

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

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

## **Die TILR-Familie des Truthuhns**

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

von Katharina Windau  
aus München

München 2013

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Cordula Poulsen Nautrup

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>CHIR.....</b>	<b>2</b>
1.1.	Allgemeines .....	2
1.2.	CHIR-A. ....	3
1.3.	CHIR-B.....	4
1.4.	CHIR-AB.....	4
1.5.	CHIR als Fc-Rezeptor .....	4
1.6.	Genomische Organisation.....	5
1.7.	CHIR-Expression.....	6
<b>2.</b>	<b>Humaner Leukozyten-Rezeptor-Komplex.....</b>	<b>6</b>
2.1.	Allgemeines.....	6
2.2.	LILR.....	7
2.3.	KIR und GPVI .....	7
2.4.	FCAR und NKp46 .....	8
2.5.	LAIR.....	9
<b>3.</b>	<b>LRC bei weiteren Säugern.....</b>	<b>10</b>
3.1.	Maus.....	10
3.2.	Affe.....	10
3.3.	Weitere.....	12
<b>4.</b>	<b>LRC bei Nicht-Säugern.....</b>	<b>14</b>
4.1.	Fisch.....	14
4.2.	Xenopus.....	14
4.3.	Ente.....	15
<b>III.</b>	<b>PUBLIKATION .....</b>	<b>16</b>
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>38</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>45</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>46</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>47</b>
<b>VIII.</b>	<b>PERSÖNLICHE DATEN .....</b>	<b>53</b>
<b>IX.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>54</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CHIR	chicken Ig-like receptor
FcR $\gamma$	gemeinsame $\gamma$ -Kette der Fc-Rezeptoren
FCAR	Fc-Rezeptor für IgA
GPVI	Glycoprotein VI
ILT	Ig-like transcript
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
ITSM	immunoreceptor tyrosine-based switch motif
KIR	killer-cell immunoglobulin-like receptor
LAIR	leukocyte associated Ig-like receptor
LILR	leukocyte Ig-like receptor
LITR	leukocyte immune-type receptor
LRC	Leukozyten-Rezeptor-Komplex
mab	monoclonal antibody
mAk	monoklonaler Antikörper
MAR	murine activatory receptor
MHC	major histocompatibility complex
NITR	novel immune-type receptor
PIR	paired Ig-like receptor
SHIP	Inositol polyphosphate 5-phosphatase
TILR	turkey Ig-like receptor
XILT	Xenopus Ig-like transcript

## I. EINLEITUNG

Chicken Ig-like receptors (CHIR) wurden erstmals 2001 von Dennis et al. beschrieben. Man hat sie entdeckt, indem mittels einer murinen paired immunoglobulin-like receptor (PIR) Sequenz die verfügbaren EST-Datenbanken des Huhns nach homologen Sequenzen durchsucht wurden. Dennis et al. beschrieben zwei chicken immunoglobulin-like receptor (CHIR) Sequenzen, eine davon wurde als CHIR-A bezeichnet, die andere CHIR-B [1]. Vier Jahre später identifizierte Viertelböck et al. sechs weitere CHIR Sequenzen, darunter befanden sich auch zwei Vertreter eines dritten Subtyps, CHIR-AB. Wie sich herausstellte, handelt es sich bei CHIR um Homologe des Leukozyten Rezeptor Komplexes (LRC) [2]. Der LRC des Bankivahuhns wurde 2010 von Lochner et al. genauer untersucht, wobei über 100 verschiedene CHIR Sequenzen bei einem Einzeltier identifiziert wurden [3]. Aber auch die CHIR-Diversität zwischen verschiedenen Hühnerlinien ist enorm [4]. Innerhalb der Hühnerlinien R11, M11 und B19 ist derzeit nur eine einzige CHIR-Sequenz bekannt, die diesen drei Hühnerlinien gemeinsam ist [5]. Eine derartige Vielfalt auf dem LRC ist bislang bei keiner anderen Spezies bekannt und wirft die Frage auf, warum diese Rezeptorfamilie beim Huhn so enorm expandiert ist. Die Lokalisation auf einem Mikrochromosom könnte dabei eine entscheidende Rolle gespielt haben.

Im Folgenden wird der Fragestellung nachgegangen, ob auch andere Vogelspezies eine CHIR-homologe Rezeptorfamilie besitzen und inwiefern diese bezüglich Diversität und Polymorphismus der CHIR-Familie ähnelt.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. CHIR

#### 1.1. Allgemeines

Chicken Ig-like receptors (CHIR) sind eine extrem expandierte, vielfältige Multigen-Rezeptorfamilie. Es handelt sich um Typ I Transmembranproteine, die der Immunglobulin-Superfamilie (IGSF) angehören. CHIR sind keiner Familie des Leukozyten Rezeptor Komplexes (LRC) des Säugers eindeutig zuzuordnen, dennoch handelt es sich um eine dem LRC synthenische Region. Die codierenden Gene konnten dem Mikrochromosom 31 zugeordnet werden, auf dem bislang keine Gene außerhalb der CHIR-Familie gefunden wurden [6]. Strukturell sind CHIR aus ein bis zwei Immunglobulin-Domänen vom C2-Typ, einer transmembranen Domäne und einer zytoplasmatischen Kette aufgebaut [6,7]. Jede Immunglobulin Domäne besitzt zwei konservierte Cysteinreste zur Ausbildung einer Disulfidbrücke [8]. Die transmembrane Domäne enthält einen konservierten Cysteinrest, dessen genaue Funktion allerdings unklar ist [6].

CHIR lassen sich in drei Gruppen einteilen: aktivierende CHIR-A, hemmende CHIR-B und bifunktionelle CHIR-AB (Abb. 1). Auffällig ist, dass sich trotz der funktionellen Gegensätze die extrazellulären Anteile sehr ähnlich sind [9]. Es wird vermutet, dass sich der heutige CHIR-Lokus ausgehend von einem inhibitorischen Vorläufermolekül im Zuge der „birth and death“ Evolution durch fortwährende Expansion und Kontraktion entwickelt hat [10,11]. Die CHIR-Diversität wurde erstmals in einer Arbeit von Laun et. al. deutlich, als bei einem Huhn (Weißes Leghorn) 103 CHIR-Loci identifiziert wurden, auf dem sich Sequenzen von 25 CHIR-A, 22 CHIR-B, 15 CHIR-AB und 41 Pseudogene befanden [10]. Bei einem einzelnen Bakivahuhn identifizierten Lochner et. al. 130 CHIR Gene, darunter 35 CHIR-A, 26 CHIR-B, 23 CHIR-AB sowie 46 Pseudogene [3]. Im Hinblick auf diese enorme Anzahl von Genen ist es durchaus vorstellbar, dass das ein Großteil des Mikrochromosom 31 aus Mitgliedern der CHIR-Familie besteht [6,7].

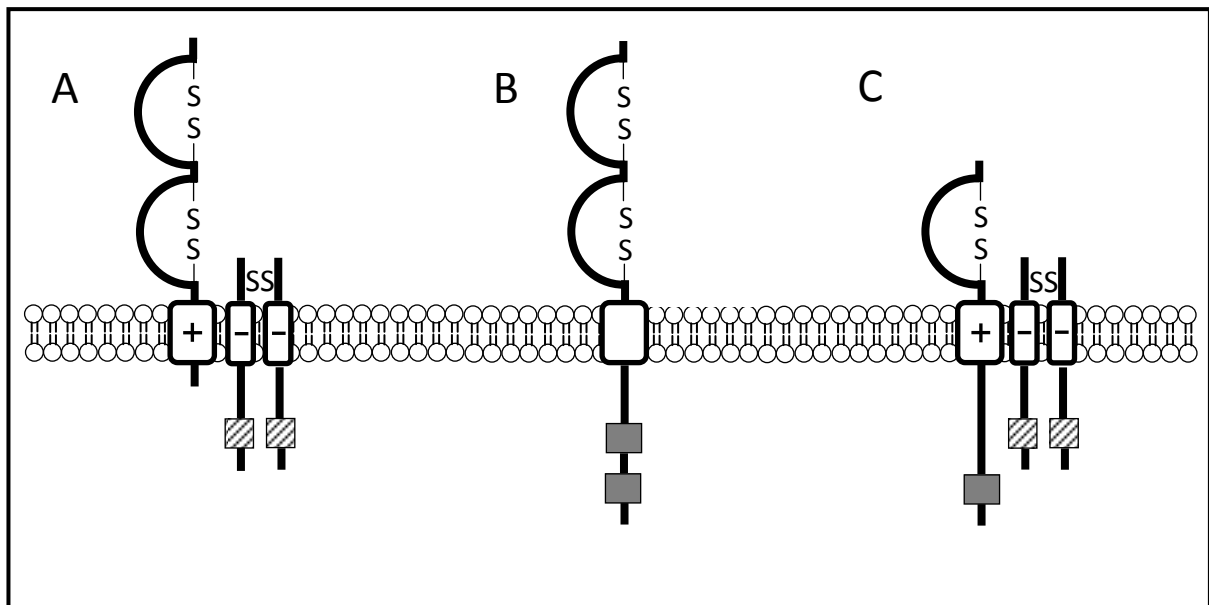


Abbildung 1: Strukturelle Darstellung von CHIR-A, CHIR-B und CHIR-AB. A. CHIR-A besitzt zwei Ig-Domänen mit je einer Disulfidbrücke (SS), einen positiv geladenen Rest im transmembranen Teil und eine kurze cytoplasmatische Kette. Das assoziierte homodimere Adaptorprotein besitzt im cytoplasmatischen Teil ein aktivierendes Signalmotiv (ITAM, dargestellt durch schraffierte Vierecke). B. CHIR-B besitzt eine längere cytoplasmatische Kette mit zwei inhibitorischen Signalmotiven (ITIM, dargestellt durch graue Vierecke). C. CHIR-AB weist nur eine Immunglobulin-Domäne auf, hat einen positiv geladenen transmembranen Rest sowie eine lange cytoplasmatische Kette mit einem Tyrosin-haltigen Signalmotiv.

## 1.2. CHIR-A

CHIR-A besitzen zwei extrazelluläre Immunglobulin-Domänen (Ig1 und Ig2), einen positiv geladenen Rest in der transmembranen Domäne sowie eine kurze cytoplasmatische Kette ohne Signalmotive. Über das transmembrane Arginin kann sich die gemeinsame  $\gamma$ -Kette der Fc-Rezeptoren (FcR $\gamma$ ) mit Hilfe eines negativ geladenen transmembranen Aspartats an den Rezeptor anlagern [12,13]. FcR $\gamma$  enthält im cytoplasmatischen Anteil ein immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), das aus der Aminosäureabfolge YxxL besteht (x steht für eine beliebige Aminosäure) und sich im Abstand von etwa sieben Aminosäuren wiederholt [14,15]. Nach Rekrutierung werden beide Tyrosinreste des ITAM durch Kinasen der Src-Familie phosphoryliert, so dass eine Bindungsstelle für SH2-Domänen-haltige Proteine der Syk-Kinase-Familie entsteht. Diese phosphorylieren weitere Moleküle und lösen ein aktivierendes Signal in der Zelle aus, welches in Form eines Calcium-Einstroms messbar ist [16,17].

### 1.3. CHIR-B

CHIR-B haben keinen basischen Rest in der transmembranen Domäne, besitzen aber im Vergleich zu CHIR-A eine deutlich längere zytoplasmatische Kette, die zwei immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIM) enthält. Diese bestehen aus der Aminosäureabfolge L/IxYxxL/V/S/I und sind durch 19 Aminosäuren getrennt [2]. ITIM sind typische Signalmotive hemmender Rezeptoren, deren Tyrosin nach Ligandenbindung durch Tyrosinkinase der Src-Familie phosphoryliert wird. Dadurch werden SH2-Domänen-haltige Proteine wie SHP-1 und SHP-2 rekrutiert, die weitere Moleküle dephosphorylieren [18]. Diese können eine vorangegangene Aktivierung der Zelle beenden und somit eine inhibitorische Wirkung ausüben [13,19]. Für den Rezeptor CHIR-B2 konnte eine verminderte B-Zell-Proliferation und somit hemmende Funktion nachgewiesen werden [18].

### 1.4. CHIR-AB

Die bifunktionellen CHIR-AB weisen sowohl Merkmale von CHIR-A als auch von CHIR-B auf. Die meisten CHIR-AB haben nur eine extrazelluläre Ig-Domäne, die strukturell der Ig1 entspricht [11]. CHIR-AB sind gekennzeichnet durch einen positiv geladenen Rest in der transmembranen Domäne und eine lange zytoplasmatische Kette mit einem ITIM-Motiv. Das N-terminale ITIM kann zu einem YxxM-Motiv abgewandelt sein und anstelle des C-terminalen ITIM findet sich gelegentlich ein „immunoreceptor tyrosine-based switch motif“ (ITSM), dessen Position -2 durch ein Threonin ersetzt ist [2]. Die aktivierende Wirkung von CHIR-AB konnte bereits nachgewiesen werden, indem durch die Assoziation mit FcRγ ein messbarer Calcium-Einstrom induziert wurde [8,20]. Ob die zytoplasmatischen ITIM-Motive auch bei CHIR-AB inhibitorische Funktion aufweisen, ist ungeklärt.

### 1.5. CHIR-AB als Fc-Rezeptor

CHIR-AB unterscheiden sich nicht nur strukturell sondern auch funktionell von CHIR-A und CHIR-B. Während kaum etwas über die Funktion der beiden letztgenannten bekannt ist, konnte die Bindung von CHIR-AB an IgY in Form einer 2:1-Stöchiometrie nachgewiesen werden [8,20]. Ob eine IgY-Bindung möglich ist oder



nicht, hängt von fünf Aminosäureresten an den Positionen 53 (Alanin), 98 (Serin), 102 (Tryptophan), 104 (Serin) und 107 (Serin) ab [5]. Der Austausch einer einzigen Aminosäure an einer dieser fünf Positionen reicht aus, um die Bindung an IgY zu unterbinden. Obwohl keine IgY-Subklassen bekannt sind, kann man zwischen stark-, schwach- und nicht-bindenden CHIR-AB unterscheiden [2,5]. CHIR-AB1 bindet an den Fc-Teil von IgY im Bereich zwischen den Domänen Cu3 und Cu4 und erinnert an die Interaktion zwischen IgA und seinem Fc-Rezeptor (FCAR). Dies ist erstaunlich, da IgY als gemeinamser Vorfahre von IgE und IgG angesehen wird, sich aber bei der Rezeptorbindung hinsichtlich Bindungsfläche und Stöchiometrie deutlich von diesen unterscheidet [21,22]. Interessanterweise ist beim Huhn kürzlich ein weiterer Fc-Rezeptor namens gallus gallus Fc-Rezeptor (ggFcR) beschrieben worden, der auf Chromosom 20 codiert wird, aber dennoch mit dem LRC verwandt ist [12]. Die Bindung von ggFcR an IgY ist deutlich schwächer als bei CHIR-AB1, erfolgt im Bereich zwischen Cu2 und Cu3 und ähnelt somit sehr der IgG-FcγR-Bindung [23].

## 1.6. Genomische Organisation

Das Signalpeptid ist, wie es für auf dem LRC lokalisierte Ig-like Moleküle typisch ist, auf zwei Exons aufgeteilt, wobei das zweite Exon 36 Basenpaare lang ist [12]. Jede Ig-Domäne wird auf einem eigenen Exon codiert, während der an die Zellmembran grenzende extrazytoplasmatische Anteil, die transmembrane Domäne sowie ein kurzer intrazellulärer Bereich gemeinsam auf Exon 5 liegen [18]. Bei CHIR-AB und CHIR-B wird die zytoplasmatische Domäne auf einem kürzeren Exon 6 und einem deutlich längeren Exon 7 codiert, wobei sich beide Signalmotive auf letzterem befinden. Bei CHIR-A werden die transmembrane Domäne und die sehr kurze zytoplasmatische Kette auf Exon 5 codiert, Exon 6 und 7 fehlen [6]. Die Exon-Intron-Struktur folgt der ag-gt-Regel, das heißt jedes Exon beginnt am 5'-Ende mit „ag“ und endet am 3'-Ende mit „gt“ [24]. Exon 1 bis 5 befinden sich in Phase 1, Exon 6 und 7 in Phase 0. Das bedeutet, dass bei Exon 1 bis 5 nur die ersten zwei Basen des Aminosäure-codierenden Triplets am 3'-Ende des Exons zu finden sind, während bei Exon 6 und 7 das gesamte Basentriplet codiert wird [24].

## 1.7. CHIR-Expression

Grundsätzlich zeigen CHIR ein relativ breites Expressionmuster und werden auf vielen verschiedenen Leukozyten exprimiert [25]. Im Gegensatz zu CHIR-AB kann CHIR-A2 nur in Anwesenheit des Adaptorproteins FcR $\gamma$  auf der Zelloberfläche exprimiert werden [6]. Während sich die CHIR-B2-Expression auf B-Zellen und eine kleine T-Zell-Subpopulation beschränkt, wird CHIR-AB1 auf vielen Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen exprimiert [18,25]. Außerdem wird CHIR-AB1 auch auf B-Zellen von PBL-Präparationen, Bursa, Milz und Caecaltonsillen sowie auf intestinalen NK-Zellen exprimiert, nicht aber auf CD3-positiven T-Zellen und Thrombozyten [20]. In Thymus und Bursa konnte bisher keine CHIR-Expression nachgewiesen werden und auch nach LPS- oder IFN- $\gamma$ -Stimulation änderte sich die Expression von CHIR nicht [2,20].

## 2. Humaner Leukozyten-Rezeptor-Komplex

Wie sich im Folgenden zeigen wird, sind CHIR keiner humanen LRC-Familie eindeutig zuzuordnen, sondern nehmen aufgrund ihrer KIR-ähnlichen genomischen Struktur und ihres LILR-ähnlichen breit gefächerten Expressionsmusters eine Zwischenstellung ein [10,25].

### 2.1. Allgemeines

Der LRC des Menschen befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 19q13 und umfasst über 40 Gene. Verteilt auf ca. 1 Mb unterteilt man die dort lokalisierten Ig-like Gene in vier Gruppen [26,27]. Zur Gruppe I gehören die leukocyte Ig-like receptors (LILR), auch Ig-like transcripts (ILT) genannt, zur Gruppe II die killer-cell Ig-like receptors (KIR) und Glycoprotein VI, zur Gruppe III die single-copy Gene Fc-Rezeptor für IgA (FCAR) und NKp46 und zur Gruppe IV die leukocyte associated Ig-like receptors (LAIR) [13,26]. Innerhalb der Multigenfamilien finden sich oft Rezeptorpaare, die an denselben Liganden binden, aber entgegengesetzte Wirkung haben [8]. Außerdem findet sich auf dem LRC die Familie der LRC-encoded novel genes (LENG), die nicht der IGSF angehört [27]. Desweiteren unterscheidet man den erweiterten LRC, zu dem unter anderem die Immunglobulin-Rezeptor-Familien

SIGLEC und CEACAM sowie die Adaptorproteine DAP10 und DAP12 zählen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll [13,28].

## 2.2. LILR

Leukocyte Ig-like receptors (LILR), auch Ig-like transcripts (ILT) genannt, liegen zentromer des KIR-Clusters auf dem LRC und sind sowohl den CHIR als auch den murinen PIR homolog [26,29]. Sie liegen in zwei entgegengesetzt orientierten, durch Duplikation entstandenen Clustern vor, zwischen denen sich zwei LAIR-Gene und eine Gruppe von LENG-Genen befinden [26,27].

Die sechs aktivierenden LILR-A und fünf inhibitorischen LILR-B besitzen eine bis vier extrazelluläre Ig-Domänen und eine transmembrane Domäne, die im Falle der aktivierenden LILR-A einen Arginin-Rest enthält und mit FcRγ assoziiert [13,27,30]. LILR-B besitzen eine lange zytoplasmatische Domäne mit zwei bis vier inhibitorischen Signalmotiven [29]. Desweiteren existieren zwei LILR-Pseudogene [13]. LILR haben ein sehr weites Expressionspektrum und werden auf Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen exprimiert [29,31]. Als Ligand sind bisher Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) Klasse I Moleküle bekannt [13].

## 2.3. KIR und GPVI

KIR besitzen zwei bis drei Ig-Domänen und werden dem entsprechend als KIR2D beziehungsweise KIR3D bezeichnet [26]. In Abhängigkeit von der Länge der zytoplasmatischen Kette werden sie beim Vorhandensein von zwei Ig-Domänen als KIR2DL (Long) oder KIR2DS (Short) bezeichnet und schließen sowohl inhibitorische als auch aktivierende Mitglieder ein [32]. Letztere können über ein transmembranes Lysin mit DAP12 assoziieren [33]. KIR2DL4 nimmt eine Sonderstellung ein, denn dieser Rezeptor besitzt einen positiv geladenen Rest in der transmembranen Domäne und eine lange zytoplasmatische Kette mit einem ITIM-Motiv [34]. Im Gegensatz zu anderen KIR besitzt KIR2DL4 ein Arginin in der transmembranen Domäne und assoziiert nicht mit DAP12, sondern mit FcRγ [35]. Die aktivierenden Eigenschaften von KIR2DL4 konnten bereits nachgewiesen werden, aber auch über

eine potentiell inhibitorische Funktion wird spekuliert [36]. Die genomische Organisation der KIR ist den CHIR sehr ähnlich, insbesondere bezüglich der Lokalisation einzelner Domänen auf verschiedenen Exons [37]. Desweiteren unterscheidet man beim Mensch zwei Haplotypen (A und B), die sich in der Zusammensetzung der einzelnen KIR-Vertreter unterscheiden [38]. KIR binden an MHC Klasse I Moleküle und werden überwiegend auf NK-Zellen, aber auch auf einer kleinen T-Zell-Subpopulation exprimiert [14,39]. Mit Hilfe der KIR ist es zytotoxischen NK- und T-Zellen möglich viral infizierte und tumorös entartete Zellen zu erkennen und effektiv zu beseitigen [40].

Glykoprotein VI (GPVI) wird ausschließlich auf Blutplättchen und Megakaryozyten exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Kollagen-induzierten Plättchen-Aktivierung [41,42]. GPVI besitzt zwei Ig-Domänen und eine 51 Aminosäuren lange zytoplasmatische Kette ohne Tyrosin-haltige Signalmotive [43]. Über ein transmembranes Arginin kann GPVI mit FcRγ assoziieren, wobei sich der Komplex aus zwei GPVI-Molekülen und einem FcRγ-Dimer zusammensetzt [43]. Im daran anschließenden Signalweg sind sich GPVI und Immunrezeptoren sehr ähnlich [44].

#### **2.4. FCAR und NKp46**

FCAR (CD89) kommt eine besondere Bedeutung zu, da dies der einzige humane Fc-Rezeptor ist, der auf dem LRC codiert wird und außerhalb des Fc-Rezeptor-Komplexes auf Chromosom 1 liegt [45,46]. FCAR wird auf Makrophagen, Monozyten, Eosinophilen und Granulozyten exprimiert und besitzt zwei extrazelluläre Ig-Domänen, einen positiv geladenen Rest in der transmembranen Domäne und eine kurze zytoplasmatische Kette [13,47]. Die Bindung an FcRγ ist im Gegensatz zu GPVI für die Expression auf der Zelloberfläche nicht zwingend erforderlich [20]. Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt letztendlich eine Freisetzung von TNF $\alpha$  und Interleukin 6 (IL-6) [48]. Interessanterweise erinnert die Bindung von FCAR an IgA im Bereich zwischen der C $\alpha$ 2 und C $\alpha$ 3-Domäne sehr an die CHIR-AB1:IgY-Bindung [21].

NKp46 gehört zusammen mit NKp44 und NKp30 zur Gruppe der natural cytotoxicity receptors (NCR), wobei nur NKp46 in unmittelbarer Nachbarschaft zu FCAR

auf dem LRC codiert wird [13]. Die Gene von NKp44 und NKp30 befinden sich auf dem Chromosomenabschnitt 6q21 [25]. NKp46 hat zwei extrazelluläre Ig-Domänen und eine kurze zytoplasmatische Domäne ohne Signalmotive. Über einen Argininrest in der transmembranen Domäne kann der Rezeptor mit FcR $\gamma$  oder CD3 $\zeta$  assoziieren [49,50]. NKp46 bindet mit der Ig2-Domäne an Hämagglutinin von Virusinfizierten Zellen und spielt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Abtötung infizierter oder tumorös entarteter Zellen [51,52]. Alle drei NCR werden ausschließlich auf NK-Zellen exprimiert und tragen wesentlich zur zytotoxischen Funktion der NK-Zellen bei [49,53].

## 2.5. LAIR

Bislang sind zwei leukocyte associated Ig-like receptor (LAIR) Gene bekannt, LAIR-1 (CD305) und LAIR-2. LAIR-1 befindet sich am Rand des centromeren LILR-Clusters, LAIR-2 ist dem telomeren LILR-Cluster angehängt [26]. Das lösliche LAIR-2 besitzt weder eine transmembrane noch eine zytoplasmatische Domäne, bindet an Kollagen und kann die LAIR-1-Kollagen-Interaktion unterbinden [54,55].

LAIR-1 besitzt eine extrazelluläre Ig-Domäne und zwei ITIM-Motive in der zytoplasmatischen Domäne [56]. LAIR-1 bindet wie LAIR-2 an Kollagen und hemmt die zytotoxische Wirkung von NK-Zellen und T-Zellen [57,58]. In B-Zellen bewirkt LAIR-1 eine Downregulation der Calcium-Freisetzung und hemmt in Monozyten die GM-CSF-induzierte Reifung zu dendritischen Zellen [59,60]. LAIR werden auf NK-Zellen, T-Zellen, B-Zellen, Thymozyten, Monozyten, dendritischen Zellen, Eosinophilen, Basophilen, Mastzellen, CD34<sup>+</sup>-Zellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen, also auf fast allen Immunzellen exprimiert [13,55].

### 3. LRC bei weiteren Säugern

#### 3.1. Maus

Der LRC der Maus auf Chromosom 7 ist deutlich weniger polymorph als der LRC des Menschen und umfasst die paired Ig-like receptors (PIR), Ly94 und GPVI [26]. Die PIR-Familie ist sowohl zu den LILR als auch zu den CHIR homolog und besteht aus elf aktivierenden PIR-A und einem hemmenden PIR-B [1,26]. Aktivierende PIR-A können mit FcR $\gamma$  assoziieren, während inhibitorische PIR-B zwei ITIM-Motive in der zytoplasmatischen Domäne besitzen, über die sie SHP-1 und SHP-2 rekrutieren können [14,61]. PIR weisen sechs Ig-Domänen auf und werden auf myeloiden und dendritischen Zellen sowie auf B-Zellen exprimiert [1,61]. Über die Liganden ist bislang nur bekannt, dass auf Monozyten exprimiertes PIR-B an tetramere HLA-G-Komplexe bindet [62]. Außerdem sind bei der Maus zwei KIR-ähnliche Moleküle bekannt, die allerdings auf Chromosom X und somit außerhalb des murinen LRC codiert sind [33].

Ly94, auch murine activatory receptor 1 (MAR-1) genannt, ist dem humanen NKp46 homolog und zu 58% mit diesem identisch [63,64]. Ly94 besitzt zwei C2-Typ Ig-like Domänen, ein Arginin als positiv geladenen Rest in der transmembranen Domäne sowie eine zytoplasmatische Kette ohne Tyrosin-haltige Signalmotive und wird ausschließlich auf NK-Zellen exprimiert [64].

Das murine GPVI ist dem des Menschen strukturell und funktionell sehr ähnlich, daher soll in diesem Rahmen nicht näher darauf eingegangen werden [42].

#### 3.2. LRC des Affen

Die bisher identifizierten KIR der Affen lassen sich in fünf Gruppen einteilen, die im Folgenden kurz dargestellt werden [65]. KIR2DL5 befindet sich am zentromeren Ende des KIR Clusters und ist etwa zu 80% mit dem humanen KIR2DL5 identisch [65,66]. Beim Chimpanse hat man ein einzelnes KIR2DL5-Homolog gefunden, während man beim Rhesus-Affen zwei Subtypen unterscheidet, KIR2DL5.1 und KIRDL5.2. KIR1D hat nur eine vollständige Ig-Domäne und tritt in vielen verschiedenen Splice-Varianten auf. Durch ein frühzeitiges Stoppcodon enthalten die Transkripte eine bis eineinhalb Ig-Domänen, manche Varianten besitzen auch eine trans-

membrane sowie eine zytoplasmatische Domäne mit ITIM-Motiven [66]. Das KIR2DL4-Molekül des Chimpanzen ist dem des Menschen sehr ähnlich, beim Rhesusaffen hingegen existieren zwei Varianten, die im Gegensatz zu Mensch und Chimpanse zwei zytoplasmatische ITIM-Motive enthalten. KIR2DL4 ist das am höchsten konservierte KIR der Primaten und ist bei Menschen, Menschenaffen und Altweltaffen auffindbar [65]. KIR3DL zeigen einen ausgeprägten Polymorphismus sowohl auf der genomischen als auch auf der transkriptionalen Ebene. Während beim Menschen nur zwei KIR3DL-Formen bekannt sind, hat man beim Chimpanzen fünf und beim Rhesusaffen sogar elf Varianten gefunden [66,67]. Bei KIR3DH handelt es sich um ein Hybrid, dessen extrazytoplasmatischer Teil von KIR3DL stammt, in der transmembranen Domänen aber wie KIR2DL4 ein Arginin enthält und eine kurze zytoplasmatische Kette ohne ITIM-Motive besitzt [65,67]. KIR3DH wurde bislang nur beim Rhesus-Affen beschrieben und es wird angenommen, dass KIR3DH den bei Mensch und Chimpanse vorkommenden aktivierenden KIR3DS und KIR2DS homolog sind [66]. Nicht alle Affenarten weisen KIR aus allen fünf Gruppen auf, so fehlt den Grünmeerkatzen KIR1D, während den Schwarz-weißen Stummelaffen KIR1D und KIR2DL4 fehlen [65,68]. Bei Grünmeerkatzen und Anubispavianen hingegen ist zusätzlich je ein KIR2DP-Pseudogen bekannt [65]. Dieser Spezies-spezifische Polymorphismus zeigt, dass sich der KIR-Lokus sehr schnell entwickelt hat [67].

Interessanterweise haben sich die aktivierenden Rezeptoren der Altweltaffen und die des Menschen unabhängig voneinander entwickelt. Während die aktivierenden KIR bei Altweltaffen in der KIR3DH-Gruppe zu finden, Arginin statt Lysin enthalten und wahrscheinlich über das Adaptorprotein FcR $\gamma$  und nicht über DAP12 ein aktivierendes Signal übermitteln, gehören die aktivierenden KIR beim Menschen zur KIR3DS/KIR2DS-Gruppe, die bei Altweltaffen nicht beschrieben ist [65]. Zusammen mit der Tatsache, dass beim Rhesusaffen auch Haplotypen ohne aktivierende Vertreter bekannt sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass sich die aktivierenden KIR ausgehend von einem inhibitorischen Vorläufer entwickelt haben [65].

Der KIR-Cluster der Affen ist durch hohe Haplotyp-Diversität und vielfältigen Genpolymorphismus gekennzeichnet [65]. Bei Rhesusaffen ist der Polymorphismus so enorm, dass bei 19 untersuchten Tieren insgesamt 70 KIR-Sequenzen gefunden wurden, wobei jedes Einzeltier zwischen sechs und 13 KIR besitzt [69]. Der größte Teil der KIR-Komplexität kommt sowohl bei Altwelt- als auch bei Neuweltaffen durch

die Expansion der Gruppen KIR3DL und KIR3DH zustande [70]. Durch eine große Anzahl verschiedener KIR wird die Wahrscheinlichkeit verringert, dass ein Pathogen der Erkennung durch das Immunsystem entkommt. Hätten alle Individuen einer Population dasselbe KIR-Repertoire, wäre sie sehr empfindlich gegenüber pathogenen Erregern. Verschiedene Haplotypen, die sich in der Genzusammensetzung deutlich unterscheiden, wirken dem entgegen und bieten so einen Selektionsvorteil [69]. Damit dieses System funktioniert, müssen sich die Peptid-präsentierenden Moleküle in Einklang mit ihren Rezeptoren weiterentwickeln. Wie sich zeigte, sind KIR und ihre Liganden, MHC Klasse I Moleküle, im Sinne einer Co-Evolution expandiert, wobei es auch hier deutliche Spezies-spezifische Unterschiede gibt. Während sich bei Altweltaffen KIR der Linie II zusammen mit den bei diesen Tieren vorkommenden HLA-A und HLA-B-Homologen entwickelt haben, sind beim Orangutan die Gruppe der MHC-C-Moleküle zusammen mit KIR der Linie III expandiert [70]. Im Gegensatz dazu konnten bei Rhesusaffen, die keine HLA-C-Moleküle besitzen, auch keine KIR2DL-Moleküle gefunden werden [67].

### 3.3. Weitere Säuger

Beim Rind hat man bereits zahlreiche KIR-Sequenzen gefunden. Diese befinden sich auf Chromosom 18 und umfassen sowohl aktivierende als auch inhibitorische Vertreter [71]. Im Gegensatz zum Menschen besitzen die meisten bovinen KIR drei Ig-Domänen und nur ein ITIM in der zytoplasmatischen Domäne [72]. Man geht davon aus, dass sich ein ursprüngliches KIR3DL-Gen vor etwa 136 Millionen Jahren erstmals dupliziert hat, aus dessen Produkten die KIR-Linien KIR3DL und KIR3DX entstanden sind [70]. Interessanterweise entspricht der Großteil der bovinen KIR dem KIR3DX1 des Menschen, dessen Funktion unbekannt ist, während alle anderen humanen KIR von einer anderen KIR-Linie abstammen, die beim Rind als single-copy Gen vorhanden ist. [72,73]. Wie auch beim Menschen unterscheidet man verschiedene Haplotypen, wobei durchschnittlich fünf bis acht funktionelle KIR sowie zwei bis drei Pseudogene einen bovinen KIR-Haplotyp bilden [71]. Das Rind ist bislang die einzige Spezies außerhalb der Primaten, bei der eine Expansion des KIR-Lokus beschrieben wurde. Wie auch beim Menschen hat man zudem auf Chromosom 5 im NK-Zell-Rezeptor-Komplex ein einzelnes Ly49-Gen gefunden, das allerdings potentiell inhibitorische Wirkung hat [72].



Auch bei Schwein, Hund und Katze wurde ein einzelnes Ly49 Gen gefunden und mittels Southern-Blot bestätigt, dass es sich um single-copy-Gene handelt [74]. Während beim Hund im Bereich zwischen LILR und FCAR keine KIR-Sequenz auffindbar war, besitzt die Katze in diesem Bereich ein KIR3DL-Gen, das allerdings aufgrund einer Deletion in Exon 1 nicht funktionell ist [75]. Auch beim Schwein wurde ein KIR-Gen nachgewiesen. Dieses KIR2DL1 hat zwei Ig-Domänen, zwei ITIM-Motive und liegt auf Chromosom 6, eingerahmt von drei LILR-Genen und dem FCAR-Gen [76].

Eine besondere Situation liegt beim Pferd vor. Wie die Nager besitzt das Pferd auf Chromosom 6 mehrere Ly49-Gene, fünf inhibitorische und ein aktivierendes. Insgesamt sind 16 transkribierte Ly49-Sequenzen bekannt [77]. Als mögliche Ursache für die außerhalb der Nager ungewöhnliche Ly49-Expansion wird das Vorkommen der KIR-ILT-Hybride auf Chromosom 10 angesehen. Diese sind bislang nur beim Pferd beschrieben, und enthalten entweder ein frühzeitiges Stoppcodon oder Verschiebungen im Leseraster. Während die Ig-Domänen dieser Hybride sehr KIR-ähnlich sind, scheinen die weiter distal gelegenen Bereiche von ILT-Proteinen zu stammen. Eventuell hat diese Crossing-over-Reaktion die Funktion der ursprünglichen Proteine beeinträchtigt und auf diese Weise die Expansion des Ly49-Lokus vorangetrieben. Außerdem besitzt das Pferd zwei KIR3DL-Gene, die sich in nur einer Aminosäure unterscheiden und aufgrund eines veränderten ITIM-Motives wahrscheinlich nicht funktionell sind [77].

Auch bei vier marinen Säugern wurden je ein KIR- und ein Ly49-Gen gefunden. Mittels Southern-Blot wurde bestätigt, dass es sich dabei um single-copy Gene handelt [75]. Wie man sieht, ist die Expansion einer dieser beiden Rezeptorfamilien für eine langfristige Arterhaltung nicht zwingend erforderlich. Während das KIR-Gen des Seelöwen nur zwei Ig-Domänen besitzt, haben die KIR-Gene von Seehund, Kegelrobbe und Weddelrobbe drei Ig-Domänen und sind zu 95,8 bis 99,8% identisch. Interessanterweise gehören diese KIR der KIR3DL-Linie an, und nicht der beim Rind expandierten KIR3DX-Linie. Bei der Kegelrobbe konnte zudem nachgewiesen werden, dass das KIR-Gen zwischen FCAR- und mehreren, teils unvollständigen LILR-Genen lokalisiert ist [75]. Auch die Ly49-Gene sind zu 94,2 bis 99,9% identisch und besitzen ein intaktes ITIM-Motiv sowie konservierte Cysteinreste zur Ausbildung von Disulfidbrücken. Es wird vermutet, dass die Situation bei den Flossenfüßlern die ursprüngliche Situation bei Plazentatieren darstellt [75].

## 4. LRC bei Nicht-Säugetern

### 4.1. Fisch

Bei Fischen sind derzeit zwei LRC-homologe Rezeptorfamilien bekannt, die leukocyte immune-type receptors (LITR) und die novel immune-type receptors (NITR).

LITR wurden erstmals beim Katzenwels beschrieben und auch beim Zebrafisch hat man mittels EST-Datenbanken LITR-homologe Sequenzen gefunden [78]. Es handelt sich um Typ I Transmembranproteine mit drei bis sechs Ig-Domänen vom C2-Typ, die wie beim Säuger potentiell inhibitorische und aktivierende Vertreter einschließen. Letztere können mit den beim Katzenwels vorkommenden Homologen von FcR $\gamma$ , FcR $\gamma$ -like und CD3 $\zeta$ -like assoziieren [25,79]. Southern Blot Analysen weisen darauf hin, dass es sich um eine polygenetische und polymorphe Rezeptorfamilie handelt. Das Besondere an dieser Rezeptorfamilie ist, dass manche Ig-Domänen bei BLAST-Analysen den Fc-Rezeptoren am ähnlichsten sind, andere hingegen ähneln mehr den LRC-codierten Rezeptoren. Stafford et. al. vermuten, dass die LITR-Familie durch vielfache Duplikation und Translokation aus dem gemeinsamen Vorläufer der Fc-Rezeptoren und LRC-codierten Rezeptoren entstanden ist [78].

NITR wurden bisher bei Zebrafisch, Pufferfisch, Katzenwels und Regenbogenforellen beschrieben [80]. Sie werden in zwölf Familien eingeteilt und umfassen insgesamt 36 Gene sowie einige Pseudogene. Interessanterweise befinden sich im NITR-Cluster auch drei C-Typ Lektin-Gene [81]. NITR besitzen eine V- und eine V-like C2-Domäne, eine transmembrane Domäne und eine zytoplasmatische Kette, die ITIM-Motive enthalten kann [82]. Potentiell aktivierende Vertreter assoziieren wie die KIR mit DAP12 und sind auch hinsichtlich der genomischen Struktur den KIR sehr ähnlich [25,83]. Durch ihre V-Domäne stehen sie sowohl mit Immunglobulinen als auch mit TCR in enger Verwandtschaft [82].

### 4.2. Xenopus

Auch in *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* hat man KIR- beziehungsweise CHIR-homologe Proteine gefunden [84]. Bei diesen so genannten *Xenopus* Ig-like

receptors (XILR) handelt es sich um Typ I Transmembranproteine mit ein bis drei extrazellulären Ig-Domänen vom C2-Typ. Manche Vertreter besitzen in Form von ITSM oder ITAM Tyrosin-haltige Signalmotive in der zytoplasmatischen Kette [25]. Durch das konservierte NxxR-Motiv in der transmembranen Domäne ist eine Assoziation mit FcR $\gamma$  möglich, so dass ihnen eine aktivierende Funktion zugesprochen wird [84].

### **4.3. Ente**

Bereits 2007 haben MacDonald et. al. erste Studien durchgeführt um CHIR-Homologe bei der Ente aufzuspüren. Zwar konnten in den EST-Datenbanken bei der Ente über 200 immunologisch relevante Gene identifiziert werden, allerdings befanden sich darunter keine CHIR-ähnlichen Sequenzen [85]. Auch die Versuche über DNA-Sonden im Southern-Blot CHIR-Homologe aufzuspüren, blieben ebenso erfolglos wie die Amplifikationsversuche mittels PCR. MacDonald et. al. schlussfolgerten, dass sich potentielle CHIR-Homologe bei der Ente, sofern vorhanden, zu mindestens 70% von der CHIR-Nukleotidsequenz unterscheiden müssten [85].

Das Ziel dieser Dissertation bestand darin, CHIR-homologe Rezeptorfamilien bei anderen Vogelarten auffindig zu machen und näher zu beschreiben.

### III. PUBLIKATION

#### **The turkey Ig-like receptor family: identification, expression and function**

Katharina Windau<sup>a</sup>, Birgit C. Viertlboeck<sup>a</sup>, and Thomas W. Göbel<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Institute for Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, University of Munich, Veterinärstr. 13, 80539 Munich, Germany

\* Corresponding author: Tel.: +49 89 2180 3827; fax: +49 89 2180 2552;

E-mail address: goebel@lmu.de (T.W. Göbel).

## Abstract

The chicken leukocyte receptor complex located on microchromosome 31 encodes the chicken Ig-like receptors (CHIR), a vastly expanded gene family which can be further divided into three subgroups: activating CHIR-A, bifunctional CHIR-AB and inhibitory CHIR-B. Here, we investigated the presence of CHIR homologues in other bird species. The available genome databases of turkey, duck and zebra finch were screened with different strategies including BLAST searches employing various CHIR sequences, and keyword searches. We could not identify CHIR homologues in the distantly related zebra finch and duck, however, several partial and complete sequences of CHIR homologues were identified on chromosome 3 of the turkey genome. They were designated as turkey Ig-like receptors (TILR). Using cDNA derived from turkey blood and spleen RNA, six full length TILR could be amplified and further divided according to the typical sequence features into one activating TILR-A, one inhibitory TILR-B and four bifunctional TILR-AB. Since the TILR-AB sequences all displayed the critical residues shown to be involved in binding to IgY, we next confirmed the IgY binding using a soluble TILR-AB1-hulg fusion protein. This fusion protein reacted with IgY derived from various gallinaceous birds, but not with IgY from other bird species. Finally, we tested various mab directed against CHIR for their crossreactivity with either turkey or duck leukocytes. Whereas no staining was detectable with duck cells, the CHIR-AB1 specific mab 8D12 and the CHIR-A2 specific mab 13E2 both reacted with a leukocyte subpopulation that was further identified as thrombocytes by double immunofluorescence employing B-cell, T-cell and thrombocyte specific reagents. In summary, although the turkey harbors similar LRC genes as the chicken, their distribution seems to be distinct with predominance on thrombocytes rather than lymphocytes.

## Introduction

The leukocyte receptor complex (LRC) is located on human chromosome 19q13.4 spanning about one Mb and it contains more than 40 genes including both multigene families like human killer cell Ig-like receptors (KIR) or leukocyte Ig-like receptors (LILR) as well as single copy genes like NKp46 or FCAR [1,2]. Comparative analyses of the LRC between different mammals have revealed an extraordinary flexibility concerning gene number and haplotypes [3,4]. For instance,

the KIR gene family has been vastly expanded in man, but mice lack KIR within the LRC; instead, two KIR-like genes have been found on chromosome X [5]. Apart from mammals, gene families that are similar to the LRC encoded genes have been identified in zebra fish and channel catfish named leukocyte immune-type receptors (LITR), as well as so called novel immune-type receptors (NITR) in zebra fish and bony fish [6-8].

The chicken LRC is located on microchromosome 31 and encodes a single gene family designated chicken Ig-like receptor (CHIR) genes [9-11]. CHIR are a vastly expanded, highly diversified and polymorphic multigene family with more than 100 expressed genes in a single animal [12,13]. They are classified as type I transmembrane proteins with either one or two C2-type Ig-like domains and are further divided into subgroups of activating CHIR-A, inhibitory CHIR-B and bifunctional CHIR-AB [10].

Activating receptors typically possess a short cytoplasmic tail without any signalling motifs, but a positively charged residue in the transmembrane domain [10,12]. This charged residue allows the receptor to associate with an adaptor molecule like FcεR1γ mediating activation via an immunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM) [14,15].

In contrast, inhibitory receptors lack this charged residue in the transmembrane domain, but possess a long cytoplasmic tail containing immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIM). The ITIM motif consists of a six amino acid consensus motif, composed of L/VxYxxV/S/I/L, whereby x represents any amino acid. Ligation of the inhibitory receptor induces tyrosine phosphorylation, thereby creating a binding site for SH2 domain containing molecules and recruitment of phosphotyrosine phosphatases like SHIP, SHP-1 or SHP-2 [9,16].

Bifunctional CHIR-AB proteins combine features of both, exhibiting a positively charged residue in the transmembrane domain and a long cytoplasmic tail including two ITIM. The membrane-proximal ITIM can be modified to an immune receptor tyrosine-based switch motif (ITSM), exchanging position -2 by a threonine instead of valine or leucine, or YxxM [10]. In comparison, the human KIR cluster also encodes similar activating and inhibitory receptors, as well as a unique receptor, KIR2DL4, that displays features of a bifunctional receptor [14,17].

The function of CHIR in the chicken immune system are mostly unknown [11]. To date, only one CHIR ligand has been identified [14]. The bifunctional CHIR-AB1 binds to the Fc portion of IgY, an ancestral immunoglobulin isotype that is believed to be the precursor of mammalian IgG and IgE [18,19]. Further analysis in various chicken lines identified almost 20 expressed CHIR-AB genes with variable binding properties to IgY ranging from undetectable to high affinity binding [20]. The binding depends on five critical amino acid residues that form a binding site as predicted by the three-dimensional structure [20,21]. It has been further demonstrated that two CHIR-AB molecules bind a single IgY and the binding takes place at the Fc $\alpha$ 3/Fc $\alpha$ 4 domains, a site similar to the binding of IgA to the FCAR, but distinct from most mammalian Fc $\gamma$ R. Hence the CHIR-AB-IgY-interaction resembles the binding pattern of Fc $\alpha$ RI to the CH2 / CH3-domain of IgA [22].

CHIR are presumably generated by “birth and death” evolution [23] frequently observed in multigene families where multiple duplications and deletions create an expanded gene family of one or few ancestral genes that maybe further shaped by a pathogen-driven selection process [24]. The location of the CHIR gene cluster on a microchromosome may have additionally favoured this process. In other bird species apart from chickens no CHIR-orthologs are known. For instance, CHIR could not be identified in ducks by several strategies including DNA cross-hybridization with chicken probes and PCR approaches [25].

The recent progress regarding genomic databases of various birds has now provided new means of identifying CHIR homologues in other birds. Here we provide evidence for the conservation of prototypic CHIR in turkeys, a bird species closely related to chickens. These genes were designated turkey Ig-like receptors (TILR). In contrast, we were not able to identify CHIR homologues in more distantly related species. We further show that a subfamily of TILR also functions as a receptor for IgY, but that its expression pattern markedly differs from that in chickens.

## Materials and Methods

### *Animals*

Blood and spleen samples of lines Bxx and Bronze Kelly were obtained directly following the slaughtering process from healthy animals that were slaughtered for meat production (therefore no approval of an ethics committee is required). They were kindly provided by the slaughtering company "Süddeutsche Truthahn AG" (Ampfing, Germany). The blood samples were collected in heparin to prevent coagulation. The non-fertilized turkey egg for IgY isolation was a kind gift from Putenbrütereier Böcker (Wallhausen, Germany).

### *Database searches*

For the identification of CHIR homologues in other bird species via databases, known CHIR sequences were used. Both NCBI blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) browsing protein database using a translated nucleotide query and ensemble genome browser blat searches (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>) looking for CHIR homologues especially in turkey (*Meleagris gallopavo*, assembly Turkey\_2.01) and zebra finch (*Taeniopygia guttata*, assembly taeGut3.2.4) were applied. For duck only data from Ensemble Pre were available ([http://pre.ensembl.org/Anas\\_platyrhynchos/Info/Index](http://pre.ensembl.org/Anas_platyrhynchos/Info/Index)). Furthermore the keyword search function of ensemble genome browser was used as well as EST databases.

### *Cloning procedures*

A part of a turkey spleen was immediately taken in Ambion RNA<sup>later</sup> (Invitrogen life technologies, Darmstadt, Germany) and after storage over night at 4°C RNA was isolated by Trizol reagent (Peqlab, Erlangen, Germany). PBMC of a blood sample (Bxx line) were prepared by density centrifugation using Ficoll (Biochrom, Berlin, Germany) and subsequently RNA was isolated. Both spleen and PBMC RNA were reverse transcribed using the ThermoScript<sup>TM</sup> RT-PCR System (Invitrogen life technologies, Darmstadt, Germany). Primers were designed according to partial sequences in the database and synthesized (Eurofins MWG Operon, Ebersberg,



Germany). 5'ATGGCACCAATGGCGCTGGC-3' was used as a common sense primer for amplifying TILR. 5'-CCTGCAGGGCTCCCATCTCT-3' served as anti-sense primer for TILR-A, 5'-CACGGTAATTCAGTGCTCACTGTGG-3' for TILR-AB and 5'-CGTGCCACCTCGGCGTAGATA-3' for TILR-B. Using Herculase II Fusion DNA-Polymerase (Agilent technologies, Waldbronn, Germany) PCR conditions were as follows: initial denaturation for 1 min at 94°C, three cycles at 94°C for 20 s, 65°C for 20 s and 68°C for 1 min. After that every three cycles the annealing temperature was decreased in steps of 1.0°C as far as the 21st cycle was finished. Then 13 cycles at 94°C for 20 s, 58°C for 20 s and 68°C for 1 min were added followed by a final extension at 68°C for 4 min. After purification with Wizard®SV Gel and PCR Clean-up system (Promega, Mannheim, Germany) the PCR product was cloned into pcR® Blunt II TOPO® vector (Invitrogen life technologies, Darmstadt, Germany). Colonies were tested by PCR and the plasmids from positive colonies were isolated using PureYield™ Plasmid Miniprep system (Promega, Mannheim, Germany) and sequenced (GATC, Konstanz, Germany). Sequence analysis and alignment were performed using NCBI database and DNASTAR Lasergene software package (Madison, USA). All new data has been deposited in GenBank, accession numbers are indicated in the figure legends.

#### *Generation of soluble TILR-AB1*

For the soluble form of TILR-AB1 (denoted as TILR-AB1-hulg) the two Ig domains of TILR-AB1 were amplified with the sense-primer 5'-GAATTCCCTGCCCCACCCT-3' and the anti-sense primer 5'-GAATTCGCTCCCATGGGACCG-3' (restriction sites underlined) encoding the beginning of the Ig1 and the end of the Ig2 domain. PCR was performed using Herculase II Fusion DNA-Polymerase (Agilent technologies, Waldbronn, Germany) with following PCR conditions: initial denaturation for 1 min at 94°C, 30 cycles at 94°C for 20 s, 65°C for 20 s and 68°C for 1 min adding a final extension at 68°C for 4 min using TILR-AB1 plasmid as template. The PCR product was cloned into pcR® Blunt II TOPO® vector (Invitrogen life technologies, Darmstadt, Germany). After sequencing (GATC, Konstanz, Germany) and digestion with EcoRI (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) the insert was ligated in pcDNA3.1/V5-His vector fusing the extracytoplasmic region of TILR-AB1 to the C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 domain of human IgG1 [20].

### *Stable transfection and purification*

Human embryonic kidney 293 cells were cultivated in RPMI with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin added in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Using Metafectene reagent (Biontex, Martinsried/Planegg, Germany) 293 cells were transfected with the TILR-AB1-hulg construct according to the manufacturer's instructions. After 24 h 800 µg/ml G418 (AppliChem, Darmstadt, Germany) were added to the culture medium for selection of stable transfected cells and the resulting clones were screened for the expression of TILR-AB1-hulg on the cell surface via sandwich ELISA [20]. For this purpose, an ELISA plate was coated with anti-human IgG UNLB antibody (3 µg/ml, SouthernBiotech, Birmingham, USA), supernatants of the transfected clones were added and detected by goat anti-human IgG HRP (1:4.000, SouthernBiotech, Birmingham, USA). Positive clones were selected and further expanded, and supernatants were subsequently purified using a protein A agarose column according to standard procedures.

### *IgY isolation and ELISA*

Turkey IgY was isolated from yolk using standard procedures [26], chicken IgY was received from Jackson ImmunoResearch Europe Ltd (Newmarket, Suffolk, UK). IgY of duck, grey parrot, pheasant, hawk and quail were kindly provided by B. Kaspers (Institute for Animal Physiology, University of Munich, Munich, Germany). ELISA plates were coated with IgY of turkey, chicken, pheasant, quail, hawk, duck and grey parrot (10 µg/ml). TILR-AB1-hulg was added (1 µg/ml) preparing a log<sub>2</sub> dilution series using PBS-T and detected by goat anti-human IgG HRP (1:4.000, SouthernBiotech, Birmingham, USA).

### *Flow cytometry*

PBMC of a blood sample from chicken, duck and turkey were isolated by Ficoll (Biochrom, Berlin, Germany) [27].  $1 \times 10^6$  cells were stained with the following mAb: 8D12 (CHIR-AB1, IgG2a) [14], 13E2 (CHIR-A2, IgG3, unpublished), 23C6 ( $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin, IgG1, Serotec) [28] followed by anti-mouse Ig-FITC conjugate (SouthernBiotech, Birmingham, USA). The CHIR specific mAb were produced by immunisation of mice with cells stably expressing the respective CHIR and

validating reactivity on untransfected versus transfected cells as well as on CHIR-fusion proteins in ELISA. For double staining of turkey PBMC, cells were incubated with a primary mab including the mab listed above as well as CT4 (CD4, IgG1), 3-298 (CD8, IgG2b), 2G11 (MHC class II, IgG1). In all cases, subclass specific goat anti mouse IgG2a (for 8D12) or IgG3-FITC (for 13E2) in combination with goat-anti-mouse IgG1-PE (in the case of CT4, 23C6, 2G11), or IgG2b-PE (in the case of 3-298) conjugates were used (SouthernBiotech, Birmingham, USA). Measurements were performed by FACS Canto II flow cytometer using BD FACSDiva software (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany).

## Results

### *Three prototypic turkey Ig-like receptors (TILR) can be distinguished*

Using various prototypic CHIR sequences, the NCBI and ENSEMBL genome browser databases were screened for CHIR homologues in the genomes of turkey, zebra finch and duck. All our attempts to identify CHIR homologues in the latter species failed, whereas in turkey we could identify several CHIR-like fragments, but no full length genomic sequence. We therefore designed oligonucleotides to amplify TILR in cDNA derived from blood or spleen. This approach yielded a total of six novel cDNA sequences that were designated “turkey Ig-like receptors” (TILR) (Fig. 1 to 3). In the current improved assembly of the turkey genome, additional three full length TILR sequences were annotated on chromosome 3 (accession numbers: XP\_003204731, XP\_003204732, XP\_003204726)

All the TILR shared typical features of LRC members such as two Ig domains in the case of TILR-A and TILR-B and a single Ig domain for TILR-AB. All Ig domains were identified as C2-type Ig domains. The transmembrane regions of all TILR sequences shared a highly conserved cysteine (Fig. 1 to 3, marked by an arrowhead). The overall amino acid identity of 67 % (CHIR-A to TILR-A), 77% (CHIR-B to TILR-B) and 84% (CHIR-AB to TILR-AB) clearly showed their relationship. The presence of full length genomic sequences in the case of TILR-A as well as the comparison to the chicken genomic sequences allowed the characterization of the genomic structures (Fig. 1 to Fig. 3, indicated by vertical lines). Like in other members of the LRC and in particular the CHIR sequences, the signal peptide was encoded by two exons followed by exons encoding each Ig

domain. Depending on the subtype of the TILR, the connecting peptide, transmembrane region and cytoplasmic domains were either encoded by a single exon (TILR-A) or by three exons (TILR-B, TILR-AB).

The sequences could be further divided according to typical features of the transmembrane and cytoplasmic domains. The TILR-A sequences (Fig. 1) were characterized by a short cytoplasmic domain lacking any motifs and a transmembrane region containing a basic residue. These typical features potentially allow the association with adaptor molecules important for activating cellular responses. In contrast, the TILR-B sequences (Fig. 2) lacked a charged transmembrane residue, but instead displayed a long cytoplasmic domain with two ITIM, thus potentially important for inhibitory function. Finally the TILR-AB sequences (Fig. 3) combined both features of TILR-A and TILR-B in that they displayed a charged transmembrane residue and a long cytoplasmic tail with two ITIM. In conclusion, turkey TILR could be identified and categorized as TILR-A, TILR-B and TILR-AB.

#### *TILR-AB binds IgY from gallinaceous birds*

To date, only IgY has been identified as ligand to interact with several CHIR-AB receptors [14]. Therefore, we also analyzed the TILR-AB sequences for the presence of those residues that have been shown to be responsible for the interaction with the CHIR-AB1 ligand, IgY [20]. All of the critical residues have been conserved in the four TILR-AB sequences (shaded in Fig. 3). These observations lead us to directly test the interaction of TILR-AB to IgY. For this purpose a human Ig fusion protein (TILR-AB1-hulg) was prepared by fusing the extracellular TILR-AB1 domain to the C<sub>H</sub>2 and C<sub>H</sub>3 domains of human IgG1. We next prepared IgY from the egg yolk of several birds, including gallinaceous as well as other bird species. The binding of the fusion protein in an ELISA revealed that the TILR-AB1-hulg fusion protein was capable of binding to IgY of all gallinaceous birds tested, including chicken, turkey, pheasant, and quail, whereas it did not react with IgY derived from parrot, duck and hawk (Fig. 4). This indicates that TILR-AB functions as a Fc receptor binding to IgY.

### *CHIR specific mab crossreact with TILR*

The high overall homology observed between CHIR and TILR provoked us to test, whether the CHIR specific mab that we have produced against CHIR-B2, CHIR-AB1 and CHIR-A2 would crossreact with cells of duck or turkey. As a positive control for staining the  $\alpha V\beta 3$  specific mab 23C6 known to be crossreactive with many species was employed. As expected, this mab clearly reacted with a subpopulation of leukocytes in duck and turkey blood (Fig. 5). All of the CHIR specific mab were found to be unreactive with duck cells. While the CHIR-B2 specific mab did not stain turkey cells (data not shown), the CHIR-AB1 specific mab 8D12 and the CHIR-A2 specific mab 13E2 both reacted with approximately 42 to 50 % and 55 to 65 % of the cells depending on the animal tested, respectively (Fig. 5). Currently it is not possible to unequivocally identify the TILR which crossreact with the CHIR specific mab, however, the specificity of the 8D12 mab was confirmed by its reactivity with the TILR-AB1-hulg fusion protein (data not shown). These results further confirm the close relationship of TILR and CHIR.

### *Thrombocytes and monocytes are reactive with CHIR specific mab*

The finding that some CHIR specific mab crossreact with turkey cells was not anticipated, since only few of the panel of chicken leukocyte specific mab also stain turkey cells. We next wanted to characterize the cells reacting with the CHIR mab with the help of the available crossreactive leukocyte markers (Fig. 6). Here, we will designate the cells reactive with 8D12 or 13E2 as “CHIR positive” rather than “TILR positive” to stress that the mab were raised against CHIR and that the exact identity of the TILR recognized is currently unknown. Double staining with CD4 or CD8 as T cell specific reagents in conjunction with either 8D12 (Fig. 6A) or 13E2 (Fig. 6B) revealed barely any double positive cells, indicating their absence on T cells. Likewise, virtually no double positive cells were detectable in the combination of CHIR specific mab with the MHC class II mab 2G11 that served to detect turkey B cells (Fig. 6A,B). However, the  $\alpha V\beta 3$  antigen detected by the crossreactive 23C6 mab was expressed by virtually all CHIR-AB1 and CHIR-A2 positive cells in turkeys. In the case of CHIR-AB1 staining, there was also a distinct  $\alpha V\beta 3$  single positive population (Fig. 6A) that was not detectable in the CHIR-A-staining (Fig. 6B). Furthermore double immunofluorescence staining using both the 8D12 and 13E2

mab revealed that most cells coexpressed both molecules with about 2,5 % and 8,4 % of CHIR-A and CHIR-AB single positive cells, respectively (Fig. 6C). Since the  $\alpha V\beta 3$  integrin is mainly expressed on thrombocytes [28], we conclude that the major cell type expressing these CHIR are thrombocytes. Besides thrombocytes and lymphocytes, monocytes can be easily distinguished in PBMC preparation according to their size. When gated on the larger monocytes, double staining with the MHC class II specific 2G11 mab in combination with either of the CHIR specific mab demonstrated that the major fraction of 2G11 positive cells also coexpressed antigens recognized by the CHIR mab (Fig. 6D). In conclusion, TILR recognized by CHIR mab are mainly expressed by thrombocytes and monocytes.

## Discussion

The characterization of the TILR family extends our previous analyses regarding the chicken LRC. The assignment of the TILR as CHIR homologues is based on the high sequence homology between TILR and CHIR. Moreover, both families share a comparable structure with two C2-type Ig domains observed for the activating and inhibitory forms and a single domain present in the bifunctional receptors. Finally, they also share a common genomic structure with a typical split exon encoding the signal peptide.

CHIR are encoded by microchromosome 31, however, TILR are located on macrochromosome 3. The initial identification of TILR was hindered by the fact, that no full length sequences were found in the genomic or EST databases at that time. Consequently, we used all available information to design primers that were potentially able to amplify the three subfamilies. This has been successful, nevertheless, the number of different TILR amplified by this strategy and the comparison to the databases suggests, that the overall complexity of this family appears to be less pronounced as compared to the chicken with hundreds of CHIR found either by PCR, in EST databases or the genomic sequence. Although this observation is only preliminary and has to be substantiated by further sequencing and annotation of the respective turkey genomic region, it may point to a difference between turkeys and chickens in terms of CHIR complexity. This could also be a consequence of the different genomic location of the locus, where the position of the CHIR on a microchromosome may favor a very extensive birth and death

evolution that can take place without affecting other genes located nearby, whereas this is more restricted due to the position of TILR on a macrochromosome. In this respect it is interesting to note that the position of TILR has been mapped close to the end of the macrochromosome 3. Several highly conserved genes including metastasis associated in colon cancer 1 (MACC1) and integrin 8 beta (ITGB8) have been annotated in proximity to TILR, whereas we have so far not identified unrelated genes close to the CHIR locus. Both MACC1 and ITGB8 are located on chicken chromosome 2 and thus on a different location as the CHIR present on chromosome 31. The conclusive composition of the turkey LRC remains to be characterized. In particular, it would be interesting to find out if other genes or gene families present in the mammalian extended LRC also exist in the turkey.

Our failure to find CHIR homologues in other bird species which is strengthened by a similar observation using a different approach in ducks [25] may be interpreted in different ways. In mammals the KIR locus as comparable LRC gene family has been shown to be a rapidly evolving gene family with striking differences even between closely related primates [29]. Moreover, in marine carnivores KIR are reduced to single genes [3] and other mammals like horses or rats seem to lack KIR completely [30]. A similar situation may be found in birds, where some species like chickens have a massively expanded LRC family whereas others may compensate the lack by expanding a functional homologue that does not share structural features, as is the case for Ly49 and KIR genes in mammals. It could alternatively be argued, that CHIR homologues exist in duck or zebra finch, but the strategies to identify them which were primarily based on sequence homology and some structural features were inadequate to find corresponding genes. An additional argument for the presence of at least CHIR-AB homologues would be the presence of IgY in these bird species which would argue in favor for the presence of a Fc receptor such as CHIR-AB. However, this could be questioned, since mammals lacking KIR frequently also lack the closely related and nearby located FCAR [4]. Moreover, ducks have an additional IgY-form which lacks the Fc region, so a receptor may not be necessary [18,31,32] and finally other Fc receptors for IgY may exist, as we have also identified an additional FcγR in the chicken [33]. The final answer whether CHIR homologues exist in bird species other than chickens and turkeys will be resolved once more bird genomes are completely sequenced and annotated.

The comparison of CHIR and TILR sequences revealed strikingly high identity between CHIR-AB and TILR-AB. This subfamily has a special function as Fc receptor binding to IgY. Turkey TILR-AB also binds to IgY and it recognizes IgY of different gallinaceous birds equally well just as we have previously shown for a CHIR-AB1 fusion protein [22]. This suggests that this CHIR/TILR-AB subfamily is primarily selected by its binding properties to the IgY Fc region and explains the high conservation of this receptor subfamily, since the Fc region of IgY is not polymorphic. Whereas the CHIR-AB sequences could be further distinguished into several subgroups that differed in their binding affinities to IgY including a subset of non-binders, that had mutations in the critical amino acid positions [20], all TILR-AB sequences identified so far, confined to the consensus that would indicate strong IgY binding. It remains to be seen, if TILR-AB sequences exist which lack binding to IgY, however, at this point the function of the non-binding CHIR-AB receptors remains to be resolved.

On the other hand the sequence comparisons of CHIR-B and CHIR-A with their corresponding TILR showed a less pronounced similarity arguing for a wider spectrum of yet undefined polymorphic ligands. As in chickens it seems plausible that the repertoire of CHIR and TILR may be shaped by yet undefined pathogens.

The finding that mab produced against several CHIR stain turkey cells was rather surprising. In general only few mab against chicken cells have been found to be crossreactive with turkey [34,35]. Moreover, since CHIR are such a highly diverse family our attempts to make mab against particular CHIR have resulted in mab reactive with groups of highly related CHIR. The CHIR-AB specific 8D12 for instance, recognizes several CHIR-AB that bind to IgY but seems to be unreactive with non-binding CHIR-AB, in fact it is able to block IgY binding [14]. The CHIR-A specific 13E2 was made against CHIR-A2. It is able to bind several other CHIR-A, but neither CHIR-B nor CHIR-AB. So essentially, the mab recognize some members within a given subfamily, but not necessarily all. Two of the three CHIR specific mab also reacted with turkey cells. Given that the TILR and CHIR can be categorized into similar subgroups that are highly related to each other, it can be concluded that the CHIR specific mab react with similar TILR subfamily members. In the case of 8D12, this has been further documented by the reactivity of the TILR-AB1-hulg fusion protein with the 8D12 mab. The mab crossreactivity can also be explained by closest homology of TILR-A1 and TILR-AB1 to CHIR-A2 and



CHIR-AB1, respectively, whereas TILR-B1 was most related to CHIR-B4 where no mab exists. All the CHIR mab tested so far in the chicken have a wide expression pattern, particularly also including lymphocytes. For instance, the CHIR-B2 specific mab is detected on virtually all lymphocytes, and CHIR-AB1 expression as detected by 8D12 can be seen on B-lymphocytes, monocytes and NK cells [9,14]. Therefore it was quite surprising to find a distinct staining pattern in turkey cells. The main cell populations detected by both the CHIR-A2 specific 13E2 and the CHIR-AB1 specific 8D12 were thrombocytes and monocytes, whereas the mab only detected very few lymphocytes. It remains to be determined whether other TILR are expressed by lymphocytes. This striking expression difference, however, could indicate that the LRC in chicken not only evolved fast in terms of number of receptors and polymorphism, but also in functional aspects that are mirrored by the expression on different leukocyte subsets. The expression on turkey thrombocytes is of particular interest out of several reasons. Firstly, the mammalian LRC also encodes at least one receptor GPVI expressed on platelets that upon collagen binding leads to platelet activation [36]. The CHIR and TILR share the same structure and some sequence homology to GPVI, so this could indicate that some of the TILR and CHIR function as collagen receptors as has also been shown for the LRC encoded LAIR-1 [37]. Secondly, the thrombocytes, once recognized as nucleated platelets with functions limited to hemostasis, seem to have a much broader physiological function that includes important innate immune aspects. It has been demonstrated that chicken thrombocytes express some important immune receptors such as TLR and which can be triggered to secrete proinflammatory cytokines [38,39].

Thirdly, the expression of a Fc receptor for IgY on thrombocytes suggest that thrombocytes can mediate immune functions that are dependent on antibodies. In this respect it is interesting that we have found high levels of mRNA expression of another Fc receptor, ggFcR, in thrombocytes [33]. Since the common Fc $\gamma$  chain is likely expressed in thrombocytes because it is essential for receptors such as GPVI, immunocomplex binding may activate thrombocytes.

In conclusion, we have characterized homologues of the CHIR family in turkey, and in particular the FcR homologue TILR-AB that binds IgY like in chickens, but is mainly expressed on thrombocytes.

## Acknowledgement

This work was supported by DFG grant no GO489/3-7. We cordially thank Drs. B. Kaspers and S. Härtle for providing reagents.

## References

1. Barrow AD, Trowsdale J (2008) The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. *Immunological Reviews* 224: 98-123.
2. Wende H, Colonna M, Ziegler A, Volz A (1999) Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mammalian Genome* 10: 154-160.
3. Hammond JA, Guethlein LA, Abi-Rached L, Moesta AK, Parham P (2009) Evolution and survival of marine carnivores did not require a diversity of killer cell Ig-like receptors or Ly49 NK cell receptors. *Journal of Immunology* 182: 3618-3627.
4. Parham P (2008) The genetic and evolutionary balances in human NK cell receptor diversity. *Seminars in Immunology* 20: 311-316.
5. Sambrook JG, Bashirova A, Palmer S, Sims S, Trowsdale J, et al. (2005) Single haplotype analysis demonstrates rapid evolution of the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) loci in primates. *Genome Research* 15: 25-35.
6. Yoder JA, Litman GW (2011) The phylogenetic origins of natural killer receptors and recognition: relationships, possibilities, and realities. *Immunogenetics* 63: 123-141.
7. Yoder JA, Mueller MG, Wei S, Corliss BC, Prather DM, et al. (2001) Immune-type receptor genes in zebrafish share genetic and functional properties with genes encoded by the mammalian leukocyte receptor cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 6771-6776.
8. Stafford JL, Bengten E, Du Pasquier L, McIntosh RD, Quiniou SM, et al. (2006) A novel family of diversified immunoregulatory receptors in teleosts is homologous to both mammalian Fc receptors and molecules encoded within the leukocyte receptor complex. *Immunogenetics* 58: 758-773.
9. 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. *Journal of Immunology* 173: 7385-7393.
10. Viertlboeck BC, Habermann FA, Schmitt R, Groenen MA, Du Pasquier L, et al. (2005) The chicken leukocyte receptor complex: a highly diverse multigene family encoding at least six structurally distinct receptor types. *Journal of Immunology* 175: 385-393.
11. Viertlboeck BC, Göbel TW (2011) The chicken leukocyte receptor cluster. *Vet Immunol Immunopathol* 144: 1-10.

12. 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. *Molecular Immunology* 47: 1956-1962.
13. Viertlboeck BC, Gick CM, Schmitt R, Du Pasquier L, Göbel TW (2010) Complexity of expressed CHIR genes. *Developmental and Comparative Immunology* 34: 866-873.
14. Viertlboeck BC, Schweinsberg S, Hanczaruk MA, Schmitt R, Du Pasquier L, et al. (2007) The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 11718-11723.
15. Göbel TW, Bolliger L (2000) Evolution of the T cell receptor signal transduction units. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 248: 303-320.
16. Long EO (1999) Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annual Review in Immunology* 17: 875-904.
17. Faure M, Long EO (2002) KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *Journal of Immunology* 168: 6208-6214.
18. Warr GW, Magor KE, Higgins DA (1995) IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today* 16: 392-398.
19. Taylor AI, Gould HJ, Sutton BJ, Calvert RA (2008) Avian IgY Binds to a Monocyte Receptor with IgG-like Kinetics Despite an IgE-like Structure. *Journal of Biological Chemistry* 283: 16384-16390.
20. Viertlboeck BC, Schweinsberg S, Schmitt R, Herberg FW, Göbel TW (2009) The chicken leukocyte receptor complex encodes a family of different affinity FcY receptors. *Journal of Immunology* 182: 6985-6992.
21. Arnon TI, Kaiser JT, West AP, Jr., Olson R, Diskin R, et al. (2008) The crystal structure of CHIR-AB1: a primordial avian classical Fc receptor. *Journal of Molecular Biology* 381: 1012-1024.
22. Pürzel J, Schmitt R, Viertlboeck BC, Göbel TW (2009) Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA: Fc alpha RI interaction. *Journal of Immunology* 183: 4554-4559.
23. Nei M, Rooney AP (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Reviews Genetics* 39: 121-152.
24. Laun K, Coggill P, Palmer S, Sims S, Ning Z, et al. (2006) The leukocyte receptor complex in chicken is characterized by massive expansion and diversification of immunoglobulin-like Loci. *PLoS Genetics* 2: e73.
25. MacDonald MR, Veniamin SM, Guo X, Xia J, Moon DA, et al. (2007) Genomics of antiviral defenses in the duck, a natural host of influenza and hepatitis B viruses. *Cytogenetic and Genomic Research* 117: 195-206.
26. Schreiner B, Viertlboeck BC, Gobel TW (2012) A striking example of convergent evolution observed for the ggFcR:IgY interaction closely resembling that of mammalian FcR:IgG. *Developmental and Comparative Immunology* 36: 566-571.

27. Göbel TW, Chen CH, Cooper MD (1996) Expression of an avian CD6 candidate is restricted to  $\alpha\beta$  T cells, splenic CD8<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells and embryonic natural killer cells. *European Journal of Immunology* 26: 1743-1747.
28. Viertlboeck BC, Göbel TW (2007) Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 119: 137-141.
29. Parham P, Abi-Rached L, Matevosyan L, Moesta AK, Norman PJ, et al. (2010) Primate-specific regulation of natural killer cells. *J Med Primatol* 39: 194-212.
30. Takahashi T, Yawata M, Raudsepp T, Lear TL, Chowdhary BP, et al. (2004) Natural killer cell receptors in the horse: evidence for the existence of multiple transcribed LY49 genes. *European Journal of Immunology* 34: 773-784.
31. Lundqvist ML, Middleton DL, Radford C, Warr GW, Magor KE (2006) Immunoglobulins of the non-galliform birds: antibody expression and repertoire in the duck. *Developmental and Comparative Immunology* 30: 93-100.
32. Magor KE, Warr GW, Middleton D, Wilson MR, Higgins DA (1992) Structural relationship between the two IgY of the duck, *Anas platyrhynchos*: molecular genetic evidence. *Journal of Immunology* 149: 2627-2633.
33. Viertlboeck BC, Schmitt R, Hanczaruk MA, Crooijmans RP, Groenen MA, et al. (2009) A novel activating chicken IgY FcR is related to leukocyte receptor complex (LRC) genes but is located on a chromosomal region distinct from the LRC and FcR gene clusters. *Journal of Immunology* 182: 1533-1540.
34. Rubbenstroth D, Dalgaard TS, Kothlow S, Juul-Madsen HR, Rautenschlein S (2010) Effects of cyclosporin A induced T-lymphocyte depletion on the course of avian Metapneumovirus (aMPV) infection in turkeys. *Developmental and Comparative Immunology* 34: 518-529.
35. Li Z, Nestor KE, Saif YM, Fan Z, Luhtala M, et al. (1999) Cross-reactive anti-chicken CD4 and CD8 monoclonal antibodies suggest polymorphism of the turkey CD8alpha molecule. *Poultry Science* 78: 1526-1531.
36. He H, Genovese KJ, Nisbet DJ, Kogut MH (2006) Profile of Toll-like receptor expressions and induction of nitric oxide synthesis by Toll-like receptor agonists in chicken monocytes. *Molecular Immunology* 43: 783-789.
37. Lebbink RJ, de Ruiter T, Adelmeijer J, Brenkman AB, van Helvoort JM, et al. (2006) Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *Journal of Experimental Medicine* 203: 1419-1425.
38. Scott T, Owens MD (2008) Thrombocytes respond to lipopolysaccharide through Toll-like receptor-4, and MAP kinase and NF-kappaB pathways leading to expression of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 with production of prostaglandin E2. *Molecular Immunology* 45: 1001-1008.
39. St Paul M, Paolucci S, Barjesteh N, Wood RD, Schat KA, et al. (2012) Characterization of chicken thrombocyte responses to Toll-like receptor ligands. *PLoS One* 7: e43381.

## Figure Legends

Fig. 1. Alignment of the TILR-A sequences. The signal peptide (SP), Ig domains (IG1, IG2), transmembrane (TM) and cytoplasmic (CY) domains are indicated. Conserved cysteines forming the intrachain disulfide bridges are marked with an asterisk and the cysteine conserved in the transmembrane domain is marked by an arrowhead. The predicted transmembrane region is indicated by a line above the sequence. Note that residues that were not conserved are shaded in black. The predicted exon : intron boundaries are marked by vertical lines in the sequences. For comparison the CHIR with highest homology (CHIR-A2, accession number AJ745093) was used. Accession number of TILR-A1: KC201188.

Fig. 2. Alignment of the TILR-B sequences. The annotation of sequence features is similar to Fig. 1. ITIM sequences in the cytoplasmic domain are boxed. For comparison the CHIR with highest homology (CHIR-B4, accession number AJ639839) was used. Accession number of TILR-B1: KC201189.

Fig. 3. Alignment of the TILR-AB sequences. Sequence features are explained in Fig. 1. Note that TILR-AB possess a single Ig domain, only. The residues known to be important for the interaction with IgY are indicated by dots above the sequence. For comparison the CHIR with highest homology (CHIR-AB1, accession number AJ745094) was used. Accession numbers of TILR-AB1: KC201190, TILR-AB2: KC201191, TILR-AB3: KC201192, TILR-AB4: KC201193.

Fig. 4. TILR-AB1 reacts with IgY from gallinaceous birds. Log<sub>2</sub> dilution of TILR-AB1-hulg fusion protein on ELISA plates coated with IgY derived from birds as indicated. Mean ± SD of triplicates is shown.

Fig. 5. Immunofluorescence staining of duck and turkey PBMC. Blood was separated via density centrifugation and stained with mab against αVβ3 and various CHIR followed by secondary antibody conjugates. Histograms of one typical out of four separate experiments is shown and frequencies of positive cells are indicated.

Fig. 6. Double fluorescence analyses of turkey PBMC. Cells were labeled with either CHIR-AB1 specific mab 8D12 (A) or CHIR-A2 specific mab 13E2 (B) in combination with the T-cell specific mab CD4 and CD8, the class II specific mab 2G11 and the  $\alpha V\beta 3$  specific mab 23C6. (C) Double staining of blood leukocytes with 8D12 and 13E2. Gates were set according to forward and sideward scatter features on the lymphocyte gate in A, B and C. (D) Combined immunofluorescence of 8D12 or 13E2 in combination with the MHC class II specific mab 2G11 as in (A) or (B), but gated on the larger monocytes based on forward/side scatter characteristics. Frequencies of positive cells are indicated in the quadrants. One representative of three experiments is shown.

# Figures

Fig. 1

```

CHIR-A2 SP  MAPMAVALILGWLLVAASRAQQ
TILR-A1 SP  MAPMALALILGWLLVAASRAQQ

CHIR-A2 IG1  LPRPSLSLHPSQGVSLGDNVTLRCHLPQLAAMVWLYSEGRSYAKSDKQDTFSFSTSRHAGTYSQYQSES*DISVSDPVELVLT
TILR-A1 IG1  LPRPSLSLHPSQGVSLGDNVTLRCHLPQLAAMVWLYSEGRSYAKSDKQDTFSFSTSRHAGTYSQYQSES*DISVSDPVELVLT

CHIR-A2 IG2  DSEFPPFISPPFRRVGTGNVTICCNKDYGRAHLLHKDGSAPIQLVDPVWGAWSFTLFGVTPADSGTYRCSY*PKNYSFLSSPLGDIVTLEVTPTAAEF
TILR-A1 IG2  DHSYPPPGISLTPKESVELGTNVTIQCNWQYGGIIFLHKAGHSAPIQHPDGGGTATFIFGVTPADSGTYRCSY*HYPKGYFLSSPLGDIVTLEVTPTAAEF

CHIR-A2 TM  G-----AEIVS*GNLVVAVV*GCAALIFALGVFFVLDARSLWTRDRSLGGEGI
TILR-A1 TM  GGGWSHEHPNSQTTQHEV*GSHGNLVAVV*GCAALVFLGVFFVLSARNLWVRRDGS*G
    
```

Fig. 2

```

CHIR-B4 SP  MAPMAVALILGWLLVAASRAQQ
TILR-B1 SP  MAPMALALILGWLLVAASRAQQ

CHIR-B4 IG1  LPRPSLSLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPQLAARVELQEGYEGH*EVCKMDMDVAEFLSLAGKQEDAV*YQCQYQGLEPVGTSKSDPVELLVLT
TILR-B1 IG1  LPRPSLSLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPQLAARVELQEGYEGH*EVCKMDMDVAEFLSLAGKQEDAV*YQCQYQGLEPVGTSKSDPVELLVLT

CHIR-B4 IG2  DHSYPPPGISLTPKESVELGTNVTIQCNWQYGGIIFLHKAGHSAPIQHPDGGGTATFIFGVTPADSGTYRCSY*HYPKGYFLSSPLGDIVTLEVTPTAAEF
TILR-B1 IG2  DHSYPPPGISLTPKESVELGTNVTIQCNWQYGGIIFLHKAGHSAPIQHPDGGGTATFIFGVTPADSGTYRCSY*HYPKGYFLSSPLGDIVTLEVTPTAAEF

CHIR-B4 TM  GVNGGPPSNLVAAVAGGCAAAITIIIVLIVSFLLAQRRT*QRDESS
TILR-B1 TM  GNGGPPSNLVAAVAGGCAAAITIIIVLIVSFLLAQRRT*QRDESS

CHIR-B4 CY  GATSRSP*EAVQFQVSPGDSEGLTYAQIQAVTPSTH*EPGSSITFEP*IIYAEV*GTRGRP
TILR-B1 CY  GATSRSP*EAVQFQVSPGDSEGLTYAQIQAVTPSTH*EPGSSITFEP*IIYAEV*GTRGRP
    
```

Fig. 3

```

CHIR-AB1 SP  MAPMAVALILGWLLVAASRAQQ
TILR-AB1 SP  MAPMALALILGWLLVAASRAQQ
TILR-AB2 SP  MAPMALALILGWLLVAASRAQQ
TILR-AB3 SP  ---MALALILGWLLVAASRAQQ
TILR-AB4 SP  MAPMALALILGWLLVAASRAQQ

CHIR-AB1 IG1  LPPPSLSLHPSQAVPLGDTVTLRCLPRVRAWVQLWLNGLTRSDKEKDKQD*AEFSFAVTKLEDAGTYQCRYQVSEPLWTSNKSEFVELVLT
TILR-AB1 IG1  LPPPSLSLHPSQAVPLGDTVTLRCLPRVRAWVQLWLNGLTRSDKEKDKQD*AEFSFAVTKLEDAGTYQCRYQVSEPLWTSNKSEFVELVLT
TILR-AB2 IG1  LPPPSLSLHPSQAVPLGDTVTLRCLPRVRAWVQLWLNGLTRSDKEKDKQD*AEFSFAVTKLEDAGTYQCRYQVSEPLWTSNKSEFVELVLT
TILR-AB3 IG1  LPPPSLSLHPSQAVPLGDTVTLRCLPRVRAWVQLWLNGLTRSDKEKDKQD*AEFSFAVTKLEDAGTYQCRYQVSEPLWTSNKSEFVELVLT
TILR-AB4 IG1  LPPPSLSLHPSQAVPLGDTVTLRCLPRVRAWVQLWLNGLTRSDKEKDKQD*AEFSFAVTKLEDAGTYQCRYQVSEPLWTSNKSEFVELVLT

CHIR-AB1 TM  GAKGRSHGNLVAVV*GCAAVV*VFLGLYFVLDARSLWTRDRS*
TILR-AB1 TM  GAKGRSHGNLVAVV*GCAAVV*VFLGLYFVLDARSLWTRDRS*
TILR-AB2 TM  GAKGRSHGNLVAVV*GCAAVV*VFLGLYFVLDARSLWTRDRS*
TILR-AB3 TM  GAKGRSHGNLVAVV*GCAAVV*VFLGLYFVLDARSLWTRDRS*
TILR-AB4 TM  GAKGRSHGNLVAVV*GCAAVV*VFLGLYFVLDARSLWTRDRS*

CHIR-AB1 CY  GVTPETPKSVQFQVTPRDESELLTYTEMPAAIPCSQTPSSHTDPQPFVIYTTVSTELP
TILR-AB1 CY  GVTPETPKSVQFQVTPRDESELLTYTEMPAAIPCSQTPSSHTDPQPFVIYTTVSTELP
TILR-AB2 CY  GVTPETPKSVQFQVTPRDESELLTYTEMPAAIPCSQTPSSHTDPQPFVIYTTVSTELP
TILR-AB3 CY  GVTPETPKSVQFQVTPRDESELLTYTEMPAAIPCSQTPSSHTDPQPFVIYTTVSTELP
TILR-AB4 CY  GVTPETPKSVQFQVTPRDESELLTYTEMPAAIPCSQTPSSHTDPQPFVIYTTVSTELP
    
```

Fig. 4

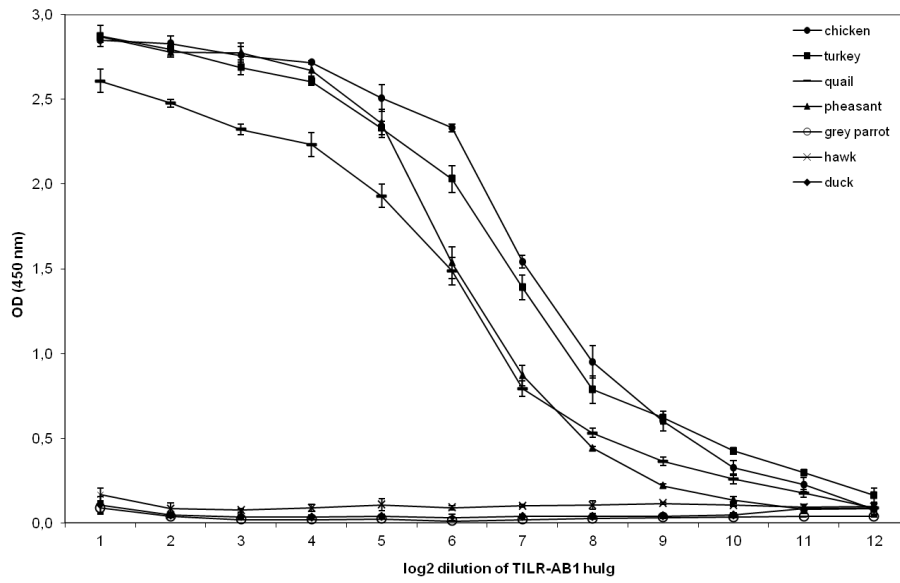


Fig. 5

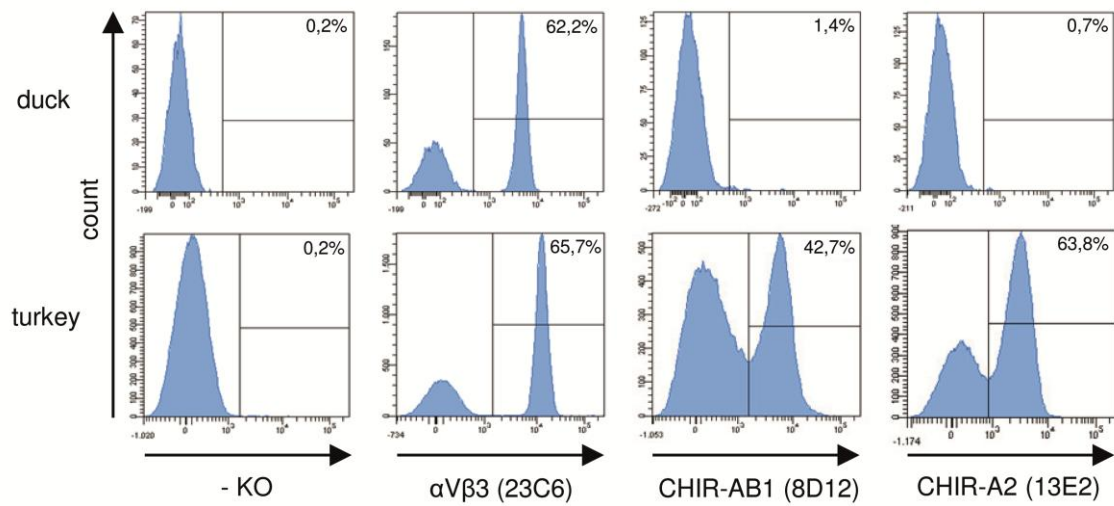
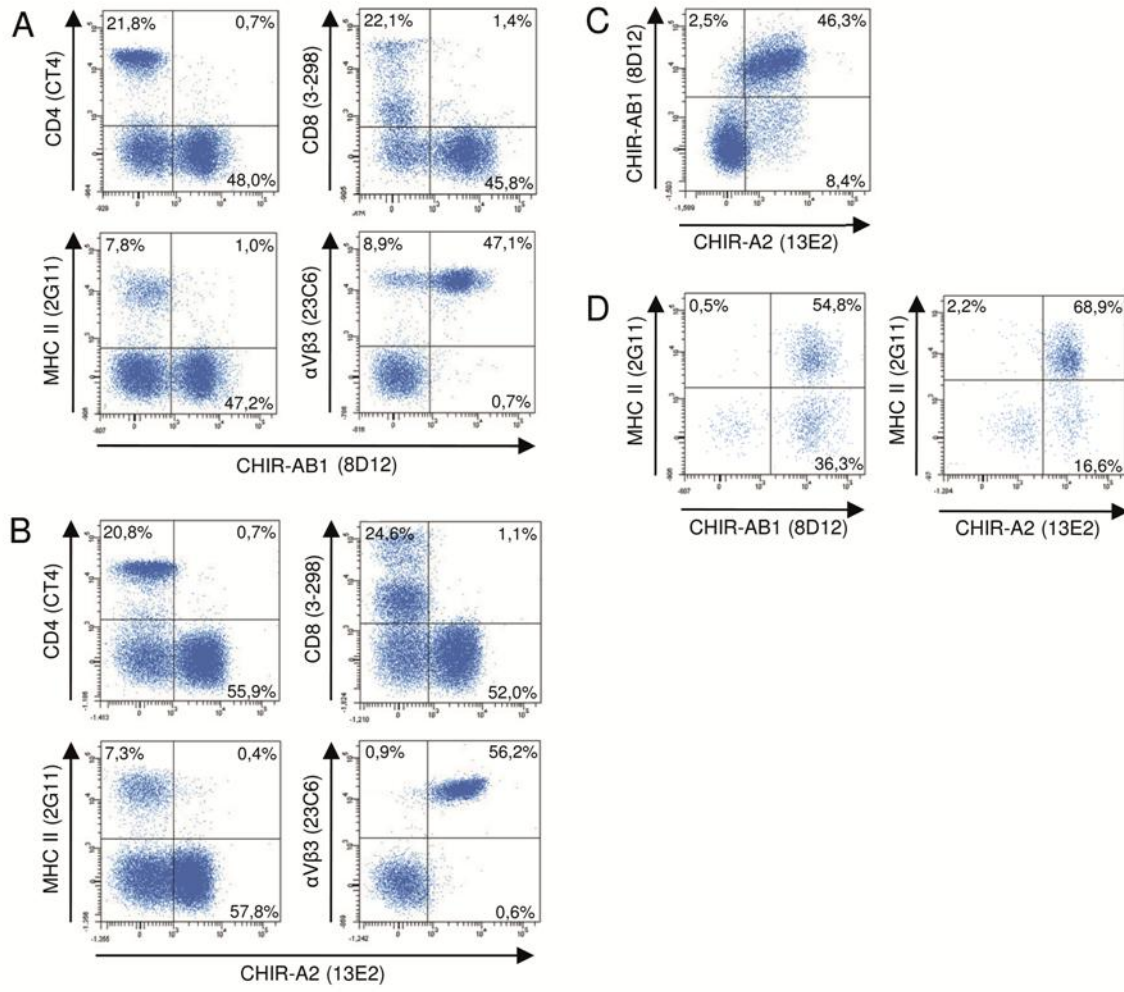




Fig. 6



## IV. DISKUSSION

Mithilfe verschiedener CHIR-Sequenzen wurden die in den Datenbanken NCBI und Ensemble genome browser verfügbaren genomischen Daten verschiedener Vogelarten durchsucht. Während bei der Pute zu Beginn der Arbeit bereits erste CHIR-homologe Sequenzbruchstücke vorhanden waren und mittlerweile zwei vollständige TILR-A und eine TILR-B-Sequenz verfügbar sind, gab es bei Zebrafink und Ente bisher keine Hinweise auf das Vorhandensein von CHIR-Homologen. Auch in den mittlerweile verfügbaren genomischen Daten von Wellensittich und Fliegenschnäpper waren keine CHIR-Homologe auffindbar. Das kann zum einen daran liegen, dass aufgrund der mangelhaften Annotation die gesuchten Sequenzen noch nicht verfügbar sind. Andererseits ist es durchaus vorstellbar, dass sich die Vorläufer der CHIR im Laufe der Evolution bei verschiedenen Vogelarten so divergent entwickelt haben, dass die Sequenzen mittels BLAST-Recherchen nicht identifiziert werden können. Drittens besteht die Möglichkeit, dass die oben genannten Vogelarten keine CHIR-Homologe besitzen und andere Proteine, die in keiner verwandtschaftlichen Beziehung mit CHIR stehen, deren Funktion übernehmen. Dieses Modell erinnert an die Situation der Multigenfamilien KIR und Ly49. Während die humanen KIR der IGSF angehören und sich beim Menschen ausgehend von einem Vorläufer mehrfach dupliziert und modifiziert haben, besitzt die Maus lediglich zwei KIR-ähnliche Gene, die auf dem Chromosom X und somit außerhalb des LRC lokalisiert sind [33]. Die funktionellen Aufgaben der KIR werden bei Maus und Ratte von der Ly49-Multigenfamilie übernommen [33]. Während die Maus 15 und die Ratte sogar 28 Ly49-Gene besitzt, von denen 11 beziehungsweise 17 funktionell sind, beherbergt der Mensch innerhalb des NK-Zell-Rezeptor-Komplexes auf Chromosom 12 nur ein einzelnes, nicht funktionelles Ly49-Pseudogen [86,87].

Ebenso wie bei CHIR existieren drei TILR-Subgruppen. Sowohl das Alignment als auch der prozentuale Anteil der identischen Aminosäuren zeigen, dass diese Proteinfamilien sehr nah miteinander verwandt sind (siehe Fig. 1-3 der Publikation). CHIR-A2 und TILR-A1 sind zu 65% identisch, CHIR-AB1 und TILR-AB1 zu 85% und CHIR-B4 und TILR-B2 zu 76%. Die konservierten Cysteinreste in den Ig-Domänen und der transmembranen Domänen sind bei allen TILR-Sequenzen an entsprechender Position vorhanden, ebenso wie das für aktivierende Rezeptoren typische transmembrane Arginin und die zwei zytoplasmatisch gelegenen inhibitorischen

schen Signalmotive. Auch die Tatsache, dass zwei gegen CHIR gerichtete monoklonale Antikörper auf Putenblut-Präparationen kreuzreagieren, weist auf die hohe strukturelle Ähnlichkeit dieser beiden Proteinfamilien hin.

Auffällig ist allerdings die unterschiedliche genomische Lokalisation. Alle CHIR sind auf dem Mikrochromosom 31 lokalisiert und bislang wurden auf diesem Chromosom keine Gene außerhalb der CHIR-Familie gefunden [6]. Es liegt die Vermutung nahe, dass ein Großteil des Mikrochromosom 31 CHIR-codierende Sequenzen enthält [3]. Dies könnte für die Entstehung der enormen CHIR-Vielfalt und Diversität entscheidend gewesen sein, da durch die Lokalisation auf einem eigenen Mikrochromosom trotz der Instabilität des CHIR-Lokus die unmittelbar benachbarten Gene nicht beeinträchtigt wurden. Im Gegensatz dazu werden die bisherigen TILR-Sequenzen der Pute dem telomeren Rand des Makrochromosom 3 zugeordnet, in unmittelbarer Nachbarschaft zu Fer3-like, MACC1 und ITGB8 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100540837>). Wie die durchgeführten Datenbankrecherchen zeigen, sind diese Gene nicht nur bei Vögeln, sondern auch bei Säugern und niederen Tieren hochkonserviert (Abbildung 2).

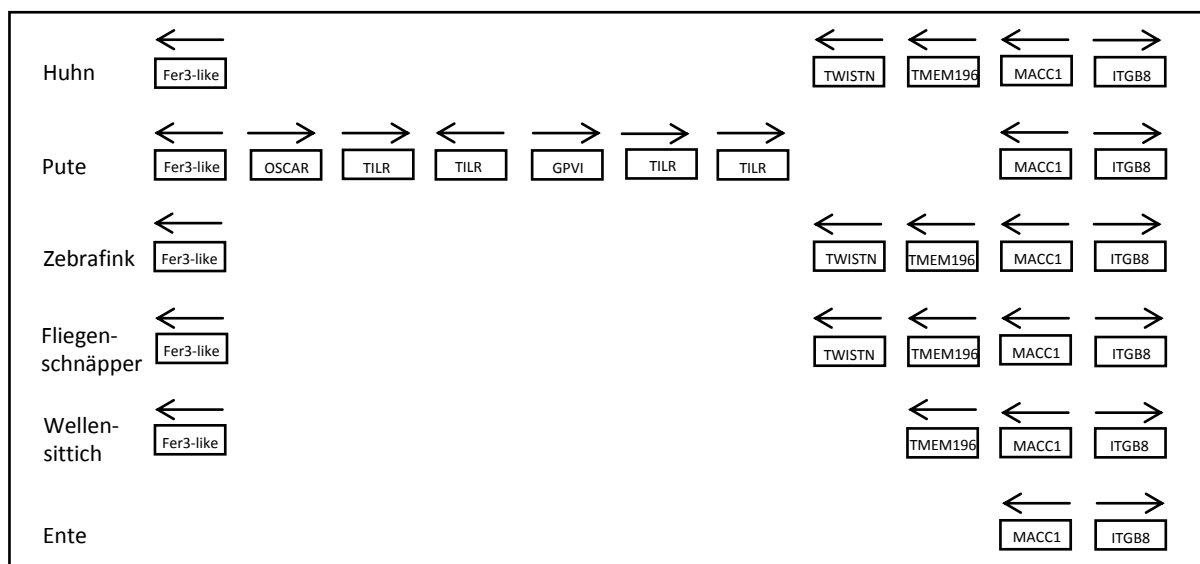


Abbildung 2: Annotation der TILR-Gene auf Makrochromosom 3 im Vergleich mit anderen Vogelgenloci. MACC1 und ITGB8 sind bei allen dargestellten Vogelarten hochkonserviert. Einzig bei der Pute ist der TILR-Lokus zusammen mit einem Gen für Glykoprotein VI (GPVI) und einem Osteoklast-activating-receptor Gen (OSCAR) zwischen das Fer3-like Gen und das MACC1 Gen eingefügt. TWISTN = TWIST neighbour, TMEM196 = Transmembranes Protein 196. Abbildung modifiziert nach [88]

Falls die derzeitige TILR-Lokalisation der Wirklichkeit entspricht, könnte das einen im Vergleich zum Huhn deutlich kleineren TILR-Lokus zur Folge haben. Denn bei multiplen Duplikationen, Modifikationen und häufigem Genrearrangement wäre die Wahrscheinlichkeit größer, dass benachbarte Gene beschädigt oder unbrauchbar gemacht werden. So ist es durchaus denkbar, dass durch die Lokalisation auf einem Makrochromosom auch die Expansion des TILR-Lokus deutlich eingeschränkt wurde.

Andererseits darf man nicht außer Acht lassen, dass die Annotation des Putengenoms bei weitem noch nicht abgeschlossen ist und es in diesem Prozess insbesondere bei Multigenfamilien immer wieder zu falschen Chromosomenzuordnungen und entsprechenden Korrekturen kommt. Dies könnte auch auf den TILR-Lokus zutreffen. Wie bereits erwähnt, sind dem TILR-Lokus telomer das Fer-3-like-Gen und zentromer die Gene MACC1 und ITGB8 angelagert. Diese Gene sind hochkonserviert und bei Huhn, Zebrafink, Fliegenschnäpper und Wellensittich in derselben Reihenfolge und Orientierung auffindbar (Abbildung 2). Auffällig ist, dass sich ausschließlich bei der Pute zwischen den Genen Fer-3-like und MACC1 zusätzlich der TILR-Lokus befindet. Gesetzt den Fall, dass die Annotation korrekt ist, müsste der TILR-Lokus sehr spät im Laufe der Evolution zwischen diese hochkonservierten Gene transloziert worden sein, und zwar ausschließlich bei der Pute. Da dies sehr unwahrscheinlich ist, ist anzunehmen, dass die derzeitige Annotation nicht korrekt ist und der TILR-Lokus in einem anderen Bereich des Genoms lokalisiert ist. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass nicht nur der CHIR-Cluster sondern auch der TILR-Cluster auf einem Mikrochromosom lokalisiert ist und ähnlich expansive Ausmaße wie beim Huhn angenommen hat. Der tatsächliche Umfang der TILR-Familie lässt sich erst bestimmen, wenn die Annotation des Putengenoms abgeschlossen ist und weitere Studien durchgeführt wurden.

Es ist bekannt, dass in der Ig1 von CHIR-AB fünf Aminosäurereste konserviert sein müssen, damit die Bindung an IgY möglich ist [5]. Im Alignment von TILR-AB und CHIR-AB1 fällt auf, dass diese fünf Positionen auch bei TILR-AB konserviert sind (Abbildung 3). Mittels eines Fusionsproteins, das aus der Ig1 von TILR-AB1 sowie der CH2- und CH3-Domäne des humanen IgG zusammengesetzt ist, konnte nachgewiesen werden, dass TILR-AB1 an IgY bindet. Da sich TILR-AB2 in der Ig1 nur in einer Position von TILR-AB1 unterscheidet und die Ig1 von TILR-AB3 und TILR-AB4 mit der von TILR-AB1 sogar identisch sind, stellt sich die Frage, ob die Pute

ausschließlich IgY-bindende TILR-AB-Rezeptoren besitzt, oder ob auch schwach- und nicht-bindende TILR-AB-Varianten vorkommen, wie es beim Huhn der Fall ist [5].

CHIR-AB1	IG1	L	P	P	S	L	S	L	H	P	S	Q	A	V	P	L	G	D	T	V	T	L	R	C	H	L	P	R	M	A	A	V	Q	L	W	L	N	G	T	L	R	S	D	K	E	K	D	K	E	Q	D	A	E	F	S	F	A	V	T	N	L	E	D	A	G	T	Y	Q	C	R	Y	Q	V	S	E	P	L	W	T	S	N	K	S	E	P	V	E	L	V	L	T	
TILR-AB1	IG1	L	P	P	P	S	L	S	L	H	P	S	Q	A	V	P	L	G	D	T	V	T	L	R	C	R	L	P	R	V	R	A	W	Q	L	W	L	N	G	T	L	R	S	D	K	E	K	D	K	E	Q	D	A	E	F	S	F	A	V	T	N	L	E	D	A	G	T	Y	Q	C	R	Y	Q	V	S	E	P	L	W	T	S	N	K	S	E	P	V	E	L	V	L	T
TILR-AB2	IG1	L	P	P	P	S	L	S	L	H	P	S	Q	A	V	P	L	G	D	T	V	T	L	R	C	R	L	P	R	V	R	A	W	Q	L	W	L	N	G	T	L	R	S	D	K	E	K	D	K	E	Q	D	A	E	F	S	F	A	V	T	N	L	E	D	A	G	T	Y	Q	C	R	Y	Q	V	S	E	P	L	W	T	S	N	K	S	E	P	V	E	L	V	L	T
TILR-AB3	IG1	L	P	P	P	S	L	S	L	H	P	S	Q	A	V	P	L	G	D	T	V	T	L	R	C	R	L	P	R	V	R	A	W	Q	L	W	L	N	G	T	L	R	S	D	K	E	K	D	K	E	Q	D	A	E	F	S	F	A	V	T	N	L	E	D	A	G	T	Y	Q	C	R	Y	Q	V	S	E	P	L	W	T	S	N	K	S	E	P	V	E	L	V	L	T
TILR-AB4	IG1	L	P	P	P	S	L	S	L	H	P	S	Q	A	V	P	L	G	D	T	V	T	L	R	C	R	L	P	R	V	R	A	W	Q	L	W	L	N	G	T	L	R	S	D	K	E	K	D	K	E	Q	D	A	E	F	S	F	A	V	T	N	L	E	D	A	G	T	Y	Q	C	R	Y	Q	V	S	E	P	L	W	T	S	N	K	S	E	P	V	E	L	V	L	T

Abbildung 3: Alignment der Ig1 von TILR-AB1 bis 4 und CHIR-AB1 im Vergleich mit CHIR-AB1. Die schwarz unterlegten weißen Buchstaben kennzeichnen unterschiedliche Aminosäuren an derselben Position, schwarze Buchstaben auf weißem Grund stellen identische Aminosäuren dar. Bei den mit schwarzen Punkten gekennzeichneten Aminosäuren handelt es sich um die fünf konservierten Aminosäuren, die bei CHIR für die IgY-Bindung essentiell sind. Die konservierten Cystein-Reste sind durch einen Stern gekennzeichnet.

Im Gegensatz zu Huhn und Pute ist es bei Säugern sehr ungewöhnlich, dass Fc-Rezeptoren auf dem LRC codiert werden. Beim Säuger werden die meisten Fc-Rezeptoren auf einem eigenen Fc-Rezeptor-Komplex auf Chromosom 1 codiert [46]. Nur der humane FCAR sowie der bovine Fcγ2R werden auf dem LRC codiert [45,89]. Dennis et al. stellten die Hypothese auf, dass LRC-codierte KIR und Fc-Rezeptoren einen gemeinsamen Vorläufer haben, der bereits vor der Trennung von Säugern und Vögeln vorhanden war [1]. Die Tatsache, dass eine Subgruppe der LRC-codierten CHIR und TILR zugleich Fc-Rezeptoren sind, stützt diese Hypothese. Beim Huhn ist zudem ein weiterer, einzelner Fc-Rezeptor auf Chromosom 20 bekannt [23]. Es ist unklar, ob die Pute ein ggFcR-homologes Protein besitzt, und wie stark und spezifisch dieses eventuell an IgY bindet.

Interessanterweise bindet TILR-AB1 auch an IgY von Huhn, Wachtel und Fasan, die alle der Vogelfamilie der Phasianidae angehören. Die Bindung an IgY von Graupapagei, Ente und Falke, drei Vertretern außerhalb dieser Familie, konnte nicht nachgewiesen werden. Es ist durchaus denkbar, dass bei letztgenannten Vogelarten die IgY-Moleküle zusammen mit ihren Fc-Rezeptoren einem anderen Selektionsprozess unterlagen und sich im Laufe der Evolution so weit auseinander entwickelt haben, dass eine Bindung an TILR-AB1 nicht mehr möglich ist. Dies wiederum wirft die Frage auf, ob Vogelfamilien außerhalb der Phasianidae CHIR-Homologe besitzen, oder ob Proteinfamilien von ganz anderer Struktur die Funk-

tion der CHIR übernehmen.

Einen Hinweis für letztere Möglichkeit liefern die Ergebnisse von MacDonald et. al, die bei der Ente weder mittels CHIR-spezifischen DNA-Sonden im Southern Blot noch über Amplifikationsversuche in der PCR einen Hinweis auf CHIR-Homologe fanden [85]. Auch die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten FACS-Färbungen auf PBMC-präpariertem Entenblut lieferten keinen Hinweis auf die Existenz von CHIR-Homologen bei der Ente. Es stellt sich die Frage, ob die Hühner-spezifischen monoklonalen anti-CHIR Antikörper potentielle CHIR-Homologe der Ente aufgrund struktureller Unterschiede nicht detektieren können, da keine Kreuzreaktivität besteht, oder ob die Ente tatsächlich keine strukturell ähnliche Rezeptorfamilie besitzt.

Anders verhält es sich bei PBMC-präpariertem Putenblut, auf dem zwei gegen CHIR gerichtete monoklonale Antikörper (mAk), anti-CHIR-AB1 (Klon 8D12) und anti-CHIR-A2 (Klon 13E2), eine deutliche Kreuzreaktivität zeigten. Um sicher zu sein, dass diese mAk spezifisch TILR detektieren, wurde die Reaktion des anti-CHIR-AB1-Überstandes mit dem bereits vorhandenen TILR-AB1-Fusionsprotein im ELISA getestet. Der gegen CHIR-B4 gerichtete mAk (Klon 3D12) zeigte bei der Pute keine positive Färbung. Die Kreuzreaktivität von CD4 (Klon CT4), CD8 (Klon 2-398) und MHC II (Klon 2G11) wurde bei der Pute bereits nachgewiesen [90,91]. MHC-II (2G11) wurde in zweifacher Hinsicht genutzt, zum einen als Monozyten- und Makrophagen-Marker und bei entsprechendem Gating auf Leukozyten als B-Zell-Marker. Im Falle des mAk  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  (Klon 23C6) wurde mittels Zytospin und anschließender Diff-Quick-Färbung bestätigt, dass es sich bei den durch  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  angefärbten Zellen um Thrombozyten handelt.

Interessanterweise unterscheidet sich das Expressionsmuster von CHIR deutlich von dem der TILR. CHIR zeigen ein sehr breites Expressionsspektrum und werden auf Monozyten, Makrophagen, NK- und B-Zellen, nicht aber auf T-Zellen und Thrombozyten exprimiert [20,25]. Nur CHIR-B2 wird auch auf einer kleinen T-Zell-Subpopulation exprimiert [18]. Auffällig ist, dass TILR im Gegensatz zu CHIR, ausschließlich auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert werden. TILR-A und TILR-AB weisen ein sehr ähnliches Expressionsmuster auf und werden weder auf CD4- oder CD8-positiven T-Zellen noch auf B-Zellen exprimiert. Eine sehr deutliche Expression konnte auf  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -positiven Zellen beobachtet werden. Dies ist sehr erstaunlich, zumal in der Doppelfärbung mit anti-CHIR-AB1 auffällt, dass alle

$\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -positiven Zellen zugleich anti-CHIR-AB1-positiv sind. Das bedeutet, dass alle Thrombozyten TILR-AB exprimieren. In der Doppelfärbung mit anti-CHIR-A2 zeigt sich ein ähnliches Bild, allerdings existiert hier zusätzlich eine kleine  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -positive Population von 9%, die anti-CHIR-A2-negativ ist. Dieses nahezu identische Expressionsmuster ist darauf zurückzuführen, dass in der anti-CHIR-AB1-anti-CHIR-A2-Doppelfärbung 46% der Zellen doppelt positiv sind, und somit überwiegend eine Co-Expression besteht.

Anti-CHIR-AB1 weist beim Huhn eine geringfügige Kreuzreaktivität mit CHIR-B auf, so dass es durchaus vorstellbar ist, dass auch ein kleiner Anteil der TILR-B-Rezeptoren durch anti-CHIR-AB1 gefärbt wird. Möglicherweise besteht also eine Dreifach-Expression der drei TILR-Subtypen. Dies ist in funktioneller Hinsicht sehr interessant, da die aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren so zur Feinabstimmung der zellulären Aktivität beitragen können.

Außerdem stellt sich die Frage, welche Rolle die Expression des Fc-Rezeptors TILR-AB auf Thrombozyten spielen könnte. Es ist bekannt, dass Thrombozyten nicht nur bei der Hämostase eine bedeutende Rolle spielen, sondern auch wichtige immunologische Funktionen übernehmen [92,93]. Thrombozyten sind im Gegensatz zu den Blutplättchen des Säugers kernhaltig, werden aber als deren Vorläufer angesehen und nehmen sehr ähnliche Funktionen wahr [92,93]. Thrombozyten besitzen Lysosomen-ähnliche Granula und können durch Kollagen, Antigen-Antikörper-Komplexe oder exprimierte Fc-Rezeptoren aktiviert werden, wobei der genaue Mechanismus unbekannt ist [92,94]. Sie sind in der Lage sowohl gram-positive als auch gram-negative Bakterien zu phagozytieren und abzutöten [95,96]. Im Gegensatz zu Heterophilen phagozytieren sie allerdings sehr unspezifisch [95]. Außerdem bilden sie nach Aktivierung Stickoxid, aktivieren das Komplementsystem und können mittels ihrer Pseudopodien Aggregate bilden, in denen sie Bakterien, andere Pathogene oder Fremdpartikel einweben [96,97]. Dies ist insofern interessant, da Thrombozyten nach den Erythrozyten die zweithäufigste zirkulierende Zellpopulation im Blut darstellen und durch ihr zahlreiches Vorkommen schnell zu jedem Infektionsort gelangen können [93].

In diesem Zusammenhang fällt auf, dass auch ein Großteil der Monozyten und Makrophagen TILR exprimieren. Im Falle von anti-CHIR-AB1 sind 56% der Zellen zugleich MHC Klasse II-positiv, in Kombination mit anti-CHIR-A2 sogar 68%. Auch bei den Monozyten und Makrophagen wurde die überwiegende Co-Expression von

TILR-A und TILR-AB nachgewiesen. Dieses ähnliche Expressionsmuster auf Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten legt nahe, dass sie eventuell auch funktionell ähnliche Aufgaben übernehmen oder sich ergänzen.

Da die Liganden von TILR-A und TILR-B ebenso wie bei CHIR-A und CHIR-B unbekannt sind, lässt sich über deren Funktion nur spekulieren. Ausgehend von den obigen Daten ist es aber durchaus vorstellbar, dass sie an der Erkennung körperfremder Strukturen und an der Abtötung von Pathogenen oder infizierten Zellen beteiligt sind. Eine Co-Expression mit TILR-B würde durchaus Sinn machen, um einerseits das aktivierende Signal zu beenden, oder um körpereigene Zellen zu schützen. Um diese Zusammenhänge und Funktionen der CHIR- und TILR-Subgruppen besser verstehen zu können, ist das Auffinden der Liganden ein unumgänglicher Schritt.



## V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden sechs turkey-Ig-like receptor (TILR) Sequenzen identifiziert, bestehend aus einer TILR-A, einer TILR-B und vier TILR-AB Sequenzen. Bei allen vier TILR-AB Sequenzen sind die fünf für die IgY-CHIR-AB-Bindung essentiellen Aminosäuren konserviert und für TILR-AB1 konnte die Bindung an IgY nachgewiesen werden. Interessanterweise bindet TILR-AB1 nicht nur IgY der Pute, sondern auch an IgY von Huhn, Wachtel und Fasan, die alle der Vogelfamilie der Phasianidae angehören. Bei drei ausgewählten Vertretern außerhalb dieser Familie (Graupapagei, Falke und Ente) konnte die IgY-Bindung an TILR-AB1 nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Huhn, dessen CHIR-Familie auf einem Mikrochromosom lokalisiert ist, werden die in den Datenbanken vorhandenen TILR-Sequenzen und Fragmente dem Makrochromosom 3 zugeordnet. Auch im Expressionsmuster unterscheiden sich CHIR und TILR deutlich. Während die TILR-B-Expression nicht näher untersucht werden konnte, zeigte sich für TILR-A und TILR-AB, dass diese weder auf T- noch auf B-Zellen exprimiert werden. Auf Thrombozyten und Monozyten ist eine sehr hohe Expressionsrate sichtbar. Auffällig ist, dass der Großteil der TILR-A positiven Zellen auch TILR-AB coexprimiert.

In den Datenbanken finden sich derzeit keine Hinweise auf das Vorhandensein von CHIR-Homologen bei Zebrafink, Fliegenschnäpper, Wellensittich und Ente. Auch die verfügbaren gegen CHIR gerichteten monoklonalen Antikörper zeigten auf Entenblut keine Kreuzreaktivität. Erst eine genaue Annotation der genomischen Daten wird Aufschluss darüber geben, inwiefern CHIR-homologe Rezeptorfamilien bei anderen Vogelspezies vorhanden und expandiert sind.

## VI. SUMMARY

### The turkey Ig-like receptor family

Six turkey Ig-like receptor (TILR) sequences were identified, composed of one TILR-A, one TILR-B and four TILR-AB sequences. The five amino acid residues, that are essential for the binding to IgY, were conserved in all TILR-AB sequences and the IgY-TILR-AB1 interaction was detectable. Interestingly, TILR-AB1 does not only bind to turkey-IgY, but also to IgY from chicken, quail and pheasant. All of them belong to the bird family phasianidae. The binding of TILR-AB1 to IgY of three particular members outside of this family (grey parrot, hawk and duck) was not measurable. The chicken CHIR family is located on microchromosome 31, in contrast, TILR sequences received from data bases were annotated to macrochromosome three. Furthermore the expression pattern of CHIR and TILR are different. TILR-A and TILR-AB were shown to be mainly expressed on thrombocytes and macrophages, but not on T- or B-cells. The expression of TILR-B could not be analyzed further due to lack of cross-reactive mab. Most of the TILR-A positive cells also coexpress TILR-AB.

There was no evidence in data bases for the existence of CHIR homologues in zebra finch, flycatcher, budgerigar and duck. Also by means of the available anti-CHIR monoclonal antibodies no cross reaction with blood cells of the duck was detectable. Further annotation of different bird genomes will shed light on the situation in other bird species, if they have CHIR-homologue receptor molecules and if so to what extent.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Dennis G, Jr., Kubagawa H, Cooper MD (2000) Paired Ig-like receptor homologs in birds and mammals share a common ancestor with mammalian Fc receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 13245-13250.
2. Viertlboeck BC, Habermann FA, Schmitt R, Groenen MA, Du Pasquier L, et al. (2005) The chicken leukocyte receptor complex: a highly diverse multigene family encoding at least six structurally distinct receptor types. *Journal of Immunology* 175: 385-393.
3. 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. *Molecular Immunology* 47: 1956-1962.
4. Viertlboeck BC, Gick CM, Schmitt R, Du Pasquier L, Göbel TW (2010) Complexity of expressed CHIR genes. *Developmental and Comparative Immunology* 34: 866-873.
5. Viertlboeck BC, Schweinsberg S, Schmitt R, Herberg FW, Göbel TW (2009) The chicken leukocyte receptor complex encodes a family of different affinity FcY receptors. *Journal of Immunology* 182: 6985-6992.
6. Viertlboeck BC, Göbel TW (2011) The chicken leukocyte receptor cluster. *Vet Immunol Immunopathol* 144: 1-10.
7. Rogers SL, Viertlboeck BC, Göbel TW, Kaufman J (2008) Avian NK activities, cells and receptors. *Seminars in Immunology* 20: 353-360.
8. Arnon TI, Kaiser JT, West AP, Jr., Olson R, Diskin R, et al. (2008) The crystal structure of CHIR-AB1: a primordial avian classical Fc receptor. *Journal of Molecular Biology* 381: 1012-1024.
9. Lochner K (2010) Der Leukozyten Rezeptor Komplex des Bankivahuhns. LMU München.
10. Laun K, Coggill P, Palmer S, Sims S, Ning Z, et al. (2006) The leukocyte receptor complex in chicken is characterized by massive expansion and diversification of immunoglobulin-like Loci. *PLoS Genetics* 2: e73.
11. Nikolaidis N, Makalowska I, Chalkia D, Makalowski W, Klein J, et al. (2005) Origin and evolution of the chicken leukocyte receptor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 4057-4062.
12. Viertlboeck BC, Schmitt R, Hanczaruk MA, Crooijmans RP, Groenen MA, et al. (2009) A novel activating chicken IgY FcR is related to leukocyte receptor complex (LRC) genes but is located on a chromosomal region distinct from the LRC and FcR gene clusters. *Journal of Immunology* 182: 1533-1540.
13. Barrow AD, Trowsdale J (2008) The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. *Immunological Reviews* 224: 98-123.
14. Ravetch JV, Lanier LL (2000) Immune inhibitory receptors. *Science* 290: 84-89.
15. Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, et al. (2002) Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 38: 637-660.
16. Vivier E, Nunes JA, Vely F (2004) Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306: 1517-1519.

17. Ivashkiv LB (2009) Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors. *Nat Immunol* 10: 340-347.
18. 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. *Journal of Immunology* 173: 7385-7393.
19. Barrow AD, Trowsdale J (2006) You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling. *European Journal of Immunology* 36: 1646-1653.
20. Viertlboeck BC, Schweinsberg S, Hanczaruk MA, Schmitt R, Du Pasquier L, et al. (2007) The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 11718-11723.
21. Pürzel J, Schmitt R, Viertlboeck BC, Göbel TW (2009) Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA: Fc alpha RI interaction. *Journal of Immunology* 183: 4554-4559.
22. Woof JM, Burton DR (2004) Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nature Reviews Immunology* 4: 89-99.
23. Schreiner B, Viertlboeck BC, Gobel TW (2012) A striking example of convergent evolution observed for the ggFcR:IgY interaction closely resembling that of mammalian FcR:IgG. *Developmental and Comparative Immunology* 36: 566-571.
24. Viertlboeck BC (2004) Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung neuer "Chicken Ig-like" Rezeptoren. LMU München.
25. Yoder JA, Litman GW (2011) The phylogenetic origins of natural killer receptors and recognition: relationships, possibilities, and realities. *Immunogenetics* 63: 123-141.
26. Martin AM, Kulski JK, Witt C, Pontarotti P, Christiansen FT (2002) Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. *Trends in Immunology* 23: 81-88.
27. Wende H, Volz A, Ziegler A (2000) Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster. *Immunogenetics* 51: 703-713.
28. Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, et al. (2001) The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunological Reviews* 181: 20-38.
29. Pilsbury LE, Allen RL, Vordermeier M (2010) Modulation of Toll-like receptor activity by leukocyte Ig-like receptors and their effects during bacterial infection. *Mediators of Inflammation* 2010.
30. Young NT, Canavez F, Uhrberg M, Shum BP, Parham P (2001) Conserved organization of the ILT/LIR gene family within the polymorphic human leukocyte receptor complex. *Immunogenetics* 53: 270-278.
31. Wende H, Colonna M, Ziegler A, Volz A (1999) Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mammalian Genome* 10: 154-160.
32. Lanier LL (1998) NK cell receptors. *Annual Review in Immunology* 16: 359-393.
33. Sambrook JG, Bashirova A, Palmer S, Sims S, Trowsdale J, et al. (2005) Single haplotype analysis demonstrates rapid evolution of the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) loci in primates. *Genome Research* 15: 25-35.

34. Rajagopalan S, Long EO (1999) A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine* 189: 1093-1100.
35. Kikuchi-Maki A, Catina TL, Campbell KS (2005) Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *Journal of Immunology* 174: 3859-3863.
36. Faure M, Long EO (2002) KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *Journal of Immunology* 168: 6208-6214.
37. Wilson MJ, Torkar M, Trowsdale J (1997) Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. *Tissue Antigens* 49: 574-579.
38. Martin A, Kulski JK, Gaudieri S, Witt C, Freitas EM, et al. (2004) Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene* 335: 121-131.
39. Young NT, Uhrberg M (2002) KIR expression shapes cytotoxic repertoires: a developmental program of survival. *Trends in Immunology* 23: 71-75.
40. Baxter AG, Smyth MJ (2002) The role of NK cells in autoimmune disease. *Autoimmunity* 35: 1-14.
41. Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY (2010) GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8: 1456-1467.
42. Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue A, Xiong X, Debili N, et al. (2000) Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 96: 1798-1807.
43. Moroi M, Jung SM (2004) Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thrombosis Research* 114: 221-233.
44. Watson SP, Asazuma N, Atkinson B, Berlanga O, Best D, et al. (2001) The role of ITAM- and ITIM-coupled receptors in platelet activation by collagen. *Thromb Haemost* 86: 276-288.
45. Kremer EJ, Kalatzis V, Baker E, Callen DF, Sutherland GR, et al. (1992) The gene for the human IgA Fc receptor maps to 19q13.4. *Hum Genet* 89: 107-108.
46. Daeron M (1997) Fc Receptor Biology. *Annu Rev Immunol* 15: 203-234.
47. Shimokawa T, Tsuge T, Okumura K, Ra C (2000) Identification and characterization of the promotor for the gene encoding the human myeloid IgA Fc receptor (Fc $\alpha$ R, CD89). *Immunogenetics* 51: 945-954.
48. Patry C, Herbelin A, Lehuen A, Bach JF, Monteiro RC (1995) Fc $\alpha$  receptors mediate release of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 by human monocytes following receptor aggregation. *Immunology* 86: 1-5.
49. Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, et al. (1998) Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *Journal of Experimental Medicine* 188: 953-960.
50. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, et al. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual Review in Immunology* 19: 197-223.
51. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, et al. (2001) Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409: 1055-1060.

52. Arnon TI, Achdout H, Lieberman N, Gazit R, Gonen-Gross T, et al. (2004) The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood* 103: 664-672.
53. Biassoni R, Cantoni C, Marras D, Giron-Michel J, Falco M, et al. (2003) Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. *Journal of cellular and molecular medicine* 7: 376-387.
54. Lebbink RJ, Van den Berg TK, de Ruiter T, Raynal N, van Roon JAG, et al. (2008) The soluble leukocyte-associated Ig-like receptor (LAIR)-2 antagonizes the collagen/LAIR-1 inhibitory immune interaction. *Journal of Immunology* 180: 1662-1669.
55. Meyaard L (2008) The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). *Journal of Leukocyte Biology* 83: 799-803.
56. Meyaard L, Adema GJ, Chang C, Woollatt E, Sutherland GR, et al. (1997) LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity* 7: 283-290.
57. Lebbink RJ, de Ruiter T, Adelmeijer J, Brenkman AB, van Helvoort JM, et al. (2006) Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *Journal of Experimental Medicine* 203: 1419-1425.
58. Meyaard L, Hurenkamp J, Clevers H, Lanier LL, Phillips JH (1999) Leukocyte-associated Ig-like receptor-1 functions as an inhibitory receptor on cytotoxic T cells. *J Immunol* 162: 5800-5804.
59. Van der Vuurst de Vries AR, Clevers H, Logtenberg T, Meyaard L (1999) Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) is differentially expressed during human B cell differentiation and inhibits B cell receptor-mediated signaling. *Eur J Immunol* 29: 3160-3167.
60. Poggi A, Tomasello E, Ferrero E, Zoocchi MR, Moretta L (1998) p40/LAIR-1 regulates the differentiation of peripheral blood precursors to dendritic cells induced by granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *Eur J Immunol* 28: 2086-2091.
61. Taylor LS, McVicar DW (1999) Functional association of FcεRIγ with arginine632 of paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A3 in murine macrophages. *Blood* 94: 1790-1796.
62. Liang S, Baibakov B, Horuzsko A (2002) HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor. *Eur J Immunol* 32: 2418-2426.
63. Frenzel LP, Abdullah Z, Kriegeskorte AK, Dieterich R, Lange N, et al. (2009) Role of natural-killer group 2 member D ligands and intercellular adhesion molecule 1 in natural killer cell-mediated lysis of murine embryonic stem cells and embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells* 27: 307-316.
64. Biassoni R, Pessino A, Bottino C, Pende D, Moretta L, et al. (1999) The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. *Eur J Immunol* 29: 1014-1020.
65. Palacios C, Cuervo LC, Cadavid LF (2010) Evolutionary patterns of killer cell Ig-like receptor genes in Old World monkeys. *Gene* 474: 39-51.
66. LaBonte ML, Hershberger KL, Korber B, Letvin NL (2001) The KIR and CD94/NKG2 families of molecules in the rhesus monkey. *Immunological Reviews* 183: 25-40.

67. Hershberger KL, Shyam R, Miura A, Letvin NL (2001) Diversity of the killer cell Ig-like receptors of rhesus monkeys. *The Journal of Immunology* 166: 4380-4390.
68. Hershberger KL, Kurian J, Korber BT, Letvin NL (2005) Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) of the African-origin *sabaeus* monkey: evidence for recombination events in the evolution of KIR. *Eur J Immunol* 35: 922-935.
69. Blokhuis JH, van der Wiel MK, M DGG, Bontrop RE (2010) The mosaic of KIR haplotypes in rhesus macaques. *Immunogenetics* 62: 295-306.
70. Parham P, Abi-Rached L, Matevosyan L, Moesta AK, Norman PJ, et al. (2010) Primate-specific regulation of natural killer cells. *J Med Primatol* 39: 194-212.
71. Dobromylskj M, Ellis S (2007) Complexity in cattle KIR genes: transcription and genome analysis. *Immunogenetics* 59: 463-472.
72. Boysen P, Storset AK (2009) Bovine natural killer cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 130: 163-177.
73. Guethlein LA, Abi-Rached L, Hammond JA, Parham P (2007) The expanded cattle KIR genes are orthologous to the conserved single-copy KIR3DX1 gene of primates. *Immunogenetics* 59: 517-522.
74. Gagnier L, Wilhelm BT, Mager DL (2003) Ly49 genes in non-rodent mammals. *Immunogenetics* 55: 109-115.
75. Hammond JA, Guethlein LA, Abi-Rached L, Moesta AK, Parham P (2009) Evolution and survival of marine carnivores did not require a diversity of killer cell Ig-like receptors or Ly49 NK cell receptors. *Journal of Immunology* 182: 3618-3627.
76. Sambrook JG, Sehra H, Coggill P, Humphray S, Palmer S, et al. (2006) Identification of a single killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene in the porcine leukocyte receptor complex on chromosome 6q. *Immunogenetics* 58: 484-486.
77. Takahashi T, Yawata M, Raudsepp T, Lear TL, Chowdhary BP, et al. (2004) Natural killer cell receptors in the horse: evidence for the existence of multiple transcribed LY49 genes. *European Journal of Immunology* 34: 773-784.
78. Stafford JL, Bengten E, Du Pasquier L, McIntosh RS, Quiniou SM, et al. (2006) A novel family of diversified immunoregulatory receptors in teleosts is homologous to both mammalian Fc receptors and molecules encoded within the leukocyte receptor complex. *Immunogenetics* 58: 758-773.
79. Mewes J, Verheijen K, Montgomery BCS, Stafford JL (2009) Stimulatory catfish leukocyte immune-type receptors (IpLITRs) demonstrate a unique ability to associate with adaptor signaling proteins and participate in the formation of homo- and heterodimers. *Molecular Immunology* 47: 318-331.
80. Yoder JA, Mueller MG, Nichols KM, Ristow SS, Thorgaard GH, et al. (2002) Cloning novel immune-type inhibitory receptors from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Immunogenetics* 54: 662-670.
81. Yoder JA, Litman RT, Mueller MG, Desai S, Dobrinski KP, et al. (2004) Resolution of the novel immune-type receptor gene cluster in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 15706-15711.
82. Litman GW, Hawke NA, Yoder JA (2001) Novel immune-type receptor genes. *Immunological Reviews* 181: 250-259.

83. Yoder JA, Mueller MG, Wei S, Corliss BC, Prather DM, et al. (2001) Immune-type receptor genes in zebrafish share genetic and functional properties with genes encoded by the mammalian leukocyte receptor cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 6771-6776.
84. Guselnikov SV, Reshetnikova ES, Najakshin AM, Mechetina LV, Robert J, et al. (2010) The amphibians *Xenopus laevis* and *Silurana tropicalis* possess a family of activating KIR-related Immunoglobulin-like receptors. *Dev Comp Immunol* 34: 308-315.
85. MacDonald MR, Veniamin SM, Guo X, Xia J, Moon DA, et al. (2007) Genomics of antiviral defenses in the duck, a natural host of influenza and hepatitis B viruses. *Cytogenetic and Genomic Research* 117: 195-206.
86. Khakoo SI, Rajalingam R, Shum B, Weidenbach K, Flodin L, et al. (2000) Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. *Immunity* 12: 687-698.
87. Hao L, Nei M (2004) Genomic organization and evolutionary analysis of Ly49 genes encoding the rodent natural killer cell receptors: rapid evolution by repeated gene duplication. *Immunogenetics* 56: 343-354.
88. Straub C, Neulen ML, Sperling B, Windau K, Zechmann M, et al. (2013) Chicken NK cell receptors (submitted).
89. Zhang G, Young JR, Tregaskes CA, Sopp P, Howard CJ (1995) Identification of a novel class of mammalian Fc $\gamma$  receptor. *The Journal of Immunology* 155: 1534-1541.
90. Li Z, Nestor KE, Saif YM, Fan Z, Luhtala M, et al. (1999) Cross-reactive anti-chicken CD4 and CD8 monoclonal antibodies suggest polymorphism of the turkey CD8 $\alpha$  molecule. *Poultry Science* 78: 1526-1531.
91. Lawson S, Rothwell L, Lambrecht B, Howes K, Venugopal K, et al. (2000) Turkey and chicken interferon- $\gamma$ , which share high sequence identity, are biologically cross-reactive. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 69-82.
92. Meseguer J, Esteban MA, Rodriguez A (2002) Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Microscopy research and technique* 57: 491-497.
93. St Paul M, Paolucci S, Barjesteh N, Wood RD, Schat KA, et al. (2012) Characterization of chicken thrombocyte responses to Toll-like receptor ligands. *PLoS One* 7: e43381.
94. Oxholm P, Winther K (1986) Thrombocyte involvement in immune inflammatory reactions. *Allergy* 41: 1-10.
95. Wigley P, Hulme SD, Barrow PA (1999) Phagocytic and oxidative burst activity of chicken thrombocytes to *Salmonella*, *Escherichia coli* and other bacteria. *Avian Pathology* 28: 567-572.
96. Kehrel BE, Jurk K (2004) Platelets at the interface between hemostasis and innate immunity. *Transfus Med Hemother* 31: 379-386.
97. Zander DMW, Klinger MHF (2009) The blood platelets contribution to innate host defense - what they have learned from their big brothers. *Biotechnol J* 4: 914-926.



## **VIII. PERSÖNLICHE DATEN**

Name: Katharina Windau

Geburtsdatum: 28.03.1986

Geburtsort: München

## **IX. DANKSAGUNG**

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

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

Desweiteren bedanke ich mich bei meinen Kollegen Marie-Luise Neulen, Barbara Schreiner, Beatrice Sperling, Christian Straub und Maria Zechmann für die gute Einarbeitung, fachliche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. B. Kaspers, Frau Dr. S. Härtle sowie der gesamten AG Kaspers für ihre Anregungen.

Auch bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für den freundlichen Umgang und die stetige Hilfsbereitschaft herzlich bedanken.