

Charakterisierung von TNF- α beim Huhn

von

Franziska Rohde

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

Charakterisierung von TNF- α beim Huhn

von

Franziska Rohde

aus

Chemnitz

München 2018

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

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Korreferent/en: Prof. Dr. Valeri Zakhartchenko

Tag der Promotion: 27.07.2018

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 TNF-Superfamilie beim Säuger	2
2.1.1 Geschichte von TNF- α	2
2.1.2 Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie	3
2.1.3 Struktur von TNF- α und dessen Rezeptoren TNFR1 und 2	5
2.1.4 Signaltransduktionswege von TNF- α	6
2.1.5 Physiologie von TNF- α	9
2.1.6 Die Bedeutung von TNF- α bei Erkrankungen	11
2.2. TNF-Superfamilie beim Huhn.....	15
2.2.1 Die Mitglieder der TNF-Superfamilie beim Huhn.....	15
3 ZIELSETZUNG	18
4 PUBLIKATION	19
5 DISKUSSION	33
5.1 Identifizierung und phylogenetische Untersuchungen von TNF- α beim Huhn 33	
5.1.1 Alignment und phylogenetische Untersuchung von chTNF- α	34
5.2 Genexpressionsanalysen von chTNF- α <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	37
5.3 Untersuchung der biologischen Aktivität von chTNF- α	39
5.4 Ausblick.....	42
6 ZUSAMMENFASSUNG	43
7 SUMMARY	45
8 LITERATURVERZEICHNIS	47
9 DANKSAGUNG	57

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie beim Säuger.....4

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signalkaskade von TNF- α7

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BAFF	B cell activating factor of the tumor necrosis factor family
BAFFR	B cell activating factor of the tumor necrosis factor family receptor
BCMA	B-cell maturation antigen
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	complementary DNA (durch reverse Transkription aus mRNA hergestellt)
chBAFF	chicken BAFF (BAFF des Huhns)
chIL-1	chicken IL-1 (IL-1 des Huhns)
chIL-6	chicken IL-6 (IL-6 des Huhns)
ChTL1A	Chicken TL1-A (TL1-A des Huhns)
chTNF- α	chicken TNF- α (TNF- α des Huhns)
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis protein
CRP	C-reaktives Protein
CR	cysteinreiche Sequenzwiederholungen (engl. cystein-rich repeat)
DcR	Decoy receptor
DED	death-effector domain
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Death receptor
EDAR	Ectodysplasin-A-Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FADD	Fas-assozierte Proteine mit Todesdomäne (engl. Fas associated proteins with a death domain)
FasR	Fas-Rezeptor
GITR	Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor
hLT	Humanes Lymphotoxin
hTNF	Humanes TNF
HVEM	Herpes virus entry mediator

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IFN- γ	Interferon- γ
IKK	Inhibitor of kappa B Kinase
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
IL-12	Interleukin 12
I κ B	Inhibitor of kappa B
kDa	Kilodalton
LITAF	LPS-induced TNF- α factor
LPS	Lipopolysaccharid
LT- α	Lymphotoxin- α
LT- β	Lymphotoxin- β
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBL	Mannose-bindende Lektin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex)
mTNF- α	murines TNF- α
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGF	Nerve Growth Factor
NGFR	Nerve growth factor receptor
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
OPG	Osteoprotegerin
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RHD	Rel homology domain

RING	Really Interesting New Gene
RIP	Rezeptor-interagierende Proteine (andere Namen: RIPK1, RIP1)
ROS	reaktives Sauerstoff-Molekül (engl. reactive oxygen species)
TACE	TNF- α Converting Enzyme
TACI	Transmembrane activator and CAML interactor
TF	Gewebethromboplastin (engl. Tissue factor)
THD	tumour necrosis factor homology domain
TIM	TRAF-interagierende Motiv
TL1-A	TNF-like ligand
TLR-4	Toll-like receptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNF-SF	Tumornekrosefaktor-Superfamilie
TNF-SFL	Tumornekrosefaktor-Superfamilie-Liganden
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2
TNFR-SF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
TRADD	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierte Protein (engl. Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein)
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierte Faktor
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
ZKÜ	Zellkulturüberstand

1 EINLEITUNG

Das Huhn (*Gallus gallus domesticus*) als Nutztier hat sowohl weltweit als auch in Deutschland große wirtschaftliche Bedeutung. So lag der Konsum von Geflügelfleisch in Deutschland pro Einwohner bei 19,8 kg/Jahr (2015) [1]. Die Schlachtmenge an Geflügel betrug 2016 1,5 Millionen Tonnen. Außerdem wurden in Deutschland 233 Eier/Einwohner (2015) verzehrt und ca. 12 Milliarden Eier (2016) produziert [1, 2]. Insgesamt wird in Deutschland in der Geflügelindustrie mit Eiern- und deren Produkten sowie mit Geflügelfleisch ein Umsatz von ca. 10,5 Milliarden Euro pro Jahr erzielt [3].

Um leistungsfähige und gesunde Tierbestände zu bewahren, ist es unabdingbar, Infektionen zu kontrollieren und durch geeignete Maßnahmen vorzubeugen. Dabei spielen vor allem virale Infektionen wie die aviäre Influenza, die Newcastle-Krankheit oder auch die Marek'sche Krankheit beim Huhn eine wichtige Rolle. Nicht alle verfügbaren Impfstoffe erfüllen erwünschte Standards an Qualität, Sicherheit und Handhabbarkeit. Ein umfassendes Verständnis des Immunsystems kann zur Entwicklung besserer Impfstoffe beitragen.

Das Huhn wird bereits seit über 100 Jahren als wichtiges Tiermodell zur Untersuchung des Immunsystems verwendet. Besonders die Identifizierung der B- und T-Zellen und deren Funktion haben zum Verständnis des aviären und Säugetier-Immunsystems beigetragen [4]. Große Fortschritte wurden dabei durch die vollständige Sequenzierung des Genoms beim Huhn gemacht [5]. Zudem wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl weiterer Vogelgenome sequenziert [6, 7]. Dieser große Pool an genomischen Daten wird intensiv genutzt, um bisher unbekannte Gene des Immunsystems beim Huhn zu identifizieren. Zu diesen gehören beispielsweise die Familie der Zytokine. Diese sind Proteine, welche für die Zelldifferenzierung und Funktion sowie das Zellwachstum verantwortlich sind. Zu den verschiedenen Zytokinfamilien gehören beispielsweise die Interferonfamilie und die Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNF-SF). Mitglieder dieser Familien wurden bereits im Huhn untersucht [8]. Dennoch konnte der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), ein Mitglied der TNF-SF, beim Huhn noch nicht identifiziert werden. In dieser Dissertation war es möglich, die Hühner TNF- α -Sequenz zu identifizieren und das Protein zu charakterisieren.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 TNF-Superfamilie beim Säuger

2.1.1 Geschichte von TNF- α

Die Entdeckung des pleiotropen Zytokins TNF- α ist charakterisiert durch eine Reihe aufeinanderfolgender Experimente. Im Jahre 1893 wurde durch Coley festgestellt, dass die Behandlung maligner Tumore mittels einer Injektion von aus Bakterien isolierten Toxinen („Coleys Toxin“) eine Verringerung der Tumorgröße beim Patienten erzielte [9, 10]. Daraufhin isolierten Shear et al. 1943 aus *E. coli* und *Serratia marcescens* einen Faktor, welcher heute als Lipopolysaccharid (LPS) bekannt ist [11]. LPS ist eine chemische Verbindung, welche in der äußeren Membran der Zellwände gramnegativer Bakterien lokalisiert ist. Es besteht aus drei Komponenten: dem außen gelegenen Lipid A, der Kernregion und dem daran gebundenen Polysaccharid. Das Lipid A wirkt als Endotoxin und wird von den Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt, welche daraufhin die bakterielle Infektion bekämpfen [12]. Es konnte dabei nachgewiesen werden, dass die Tumorregression auf diesen toxischen Faktor zurückzuführen war [11, 13]. 1962 wurde eine Tumor nekrotisierende Aktivität von LPS festgestellt. Dabei wurde einer normalen Mauslinie der zu dieser Zeit als „*Serratia marcescens* polysaccharid“ bezeichnete Stoff verabreicht. Das Serum dieser Mäuse wurde daraufhin einer zweiten Mauslinie mit induzierten Sarkomen injiziert und dabei die Nekrotisierung der Tumore beobachtet [14]. Carswell et al. bezeichneten als erste Gruppe im Jahre 1975 den durch das Endotoxin induzierten Serumfaktor als „Tumor Nekrose Faktor = TNF“. Es wurde bereits vermutet, dass TNF durch die Wirtszelle, speziell durch Makrophagen, im Zuge der LPS-Stimulation ausgeschüttet wird, was eine Tumorregression zur Folge hatte [15]. Parallel zu diesen Forschungsergebnissen entdeckten Cerami und Beutler, dass das von ihnen charakterisierte Cachectin und TNF dasselbe Protein darstellten [16-18]. Im Rahmen der Charakterisierung von humanem Lymphotoxin (hLT) konnten Aggarwal et al. 1984 Teile von dessen Aminosäuresequenz identifizieren [19]. Dies legte den Grundstein für die Klonierung der cDNA von hLT [20]. Im selben Jahr konnte auch die humane TNF (hTNF) cDNA-Sequenz entschlüsselt werden [21]. Durch die gleichzeitige strukturelle Untersuchung von TNF und Lymphotoxin (LT) konnten sowohl eine Sequenzhomologie als auch funktionelle Ähnlichkeiten dieser beiden Zytokine bestätigt werden [21]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Existenz einer größeren TNF-Familie mit mehreren Mitgliedern vermutet [19, 22]. Dies konnte in den folgenden Jahren

durch die Identifizierung weiterer Zytokine, welche der TNF-Superfamilie zugeordnet werden konnten, bestätigt werden.

2.1.2 Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie

Die TNF-SF beim Säuger besteht aus 19 Liganden und ihren dazugehörigen 29 Rezeptoren (Abbildung 1). Zu den Liganden gehören unter anderem TNF- α , Lymphotoxin- α (LT- α), LT- β , B cell activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) und Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), welche auch teilweise beim Huhn beschrieben wurden. Nach der Entdeckung von TNF- α und LT wurden mit moderneren, molekularbiologischen Techniken auch weitere Vertreter identifiziert und so konnte die Existenz einer TNF-SF bestätigt werden. Die Liganden der TNF-SF weisen Ähnlichkeiten in ihrer Struktur, ihrer biologischen Aktivität und auch in ihren immunstimulierenden Funktionen auf [10, 15, 19, 22, 23]. Mitglieder der TNF-SF kommen entweder als lösliche oder membrangebundene Proteine im Körper vor, welche den Typ-II-Transmembranproteinen zugeteilt werden. Charakteristisch für diese ist es, dass sie einen intrazellulären N-Terminus aufweisen und teilweise als Trimere vorliegen, wohingegen Typ-I-Transmembranproteine einen extrazellulären N-Terminus besitzen [24]. Des Weiteren weisen die Liganden typische homologe Motive innerhalb ihrer Aminosäuresequenz auf, welche 20-30 % Übereinstimmungen aufweisen [24, 25]. Die TNF-Superfamilien-Liganden (TNF-SFL) binden die entsprechenden Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFR-SF). Dabei kann ein Ligand entweder mit einem einzigen Rezeptor oder mit mehreren interagieren. Kennzeichnend für diese Rezeptoren ist es, dass sie zu den Typ-I-Transmembranproteinen gehören, welche ein bis sechs extrazelluläre cysteinreiche Sequenzwiederholungen (engl. cystein-rich repeat; CR) aufweisen. Man unterteilt diese Rezeptoren, aufgrund ihrer unterschiedlichen intrazellulären Domänen, in drei Gruppen [24]. Die erste Gruppe besitzt die sogenannte Todesdomäne. Diese Proteine werden aufgrund ihrer apoptosefördernden Wirkungsweise auch als Todesrezeptoren bezeichnet [26]. Dazu gehören die Rezeptoren: Ectodysplasina-Rezeptor (EDAR), Decoy receptor 2 (DcR2), Death receptor 3 (DR 3), DR 4, DR 5, DR 6, Nerve growth factor receptor (NGFR) und der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1 (TNFR1) [22]. Die zweite Gruppe ist durch das TNF-Rezeptor-assoziierte Faktor (TRAF)-interagierende Motiv (TIM) charakterisiert. Diese Rezeptoren zeichnen sich durch die Aktivierung von Signalkaskaden aus, die zum Überleben und Wachstum der

Zellen führen. Als Beispiele sind der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-2 (TNFR2), Receptor Activator of NF- κ B (RANK), B cell activating factor of the tumor necrosis factor family receptor (BAFFR) und Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor (GITR) zu nennen [22]. Zu der dritten Gruppe gehören Osteoprotegerin (OPG), DcR1 und DcR3. Diese besitzen keine intrazelluläre Signaltransduktionskette, sie konkurrieren lediglich mit den anderen beiden Rezeptorgruppen um ihre spezifischen Liganden [24, 27].

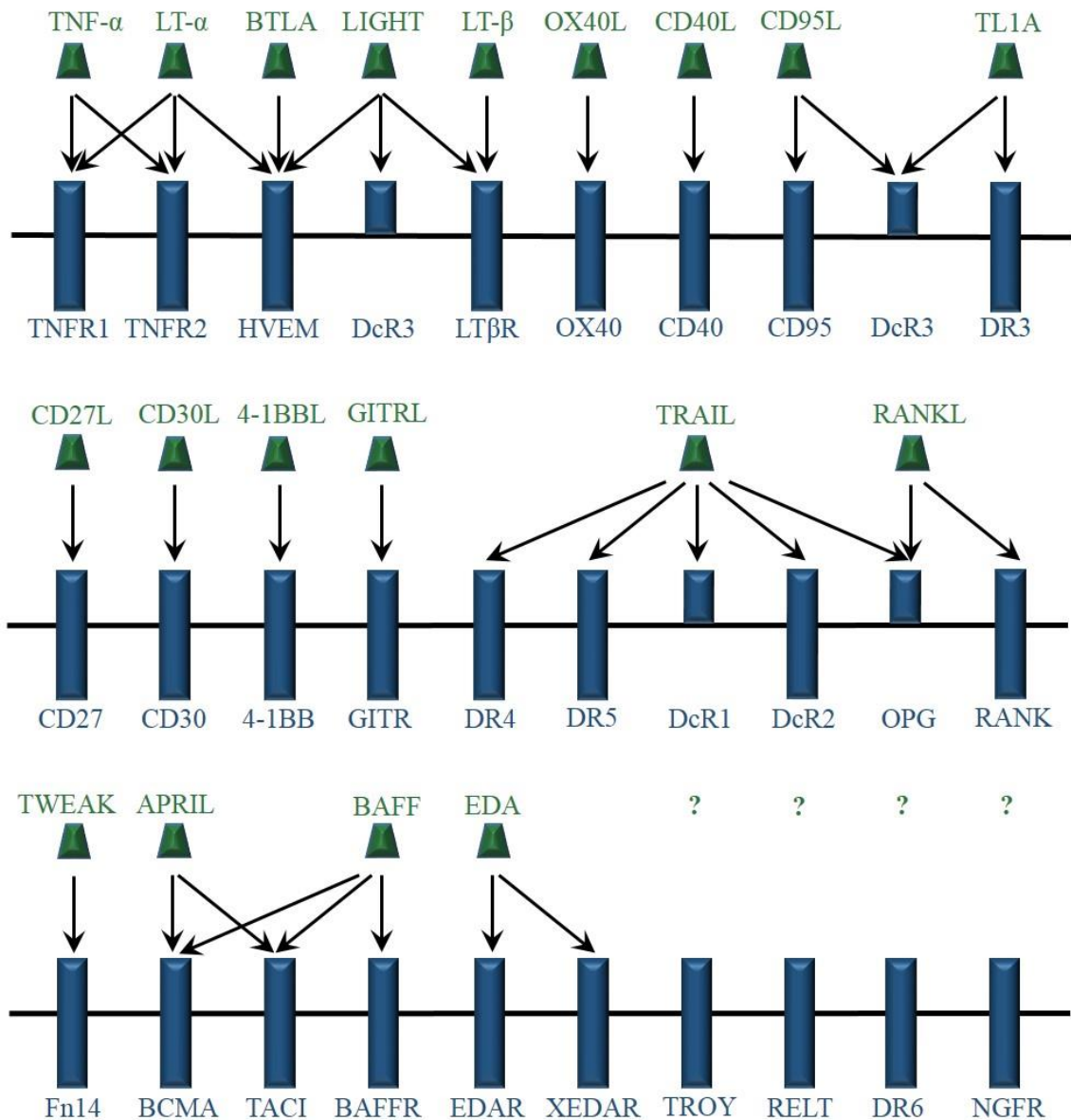


Abbildung 1: Die Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie beim Säuger

Die 29 Liganden (grün) der TNF-SF und die korrespondierenden 19 Rezeptoren (blau) sind dargestellt. Die Zugehörigkeit ist durch verbindende Pfeile gekennzeichnet. Die Fragezeichen geben an, dass zu diesen Rezeptoren noch keine TNF-SF-Liganden identifiziert werden konnten. Funktionelle Nomenklatur nach [22, 27].

2.1.3 Struktur von TNF- α und dessen Rezeptoren TNFR1 und 2

TNF- α kann in einer membrangebundenen und einer löslichen Form vorkommen, welche durch Metalloproteinasen aus der membrangebundenen Form abgespalten wird. Dadurch, dass beide Formen biologisch aktiv sind, werden sowohl parakrine, endokrine als auch autokrine Effekte vermittelt [24]. Es ist, wie auch die anderen TNF-SFL, ein Typ-II-Transmembranprotein. Die membrangebundene Form besteht aus 233 Aminosäuren mit einem molekularen Gewicht von 26 Kilodalton (kDa) [28, 29]. Die abgespaltene lösliche Form setzt sich aus 157 Aminosäuren zusammen und ist 17 kDa groß [29, 30]. Als lösliche Form liegt TNF- α als Trimer vor, so dass es ein Molekulargewicht von 51 kDa aufweist [31]. Dem liegt eine spezielle, charakteristische Proteinfaltung des Monomers, aus zwei antiparallelen β -Faltblättern zu Grunde, welche als β -jelly-rolls bezeichnet wird [32, 33].

Die Aminosäuresequenz des membrangebundenen TNF- α setzt sich aus einer extrazellulären Domäne (177 Aminosäuren), einer transmembranen Domäne (26 Aminosäuren) und einer intrazellulären Domäne (30 Aminosäuren) zusammen [29]. Der C-terminale Abschnitt beinhaltet die extrazelluläre Domäne, welche die konservierte tumour necrosis factor homology domain (THD) beinhaltet. Die THD weist eine 20-30 % hohe Sequenzhomologie auch innerhalb der Mitglieder der TNF-SF auf [34]. Bei Studien, welche die vollständige Proteinsequenz zwischen hTNF und murinem TNF- α (mTNF- α) verglichen haben, konnte eine 79 %ige Übereinstimmung festgestellt werden [35]. Nicht nur zwischen den Proteinen der Säugetiere konnten Ähnlichkeiten in der TNF-Sequenz gefunden werden, sondern auch mit denen von Amphibien und Fischen. So konnte beispielsweise eine 34 %ige Sequenzidentität in der THD des *Xenopus tropicalis* im Vergleich zu der THD beim Säugetier nachgewiesen werden, was eine strukturelle und funktionelle Homologie dieser Proteine nahe legt [36].

TNF- α bindet an die TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 [37] (Abbildung 1). Auch LT- α bindet unter anderem an diese beiden Rezeptoren, aber zusätzlich auch an den herpes virus entry mediator (HVEM), welcher auch zur TNFR-SF gehört [24]. Die beiden TNF-Rezeptoren werden Zelltyp-abhängig unterschiedlich stark exprimiert. Es ist kein Zelltyp bekannt, auf dem der TNFR1 nicht exprimiert wird, wohingegen der TNFR2 ausschließlich von Immunzellen und Endothelzellen exprimiert wird [22]. Abhängig davon, an welchen TNFR TNF- α bindet, werden dabei unterschiedliche Immunantworten im Körper ausgelöst. Dem zu Grunde liegt auch die unterschiedliche Struktur der beiden

Rezeptoren. Im Jahre 1989 konnten Hohmann et al. die Existenz der beiden unterschiedlichen Rezeptoren nachweisen. Der Nachweis erfolgte mittels radioaktiv markiertem TNF- α auf unterschiedlichen Zelltypen, wobei zwei unterschiedlich große Proteine für die Bindung identifiziert wurden [38]. Der TNFR1 hat ein Molekulargewicht von 55 kDa und bindet sowohl die lösliche als auch die membrangebundene Form von TNF- α . Im Gegensatz zu TNFR2 besitzt der TNFR1 eine Todesdomäne [37, 39]. Der TNFR2 hat ein Molekulargewicht von 75 kDa und bindet vor allem die membrangebundene Form von TNF- α [40, 41]. Dabei bindet die extrazelluläre cystein rich domain (CRD) beider TNF-Rezeptoren an die extrazelluläre THD von TNF- α [34].

2.1.4 Signaltransduktionswege von TNF- α

Abhängig davon ob TNF- α an den TNFR1 oder an den TNFR2 bindet, werden unterschiedliche Reaktionen im Körper ausgelöst. Verantwortlich dafür sind die sich an die Rezeptoraktivierung anschließenden unterschiedlichen Signalkaskaden (Abbildung 2). Wenn TNF- α an den TNFR1 bindet, erfolgt eine Konformationsänderung der intrazellulären Todesdomäne, welche die Interaktion mit anderen Proteinen zulässt. Dazu gehören TNF-Rezeptor-assoziierte Proteine (engl. Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein; TRADD) und Fas-assoziierte Proteine mit Todesdomäne (engl. Fas associated proteins with a death domain; FADD). Während die Aktivierung von FADD über TRADD zur Apoptose führt, kann TRADD selbst eine Downstream-Kaskade auslösen und zu einer Aktivierung anderer inflammatorischer Gene führen. Diese Downstream-Kaskade führt über Rezeptor-interagierende Proteine (RIP) zu TRAF2 und TRAF5. TRAF2 bindet an das cellular inhibitor of apoptosis protein 1 und 2 (cIAP1, cIAP2). Dabei bilden TNFR1-TRADD-RIPKI-TRAF2 den membrangebundenen Komplex I [42]. Dieser Komplex rekrutiert daraufhin die Inhibitor of kappa B Kinase (IKK). Deren Aktivierung führt zur Phosphorylierung und damit zur Degradierung der Proteine der Inhibitor of kappa B (I κ B) Familie. Diese Kaskade führt zur Aktivierung und Lokalisation des Schlüssel-Transkriptionsfaktors Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) in den Zellkern und damit zum Überleben der Zelle [43-45]. Dadurch ist die durch den TNFR1 vermittelte Signalübertragung auch an proinflammatorischen und antiapoptotischen intrazellulären Antworten beteiligt, um den Zelltod zu umgehen.

Auf der anderen Seite kann die Bindung von TNF- α an den TNFR1 zum Zelltod führen. Dabei bilden TRADD-FADD und die damit assoziierte Caspase 8 den Komplex II [42].

Diese fragile Balance zwischen Apoptose und Anti-Apoptose wird durch andere zelluläre Prozesse spezifisch reguliert, wie zum Beispiel durch die Liganden/Rezeptoren-Internalisierung [44].

Durch die Bindung von TNF- α an den TNFR2 werden keine Signaltransduktionswege ausgelöst, welche zur Apoptose führen, was somit zum Teil zu einer Überschneidung mit der Signalkaskade des TNFR1 führt. Im Gegensatz zu dem TNFR1 besitzt der TNFR2 keine Todesdomäne, sondern die TIMs, welche mit den TRAFs interagieren. Wenn TNF- α an den TNFR2 bindet, führt dies zur direkten Anlagerung von TRAF1/2, welche ihrerseits cIAP1 oder cIAP2 binden. Dadurch kann auch diese Signalkaskade NF- κ B aktivieren [44, 46].

Sowohl die lösliche als auch die membrangebundene Form binden beide an den TNFR1 und an den TNFR2. Dennoch führt vor allem die lösliche Form von TNF- α zu der Aktivierung von TNFR1. Auf der anderen Seite hat der TNFR2 eine besonders hohe Affinität für das membrangebundene TNF- α [47]. Somit führt die Bindung von TNF- α an den jeweiligen Rezeptoren zu einzigartigen Signalwegen, aber auch zu deren Überschneidungen [48].

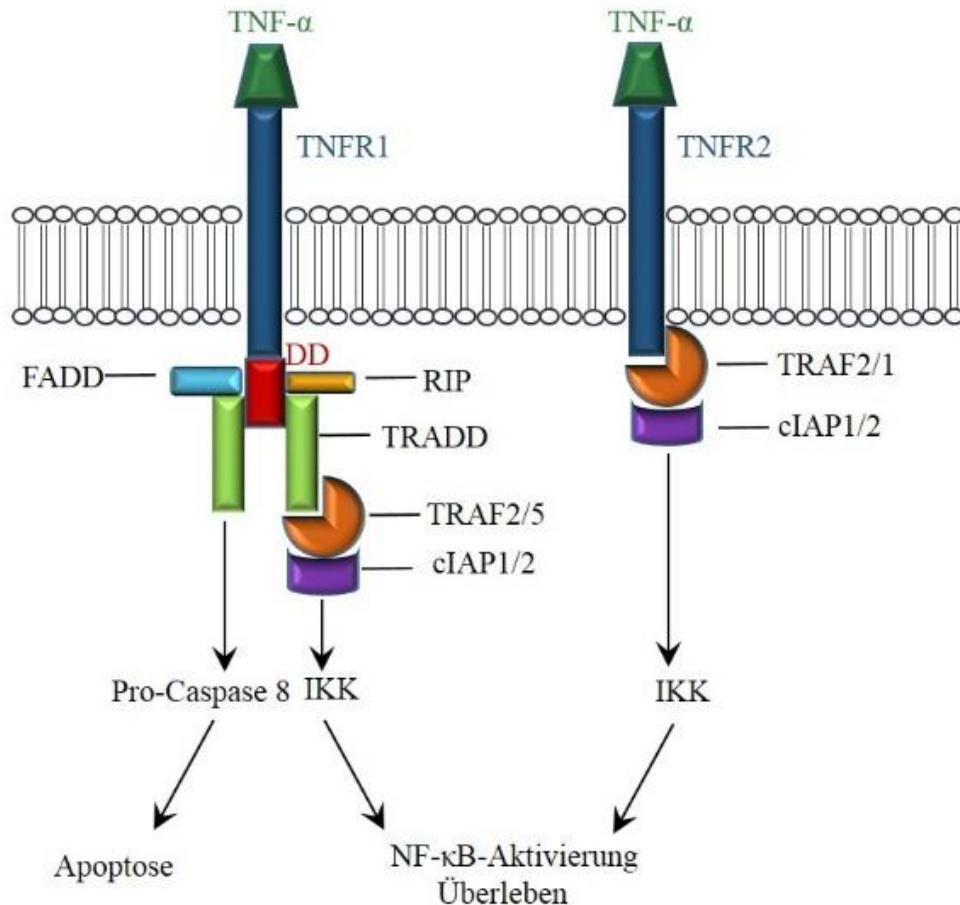


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signalkaskade von TNF- α

Durch die Bindung von TNF- α an den TNFR1 oder TNFR2 werden verschiedene Signaltransduktionswege initialisiert. Die Abfolge ist durch Pfeile gekennzeichnet und zeigt auch die Überschneidung zwischen TNFR1 und 2.

2.1.4.1 Komponenten des Signaltransduktionsweges

TRADD ist ein Adapter-Protein, welches sowohl Signalwege vermittelt, die zur Apoptose als auch solche, die zum Zellüberleben führen. Dabei ist TRADD mit Proteinen assoziiert, welche selbst eine Todesdomäne besitzen, wie zum Beispiel einige Mitglieder der TNFR-SF [22, 49]. So besitzt auch TRADD selbst eine mit der TNFR1 Todesdomäne zu 23 % übereinstimmenden Abschnitt in der Aminosäuresequenz. TRADD besitzt ein Molekulargewicht von 34 kDa. Im C-terminalen Abschnitt von TRADD liegt die Todesdomäne, welche beispielsweise für die direkte Bindung mit der Todesdomäne von TNFR1 verantwortlich ist. Der N-Terminus hat eine gefaltete α/β -Sandwich Struktur und interagiert mit dem C-terminalen Anteil von TRAF2 [49, 50].

FADD ist ein weiteres wichtiges Adapter-Protein und interagiert auch mit anderen Mitgliedern der TNFR-SF wie CD95 (FasR) und TNFR1 [22, 51]. Es hat ein Molekulargewicht von 23 kDa und interagiert über seine Todesdomäne im C-Terminus mit der Todesdomäne des TNFR1. Der N-terminale Abschnitt besitzt die death-effector domain (DED), welche mit der Caspase 8 interagiert und so zur Apoptose führt. Dabei bilden sie zusammen den death-inducing signaling complex (DISC) [51, 52].

Die TRAFs werden in TRAF1-6 beim Säugetier eingeteilt. Die TRAF-Domäne besteht aus einem hochkonservierten C-terminalen Abschnitt und einem variablen N-terminalen Abschnitt. Der C-terminale Abschnitt ist für die Bindung an Mitglieder der TNFR-SF verantwortlich, wohingegen der N-terminale Abschnitt die Funktion vermittelt, welche beispielsweise zu der Aktivierung von NF- κ B führt [53, 54]. Des Weiteren enthält der N-terminale Teil aller TRAFs Zink-Finger-Motive [55] und außer TRAF1 ein RING-Finger-Motiv [56].

NF- κ B ist kein einzelnes Protein, sondern ein Oberbegriff für fünf verschiedene Proteine beim Säuger, welche der NF- κ B/Rel-Proteinfamilie zugeordnet werden. Dazu gehören NF κ B1 (p50), NF κ B2 (p52), RelA (p65), RelB und c-Rel. Aus diesen einzelnen Mitgliedern bilden sich Dimere, welche wiederum Transkriptionsfaktoren darstellen. Charakteristisch ist die gemeinsame Rel homology domain (RHD), welche aus 300 Aminosäuren besteht und die Dimerisierung bewirkt [45]. NF- κ B wird durch die

Inhibitoren der I κ B-Familie im Zytoplasma inaktiviert. Die IKK phosphoryliert diese und führt über diesen Signaltransduktionsweg zur Aktivierung von NF- κ B [57]. Die TNF-gesteuerte Aktivierung von NF- κ B dient sowohl dem Schutz vor Apoptose, als auch der Induktion von proinflammatorischen Prozessen. NF- κ B ist somit ein zentraler Transkriptionsfaktor, welcher eine Vielzahl von Genen reguliert, welche beispielsweise an der Immunantwort beteiligt sind [45, 57]. Die von NF- κ B regulierten Gene lassen sich unterschiedlichen Gruppen zuordnen. Darunter befinden sich Zytokine wie BAFF, Interferon- γ (IFN- γ), aber auch TNF- α selbst. Des Weiteren konnten eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, wie der Nerve Growth Factor (NGF) oder Erythropoetin und andere Transkriptionsfaktoren, wie p53 als regulierte Gene nachgewiesen werden. Auch die verstärkte Transkription von Proteinen der Akuten-Phase-Reaktion, darunter das C-reaktive Protein (CRP) oder das Gewebethromboplastin (engl. Tissue factor, TF), welches die Blutgerinnung initiiert, sind der Aktivierung durch NF- κ B zuzuordnen. Somit sind neben den Genen für die Immunantwort ebenfalls Gene, die für das Zellwachstum eine Rolle spielen, zum Beispiel das Phosphatase and Tensin homolog (PTEN), als direkte Ziele der NF- κ B Regulation bekannt [58].

2.1.5 Physiologie von TNF- α

TNF- α wird von vielen Zellarten, vor allem aber von Zellen des Immunsystems, unter physiologischen Bedingungen im Rahmen der Immunantwort exprimiert. Dazu gehören vor allem Makrophagen, aber auch B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Mikrogliazellen [22, 59]. Des Weiteren schütten auch Endothelzellen, Mastzellen, Herzmuskelzellen und Fettzellen TNF- α als Reaktion auf proinflammatorische Stimuli aus [60-63]. Es konnte nachgewiesen werden, dass ausgeschüttetes TNF- α lokal direkt auf das Endothel wirkt. Dabei hat es einen Einfluss auf die Stimulation und Ausschüttung weiterer Proteine, welche teilweise auch auf die Blutgerinnung wirken [64].

Bei der Blutgerinnung bilden eine Vielzahl von Faktoren die Gerinnungskaskade, deren Ziel es ist, die Blutung durch eine Erhöhung der Viskosität des Blutes zu stoppen. Dadurch wird zum einen der übermäßige Verlust von Blut verhindert, zum anderen die Wunde verschlossen und so das Eindringen von Pathogenen erschwert. Die Gerinnungskaskade wird, je nachdem wie diese aktiviert wird, in einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg unterteilt. Als Initiator der extrinsischen Gerinnung dient das

Zelloberflächenprotein TF. Dieses wird auf der Oberfläche von perivaskulären Zellen exprimiert und steht im Normalfall nicht mit dem Blut in Kontakt. Zusätzlich können Endothelzellen und Monozyten den TF durch Induktion exprimieren. Das unversehrte Endothel bildet dabei die Barriere zwischen dem TF und dem im Blut gelösten Faktor VIIa, welche zusammen die Gerinnung initiieren und die Signalkaskade auslösen [65]. Durch eine Schädigung der Endothelschicht, zum Beispiel bei Stich- oder Schnittverletzungen, kommt es zu einer Freisetzung von TF. Aber auch die Bekämpfung von Bakterien durch die lokale Ausschüttung von TNF- α durch Immunzellen kann in Endothelzellen die Freisetzung von TF induzieren. Diese werden dadurch aktiviert und die Fähigkeit zur Rekrutierung und Bindung von Leukozyten und Blutplättchen erhöht. Die direkte Wirkung auf das Gefäßendothel soll so eine Ausbreitung der Infektion verhindern. TNF- α führt dort zu einer vermehrten Permeabilität der Blutgefäße, indem der interzelluläre Abstand zwischen den Endothelzellen erhöht wird. Dadurch können zum Beispiel Antikörper, speziell das Immunglobulin G, lokal wirken. Außerdem führt es zur Ausschüttung weiterer TNF- α / NF- κ B regulierter Proteine der Immunantwort und parallel zur Aktivierung des Komplementsystems [66]. Der durch TNF- α ausgelöste Schutzmechanismus bei lokalen Infektionen kann allerdings auch bei systemischen Infektionen ausgelöst werden. Dadurch kommt es in den Blutgefäßen zu einer verstärkten Gerinnung, einer Verringerung des Blutdruckes bei gleichzeitiger Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Die folgende Unterversorgung der angrenzenden Organe mit Nährstoffen und Sauerstoff kann zu einer schwerwiegenden Schädigung des Gewebes bis hin zum Absterben führen. Dies wird klinisch als septischer Schock bezeichnet [66].

TNF- α ist ein Zytokin, welches im angeborenen Immunsystem eine große Rolle spielt. Weitere wichtige Zytokine in diesem Zusammenhang sind Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 6 (IL-6). Diese werden unter anderem auch von Makrophagen sezerniert [66]. TNF- α ebenso wie IL-1 und IL-6 führen zu der sogenannten Akute-Phase-Reaktion. Diese ist beispielsweise die Folge einer lokalen bakteriellen Infektion bzw. einer Verletzung. Dabei werden die Zytokine von Makrophagen am Ort des Insults ausgeschüttet, gelangen über das Blut in die Leber, wirken auf die Hepatozyten und induzieren die Synthese von Akute-Phase-Proteinen (APP). Zu den wichtigsten Vertretern der APP zählen das CRP und das Mannose-bindende Lektin (MBL). Je nachdem, welches Protein gebildet wird, werden unterschiedliche Immunreaktionen im Körper ausgelöst, wie beispielsweise die bereits erwähnte Aktivierung des Komplementsystems [66-68].

2.1.6 Die Bedeutung von TNF- α bei Erkrankungen

2.1.6.1 Autoimmune Erkrankungen

TNF- α ist bei vielen autoimmunen Erkrankungen relevant. Zu diesen gehört beispielsweise die rheumatoide Arthritis, welche sich durch Schmerzen, dem Anschwellen und der progressiven Zerstörung der Gelenke auszeichnet. Als Ursache wird eine autoimmune Reaktion innerhalb der Gelenke und die damit einhergehende Degeneration beschrieben. Dabei wird die Vaskularität der Gelenke erhöht, wobei gleichzeitig eine verstärkte Infiltration durch Zellen des Immunsystems stattfindet. Besonders aktivierte CD4⁺ T-Zellen sind in diesem Bereich für die Ausschüttung von Zytokinen, wie IL-1, IL-6 und TNF- α , verantwortlich [69]. Es ist bekannt, dass in Geweben mit hoher TNF- α Konzentration eine erhöhte Degeneration von Knorpelgewebe sowie eine erhöhte Expression von Zelladhäsionsmolekülen stattfindet [70, 71]. Dieselben Zytokine sind allerdings auch für die Bekämpfung exogener Fremdstoffe, wie Bakterien, verantwortlich. Der Nachweis von Zytokinen in der Gelenksflüssigkeit von Patienten führte zu der Überlegung, ob Antikörper gegen diese zu einer Behandlung genutzt werden können. Elliot et al. beschrieben als erste die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen TNF- α bei einer autoimmunen Erkrankung beim Menschen [72]. Dabei kann eine Verbesserung der Symptome sowie eine Verringerung von proinflammatorischen Zytokinen bis hin zur Expression von antiinflammatorischen Markern beobachtet werden [69, 71]. Aktuell werden beispielsweise Medikamente wie Etanercept oder Infliximab in der Therapie beim Menschen verwendet. Etanercept besitzt die TNF-bindende Domäne des TNF-Rezeptors, interagiert dadurch mit TNF- α und verhindert so kompetitiv dessen Bindung an den Rezeptor. Infliximab wirkt als monoklonaler Antikörper und damit als TNF-Blocker [71, 73].

Ein ähnlicher immunologischer Zusammenhang wird auch beim Morbus Bechterew vermutet, welcher auch eine rheumatoide Gelenkserkrankung, speziell der Wirbelsäulengelenke, ist. Mit Hilfe von genomischen Studien konnten mittlerweile verschiedene Signaltransduktionswege des Immunsystems identifiziert werden, deren Dysregulation an der Entstehung und Progression der Erkrankung beteiligt ist. Darunter sind die Regulation von NF- κ B aber auch die intrazelluläre Prozessierung der Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle (engl. Major Histocompatibility Complex; MHC) zu nennen. In den arthritischen Bereichen konnten zudem proinflammatorische Zytokine, darunter TNF- α und IL-6, nachgewiesen werden [74]. Eine aktive lokale

Immunreaktion kann daher zu einer Degeneration der umgebenen Gewebe führen. Die Behandlung der Patienten mit TNF-Blockern, besonders in der Frühphase der Erkrankung, konnte in klinischen Studien eine Verbesserung der Symptome bewirken [75].

Eine weitere Autoimmunerkrankung, die mit einer TNF- α Dysregulation assoziiert ist, ist der Morbus Crohn, eine chronische Entzündung des Gastrointestinaltraktes, besonders allerdings des Darmes. Histologische Untersuchungen des Darmes bei Patienten konnten eine entzündungsbedingte Verdickung der Darmmukosa nachweisen [76]. Auch bei dieser Erkrankung konnte eine fehlgeleitete Aktivierung zytotoxischer T-Zellen als Ursache ausgemacht werden. Diese reagieren dabei auf die normale Darmflora und können danach nicht durch Apoptose abgeschaltet werden, wodurch diese eine längere Aktivität und damit eine erhöhte Expression und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen aufweisen. Durch diese Überreaktion ist auch die Entstehung autoreaktiver Antikörper gegen die körpereigenen Antigene der Darmzellen möglich, was zu einer entzündlichen Degeneration dieser Zellen führt. Durch die Reifung der T-Zellen wird auch die Sekretion von IFN- γ und TNF- α angeschaltet, welches die lokale Überreaktion nur weiter verstärkt und dabei Anfälle besonders heftiger Entzündungen auslösen kann. Auch hier werden anti-TNF-Medikamente sowie weitere in der Entwicklung befindliche Zytokin-Blocker zur symptomatischen Behandlung eingesetzt [77].

2.1.6.2 Infektiöse Erkrankungen

TNF- α spielt auch bei bakteriellen oder viral bedingten Infektionen eine Rolle. Dabei werden die TNF-Signaltransduktionswege durch die exogenen Pathogene auf verschiedene Art und Weise beeinflusst [24, 78].

Bei der Wirtsabwehr werden die Zellen des Immunsystems zunächst durch Antigene der Erreger aktiviert. So wird zum Beispiel LPS durch den Toll-like receptor 4 (TLR-4) von Makrophagen erkannt. LPS sowie andere Antigene werden dabei als pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) bezeichnet. Dies sind Oberflächenstrukturen, die bei vielen Bakterien ähnlich aufgebaut sind und daher von den gleichen Rezeptoren erkannt werden können. Solche Rezeptoren, wie TLR-4, werden der Familie der pattern recognition receptor (PRR) zugeordnet [79]. Die Aktivierung des TLR-4 führt zur Ausschüttung von Zytokinen, wie TNF- α , IL-1 und IL-6 und damit zur Stimulierung anderer Immunzellen. So kann das TNF- α -Signal besonders gegen intrazelluläre Infektionserreger wirken,

indem es die Apoptose induziert, zytolytisch wirkt oder die Replikation der Erreger inhibiert. Dadurch können zellinvasive Bakterien wie *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* und *Mycobacterium tuberculosis* abgewehrt werden. Diese Bakterien benötigen für ihre Replikation Wirtsproteine, da sie selber nicht in der Lage sind, diese zu exprimieren und damit extrazellulär nicht wachsen können. Das Gleiche betrifft die Viren, da auch deren Replikation von den Wirtsproteinen zur Genexpression abhängig ist. Mit Hilfe von Maus-Infektionsmodellen konnte nachgewiesen werden, dass der Knockout von TNF- α oder TNFR1 zu einer Beeinträchtigung der Wirtsabwehr führt. Dabei ist speziell die T-Zell-abhängige Immunantwort bei bakteriellen Infektionen reduziert [78, 80]. Bei viralen Infektionen, beispielsweise mit dem *Herpes simplex virus*, wurde auch gezeigt, dass bei diesen Knockout-Mäusen die Inhibition der Replikation eingeschränkt ist. Selektionsbedingt haben diese Erreger im Laufe der Zeit Strategien entwickelt, um der Wirtsabwehr zu entkommen, sogenannte Evasions-Mechanismen [78]. So konnten einige Viren viral codierte Proteine entwickeln, die als TNF- oder TNFR1-Inhibitoren fungieren. Dabei wird entweder TNF- α selbst gebunden, oder die Interaktion mit den Rezeptoren beziehungsweise die korrekte Homodimerisierung der Rezeptoren verhindert und so die apoptotische Kaskade ausgeschaltet. Außerdem kann über die Modulation der NF- κ B abhängigen Gene die Konzentration antiapoptotischer Faktoren in den infizierten Wirtszellen erhöht werden. Bei Bakterien sind bis zum heutigen Tage keine Proteine für direkte Interaktionen mit TNF- α bekannt, stattdessen werden die proliferativen Signalwege über NF- κ B oder die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) moduliert [78].

Bei Mäusen wurden auch Infektionsmodelle mit *Mycobacterium tuberculosis* genutzt, welche zeigten, dass TNF- α für die T-Zell-Differenzierung und bei der Reifung von aktivierten Makrophagen wichtig ist, um die Infektion einzuschränken [81]. Zusätzlich wurde festgestellt, dass sowohl der Schutz vor den Pathogenen, aber auch das Fortschreiten der Krankheit sowie die Persistenz der Bakterien durch das regulatorische TNF- α Netzwerk kontrolliert werden. Da *M. tuberculosis* besonders in Makrophagen persistiert und repliziert, wird durch eine genaue Kontrolle der TNF- α Konzentration in der näheren Umgebung die Voraussetzung für die Regulation des Bakterienwachstums gelegt. Dadurch entstehen die für Tuberkulose typischen Tuberkel oder Granulome, Ansammlungen von Immunzellen (mononukleare Phagozyten, multinukleare Riesenzellen), in denen eine Bakterien-Replikation kontrolliert werden kann [82, 83]. Die Verringerung der TNF- α Konzentration führt dabei zu einer Freisetzung der Bakterien

und damit zu einer Ausbreitung der Infektion. Im Infektionsmodell mit TNF-Knockout-Mäusen konnte keine Bildung der Granulome beobachtet werden und die Tiere erlagen der Infektion [84]. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Untersuchungen im Rahmen der Entwicklung von anti-TNF- α Medikamenten ein erhöhtes Risiko von Infektionen oder die Reaktivierung der Pathogene (*M. tuberculosis*, *Herpes simplex virus*, *Varizella-Zoster-Virus*) durch die Therapie aufzeigten [83, 85]. Sowohl bei Experimenten mit Mäusen als auch bei klinischen Studien stellt die Erkrankung mit *Mycobacterium tuberculosis* ein potentielles Risiko bei einer anti-TNF- α -Therapie dar [81].

Zur effektiven Bekämpfung von Erregern haben Immunzellen, darunter alveoläre Makrophagen und neutrophile Granulozyten, einen weiteren Mechanismus entwickelt, um die Immunantwort zu regulieren. Durch die Aufnahme von Bakterien oder anderen Pathogenen im Zuge der Phagozytose steigt der Sauerstoff-Verbrauch dieser Zellen enorm an, auch „Respiratorischer Burst“ genannt [66, 86]. Im Zuge der Zellatmung werden gleichzeitig eine Reihe von reaktiven Sauerstoff-Molekülen (engl. reactive oxygen species, ROS) produziert. Diese reagieren danach mit den aufgenommenen Molekülen (Proteine, Nukleinsäuren) der Pathogene. Zu den produzierten ROS gehört auch in geringer Menge Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die Beobachtung einer Aktivierung von T-Zellen durch extrazelluläres H_2O_2 führte zu der Vermutung, dass auch die intrazelluläre Aktivierung von NF- κ B durch freigesetzte ROS stattfinden kann. Dieser Mechanismus konnte auch in alveolären Makrophagen festgestellt werden [87]. Dabei werden vor allem die Inhibitoren von NF- κ B durch die Aktivierung von dazugehörigen Kinasen phosphoryliert, was die Freisetzung von NF- κ B und die Translokation in den Nukleus zur Folge hat [88]. Zusätzlich hat H_2O_2 auch einen Einfluss auf die Aktivierung von proliferativen Signalwegen über die MAPK-Kaskaden, was zur Expression einer Vielzahl von Genen für Zellproliferation führt [89].

Die Bekämpfung von Krankheitserregern durch die Aktivierung von Genen des Immunsystems sowie die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen durch die Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α erfolgt also nicht nur durch einen festgelegten Signalweg, sondern durch mehrere redundante und stark vernetzte Signalkaskaden.

2.2. TNF-Superfamilie beim Huhn

2.2.1 Die Mitglieder der TNF-Superfamilie beim Huhn

Die Identifizierung von Zytokinen beim Huhn wurde lange Zeit dadurch erschwert, dass sie auf genomischer Ebene nur geringe Übereinstimmungen mit den orthologen Säugersequenzen aufweisen und kommerzielle Assays für den Nachweis der biologischen Aktivität von Hühnerzytokinen fehlen. Durch die Verfügbarkeit des Hühnergenoms wurde schließlich die Grundlage für die Charakterisierungen von Zytokinen und deren Zuordnung und Gruppierung in entsprechende Zytokin-Familien gelegt [5, 90].

Beim Huhn wurden inzwischen zahlreiche TNF-SFL und deren Rezeptoren identifiziert. Allerdings konnten noch nicht alle beim Säuger beschriebenen Liganden und Rezeptoren der TNF-SF beim Huhn nachgewiesen werden. Unter anderem sind jedoch die folgenden Liganden der TNF-SF bekannt: BAFF, CD30L, TRAIL, CD40L, OX40L und CD95L [90].

Im Zuge der Identifizierung von Hühner BAFF (engl. chicken BAFF, chBAFF) konnte im Vergleich der Aminosäuresequenzen eine Übereinstimmung von 76 % zwischen humanem und chBAFF aufgezeigt werden. Aufgrund der hohen Übereinstimmung wurde auch die Interaktion zwischen chBAFF und humanem BAFFR untersucht und eine Bindung nachgewiesen. Im Säuger interagiert BAFF zusätzlich mit dem Transmembrane activator and CAML interactor (TACI) und dem B-cell maturation antigen Rezeptor (BCMA). Auch hier konnte die direkte Interaktion zwischen den humanen Rezeptoren und dem chBAFF nachgewiesen werden [91]. Beim Huhn konnten die Rezeptoren BAFFR und TACI im Genom identifiziert und die Bindung mit dem chBAFF verifiziert werden. Die Sequenz des Rezeptors BCMA ist im Hühner-Genom nur unvollständig enthalten und codiert nicht für das Homolog des humanen BCMA. Eine Interaktion zwischen dem chBAFF und dem BCMA im Huhn wurde daher nicht untersucht [92]. BAFF ist ein wesentlicher Faktor für die Proliferation und das Überleben von B-Zellen im Säuger. *In vitro* Untersuchungen mit Hühner B-Zellen konnten den proliferativen Effekt von chBAFF nicht nachweisen, jedoch eine verlängerte Lebensphase der B-Zellen [91]. Zur weiteren Untersuchung der B-Zell Homöostase beim Huhn wurden *in vivo* Experimente mit überexprimiertem chBAFF, sowie einer löslichen Variante des humanen BCMA durchgeführt. Die Überexpression von chBAFF führte dabei zu einer stark erhöhten Anzahl an B-Zellen und damit einhergehend einer erhöhten Konzentration an

Immunglobulinen. Die erwartete Reduktion der B-Zell-Anzahl nach Behandlung mit dem löslichen Rezeptor BCMA konnte ebenfalls nachgewiesen werden, sie resultierte aus der systemischen Neutralisation des löslichen chBAFF und damit der Verringerung der biologischen Aktivität [93]. Durch diese Studien konnte gezeigt werden, dass chBAFF, wie beim Säuger, eine zentrale Rolle in der B-Zell Homöostase spielt. Darüber hinaus erwies sich chBAFF als essentieller Faktor für die Reifung der B-Zellen in der Bursa Fabricii.

CD30L und TRAIL wurden von Abdalla et al. beim Huhn charakterisiert. Es wurde die cDNA kloniert, die Aminosäuresequenz verglichen und die Expression dieser Liganden analysiert. Der CD30L beim Huhn hat eine Übereinstimmung von 36,4 % mit dem humanen Molekül. Es konnte eine erhöhte Expression in der Lunge, der Bursa Fabricii und der Milz gezeigt werden. TRAIL hat eine Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz von 54,4 % zwischen Huhn und Mensch. Eine Expression wurde hier unter anderem in Milz, Niere, Knochenmark und der Bursa Fabricii nachgewiesen [94].

OX40L und der dazugehörige TNF-Rezeptor OX40 wurden erst kürzlich beim Huhn genauer von Scherer und Göbel charakterisiert [95]. Die Proteine wurden zunächst phylogenetisch und strukturell durch Sequenzalignments untersucht. OX40L beim Huhn besitzt eine Sequenzhomologie von 19 % zum humanen OX40L und weist ähnliche strukturelle Charakteristika auf, wie zum Beispiel eine konservierte THD. Der entsprechende Rezeptor des Huhns zeigt eine Übereinstimmung der gesamten Sequenz von 30 % im Vergleich zum humanen OX40. Sowohl der Ligand OX40L als auch der dazugehörige Rezeptor OX40 wurden als rekombinante Proteine exprimiert. Es konnte so die Bindung zwischen dem Liganden OX40L mit dem entsprechenden Rezeptor OX40 mittels eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und durchflusszytometrisch gezeigt werden. Das OX40-OX40L System reguliert in Säugern unter anderem das Überleben von T-Zellen durch die Expression von anti-apoptischen Genen [96]. Zur Überprüfung dieses Systems im Huhn wurden Hühner-T-Zellen sowohl vor der Stimulation mit IL-2 und IL-12 als auch danach auf die Bindung zwischen dem membranständigen OX40L und rekombinant exprimierten OX40 untersucht. Dabei konnte nach der Aktivierung eine direkte Bindung beider Proteine detektiert und damit die Existenz des OX40-OX40L-Systems für T-Zellen auch im Huhn nachgewiesen werden [95].

TNF- α , wie auch LT- α und β konnten noch nicht beim Huhn identifiziert und charakterisiert werden. Es gab mehrere Studien beim Huhn, welche eine TNF-ähnliche

Aktivität beschrieben. Dazu untersuchten Hong et al. den LPS-induced TNF- α factor (LITAF). Dieses Protein besteht aus 148 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 16 kDa. Bei der Stimulation von Makrophagen mit LPS konnte man eine Expression nach vier Stunden nachweisen. Dennoch stellt dies kein Homolog zu TNF- α beim Huhn dar [97]. Eine andere Studie beschäftigt sich mit einem dem humanen TL1-A (TNF-like ligand) homologen Hühner TL1-A (ChTL1A). Die Aminosäuresequenz besteht aus 239 Aminosäuren, welche auch einen transmembranen Abschnitt aufweist. Bei einem *in vivo* Versuch wurde Hühnern LPS injiziert und in verschiedenen Organen die mRNA Expression von ChTL1A analysiert. Es konnte eine erhöhte Expression in der Milz detektiert werden. Des Weiteren wurde in einer nachfolgenden Studie rekombinantes ChTL1A Hühnern injiziert und es wurden weitere inflammatorische Zytokine wie IL-1 und IL-6 in der quantitativen Realtime-PCR (qRT-PCR) gemessen. Eine erhöhte Expression konnte sowohl für IL-1 als auch für IL-6 in der Milz validiert werden. Daraufhin wurde in dieser Studie die Existenz von TNF- α beim Huhn in Frage gestellt und anstelle dessen ChTL1A als funktioneller Ersatz diskutiert [98, 99]. Auch die Analyse genomischer Datenbanken konnte bisher kein TNF- α Ortholog im Genom des Huhnes nachweisen [8]. Der in Säugetieren bekannte Gencluster für TNF- α , LT- α und LT- β , welcher sich im MHC class III Locus befindet, wurde bisher nicht im Genom des Huhnes identifiziert [100]. Genomweite Untersuchungen konnten diese Gene bisher auch in keinem anderen Abschnitt detektieren. Somit konnte bisher deren Existenz und Funktion in aviären Spezies, trotz deren essentieller Rolle im Immunsystem der Säugetiere, bislang nicht untersucht werden [90].

3 ZIELSETZUNG

Obwohl schon viele Mitglieder der TNF-SF beim Huhn identifiziert werden konnten, ist es bisher nicht gelungen den Namensgeber der Familie (TNF- α) zu identifizieren. Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von genomischen Analysen, die Sequenz von TNF- α beim Huhn zu identifizieren und das Zytokin zu charakterisieren.

Mit der Identifizierung der TNF- α -Sequenz beim Huhn (chTNF- α) bestand die Möglichkeit, weitere phylogenetische Analysen durchzuführen.

Schließlich sollte die Expression von chTNF- α mittels quantitativer PCR-Analysen sowohl *in vitro* bei primären Makrophagen des Huhnes (Blut, Milz, Knochenmark) und bei T-Zellen (Milz) als auch *in vivo* untersucht werden.

Abschließend sollte chTNF- α als rekombinantes Protein gewonnen und dessen biologische Aktivität mittels eines bereits etablierten CEC-NF κ B-Reporterassays (Luciferase-Assay) überprüft werden.

4 PUBLIKATION



ORIGINAL RESEARCH
published: 17 April 2018
doi: 10.3389/fimmu.2018.00605



Characterization of Chicken Tumor Necrosis Factor- α , a Long Missed Cytokine in Birds

Franziska Rohde¹, Benjamin Schusser², Tomáš Hron³, Helena Farkašová³, Jiří Plachý³, Sonja Härtle¹, Jiří Hejnar³, Daniel Elleder^{3*†} and Bernd Kaspers^{1*†}

¹Department of Veterinary Science, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany, ²Reproductive Biotechnology, Department of Animal Sciences, Technical University Munich, Munich, Germany, ³Laboratory of Viral and Cellular Genetics, Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czechia

OPEN ACCESS

Edited by:

Diana Boraschi,
Istituto di Biochimica delle Proteine
(CNR), Italy

Reviewed by:

Angela Bonura,
Consiglio Nazionale Delle Ricerche
(CNR), Italy
Cheol-Heui Yun,
Seoul National University,
South Korea

*Correspondence:

Daniel Elleder
elleder@img.cas.cz;
Bernd Kaspers
kaspers@imu.de

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted
to Cytokines and Soluble
Mediators in Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 05 December 2017

Accepted: 09 March 2018

Published: 17 April 2018

Citation:

Rohde F, Schusser B, Hron T,
Farkašová H, Plachý J, Härtle S,
Hejnar J, Elleder D and Kaspers B
(2018) Characterization of Chicken
Tumor Necrosis Factor- α , a Long
Missed Cytokine in Birds.
Front. Immunol. 9:605.
doi: 10.3389/fimmu.2018.00605

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is a pleiotropic cytokine playing critical roles in host defense and acute and chronic inflammation. It has been described in fish, amphibians, and mammals but was considered to be absent in the avian genomes. Here, we report on the identification and functional characterization of the avian ortholog. The chicken TNF- α (chTNF- α) is encoded by a highly GC-rich gene, whose product shares with its mammalian counterpart 45% homology in the extracellular part displaying the characteristic TNF homology domain. Orthologs of chTNF- α were identified in the genomes of 12 additional avian species including *Palaeognathae* and *Neognathae*, and the synteny of the closely adjacent loci with mammalian TNF- α orthologs was demonstrated in the crow (*Corvus cornix*) genome. In addition to chTNF- α , we obtained full sequences for homologs of TNF- α receptors 1 and 2 (TNFR1, TNFR2). chTNF- α mRNA is strongly induced by lipopolysaccharide (LPS) stimulation of monocyte derived, splenic and bone marrow macrophages, and significantly upregulated in splenic tissue in response to i.v. LPS treatment. Activation of T-lymphocytes by TCR crosslinking induces chTNF- α expression in CD4⁺ but not in CD8⁺ cells. To gain insights into its biological activity, we generated recombinant chTNF- α in eukaryotic and prokaryotic expression systems. Both, the full-length cytokine and the extracellular domain rapidly induced an NF κ B-luciferase reporter in stably transfected CEC-32 reporter cells. Collectively, these data provide strong evidence for the existence of a fully functional TNF- α /TNF- α receptor system in birds thus filling a gap in our understanding of the evolution of cytokine systems.

Keywords: tumor necrosis factor- α , chicken, avian, tumor necrosis factor- α receptors, missing gene, biological activity

INTRODUCTION

Work in mammals over the last 40 years identified members of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor (TNFR) superfamilies as critical regulators of diverse biological functions, such as inflammation, immune defense, tissue development, and lymphocyte homeostasis (1–3). The founding member of this family was initially described as a serum factor induced by lipopolysaccharide (LPS) which caused hemorrhagic necrosis of induced fibrosarcomas, hence named TNF (4). Today, more than 40 members of the TNF/TNFR superfamilies have been described (5). TNF

family members are type II transmembrane proteins which form trimers either as membrane bound proteins or as soluble factors released from the cell membrane after proteolytic cleavage (6, 7). TNF-ligands bind to one or several receptors of the TNFR family, which are type I transmembrane proteins characterized by their cysteine-rich domains (5, 8, 9).

The identification, cloning, and functional characterization of avian cytokines and their receptors have been hampered by their low sequence homology with their mammalian orthologs, the lack of cross-reactivity of diagnostic tools and of suitable bioassays. Progress was made when the first chicken genome sequence was released (10, 11). Since then several cytokine and cytokine receptor families have been identified mainly in chickens (12) and to some extent in other avian species (13). The first comprehensive analysis of the chicken TNF/TNFR superfamilies identified numerous members but indicated a reduced complexity in comparison with the mammalian system (12). Several functionally important members of this superfamily seemed to be absent from the avian genome as previously observed for other avian cytokine and chemokine families. Most notably, neither TNF- α nor lymphotoxin- α (LT α) or LT β in birds were found despite their essential roles in immune defense and lymphoid organ development in mammals (11). Despite significant efforts using conventional database analysis and EST database screening (12) as well as expression cloning approaches a chicken TNF- α (chTNF- α) ortholog could not be identified. Furthermore, while the mammalian TNF- α gene is located within the MHC class III region in a cluster with LT α and LT β , the syntenic region is absent from the chicken MHC locus (14). TNF- α -like biological activities in conditioned media have been reported repeatedly (15–18) but none of these activities could be further characterized and clearly attributed to a TNF- α -like protein. These observations led some authors to conclude that TNF- α is indeed lacking in birds and arguments were put forward that other TNF family members such as TNF-like ligand 1A might at least partially substitute for its absence (11, 19) as discussed for other missing genes (20).

However, TNF- α homologs have been described in the genomes of several teleosts including Japanese flounder, rainbow trout, and common carp (21–23). Functional studies demonstrated homologs biological activities to mammalian TNF- α (23, 24) and characterized fish TNF- α as a potent inducer of inflammatory cytokines and antimicrobial peptides (25). These findings would predict that TNF- α is a phylogenically “old” cytokine which might have been lost during the evolution of avian species (20) or translocated in the genome due to extensive reassortment as observed in the chicken MHC locus and thus escaped identification as a consequence of incomplete shotgun sequences (12). Evidence in favor of the latter hypothesis comes from the identification of orthologs of the two mammalian TNF- α receptors in the chicken genome. In mice and man, TNFR1 is expressed on most cells and binds TNF- α in its membrane bound and soluble forms. Expression of TNFR2 is largely restricted to immune cells and endothelial cells and primarily binds to transmembrane TNF- α (5, 26). Likewise, the chicken TNFR1 ortholog is expressed in a wide variety of tissues (27, 28). By contrast, the chicken TNFR2 ortholog, which was identified through a suppressive subtractive hybridization approach in LPS stimulated spleens, is primarily

expressed in lymphoid tissues (29). This receptor shows 31 and 28% homology with its human and murine counterparts, respectively. Using reciprocal BLAST analysis and examination of conserved syntenic regions Kaiser et al. confirmed the presence of a TNFR2 ortholog in the chicken genome (12).

Recently, other “missing” genes were identified in the chicken genome including cytokines, such as erythropoietin (30) and leptin (31, 32) by making use of the increasing number of avian genome sequences and advanced data mining technologies. It turned out that these newly identified genes were highly GC-rich, which for technical reasons caused their absence from genome assemblies and other genetic databases (30). Such genes with high GC content and long GC-rich stretches are very hard to amplify by PCR and are also extremely underrepresented in next generation sequencing data. Thus, based on our previous success with EPO and leptin we set out to search for avian TNF- α . Independently, another group recently reported partial sequence homologous to chTNF- α (33). Here, we report on the assembly of a full-length gene resembling chTNF- α and provide functional evidence that the identified gene is indeed the avian ortholog of mammalian TNF- α . Thus, our study closes a long existing gap in avian cytokine research and in the evolutionary tree of the TNF family.

RESULTS

Identification of chTNF- α

We were able to identify chTNF- α using BLAST searches and manual assembly from Illumina sequence datasets available at the Sequence Read Archive (SRA) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (see Materials and Methods). According to our previous experience with the discovery of novel chicken GC-rich genes, the key requirement for successful assembly is the use of very large Illumina sequence datasets. This compensates for the extreme underrepresentation bias of these GC-rich regions in the data. The entire coding sequence obtained *in silico* was verified by RT-PCR amplification from chicken RNA. Since GC-rich sequences are hard to amplify, the PCR was carried out in five overlapping shorter fragments that cover the entire chTNF- α coding sequence. The resulting chTNF- α sequence was submitted to GenBank under accession number MF000729. It is predicted to encode a protein of 285 amino acids (Figure 1). Comparison with available sequences from different reptiles and amphibian reveals an extended intracellular domain and a relatively well-conserved extracellular domain. The extracellular domain is well alignable with human (45% similarity) and other vertebrate domains and contains the TNF superfamily motif.

Phylogenetic Analysis of TNF- α From Chicken and Other Birds

We next used the chTNF- α sequence as a probe in BLAST searches of NCBI SRA datasets from additional avian species. We were able to assemble full or partial TNF- α sequences from a wide variety of avian species (Figure S1 in Supplementary Material) including members of the suborders of *Palaeognathae* and *Neognathae* (with several *Galloanserae* and *Neoaves*).

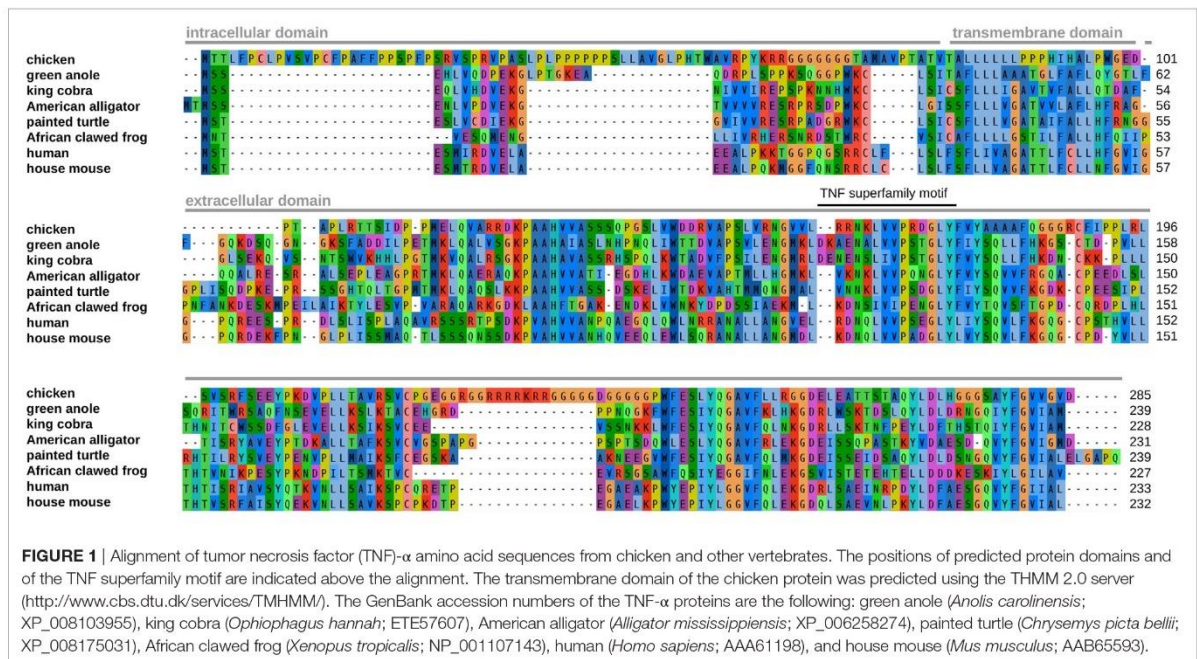


FIGURE 1 | Alignment of tumor necrosis factor (TNF)- α amino acid sequences from chicken and other vertebrates. The positions of predicted protein domains and of the TNF superfamily motif are indicated above the alignment. The transmembrane domain of the chicken protein was predicted using the THMM 2.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). The GenBank accession numbers of the TNF- α proteins are the following: green anole (*Anolis carolinensis*; XP_008103955), king cobra (*Ophiophagus hannah*; ETE57607), American alligator (*Alligator mississippiensis*; XP_006258274), painted turtle (*Chrysemys picta bellii*; XP_008175031), African clawed frog (*Xenopus tropicalis*; NP_0011107143), human (*Homo sapiens*; AAA61198), and house mouse (*Mus musculus*; AAB65593).

As in the previous examples of GC-rich avian “missing” genes, all avian TNF- α sequences have a high GC content, in contrast to their various non-avian vertebrate orthologs (Figure S2 in Supplementary Material).

Phylogenetic analysis clearly shows the expected relationship of all newly identified avian TNF- α sequences, reflecting the evolutionary relationship of the species (Figure 2). The avian sequences form a distinct cluster away from fish, reptile, mammalian TNF- α , and the mammalian LT- α and LT- β . We were not able to identify orthologs of LIs in the available avian genomes and other sequence data.

To confirm the identity of both chicken TNF receptors, we performed phylogenetic analysis of these two genes with the receptors from other vertebrates. Both chicken candidate TNFR1 and TNFR2 (Figure 3) receptors cluster with high bootstrap support with the corresponding TNF receptors from reptiles and mammals (29, 34).

TNF- α Has Been Translocated in the Avian Genome With Large Genomic Region From the MHC Locus

We attempted to analyze the location of avian TNF- α in broader genomic context. We were not able to assemble the genomic region surrounding the chicken gene. However, in another avian genome, a newly released assembly of the crow (35), we succeeded in the identification of an 80-kb contig (accession number MVNZ01000346) that contained a clear match to our identified avian TNF- α sequence. Importantly, this contig also contained nine additional genes, the orthologs of which lie close to human TNF- α in the MHC locus (Figure 4). Most of the nine genes do

not have annotations in any avian genome, to date. This conserved synteny suggests that possibly a chromosomal fragment containing several genes of the MHC complex, including TNF- α , was displaced to a new location in the avian ancestor. The verification of this hypothesis and determination of the chromosomal position would require much more complete genomic assemblies from multiple avian species. The crow genomic sequence also allowed us to determine that the TNF- α gene of this species has the same four-exon structure as in other vertebrates (data not shown).

chTNF- α Is Induced in Cultured Macrophages, CD4⁺ T-Lymphocytes, and Spleen Tissue

To gain insight into the expression of chTNF- α , we first performed *in vitro* experiments with LPS activated monocyte-derived macrophages. Macrophages are well known from the mammalian system as primary producers of TNF- α . Chicken monocyte-derived macrophages were cultured in the presence of 10 μ g/ml or 100 ng/ml of LPS for up to 24 h, lysed and tested for cytokine expression by quantitative RT-PCR. A strong induction of chTNF- α message was observed within 4 h after LPS stimulation with 100 ng/ml being more potent than 10 μ g/ml (data not shown). Therefore, subsequent experiments were performed with a final concentration of 100 ng/ml LPS. Monocyte-derived macrophages (>92% KUL01⁺) (Figure 5A) showed significant transcription of chTNF- α (three independent experiments) within 1 h of stimulation and maximal response after 2 h. mRNA levels rapidly declined after 8 h and were at background levels at 24 h. Splenic macrophages (containing > 90% KUL01 positive

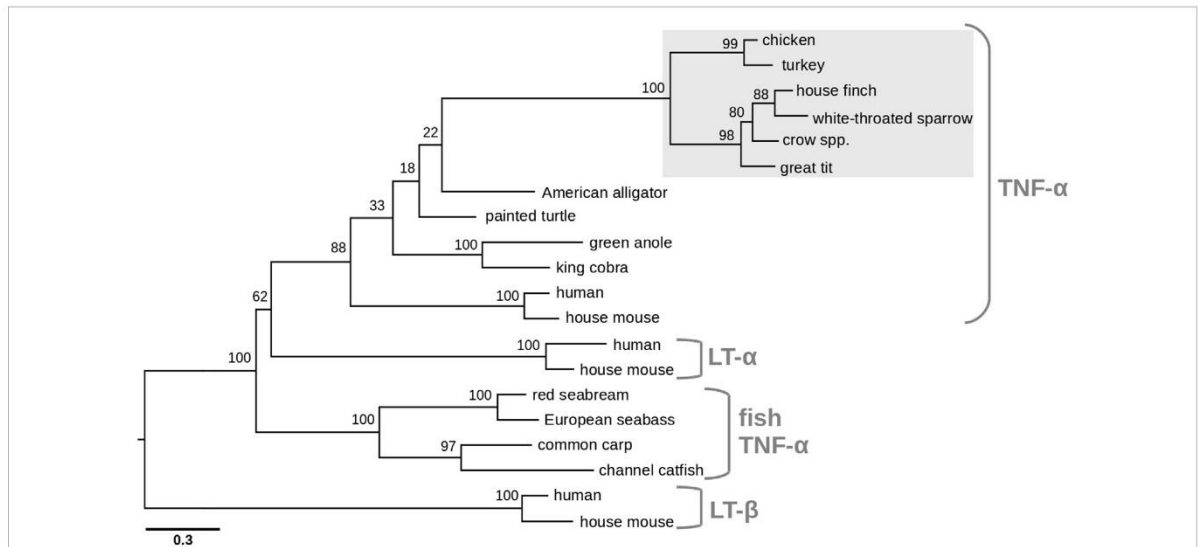


FIGURE 2 | Phylogenetic relationship of avian tumor necrosis factor (TNF- α) proteins with other members of the TNF superfamily. The maximum likelihood tree was generated from avian TNF- α proteins for which full-length sequences were obtained in this study, together with selected vertebrate TNF- α proteins and representatives of lymphotoxin- α (LT- α) and lymphotoxin- β (LT- β) families. TNF- α proteins include the representatives presented in **Figure 1**, along with avian sequences from this study (turkey, *Meleagris gallopavo*; house finch, *Haemorrhous mexicanus*; white-throated sparrow, *Zonotrichia albicollis*; crow spp., *Corvus* spp.; great tit, *Parus major*) and fish sequences: red seabream (*Pagrus major*; AAP76392), European seabass (*Dicentrarchus labrax*; AAZ20770), common carp (*Cyprinus carpio*; CAC84641), and channel catfish (*Ictalurus punctatus*; NP_001187101). LT- α sequences include human (NP_000586) and house mouse (NP_034865), LT- β include human (NP_002332) and house mouse (NP_032544). Bootstrap support values are shown for each node. The scale bar indicates the number of amino acid substitutions per site.

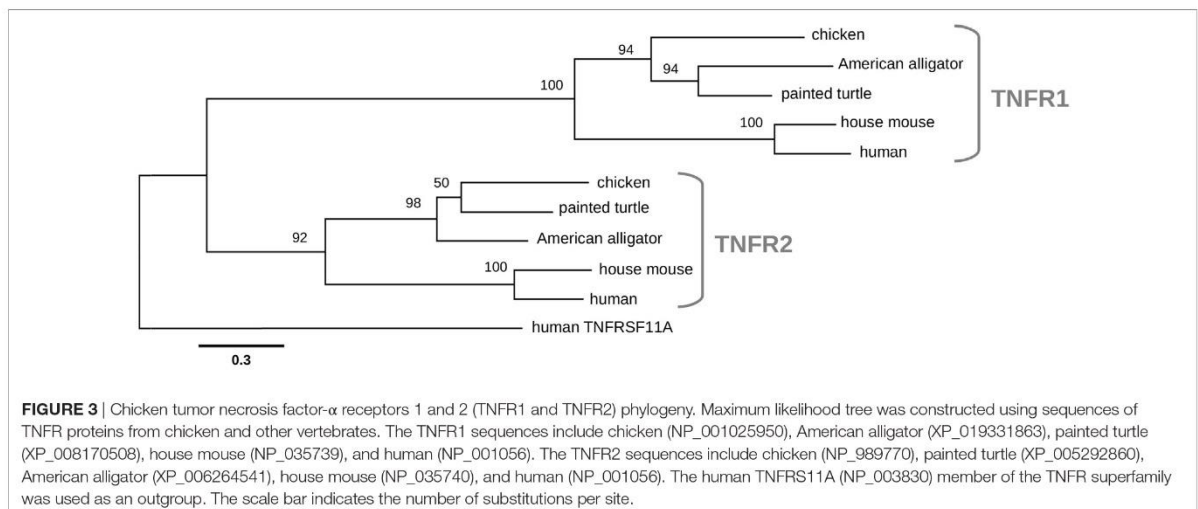
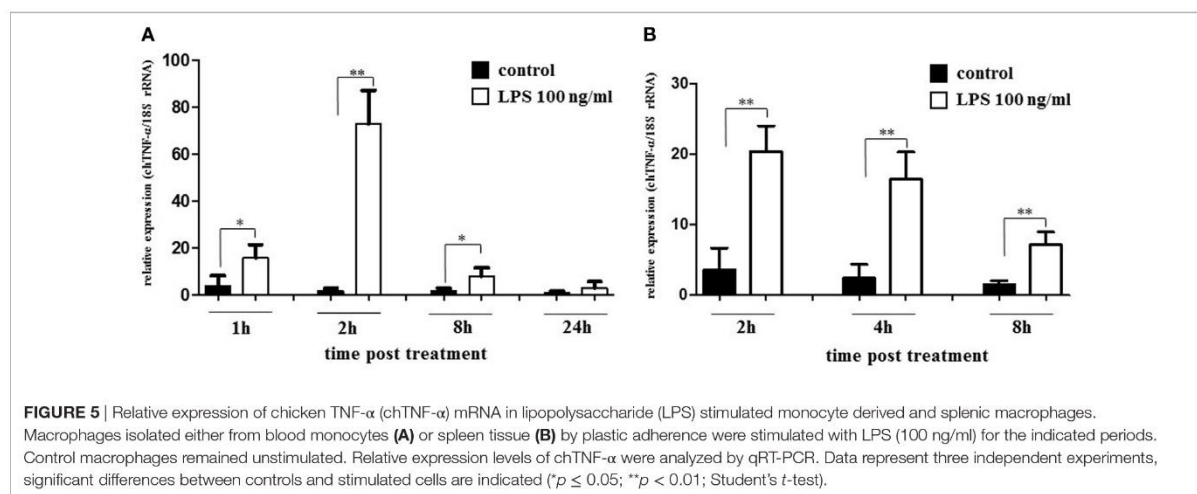
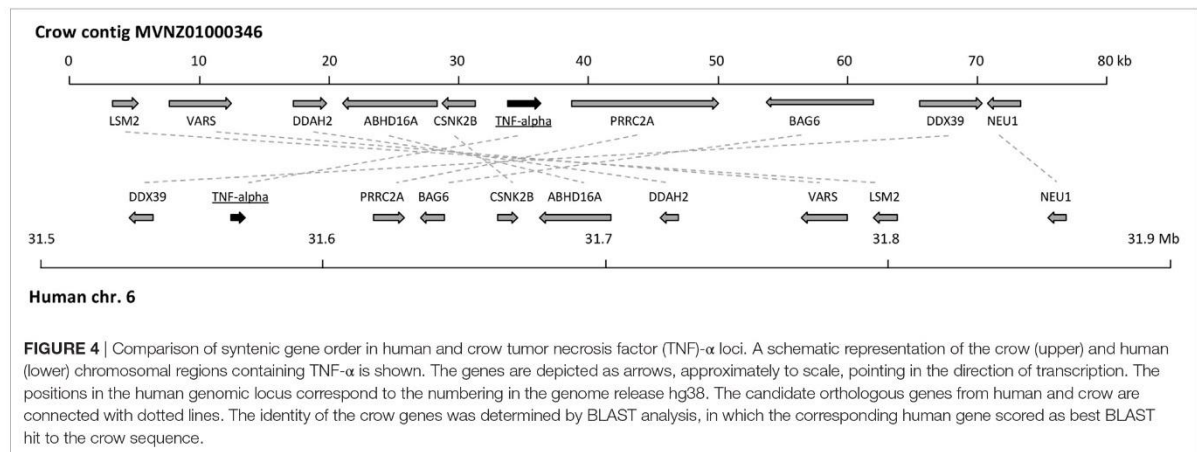


FIGURE 3 | Chicken tumor necrosis factor- α receptors 1 and 2 (TNFR1 and TNFR2) phylogeny. Maximum likelihood tree was constructed using sequences of TNFR proteins from chicken and other vertebrates. The TNFR1 sequences include chicken (NP_001025950), American alligator (XP_019331863), painted turtle (XP_008170508), house mouse (NP_035739), and human (NP_001056). The TNFR2 sequences include chicken (NP_989770), painted turtle (XP_005292860), American alligator (XP_006264541), house mouse (NP_035740), and human (NP_001056). The human TNFRSF11A (NP_003830) member of the TNFR superfamily was used as an outgroup. The scale bar indicates the number of substitutions per site.

cells) (**Figure 5B**) showed similar kinetics with strong induction of chTNF- α message 2, and 4 h after LPS treatment and a reduction at 8 h (three independent experiments). Finally, macrophages differentiated from bone marrow (BM) precursors by colony-stimulating factor 1 (CSF-1) treatment (36) responded equally to LPS but with a slightly delayed onset (**Table 1**).

In addition to macrophages, we tested lymphocytes for their capability to produce chTNF- α . Lymphocytes isolated from spleen tissue were subjected to crosslinking of the α/β T-cell receptor (TCR α/β) for 14 h which proved to induce high levels of chIFN- γ mRNA in previous experiments (37) and let to strong induction of chTNF- α message as shown here (**Table 1**). To identify the chTNF- α producing T-cell subpopulation we sorted in



an independent experiment CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes from spleen by FACS sorting to >99% purity and subjected these cells to TCR α/β crosslinking. Strikingly, no response was observed in the CD8⁺ population while T-helper cells transcribed both chTNF- α and chIFN- γ mRNA.

We next injected LPS i.v. into white leghorn hens at a dose of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW and collected liver and spleen tissues 3 h after treatment. To compare the chTNF- α response with that of other inflammatory cytokines described in chickens, we quantified chicken interleukin-6 (chIL-6) mRNA in parallel (Figure 6). In liver samples, IL-6 was upregulated 30-fold within 3 h confirming the induction of an acute-phase response in the birds. By contrast, no significant difference was observed for chTNF- α message in liver tissue between non-stimulated control birds and birds treated with LPS. Spleen tissue showed an even stronger induction of chIL-6 mRNA with a 350-fold increase at the same time point. We observed chTNF- α induction in the same samples but to a much lower level with only fourfold upregulation relative to the controls.

Collectively the expression data confirm a rapid induction of chTNF- α in response to toll-like receptor (TLR)-4 ligation both *in vitro* and *in vivo* identifying this cytokine as a typical acute-phase protein.

Recombinant chTNF- α Is Biologically Active

Finally, we intended to investigate if the newly identified cytokine is biologically active. Therefore, chTNF- α was synthesized after codon optimization to avoid GC-rich regions for expression in HEK 293 cells and cloned into the expression vector pcDNA3.1 for transient expression. Cell culture supernatants from chTNF- α transfected cells and non-transfected cells were harvested after 12–16 h and added to the quail CEC-NF κ B-luciferase reporter cells at a 1:25 dilution. These cells were initially established as reporters for chIL-1 bioactivity. Therefore, supernatants from HEK293 cells transfected with a chIL-1 expression construct served as positive controls. As shown in Figure 7A, rec. chTNF- α

TABLE 1 | Relative expression of chTNF- α and chIFN- γ mRNA.

Cell type	Stimulated with	rel. Expression chTNF- α	rel. Expression IFN- γ
Lymphocytes	Control	2.4	0.5
	TCR-2	37.5	179.8
CD4 ⁺ cells	Control	1.1	1.1
	TCR-2	45.7	176.7
CD8 ⁺ cells	Control	0.6	1.0
	TCR-2	1.1	0.1
Macrophages (BM)	2 h control	2.4	
	2 h LPS	3.0	
	4 h control	0.8	
	4 h LPS	44.4	
	8 h control	1.0	
	8 h LPS	38.2	

Lymphocytes were obtained from chicken spleen and either stimulated as a mixed population or after FACS sorting to obtain >99% pure CD4⁺ or CD8⁺ T-cells preparations. Cells were stimulated by crosslinking of the $\alpha\beta$ -TCR with the monoclonal antibody TCR-2 for 14 h. chIFN- γ mRNA expression was used as a positive control. CSF-1 expanded BM-derived macrophages were stimulated with 100 ng/ml LPS for 2, 4, and 8 h. Relative expression was calculated using 18S rRNA as reference. chTNF- α , chicken TNF- α ; LPS, lipopolysaccharide; CSF-1, colony-stimulating factor 1; BM, bone marrow.

activated the reporter with a similar potency as rec. chIL-1. This activity was largely eliminated when samples were heated to 80°C for 5 min thus excluding the possibility that the observed activity is due to contaminating LPS. The presence of recombinant chTNF- α in the culture supernatant was determined by mass spectrometry measurements (see Materials and Methods). Three unique peptides from the chTNF- α protein were detected, with sequence coverage 10.2, MaxQuant Score 83.5 and Q-value (false-positive probability) equal to zero (Figure S3A in Supplementary Material).

In addition, we expressed chTNF- α in *E. coli* as a full-length version and as a version encompassing only the extracellular domain and purified them by Ni-chelate chromatography. Proper expression of the extracellular portion was confirmed by Western blotting identifying a His-tagged protein band at the correct molecular size (Figure S3B in Supplementary Material). As shown in Figure 7B, the full-length chTNF- α strongly induced the luciferase reporter. This effect was not due to LPS contamination since LPS added at high (10 μ g/ml) and low (10 ng/ml) concentrations to the cells did not lead to reporter induction (Figure 7B). In addition, LPS concentrations in our cytokine preparations were found to be 0.7 ng/ml at maximum as quantified by Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay and thus well below those concentrations tested on the reporter cells. Finally, the activity was completely abrogated by heating to 80°C for 5 min (Figure 7C). Likewise, the extracellular version of chTNF- α highly significantly activated the reporter cells. This biological activity was completely abrogated if chTNF- α was heat treated prior to addition to the cell culture (Figure 7D).

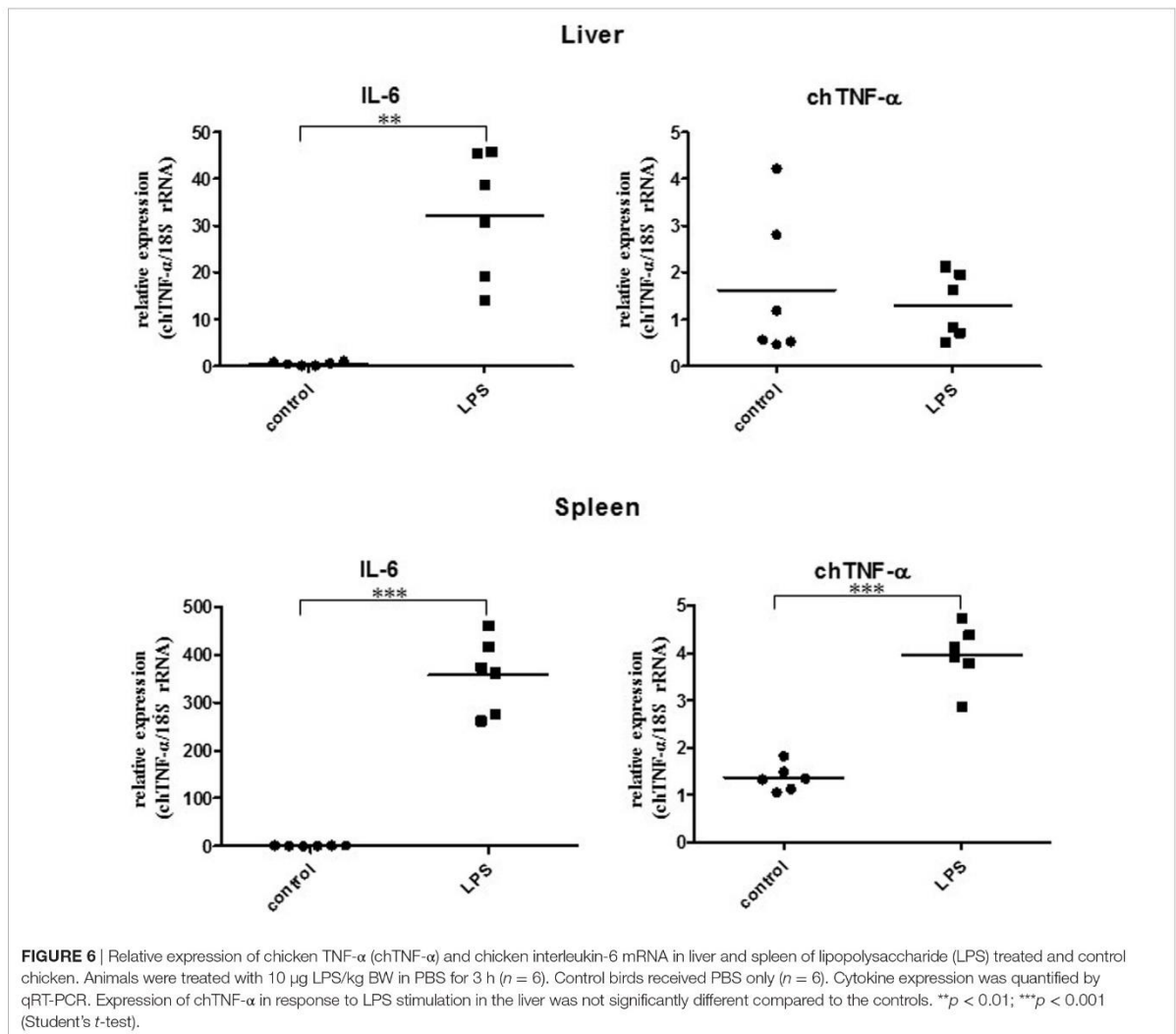
DISCUSSION

TNF- α is a pleiotropic cytokine essential to control intracellular bacteria, such as *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium*

tuberculosis, and *Salmonella typhimurium* as shown in TNF receptor 1 deficient mice (2). It is also known to be an important endogenous mediator of acute (39) and chronic inflammatory (40) responses and is successfully targeted to treat rheumatoid arthritis in humans (41, 42). While orthologs of TNF- α were identified in many mammalian species, amphibian, and teleost fish (25, 43, 44), it seemed to be absent in avian species. Using very large Illumina sequence datasets, we were able to assemble a gene which showed significant homology to TNF- α and to further characterize it as a true ortholog by its genomic structure and its biological properties.

Chicken TNF- α , like other “missing genes” in avian species, escaped from earlier identification due to its GC richness and the absence of readily identifiable syntenic regions. A most recently published study newly described 137 genes classified as “missing” including a sequence with homology to TNF- α . The published chTNF- α sequence (33) shows almost complete identity across most of the length with the sequence obtained in this study. However, the Bornelov et al. sequence is missing 216 nucleotides at the 5' end and contains an insertion of 55 consecutive G nucleotides near the 3' end (Figure S4 in Supplementary Material). These are, in our opinion, sequence assembly artifacts caused by the extremely high GC content. While only a small part of the sequence from the Bornelov et al. study was experimentally verified, we have confirmed the complete chTNF- α sequence by RT-PCR and sequencing. The chicken cytokine has an extended intracellular domain with unknown function at this point, as well as a conserved transmembrane sequence and displays the characteristic TNF superfamily motif in its extracellular part. The extracellular portion is 45% similar at the amino acid level to human TNF- α which is much higher than observed with other chicken cytokines, e.g., the interferons with only 20–25% similarity (12). The sequence of the intracellular domain is very distant to corresponding sequences of non-avian vertebrates and is quite variable even among avian species. We identified full or partial sequences with high homology to chTNF- α in 12 avian species including *Palaeognathae* and *Neognathae* supporting the concept that this cytokine is phylogenetically conserved across avian species. In mammals, the extracellular portion of TNF- α is cleaved by metalloproteinases such as TNF- α converting enzyme between the alanine⁷⁶ and valine⁷⁷ residues to release the soluble and biologically active form (45). This precise cleavage site is not present in the chicken sequence, while the relatively high overall sequence similarity points at an identical biology. To address this assumption, we cloned and expressed the extracellular part of chTNF- α and confirmed its biological activity using the NF κ B-reporter assay (46) indicating that an alternative cleavage site should be present in the avian protein.

Phylogenetic analysis clustered the newly identified protein within the TNF- α family next to amphibian TNF- α and close to the human gene but more distant to the mammalian lymphotoxin genes and the fish TNF- α homologs. Earlier studies reported that TNF- α is missing in the chicken MHC locus (14) pointing at a translocation event of either the TNF- α gene or the entire syntenic locus. Screening of avian genome databases identified a contig in the recently published crow genome harboring the avian

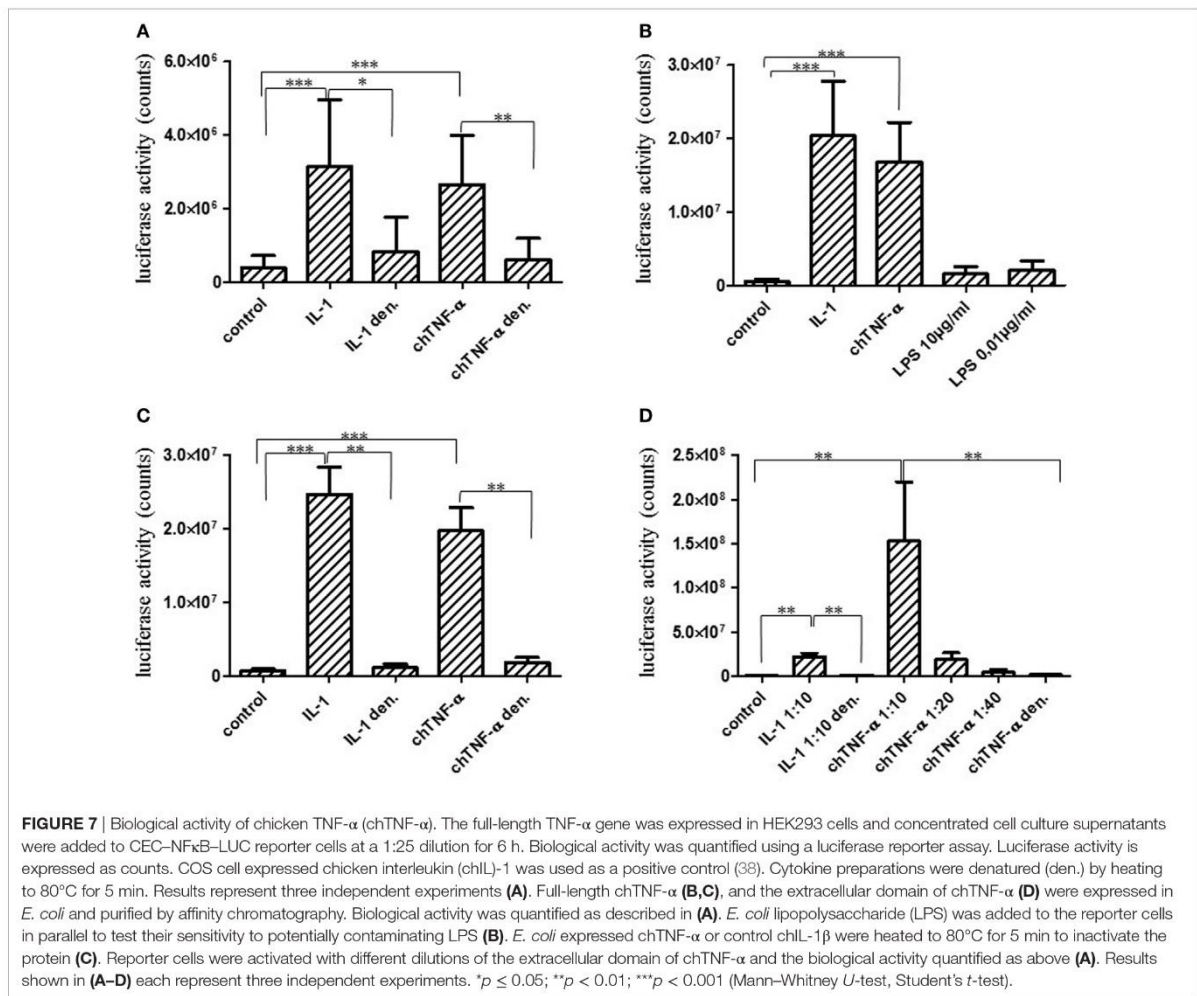


TNF- α sequence next to nine thus far mostly unknown genes, whose orthologs are ascribed to the mammalian MHC locus. Importantly, this contig did not contain LT α and LT β orthologs as it would be expected based on synteny with mammalian genomes (47). This observation confirms the translocation of the TNF- α locus from the MHC region to a thus far unknown genomic location in birds and provides further evidence to the hypothesis that critical immune genes may be present in birds but have not been identified as a consequence of translocation events and the high GC contents. In this context, it should be noted that the lymphotoxins might be an exception and may indeed be absent in species without lymph nodes as suggested by others (12).

Previous work indicated the presence of orthologs of both receptors of chTNF- α (29, 34). We followed up on this work and obtained full sequences for both genes. Both receptors very closely cluster with their reptile orthologs and show close relation

to the human and mouse receptors. Collectively, these studies show that the TNF- α /TNF- α receptor genes are encoded in the chicken and many avian genomes and might thus display similar biological functions.

In mammals, macrophages stimulated by TLR ligands are known to be the primary source for TNF- α (4). Likewise, chicken monocyte derived macrophages rapidly respond to LPS treatment with the induction of the TNF- α gene. Transcripts reached peak abundance within 2 h after stimulation and were at background levels at 24 h after treatment. This kinetic feature is similar to that reported in mice (48). The observed response pattern was independent of the macrophage source since splenic and BM-derived macrophages showed nearly identical kinetics. In mammals, T-lymphocytes are known as an additional source of TNF- α (49). Therefore, we isolated splenic lymphocytes, activated the cells through TCR α/β crosslinking and observed



strong chTNF- α expression. This response was restricted to the CD4⁺ T-helper cell population which is in full agreement with results obtained in mouse and man (50). Next, we treated birds with LPS to confirm our *in vitro* observations. TNF- α mRNA was significantly induced in spleen but not in liver 3 h after treatment, while IL-6 was induced in both tissues and too much higher levels at this single time point. The lack of chTNF- α expression in the liver may be explained by its state of active tolerance to LPS which is constantly delivered from the gut *via* the portal vein as reviewed in Ref. (51). However, the comparatively weak induction of chTNF- α in splenic tissue was surprising taken into account that the murine spleen responds to LPS within 2–6 h with strong TNF- α induction (48). However, these observations are in line with earlier work by several groups who unsuccessfully attempted to induce high levels of chTNF- α like activity in chicken macrophages sufficient for purification to homogeneity and further molecular characterization (17, 52). Likewise, oral treatment of chickens with the TLR-7 ligand S-28463 induced a

strong cytokine response in spleens with interferon, chemokine, and IL-6 mRNA expression, while expression of a TNF- α like message was not observed (53). The failure to identify a TNF- α ortholog in chickens prior to the availability of large genomic sequence databases may partially be due to comparatively low expression levels or inadequate stimuli used in earlier studies. Using the information provided here, more detailed analysis of the chTNF- α biology will now be possible including extended *in vitro* and *in vivo* induction studies and more detailed analysis of the induction kinetics.

Finally, we generated recombinant chTNF- α in eukaryotic and prokaryotic expression systems to demonstrate its biological activity. Upon binding to TNFR1, the cytokine induces a complex signaling cascade which ultimately leads to activation of the classical NF κ B pathway (26) and NF κ B induction (54). In a previous study, we established a reporter assay based on the quail fibroblast cell line CEC-32 by stably transfecting the cells with an NF κ B-luciferase reporter. This cell line rapidly responds

to rec. chIL-1 (46) which led us to assume that it may also be responsive to chTNF- α . As expected, full-length chTNF- α expressed in HEK 293 cells induced the reporter to the same level as rec. chIL-1. This effect was cytokine specific since (1) cell culture supernatants from mock transfected cells did not induce the reporter, (2) heat treatment abrogated the activity, and (3) LPS, as a potential contaminant to the culture supernatant, did not lead to a response over a concentration range from 0.1 ng/ml to 10 μ g/ml. The reporter cell line used in this study is a quail cell line (55) which may not express TLR-4 in contrast to chicken primary macrophages, macrophage cell lines, and heterophils and may therefore be unresponsive to LPS (56). An identical response pattern was observed with *E. coli* expressed full-length chTNF- α and the extracellular domain of the cytokine in a series of independent experiments.

Based on the genomic and functional data presented in this study, we provide strong evidence for the existence of a true ortholog of TNF- α in birds. This work lays the foundation to gain new insights into the response of avian hosts to infection and inflammatory stimuli. Thus far, research on the inflammatory response in birds has mainly focused on the analysis of IL-1 and IL-6 (38, 53, 57, 58). Both cytokines are known to be induced by TNF- α (59, 60) in myeloid cells and, on the other hand, are capable of inducing this cytokine (61). The regulation of this intricate network could not be investigated in avian species to date but may help to understand unique responses of birds to pathogens. The availability of biologically active rec. chTNF- α provides a basis for functional studies *in vitro* and *in vivo*. Technologies such as *in vivo* overexpression or functional inhibition by retroviral vector-mediated gene transfer have been used successfully in previous research into the avian TNF family (62) and the type I IFN system (63, 64) and can be explored to further understand the chTNF- α /TNFR system. In addition, this work opens new avenues to investigate immunomodulatory properties of avian pathogens targeting the TNF family as shown in particular for herpes and pox viruses in mammals (65) and as previously studied for IFN modulatory factors in the chicken system (66, 67).

MATERIALS AND METHODS

Animals

All chickens were hatched and housed at the Institute of Animal Physiology (University of Munich, Germany). Commercial diet and water were provided *ad libitum*. For LPS treatment, Lohmann Selected Leghorn (LSL) chickens obtained from LSL Rhein-Main (Berglern, Germany) were used at an age of 6 weeks. Six birds were *i.v.* treated with 10 μ g LPS in PBS/kg BW. Control animals received PBS only. Three hours after injection animals were euthanized, liver and spleen tissues were obtained and stored in RNAlater (Sigma Aldrich, USA). Animal experiments were approved by the Government of Upper Bavaria, License number 55.2-1-54-2531-121-09.

Blood was collected from the jugular vein of 3–4 months old white leghorn chickens (line M11) obtained from the Institute of Farm Animal Genetics (Federal Research Institute for Animal Health, Neustadt, Germany), and experiments were

approved by the Government of Upper Bavaria, License number 55.2-1-542532.0-60-2015.

Cell Culture

HEK293T and HEK293 cells were cultured in RPMI 1640 (Biochrom, Germany) supplemented with 10% FBS (Biochrom, Germany) (standard medium) at 37°C and 5% CO₂. Cells were transfected using ViaFect transfection reagent (Promega, Germany) according to the manufacture protocol. Supernatant was collected 48 h post-transfection and concentrated using an Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units according to the manufacturer (Merck, UK).

CEC-NF κ B-LUC cells (46) were cultured in Iscove's basal Medium (Biochrom, Germany) supplemented with 8% FBS (Biochrom, Germany), 2% chicken serum (Thermo Scientific, Germany), 1% penicillin/streptomycin at 40°C, and 5% CO₂.

Isolation and Cultivation of Primary Chicken Macrophages

60 ml blood was collected into syringes containing 200 μ l Li-Heparin (500 IU/ml in RPMI 1640, Biochrom, Germany). Peripheral blood mononuclear cells were separated by density gradient centrifugation over Biocoll (1,077, Biochrom, Germany) at 200 \times g for 20 min. Cells were washed twice with PBS and 1 \times 10⁸ cells in 10 ml standard medium were plated in cell culture treated Petri dishes (ϕ 9 cm) and incubated at 40°C and 5% CO₂. After 72 h, plates were washed three times with PBS to remove non-adherent cells. Spleen macrophages were isolated according to the procedure described (68). BM macrophages were generated as described by Garceau et al. (36) using rec. chicken CSF-1 to differentiate BM precursors into macrophages. Macrophages adherent to cell culture Petri dishes were stimulated with LPS as indicated for the indicated periods. Purity of macrophage preparations was assessed by staining with monoclonal antibody KUL01-PE (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) at a 1:100 dilution and live-dead cell discrimination was obtained with fixable viability dye eFluor[®] 780 (Thermo Fisher Scientific) followed by analysis using a BD FACSCanto II (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and FACS Diva software.

Isolation of Lymphocytes and Cell Sorting

Leukocytes were isolated from spleen tissue as described (37) and either activated without further separation or as purified CD4⁺ or CD8⁺ cell preparations. Purification was achieved by cell sorting with a BD FACSAriaIIIu (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Monoclonal antibodies reacting with chicken CD8 α (clone 3-298) (69) or chicken CD4 (CT4, SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) were used as FITC or RPE conjugates, respectively, to directly label T-cell subpopulations. Lymphocyte activation was achieved by TCR cross-linking as described (37).

mRNA Isolation, cDNA Synthesis, and PCR Amplification

Total RNA was isolated using TRI reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) from lung tissue of Brown Leghorn chicken. Reverse

transcription was performed using the SMART RACE (Clontech, Palo Alto, CA, USA) procedure, 1 μ g RNA, and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (NEB, Ipswich, MA, USA). To amplify the highly GC-rich TNF- α gene, previously reported conditions were used (31): a 1:200 mixture of Deep Vent and Taq polymerases (both from NEB) and long (5–10 min) extension times. The TNF- α cDNA was divided into five overlapping short amplicons, which cover the entire coding sequence. The primer pairs used were 5'-CCATATGACCACGCTCTTCCGGT and 5'-AGCAGCAGCAGCAGCAGAGC, 5'-GTGGGCGGTGCGGCCATA and 5'-ACGTCGTTCTGAGCGGAGCTGT, 5'-GGGGAGAGGACCCACAGCTC and 5'-CCTTCTCAGCACCA CGCCGTTA, 5'-GTCCTCTCAGCCCGCTCGTT and 5'-GGT CAGGAGGGGGACGCTCTTTG, 5'-CCGGGACGGCCTTTACT TCGTA and 5'-CTAATTTAATCCACTCCCACCACCC. The PCR products were directly sequenced following isolation from agarose gel electrophoresis.

For gene expression studies, total RNA was isolated from LPS treated and non-treated macrophages using Trifast (peq-GOLD TriFast, Peqlab, Germany) according to the manufacturer's protocol. Tissues were homogenized using a Precellys[®] tissue homogenizer (Peqlab, Germany) prior to RNA isolation. 1 μ g total RNA was treated with DNase I, RNase-free-kit (Thermo Scientific, Germany) to remove genomic DNA. cDNA was synthesized from 400 ng digested RNA using GoScript[™] Reverse Transcription System kit as recommended by the manufacturer (Promega, Germany).

Cloning chTNF- α Expression Construct

The chTNF- α nucleotide sequence was codon optimized for expression in human cell lines to avoid GC-rich regions using the online tool provided by GeneArt (Thermo Scientific, Germany). The codon-optimized sequence was used to synthesize chTNF- α and to clone it into the expression vector pcDNA3.1. Gene synthesis and cloning were done using GeneArt. The plasmid sequence was confirmed by sequencing.

The chTNF- α sequence from the expression vector pcDNA3.1 was cloned into pET-45b(+) (Novagen[®], Merck, UK) using Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Germany) and the following overhang primers: full length forward (5'-CACCAC CACCATCACGTGGGTACCGGTACCACCCCTGTTCCCT TGC), full length reverse (5'-AGCGGTTTCTTTACCAGACT CGAGTCAATCCACTCCCACGAC), extracellular domain forward (5'-TCACCACCACCATCACGTGGGTACCGGTCTCT TGGGCGAGGATCCT), and extracellular domain reverse (5'-CAGCGGTTTCTTTACCAGACTCGAGTCAATCCACT CCCACGACTC).

The DNA was purified using the Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Germany) according to the manufacturer instructions.

Purified DNA fragments and pet45b vector cut with AgeI and XhoI (Thermo Scientific, Germany) and assembled using NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB) according to the manufacturer's protocol. The final constructs were then transformed into *E. coli* NEB5 α cells using a 42°C heat-shock for 30 s. Properly transformed cells were selected over ampicillin resistance. The plasmids were isolated using the PureYield[™]

Plasmid Miniprep System Technical Bulletin (Promega, Germany) and were verified by sequencing.

Expression of Recombinant chTNF- α

To express recombinant chTNF- α , we transformed the pet45b vector including either the full length or the extracellular chTNF- α into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells using the manufacturer's protocol (Biolabs, USA). Shortly, BL21 cells were thawed on ice, the plasmid DNA was added and transformed by heat-shock for 10 s at 42°C. After successful selection, the protein was produced from 2 l bacteria suspension after induction of chTNF- α expression with 50 μ M IPTG. Cells were centrifuged and the resulting cell pellet was suspended in ultrasonic buffer (300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, 1 mM DTT, pH 7.8). Cells were lysed by ultrasound seven times for 30 s while kept on ice. Cells were again centrifuged and the pellet was suspended in lysis buffer (6 M guanidine-HCl, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, pH 8.0), centrifuged and the supernatant collected. Ni-NTA Agarose (Qiagen, Germany) was washed once with water and once with the lysis buffer and mixed with the supernatant for overnight rotation at 4°C. The mixture was added to a column and washed with lysis buffer and subsequently with washing buffer 1 (8 M urea, 100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, pH 8.0) and washing buffer 2 (2 M urea, 1 M NaCl, 100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, pH 8.0). To eluate the protein, two elution buffers with different pH were used. First buffer contained 50 mM Na-acetate, 1 M NaCl, 2 M urea, 10 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, pH 6.5, added to the column and let flow through until 3 ml were left. Then the second elution buffer (50 mM Na-acetate, 1 M NaCl, 2 M urea, 1 mM DTT, pH 3.6) was added and the protein was eluted with pressure and collected in several fractions. All fractions were then tested for the specific biological activity using the luciferase bioassay.

Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR was performed using either SYBRGreen (GoTaq[®] qPCR Master Mix Promega, Germany) or TaqMan (Biolabs, USA) chemistry. Target gene expression was normalized to the expression of 18S rRNA as previously described (70). For qPCR analysis, the following primers were used: 18S rRNA: 5'-CATGTCTAAGTACACACGGGCGGTA and 5'-GGCGCTG CTGGCATGTATTA; chTNF α : 5'-CGCTCAGAACGACGTC AA and 5'-GTCGTCCACACCAACGAG; chIL-6: 5'-GCTTCGAC GAGGAGAAATGC and 5'-GCCAGGTGCTTTGTGCTGTA; chIFN- γ : 5'-TGGCGTGAAGAAGGTGAAAGA and 5'-TCCG CAGCTGGAAAAAGTG. ChTNF- α primers were designed using Primer 3 Software (71) and all primers were purchased from Eurofins (Germany). The reactions were performed using a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Scientific).

Bioassay for chTNF- α and LPS Quantification

CEC-NF κ B-LUC cells were seeded into 96-well plates at a density of 1×10^5 cells per well and incubated for 12–16 h. After washing the cells with PBS, concentrated cell culture supernatant

containing chTNF- α or Ni-Agarose purified TNF- α was added to each well and cultures were incubated for another 6 h. The following steps including cell lysis and analysis were performed according to the manufacturer's protocol (Luciferase Assay system, Promega, Germany). Samples were measured on a Glomax 96 microplate luminometer (Promega, Germany).

Lipopolysaccharide concentrations in chTNF- α preparations were quantified by LAL assay as described by the manufacturer (Thermo Scientific, Germany).

Mass Spectrometry Analysis

Stably transfected HEK293T cells, cultivated as mentioned above, were washed six times with serum-free RPMI medium. B&S serum-free medium (Bio&Sell, Germany) was applied for 6 h and supernatant was collected and concentrated using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units. Protein aliquots (1 mg) were solubilized using sodium deoxycholate [1% (w/v) final conc.], reduced with TCEP [tris(2-carboxyethyl)phosphine], alkylated with MMTS (S-methyl methanethiosulfonate), digested sequentially with trypsin and extracted with ethylacetate saturated with water as described (72). Samples were desalted on OPTI-TRAP Macro (Optimize Technologies, Oregon City, OR, USA), dried in Speedvac and dissolved in 20 mM ammonium formate + 2% acetonitrile. About 1 mg of peptide digests were separated on C18 column (Kinetex 1.7 μ m, EVO C18), with linear gradient from 0% A (of 20 mM ammonium formate, 2% acetonitrile pH = 10) to 50% B (of 20 mM ammonium formate, 80% acetonitrile pH = 10) in 32 min, flow 300 μ l/min. 32 fractions were collected and pooled into 8 fractions (73); the resulting fractions were dried and resuspended in 20 μ l of 1% trifluoroacetic acid. About 2 μ g of peptide from each fraction were separated on 50-cm C18 column using 2.5 h elution gradient and analyzed in a DDA mode on Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Scientific) mass spectrometer. Resulting raw files were processed in MaxQuant (v. 1.5.8.3) (74). Searches were performed against latest version of human Uniprot reference database, sequence of protein of interest, and common contaminant database. Downstream analysis and visualization was performed in Perseus (v. 1.5.5.3) (75).

Western Blot Analysis

Purified chTNF- α , diluted 1:6 into Lämmli buffer containing additional 0.5 μ l 1 M DTT (Thermo Scientific, USA), was separated on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Protran[®] 0.2 μ m, GE Healthcare Europe GmbH, Germany) using the Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad, Germany) at 100 V for 1 h. The membrane was blocked with 4% skim milk (Applichem, Germany) for 1 h, washed three times with PBS-T and incubated with an anti-His-antibody (0.2 mg/ml, Dianova, Germany) 1:1,000 diluted in PBS-T for 1 h. After three washings, Goat-Anti-Mouse IgG (H + L)-HRPO (©Jackson ImmunoResearch, USA) at a 1:10,000 dilution was added for 1 h and membranes were subsequently washed six times. Membranes were developed with Luminol reagent (Sigma Aldrich, USA) for 1 min and images were taken using the Image Quant Capture 300 device (GE Healthcare Europe GmbH, Germany). An irrelevant HIS-tagged protein was used as a control.

Computational Analysis of Avian Sequences From SRA

To assemble the chTNF- α sequence, several large datasets from the NCBI SRA were used (mainly Illumina RNA-seq studies ERP003988, SRP026393, SRP033603, and SRP014719). Sequences of non-avian vertebrate TNF- α genes were used as probes in BLAST searches of the SRA datasets. The sequences obtained were downloaded and assembled manually either with CLC genomics workbench 8.0.1 (www.clcbio.com) or with Lasergene 10.0.0 (DNASTAR, Madison, WI, USA). The resulting short contigs were used as probes in subsequent rounds of BLAST searches against SRA datasets, until the full open reading frame was completed. To obtain TNF- α from other avian species, the chicken gene was used as a probe to interrogate by BLAST the SRA RNA-seq or genomic datasets from the particular species. In some cases, the coverage of the TNF- α gene was not sufficient to assemble the complete coding sequence.

Sequence Alignment and Phylogenetic Inference

Amino acid sequences were aligned using the MAFFT software v7.271 with L-INS-i algorithm (76). Prior to the phylogenetic inference, columns with more than 80% of gaps were discarded. Maximum likelihood phylogeny was generated using MEGA 6 software (77). WAG + F model with gamma distribution (six categories) of rates among sites was used as a best-fitting substitution model (according to the Akaike Information Criterion calculated in Smart Model Selection module of PhyML software). The SPR operations in an optimized BioNJ starting tree were used for searching of the final tree. Bootstrap support for each node was evaluated with 1,000 replicates.

Statistical Analysis

Statistics were performed using SPSS 24 (IBM, USA) calculating either the Student's *t*-test or Mann-Whitney *U*-test.

ETHICS STATEMENT

Animal experiments were approved by the Government of Upper Bavaria, License number 55.2-1-54-2531-121-09. Blood sampling was approved by the Government of Upper Bavaria, License number and 55.2-1-542532.0-60-2015.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FR planned and performed experiments, analyzed data, and wrote the paper. BS planned experiments and wrote the paper. TH performed bioinformatic data analysis and phylogenetic analysis. HF performed experimental work on gene expression and sequencing. JP performed preliminary *in vivo* experimental work. SH isolated lymphocytes and performed cell sorting experiments. JH analyzed results, contributed to writing the final version of the manuscript. DE performed bioinformatic data analysis and phylogenetic analysis, evaluated the experiments, participated in drafting the manuscript. BK planned the project

and experiments, analyzed data, and wrote the paper. All authors contributed to manuscript revision, read and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Germany grant number 315-06.01 MICHI-C2814ERA01D to BK and by grant 17-23675S from the Czech Science Foundation to DE. We also acknowledge the institutional support by project RVO 68378050. We would like to thank Karel Harant from the Proteomic core facility, BIOCEV, Faculty of Science, Charles University in Prague (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) for the mass spectrometric measurements. We also would like to thank Marina Kohn for expert assistance and David Hume for generously providing chicken CSF-1.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00605/full#supplementary-material>.

FIGURE S1 | Alignment of TNF- α amino acid sequences from various avian species. In some avian species, only partial TNF- α sequence could be obtained from the available National Center for Biotechnology Information Sequence Read Archive data. In such cases, the 5' and/or 3' regions are filled with blue "X"

REFERENCES

- Ware CF. The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* (2003) 14(3–4):181–4. doi:10.1016/S1359-6101(03)00032-7
- Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* (2005) 115(1):1–20. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x
- Croft M, Benedict CA, Ware CF. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov* (2013) 12(2):147–68. doi:10.1038/nrd3930
- Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF – a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* (1989) 7:625–55. doi:10.1146/annurev.ij.07.040189.003205
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* (2001) 104(4):487–501. doi:10.1016/S0092-8674(01)00237-9
- Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* (2000) 50(3):184–95. doi:10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H
- Li J, Yin Q, Wu H. Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. *Adv Immunol* (2013) 119:135–53. doi:10.1016/B978-0-12-407707-2.00005-9
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* (1994) 76(6):959–62. doi:10.1016/0092-8674(94)90372-7
- Qu Y, Zhao G, Li H. Forward and reverse signaling mediated by transmembrane tumor necrosis factor-alpha and TNF receptor 2: potential roles in an immunosuppressive tumor microenvironment. *Front Immunol* (2017) 8:1675. doi:10.3389/fimmu.2017.01675
- International Chicken Genome SC. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* (2004) 432(7018):695–716. doi:10.1038/nature03154
- Kaiser P. The long view: a bright past, a brighter future? Forty years of chicken immunology pre- and post-genome. *Avian Pathol* (2012) 41(6):511–8. doi:10.1080/03079457.2012.735359
- Kaiser P, Poh TY, Rothwell L, Avery S, Balu S, Pathania US, et al. A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *J Interferon Cytokine Res* (2005) 25(8):467–84. doi:10.1089/jir.2005.25.467
- Schultz U, Magor K. Comparative immunology of agricultural birds. In: Schat K, Kaspers B, Kaiser P, editors. *Avian Immunology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press (2014). p. 363–89.
- Kaufman J, Milne S, Gobel TW, Walker BA, Jacob JP, Auffray C, et al. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature* (1999) 401(6756):923–5. doi:10.1038/44856
- Arnold JW, Holt PS. Cytotoxicity in chicken alimentary secretions as measured by a derivative of the tumor necrosis factor assay. *Poult Sci* (1996) 75(3):329–34. doi:10.3382/ps.0750329
- Byrnes S, Eaton R, Kogut M. In vitro interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha production by macrophages from chickens infected with either *Eimeria maxima* or *Eimeria tenella*. *Int J Parasitol* (1993) 23(5):639–45. doi:10.1016/0020-7519(93)90170-4
- Rautenschlein S, Subramanian A, Sharma JM. Bioactivities of a tumour necrosis-like factor released by chicken macrophages. *Dev Comp Immunol* (1999) 23(7–8):629–40. doi:10.1016/S0145-305X(99)00043-9
- Zhang S, Lillehoj HS, Ruff MD. In vivo role of tumor necrosis-like factor in *Eimeria tenella* infection. *Avian Dis* (1995) 39(4):859–66. doi:10.2307/1592424
- Takimoto T, Sato K, Akiba Y, Takahashi K. Role of chicken TL1A on inflammatory responses and partial characterization of its receptor. *J Immunol* (2008) 180(12):8327–32. doi:10.4049/jimmunol.180.12.8327
- Lovell PV, Wirthlin M, Wilhelm L, Minx P, Lazar NH, Carbone L, et al. Conserved syntenic clusters of protein coding genes are missing in birds. *Genome Biol* (2014) 15(12):565. doi:10.1186/s13059-014-0565-1
- Hirono I, Nam BH, Kurobe T, Aoki T. Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J Immunol* (2000) 165(8):4423–7. doi:10.4049/jimmunol.165.8.4423
- Laing KJ, Wang T, Zou J, Holland J, Hong S, Bols N, et al. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem* (2001) 268(5):1315–22. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.01996.x
- Saeij JP, Stet RJ, de Vries BJ, van Muiswinkel WB, Wiegertjes GF. Molecular and functional characterization of carp TNF: a link between TNF polymorphism

- and trypanotolerance? *Dev Comp Immunol* (2003) 27(1):29–41. doi:10.1016/S0145-305X(02)00064-2
24. Zou J, Peddie S, Scapigliati G, Zhang Y, Bols NC, Ellis AE, et al. Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol* (2003) 27(9):813–22. doi:10.1016/S0145-305X(03)00077-6
 25. Hong S, Li R, Xu Q, Seccombe CJ, Wang T. Two types of TNF- α exist in teleost fish: phylogeny, expression, and bioactivity analysis of type-II TNF- α 3 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Immunol* (2013) 191(12):5959–72. doi:10.4049/jimmunol.1301584
 26. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* (2016) 12(1):49–62. doi:10.1038/nrrheum.2015.169
 27. Bridgham JT, Johnson AL. Expression and regulation of Fas antigen and tumor necrosis factor receptor type I in hen granulosa cells. *Biol Reprod* (2001) 65(3):733–9. doi:10.1095/biolreprod65.3.733
 28. Bridgham JT, Johnson AL. Characterization of chicken TNFR superfamily decoy receptors, DcR3 and osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 307(4):956–61. doi:10.1016/S0006-291X(03)01304-4
 29. Abdalla SA, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H. Molecular study on chicken tumor necrosis factor receptor-II and tumor necrosis factor receptor-associated factor-5. *Vet Immunol Immunopathol* (2004) 98(1–2):31–41. doi:10.1016/j.vetimm.2003.10.004
 30. Hron T, Pajer P, Paces J, Bartunek P, Elleder D. Hidden genes in birds. *Genome Biol* (2015) 16:164. doi:10.1186/s13059-015-0724-z
 31. Farkasova H, Hron T, Paces J, Pajer P, Elleder D. Identification of a GC-rich leptin gene in chicken. *Agri Gene* (2016) 1:88–92. doi:10.1016/j.aggene.2016.04.001
 32. Seroussi E, Cinnamon Y, Yosefi S, Genin O, Smith JG, Rafati N, et al. Identification of the long-sought leptin in chicken and duck: expression pattern of the highly GC-rich avian leptin fits an autocrine/paracrine rather than endocrine function. *Endocrinology* (2016) 157(2):737–51. doi:10.1210/en.2015-1634
 33. Bornelov S, Seroussi E, Yosefi S, Pendavis K, Burgess SC, Grabherr M, et al. Correspondence on Lovell et al.: identification of chicken genes previously assumed to be evolutionarily lost. *Genome Biol* (2017) 18(1):112. doi:10.1186/s13059-017-1231-1
 34. Mahul-Mellier AL, Strappazon F, Petiot A, Chatellard-Causse C, Torch S, Blot B, et al. Alix and ALG-2 are involved in tumor necrosis factor receptor 1-induced cell death. *J Biol Chem* (2008) 283(50):34954–65. doi:10.1074/jbc.M803140200
 35. Weissensteiner MH, Pang AWC, Bunikis I, Hoijer I, Vinnere-Pettersson O, Suh A, et al. Combination of short-read, long-read, and optical mapping assemblies reveals large-scale tandem repeat arrays with population genetic implications. *Genome Res* (2017) 27(5):697–708. doi:10.1101/gr.215095.116
 36. Garceau V, Smith J, Paton IR, Davey M, Fares MA, Sester DP, et al. Pivotal advance: avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *J Leukoc Biol* (2010) 87(5):753–64. doi:10.1189/jlb.0909624
 37. Gobel TW, Schneider K, Schaerer B, Mejri I, Puehler F, Weigend S, et al. IL-18 stimulates the proliferation and IFN- γ release of CD4+ T cells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species. *J Immunol* (2003) 171(4):1809–15. doi:10.4049/jimmunol.171.4.1809
 38. Weining KC, Sick C, Kaspers B, Staeheli P. A chicken homolog of mammalian interleukin-1 beta: cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *Eur J Biochem* (1998) 258(3):994–1000. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2580994.x
 39. Beutler B, Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem* (1988) 57:505–18. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.002445
 40. Di Girolamo N, Visvanathan K, Lloyd A, Wakefield D. Expression of TNF- α by human plasma cells in chronic inflammation. *J Leukoc Biol* (1997) 61(6):667–78. doi:10.1002/jlb.61.6.667
 41. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* (1993) 36(12):1681–90. doi:10.1002/art.1780361206
 42. Feldmann M, Maini RN. Lasker clinical medical research award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med* (2003) 9(10):1245–50. doi:10.1038/nm939
 43. Savan R, Kono T, Igawa D, Sakai M. A novel tumor necrosis factor (TNF) gene present in tandem with the TNF- α gene on the same chromosome in teleosts. *Immunogenetics* (2005) 57(1–2):140–50. doi:10.1007/s00251-005-0768-4
 44. Soller JT, Murua-Escobar H, Willenbrock S, Janssen M, Eberle N, Bullerdiek J, et al. Comparison of the human and canine cytokines IL-1(α / β) and TNF- α to orthologous other mammalian. *J Hered* (2007) 98(5):485–90. doi:10.1093/jhered/esm025
 45. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* (1997) 385(6618):729–33. doi:10.1038/385729a0
 46. Gyorfy Z, Ohnemus A, Kaspers B, Duda E, Staeheli P. Truncated chicken interleukin-1beta with increased biologic activity. *J Interferon Cytokine Res* (2003) 23(5):223–8. doi:10.1089/107999003321829935
 47. The MHC Sequencing Consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* (1999) 401:921–3. doi:10.1038/44853
 48. Gifford GE, Flick DA. Natural production and release of tumour necrosis factor. In: Bock G, Marsh J, editors. *Ciba Foundation Symposium 131 – Tumour Necrosis Factor and Related Cytotoxins*. Amsterdam: John Wiley & Sons, Ltd (2007). p. 3–20.
 49. Andersson U, Sander B, Andersson J, Moller G. Concomitant production of different lymphokines in activated T cells. *Eur J Immunol* (1988) 18(12):2081–4. doi:10.1002/eji.1830181232
 50. Pawelec G, Schaudt K, Rehbein A, Busch FW. Differential secretion of tumor necrosis factor- α and granulocyte/macrophage colony-stimulating factors but not interferon- γ from CD4+ compared to CD8+ human T cell clones. *Eur J Immunol* (1989) 19(1):197–200. doi:10.1002/eji.1830190132
 51. Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* (2009) 27:147–63. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132629
 52. Zhang S, Lillehoj HS, Ruff MD. Chicken tumor necrosis-like factor. I. In vitro production by macrophages stimulated with *Eimeria tenella* or bacterial lipopolysaccharide. *Poult Sci* (1995) 74(8):1304–10. doi:10.3382/ps.0741304
 53. Schneider K, Klaas R, Kaspers B, Staeheli P. Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties. *Eur J Biochem* (2001) 268(15):4200–6. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.02334.x
 54. Meyer R, Hatada EN, Hohmann HP, Haiker M, Bartsch C, Rothlisberger U, et al. Cloning of the DNA-binding subunit of human nuclear factor kappa B: the level of its mRNA is strongly regulated by phorbol ester or tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991) 88(3):966–70. doi:10.1073/pnas.88.3.966
 55. Rubbenstroth D, Rinder M, Kaspers B, Staeheli P. Efficient isolation of avian bornaviruses (ABV) from naturally infected psittacine birds and identification of a new ABV genotype from a salmon-crested cockatoo (*Cacatua moluccensis*). *Vet Microbiol* (2012) 161(1–2):36–42. doi:10.1016/j.vetmic.2012.07.004
 56. Iqbal M, Philbin VJ, Smith AL. Expression patterns of chicken toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Vet Immunol Immunopathol* (2005) 104(1–2):117–27. doi:10.1016/j.vetimm.2004.11.003
 57. Burggraaf S, Karpala AJ, Bingham J, Lowther S, Selleck P, Kimpton W, et al. H5N1 infection causes rapid mortality and high cytokine levels in chickens compared to ducks. *Virus Res* (2014) 185:23–31. doi:10.1016/j.virusres.2014.03.012
 58. Dalgaard TS, Skovgaard K, Norup LR, Pleidrup J, Permin A, Schou TW, et al. Immune gene expression in the spleen of chickens experimentally infected with *Ascaridia galli*. *Vet Immunol Immunopathol* (2015) 164(1–2):79–86. doi:10.1016/j.vetimm.2015.01.003
 59. Mauviel A, Temime N, Charron D, Loyau G, Pujol JP. Induction of interleukin-1 beta production in human dermal fibroblasts by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor- α . Involvement of protein kinase-dependent and adenylate cyclase-dependent regulatory pathways. *J Cell Biochem* (1991) 47(2):174–83. doi:10.1002/jcb.240470211
 60. Zhang YH, Lin JX, Vilcek J. Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. *Mol Cell Biol* (1990) 10(7):3818–23. doi:10.1128/MCB.10.7.3818
 61. Bethea JR, Chung IY, Sparacio SM, Gillespie GY, Benveniste EN. Interleukin-1 beta induction of tumor necrosis factor- α gene expression in human astrogloma cells. *J Neuroimmunol* (1992) 36(2–3):179–91. doi:10.1016/0165-5728(92)90049-Q
 62. Kothlow S, Schenk-Weibhauser K, Ratcliffe MJ, Kaspers B. Prolonged effect of BAFF on chicken B cell development revealed by RCAS retroviral

- gene transfer in vivo. *Mol Immunol* (2010) 47(7–8):1619–28. doi:10.1016/j.molimm.2010.01.011
63. Penski N, Hartle S, Rubbenstroth D, Krohmann C, Ruggli N, Schusser B, et al. Highly pathogenic avian influenza viruses do not inhibit interferon synthesis in infected chickens but can override the interferon-induced antiviral state. *J Virol* (2011) 85(15):7730–41. doi:10.1128/JVI.00063-11
64. Schusser B, Reuter A, von der Malsburg A, Penski N, Weigend S, Kaspers B, et al. Mx is dispensable for interferon-mediated resistance of chicken cells against influenza A virus. *J Virol* (2011) 85(16):8307–15. doi:10.1128/JVI.00535-11
65. Rahman MM, McFadden G. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog* (2006) 2(2):e4. doi:10.1371/journal.ppat.0020004
66. Laidlaw SM, Robey R, Davies M, Giotis ES, Ross C, Buttigieg K, et al. Genetic screen of a mutant poxvirus library identifies an ankyrin repeat protein involved in blocking induction of avian type I interferon. *J Virol* (2013) 87(9):5041–52. doi:10.1128/JVI.02736-12
67. Puehler F, Schwarz H, Waidner B, Kalinowski J, Kaspers B, Bereswill S, et al. An interferon-gamma-binding protein of novel structure encoded by the fowl-pox virus. *J Biol Chem* (2003) 278(9):6905–11. doi:10.1074/jbc.M207336200
68. Peck R, Murthy KK, Vainio O. Expression of B-L (Ia-like) antigens on macrophages from chicken lymphoid organs. *J Immunol* (1982) 129(1):4–5.
69. Luhtala M, Koskinen R, Toivanen P, Vainio O. Characterization of chicken CD8-specific monoclonal antibodies recognizing novel epitopes. *Scand J Immunol* (1995) 42(1):171–4. doi:10.1111/j.1365-3083.1995.tb03641.x
70. Roge R, Thorsen J, Topping C, Ozbay A, Moller BK, Carstens J. Commonly used reference genes are actively regulated in in vitro stimulated lymphocytes. *Scand J Immunol* (2007) 65(2):202–9. doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01879.x
71. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* (2012) 40(15):e115. doi:10.1093/nar/gks596
72. Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res* (2008) 7(2):731–40. doi:10.1021/pr700658q
73. Wang Y, Yang F, Gritsenko MA, Wang Y, Clauss T, Liu T, et al. Reversed-phase chromatography with multiple fraction concatenation strategy for proteome profiling of human MCF10A cells. *Proteomics* (2011) 11(10):2019–26. doi:10.1002/pmic.201000722
74. Cox J, Hein MY, Luber CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* (2014) 13(9):2513–26. doi:10.1074/mcp.M113.031591
75. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* (2016) 13(9):731–40. doi:10.1038/nmeth.3901
76. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* (2013) 30(4):772–80. doi:10.1093/molbev/mst010
77. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* (2013) 30(12):2725–9. doi:10.1093/molbev/mst197

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Rohde, Schusser, Hron, Farkašová, Plachý, Härtle, Hejnar, Elleder and Kaspers. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5 DISKUSSION

5.1 Identifizierung und phylogenetische Untersuchungen von TNF- α beim Huhn

Das pleiotrope Zytokin TNF- α wurde bereits bei vielen Spezies charakterisiert. Unter anderem wurden orthologe Sequenzen bei Säugetieren, aber auch bei Amphibien und Fischen identifiziert [36, 101, 102]. Dennoch konnte TNF- α bisher nicht bei Vögeln nachgewiesen werden.

Das aviäre Genom besteht aus einem diploiden Chromosomensatz aus 39 Chromosomen. Davon werden 33 als Mikrochromosomen und sechs als Makrochromosomen bezeichnet, welche sich wesentlich in ihrer Länge unterscheiden [103]. Eine weitere Eigenschaft der Mikrochromosomen besteht in ihrem GC-Reichtum, also dem erhöhten Anteil der Basen Guanin und Cytosin im Vergleich zu Adenin und Thymin [104]. Gleichzeitig finden sich in diesen Chromosomen sehr viele repetitive Sequenzen, immer wiederkehrende Basenabfolgen [105]. Genauere Untersuchungen des aviären Genoms konnten nachweisen, dass etwa 70 % aller Basen auf den Makrochromosomen lokalisiert sind [103, 106]. Dennoch befinden sich die Vielzahl (50-70 %) aller Gene auf den Mikrochromosomen, womit diese aufgrund ihrer Größe eine wesentlich höhere Gendichte aufweisen [103, 107]. Trotz der umfassenden Sequenzierung des Hühnergenoms sind gerade die genomischen Daten der Mikrochromosomen unterrepräsentiert [108]. Einer der Gründe dafür liegt in den physikalischen Eigenschaften der GC-reichen Sequenzen und den damit verbundenen Schwierigkeiten, die mit Standard-PCR-Methoden auftreten. Es ist bekannt, dass diese Sequenzen komplexe Sekundärstrukturen, wie zum Beispiel Haarnadelstrukturen, ausbilden. Gleichzeitig können intermolekulare Wechselwirkungen zwischen zwei GC-reichen Einzelsträngen entstehen, die die Amplifikation erschweren [109]. Diese Strukturen führen zu dem, dass die Denaturierungszeit in vielen standardmäßig verwendeten PCR-Programmen nicht ausreicht, um eine vollständige Trennung der Einzelstränge zu gewährleisten [110]. Zum anderen sind einige kommerziell erhältliche Polymerasen, wie die Taq-Polymerase oder die zur Generierung von cDNA-Bibliotheken verwendete Phusion-High-Fidelity-Polymerase, nicht in der Lage Sekundärstrukturen aufzulösen [111]. Weiterhin bilden GC-reiche Sequenzen bei der Amplifikation ein äußerst stabiles Duplex mit dem neu gebildeten komplementären DNA-Strang aus. Beim Erreichen einer Haarnadelstruktur oder dem Ende der zu amplifizierenden Sequenz kann dieser nicht

gelockert und damit nicht aus dem Polymerase-RNA/DNA-Komplex herausgelöst werden und verhindert damit ein Fortschreiten der Polymerase [112]. Sowohl ein Abbruch mit verkürzten PCR-Produkten als auch ein Überspringen der Haarnadelstruktur mit falschen PCR-Ergebnissen führen zu einer Unterrepräsentation der korrekten genomischen Sequenzen [113]. Eine chemische Stabilisierung der GC-reichen Einzelstränge, aber auch die Erstellung überlappender Amplicons können diese Schwierigkeiten ausgleichen [113]. Die in dieser Arbeit verwendeten Protokolle kombinieren dabei eine längere PCR-Extentionszeit und die Amplifikation mehrerer überlappender Abschnitte, um GC-reiche Sequenzen korrekt zu vervielfältigen. Des Weiteren kann die Verwendung von großen Datensätzen aus Illumina- und PaqBio-Sequenzierungen die Unterrepräsentation GC-reicher Sequenzen ausgleichen und damit die Identifizierung solcher Gene ermöglichen. Dennoch wurden seit der Veröffentlichung des Hühnergenoms eine Vielzahl verschiedener Gene, darunter auch GC-reiche, beschrieben und charakterisiert. Zu diesen gehören einige Mitglieder der Interleukin-, Interferon- und TNF-Superfamilie [8]. GC-reich sind beispielsweise auch die im Huhn neu identifizierten Sequenzen von Erythropoetin [114] und Leptin [115]. Diese konnten, wie die Sequenz von chTNF- α , durch die Benutzung von großen Illumina Sequenz Datensätzen des Sequence Read Archive (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) identifiziert werden.

5.1.1 Alignment und phylogenetische Untersuchung von chTNF- α

Für die weitere Charakterisierung der Sequenz von chTNF- α wurden Alignments mit anderen Vertebraten und Vogelspezies angefertigt. Dazu wurde in einem Alignment die vollständige, 285 Aminosäuren lange, Sequenz von chTNF- α mit anderen Vertebraten wie Amphibien, Reptilien und Säugetieren verglichen. Die Sequenz von chTNF- α besteht aus einer intrazellulären, transmembranen und extrazellulären Domäne. Bei der Betrachtung der intrazellulären Domäne von chTNF- α fällt auf, dass diese im Vergleich zu den Säugern, Reptilien und Amphibien verlängert ist. Ob eine gesonderte Funktion dieser verlängerten intrazellulären Domäne vorhanden ist, konnte noch nicht untersucht werden. Des Weiteren hat die Sequenz sowohl eine konservierte Transmembran-Domäne als auch eine konservierte extrazelluläre Domäne. Die extrazelluläre Domäne zeigt dabei im Vergleich mit denen anderer Spezies auch das charakteristische TNF-Superfamilien-Motiv. In der vorliegenden Studie wurde bei einem Vergleich des extrazellulären

Abschnitts des humanen TNF- α mit chTNF- α eine Übereinstimmung von 45 % festgestellt. Die beiden vollständigen Sequenzen zeigen insgesamt eine Übereinstimmung von 36 %. Dies ist höher als erwartet, da zum Beispiel das Zytokin Interferon- α vom Huhn nur eine Sequenz-Übereinstimmung von 20-25 % zeigt [8]. Innerhalb der TNF- α -Sequenz der Säugetiere gibt es eine Spaltstelle im Bereich des extrazellulären Abschnitts zwischen dem Alanin⁷⁶ und Valin⁷⁷. In diesem Bereich spalten Metalloproteinasen wie das TNF- α Converting Enzyme (TACE) die lösliche und biologisch aktive Variante von TNF- α ab [28]. Diese Spaltstelle ist nicht in der chTNF- α -Sequenz zu finden. Es ist anzunehmen, dass eine alternative Spaltstelle in der Sequenz von chTNF- α vorhanden ist, da die selektive Expression der extrazellulären Domäne zu einem Produkt führte, welches biologisch aktiv ist.

In einem zweiten Alignment wurde die chTNF- α -Sequenz mit der anderer Vogelspezies verglichen. Dabei wurde die Hühner-TNF- α -Sequenz genutzt, um TNF- α -Sequenzen von anderen Vogelarten zu identifizieren (NCBI, BLAST). Insgesamt konnten so 12 weitere aviäre TNF- α Sequenzen identifiziert werden, davon sechs vollständige und sechs unvollständige. Der Vergleich der intrazellulären Abschnitte dieser Sequenzen zeigte, dass diese ebenfalls eine verlängerte intrazelluläre Domäne, wie chTNF- α , aufweisen. Des Weiteren ist das TNF-Superfamilien-Motiv innerhalb der aviären TNF- α -Sequenzen hochkonserviert, welches auf eine gemeinsame evolutionäre Vergangenheit hindeutet.

Zeitgleich mit der Identifizierung der chTNF- α -Sequenz in dieser Arbeit haben Bornelov et al. weitere bisher unbekannte Gene (137) des Huhns identifiziert. Darunter wurde auch eine Sequenz von chTNF- α publiziert [116]. Diese Sequenz zeigt eine überwiegende Übereinstimmung mit der in dieser Studie identifizierten chTNF- α -Sequenz. Allerdings scheint die Sequenz von Bornelov et al. unvollständig zu sein, da in der hier vorliegenden Studie am 5'-Ende 216 weitere Nukleotide vorhanden sind. Außerdem sind innerhalb der chTNF- α -Sequenz von Bornelov et al. nahe des 3'-Endes 55 aufeinanderfolgende G-Nukleotide eingefügt. Es handelt sich dabei mit aller Wahrscheinlichkeit um Artefakte, welche durch den Prozess der Sequenzassemblierung entstanden sind. Dies kommt vor allem bei GC-reichen Sequenzen vor. Des Weiteren wurden nur kurze Abschnitte der chTNF- α -Sequenz von Bornelov et al. experimentell überprüft, wohingegen die hier vorgelegte vollständige Sequenz durch RT-PCR und Sequenzierung bestätigt wurde. Somit wurde für die weiterführenden Experimente ausschließlich die vollständige chTNF- α -Sequenz benutzt.

Anschließend wurde die chTNF- α -Sequenz phylogenetisch untersucht. Dazu wurden in

einem ersten phylogenetischen Baum (Maximum Likelihood) chTNF- α mit den sechs vollständigen aviären TNF- α -Sequenzen und weiteren TNF-SF-Mitgliedern, wie LT- α und LT- β anderer Spezies, verglichen. Es zeigte sich eine eindeutige phylogenetische Beziehung innerhalb der aviären chTNF- α -Sequenzen. Innerhalb der TNF- α -Familie gruppieren die Vogelspezies zusammen, woran sich die Reptilien und danach die Säugetiere wie Mensch und Maus anschließen. Dies spiegelt auch die grundlegende, evolutionäre Annahme wieder, dass Vögel und Amphibien enger miteinander verwandt sind, als die Vögel mit den Säugetieren [117, 118]. Trotz der Identifizierung der chTNF- α -Sequenz konnte die genaue genomische Lokalisation noch nicht bestimmt werden. Beim Säuger ist bekannt, dass TNF- α im MHC-Lokus codiert wird [119]. Daher wurde vermutet, dass die Sequenz von chTNF- α auch beim Huhn im MHC-Lokus zu finden ist, was aber nicht bestätigt werden konnte [100]. Ein Grund dafür kann die mögliche Translokation des einzelnen Gens oder aber des gesamten syntenischen Lokus sein. Eine Verschiebung des gesamten Lokus wird durch neue genomische Untersuchungen des erst kürzlich neu publizierten Genoms der Krähe gestützt. Dort konnte die TNF- α -Sequenz der Krähe zusammen mit neun weiteren, bisher beim Vogel unbekanntem, Genen in einem einzelnen Contig lokalisiert werden. Interessanterweise stellen diese Gene Orthologe zu Genen des Menschen dar, welche dort mit dem humanen TNF- α zusammen im MHC-Lokus codiert werden [100, 119, 120]. Dennoch konnten in dem Contig der Krähe weder LT- α noch LT- β identifiziert werden. Diese wurden aufgrund der gemeinsamen syntenischen Lokalisation mit TNF- α im humanen MHC-Lokus auch innerhalb dieses Contigs vermutet. Diese Beobachtungen lassen eine Translokation des aviären TNF- α Lokus vermuten, was erklärt, warum dieses Gen nicht im MHC-Lokus zu finden war. Da weder die Sequenzen für LT- α und LT- β des Vogels identifiziert noch im Genom lokalisiert werden können, muss auch weiterhin angenommen werden, dass diese Gene im Huhn nicht vorhanden sind. Lymphotoxine sind für deren Funktion bei der Entwicklung der Lymphknoten im Säuger bekannt [121]. Da diese im Immunsystem des Huhnes vollständig fehlen, ist auch das Fehlen der Gene sowohl für die Lymphotoxine als auch für deren Rezeptoren nachvollziehbar [8].

In einem nächsten Schritt wurden die beiden bereits bekannten Rezeptoren für chTNF- α (TNFR1 und 2) [122, 123] erstmals phylogenetisch analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu beide Sequenzen mit denen anderer Spezies verglichen. Die jeweiligen Sequenzen der beiden Rezeptoren bilden dabei voneinander getrennte Cluster aus. Innerhalb dieser zeigte sich die gleiche evolutionäre Beziehung zwischen Vögeln,

Reptilien und Säugetieren, wie sie auch bei der phylogenetischen Analyse von TNF- α gefunden wurde. Mit Hilfe der vorgelegten phylogenetischen Daten konnte eine eindeutige Verwandtschaft zwischen TNF- α und seinen Rezeptoren bei verschiedenen Spezies nachgewiesen werden. Zusammen mit den teils hohen Sequenz-Übereinstimmungen kann daher davon ausgegangen werden, dass chTNF- α eine vergleichbare biologische Funktion im Huhn besitzt.

5.2 Genexpressionsanalysen von chTNF- α *in vitro* und *in vivo*

Basierend auf der vorhandenen Sequenz von chTNF- α wurden anschließend spezifische Primer entwickelt und Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR durchgeführt. LPS stimulierte Makrophagen stellen beim Säuger die Hauptquelle von TNF- α dar [16]. LPS ist in der Außenmembran gramnegativer Bakterienzellwände lokalisiert und führt im Körper zu einer Induktion proinflammatorischer Zytokine [12]. In ersten Experimenten wurden daher primäre Makrophagen aus Hühnerblut mit verschiedenen LPS-Konzentrationen für verschiedene Zeiträume bis zu 24 Stunden stimuliert. Dabei zeigte sich eine rasche Induktion und erhöhte Expression nach vier Stunden, vor allem bei einer LPS-Konzentration von 100 ng/ml. Diese Konzentration wurde so für alle weiteren *in vitro* Experimente verwendet. Da bei Mäusen schon nach wenigen Stunden eine schnelle Induktion von TNF- α beobachtet wird, konnte eine ähnliche Kinetik auch für chTNF- α vermutet werden. Entsprechend wurden auch frühere Zeitpunkte (1h, 2h) untersucht [124]. Diese drei unabhängigen Experimente zeigen eine signifikant erhöhte Expression von chTNF- α nach einer Stunde mit einem Peak nach zwei Stunden im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle. Nach 24 Stunden ist keine signifikante Expression von chTNF- α festzustellen. In einem weiteren *in vitro* Experiment wurden primäre Makrophagen aus der Hühnermilz isoliert und mit der gewählten LPS-Konzentration stimuliert. Die stimulierten Milzmakrophagen zeigen, wie auch die Blutmakrophagen, einen signifikanten Anstieg der TNF- α mRNA Abundanz nach zwei Stunden (drei unabhängige Experimente). Eine weitere Quelle für primäre Makrophagen stellt das Knochenmark dar. Aus diesem wurden hämatopoetische Stammzellen isoliert und zur Differenzierung mit dem Colony-Stimulating-Factor 1 (CSF-1) behandelt und anschließend mit LPS stimuliert [125]. Eine erhöhte Expression ist nach vier und acht Stunden zu sehen. So zeigen die *in vitro* Experimente mit primären Makrophagen, welche aus unterschiedlichen Quellen stammen, vergleichbare Expressionsmuster für chTNF- α .

Des Weiteren produzieren beim Säuger nicht nur Makrophagen sondern auch T-Zellen TNF- α [126]. Um dies auch beim Huhn zu überprüfen, wurden aus der Hühnermilz Lymphozyten isoliert und die Zellen durch die Quervernetzung des α/β -T-Zell-Rezeptors spezifisch aktiviert [127]. Nach 14 Stunden Stimulation wurde eine deutliche Erhöhung der chTNF- α Expression im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle beobachtet. In einem weiteren Schritt wurden die Subpopulationen von T-Zellen spezifisch auf ihre Expression von chTNF- α untersucht. Im Säuger wurde gezeigt, dass die CD4⁺ T-Zellen eine deutliche Expression von TNF- α aufweisen, CD8⁺ T-Zellen dagegen das Zytokin nicht exprimieren [128]. Für die vergleichenden Untersuchungen beim Huhn wurden die aus der Hühnermilz isolierten Lymphozyten durchflusszytometrisch sortiert und anschließend erneut durch die Stimulation des T-Zell-Rezeptors aktiviert. Nach 14 Stunden konnte eine deutliche Erhöhung der Expression von chTNF- α bei den CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden. Bei den CD8⁺ T-Zellen konnte, wie auch beim Säuger, keine Geninduktion von chTNF- α beobachtet werden. Somit wurde auch beim Huhn gezeigt, dass CD4⁺ T-Zellen die Subpopulation darstellt, welche auf adäquate Stimulation chTNF- α bilden.

Zusätzlich wurden auch Genexpressionsanalysen von chTNF- α *in vivo* durchgeführt. Dazu wurde weißen Leghornhennen 10 μ g LPS pro kg Körpergewicht intravenös injiziert [129]. Nach drei Stunden wurden die Tiere geschlachtet und Proben von Leber und Milz entnommen. Parallel zu chTNF- α wurde auch die IL-6 mRNA quantifiziert, ein weiteres inflammatorisches Zytokin, welches beim Huhn seit längerem bekannt ist (chicken IL-6, chIL-6) [129, 130]. Die chTNF- α mRNA war signifikant in der Milz, aber nicht in der Leber, hochreguliert. Anders als in der Maus war zwar eine signifikante, aber dennoch geringe Induktion von chTNF- α mRNA in der Milz nachzuweisen [124]. Im Vergleich dazu ist chIL-6 in beiden Geweben deutlich höher exprimiert als chTNF- α . Da in diesen Untersuchungen nur Proben von einem Zeitpunkt nach LPS-Stimulation analysiert wurden, kann die Möglichkeit einer von der IL-6 Kinetik abweichenden chTNF- α Induktion nicht ausgeschlossen werden. Überraschend war die negative Reaktion des Lebergewebes. Möglicherweise ist chTNF- α in der Leber aufgrund der aktiven Toleranz gegenüber LPS nur sehr gering exprimiert. LPS und andere PAMPs werden durch Zellen des Immunsystems unter anderem durch den TLR-4 erkannt, worauf es zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine kommt [79]. Die Leber steht als Entgiftungsorgan in ständigen Kontakt mit dem Blut, welches direkt über die Portalvene aus dem Magen-Darm-Trakt kommt. Dieses Blut enthält neben Antigenen aus

Verdauungsprozessen auch bakterielle Bestandteile aus dem Darm. Zu diesen gehört auch LPS, welches im Vergleich zum systemischen Blutkreislauf in der Portalvene nachweisbar ist [131]. Dadurch sind die Immunzellen der Leber kontinuierlich mit einer gewissen LPS-Konzentration konfrontiert. Um Entzündungsreaktionen zu vermeiden, ist die ansonsten starke Immunantwort auf LPS in der Leber herabgesetzt. Dieser Prozess wird als aktive Toleranz der Leber bezeichnet. Häufig vorkommende Antigene werden dadurch nicht immer effektiv bekämpft, während unbekannte Pathogene eine stärkere Immunantwort auslösen [132]. Somit ist anzunehmen, dass auch in dieser Studie die geringe Expression von chTNF- α auf die hepatischen Toleranzmechanismen zurückzuführen ist. In dieser Untersuchung konnte somit die Expression von chTNF- α sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Dies legt die Grundlage für weitere Experimente zur Induktion und Kinetik von chTNF- α .

5.3 Untersuchung der biologischen Aktivität von chTNF- α

Schließlich wurde in der vorliegenden Arbeit die biologische Aktivität von chTNF- α untersucht, in dem das Protein rekombinant mit Hilfe von eukaryotischen und prokaryotischen Expressionssystemen exprimiert wurde. Dazu wurde die vollständige Sequenz von chTNF- α in den pcDNA3.1 Vektor kloniert und das Protein von transient transfizierten 293-Zellen in den Zellkulturüberstand (ZKÜ) abgegeben. Anschließend konnte die biologische Aktivität in einem bereits etablierten NF- κ B-Reporter-Luciferase-Assay (CEC-32) analysiert werden [133]. Diese Zelllinie wurde bereits verwendet, um die biologische Aktivität von rekombinantem IL-1 beim Huhn (chIL-1) nachzuweisen. Die Stimulation der Reporter-Zelllinie mit chIL-1 wurde daher als positiv Kontrolle verwendet [133]. Der beim Säuger hinlänglich bekannte Signaltransduktionsweg von TNF- α über den TNFR1-TRADD-RIPK1-TRAF2-Komplex hin zu NF- κ B [42], kann auch beim Huhn angenommen werden. Ein Grund dafür ist die Codierung des chTNF- α Rezeptors TNFR1 im Genom des Huhnes. Zusätzlich wurden im Hühnergenom die Sequenzen für die Orthologe zu TRADD [134], RIPK1 [135] und TRAF2 [136] annotiert. Basierend auf diesen Daten wurde die beschriebene Reporter-Zelllinie zur Überprüfung der biologischen Aktivität des chTNF- α verwendet. Der eukaryotische ZKÜ wurde nach einer Aufkonzentrierung in Verdünnungsreihe in dem entsprechenden Luciferase-Assay getestet. Es konnte eine ähnlich hohe biologische Aktivität von chTNF- α im Vergleich zu chIL-1 festgestellt werden. Der verwendete Assay ist sensibel genug, um auch die

biologische Aktivität geringer Proteinmengen zu detektieren, da der zugrundeliegende Signaltransduktionsweg direkt den NF- κ B-Reporter induziert [133]. Parallel zu der Überprüfung des rekombinanten chTNF- α auf die biologische Aktivität wurde auch versucht, das Protein in einem Western Blot nachzuweisen. Eine eindeutige Proteinbande konnte mit dieser Methode nicht detektiert werden, so dass auf die sensiblere Technik des Massenspektrometers zurückgegriffen wurde. Dort war der eindeutige Nachweis von chTNF- α aus dem ZKÜ möglich. Daraufhin wurde ein weiteres Expressionssystem verwendet, um zu überprüfen, ob dieses effektiver geeignet ist, um chTNF- α rekombinant herzustellen. ChTNF- α wurde daher zusätzlich in dem klassischen prokaryotischen Expressionssystem *E. coli* exprimiert. Dazu wurde zum einen die vollständige Sequenz und zum anderen lediglich die extrazelluläre Domäne von chTNF- α kloniert, exprimiert, aufgereinigt und auf die biologische Aktivität hin überprüft. In der vollständigen Sequenz von TNF- α beim Säuger findet sich eine Spaltstelle für die Metalloproteinase TACE, welche die extrazelluläre Domäne und damit das lösliche TNF- α abspaltet [28]. Diese Spaltstelle wurde in der chTNF- α -Sequenz nicht gefunden, weswegen die extrazelluläre Domäne (Prolin⁹⁶ bis Asparaginsäure²⁸⁵) auch einzeln rekombinant exprimiert wurde. Sowohl das vollständige chTNF- α als auch die lösliche extrazelluläre Form des Zytokins zeigten im Luciferase-Assay eine signifikante biologische Aktivität. Parallel dazu wurde das aufgereinigte extrazelluläre chTNF- α auch im Western Blot getestet. Das rekombinante extrazelluläre chTNF- α zeigte im Western Blot auf der kalkulierten Höhe von 21 kDa in reduzierter Form eine deutliche Bande. Daher lässt sich vermuten, dass mit dem prokaryotischen Expressionssystem größere Mengen an rekombinantem Protein generiert werden können, so dass sich dieses auch im Western Blot detektieren lassen.

Um allgemein eine Fehlinduktion des Reporters auszuschließen, wurden mehrere Kontrollen durchgeführt, da besonders bei Proteinexpressionen in *E. coli* eine LPS-Kontamination nicht auszuschließen ist [137]. Um dies zu überprüfen, wurden drei verschiedene Kontrollansätze gewählt, da LPS über die Bindung an den TLR-4 NF- κ B induzieren kann [79]. Erstens wurde der ZKÜ bei 80 °C für fünf Minuten inkubiert und anschließend getestet. LPS ist ein sehr hitzestabiles Protein, welches erst bei Temperaturen zwischen 180-250 °C denaturiert wird [138]. Im Gegensatz dazu ist nach der Erhitzung des ZKÜ keine biologische Aktivität von chTNF- α zu erwarten. Nach dieser Behandlung wurde keine Luciferase-Aktivität festgestellt, was darauf hindeutet, dass im ZKÜ keine LPS-Konzentration vorhanden ist, die den Reporter induzieren kann. Zweitens wurde aufgereinigtes chTNF- α in einem Limulus-Amöbozyten-Lysat-Assay

auf eine mögliche LPS-Kontamination überprüft. Dabei ergab sich eine sehr geringe Verunreinigung durch LPS von 0,7 ng/ml. Als drittes wurde die Reporter-Zelllinie mit verschiedenen LPS-Konzentrationen behandelt. Dabei wurde keine Fehlinduktion sowohl bei 0,1 ng/ml als auch bei 10 µg/ml festgestellt. Daher kann angenommen werden, dass die Reporter-Zelllinie keinen TLR-4 besitzt oder dieser in der Wachtel nicht durch LPS stimuliert wird, da keine messbare Induktion festgestellt werden konnte.

Die biologische Aktivität von TNF- α ist von der quaternären Struktur des Homo-Trimeres abhängig. Dabei ist bekannt, dass diese Form selbst unter physiologischen Bedingungen nicht unbegrenzt stabil ist, sondern mit der Zeit reversibel in eine inaktive Form, wahrscheinlich das Monomer, dissoziiert [139]. Es wird vermutet, dass dieses Verhalten für die Aufrechterhaltung des TNF- α Signals eine Rolle spielt, da die Potenz von TNF- α sehr hoch ist und damit schon geringe Mengen eine Reaktion auslösen können [140]. Des Weiteren zeigten frühe Studien zur Stabilität des Homo-Trimers, dass sich sowohl Konzentration, als auch der pH-Wert auf das Verhältnis zwischen Dissoziation und Re-Assoziation auswirken. Bei niedrigeren pH-Werten (pH 6,0) konnte für geringere Proteinkonzentrationen (µg/ml) eine erhöhte Dissoziation und damit eine erhöhte Konzentration des Monomers nachgewiesen werden [141]. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes des verwendeten Elutionspuffers bei der Aufreinigung des rekombinanten chTNF- α kann davon ausgegangen werden, dass sich das Verhältnis zwischen Homo-Trimer und Monomer mehr auf der Seite des Monomeres verschiebt. Dieser Effekt ist auch bei den genutzten Verdünnungen (1:10, 1:20) der chTNF- α Lösung zu beobachten, da bei der 1:20 Verdünnung die biologische Aktivität kaum noch nachweisbar war. Insgesamt können sowohl der pH-Wert als auch die Konzentration einen Einfluss auf die biologische Aktivität nehmen. Auch die Inkubationszeit und Temperatur wurden zuvor untersucht und eine höhere Temperatur führte zu einer schnelleren Dissoziation des Homo-Trimers [139]. Eine Inkubationszeit von sechs Stunden bei 40 °C im Verlauf des Luciferase-Assays kann daher auch eine geringere biologische Aktivität verursachen. Eine Anpassung des Protokolls in Zeit und Temperatur würde daher interessante Einblicke in die Stabilität und Aktivität des rekombinanten chTNF- α liefern. Des Weiteren wurde zu Beginn der Experimente die aufgereinigte Proteinlösung gegen PBS dialysiert, um so einen physiologischeren pH-Wert zu erreichen. Nach der Dialyse wurde keine biologische Aktivität mehr festgestellt und diese für die nachfolgenden Experimente nicht weiter durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Der erneute Versuch der Dialyse sowie die Anpassung des Protokolls und des Dialysepuffers können helfen, die

Stabilität von chTNF- α zu erhöhen und damit noch höhere biologische Aktivitäten zu erhalten.

Mit den beschriebenen Experimenten wurde somit ein Expressionssystem für chTNF- α generiert. Durch dieses ist die Herstellung eines rekombinanten chTNF- α , welches eine hohe biologische Aktivität zeigt, möglich und erlaubt damit weiterführende Experimente.

5.4 Ausblick

Mit den in dieser Studie gewonnenen Daten konnte sowohl die Existenz eines Orthologs für TNF- α beim Huhn als auch dessen biologische Aktivität nachgewiesen werden. Das zur Verfügung stehende rekombinante Protein ermöglicht es nun, weiterführende Experimente mit chTNF- α durchzuführen. Bisher wurden chIL-1 und chIL-6 als Marker zur Untersuchung von inflammatorischen Prozessen im Huhn verwendet [142]. In weiterführenden Studien kann die Rolle von chTNF- α bei Infektionskrankheiten im Huhn untersucht werden. So könnte mittels qRT-PCR die Expression von chTNF- α in verschiedenen Geweben unter physiologischen und pathologischen Bedingungen detektiert werden. Das daraus resultierende Grundverständnis kann zur Kontrolle von Infektionskrankheiten beim Huhn beitragen. Des Weiteren ist es jetzt möglich, die chTNF- α Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren (TNFR1, 2) zu überprüfen und zu verifizieren. Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Experimente können auf der Grundlage dieser Arbeit geplant und durchgeführt werden. Die Verwendung von Techniken zur funktionellen Inhibition von Zytokinen, zum Beispiel durch die Nutzung eines löslichen chTNF- α neutralisierenden Decoyrezeptors, kann zum Verständnis des chTNF- α Netzwerkes im Huhn beitragen, wie dies für ein anderes TNF-SF Mitglied beim Huhn bereits modellhaft aufgezeigt wurde [93]. Des Weiteren ermöglicht der Nachweis eines chTNF- α Orthologs die weitere Untersuchung aviärer Pathogene in Bezug auf deren Immunmodulation. Solche Untersuchungen wurden zuvor auch in Säugetieren mit Herpes- und Pockenviren durchgeführt. Diese sind in der Lage die Signaltransduktion durch die Blockierung und Inhibierung von TNF- α und dessen Rezeptoren zu verändern [78]. Die von TNF- α abhängigen komplizierten, immunmodulatorischen Netzwerke können auf Grundlage dieser Arbeit nun genauer analysiert werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Wirkung des TNF- α als erstes Zytokin beschrieben und ist bis heute eines der am besten untersuchten Signalmoleküle im Immunsystem. Inzwischen konnte eine große Familie strukturell ähnlicher Moleküle identifiziert werden, die in ihrer Gesamtheit die TNF-Superfamilie bilden. Trotz seiner wichtigen Funktion in der Regulation des Immunsystems konnte ein homologes Protein beim Huhn bis heute nicht identifiziert werden, obwohl Orthologe bei zahlreichen Säugern, aber auch bei Amphibien und Fischen charakterisiert wurden. Die Verfügbarkeit großer genomischer Datensätze einer Vielzahl von Vogelspezies hat in den letzten Jahren die Identifizierung zahlreicher sogenannter „missing genes“ in Vogelgenomen ermöglicht, darunter wichtiger Zytokine wie Erythropoetin oder Leptin. Unter Verwendung dieser Datensätze und vergleichbarer Methoden ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, die vollständige Sequenz von TNF- α beim Huhn (chTNF- α) und weiteren Vogelarten zu identifizieren und chTNF- α im Weiteren zu charakterisieren.

Die Sequenzen des TNF- α des Huhns und fünf weiterer Vogelspezies weisen eine konservierte extrazelluläre TNF-Homologie Domäne auf, welche eine ca. 45 %ige Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz des Zytokins der Säuger zeigt. Neben der Transmembran-Domäne besitzen die aviären TNF- α Orthologe einen verlängerten intrazellulären Abschnitt. Zusätzlich wurden die bereits beim Huhn bekannten Sequenzen der TNF-Rezeptoren (TNFR1, TNFR2) in Bezug auf ihre phylogenetische Verwandtschaft mit Sequenzen anderer Vertebraten untersucht. Um erste Informationen über die Regulation von TNF- α beim Huhn zu erhalten, wurden Expressionsanalysen von chTNF- α mittels qRT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden primäre Makrophagen isoliert und mit Lipopolysaccharid (LPS) für unterschiedliche Zeiträume stimuliert. Wie auch für andere Vertebraten beschrieben, wird TNF- α beim Huhn sehr schnell induziert. Eine signifikante Hochregulation der spezifischen mRNA wurde bereits nach zwei Stunden beobachtet. Nahezu identische Kinetiken wurden für die Induktion in Makrophagen beobachtet, die aus Monozyten, der Milz oder aus Knochenmarksvorläuferzellen gewonnen wurden. Die Analyse der chTNF- α Expression in Lymphozyten zeigte eine signifikante Induktion in isolierten CD4⁺ T-Helferzellen, nicht aber in CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. Auch die intravenöse Applikation von LPS führte *in vivo* nach drei Stunden zu einer signifikanten Induktion der TNF- α mRNA in der Milz, nicht aber in der Leber.

Um die biologische Aktivität des Zytokins zu analysieren, wurde die vollständige chTNF- α -Sequenz sowohl in einem eukaryotischen (HEK293) als auch einem prokaryotischen Expressionssystem exprimiert. Die biologische Aktivität der rekombinanten Proteine wurde mit Hilfe einer NF- κ B-Reporter-Zelllinie (CEC-NF- κ B) quantifiziert. ChTNF- α aus beiden Expressionssystemen bewirkte eine starke Induktion des Reporters. Auch ein Konstrukt, welches lediglich die extrazelluläre Domäne des chTNF- α beinhaltete, führte zu einer hoch signifikanten Reporteraktivierung.

Zusammenfassend konnte somit die Existenz eines Orthologs von TNF- α beim Huhn und dessen biologische Aktivität nachgewiesen werden. Damit wurde die Grundlage für weitere umfassende Untersuchungen zur funktionellen Relevanz von TNF- α bei inflammatorischen Prozessen beim Huhn und die Nutzung dieses Zytokins als Biomarker gelegt.

7 SUMMARY

TNF- α was the first cytokine to be described and early reports date back to the end of the 19th century. To date it is one of the most intensively investigated signaling molecules of the immune system. Over the last 40 years a large family of structurally similar molecules has been identified, providing the entirety of the TNF-superfamily. Despite its important function in the regulation of the immune system, a homologous protein has not yet been identified in the chicken, although orthologues have been characterized in numerous mammals and also in amphibians and fish. The availability of large genomic databases in a variety of avian species has enabled the identification of numerous so-called “missing genes” in the avian genomes. In recent years this has included important cytokines like erythropoietin and leptin. Using these datasets and comparable methods, this study succeeded in identifying the complete sequence of TNF- α in the chicken and other bird species and characterizing chTNF- α .

The sequences of TNF- α of the chicken and five other bird species show a conserved extracellular TNF-homology domain with 45 % amino acid similarity compared to the mammalian cytokines. In addition to the transmembrane domain the avian TNF- α orthologues contain an extended intracellular part. Furthermore, sequences of the TNF receptors (TNFR1, TNFR2) in the chicken already described by others were analysed for their phylogenetic relationship to sequences of other vertebrates. To obtain first information about the regulation of chTNF- α , expression analyses were performed using qRT-PCR. Primary macrophages were isolated and stimulated with lipopolysaccharide (LPS) for different periods of time. As described for other vertebrates, TNF- α is induced rapidly in chicken cells. A significant upregulation of the specific mRNA was already observed after 2 hours. Almost identical kinetics were observed for the induction in macrophages, which were obtained from monocytes, spleen and bone marrow precursor cells. The analysis of the chTNF- α expression in lymphocytes showed a significant induction in isolated CD4⁺ T-helper cells, but not in CD8⁺ cytotoxic T-cells. After three hours the intravenous application of LPS also resulted in a significant induction of chTNF- α mRNA in the spleen but not in the liver.

To analyse the biological activity of the cytokine, the entire sequence of chTNF- α was expressed both in eukaryotic (HEK293) and prokaryotic expression systems. The biological activity of the recombinant protein was quantified using a NF- κ B-reporter-cell line (CEC-NF- κ B). chTNF- α derived from both expression systems caused a strong

induction of the reporter. A construct, representing the extracellular domain of chTNF- α , also induced a significantly high activation of the reporter.

In summary, the existence of an orthologue of TNF- α in the chicken and its biological activity could be demonstrated. This study lays the foundation for further comprehensive investigations of the functional relevance of TNF- α during inflammatory processes in chicken and the use of this cytokine as a biomarker.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Statistisches Bundesamt, *6 Einkommen, Konsum, Lebensbedingungen*, in *Statistisches Jahrbuch 2017 Deutschland und Internationales*, J. Gude, Editor. 2017, Statistisches Bundesamt (Destatis): Wiesbaden. p. 171-198.
2. Statistisches Bundesamt, *19 Land-und Forstwirtschaft*, in *Statistisches Jahrbuch 2017 Deutschland und Internationales*, J. Gude, Editor. 2017, Statistisches Bundesamt (Destatis): Wiesbaden. p. 481-512.
3. ZDG Zentralverband der Deutschen Geflügelwirtschaft e.V. *Wirtschaftszahlen*. Verfügbar unter <https://www.gefluegel-charta.de/infopool/wirtschaftszahlen/> [05.03.2018].
4. Davison, F., *The Importance of the Avian Immune System and its Unique Features*, in *Avian Immunology*, K. Schat, B. Kaspers, and P. Kaiser, Editors. 2014, Academic Press: San Diego, London, Waltham. p. 1-9.
5. International Chicken Genome, S.C., *Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution*. *Nature*, 2004. **432**(7018): p. 695-716.
6. Lu, L., et al., *The goose genome sequence leads to insights into the evolution of waterfowl and susceptibility to fatty liver*. *Genome Biology*, 2015. **16**: p. 89.
7. Huang, Y., et al., *The duck genome and transcriptome provide insight into an avian influenza virus reservoir species*. *Nature Genetics*, 2013. **45**(7): p. 776-783.
8. Kaiser, P., et al., *A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines*. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2005. **25**(8): p. 467-84.
9. Coley, W.B., *The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)*. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 1910. **3**(Surg Sect): p. 1-48.
10. Coley, W.B., *The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1991(262): p. 3-11.
11. Shear, M.J., et al., *Chemical Treatment of Tumors. V. Isolation of the Hemorrhage-Producing Fraction from Serratia marcescens (Bacillus prodigiosus) Culture Filtrate I*. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 1943. **4**(1): p. 81-97.
12. Steimle, A., I.B. Autenrieth, and J.S. Frick, *Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2016. **306**(5): p. 290-301.
13. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. *Science*, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.

14. O'Malley, W.E., B. Achinstein, and M.J. Shear, *Action of Bacterial Polysaccharide on Tumors. II. Damage of Sarcoma 37 by Serum of Mice Treated with Serratia Marcescens Polysaccharide, and Induced Tolerance*. Nutrition Reviews, 1988. **46**(11): p. 389-391.
15. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
16. Beutler, B. and A. Cerami, *Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator*. Annual Review of Biochemistry, 1988. **57**: p. 505-18.
17. Beutler, B. and A. Cerami, *The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response*. Annual Review of Immunology, 1989. **7**: p. 625-55.
18. Beutler, B., et al., *Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin*. Nature, 1985. **316**(6028): p. 552-4.
19. Aggarwal, B.B., B. Moffat, and R.N. Harkins, *Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization*. Journal of Biological Chemistry, 1984. **259**(1): p. 686-91.
20. Gray, P.W., et al., *Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 721-4.
21. Pennica, D., et al., *Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 724-9.
22. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(9): p. 745-56.
23. Granger, G.A., et al., *Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells*. Nature, 1969. **221**(5186): p. 1155-7.
24. Hehlhans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.
25. Idriss, H.T. and J.H. Naismith, *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. Microscopy Research and Technique, 2000. **50**(3): p. 184-95.
26. Bridgham, J.T. and A.L. Johnson, *Characterization of chicken TNFR superfamily decoy receptors, DcR3 and osteoprotegerin*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **307**(4): p. 956-61.
27. Tansey, M.G. and D.E. Szymkowski, *The TNF superfamily in 2009: new pathways, new indications, and new drugs*. Drug Discovery Today, 2009. **14**(23-24): p. 1082-8.
28. Black, R.A., et al., *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature, 1997. **385**(6618): p. 729-33.

29. Horiuchi, T., et al., *Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents*. Rheumatology (Oxford), 2010. **49**(7): p. 1215-28.
30. Kriegler, M., et al., *A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF*. Cell, 1988. **53**(1): p. 45-53.
31. Smith, R.A. and C. Baglioni, *The active form of tumor necrosis factor is a trimer*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(15): p. 6951-4.
32. Eck, M.J. and S.R. Sprang, *The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(29): p. 17595-605.
33. Vanamee, E.S. and D.L. Faustman, *Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling*. Science Signaling, 2018. **11**(511).
34. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. Trends in Biochemical Sciences, 2002. **27**(1): p. 19-26.
35. Pennica, D., et al., *Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985. **82**(18): p. 6060-4.
36. Wiens, G.D. and G.W. Glenney, *Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies*. Developmental & Comparative Immunology, 2011. **35**(12): p. 1324-35.
37. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
38. Hohmann, H.P., et al., *Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha)*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(25): p. 14927-34.
39. Banner, D.W., et al., *Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation*. Cell, 1993. **73**(3): p. 431-45.
40. Beutler, B. and C. van Huffel, *Unraveling function in the TNF ligand and receptor families*. Science, 1994. **264**(5159): p. 667-8.
41. Kalliolias, G.D. and L.B. Ivashkiv, *TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies*. Nature Reviews Rheumatology, 2016. **12**(1): p. 49-62.
42. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181-90.
43. Sabio, G. and R.J. Davis, *TNF and MAP kinase signaling pathways*. Seminars in Immunology, 2014. **26**(3): p. 237-245.

44. Brenner, D., H. Blaser, and T.W. Mak, *Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die*. Nature Reviews Immunology, 2015. **15**(6): p. 362-74.
45. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity*. Annual Review of Immunology, 2000. **18**: p. 621-63.
46. Faustman, D.L. and M. Davis, *TNF Receptor 2 and Disease: Autoimmunity and Regenerative Medicine*. Frontiers in Immunology, 2013. **4**: p. 478.
47. Grell, M., et al., *The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1995. **83**(5): p. 793-802.
48. Hayashi, K., et al., *A systems biology approach to suppress TNF-induced proinflammatory gene expressions*. Cell Communication and Signaling, 2013. **11**(1): p. 84.
49. Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel, *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. Cell, 1995. **81**(4): p. 495-504.
50. Zhang, N., et al., *Structure of the C-terminal domain of TRADD reveals a novel fold in the death domain superfamily*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 7073.
51. Kim, P.K., et al., *Genomic structure and mapping of human FADD, an intracellular mediator of lymphocyte apoptosis*. The Journal of Immunology, 1996. **157**(12): p. 5461-6.
52. Eberstadt, M., et al., *NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain*. Nature, 1998. **392**(6679): p. 941-5.
53. Rothe, M., et al., *A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1994. **78**(4): p. 681-92.
54. Xie, P., *TRAF molecules in cell signaling and in human diseases*. Journal of Molecular Signaling, 2013. **8**: p. 7-7.
55. Chung, J.Y., et al., *All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction*. Journal of Cell Science, 2002. **115**(Pt 4): p. 679-88.
56. Freemont, P.S., *RING for destruction?* Current Biology, 2000. **10**(2): p. R84-7.
57. Verma, I.M., et al., *Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation*. Genes & Development, 1995. **9**(22): p. 2723-35.
58. Website der Boston University. *NF-kB Target Genes*. Verfügbar unter <https://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/> [25.02.2018].
59. Xie, X., et al., *miR-145-5p/Nurr1/TNF-alpha Signaling-Induced Microglia Activation Regulates Neuron Injury of Acute Cerebral Ischemic/Reperfusion in Rats*. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2017. **10**: p. 383.

60. Chen, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha produced in cardiomyocytes mediates a predominant myocardial inflammatory response to stretch in early volume overload*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2010. **49**(1): p. 70-8.
61. Dudeck, J., et al., *Mast-Cell-Derived TNF Amplifies CD8(+) Dendritic Cell Functionality and CD8(+) T Cell Priming*. Cell Reports, 2015. **13**(2): p. 399-411.
62. Hube, F. and H. Hauner, *The role of TNF-alpha in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance?* Hormone and metabolic research, 1999. **31**(12): p. 626-31.
63. Ranta, V., et al., *Human vascular endothelial cells produce tumor necrosis factor-alpha in response to proinflammatory cytokine stimulation*. Critical Care Medicine, 1999. **27**(10): p. 2184-7.
64. Dellinger, R.P., *Inflammation and coagulation: implications for the septic patient*. Clinical infectious diseases, 2003. **36**(10): p. 1259-65.
65. Gassmann, M., et al., *Blut*, in *Physiologie der Haustiere*, W. von Engelhardt and G. Breves, Editors. 2010, Enke Verlag: Stuttgart. p. 197-240.
66. Malissen, B., et al., *The induced responses of Innate Immunity*, in *Janeway's Immunobiology 8th edition*, C.A.T. K.J. Murphy, P.; Walport, M.; Mowat, A.; Weaver, C.T., Editor. 2012, Garland Science, Taylor & Francis Group LLC: London & New York. p. 75-125.
67. Bopst, M., et al., *The combined inactivation of tumor necrosis factor and interleukin-6 prevents induction of the major acute phase proteins by endotoxin*. European Journal of Immunology, 1998. **28**(12): p. 4130-7.
68. Ceciliani, F., A. Giordano, and V. Spagnolo, *The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins*. Protein & Peptide Letters, 2002. **9**(3): p. 211-23.
69. Vasanthi, P., G. Nalini, and G. Rajasekhar, *Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review*. APLAR Journal of Rheumatology, 2007. **10**(4): p. 270-274.
70. Osborn, L., et al., *Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes*. Cell, 1989. **59**(6): p. 1203-11.
71. Siebert, S., et al., *Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases*. Pharmacological Reviews, 2015. **67**(2): p. 280-309.
72. Elliott, M.J., et al., *Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha*. Arthritis & Rheumatism, 1993. **36**(12): p. 1681-90.
73. Feldmann, M. and R.N. Maini, *Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases*. Nature Medicine, 2003. **9**(10): p. 1245-50.

74. Smith, J.A., *Update on ankylosing spondylitis: current concepts in pathogenesis*. Current Allergy and Asthma Reports, 2015. **15**(1): p. 489.
75. Molnar, C., et al., *TNF blockers inhibit spinal radiographic progression in ankylosing spondylitis by reducing disease activity: results from the Swiss Clinical Quality Management cohort*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2018. **77**(1): p. 63-69.
76. Maglinte, D.D., et al., *Classification of small bowel Crohn's subtypes based on multimodality imaging*. Radiologic Clinics of North America, 2003. **41**(2): p. 285-303.
77. Bandzar, S., S. Gupta, and M.O. Platt, *Crohn's disease: a review of treatment options and current research*. Cellular Immunology, 2013. **286**(1-2): p. 45-52.
78. Rahman, M.M. and G. McFadden, *Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens*. PLOS Pathogens, 2006. **2**(2): p. e4.
79. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-51.
80. Wright, T.W., et al., *TNF receptor signaling contributes to chemokine secretion, inflammation, and respiratory deficits during Pneumocystis pneumonia*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(4): p. 2511-21.
81. Ehlers, S., *Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2003. **62**(Suppl 2): p. ii37-ii42.
82. Myers, J.A., *Development of Knowledge of Unity of Tuberculosis and of the Portals of Entry of Tubercle Bacilli*. Journal of the History of Medicine and Allied Sciences, 1974. **XXIX**(2): p. 213-228.
83. Dorhoi, A. and S.H. Kaufmann, *Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection*. Seminars in Immunology, 2014. **26**(3): p. 203-9.
84. Benini, J., E.M. Ehlers, and S. Ehlers, *Different types of pulmonary granuloma necrosis in immunocompetent vs. TNFRp55-gene-deficient mice aerogenically infected with highly virulent Mycobacterium avium*. The Journal of Pathology, 1999. **189**(1): p. 127-37.
85. Galloway, J.B., et al., *Risk of skin and soft tissue infections (including shingles) in patients exposed to anti-tumour necrosis factor therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2013. **72**(2): p. 229-34.
86. Baldrige, C.W. and R.W. Gerard, *The extra respiration of phagocytosis*. American Journal of Physiology-Legacy Content, 1932. **103**(1): p. 235-236.
87. Kaul, N. and H.J. Forman, *Activation of NFκB by the respiratory burst of macrophages*. Free Radical Biology and Medicine, 1996. **21**(3): p. 401-405.

88. Yin, Z., et al., *Glutathione S-transferase p elicits protection against H2O2-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases*. *Cancer Research*, 2000. **60**(15): p. 4053-7.
89. Iles, K.E. and H.J. Forman, *Macrophage signaling and respiratory burst*. *Immunologic Research*, 2002. **26**(1-3): p. 95-105.
90. Kaiser, P., *The long view: a bright past, a brighter future? Forty years of chicken immunology pre- and post-genome*. *Avian Pathology*, 2012. **41**(6): p. 511-8.
91. Schneider, K., et al., *Chicken BAFF--a highly conserved cytokine that mediates B cell survival*. *International Immunology*, 2004. **16**(1): p. 139-48.
92. Reddy, S.K., et al., *The BAFF-Interacting receptors of chickens*. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008. **32**(9): p. 1076-1087.
93. Kothlow, S., et al., *Prolonged effect of BAFF on chicken B cell development revealed by RCAS retroviral gene transfer in vivo*. *Molecular Immunology*, 2010. **47**(7-8): p. 1619-28.
94. Abdalla, S.A., et al., *Molecular cloning and characterization of chicken tumor necrosis factor (TNF)-superfamily ligands, CD30L and TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2004. **66**(6): p. 643-50.
95. Scherer, S. and T.W. Gobel, *Characterisation of chicken OX40 and OX40L*. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018. **82**: p. 128-138.
96. Rogers, P.R., et al., *OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells*. *Immunity*, 2001. **15**(3): p. 445-55.
97. Hong, Y.H., et al., *Molecular cloning and characterization of chicken lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor (LITAF)*. *Developmental & Comparative Immunology*, 2006. **30**(10): p. 919-29.
98. Takimoto, T., et al., *Molecular cloning and functional characterizations of chicken TL1A*. *Developmental & Comparative Immunology*, 2005. **29**(10): p. 895-905.
99. Takimoto, T., et al., *Role of chicken TL1A on inflammatory responses and partial characterization of its receptor*. *The Journal of Immunology*, 2008. **180**(12): p. 8327-32.
100. Kaufman, J., et al., *The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex*. *Nature*, 1999. **401**(6756): p. 923-5.
101. Hong, S., et al., *Two types of TNF-alpha exist in teleost fish: phylogeny, expression, and bioactivity analysis of type-II TNF-alpha3 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss**. *The Journal of Immunology*, 2013. **191**(12): p. 5959-72.
102. Soller, J.T., et al., *Comparison of the human and canine cytokines IL-1(alpha/beta) and TNF-alpha to orthologous other mammals*. *Journal of Heredity*, 2007. **98**(5): p. 485-90.

103. McQueen, H.A., G. Siriaco, and A.P. Bird, *Chicken Microchromosomes Are Hyperacetylated, Early Replicating, and Gene Rich*. *Genome Research*, 1998. **8**(6): p. 621-630.
104. Auer, H., et al., *An extended chicken karyotype, including the NOR chromosome*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1987. **45**(3-4): p. 218-21.
105. Stefos, K. and F.E. Arrighi, *Repetitive DNA of Gallus domesticus and its cytological locations*. *Experimental Cell Research*, 1974. **83**(1): p. 9-14.
106. Stubbelfield, E. and J. Oro, *The isolation of specific chicken macrochromosomes by zonal centrifugation and flow sorting*. *Cytometry*, 1982. **2**(5): p. 273-81.
107. Smith, J., et al., *Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes*. *Animal Genetics*, 2000. **31**(2): p. 96-103.
108. Zlotina, A., D. Dedukh, and A. Krasikova, *Amphibian and Avian Karyotype Evolution: Insights from Lampbrush Chromosome Studies*. *Genes*, 2017. **8**(11): p. 311.
109. Bhagya, C.H.W.M.R.C., W.S. Wijesundera Sulochana, and N.P. Hemamali, *Polymerase chain reaction optimization for amplification of Guanine-Cytosine rich templates using buccal cell DNA*. *Indian Journal of Human Genetics*, 2013. **19**(1): p. 78-83.
110. Aird, D., et al., *Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries*. *Genome Biology*, 2011. **12**(2): p. R18.
111. Viswanathan, V.K., K. Krmarik, and N.P. Cianciotto, *Template secondary structure promotes polymerase jumping during PCR amplification*. *Biotechniques*, 1999. **27**(3): p. 508-11.
112. Belotserkovskii, B.P., et al., *Mechanisms and implications of transcription blockage by guanine-rich DNA sequences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(29): p. 12816.
113. Musso, M., et al., *Betaine, Dimethyl Sulfoxide, and 7-Deaza-dGTP, a Powerful Mixture for Amplification of GC-Rich DNA Sequences*. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 2006. **8**(5): p. 544-550.
114. Hron, T., et al., *Hidden genes in birds*. *Genome Biology*, 2015. **16**: p. 164.
115. Farkasova, H., et al., *Identification of a GC-rich leptin gene in chicken*. *Agri Gene*, 2016. **1**: p. 88-92.
116. Bornelov, S., et al., *Correspondence on Lovell et al.: identification of chicken genes previously assumed to be evolutionarily lost*. *Genome Biology*, 2017. **18**(1): p. 112.
117. Brusatte, Stephen L., Jingmai K. O'Connor, and Erich D. Jarvis, *The Origin and Diversification of Birds*. *Current Biology*, 2015. **25**(19): p. R888-R898.
118. Shine, R., *Reptiles*. *Current Biology*, 2013. **23**(6): p. R227-R231.

119. The, M.H.C.s.c., *Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex*. Nature, 1999. **401**: p. 921-23.
120. Weissensteiner, M.H., et al., *Combination of short-read, long-read, and optical mapping assemblies reveals large-scale tandem repeat arrays with population genetic implications*. Genome Research, 2017. **27**(5): p. 697-708.
121. Ruddle, N.H., *Lymphoid neoorganogenesis*. Immunologic Research, 1999. **19**(2): p. 119-125.
122. Abdalla, S.A., et al., *Molecular study on chicken tumor necrosis factor receptor-II and tumor necrosis factor receptor-associated factor-5*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2004. **98**(1-2): p. 31-41.
123. Mahul-Mellier, A.L., et al., *Alix and ALG-2 are involved in tumor necrosis factor receptor 1-induced cell death*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(50): p. 34954-65.
124. Gifford, G.E. and D.A. Flick, *Natural Production and Release of Tumour Necrosis Factor*, in *Ciba Foundation Symposium 131 - Tumour Necrosis Factor and Related Cytotoxins*. 2007, John Wiley & Sons, Ltd. p. 3-20.
125. Garceau, V., et al., *Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products*. Journal of Leukocyte Biology, 2010. **87**(5): p. 753-64.
126. Andersson, U., et al., *Concomitant production of different lymphokines in activated T cells*. European Journal of Immunology, 1988. **18**(12): p. 2081-4.
127. Gobel, T.W., et al., *IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4+ T cells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species*. The Journal of Immunology, 2003. **171**(4): p. 1809-15.
128. Pawelec, G., et al., *Differential secretion of tumor necrosis factor-alpha and granulocyte/macrophage colony-stimulating factors but not interferon-gamma from CD4+ compared to CD8+ human T cell clones*. European Journal of Immunology, 1989. **19**(1): p. 197-200.
129. Schneider, K., et al., *Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties*. European Journal of Biochemistry, 2001. **268**(15): p. 4200-6.
130. Smith, C.K., et al., *Campylobacter jejuni-induced cytokine responses in avian cells*. Infection and Immunity, 2005. **73**(4): p. 2094-100.
131. Lumsden, A.B., J.M. Henderson, and M.H. Kutner, *Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis*. Hepatology, 1988. **8**(2): p. 232-6.
132. Crispe, I.N., *The liver as a lymphoid organ*. Annual Review of Immunology, 2009. **27**: p. 147-63.
133. Gyorfy, Z., et al., *Truncated chicken interleukin-1beta with increased biologic activity*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2003. **23**(5): p. 223-8.

134. NCBI Gene. *TRADD TNFRSF1A associated via death domain [Gallus gallus (chicken)]* Verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/415700> [20.03.2018].
135. NCBI Gene. *RIPK1 receptor interacting serine/threonine kinase 1 [Gallus gallus (chicken)]* Verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=378921> [20.03.2018].
136. NCBI Gene. *TRAF2 TNF receptor associated factor 2 [Gallus gallus (chicken)]* Verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=417287> [20.03.2018].
137. Petsch, D. and F.B. Anspach, *Endotoxin removal from protein solutions*. Journal of Biotechnology, 2000. **76**(2-3): p. 97-119.
138. Magalhaes, P.O., et al., *Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review*. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2007. **10**(3): p. 388-404.
139. Corti, A., et al., *Oligomeric tumour necrosis factor alpha slowly converts into inactive forms at bioactive levels*. Biochemical Journal, 1992. **284** (Pt 3): p. 905-10.
140. van Schie, K.A., et al., *Therapeutic TNF Inhibitors can Differentially Stabilize Trimeric TNF by Inhibiting Monomer Exchange*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 32747.
141. Narhi, L.O. and T. Arakawa, *Dissociation of recombinant tumor necrosis factor-alpha studied by gel permeation chromatography*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987. **147**(2): p. 740-6.
142. Burggraaf, S., et al., *H5N1 infection causes rapid mortality and high cytokine levels in chickens compared to ducks*. Virus Research, 2014. **185**: p. 23-31.

9 DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernd Kaspers für die hervorragende Betreuung und die Überlassung des Dissertationsthemas bedanken. Vor allem möchte ich mich für die wissenschaftliche Unterstützung bedanken, die einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat.

Ein großer Dank geht an meine Arbeitsgruppe. Bei PD. Dr. Sonja Härtle möchte ich mich für die Unterstützung bei methodischen Fragestellungen und für die lehrreichen Stunden während der immunologischen Seminare bedanken. Bei Marina Kohn, Beatrice Schaerer und Dr. Nina Burkhardt möchte ich mich für die große Hilfsbereitschaft, freundschaftliche Unterstützung, ein harmonisches Miteinander und für die technische Expertise bedanken. Für die anfängliche Einarbeitung in erste molekularbiologische Methoden danke ich Dr. Susanne Röhl. Meinen Mitdoktoranden Dr. Anke Staudt und Dr. Larissa Postrak möchte ich für die harmonische Arbeitsatmosphäre danken.

Bei den Mitarbeitern der AG Deeg und AG Göbel möchte ich mich für die kollegiale Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Göbel und PD Dr. Birgit Viertböck für den wissenschaftlichen Austausch. Für den freundschaftlichen und angenehmen Umgang danke ich den Doktoranden der AG Göbel.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Benjamin Schusser, der mich bei molekularbiologischen Techniken und Fragestellungen unterstützt hat. Insbesondere danke ich der Arbeitsgruppe von Jiří Hejnar, Ph.D., welche mich in Prag herzlich aufgenommen haben. Ein besonderer Dank geht an Daniel Elleder, Ph.D., der mir die phylogenetischen Analysetechniken gezeigt hat.

Für die gute Betreuung der Hühner möchte ich mich bei Fritz Meggendorfer, Andreas Schöffmann, Thomas Hoschka und Daniela Hölle bedanken.

Meinen Freunden möchte ich dafür danken, dass sie für mich immer ein offenes Ohr haben und sie mir mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Mein größter Dank geht an meine Familie, insbesondere an meine Eltern, an meine Schwester und meinen Mann. Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich in jeder Lebenslage unterstützen, immer für mich da sind und mir auch das Studium ermöglicht haben. Meiner Schwester möchte ich dafür danken, dass sie immer an mich glaubt und mich jederzeit unterstützt. Unendlich dankbar bin ich meinem Mann Markus für den großen Rückhalt, seine Liebe und sein Verständnis.