

Aus dem
Institut für Immungenetik
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Humboldt-Universität zu Berlin

eingereicht über das
Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Kartierung, Expressionsanalyse und Evolution von Immunrezeptor (CHIR) - Genen beim Huhn (*Gallus gallus domesticus*)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Katja Laun
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2006

Journalnummer: 3015

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hafez. M. Hafez
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Andreas Ziegler
Dritter Prüfer: Prof. Dr. Heike Tönhardt

Descriptorien: immunogenetics; gene mapping; gene expression; fowl; multigene
families; receptors; immunoglobulins

Tag der Promotion: 29.September 2006

„Es gibt nichts in der Natur, was es nicht gibt.“

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	iv
II	Abbildungsverzeichnis.....	viii
III	Tabellenverzeichnis.....	x
IV	Abkürzungsverzeichnis.....	xi
1	Einleitung.....	1
1.1	Merkmale von Immunrezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF).....	1
1.2	Die genomische Organisation des „Leucocyte Receptor Complex“ (LRC).....	3
1.3	Struktur und Funktion der LRC-Gene.....	4
1.3.1	Die „leukocyte immunoglobulin-like“ Rezeptoren (LILRs).....	4
1.3.2	“Killer-Cell Ig-like” Rezeptoren (KIRs).....	7
1.3.3	NKp46.....	8
1.3.4	“Leukocyte-associated Ig-like” Rezeptoren (LAIRs).....	9
1.3.5	Fc Rezeptor für IgA (FCAR).....	10
1.3.6	Glykoprotein VI (GPVI).....	10
1.4	Exon-Intron-Struktur der LRC-Gene.....	10
1.5	Die Evolution der LRC-Gene.....	11
1.6	„Chicken Ig-like“ Rezeptoren (CHIRs) beim Haushuhn.....	12
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	13
2	Material.....	14
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	14
2.2	Enzyme.....	15
2.3	Medien.....	15
2.4	Lösungen und Puffer.....	16
2.4.1	Lösungen für die Isolierung von genomischer DNA.....	16
2.4.2	Lösungen für die Arbeit mit Bakterien.....	16
2.4.3	Lösungen für die Plasmidisolierung.....	17
2.4.4	Elektrophoreselösungen.....	18
2.4.5	Lösungen für die Arbeit mit DNA.....	19
2.4.6	Lösungen für Southern-Blotting und Hybridisierungen.....	19
2.4.7	Lösungen für die Polymerasekettenreaktion.....	20
2.5	Geräte.....	21

2.6	Oligonukleotide (Primer)	21
2.7	Sonden	22
2.8	Vektoren	22
2.9	DNA-Bibliotheken	23
2.10	Gewebe	23
3	Methoden	24
3.1	Probengewinnung und –aufarbeitung	24
3.2	Isolierung genomischer DNA	24
3.3	Bakterienkulturen	25
3.4	Dauerkulturen	25
3.5	Plasmidisolierung	25
3.5.1	(Mini)- Plasmid-Präparation	25
3.5.2	(Midi)-Plasmid-Präparation	25
3.6	Restriktionsendonuklease-Verdau	26
3.7	Fällung von Nukleinsäuren	26
3.7.1	Ethanol-Fällung	26
3.7.2	Isopropanol-Fällung	26
3.8	Gelelektrophorese	27
3.8.1	Agarose-Gelelektrophorese	27
3.8.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
3.8.3	Polyacrylamid-Gel für Sequenzanalysen	28
3.9	Färbung von Agarose- und Polyacrylamidgelen	29
3.10	Southern-Blotting	29
3.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
3.11.1	Photometrische Messung	30
3.11.2	Picogreen-Messung	30
3.12	Radioaktive Markierung und Hybridisierung	30
3.12.1	Sondenherstellung	30
3.12.2	Radioaktive Markierung von Sonden	30
3.12.2.1	Radioaktive Markierung mit dem Megaprime-Kit	30
3.12.2.2	Radioaktive Markierung mit dem StripEZ-labelling-Kit	31
3.12.3	Radioaktive Hybridisierung	32
3.12.4	Signaldetektion	32
3.13	Isolierung von Gesamt-RNA	33

3.14	cDNA-Synthese.....	33
3.15	Polymerase-Kettenreaktion	34
3.16	DNA-Sequenzierung	34
3.17	Entfernung niedermolekularer Stoffe aus DNA-Proben	35
3.17.1	Gelfiltration	35
3.17.2	Dialyse.....	36
3.18	Klonierung.....	36
3.19	Transformation von Bakterienzellen.....	36
3.19.1	Hitzeschock	36
3.19.2	Elektroporation.....	36
3.20	Angewendete Programme	37
4	Ergebnisse und Diskussion	38
4.1	Identifizierung von LRC-homologen Sequenzen bei verschiedenen Spezies.....	38
4.1.1	Radioaktive Hybridisierung mit einer LILR-Sonde.....	38
4.1.2	Radioaktive Hybridisierungen mit Sonden anderer Gene des LRC.....	39
4.1.3	Identifikation von LILR-Homologen beim Huhn	41
4.1.4	Diskussion der Hybridisierungsergebnisse.....	42
4.2	Analyse der genomischen Organisation der CHIR-Gene des Huhns.....	43
4.2.1	Durchmusterung einer Bibliothek mit Klonen genomischer Hühner-DNA.....	43
4.2.2	Sequenzierung ausgewählter BAC-Klone.....	46
4.2.3	Analyse der Sequenzen der CHIR-enthaltenden BAC-Klone.....	46
4.2.3.1	Vergleich der BAC-Sequenzen untereinander	46
4.2.3.2	Vergleich der Fingerprint-Daten mit den Dot-Matrix-Ergebnissen.....	47
4.2.3.3	Detaillierte Sequenzanalyse der BAC-Klone.....	48
4.2.3.4	Genomische Organisation der CHIR-Gene.....	51
4.2.3.5	Detailanalyse der CHIR-Gene.....	53
4.3	Charakterisierung von Transkripten der CHIR-Gene	63
4.3.1	Durchmusterung einer Hühner-cDNA-Bibliothek	64
4.3.2	Herstellung von Hühner-cDNA und deren Verwendung für CHIR-spezifische PCRs	66
4.3.3	„Expressed Sequence Tags“ (ESTs).....	70
4.3.4	Zuordnung der Transkripte zu CHIR-Genen.....	72
4.3.5	Diskussion der CHIR-Transkript-Analyse	73
4.4	Evolutionäre Betrachtungen zur Entwicklung der CHIR-Gene.....	76

4.5	Variabilität der CHIRs	78
4.6	Strukturmodelle für CHIRs	81
4.7	Abschließende Betrachtung und Ausblick	81
4.7.1	Genomische Organisation	82
4.7.2	Struktur und Funktion der CHIRs	85
4.7.3	Evolution der CHIR-Gene	87
5	Zusammenfassung	90
6	Summary	92
7	Referenzen	94
8	Danksagung	104
9	Lebenslauf	106

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Strukturmodell einer Ig-Domäne.....	1
Abb. 2 Schematische Struktur von aktivierenden und inhibitorischen Immunrezeptoren der Ig-SF.....	2
Abb. 3 Genomische Organisation des LRC von Mensch und Maus.....	4
Abb. 4 Schematische Darstellung der Interaktion zwischen KIR2DL1 und LILRB1 mit einem MHC-Klasse-I-Molekül.	6
Abb. 5 Exon-Intron- Struktur einiger ausgewählter LRC-Gene	11
Abb. 6 Hybridisierung einer „Multispezies-Membran“ mit der Sonde ILT1 (LILRA2).....	38
Abb. 7 Multispezies-Membranen, welche mit zwei unterschiedlichen NKp46-Sonden hybridisiert wurden.	39
Abb. 8 Hybridisierung einer Multispezies-Membran mit einer humanen Fc α R-Sonde.....	40
Abb. 9 Hybridisierung einer „Multispezies-Membran“ mit KIR-Sequenzen	41
Abb. 10 Hybridisierungsergebnis der „Makro-Array“-Membran 2 der Huehner-BAC- Bibliothek	44
Abb. 11 Gelelektrophoretische Auftrennung der CHIR-BAC-Klone und deren radioaktive Hybridisierung mit CHIR-A und -B-spezifischen Sonden.....	45
Abb. 12 Überlappung der Klone 112A23 und 58B13.....	47
Abb. 13 Dot-Matrix-Sequenzvergleich eines Teils von BAC 52G8 mit der CHIR-B- cDNA	48
Abb. 14 Exon-Intron-Struktur der CHIR-Gene.	49
Abb. 15 Grafische Darstellung der Organisation der CHIR-Gene innerhalb der BAC- Contigs.....	52
Abb. 16 Aminosäuresequenzvergleich aller 60 funktionellen CHIR-Rezeptoren.....	54
Abb. 17 Schematische Darstellung der Rezeptortypen CHIRA, CHIR1B und CHIR-1C.....	55
Abb. 18 Schematische Darstellung der Intron-Exon-Struktur der CHIRA- und CHIR1B/CHIR1C-Gene.....	56
Abb. 19 Exon-Intron-Struktur für ein CHIRA-Typ-Gen (CHIRA-01).....	57
Abb. 20 Aminosäure-Sequenzvergleich von je zwei Genen pro aktivierendem Rezeptor- Typ	58
Abb. 21 Mögliche Mitglieder der Rezeptor-Gruppen II, die Homologie zu inhibitorischen CHIRs zeigen.	59

Abb. 22 Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur der verschiedenen inhibierenden CHIR-Gen-Typen.....	59
Abb. 23 Exon-Intron-Struktur eines CHIRB-Typ-Gens (<i>CHIRB-01</i>).....	61
Abb. 24 Aminosäuren-Sequenzvergleich von je einem Gen pro inhibierenden Rezeptor-Typ.....	62
Abb. 25 Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur der sequenzierten Bursa-cDNA-Klone.....	65
Abb. 26 Schematische Darstellung der Lage der zur CHIR-Amplifikation verwendeten Primer.....	67
Abb. 27 Schematische Darstellung aller amplifizierten CHIR-cDNA-Sequenzen.....	68
Abb. 28 Schematische Darstellung einiger ausgewählter ESTs.....	71
Abb. 29 Gewebeverteilung der analysierten CHIR-ESTs.....	72
Abb. 30 Sequenzvergleich eines Teils der Gene <i>CHIRC-04</i> und <i>CHIRC-05</i> mit den cDNAs-08 und -24.....	74
Abb. 31 Stammbaum von Exon 5 aller funktionellen CHIR-Gene.....	77
Abb. 32 Sequenzdiversität der CHIRs.....	80
Abb. 33 Strukturmodelle von <i>CHIRC-02</i> basierend auf <i>LILRB1</i> und <i>KIR2DL2</i>	82

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Längen, Contigs und Eigenschaften der sequenzierten CHIR-BAC-Klone.	47
Tab. 2 Liste aller Gene von Gruppe-I-Rezeptoren.	57
Tab. 3 Gene der Rezeptorgruppe II und ihre Zuordnung zu den einzelnen Contigs.	60
Tab. 4 Charakteristika der Pseudogene und Genfragmente	63

IV Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-abhängige Zellzytotoxizität (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
AS	Aminosäure
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CHIR	„Chicken Ig-like“ Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation (Nomenklatur für Oberflächen-Antigene)
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
dATP	Desoxyadenosin 5'-Triphosphat
α [³² P]dCTP	Desoxycytidin 5'- [α - ³² P] Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin 5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin 5'-Triphosphat
DMF	N, N - Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid 5'-Triphosphat
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	1-4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin 5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	Expressed Sequence Tag (Exprimierter Sequenzabschnitt)
EtBr	Ethidiumbromid
FA	Formaldehyd
Fc α R, FCAR	Fc Rezeptor für IgA
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
h	Stunde(n)
HLA	Human Leukocyte Antigen
Ig-SF	Immunglobulin-Superfamilie
ILT	„Immunoglobulin-like Transcript“
IRD	Infra Red Dye
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
ITIM	“Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibitory Motif”
ITAM	“Immunoreceptor Tyrosin-based Activatory Motif”
kb	Kilobasenpaar(e)
KIR	„Killer-Cell Ig-like“ Rezeptor
kV	Kilovolt
LILR	„Leucocyte immunoglobulin-like“ Rezeptor
LIR	„Leucocyte Ig-like“ Rezeptoren
LRC	Leucocyte Receptor Complex
M	molar (Mol/Liter)
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
min	Minute(n)

ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MNZ	Mononukleäre Zellen
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster (Open Reading Frame)
PAC	P1-derived bacterial artificial chromosome
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PIR	“Paired Ig-like” Rezeptoren
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelbasenpaaraustausch)
SSC	Citrat-gepufferte Salzlösung (Standard Saline Citrat)
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
üN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
X-GAL	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

8 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle zuerst bei Prof. Dr. Andreas Ziegler für die Überlassung des Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, seine erfolgreichen Bemühungen, Kooperationspartner für dieses Projekt zu gewinnen und die kritische Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H. M. Hafez bedanke ich mich herzlich für die Durchsicht der Dissertationsschrift und die Vertretung dieser extern angefertigten Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Armin Volz, der als Betreuer dieser Arbeit immer ein offenes Ohr für meine experimentellen und theoretischen Fragen hatte. Durch viele konstruktive und kritische Gespräche hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Stephan Beck und seiner Arbeitsgruppe vom “Wellcome Trust Sanger Institute“ in Großbritannien danke ich für die aufwendige und umfangreiche Sequenzierarbeit; ohne diese wäre die vorliegende Arbeit in diesem Umfang nicht zustande gekommen.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Hagen Wende für fachlich konstruktive Gespräche, Hilfestellungen und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, die jeder auf seine Weise eine große Hilfe insbesondere bei den Tiefen des molekularbiologischen Arbeitens waren. Waltraud Bangel, die immer dafür gesorgt hat, daß mir nie die Pipettenspitzen oder das Medium für die Bakterienkultur ausgingen. Maja Thieck, die mir unter anderem eine ganz neue Sichtweise bezüglich der Bedeutung des Leerwertes einer PCR nahegebracht hat. Zusammen mit Melanie Rühl haben sie mir immer hilfreich bei kleinen und großen Problemen zur Seite gestanden und zusammen mit Britta Radeloff dafür gesorgt, daß der Spaß beim Arbeiten nicht zu kurz kam. Ich bedanke mich für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre, das großartige kollegiale Miteinander und die angenehme Zeit.

Mein herzlichster Dank geht an Maja, die mir den Rücken gestärkt hat, mich immer wieder aufgebaut und zu mir gehalten hat. Sie hat mich durch viele intensive Gespräche und Denkanstöße persönlich unglaublich voran gebracht. Für ihre außergewöhnlichen Bemühungen werde ich ihr immer dankbar sein. Nicht zu vergessen die vielen gemütlichen Abende, bei denen ich bekocht und bewirtet wurde; Du bist eine ganz große Köchin! Ich wünsche Dir und Deiner kleinen Familie alles erdenklich Gute. Sei lieb umarmt!

In diesem Zusammenhang geht auch ein ganz großes Dankeschön an Melli und Bettina, die mich mit Worten und Taten unterstützt und motiviert haben.

Dr. T., was waren das für Zeiten. Schräge Melkmeister, Reggae-Musik morgens um drei, und die prompte Anwendung neu erlernter Wörter, wie zum Beispiel Gynäkomastie. Danke für den einen oder anderen Denkanstoß.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mir die Möglichkeit gegeben haben, mit ihrer steten Unterstützung meinen gewählten beruflichen Weg einzuschlagen und zu realisieren.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Charité Berlin im Rahmen eines Forschungsstipendiums.

9 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Laun
Vorname: Katja
Geburtstag: 04. Januar 1975
Geburtsort: Berlin

SCHULAUSBILDUNG:

1991 - 1994 Lise-Meitner-Oberstufenzentrum in Berlin
- Abschluss: Abitur -

BERUFSAUFBILDUNG:

08/94 - 06/95 Berufsausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin am Lise-Meitner-Oberstufenzentrum in Berlin

STUDIUM:

10/96 - 07/02 Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

Studienbegleitende Praktika:

07/01-08/01 Fleischhygieneamt Teterow, *Mecklenburg-Vorpommern*
09/01-10/01 Groß- und Kleintierpraxis in *Mecklenburg-Vorpommern*
10/01 - 01/02 „Veterinary Clinic for Small and Large Animals“ in Hout Bay, *Südafrika*

PROMOTION:

08/02 – 06/05 Promotion am Institut für Immungenetik

BERUFLICHE TÄTIGKEIT:

06/95 - 10/96 Biologisch-technische Assistentin am Institut für experimentelle Onkologie und Transplantationsmedizin

10/96 - 07/01 studentische Hilfskraft am Institut für Immungenetik

seit 07/05 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité – Universitätsmedizin Berlin

Hiermit bestätige ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 08. März 2006

Katja Laun