

## 5 Zusammenfassung

*Chicken Ig-like* Rezeptoren (CHIR) kodieren für Oberflächenproteine der Immunglobulin-Superfamilie und sind in einem zusammenhängenden Cluster auf einem Minichromosom des Huhns lokalisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die genomische Organisation dieses Genclusters im Detail untersucht. Hierzu wurde zunächst eine Bibliothek künstlicher Bakterienchromosomen (BAC) nach CHIR-positiven Klonen durchmustert. Die gewonnenen Klone wurden dann im Rahmen einer Kooperation durch das Wellcome Trust Sanger Institut sequenziert. Die sich anschließende detaillierte Analyse der erhaltenen Sequenzen zeigte, daß CHIRs eine Multigenfamilie bilden, die aus mindestens 60 funktionellen Genen besteht. Darüber hinaus wurden 43 Pseudogene und Genfragmente identifiziert. Die funktionellen Gene lassen sich vier unterschiedlichen Rezeptortypen zuordnen, die aktivierende Eigenschaften besitzen (CHIRA), inhibitorisch wirken (CHIRB) oder bifunktionelle Signaltransduktionsmotive tragen (CHIR1C, CHIRC). Innerhalb dieser vier Gruppen gibt es noch einige Subtypen, so daß sieben unterschiedliche Varianten beschrieben werden konnten. CHIRs besitzen eine oder zwei Ig-Domänen in ihrem extrazellulären, N-terminalen Bereich und können einen kurzen oder langen zytoplasmatischen Schwanz tragen, der inhibitorische Signaltransduktionsmotive enthalten kann.

Um zu untersuchen, ob die gefundenen CHIR-Gene *in vivo* exprimiert werden, wurde eine umfangreiche Transkriptanalyse durchgeführt. Hierzu wurden sowohl CHIR-cDNAs mittels RT-PCR amplifiziert, als auch Transkripte einer bestehenden Bibliothek untersucht und Datenbanken nach CHIR-ESTs durchsucht. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den CHIR-Genen verglichen. Es konnte festgestellt werden, daß eine Vielzahl von CHIR-Genen abgelesen wird. Keines der Transkripte zeigte jedoch vollständige Sequenzübereinstimmung mit einem der untersuchten Gene, woraus geschlossen werden kann, daß die CHIR-Gene hochpolymorph sind. Die Gewebeverteilung der Transkripte zeigte zudem, daß CHIRs vor allem auf Zellen des Immunsystems exprimiert werden.

Die zusammenhängende Organisation der CHIR-Gene legt deren Entstehung aus einem gemeinsamen Vorläufer-Gen durch wiederholte Gen-Duplikationen nahe. Um diese Theorie näher zu untersuchen, wurden Stammbäume der CHIR-Gene erstellt. Die Analyse dieser Stammbäume zeigte, daß die einzelnen funktionellen Gruppen untereinander eine erhöhte Homologie im Vergleich zu Mitgliedern anderer Gruppen zeigen. Dies deutet darauf hin, daß die einzelnen Gruppen jeweils aus einem Vorläufer entstanden und dann in evolutionär jüngerer Vergangenheit expandiert sind. Ähnliches wurde auch für KIRs gezeigt. Sie stellen zu-

---

sammen mit LILRs und NKp46 die evolutionär nächsten Verwandten der CHIRs bei Säugern dar. Aus den strukturellen, funktionellen und evolutionären Ähnlichkeiten wurde daher abgeleitet, daß es sich bei den CHIR-Clustern um eine zum LRC synthetische Region handelt.

Die Funktion und die Liganden der CHIR-Proteine konnten bisher nicht aufgeklärt werden. Aus diesem Grund wurden Analysen zur Variabilität und Strukturvorhersage der CHIR-Proteine durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Proteinsequenzen der CHIR-Proteine hochvariabel sind. Diese Variabilität legt zusammen mit den Strukturvorhersagen nahe, daß es sich bei dem Liganden der CHIRs ebenfalls um polymorphe Moleküle handeln muß. Die Parallelen zu Rezeptoren des Säuger-LRC, wie den KIRs oder LILRs, lassen außerdem vermuten, daß es sich bei dem Liganden um MHC-Klasse-I-Moleküle des Huhns handeln könnte. Mögliche Aspekte der Funktion von CHIR-Proteinen bei der Immunantwort des Huhns wurden diskutiert.

Die Untersuchung der einzelnen CHIRs, ihrer Liganden, der zell-spezifischen Expression und ihrer Funktion wird es in Zukunft erlauben, die Rolle der CHIRs bei der Immunantwort des Huhns aufzuklären. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Struktur, Variabilität, genomischer Organisation und Evolution sollten eine gute Grundlage für die weitergehenden Untersuchungen sein.

## 6 Summary

### Mapping, expression-analysis and evolution of chicken (*Gallus gallus domesticus*) - immunoreceptor (CHIR) -genes

*Chicken Ig-like* receptors (CHIRs) are cell-surface-proteins belonging to the immunoglobulin-superfamily. All CHIR genes are encoded in one cluster on a chicken-minichromosome. In this study, the genomic organization of this genecluster was examined in detail. First, a library of bacterial artificial chromosomes (BACs) was screened for clones containing CHIR sequences. The resulting clones were then sequenced in collaboration by the Wellcome Trust Sanger Institute. The subsequent detailed analysis of the sequences identified CHIRs as a multigene-family, including at least 60 functional genes. Furthermore, 43 pseudogenes and gene-fragments were found. The functional CHIR genes can be classified into four different types of receptors: Activatory (CHIRA), inhibitory (CHIRB) or bifunctional (CHIR1C, CHIRC) receptors. Within these groups there are also some subtypes, thus seven different types of receptors could be defined. CHIRs have one or two Ig-domains in the extracellular N-terminal region. The stalk and transmembrane region is followed by either a short or a long cytoplasmic tail, possibly bearing inhibitory signaltransduction motifs.

To examine whether the identified CHIR-genes are expressed *in vivo*, an extensive transcriptional analysis has been performed using sequences from three different sources: i) cDNAs amplified using RT-PCR; ii) transcripts from a cDNA library and iii) transcripts obtained by homology searches in a EST database. The various CHIR transcripts have been aligned with the CHIR-genes. Many cDNAs showed very high homology to the CHIR genes, indicating that a multiplicity of these genes is expressed. Nonetheless no transcript could be found which showed complete sequence identity to one of the CHIR genes. Therefore CHIR-genes are likely to be highly polymorphic. The tissue distribution of the ESTs showed that CHIRs are primarily expressed in cells of the immune system.

The contiguous organization and high homology of the CHIR-genes suggests that the cluster developed by repeated duplication of a common ancestral gene. To analyze this in more detail, phylogenetic trees of the CHIR-genes have been calculated. The resulting trees showed that members of functional groups have increased homology amongst each other, whereas reduced homology could be observed between members of different functional groups. It is therefore tempting to speculate that ancestors of the different functional groups developed

---

early in the evolution of the CHIR cluster from a single gene and then expanded independently of each other evolutionarily more recently. A similar process had been shown for KIRs. Together with LILRs and NKp46, KIRs form the evolutionarily closest mammalian relatives to CHIRs. Because of the structural, functional and evolutionary similarities it is very likely, that the CHIR cluster is the LRC-syntenic region of the chicken.

The function and ligands of the CHIR proteins are so far unknown. In order to gain more insight into the possible function of the CHIRs, the variability was analyzed together with predictions of the possible structure of the CHIR proteins. The results showed that the protein sequences of CHIRs are highly variable and that the most variable residues lie within the presumptive ligand binding interface. This suggests that the CHIR-ligands are probably also polymorphic molecules like the CHIRs. Given the similarity to the mammalian LRC receptor-families KIRs and LILRs, it can be speculated that the ligands of the CHIRs could be the MHC-class-I-molecules of the chicken. The functional relevance of this finding in the immune response of the chicken has been discussed.

In the future, the detailed analysis of the individual CHIRs, their ligands, their cell-specific expression and their function will allow for the elucidation of their role in immune responses in the chicken. The data gained in this study, including structure, variability, genomic organization and evolution, ought to be a good basis for further analysis of this interesting gene family.