

## 1 Einleitung

### 1.1 Merkmale von Immunrezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF)

Proteine der IgSF besitzen in ihrer extrazellulären Domäne sogenannte Immunglobulin (Ig)-Domänen. Hierbei handelt es sich um zwei über eine Disulfid-Brücke verbundene antiparallele  $\beta$ -Faltblätter. Ig-Domänen werden nach Sequenzmustern und der Domänenlänge in die Subfamilien V, C1, C2 und I unterteilt (Williams AF 1987; Williams und Barclay 1988; Harpaz und Chothia 1994). Die Struktur einer Ig-Domäne zeigt Abb. 1.

Neben ihrer starken Verbreitung im Immunsystem spielen Proteine mit Ig-Domänen auch in anderen Organsystemen (z.B. dem Nervensystem) eine wichtige Rolle. Es wird deshalb vermutet, daß ihre ursprüngliche Funktion nicht die Antigenerkennung und -Beseitigung war, sondern daß sich IgSF-Domänen entwickelten, um generell Interaktionen an der Zelloberfläche zu vermitteln (Williams und Barclay 1988). In Übereinstimmung mit dieser Theorie findet man Proteine mit Ig-Domänen

nicht nur bei Vertebraten, sondern auch bei Insekten bis hin zu Schwämmen, wo sie verschiedenste Funktionen wahrnehmen (du Pasquier L. 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Immunrezeptoren des Huhns und deren evolutionär verwandte Rezeptoren bei anderen Spezies können neben den für die Interaktion notwendigen extrazellulären Ig-Domänen auch durch Merkmale ihrer Transmembrandomäne sowie der zytoplasmatischen Domäne in Gruppen eingeteilt werden. Sowohl die Transmembrandomäne als auch die zytoplasmatische Domäne können Sequenzmotive enthalten, die für die Signaltransduktion und damit die Funktion der Rezeptoren von essentieller Bedeutung sind.

So haben aktivierend wirkende Rezeptoren eine kurze zytoplasmatische Domäne und eine basische Aminosäure (Arginin oder Lysin) in ihrer Transmembrandomäne. Diese erlaubt die

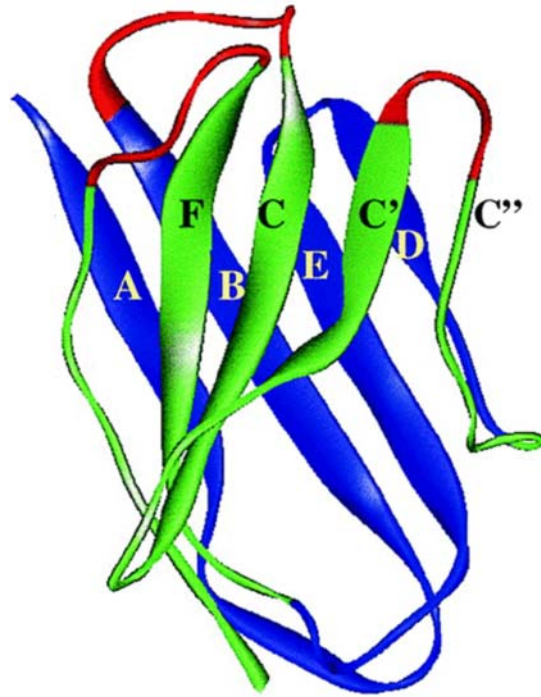
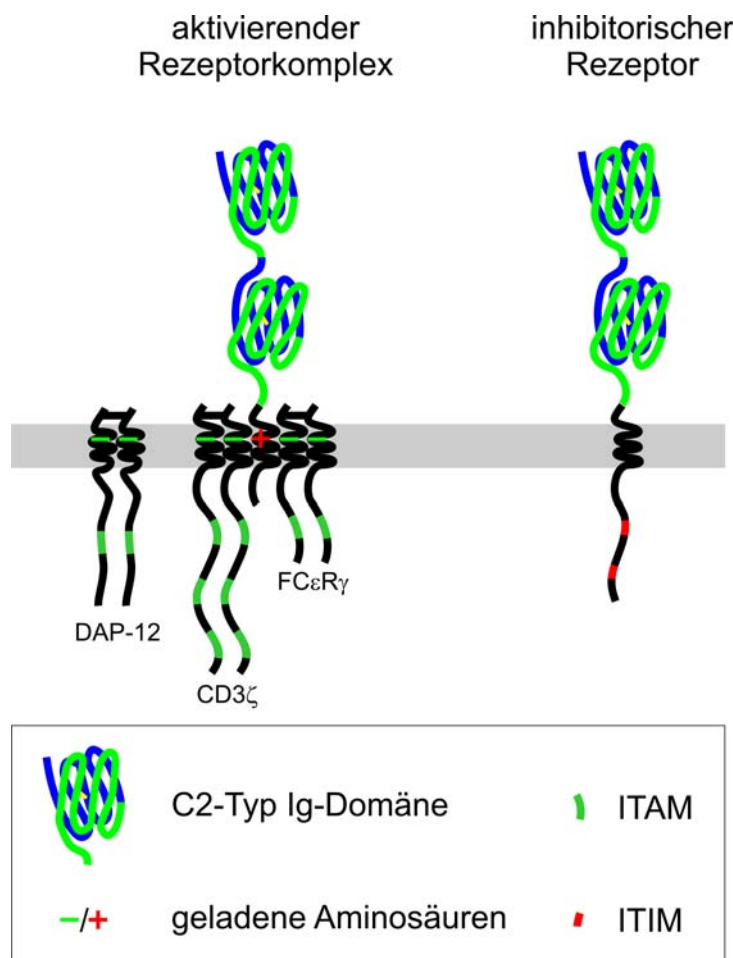


Abb. 1 Strukturmodell einer Ig-Domäne  
Eine Ig-Domäne (in diesem Fall vom V-Typ) besteht aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die durch eine Disulfid-Brücke (hier zwischen Kette F und B) miteinander verbunden sind. Abbildung modifiziert nach Barclay (Barclay 1999).

Interaktion mit Adaptermolekülen, die ihrerseits eine saure Aminosäure in der Transmembrandomäne tragen (Abb. 2). Die verschiedenen Adaptermoleküle, die als kovalent verbundene Homo- oder Heterodimere exprimiert werden, weisen Tyrosin-haltige Signaltransduktionsmotive in ihrer zytoplasmatischen Domäne auf. Hierbei kann es sich zum Beispiel um die Immunrezeptor-Tyrosin-basierten aktivierenden Motive (ITAM) handeln, die bei den Adaptermolekülen CD3 $\zeta$ , Fc $\epsilon$ R $\gamma$ , und DAP12 gefunden wurden (Tomasello et. al. 2000), oder auch um das bei DAP10 vorkommende YxxM-Motiv (Lanier et. al. 1998; Wu et. al. 2000). In jedem Fall führt die Aktivierung der Rezeptoren zur Phosphorylierung des Tyrosinrestes der Signaltransduktionsmotive und damit zur Anlagerung und Aktivierung von Src Homologie 2 (SH2)-Domänen enthaltenden Protein-Tyrosinkinasen wie Syk und ZAP-70 (ITAM) oder der p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) (Songyang et. al. 1993). Diese Kinasen führen dann über verschiedene Signaltransduktionswege zur Aktivierung der Zelle (Blery et. al. 2000; Bakker et. al. 2000; Djeu et. al. 2002).

Im Gegensatz zu aktivierenden Rezeptoren findet man bei inhibitorischen Rezeptoren in



aller Regel keine geladene Aminosäure in der Transmembrandomäne. Zusätzlich haben inhibitorische Rezeptoren eine lange zytoplasmatische Domäne. Diese Domäne enthält ein oder mehrere tyrosin-haltige Motive, die als ‚Immunreceptor Tyrosin-based Inhibitory Motif‘ (ITIM) bezeichnet werden. Die ITIM-Sequenz besteht aus sechs Aminosäuren: V/I/L/S-X-Y-XX-V/L, wobei die Schrägstriche bedeuten, daß eine dieser Aminosäuren auftreten kann, X ist eine beliebige Aminosäure (Ravetch und Lanier 2000). Durch die Bindung der Liganden auf der Zielzelle kommt es zur Zusammenlagerung der ITIM-haltigen Rezeptoren, was zur Phosphorylierung der Ty-

Abb. 2 Schematische Struktur von aktivierenden und inhibitorischen Immunrezeptoren der Ig-SF.

rosinreste durch Kinasen der Src-Familie führt. Die phosphorylierten ITIMs dienen dann als Bindungsstellen für SH2-Domänen enthaltende Phosphatasen, wie SHIP, SHP-1 und SHP-2 (Unkeless und Jin 1997). Diese Phosphatasen wiederum dephosphorylieren verschiedene Glieder der aktivierenden Signaltransduktionkette inklusive der ITAM-Motive der Adapterproteine von aktivierenden Rezeptoren (siehe oben) und verhindern dadurch die Entstehung von aktivierenden Signalen. Die grundsätzliche Struktur von inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren (mit ihren Adapterproteinen), die in dieser Arbeit von Interesse sind, ist in Abb. 2 dargestellt.

„Chicken Ig-like“ Rezeptoren (CHIRs) zeigen hohe Homologie zu den „Paired Ig-like Receptors“ (PIRs) der Maus (Kubagawa et. al. 1997) und zu den „immunoglobulin-like transcripts“ (ILTs) des Menschen (Samaridis und Colonna 1997), die auch als „leukocyte Ig-like receptors“ (LIR) (Cosman et. al. 1997) oder „monocyte/macrophage inhibitory receptors“ (MIR) bezeichnet werden (Wagtman et. al. 1997). Im Folgenden wird die Bezeichnung „leukocyte immunoglobulin-like“ Rezeptoren (LILR) für diese Familie verwendet, da dies die jetzt vereinheitlichte und anerkannte Nomenklatur für diese Gene ist (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/lilr.html>). Sowohl PIRs als auch LILRs sind in einem Multigenkomplex kodiert, der als „Leukocyte Receptor Complex“ (LRC) bezeichnet wird und zumindest bei Primaten und der Maus identifiziert werden konnte (Wagtman et. al. 1997; Wende et. al. 1999; Wilson et. al. 2000). Es liegt daher nahe anzunehmen, daß CHIRs Teil eines solchen Komplexes beim Huhn sind. Im Folgenden soll daher näher auf diesen Komplex und die Funktion der darin kodierten Rezeptoren eingegangen werden.

## **1.2 Die genomische Organisation des „Leucocyte Receptor Complex“ (LRC)**

Die genomische Organisation des Leucocyte Receptor Complex ist besonders beim Menschen eingehend analysiert worden (Lander et. al. 2001). Er umfaßt eine Länge von etwa einem Megabasenpaar auf Chromosom 19q13.4 und enthält bis zu 31 Gene, die für Proteine der Ig-Superfamilie kodieren (Wagtman et. al. 1997; Wende et. al. 1999; Wende et. al. 2000; Wilson et. al. 2000; Volz et. al. 2001; Trowsdale et. al. 2001). Diese Gene lassen sich überwiegend zwei Multigen-Familien zuordnen. Bei den Mitgliedern der Multigenfamilien handelt es sich einerseits um 13 der bereits oben erwähnten LILR-Gene (Wende et. al. 2000) und zum anderen um bis zu 13 „killer-cell Ig-like receptors“ (KIRs) (Trowsdale 2001). Beide Multigenfamilien liegen in Clustern vor und sind von weiteren Genen der Ig-SF flankiert. Bei diesen handelt es sich um das „platelet collagen receptor glycoprotein VI“ (*GPVI*) (Ezumi et. al.

2000a), die „leucocyte-associated Ig-like receptors“ (LAIRs) (Meyaard et. al. 1997), den Rezeptor für den Fc-Teil von IgA (*FCAR*) (de Wit et. al. 1995) und um *NKp46* (*NCRI*) (Pessino et. al. 1998).

Die Organisation des syntenen Chromosomenabschnitts der Maus ist der des humanen LRC sehr ähnlich. So bilden die LILR-homologen PIRs ähnlich wie im humanen LRC zwei voneinander getrennte Cluster. Außerdem sind auch im LRC der Maus das *NKp46*-Gen (*Ly94*), *GPVI* sowie LAIR-ähnliche Sequenzen vorhanden. Auffällig ist jedoch, daß der LRC der Maus kein *FCAR*-Gen und keine KIR-homologen Gene enthält, was unter anderem darauf hindeutet, daß zumindest KIRs stammesgeschichtlich jünger sind als LILRs und PIRs (Volz et. al. 2001) (siehe auch Abschnitt 1.3.2 und Abschnitt 1.3.5 bezüglich *FCAR*). Die genomische Organisation des LRC von Mensch und Maus ist in Abb. 3 dargestellt.

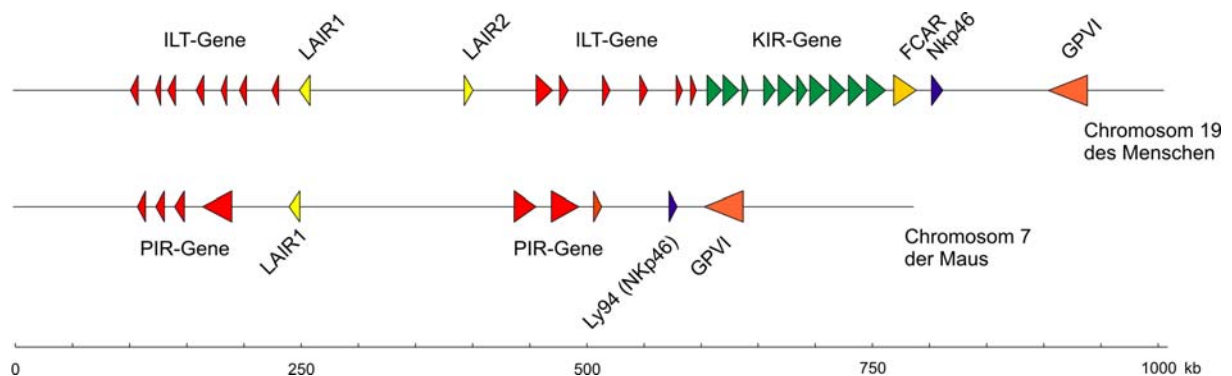


Abb. 3 Genomische Organisation des LRC von Mensch und Maus.

Die syntenen chromosomalen Regionen des Menschen (oben) und der Maus (unten) sind zusammen mit den darin enthaltenen Genen maßstabsgetreu dargestellt. Die Spitzen der Gensymbole zeigen zum 3'-Ende der Gene, die Länge entspricht der Länge des jeweiligen Gens. Abbildung modifiziert nach H. Wende (Wende H. 2004).

### 1.3 Struktur und Funktion der LRC-Gene

Im den folgenden Abschnitten soll auf die Struktur und Funktion von verschiedenen LRC-Genen eingegangen und die evolutionäre Verwandtschaft zu anderen Spezies herausgestellt werden.

#### 1.3.1 Die „leukocyte immunoglobulin-like“ Rezeptoren (LILRs)

Die Mitglieder der LILR-Genfamilie kodieren für eine Gruppe von 13 membranständigen Rezeptoren, die extrazellulär zwei oder vier Ig-Domänen tragen. Es wurden sowohl inhibierende Vertreter mit ITIMs in der zyttoplasmatischen Domäne, als auch aktivierende Rezeptoren mit einer geladenen Aminosäure in der Transmembrandomäne beschrieben (Samaridis und Colonna 1997; Borges et. al. 1997; Cosman et. al. 1997; Wagtmann et. al. 1997). LILRs werden vorwiegend auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert; viele kommen auf Mono-

zyten, Makrophagen und dendritischen Zellen vor, einige werden auch von Subpopulationen von B-, T- und NK-Zellen exprimiert (Colonna et. al. 2000).

Die Funktion der meisten LILRs konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Von zwei inhibierenden Vertretern (LILRB1 und LILRB2) ist jedoch bekannt, daß sie an eine breite Palette von Haupthistokompatibilitätskomplex (‘major histocompatibility complex’ [MHC]; bzw. beim Menschen ‘human leukocyte antigen’ [HLA] )-Klasse-I-Molekülen binden (Colonna et. al. 1997; Cosman et. al. 1997). Die Funktion der durch MHC-Gene kodierten Proteine besteht in der Bindung von eigenen und fremden Peptiden, die auf der Zelloberfläche den T-Lymphozyten präsentiert werden und dadurch eine Immunantwort auslösen (Bjorkman und Parham 1990). LILRB1 und LILRB2 binden mit unterschiedlichen Affinitäten die  $\alpha 3$ -Domäne der HLA-Moleküle und dabei bevorzugt HLA-G. Beide LILRs sind zudem in der Lage mit CD8 um HLA-Klasse-I-Moleküle zu kompetitieren, was darauf hindeuten könnte, daß zumindest LILRB1 modulierenden Einfluß auf die Immunantwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat (Shiroishi et. al. 2003). Interessanterweise bindet der LILRB1-Rezeptor auch an das vom humanen Cytomegalievirus (HCMV) kodierte HLA-Klasse-I-homologe Protein UL18, und das mit höherer Affinität als an HLA-Klasse-I-Moleküle (Cosman et. al. 1997; Vitale et. al. 1999). Es ist schon länger bekannt, daß die Expression bestimmter viraler Proteine dazu führt, daß die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen vermindert wird. Auf diese Weise können viral infizierte Zellen der Erkennung durch zytotoxische T-Zellen entgehen (Barnes und Grundy 1992; Beersma et. al. 1993; Yamashita et. al. 1993). Das Fehlen der MHC-Klasse-I-Moleküle macht solche Zellen jedoch zum Ziel von NK-Zellen, die durch das Fehlen von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche aktiviert werden (siehe Abschnitt 1.3.2). Es wird deshalb angenommen, daß die zusätzliche Expression von UL18 eine Art Ersatz für die fehlenden MHC-Moleküle darstellt und über die LILRB1- Interaktion zur Inhibition der Abwehrmaßnahmen führt (Cosman et. al. 1999). Dazu muss der Rezeptor nicht zwangsläufig von den Effektorzellen, in diesem Fall NK-Zellen, exprimiert werden. So ist zum Beispiel bekannt, daß die Expression von UL18 auch die Aktivierung von Monozyten und damit deren Zytokinausschüttung unterdrückt. Diese Zytokine führen normalerweise indirekt zur Aktivierung von NK-Zellen, die daraufhin IFN- $\gamma$  ausschütten. Nicht-aktivierte NK-Zellen ohne IFN- $\gamma$  zeigen aber keine Zytotoxizität gegenüber virusinfizierten Zellen (Borges und Cosman 2000), woraus folgt, daß die Expression von UL18 ein effektiver Weg ist, um der Bekämpfung durch das Immunsystem des Wirts zu entgehen.

LILRs sind weit weniger polymorph als zum Beispiel die weiter unten beschriebenen ‘killer cell Ig-like’ Rezeptoren (KIR). Es ist anzunehmen, daß dies unter anderem durch die Er-

kennung eines relativ konservierten Ligandenepitops, der  $\alpha 3$ -Domäne und von  $\beta 2m$  von HLA-Klasse-I-Molekülen bei LILRB1 und LILRB2 (Willcox et. al. 2003a), bedingt ist (siehe Abb. 4). Diese Interaktion mit einem sehr konservativen Bereich der HLA-Klasse-I-Moleküle könnte auch zur evolutionären Konservierung der LILR-Familie beigetragen haben. So ist es erstaunlich, daß auch die LILR-homologen Rezeptoren der Maus, die PIRs, in der Lage sind HLA-Klasse-I-Moleküle zu binden (Kollnberger et. al. 2004a).

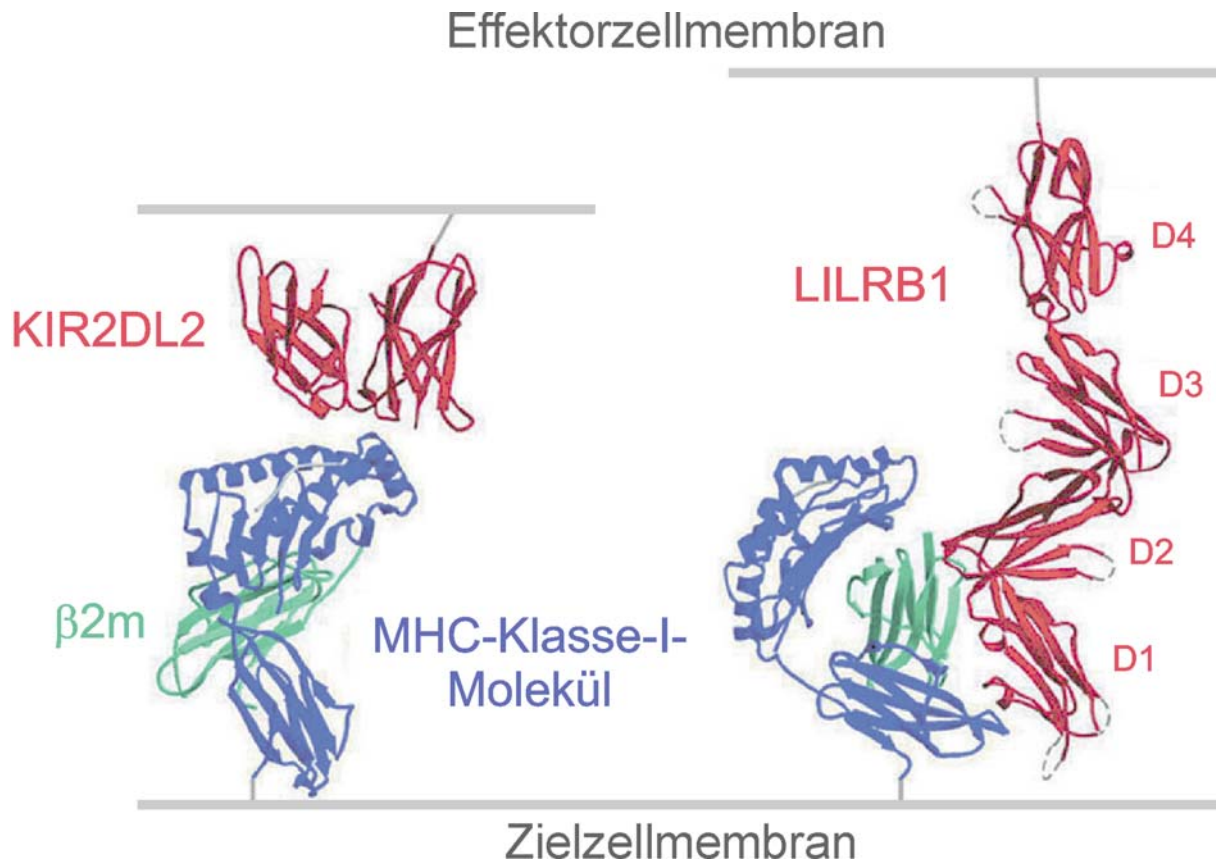


Abb. 4 Schematische Darstellung der Interaktion zwischen KIR2DL1 und LILRB1 mit einem MHC-Klasse-I-Molekül. KIRs binden MHC-Klasse-I-Moleküle orthogonal über die beiden  $\alpha$ -Helices, die die Peptidbindungsfurche bilden. Sie interagieren also mit polymorphen Epitopen. Im Gegensatz dazu bindet LILRB1 die  $\alpha 3$ -Domäne und  $\beta 2$ -Mikroglobulin ( $\beta 2m$ ), also relativ konservierte Ligandenepitope. Abbildung modifiziert nach (Willcox et. al. 2003b)

Die am besten charakterisierten LILR-homologen Gene bei anderen Spezies sind die „paired Ig-like“ Rezeptoren (PIR) bei Maus und Ratte (Kubagawa et. al. 1997; Dennis, Jr. et. al. 1999). Sie besitzen im Vergleich zu LILRs sechs Ig-Domänen in ihrer extrazellulären Domäne, wobei die beiden distalen Domänen offensichtlich durch Duplikation der Domänen 3 und 4 entstanden sind. Es gibt mehrere aktivierende Rezeptoren (PIR-A) mit kurzer zytoplasmatischer Domäne und geladener Aminosäure in der Transmembrandomäne und einen inhibitorischen Rezeptor (PIR-B), mit einer langen zytoplasmatischen Domäne und ITIMs.

PIRs werden auf B-Zellen und Zellen der myeloischen Reihe exprimiert (Kubagawa et. al. 1997). Im Gegensatz zur Maus, in der PIR-A und -B immer zusammen exprimiert werden, kann PIR-A der Ratte auf B-Zellen und PIR-B allein auf NK-Zellen nachgewiesen werden (Dennis, Jr. et. al. 1999). Das läßt vermuten, daß sich die Funktion der Rezeptoren bei Maus und Ratte seit ihrem letzten gemeinsamen Vorfahren (vor ca. 20 Mio. Jahren) in unterschiedliche Richtungen entwickelt haben. Das *PIR-B*-Gen, welches für den einzigen inhibierenden PIR der Maus kodiert, wurde experimentell inaktiviert. Bei den dabei erzeugten *PIR-B*<sup>-/-</sup>-Mäusen ist die B-Zellreifung gestört. Zusätzlich kommt es in diesen Mäusen zu einer erhöhten T-Helfer-Zellantwort (Ujike et. al. 2002).

Die Liganden der PIRs konnten bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Es handelt sich jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit um MHC-Klasse-I-Moleküle, da in transgenen Mäusen gezeigt werden konnte, daß PIRs mit HLA-B27 und HLA-G interagieren können (Liang et. al. 2002; Kollnberger et. al. 2004b). Es liegt also nahe, daß auch die Funktionen von LILRs und PIRs ähnlich sind.

### 1.3.2 “Killer-Cell Ig-like” Rezeptoren (KIRs)

KIRs sind Rezeptoren, die fast ausschließlich auf NK-Zellen exprimiert werden (Colonna und Samaridis 1995). NK-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem und sind in der Lage, Zielzellen beim ersten Kontakt ohne vorherige zeitaufwendige Selektionsprozesse zu töten. Ziel eines Angriffes kann eine virus- (Tay et. al. 1998), bakterien- (Vankayalapati et. al. 2002), oder parasitenbefallene Zelle (Scott und Trinchieri 1995) sein. In vielen Fällen erfolgt der Angriff auf eine infizierte Zielzelle aufgrund der reduzierten oder fehlenden Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen, wie es z.B. bei viralen Infektionen häufig der Fall ist. Nach der „missing-self“-Hypothese werden durch NK-Zellen alle Zellen abgetötet, die eine veränderte Expression von Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche aufweisen (Ljunggren und Karre 1990). Mitte der 90iger Jahre konnte gezeigt werden, daß inhibierende KIRs für dieses Phänomen verantwortlich sind (Colonna und Samaridis 1995). KIRs gehören wie die LILRs zur Ig-Superfamilie und besitzen zwei oder drei Ig-Domänen im extrazellulären Bereich. Sie haben entweder einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz mit einer geladenen Aminosäure in der Transmembrandomäne (Lysin) und wirken aktivierend, oder sie tragen einen langen zytoplasmatischen Schwanz mit ITIMs und wirken inhibierend (Martin et. al. 2002).

Alle bisher identifizierten Liganden von KIRs sind HLA-Klasse-I-Moleküle. Teilweise zeigen einzelne KIRs klare Spezifitäten für bestimmte HLA-Klasse-I-Moleküle, andere differenzieren zwischen verschiedenen Allelgruppen eines Gens, die jeweils ein gemeinsames Epi-



top tragen (Lanier 1998). Die Kristallstruktur eines Komplexes aus KIR2DL2 und einem HLA-Cw3-Molekül (siehe Abb. 4) zeigt, daß der KIR fast orthogonal über die  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Helices des HLA-Moleküls bindet (Boyington et. al. 2000). Im Gegensatz zu LILRs interagieren KIRs also mit polymorphen Epitopen des HLA-Moleküls, die auch das gebundene Peptid mit beinhalten können (Hansasuta et. al. 2004; Stewart-Jones et. al. 2005).

Interagieren inhibitorische KIRs mit ihren Liganden auf der Zielzelle, kommt es zur Phosphorylierung der zytoplasmatischen ITIMs, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird (siehe Abschnitt 1.1), die letztlich in die Blockierung der NK-Zellaktivität mündet. Diese Inaktivierung führt zur Inhibition sowohl der Zytotoxizität als auch der Zytokinproduktion (Moretta und Moretta 1997). NK-Zellen können gleichzeitig auch aktivierende KIRs exprimieren, deren Ligandenbindung zur Aktivierung der NK-Zelle führt, wenn nicht gleichzeitig inhibierende Signale (z.B. von anderen KIRs) diese Aktivierung unterdrücken (Moretta et. al. 1995). Auf diese Weise kann die verringerte Expression einzelner HLA-Moleküle auch dann zur Aktivierung von NK-Zellen führen, wenn zum Beispiel der Ligand eines inhibitorischen KIRs herunterreguliert wird, während HLA-Klasse-I-Moleküle für aktivierende Rezeptoren weiterhin exprimiert werden (Binstadt et. al. 1997; Long et. al. 2001).

KIRs werden von einer Multigen-Familie auf Chromosom 19q13.4 kodiert (Suto et. al. 1996). Die KIR-Gene zeigen untereinander eine hohe Homologie, sind andererseits jedoch sehr polymorph. Die zugehörigen Liganden, die HLA-Klasse-I-Moleküle, dienen dem Schutz des Organismus vor Infektionen. Da sie durch sich schnell verändernde Pathogene unter einem starken evolutionären Druck stehen, sind sie extrem divergent (Dawkins et. al. 1999). Um weiterhin mit den schnell evolvierenden HLA-Klasse-I-Molekülen interagieren zu können, müssen sich auch die KIRs entsprechend schnell weiterentwickeln. Hier zeigt sich ein schönes Beispiel der Koevolution zweier miteinander wechselwirkender Gruppen von Molekülen (Guethlein et. al. 2002).

KIRs sind stammesgeschichtlich jünger als LILRs (Wilson et. al. 2000). Eine größere Zahl von KIR-Genen wurde bei verschiedenen Primaten gefunden. Darüber hinaus wurden kürzlich KIR-homologe Gene beim Rind entdeckt (McQueen et. al. 2002; Storset et. al. 2003). Das Pferd besitzt ebenfalls KIR-ähnliche Gene, die jedoch scheinbar ihre Funktionalität verloren haben (Takahashi et. al. 2004).

### 1.3.3 NKp46

Ein weiterer LRC-Rezeptor ist NKp46. Er gehört zur Gruppe der „Natural Cytotoxicity Receptors“ (NCRs), die außer NKp46 noch NKp44 und NKp30 beinhaltet (Moretta et. al. 2001).



Die Expression aller NCRs ist strikt auf NK-Zellen beschränkt und die Dichte ihrer Expression auf der Zelloberfläche korreliert mit der Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber ihren Zielzellen. Die Bindung der NCRs führt zu einer starken Aktivierung der NK-vermittelten Zytolyse (Biassoni et. al. 2001). NKp46 scheint einer der wichtigsten aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen zu sein. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß die Anfälligkeit einiger Patienten gegenüber Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis* mit einer verringerten NKp46-Expression korreliert und daß bei einigen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie die Funktion von NKp46 eingeschränkt ist (Vankayalapati et. al. 2002; Costello et. al. 2002). Außerdem kann die natürliche Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber einer Reihe von Tumorzelllinien durch Maskierung von NKp46 mit einem Antikörper blockiert werden (Pessino et. al. 1998). Der Liganden der NCRs konnten bisher nicht identifiziert werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß es sich um evolutionär sehr konservierte Oberflächenstrukturen handelt, da NK-Zellen, die NKp46 exprimieren, sogar durch den Kontakt mit bestimmten Zelllinien der Maus aktiviert werden können. Es konnte hierbei gezeigt werden, daß dieser Effekt über NKp46 vermittelt wird (Pessino et. al. 1998).

NKp46 besitzt zwei Ig-Domänen im extrazellulären Anteil, eine kurze zytoplasmatische Domäne und eine geladene Aminosäure in der Transmembrandomäne. Es handelt sich um einen evolutionär konservierten Rezeptor, der bisher neben Primaten auch in Maus, Ratte und Rind identifiziert werden konnte (Biassoni et. al. 1999; Falco et. al. 1999; Storset et. al. 2004).

#### **1.3.4 “Leukocyte-associated Ig-like” Rezeptoren (LAIRs)**

“Leukocyte-associated Ig-like“ Rezeptoren (LAIR) sind eng mit LILRs verwandte Rezeptoren der Ig-SF. Beim Menschen wurden zwei LAIR-Gene beschrieben (siehe Abb. 3). LAIR1 ist ein inhibitorischer Rezeptor, der eine Ig-Domäne besitzt und auf fast allen Blutzellen exprimiert wird (Meyaard et. al. 1997). LAIR1 interagiert mit dem „Epithelial Cellular Adhesion Molecule“ (Ep-CAM), welches auf vielen einschichtigen Epithelien des Menschen exprimiert wird. Aufgrund des Liganden wird eine Rolle von LAIR1 bei der Kontrolle überschießender Entzündungsreaktionen diskutiert (Meyaard et. al. 2001). LAIR2 ist ein lösliches Protein, ebenfalls mit nur einer Ig-Domäne, dessen Funktion und Ligand unbekannt sind.

LAIRs scheinen evolutionär weniger stark konserviert zu sein, als zum Beispiel *NKp46*. Das kürzlich identifizierte LAIR-Homolog der Maus zeigt nur 40% Sequenzidentität zum humanen LAIR1 (Lebbink et. al. 2004). Das Gen ist jedoch im LRC der Maus an einem zum humanen *LAIR1* syntenen Ort lokalisiert (siehe Abb. 3).

### 1.3.5 Fc Rezeptor für IgA (FCAR)

Das Gen des Fc-Rezeptors für IgA (*FCAR*) liegt ebenfalls im LRC. Der FCAR besitzt zwei Ig-Domänen, einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz und eine geladene Aminosäure in der Transmembrandomäne (de Wit et. al. 1995). Es handelt sich um einen aktivierenden Rezeptor, der mit der FcR $\gamma$ -Kette assoziiert. Der humane FCAR wird von Neutrophilen, Eosinophilen, Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und Kupfferschen Sternzellen exprimiert. Er bindet beide IgA-Subklassen mit geringer Affinität (Monteiro und van De Winkel 2003).

Der LRC der Maus enthält kein FCAR-Gen; dies ist insofern bemerkenswert, da kürzlich gezeigt werden konnte, daß ein funktionelles FCAR-Gen im LRC der Ratte vorhanden ist (Maruoka et. al. 2004). Eine Hybridisierung von genomischer Maus-DNA mit einer FCAR-Sonde der Ratte ergab, daß das Mausgenom tatsächlich kein homologes Gen enthält. Offensichtlich ist das FCAR-Gen im Verlauf der Entwicklung der Maus verloren gegangen. Neben der Ratte wurde ein FCAR-Gen auch beim Rind gefunden und liegt dort wie bei der Ratte im LRC (Morton et. al. 2004).

### 1.3.6 Glykoprotein VI (GPVI)

Wie der FCAR besitzt auch das *GPVI* zwei Ig-Domänen, eine kurze zytoplasmatische Domäne und eine geladene Aminosäure in der Transmembrandomäne (Clemetson et. al. 1999; Ezumi et. al. 2000b). Es ist ein aktivierender Kollagenrezeptor, der auf Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert wird (Kehrel et. al. 1998). GPVI ist wie FCAR nicht-kovalent mit der FcR $\gamma$ -Kette assoziiert. Zumindest in der Maus konnte gezeigt werden, daß diese FcR $\gamma$ -Kette für die Aktivierung der Thrombozyten durch GPVI unerlässlich ist (Nieswandt et. al. 2000).

GPVI ist ein evolutionär relativ konserviertes Molekül, das zwischen Mensch und Maus 60% Aminosäuresequenzübereinstimmung zeigt.

## 1.4 Exon-Intron-Struktur der LRC-Gene

Die Vielzahl der Gene des LRC ist sehr wahrscheinlich durch wiederholte Duplikation eines Vorläufers entstanden (Volz et. al. 2001). Dies spiegelt sich auch in der Exon-Intron-Organisation der LRC-Gene wider (Abb. 5). So werden die einzelnen Ig-Domänen von separaten Exonen kodiert. Dieser modulare Aufbau der extrazellulären Domänen erlaubte es vermutlich, durch Austausch, Addition oder Deletion einzelner Ig-Domänen zur Entstehung dieser Vielzahl von funktionell unterschiedlichen Rezeptoren beizutragen. Typisch ist auch, daß

das Signalpeptid bei allen Rezeptoren von zwei kleinen Exonen und die Transmembrandomäne von einem einzelnen Exon kodiert wird. Die Organisation der Exone, die 3' der Ig-Domänen gelegen sind, ist bei den stammesgeschichtlich älteren Rezeptoren (LILR, *NKp46* und *GPVI*) weitgehend konserviert. Die stammesgeschichtlich jüngeren inhibitorischen Rezeptoren weisen im Gegensatz dazu eine deutlich höhere Variabilität im Aufbau der zytoplasmatischen Domäne auf (Volz et. al. 2001). Allgemein läßt sich feststellen, daß die Exon-Intron-Struktur der zytoplasmatischen Domäne deutlich variabler ist als der Aufbau der für den extrazellulären Bereich kodierenden Domänen, da hier nur die Anzahl der Ig-Domänen und deren Sequenz variiert. Die Längen der Intronsequenzen sind innerhalb der einzelnen Rezeptorfamilien konserviert, variieren jedoch zwischen den verschiedenen LRC-Genen deutlich. Hochkonserviert sind hingegen die Exon-Intron-Grenzen (Trowsdale et. al. 2001). Interessant ist auch, daß die Transkriptionsrichtung der Rezeptoren bis auf eine große Inversion

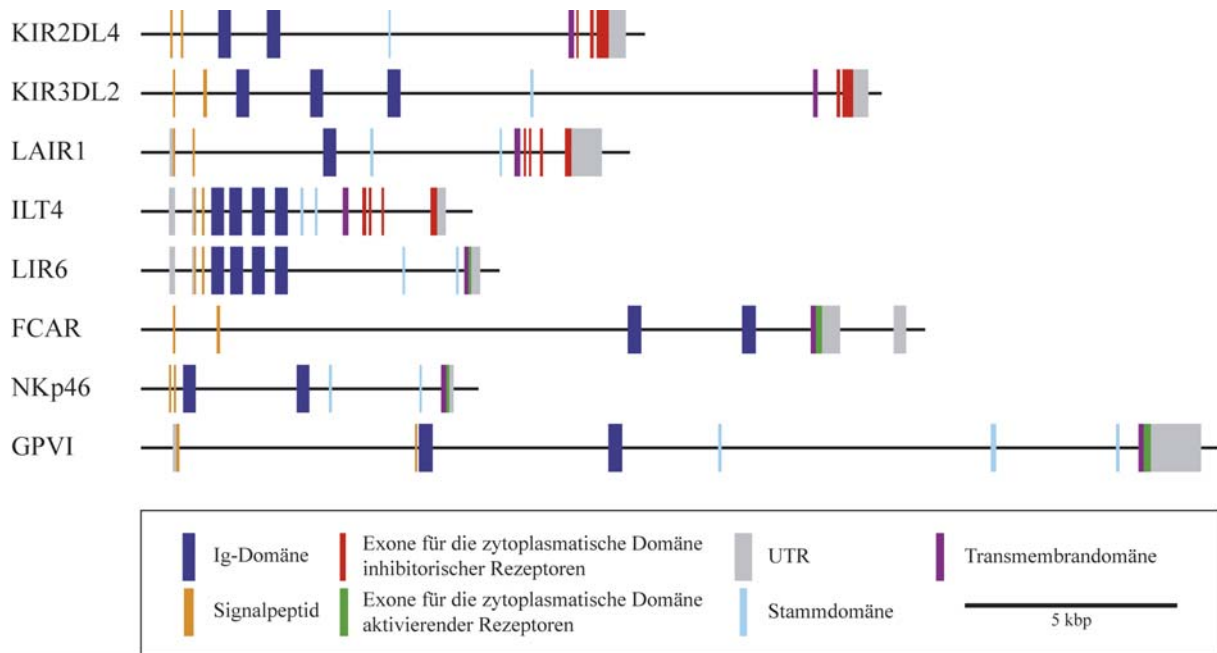


Abb. 5 Exon-Intron- Struktur einiger ausgewählter LRC-Gene

des zentromeren Teils des LRC bei allen Rezeptoren gleich ist (Wende et. al. 2000). Diese Tandem-Organisation ist vermutlich das Ergebnis der verstärkten Expansion von KIR- und LILR-Genen, die bei dieser Konfiguration zum Beispiel durch ungleiches ‚crossing over‘ entstehen kann (Wilson et. al. 2000).

### 1.5 Die Evolution der LRC-Gene

Die räumliche Nähe und Anordnung der Gene des LRC auf einem relativ kurzen Chromosomenabschnitt legt nahe, daß sich diese Gene aus einem gemeinsamen Vorläufergen durch wiederholte Duplikation und Diversifikation entwickelt haben (Volz et. al. 2001; Trowsdale

et. al. 2001; Martin et. al. 2002). Durch den Vergleich der Genkomplexe bei verschiedenen Tierarten lassen sich Rückschlüsse auf das Alter der Gene ziehen. Auf diese Weise wurde zum Beispiel abgeschätzt, daß LILR-Vorläufer älter und KIR-Gene jünger als ca. 100 Millionen Jahre sein müssen, da die entsprechenden homologen Gene bei der Maus vorhanden sind oder fehlen (Wilson et. al. 2000). Weiterhin ist es möglich herauszufinden, wie die LRC-Rezeptoren bei verschiedenen Arten evolvierten, um den Anforderungen an die Abwehr von Pathogenen gewachsen zu sein. Bei den jüngsten LRC-Genen, den KIR-Rezeptoren, zeigt sich zum Beispiel, daß die verschiedenen Tierarten die Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen durch ganz unterschiedliche Kombinationen aus Rezeptoren bewerkstelligen. So besitzen Mäuse keine KIR-Gene; stattdessen wird die Funktion der KIRs hier von den lectinartigen Ly49-Genen übernommen. Andere Arten, wie zum Beispiel Pferd und Rind, haben sowohl funktionelle KIR- als auch funktionelle Ly49-Gene (McQueen et. al. 2002; Takahashi et. al. 2004).

Bei der Untersuchung verschiedener Individuen einer Art zeigt sich zudem, daß der Prozeß der Anpassung an die Umwelt nicht abgeschlossen ist, sondern immer noch anhält. So sind die KIR-Gene des Menschen sehr polymorph und ihre Anzahl kann von Haplotyp zu Haplotyp drastisch schwanken (Wilson et. al. 2000). Gleichzeitig sind im LRC Rezeptoren kodiert, die sich im Laufe der Evolution nur langsam entwickelten und die in ähnlicher Form und Funktion bei den meisten untersuchten Säugetieren vorkommen.

Bei der Diversifikation von Genen ist die Genduplikation ein evolutionärer Vorteil. Während ein Gen weiterhin die ursprüngliche Funktion zur Verfügung stellt, kann sich die Kopie weiterentwickeln und neue Funktionen übernehmen. Für das einzelne Individuum mag dies nur zu einem geringen Selektionsvorteil führen. Das Vorhandensein eines zusätzlichen Rezeptors kann aber zu einem – wenn auch teilweise nur schwachen – Selektionsvorteil für die Gesamtpopulation führen (Ohno 1970).

## **1.6 „Chicken Ig-like“ Rezeptoren (CHIRs) beim Haushuhn**

Die in dieser Arbeit untersuchten CHIRs stellen sehr wahrscheinlich Homologe zu LRC-Rezeptoren dar. Beim Huhn (*Gallus gallus domesticus*) waren zu Beginn meiner Arbeit zwei Rezeptoren charakterisiert, die als CHIR-A und CHIR-B bezeichnet wurden (Dennis, Jr. et. al. 2000). Dabei enthält die Transmembranregion von CHIR-A einen Histidin-Rest und der dazugehörige zytoplasmatische Schwanz ist relativ kurz; man nimmt deshalb an, daß es sich hierbei um einen Rezeptor vom aktivierenden Typ handelt. CHIR-B hingegen besitzt eine Transmembranregion, die keine basischen Aminosäuren aufweist, dafür aber eine lange zyto-

plasmatische Domäne, welche zwei ITIMs enthält. CHIR-B kann somit zu den hemmenden Rezeptoren gerechnet werden. Beide Rezeptoren besitzen zwei Ig-Domänen vom C-2-Typ im der extrazellulären Bereich.

Die genomische Organisation, d.h. die Anordnung der Gene auf einem oder mehreren Chromosomenabschnitten war beim Huhn noch unbekannt. Auch gab es noch keine Erkenntnisse über die Anzahl der CHIR-Gene, obwohl Voruntersuchungen nahe legten, daß zahlreiche weitere CHIRs existieren sollten (Volz et. al. 2001).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Am Institut für Immungenetik wurde die Organisation der LILR-Gene auf Chromosom 19 des Menschen untersucht, um die evolutionäre Beziehung der Rezeptoren untereinander und die Entstehung der als „ILT-Cluster“ bezeichneten genomischen Region besser zu verstehen. Dieser Gencluster beinhaltet alle bekannten Gene der LILR-Familie beim Menschen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde auch nach vergleichbaren Genen in verschiedenen Tierarten gesucht, um die Evolution dieser Rezeptoren nachvollziehen zu können. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen legen beim Huhn (*Gallus gallus domesticus*) die Existenz von mehr als den bisher beschriebenen zwei CHIR-Genen nahe (Volz et. al. 2001).

Ziel der Doktorarbeit sollte es daher sein, mehr über die Anzahl, Identität und genomische Organisation der CHIRs herauszufinden. Hierzu sollte eine CHIR-spezifische Sonde anhand der bereits bekannten, publizierten Sequenzen generiert werden. Diese DNA-Sonde sollte anschließend zur Durchmusterung einer "bacterial artificial chromosome" (BAC)-Bibliothek mit genomischer DNA des Huhnes verwendet werden, um Klone zu identifizieren, die Gene der CHIR-Familie beinhalten. Die verifizierten Klone sollten dann im Rahmen einer Kooperation durch das Wellcome Trust Sanger Institut (Hinxton, Großbritannien) sequenziert werden, um die genaue Analyse der chromosomalen Regionen zu ermöglichen. Des weiteren stand für Expressionsanalysen eine Bursa-cDNA-Bibliothek des Haushuhnes zur Verfügung, um exprimierte CHIRs zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Im Rahmen der Expressionsanalysen sollte zusätzlich RT-PCR mit degenerierten CHIR-spezifischen Primern auf Gesamt-RNA von Hühner-Leukozyten durchgeführt werden. Aus den erhaltenen Ergebnissen sollte neben der Identifikation neuer CHIRs auch auf das Expressionsmuster der Rezeptoren geschlossen werden. Die Gesamtheit der erhaltenen Sequenzinformationen sollte es ermöglichen, die Variabilität und die Evolution der CHIRs im Detail zu untersuchen.