

## ZÁRÓJELENTÉS

A SLAM családba tartozó receptorokat eredetileg T-, B- és NK sejtek felszínén írták le, mára azonban világossá vált, hogy a család több tagja jelentős szerepet játszik a különböző immunkompetens sejtek fejlődésének szabályozásában (lineage commitment) (1). A receptorcsalád tagjait (SLAMF1 (CD150, SLAM), SLAMF2 (CD48), SLAMF3 (CD229, Ly9), SLAMF4 (CD244, 2B4), SLAMF5 (CD84), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAMF7 (CD319, CRACC/CS1), SLAMF8 (BLAME) és SLAMF9 (SF2001)) kódoló gének az egyes kromoszómán találhatóak és az általuk elfoglalt kromoszómaszakasz része a szisztémás Lupusz (SLE) kialakulásával kapcsolt kromoszóma szakasznak (1-3). A SLAM-receptorok aktivációja (a CD48/2B4 receptorpár kivételével, melyek egymás ligandumai) homoasszociáció útján történik, ami kétirányú szignalizációt indít el a kapcsolatba lépő sejtekben. Vagyis például egy dendritikus sejt (DS)/T sejt interakció során a DS-en expresszált SLAM a T-sejten expresszált SLAM-hoz kapcsolódik. Jelen pályázat keretében a CD84 receptor dendritikus sejt-funkciókra gyakorolt hatását vizsgáltuk, a következő indokok alapján. (1) A CD84 receptor már a CD34+ hematopoetikus őssejtek mintegy 30%-án megjelenik és szinte minden immunkompetens sejtben expresszálódik, funkciójáról azonban keveset tudunk. (2) A DS-ek, mint a leghatékonyabb professzionális antigén prezentáló sejtek alapvető szerepet játszanak az adaptív immunválasz minden fázisának szabályozásában. (3) A CD84 receptor szükséges a T-sejt/B-sejt adhézió fenntartásához és a megfelelő kommunikációhoz a follicularis T-helper sejtek és a differenciálódó B-sejtek között. Utóbbinak elengedhetetlen szerepe van a hatékony memóriaválasz kialakulásában. A follicularis T-helper sejtek naív T sejtekből történő differenciációja szintén DS-függő folyamat. A fentiek alapján a CD84 DS-T-sejt kommunikációban betöltött szerepének tisztázása különösen fontos. (4) A DS-T-sejt és/vagy a DS-B-sejt kölcsönhatás szabályozásával a CD84-nek nagy valószínűséggel szerepe lehet az SLE-ben megfigyelhető autoimmun sejtek kialakulásában is.

### **EREDMÉNYEK:**

A SLAM receptorok elleni antitestek többsége nem agonista, hanem éppen ellenkezőleg, antagonistikus hatású, vagyis blokkolja a sejt-sejt interakció során kialakuló homoasszociáció indukálta aktivációt (4). Ezért a CD84 receptor funkcionális vizsgálatára antitestek alkalmazása helyett két, egymást kiegészítő in vitro rendszert állítottunk be. Az egyikben a CD84/CD84 homoasszociáció CD40-ligand- vagy lipopoliszacharid-indukálta aktivációra gyakorolt hatását vizsgáltuk CD84 molekulát expresszáló vagy nem expresszáló L929

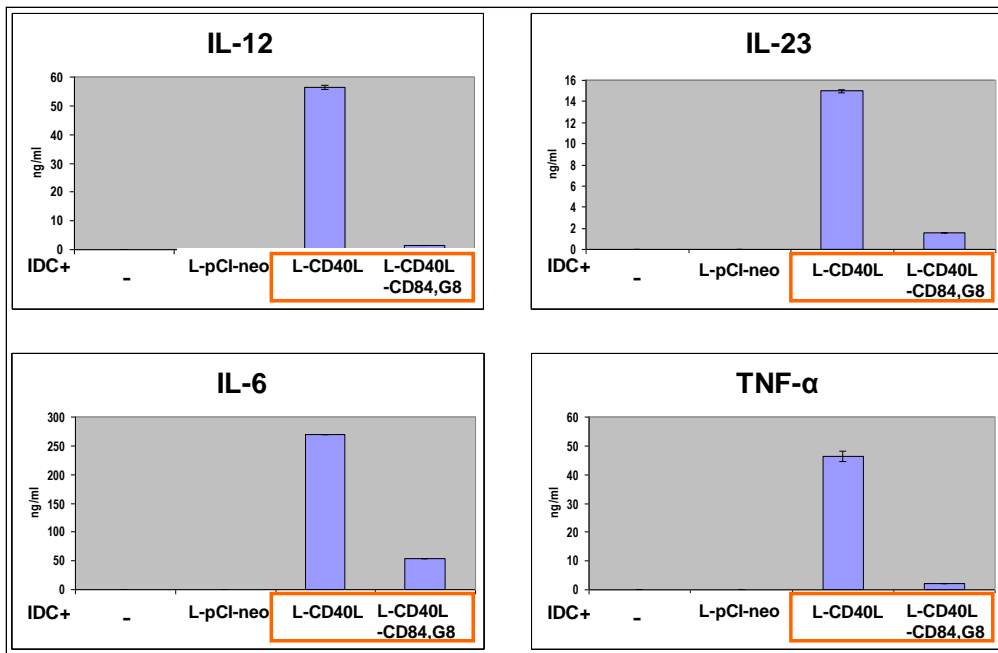
fibroblaszt sejtek és DS-ek közös tenyészetében. A másikban a CD84 expresszió hiányának következményeit vizsgáltuk RNS-interferencia segítségével. Mindkét rendszerben a CD84 receptor DS-T sejt interakciót (CD40 receptor aktiváció CD40-ligand által) vagy az antibakteriális választ (LPS általi aktiváció) moduláló hatását modelleztük.

## **1. A CD84-CD84 „homofil” interakció DS-funkciókra gyakorolt hatásainak vizsgálata**

### **1.1. A CD84 hatása a CD40-indukálta citokintermelésre DS-ekben**

A DS/ T-sejt adhézió során a DS-eken expresszált CD40 receptor és az aktivált T-sejteken megjelenő CD40 ligandum (CD40L) interakciója a DS-ekben aktivációs szignálokat indukál. Ezen szignálokat a többi, egyidőben expresszálódó receptor modulálni képes. A DS /T-sejt interakció során bekövetkező CD84 homoasszociáció hatásának vizsgálatára humán CD40L-ot és CD84 receptort együtt expresszáló L929 sejtklónokat (CD40L/L/CD84) hoztunk létre. Kontrollként L929-CD40L (CD40L/L) és L929 (L-pCI-neo) sejteket használtunk. Az L929 sejtek nem fejeznek ki endogén CD84-et.

A citokintermelés vizsgálatára az éretlen dendritikus sejteket CD40L-ot, valamint CD40L-ot és CD84 receptort expresszáló L-sejtekkel tartottuk közös kultúrában. 24 óra elteltével citokin ELISA segítségével mértük a termelt citokinek mennyiségét. Eredményeink szerint a CD40-indukálta IL-12, IL-23, IL-6 és TNF- $\alpha$  termelést a CD84/CD84 homoasszociáció jelentősen csökkenti. Az IL-12, IL-23 és TNF- $\alpha$  esetében az összes vizsgált donorban hasonló mértékű, mintegy 90%-os gátlást tapasztaltunk, míg az IL-6 esetében donoronként változó mértékű, 50-90%-os gátlást figyelhattunk meg. Eredményeink azt mutatják, hogy DS-ekben a CD84 receptor a CD40 indukálta jelátviteli utakat a SLAMF1 receptorhoz hasonlóan modulálja. A SLAM és CD84 receptorok tehát humán monocita-eredetű DS-eken valószínűleg szinergisztikus hatásúak és részt vesznek a Th1 válasz intenzitásának csökkentésében. (1. Ábra)



**1. ábra. A CD84/CD84 interakció hatása a dendritikus sejtek CD40-indukálta gyulladásos citokin termelésére.** Az éretlen dendritikus sejteket transzfektáns L-sejtekkel aktiváltuk, majd citokin ELISA segítségével mértük a termelt citokinek mennyiségét. Negatív kontrollként üres vektorral transzfektált (L-pCI-neo) sejtekkel aktivált és aktiválatlan DS-eket használtunk. Az adatok az IL-23 esetében három, az IL-6 és TNF- $\alpha$  esetében hét, az IL-12-re vonatkozóan pedig tíz önkéntes véradó véreből szeparált sejtekkel végzett kísérletekből származnak. iDC-immature dendritic cell

## 1.2. A CD84 hatása a TLR4-indukálta citokintermelésre DS-ekben

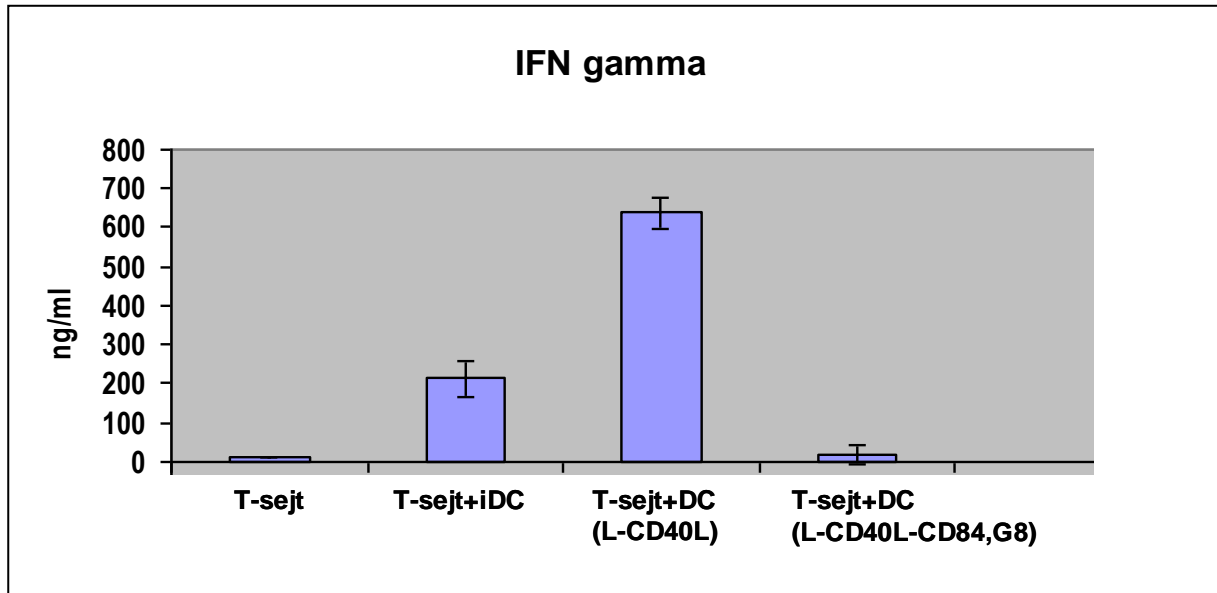
A SLAM receptor esetében kimutattuk, hogy a CD40-indukálta gyulladásos citokin termelést a SLAM egyidejű szignalizációja gátolja, míg a TLR-4-indukálta gyulladásos citokin termelést fokozza (4). A CD84 TLR4-közvetített szignálokra kifejtett hatását dendritikus sejtek és L929 sejtek, illetve CD84-et kifejező L929 sejtek LPS-sel aktivált tenyészeiben vizsgáltuk. Ebben a rendszerben a CD84 szignalizáció a DS-ek TLR4-indukálta gyulladásos citokin termelését nem befolyásolja (nincs ábrázolva).

## 1.3. A CD84/CD84 interakció hatása a naiv CD4<sup>+</sup> T-sejtek differenciációjára

### 1.3.1. A CD84/CD84 interakció hatása a Th1 irányú polarizációra

A gyulladásos citokinek jelenléte döntően befolyásolja a kialakuló immunválasz jellegét. A DS-ek által termelt TNF- $\alpha$  és különösen az IL-12 elősegíti a naiv CD4<sup>+</sup> T-sejtek IFN- $\gamma$ -termelő Th1 effektor sejtekké történő differenciálódását. Feltételezésünk szerint a CD84 interakció az inflammatorikus mediátorok termelésének gátlásán keresztül korlátozza az IFN- $\gamma$ -termelő Th1 sejtek differenciálódását. Hipotézisünk vizsgálatára in vitro T-sejt polarizációs rendszert állítottunk be. (2. **Ábra**). A CD40L-mal, valamint CD40L+CD84 receptorral a korábban leírt

módon aktivált dendritikus sejteket CD11c-specifikus ellenanyag felhasználásával, áramlási citometria segítségével izoláltuk, majd CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> allogén naiv T-sejtekkel tenyésztettük közös kultúrában. Az 5. napon a T-sejteket humán CD3-specifikus ellenanyaggal fedett lemezekon aktiváltuk. A 6. napon citokin ELISA segítségével mértük a termelt IFN- $\gamma$  mennyiségét, mely citokin jelenléte differenciált Th1 effektor sejtek jelenlétére utal.



**2. Ábra. A CD84/CD84 interakció hatása a T-sejt polarizációra.** A transzfektáns L-sejtekkel aktivált és áramlási citometriával szeparált DS-eket allogén, naiv T-sejtekkel tartottuk ko-kultúrában. Az ötödik napon anti-humán CD3-mal fedett lemezekon aktiváltuk a T-sejteket 24 óráig. A termelt IFN- $\gamma$  mennyiségét az 5. és a 6. napon is meghatároztuk. Mindkét esetben arányaiban hasonló eredményt kaptunk. Az ábrán  $\alpha$ -human CD3-mal aktivált T-sejtek felülúszóiból ELISA-val mért IFN- $\gamma$  mennyiségi összehasonlítása látható. iDC-immature dendritic cell, DC-dendritic cell

Várakozásainknak megfelelően a CD40L-mal és CD84 receptorral egyidejűleg aktivált DS-ek – inflammatorikus mediátorok hiányában – csökkent Th1 polarizáló képességgel rendelkeznek (**2. Ábra**). Az ELISA-val kapott eredményeket CBA-val (cytokine bead array) is megerősítettük (nincs ábrázolva). Autológ rendszerben a fentiekkel azonos eredményeket kaptunk.

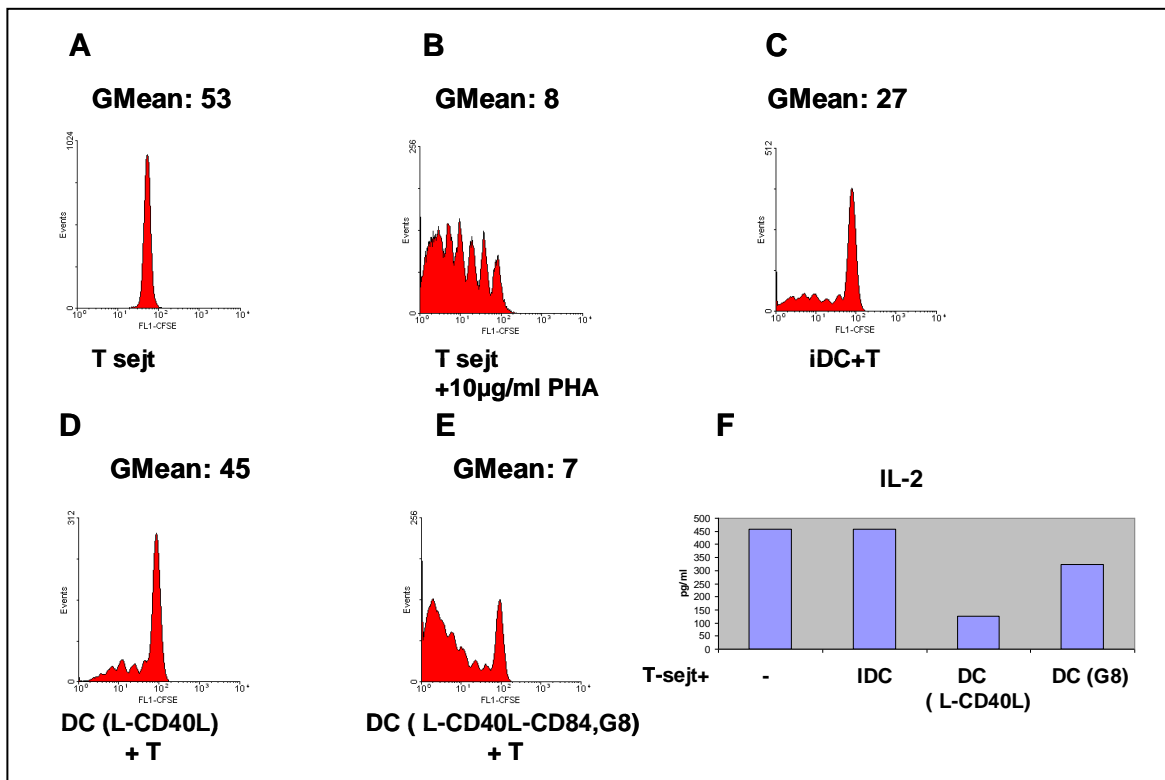
### 1.3.2. A CD84 szignálok hatása a Th2, Th17, illetve Tr1 irányú polarizációra

A fenti adatok fényében felmerült a kérdés, hogy a CD84 szignálok jelenlétében aktivált dendritikus sejtek a Th1 irányú polarizáció gátlása mellett indukálják-e egyéb Th alpopulációkba tartozó sejtek differenciálódását. Az IL-12 és a TNF- $\alpha$  szekréció csökkenése közvetve a Th2 irányú polarizációnak kedvez. Ennek ellenére a jellegzetes Th2 citokinek (IL-4, IL-5) szekréciójának fokozódását nem sikerült detektálnunk (nincs ábrázolva). A TGF- $\beta$  és az IL-1 $\beta$  mellett a TNF- $\alpha$ , IL-6 és IL-23 jelenléte elősegíti a Th17 sejtek fejlődését. Mivel CD84 interakció hatására az utóbbi citokinek szekréciója jelentősen csökken, valamint a

CD40L-mal aktivált DS-ekkel stimulált T-sejtek felülúszóiban található IL-17 mennyisége CD84 szignálok hatására nem változik (nincs ábrázolva) arra következtethetünk, hogy a CD84 receptor szignalizációja nem segíti elő a Th17 sejtek differenciációját. Mivel a CD40L-mal aktivált DS-ekkel összehasonlítva a CD84 szignálok jelenlétében aktivált DS-ekkel stimulált T-sejtek felülúszóiban csökken az IL-10 mennyisége, így az adott rendszerben IL-10 szekretáló Tr1 sejtek differenciációja is valószínűtlen.

#### 1.4. A CD84-CD84 interakció hatása a T-sejt proliferációra

A T-sejt proliferáció vizsgálatának céljából az előzőekben leírt módon aktivált és áramlási citometriával izolált dendritikus sejteket CFSE-vel intracellulárisan jelölt CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> allogén, naiv T-sejtekkel közös kultúrában tartottuk. Az 5. napon áramlási citometriával határoztuk meg a proliferáció mértékét. Hwu és munkatársai kimutatták(5), hogy **szolubilis** CD40L jelenlétében a DS-ek által indukált allogén T-sejt proliferáció gátolt. Saját kísérleteink, melyekben a CD40 receptort sejt felszínen expresszált CD40L-al aktiváltuk hasonló eredménnyel jártak. A CD40L által aktivált DS-ek jelenlétében még az éretlen DS-ek által aktivált T-sejt kultúrákénál is kisebb mértékű proliferációt mértünk, ami arra utal, hogy az L-sejtek felszínen expresszált CD40L általi aktiváció gátolja a naiv, allogén T-sejtek DS-indukálta expanszióját (**3/C és D. Ábra**). Ezzel egyidejűleg csökkent a T-sejtek által termelt IL-2 mennyisége (**3/F. Ábra**). A CD40L-ot és CD84-et együttesen expresszáló L-sejtekkel aktivált DS-ek jelenlétében ezzel szemben fokozódik a proliferáció és az IL-2 szekréció (**3/E. Ábra**). Ez a megfigyelés összhangban áll a CD40-indukálta szignálok CD84 receptor általi gátlásával.



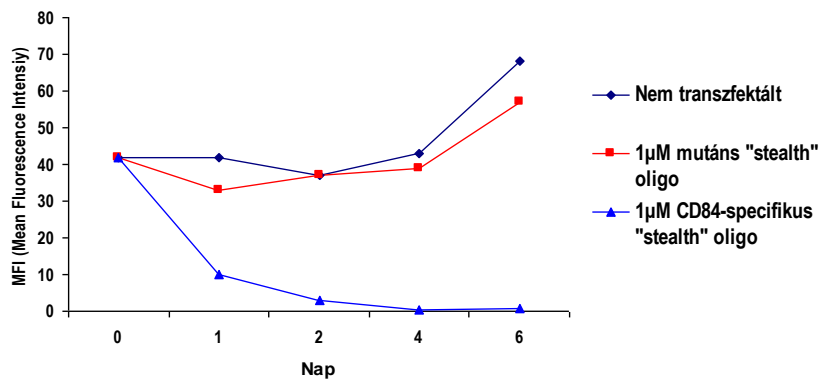
**3. Ábra. A CD84/CD84 interakció hatása a T-sejt proliferációra.** A transzfektáns L-sejtekkel aktivált és áramlási citometriával izolált DS-eket CFSE-vel jelölt allogén, naiv T-sejtekkel tartottuk közös kultúrában öt napig, majd áramlási citometriával mértük a sejtek CFSE tartalmát. Negatív kontrollként aktiválatlan, illetve éretlen DS-ekkel aktivált T-sejteket (**A,C**), pozitív kontrollként phytohemagglutinin-nel aktivált T-sejteket (**B**) használtunk. A fluoreszcencia-intenzitásból (melynek jellemzésére a GMean értéket használtuk) következtethetünk a proliferáció mértékére. Az egyes csúcsok az osztódások számát jelzik. Látható, hogy a csak CD40L-dal aktivált DS-ektől eltérően (**D**), a CD40L-dal és CD84 receptorral aktivált DS-ek (**E**) elősegítik a T-sejtek expanzióját. A sejtek felülírójában CBA-val mért IL-2 koncentrációt az **F** panelen tüntettük fel. A proliferációs vizsgálatokat öt önkéntes véradóról izolált sejtek felhasználásával végeztük. A kísérletek során 0,5 vagy 1 µg/ml humán CD3-specifikus ellenanyagot alkalmaztunk. Anti-CD3 hiányában nem tapasztaltunk proliferációt. Autolog rendszerben hasonló eredményeket kaptunk. iDC – immature dendritic cell, DC – dendritic cell, PHA – phytohemagglutinin, GMean – Geometric Mean

## 2. A CD84-CD84 „homofil” interakció hiányában bekövetkező DS aktiváció funkcionális vizsgálata

### 2.1 A CD84 expresszió gátlása kettős szálú RNS oligonukleotid direkt transzfekciójával DS-ekben

2.1.1. Az siRNS dendritikus sejtekbe vagy monocitákba juttatását direkt elektroporációval, egy a Schuler laboratórium által közölt protokoll szerint végeztük(6). Első lépésben a DS-eket a Dharmakon cég által forgalmazott, fluoreszcens festékkel jelölt dupla szálú oligonukleotidával transzfektáltuk (siGLOW, nincs ábrázolva). A transzfekció hatásfoka közel **100%-os** volt és az siRNS általi fluoreszcens szignál intenzitása a

transzfekeciót követő első három napban nem csökkent, sőt fokozatosan növekedett. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor monocita eredetű DS-ek helyett humán monocitákat transzfekektáltunk. Az siRNS általi génreguláció fontos paramétere a transzfekeció hatékonyságán kívül a „gene silencing” tartóssága. Esetünkben a CD84 specifikus oligonukleotiddal (Stealth, Invitrogen) transzfekektált monociták CD84 expressziója a transzfekeciót követő második naptól a hatodik napig gyakorlatilag nulla, amíg a „mutáns oligóval” transzfekektált sejtek CD84 expressziója nem változik a nem elektroporált sejtekkel összehasonlítva (**4. Ábra**)

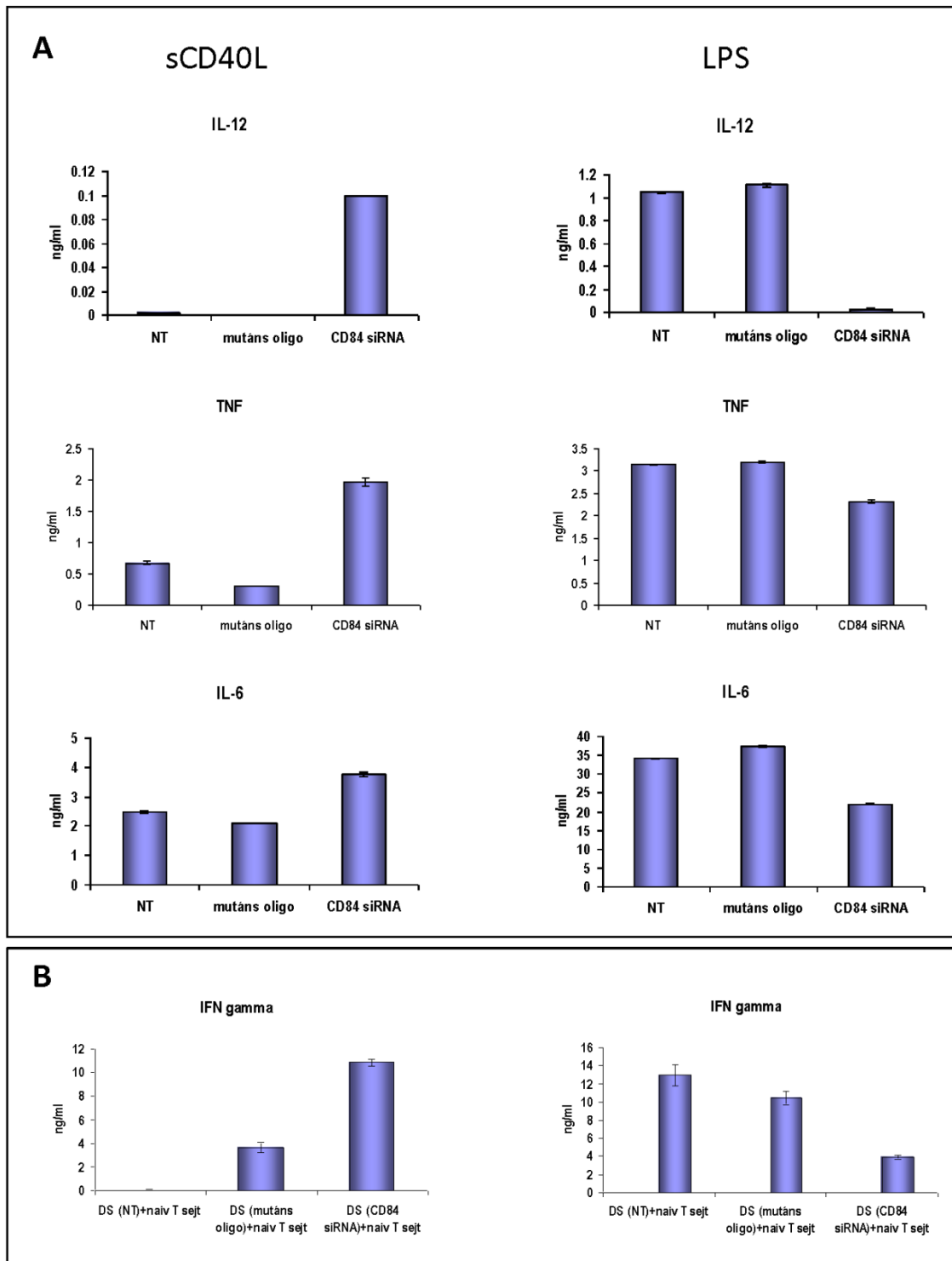


**4. Ábra. CD84 expresszió gátlása specifikus siRNS tranziens transzfekeciójával.** A perifériás vérből izolált humán monocitákat a 0. napon elektroporáltuk CD84-specifikus siRNS-sel. Kontrollként scrambled oligoval transzfekektált, illetve nem transzfekektált sejteket használtunk. A sejteket a negyedik vagy az ötödik napon aktiváltuk 100 ng/ml LPS-sel, vagy szolubilis CD40L-mal (1-10 µg/ml). A CD84 expressziót naponta mértük áramlási citométerrel.

## 2.2. A CD84 hiányának funkcionális hatása humán DS-eken.

Az RNS interferencia segítségével CD84 hiányossá tett dendritikus sejtek CD40L- vagy LPS-aktivációt követő gyulladási citokin termelését és a T-sejt polarizációra gyakorolt hatását az

**5. Ábra** foglalja össze.



**5. Ábra. A CD84 expresszió gátlásának hatása a DS-ek gyulladási citokin termelésére és Th1-sejt polarizáló képességére.**

Az 5. Ábra adatai alapján megállapítható, hogy a CD84 receptor hiányában jelentősen fokozódik a DS-ek szolubilis CD40-ligand aktiváció iránti érzékenysége, ami fokozott



gyulladásos citokin termelésben és Th1 irányú T-sejt polarizációban nyilvánul meg. A TLR4 receptor-indukálta szignálok esetében a CD84 hiánya elsősorban az IL-12 termelésre volt erőteljes hatással. CD84 hiányában az LPS-indukálta IL-12 termelés erősen csökkent. Jól mérhető, de kevésbé drámai a CD84 hatása az LPS indukciót követő TNF- $\alpha$  és IL-6 termelésre (5.ábra). Megállapítható tehát, hogy a SLAM receptorhoz hasonlóan {Rethi, 2006 #355} a CD84 szignálok gátolják a CD40L-indukálta aktivációs útvonalakat, viszont a TLR4-indukálta szignálokat jelentősen (IL-12), vagy kisebb mértékben (TNF- $\alpha$ , IL-6) fokozzák.

### **3. A CD84 által szabályozott jelátviteli útvonalak azonosítása microarray analízissel.**

A CD84 által szabályozott jelátviteli útvonalak azonosítását kontrol és CD84-specifikus siRNS-sel kezelt dendritikus sejtek génexpressziós profiljának összehasonlításával végeztük. Kontrollként minden esetben az adott siRNS-hez tervezett kontroll oligókat használtunk, melyekben a célszekvencia középső 4 nukleotidját összekevertük. További kontrollként siRNS nélkül elektroporált sejteket használtunk, mely kontroll az oligonukleotidák esetleges off-target hatásaira mutathat rá. A differenciálódó dendritikus sejteket az izolációt követő 2. napon elektroporáltuk. A CD40L, illetve LPS általi aktivációt az 5. napon végeztük. A kezelt DS-ekből 6 óra elteltével RNS-t izoláltunk. Az RNS-ek minőségét Agilent Chip-eken vizsgáltuk. A géncsendesítés és sejtaktiváció hatékonyságát minden esetben áramlási citometriával, ELISA-val és kvantitatív RT PCR-rel ellenőriztük.

A hibridizációs kísérleteket Dr. Dilair Baban, (Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Oxford) végezte Illumina HumanWG-6 v3 Expression BeadChip-ek felhasználásával. Az adatok bioinformatikai analízise a Fisher's Exact Test (FET) és a Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), két ismert pathway analízis módszer kombinációjával történt a Duccio Cavalieri laboratóriumban (Univ. of Florence) kifejlesztett módszerrel(7). Az együttműködést a DC\_THERA DS Network of Excellence által kiírt és a témavezető által elnyert támogatás is segítette.

Az analízis legérdekesebb eredményeit az 1. Táblázat foglalja össze.

**1. Táblázat. CD40L által aktivált DS-ekben CD84 hiányában számos egyes típusú interferon- indukálta gén expressziója csökken**

Gene Symbol	Gene Name	Pathway	Fold Change CD84 wt/KO
IFIT2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	MDA5	6,484142
MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2	MDA5	6,455148
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	MDA5, TLR3_IRF3	5,260823
ISG15	Interferon-induced 17 kDa protein	DC-SIGN	5,039517
<b>CD84</b>	<b>CD84 molecule</b>	<b>SLAM</b>	<b>4,1929</b>
MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1	MDA5	3,997404
APOBEC3A	apolipoprotein B mRNA editing enzyme	NA	3,21
OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1	MDA5	2,705428
IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6 radical S-adenosyl methionine domain containing 2	MDA5	2,4467
RSAD2		MDA5	2,4423
IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	MDA5	2,16
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	MDA5	2,4046
STIM2	Stromal interaction molecule 2	Dectin-1	2,371017
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	MDA5	1,8794
CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8, IL8	TLR5-8	0,497464
IL12B	IL12 beta p40	DC-SIGN, TLR5-8	0,470670
PIK3C2B	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase Drosophila melanogaster ECSIT human	TLR3_NFkB	0,45908
ECSIT	homologue	TLR4, 7, 8	0,429566

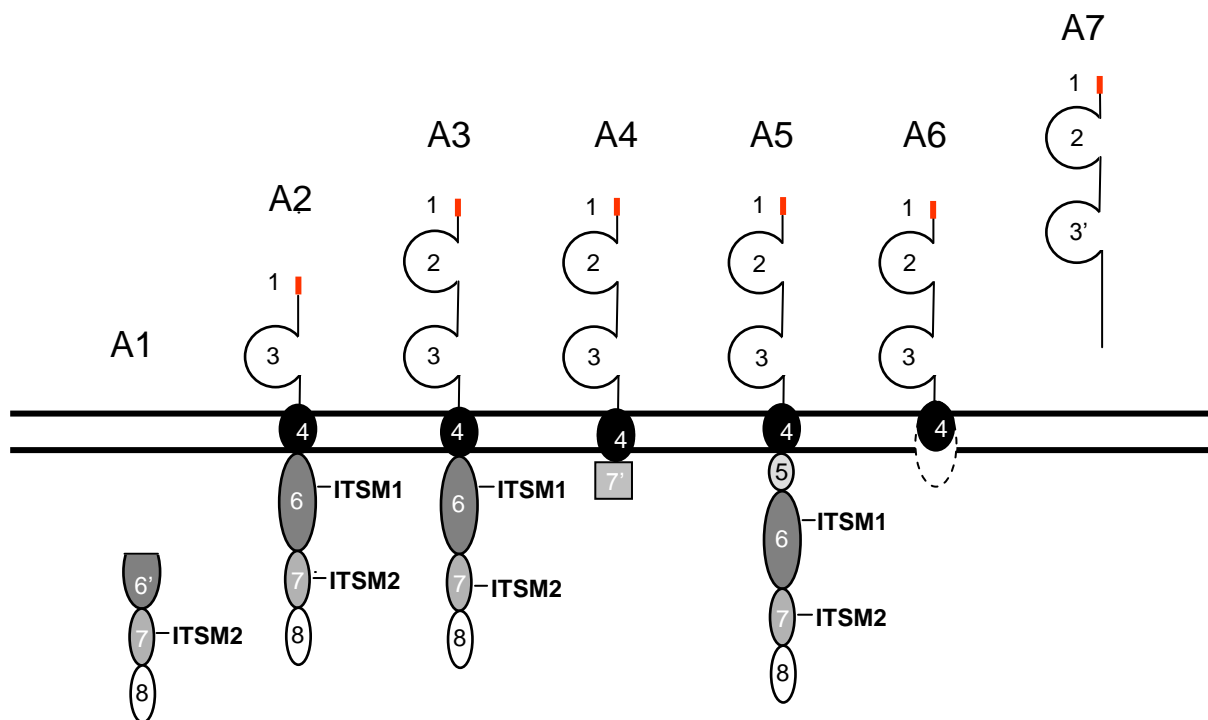
Előzetes eredményeinknek megfelelően CD40L aktivációt követően a gyulladási citokinek expressziója (IL-12, IL-8,) CD84 hiányában emelkedik. Érdekes, hogy a CD40L által aktivált DS-ekben a CD84 receptor hiányában a DC-SIGN és az MDA5 pathway szignifikánsan gátolt. Számos egyes típusú interferonok által regulált gén (MX1, MX2, IFIT2, IFI6, IFI27, 1. Táblázat), valamint az IFN-indukált CXCL10 (IP10) expressziója is drasztikusan csökken CD84 szignálok hiányában (2.5-20X különböző donorok esetén). Az érintett gének differenciális expresszióját független mintákon kvantitatív PCR segítségével ellenőriztük.

Az egyes típusú interferonok által indukált gének CD84-általi differenciális szabályozása CD40L-aktivált DS-ekben igen nagy jelentőségű lehet, mivel a SLAM-receptorok az egerekben és emberben is leírt *sle1b* lokusz centrumában található és a család több receptoráról feltételezik, hogy aberráns működése szerepet játszhat az SLE kialakulásában(2). Továbbá az is érdekes lehet, hogy a CXCL10/IP10 kemokin szérum

szintje Lupuszos betegekben korrelációt mutat a betegség klinikai képével(8). Az MDA5 jelátviteli út CD84 receptor általi szabályozásának kutatása folyamatban van.

#### **4. A CD84 receptor alternatív splice variánsainak vizsgálata immunkompetens sejtekben**

A génfunkciók biológiai diverzitásának fokozása részben különböző, alternatív splicing során képződő mRNS-ek keletkezésével valósulhat meg. Unger és munkatársai Affimetrix exon array segítségével 2105, a T-sejt proliferáció során megváltozott expressziójú transzkriptból 472 esetben alternatív splice variánsok differenciális expresszióját mutatták ki(9). A SLAM receptorok közül az NTB-A (SLAMF6) hosszú izoformájának (2 ITSM motívum) fokozott, rövid izoformájának (3 ITSM motívum) csökkent expresszióját találták B6sle1b egerek T- és B-sejtjeiben(3). Ezen egerekben az erős, sejtfelszínhez kötött saját antigén hatására a specifikus B-sejtek klonális deléciója normális a csonvelőben, míg a gyengébb, szolubilis saját antigén hatására fiziológiásan a periférián lezajló B-sejt anergia zavart szenved(10). Ezek alapján az NTB-A rövid izoformájának szerepe lehet az önreaktív B sejtek aktivitásának szabályozásában(1,2). Hipotézisünk szerint a CD84 receptor fent leírt funkcionális hatásainak egy része alternatív splicing útján szabályozódik. A CD84 receptor cDNS könyvtárakban is előforduló splice variánsait a 6. Ábra mutatja. Amíg az A1 és A2 izoforma homoasszociációra nem képes, intracelluláris doménjéhez a CD84 receptor szignalizációjában fontos molekulák kötődhetnek, így valószínűleg ezek a formák részt vehetnek a CD84 vagy egyéb SLAM receptor jelpályák modulációjában. Az A3-A6 formák extracelluláris doménja érintetlen, de az A4 és A6 izoforma citoplazmatikus régiója erősen hiányos. Ezen formák képesek lehetnek CD84 szignalizációt indukálni más sejteken, maguk azonban nem közvetítenek intracelluláris szignálokat. Az A7, szolubilis forma képes lehet a CD84 szignalizáció szomszédos, esetleg távoli sejtekben történő modulációjára. Az, hogy a szolubilis CD84 DS-ekben gátló vagy aktiváló szignálokat indukál még nem ismert.

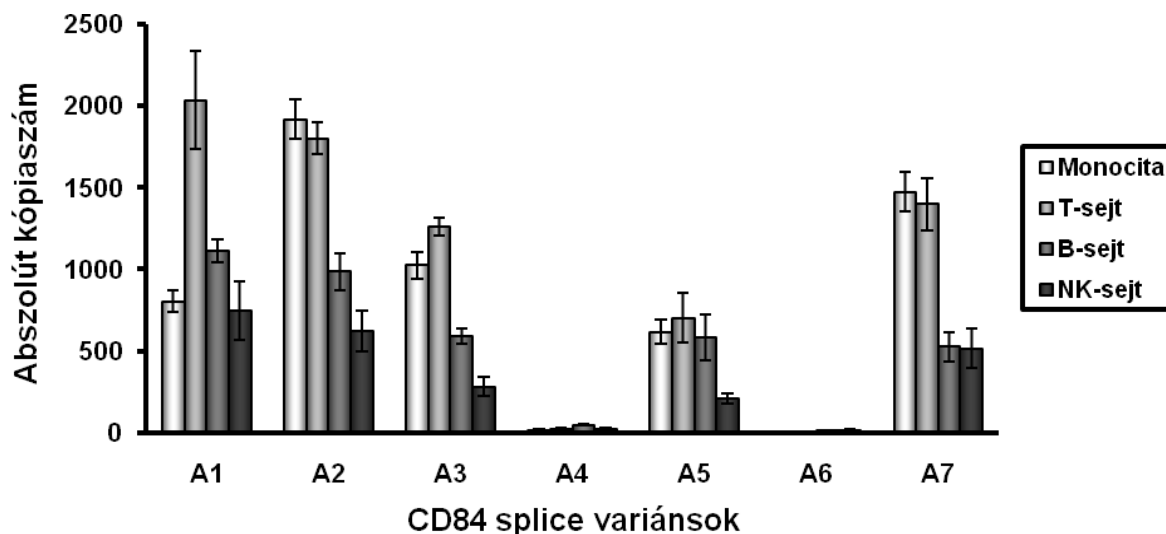


**6. Ábra. A CD84 ismert splice variánsainak felépítése.** ITSM: Immunoreceptor Tyrosine based Switch Motive (foszforilálható tirozinok)

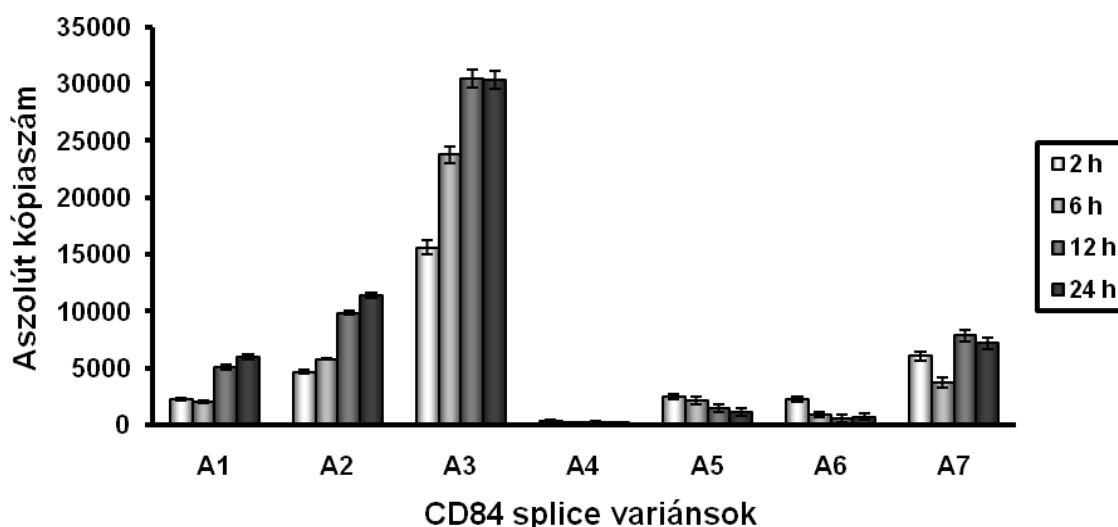
#### 4.1. A CD84 izoformák expressziója különböző immunkompetens sejtekben

Első lépésként a 6. ábrán látható splice variánsokra specifikus kvantitatív PCR reakciókat állítottunk be. Az egyes izoformák expresszióját nagy tisztaságú (<99.5%), áramlási citometria segítségével izolált primer monocitákon, T-, B- és NK sejteken határoztuk meg (7. Ábra.) Mivel az egyes PCR reakciók hatékonysága eltérő lehet, relatív expresszió helyett abszolút kópiaszámokat mértünk.

Adataink szerint primer immunsejtekben az A1, A2, A3, A5 és A7 transzkript detektálható. Érdekes, hogy az A1, A2 és A7 splice variáns meglepően magas kópiaszámban fordul elő az A3, vagyis a „vad típusú”, teljes hosszúságú transzkript-hez képest (7. Ábra.). Szolubilis CD84 mérésére Dr. Pablo Engellel kollaborációban (Univ. of Barcelona) szendvics ELISA módszert állítottunk be, melynek érzékenysége jelenleg 1ng/ml alatti, de tervezzük a tesztet pg/ml érzékenyséig fejleszteni. Az ELISA alkalmas lesz SLE kórképekben szenvedő betegek szérumában az A7 szolubilis CD84 izoforma mérésére.



**7. Ábra. A CD84 alternatív splice variánsainak megoszlása primer immunocitákban.** Áramlási citometriával izolált sejtekből standard módszerrel totál RNS-t izoláltunk, majd cDNS-t szintetizáltunk, végül 20ng RNS-nek megfelelő cDNS mintában meghatároztuk az egyes variánsok abszolút kópiaszámát. A kópiaszám meghatározáshoz az amplifikált régióknak megfelelő szintetikus DNS-t (amplikont) használtunk.



**8. ábra. A CD48 alternatív splicing során képződő variánsainak expressziója monocita-eredetű dendritikus sejtekben.** A perifériás vérből izolált monocitákból differenciáltatott dendritikus sejteket 10ug/ml Zymosan (TLR2 ligand) jelenlétében aktiváltuk, majd az ábrázolt időpontokban meghatároztuk az A1-7 splice variánsok abszolút kópiaszámát.

Ezt követően monocita eredetű DS-ekben mértük a fenti splice variánsok expresszióját. Mint az a 8. ábrán látható, a DS-ekben az A3 transzkript a domináns, de jelentős, a monocitákban

mérhető expressziót jelentősen meghaladó expressziót mutat az A1, A2 és A7 variáns is. A 7. és 8. ábra összehasonlításakor kiderül, hogy a monociták dendritikus sejtekké történő differenciációja során a CD84 gén transzkripciója fokozódik és az egyes splice variánsok egymáshoz viszonyított aránya jelentősen megváltozik.

Jelenleg Pablo Engel-lel együttműködésben, folyamatban van a fenti splice variánsok DS-funkciókban betöltött szerepének vizsgálata. Az egyes splice variánsokat expressziós vektorok segítségével DS-ekben overexpresszáljuk és vizsgáljuk a DS-ek citokintermelésére, ölü funkcióira, valamint T-sejt polarizációs képességére gyakorolt hatásukat.

### **Összefoglalva:**

A pályázat keretein belül számos, eddig ismeretlen, az immunfolyamatok szabályozásában fontos jelenséget detektáltunk a CD84 receptor DS funkciókra gyakorolt hatásait illetően. A CD84 receptor funkcionális vizsgálatára két, egymástól független, egymást kiegészítő modell rendszert állítottunk be, melyek segítségével kimutattuk, hogy a CD84 a SLAM-hoz hasonlóan kontext-dependens receptor, amely a CD40-indukálta (elsősorban T-sejt eredetű) szignálokat gátolni, a TLR4 szignálokat fokozni képes. Ezen megfigyeléseink és azon kísérleteink, amelyekben a CD84 és a SLAM expresszióját RNS interferenciával egyidejűleg gátoltuk arra utalnak, hogy a két receptor a DS-funkciók szabályozásában szinergisztikusan működik

Teljes transzkriptom (microarray) analízis segítségével kimutattuk, hogy az MDA5 jelátviteli pálya működését a CD84-eredetű szignálok jelentősen befolyásolják, de kísérleti adataink alapján a másik fontos RNS szenzor (RIG1) pathway modulációja sem zárható ki. Az említett jelátviteli pályák protein szintű vizsgálata folyamatban van. Az egyes típusú IFN-aktivált gének CD84 általi modulációja felveti a CD84 szerepét az SLE-ben megfigyelhető patológias folyamatok kialakulásában is.

Végül jellemeztük a CD84 egyes splice variánsainak megoszlását primer immunsejtekben és kimutattuk, hogy az egyes mRNS átíratok relatív mennyisége a DS differenciáció során jelentősen megváltozik. E változások funkcionális hatásainak vizsgálata folyamatban van.

## **Idézett Irodalom:**

1. Calpe, S., Wang, N., Romero, X., Berger, S. B., Lanyi, A., Engel, P., and Terhorst, C. (2008) *Adv Immunol* **97**, 177-250
2. Detre, C., Keszei, M., Romero, X., Tsokos, G. C., and Terhorst, C. *Semin Immunopathol* **32**(2), 157-171
3. Wandstrat, A. E., Nguyen, C., Limaye, N., Chan, A. Y., Subramanian, S., Tian, X. H., Yim, Y. S., Pertsemlidis, A., Garner, H. R., Jr., Morel, L., and Wakeland, E. K. (2004) *Immunity* **21**(6), 769-780
4. Rethi, B., Gogolak, P., Szatmari, I., Veres, A., Erdos, E., Nagy, L., Rajnavolgyi, E., Terhorst, C., and Lanyi, A. (2006) *Blood* **107**(7), 2821-2829
5. Hwu, P., Du, M. X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M. W., and Young, H. A. (2000) *J Immunol* **164**(7), 3596-3599
6. Schaft, N., Dorrie, J., Thumann, P., Beck, V. E., Muller, I., Schultz, E. S., Kampgen, E., Dieckmann, D., and Schuler, G. (2005) *J Immunol* **174**(5), 3087-3097
7. Beltrame, L., Rizzetto, L., Paola, R., Rocca-Serra, P., Gambineri, L., Battaglia, C., and Cavalieri, D. (2009) *PLoS One* **4**(1), e4128
8. Bauer, J. W., Petri, M., Batliwalla, F. M., Koeuth, T., Wilson, J., Slattery, C., Panoskaltsis-Mortari, A., Gregersen, P. K., Behrens, T. W., and Baechler, E. C. (2009) *Arthritis Rheum* **60**(10), 3098-3107
9. Whistler, T., Chiang, C. F., Lonergan, W., Hollier, M., and Unger, E. R. *BMC Genomics* **11**, 496
10. Kumar, K. R., Li, L., Yan, M., Bhaskarabhatla, M., Mobley, A. B., Nguyen, C., Mooney, J. M., Schatzle, J. D., Wakeland, E. K., and Mohan, C. (2006) *Science* **312**(5780), 1665-1669