

OTKA ZÁRÓJELENTÉS A T2002-2005

A SLAM receptorcsalád főbb jellemzői és immunregulációs szerepe

Az elmúlt három évben a SLAM (Signaling Lymphocyte activation Molecule) szignalizációs útvonal T-sejt aktivációban -és differenciációban betöltött szerepét vizsgáltuk. A SLAM családba tartozó ko-receptorok szerepet játszanak a naív T-sejtek Th1/Th2 effektor sejtekké történő differenciálódásában, de a legújabb eredmények szerint nélkülözhetetlenek a hatékony anti-bakteriális, (természetes) immunválasz szabályozásában is. SLAM-hiányos egerekben makrofágok LPS jelenlétében nem termelnek NO-t és a szuperoxid termelés is gátolt¹. Egy másik "családtag" az Ly108/NTB hiánya a neutrofil funkciók károsodását okozza². A SLAM receptor szerepét igazolták hematopoietikus őssejtekben is, melyeknek jelenleg az a receptor a legbiztosabb marker fehérjéje³. A SLAM család jelenleg 9 tagból áll: SLAM⁴, CRACC/19A/CS1^{5,6}, BLAME⁷, CD48^{8,9}, CD84¹⁰⁻¹², 2B4 (CD244)^{13,14}, Ly-9 (CD229)^{15,16}, Ly108/NTB-A^{17,18} és az SF2001¹⁸. Érdekes, hogy a SLAM család fehérjéi homoasszociációt követően aktiválódnak. A homoasszociációt, például SLAM/SLAM kölcsönhatást követően, a T-sejtben és az antigén prezentáló sejtben (pl. dendritikus sejtben) kétirányú szignalizációs folyamatok indulnak meg, melyek szabályozásában döntő szerepe van a T- és NK-sejtekben kifejeződő SAP (SLAM- Associated protein) adaptor fehérjének, valamint a SAP-homológ EAT-2 (Ewing Sarcoma Associated Transcript-2) proteinek. Az EAT-2 fehérje elsősorban antigénprezentáló sejtben (dendritikus sejt, makrofág, B-sejt) fejeződik ki. A SAP és az EAT-2 egyetlen SH2-doménből álló adaptor fehérjék, melyek a SLAM mellett a CD84, a 2B4, az Ly9, az NTB-A jelátviteli folyamataiban is alapvető jelentőségűek¹⁹. E folyamatok molekuláris szintű megértése, elvezethet a SLAM-receptorok szignalizációs folyamatainak gyógyszerekkel történő szabályozásához. Ath1/Th2 egyensúly Th1 irányú modulációjával lehetővé válhat egyes bakteriális²⁰⁻²², allergiás, vagy autoimmun^{23,24} kórképek eredményesebb kezelése, esetleg gyógyítása is.

1. A SAP/EAT adaptor tartalmú molekulakomplexek jellemzése.

A SAP/EAT fehérjék interakciója a Src családba tartozó protein tirozin kinázokkal:

1.1. A SAP/Fyn kölcsönhatás biokémiai jellemzése

Élesztő kettős hibrid rendszerben és tranziens transzfekciók segítségével bizonyítottuk, hogy a SAP fehérje (SLAM associated protein) kötődni képes a FYN-T SH3 doménjéhez. A közvetlen kölcsönhatás bizonyítást nyert Röntgen-diffrakciós vizsgálatok által is (kollaborációban Dr. Cox Terhorst-tal and Dr. Michel Eck-kel.) Az SH3-domén interakciója a SAP fehérjével a kináz enzimaktivitásának fokozódását váltja ki in vitro rendszerben (Chan, Lányi et al.²⁵). ***Ezzel bizonyítottuk, hogy az egyetlen SH2-doménből álló SAP fehérje nem egyszerűen inhibítorként, hanem adaptor molekulaként is működik. A SAP/Fyn kölcsönhatás máig az egyetlen ismert SH2 -és SH3-domének közötti közvetlen interakció.*** E megfigyelések jelentősen hozzájárultak a SLAM fehérje szignalizáció mechanizmusának megismeréséhez. Az általunk megfigyelt interakció hiányában, például SAP, vagy FynT-hiányos egerekben az invariáns T-sejt receptort hordozó iNKT sejt populáció teljes mértékben hiányzik²⁶

1.2. SAP és EAT-2 interakciója egyéb Src-kinázokkal

Kimutattuk, hogy a SAP és az EAT-2 molekula a Fyn és az Lck molekulán kívül a Hck, a Lyn, az Fgr kinázokkal is képes kapcsolódni és hogy ezen interakciók nem az SH3, hanem a kináz domén kötésével jönnek létre^{27,28}. Sikertelenül tehát bizonyítanunk egy új kötőhely meglétét a src-családba tartozó több tirozin kináz (pl. Fyn és Lck Hck Lyn) kináz doménjén. Az újonnan felfedezett kötőhely nemcsak a SAP fehérjét, de annak homológját az EAT-2 proteint is képes megkötni. Érdekes módon a SAP és EAT-2 fehérjék a mutáns (kinase dead) Hck vagy Lyn kinázzal nem alkotnak komplexet, így a megfigyelésünk egyrészt az említett kölcsönhatások specificitását bizonyítja, másrészt arra utal, hogy a kináz(ok) natív konformációja, szükséges a SAP vagy az EAT-2 adaptor fehérje kötődéséhez.

. A src-családba tartozó kinázok aktivitásának szabályozása a kináz doménnel történő interakción keresztül eddig ismeretlen, így az általunk felfedezett interakciók egy új szabályozó mechanizmus megismeréséhez vezethetnek^{27,28}

2. A SLAM családba tartozó fehérjék funkciójának vizsgálata dendritikus sejtekben.

A T-sejtek polarizációja a dendritikus sejtek szabályozása alatt áll. Jogos tehát a feltételezés, miszerint a T-sejt polarizációt szabályozó legkorábbi szignálok a naiv T-sejtek és a DS-ek közötti SLAM szignálok is magukba foglaló kommunikáció eredménye. Ezért kidolgoztunk egy modellrendszert, amelynek segítségével a T-sejt/dendritikus sejt (DS) interakció során a dendritikus sejtekben történő SLAM jelátvitel vizsgálható.

2.1. Kísérleti rendszer beállítása a SLAM (CD150) receptor homoasszociációjával kiváltott szignálok funkcionális vizsgálatára dendritikus sejtekben.

A dendritikus sejtek IL-12 termelésének hatására a naiv T-sejtek Th1 sejtekké differenciálódnak. Ezzel ellentétben, ha a DS-ek IL-12 termelése csökken, nő a Th2 típusú effektor sejtekké differenciálódó T-sejtek aránya. Munkahipotézisünk szerint a SLAM receptoron keresztül, SAP/EAT-2 által közvetített szignálok hatására csökken a DS-ek IL-12 termelése, ami fokozott Th2 sejt differenciációhoz vezet. Hipotézisünk alapjául a SLAM illetve SAP knockout egerekben megfigyelhető kórosan magas Th1 irányú T-sejt polarizáció, és az ezzel együtt járó Th2 deficiencia szolgál.

A DS-ek érésekor CD40/CD40L interakció hatására az aktivált DS-ek nagy mennyiségű IL-12-t termelnek. Az aktivált DS-eken megjelenik a SLAM receptor is (Bleharski és mtsai²⁹). *Mivel a SLAM természetes liganduma saját maga, így az aktivált dendritikus sejteken kifejeződő SLAM és CD40 egyidejűleg képes kapcsolódni az aktivált T-sejteken kifejeződő SLAM és CD40L molekulával. Kísérleti rendszerünkben ezt a hatást kívántuk modellezni.* Humán CD40L-t stabilan expresszáló L929 egér fibroblaszt sejtvonalba emberi SLAM receptor cDNS-ét transzfektáltuk, majd több egymástól független CD40L+/SLAM+ sejtvonalat izoláltunk. Az így kapott sejtvonalak DS-aktiváló képességét a parentális (L929-CD40L) sejtvonalakéival összehasonlítva vizsgálható a SLAM receptor szignalizáció DS funkciókra gyakorolt hatása Réthi és mtsai³⁰.

2.2. A SLAM receptor homo-asszociációja általi szignalizáció gátolja dendritikus sejtek gyulladási citokin termelését (IL-12, TNF- α , IL-6).

Citokin array filterek felhasználásával kimutattuk, hogy a SLAM szignalizáció csökkenti DS-ek CD40-indukció hatására szekretált gyulladási citokinek mennyiségét (Réthi és mtsai 3-5. Ábra.).

2.3. A SLAM szignálok hatására csökken a CD40-indukálta IL-12 termelése dendritikus sejtekben

Ismert, hogy a dendritikus sejtekben *SLAM-specifikus ellenanyagok jelenlétében* fokozódik a CD40 aktiváció hatására kiváltott IL-12 termelés²⁹. Ha az érett dendritikus sejtekben a SLAM szignalizációt specifikus ellenanyag helyett *SLAM fehérjét expresszáló egér fibroblaszt sejtvonallal* aktiváljuk (a SLAM homoasszociációján keresztül) az IL-12 termelés csökken (Réthi és mtsai 4-5. Ábra.). Beállítottuk továbbá a monocita eredetű dendritikus sejtek hatékony tranziens transzfekcióját, majd kimutattuk, hogy a SLAM fehérje overexpressziója gátolja a CD40-által kiváltott IL-12 termelést (Réthi és mtsai 6. Ábra.). Ezen eredmények összhangban állnak a SLAM-hiányos egerekben *in vivo* megfigyelhető fokozott Th1 polarizációval, amely az említett ellenanyaggal történő stimulációs eredmények alapján nem voltak magyarázhatók.

2.4. A SLAM szignalizáció hatása a dendritikus sejtek általi T-sejt aktivációra.

In vitro T-sejt polarizációs vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a SLAM receptor homoasszociációja általi szignalizáció gátolja a naív T-limfocitákból allogén stimuláció hatására differenciálódó effektor sejtek IFN- γ termelését (Réthi és mtsai 7a-b. Ábra.).

Mivel a CD40L és a SLAM egyidejű expressziója az aktivált, illetve a memória Th1-sejteken fordul elő feltételezzük hogy a SLAM receptor része egy az immunválasz késői szakaszában működő negatív visszacsatolási mechanizmusnak amely gátolja a CD40-aktiválta DS-ek gyulladási citokin termelését és a DS-indukálta Th1-polarizációt. Valószínűsíthető, hogy DS-T-sejt interakció során létrejövő SLAM homoasszociáció szerepet játszhat a krónikus gyulladási folyamatok kialakulásának gátlásában, és/vagy a kialakult gyulladási folyamatok intenzitásának csökkentésében.

Tudományos teljesítmény a pályázati időszakban:

Közlemények:

1. Calpe S, Erdos E, Liao G, Wang N, Rietdijk S, Simarro-Grande M, Scholtz B, Mooney J, Lee CH, Shin MS4, Rajnavölgyi É, John Schatzle, Morse CH III, Terhorst C, **Lanyi A.** Identification and characterization of two related murine genes, Eat2a and Eat2b, encoding single SH2-domain adapters **Immunogenetics**, 2006 Jan 20;:1-11 [Epub ahead of print]
2. Rethi B, Gogolak P, Szatmari I, Veres A, Erdos E, Nagy L, Rajnavölgyi E, Terhorst C, **Lanyi A.** SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte derived dendritic cells. **Blood**. In press. 2005 Nov 29; [Epub ahead of print]
3. Simarro M, **Lanyi A**, Howie D, Poy F, Bruggeman J, Choi M, Sumegi J, Eck MJ, Terhorst C. (2004) SAP increases FynT kinase activity and is required for phosphorylation of SLAM and Ly9. **Int Immunol**. 2004 May;16(5):727-36.
4. Rajnavölgyi E, **Lanyi A.** (2003) Role of CD4+ T lymphocytes in antitumor immunity. **Adv Cancer Res**. 87:195-249.
5. Chan B⁺, **Lanyi A**⁺, Song HK, Griesbach J, Simarro-Grande M, Poy F, Howie D, Sumegi J, Terhorst C, Eck MJ. (2003) SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. **Nat Cell Biol**. 155-60. ⁺co-first author
6. Lányi Árpád (2003) X-kromoszómához kapcsolt lymphoproliferatív betegség

Gyermekgyógyászat, 54. 107-115.

7. Sumegi J, Seemayer TA, Huang D, Davis JR, Morra M, Gross TG, Yin L, Romco G, Klein E, Terhorst C, **Lanyi A.** (2002) A spectrum of mutations in SH2D1A that causes X-linked lymphoproliferative disease and other Epstein-Barr virus-associated illnesses. *Leuk Lymphoma*;43(6):1189-201.

Konferencia előadások:

1. **Árpád Lányi:** SLAM/SLAM interactions inhibit CD40 induced production of inflammatory cytokines in monocyte derived dendritic cells **13th Signal and Signal Processing in the Immune System EFIS Conference 2005 Előadás**
2. Lanyi A et al. „CD150 (SLAM) induces anti-inflammatory signals in dendritic cells.” **12th International Congress of Immunology** July 18-23, 2004. Montreal Canada.
3. Lanyi A et al. SAP and EAT-2 are adapters that bind directly to Src kinases and facilitate phosphorylation of SLAM-related receptors. **15th European immunology Congress**, June 8-12 2003. Rhodes, Greece
4. Lányi és mtsai. “A Duncan szindróma molekuláris szintű vizsgálata: mutációk, fehérje kölcsönhatások és szerepük a T-limfocita funkciókban” **A Magyar Immunológiai Társaság XXXI. Kongresszusa** 2001. október 17-19. Eger.
5. Lányi és mtsai. “Az X-kromoszómához kapcsolt limfoproliferatív betegség (XLP) molekuláris szintű vizsgálata: mutációk. **X. Sejt-és Fejlődésbiológiai Napok.** 2002. március 27-29. Siófok.
6. Lányi és mtsai. “A Duncan szindróma molekuláris alapjai” **A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Szakosztályának 7. Munkaértekezlete.** 2002 május14-17. Keszthely.

Idézett Irodalom:

1. Wang N, Satoskar A, Faubion W, Howie D, Okamoto S, Feske S, Gullo C, Clarke K, Sosa MR, Sharpe AH, Terhorst C. The Cell Surface Receptor SLAM Controls T Cell and Macrophage Functions. *J Exp Med.* 2004;199:1255-1264
2. Howie D, Laroux FS, Morra M, Satoskar AR, Rosas LE, Faubion WA, Julien A, Rietdijk S, Coyle AJ, Fraser C, Terhorst C. Cutting edge: the SLAM family receptor Ly108 controls T cell and neutrophil functions. *J Immunol.* 2005;174:5931-5935
3. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005;121:1109-1121
4. Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature.* 1995;376:260-263

5. Bouchon A, Cella M, Grierson HL, Cohen JI, Colonna M. Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J Immunol.* 2001;167:5517-5521
6. Boles KS, Mathew PA. Molecular cloning of CS1, a novel human natural killer cell receptor belonging to the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. *Immunogenetics.* 2001;52:302-307
7. Kingsbury GA, Feeney LA, Nong Y, Calandra SA, Murphy CJ, Corcoran JM, Wang Y, Prabhu Das MR, Busfield SJ, Fraser CC, Villeval JL. Cloning, expression, and function of BLAME, a novel member of the CD2 family. *J Immunol.* 2001;166:5675-5680
8. Fisher RC, Thorley-Lawson DA. Characterization of the Epstein-Barr virus-inducible gene encoding the human leukocyte adhesion and activation antigen BLAST-1 (CD48). *Mol Cell Biol.* 1991;11:1614-1623
9. Wong YW, Williams AF, Kingsmore SF, Seldin MF. Structure, expression, and genetic linkage of the mouse BCM1 (OX45 or Blast-1) antigen. Evidence for genetic duplication giving rise to the BCM1 region on mouse chromosome 1 and the CD2/LFA3 region on mouse chromosome 3. *J Exp Med.* 1990;171:2115-2130
10. de la Fuente MA, Tovar V, Pizcueta P, Nadal M, Bosch J, Engel P. Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of the mouse homologue of CD84, a member of the CD2 family of cell surface molecules. *Immunogenetics.* 1999;49:249-255
11. de la Fuente MA, Pizcueta P, Nadal M, Bosch J, Engel P. CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily. *Blood.* 1997;90:2398-2405
12. de la Fuente MA, Tovar V, Villamor N, Zapater N, Pizcueta P, Campo E, Bosch J, Engel P. Molecular characterization and expression of a novel human leukocyte cell-surface marker homologous to mouse Ly-9. *Blood.* 2001;97:3513-3520
13. Mathew PA, Garni-Wagner BA, Land K, Takashima A, Stoneman E, Bennett M, Kumar V. Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol.* 1993;151:5328-5337
14. Sivori S, Parolini S, Falco M, Marcenaro E, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol.* 2000;30:787-793
15. Mathieson BJ, Sharrow SO, Bottomly K, Fowlkes BJ. Ly 9, an alloantigenic marker of lymphocyte differentiation. *J Immunol.* 1980;125:2127-2136
16. Hogarth PM, Craig J, McKenzie IF. A monoclonal antibody detecting the Ly-9.2 (Lgp 100) cell-membrane alloantigen. *Immunogenetics.* 1980;11:65-74
17. Bottino C, Falco M, Parolini S, Marcenaro E, Augugliaro R, Sivori S, Landi E, Biassoni R, Notarangelo LD, Moretta L, Moretta A. NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med.* 2001;194:235-246
18. Fraser CC, Howie D, Morra M, Qiu Y, Murphy C, Shen Q, Gutierrez-Ramos JC, Coyle A, Kingsbury GA, Terhorst C. Identification and characterization of SF2000 and SF2001, two new members of the immune receptor SLAM/CD2 family. *Immunogenetics.* 2002;53:843-850
19. Engel P, Eck MJ, Terhorst C. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:813-821
20. Garcia VE, Quiroga MF, Ochoa MT, Ochoa L, Pasquinelli V, Fainboim L, Olivares LM, Valdez R, Sordelli DO, Aversa G, Modlin RL, Sieling PA. Signaling Lymphocytic Activation Molecule Expression and Regulation in Human Intracellular Infection Correlate with Th1 Cytokine Patterns. *J Immunol.* 2001;167:5719-5724

21. Pasquinelli V, Quiroga MF, Martinez GJ, Zorrilla LC, Musella RM, Bracco MM, Belmonte L, Malbran A, Fainboim L, Sieling PA, Garcia VE. Expression of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein interrupts IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol.* 2004;172:1177-1185
22. Quiroga MF, Martinez GJ, Pasquinelli V, Costas MA, Bracco MM, Malbran A, Olivares LM, Sieling PA, Garcia VE. Activation of signaling lymphocytic activation molecule triggers a signaling cascade that enhances Th1 responses in human intracellular infection. *J Immunol.* 2004;173:4120-4129
23. Isomaki P, Aversa G, Cocks BG, Luukkainen R, Saario R, Toivanen P, de Vries JE, Punnonen J. Increased expression of signaling lymphocytic activation molecule in patients with rheumatoid arthritis and its role in the regulation of cytokine production in rheumatoid synovium. *J Immunol.* 1997;159:2986-2993
24. Theil D, Farina C, Meinel E. Differential expression of CD150 (SLAM) on monocytes and macrophages in chronic inflammatory contexts: abundant in Crohn's disease, but not in multiple sclerosis. *J Clin Pathol.* 2005;58:110-111
25. Chan B, Lanyi A, Song HK, Griesbach J, Simarro-Grande M, Poy F, Howie D, Sumegi J, Terhorst C, Eck MJ. SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol.* 2003;5:155-160
26. Borowski C, Bendelac A. Signaling for NKT cell development: the SAP-FynT connection. *J Exp Med.* 2005;201:833-836
27. Simarro M, Lanyi A, Howie D, Poy F, Bruggeman J, Choi M, Sumegi J, Eck MJ, Terhorst C. SAP increases FynT kinase activity and is required for phosphorylation of SLAM and Ly9. *Int Immunol.* 2004;16:727-736
28. Calpe S EE, Liao G, Wang N, Rietdijk S, Scholtz B, Mooney J, Lee CH, Min MS, Rajnavölgyi É, Schatzle J, Morse HC III, Terhorst C, Lanyi Á. Identification and characterization of two related murine genes, Eat2a and Eat2b, encoding single SH2-domain adapters. *Immunogenetics.* 2005;in press
29. Bleharski JR, Niazi KR, Sieling PA, Cheng G, Modlin RL. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol.* 2001;167:3174-3181
30. Réthi B PG, István Szatmári, Ágota Veres, Erika Erdős, László Nagy, Éva Rajnavölgyi, Cox Terhorst and Árpád Lányi. SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte derived dendritic cells. *Blood,* 2005 Nov 29; [Epub ahead of print]. 2005

Melléklet:

1. Chan, Lanyi et al.,



acrobat Documer

2. Rethi et al.,



acrobat Documer

3. Calpe-Erdos et al.,



acrobat Documer