

DE OEC, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, Debrecen (Igazgató: Prof. Dr. Sziklai István),

¹DE OEC, Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen (Igazgató: Doc. Dr. Kónya József),

²Bajcsy-Zsilinszky Kórház, Fül-Orr-Gége Osztály, Budapest (Főorvos: Dr. Liktör Bálint),

³DE OEC, Anatómiai-, Szövet- és Fejlődéstan Intézet, Debrecen (Igazgató: Prof. Dr. Antal Miklós),

⁴POTE, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, Pécs (Igazgató: Prof. Dr. Pytel József)

⁵SZOTE, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, Szeged (Igazgató: Prof. Dr. Jóri József)

Új, otosclerosis-specifikus CD46 variánsok: Az otosclerosis csontátépülés genetikai alapja?

Karosi Tamás dr., Csomor Péter¹, Szalmás Anita¹, Kónya József dr.¹, Z. Szabó László dr.²,
Liktör Bálint dr.², Petkó Mihály dr.³, Pytel József dr.⁴, Jóri József dr.⁵, Sziklai István dr.

ÖSSZEFOGLALÁS: Az otosclerosis szervspecifikus, vírus indukált, komplex csontremodellizációs zavar, ezért azt feltételeztük, hogy az oticus capsula (és a stapes talp) sajátos kanyaróvírus receptor mintázattal rendelkezik. A kanyaróvírus receptora a 14 ismert „splicing” izoformával rendelkező CD46 molekula. A stapedectomy során eltávolított stapes talpakkból (N=99) kivontuk a nukleinsavakat. Párhuzamosan szövettani-, CD46-specifikus immunhisztokémiai- és multiplex RT-PCR vizsgálatokat végeztünk. A kanyaróvírus kimutatás „semi-nested” RT-PCR technikával történt. A CD46 „splicing” variánsait „nested” RT-PCR technikával mutattuk ki, majd cDNS szekvenálással tipizálást végeztünk. A kanyaróvírust kizárólag a szövettanilag is otosclerosis stapes talpokban azonosítottuk. A vírusnegatív, fixált stapes talpak változatos kórszövettannal jellemzett, degeneratív elváltozásokat mutattak. Az otosclerosis gócokat számos erős CD46 immunreakciót mutató osteoclast jellemezte, szemben a nem-otosclerosis stapes fixációkkal. A normális és a nem-otosclerosis stapes talpokban kizárólag a CD46 „c”, „d”, „e”, „f” és „l” variánsainak expresszióját tapasztaltuk. Ezzel szemben az otosclerosis gócokban négy eddig ismeretlen CD46 „splicing” variánst azonosítottunk: *os1*, *os2*, *os3* és *os4*. Az újonnan azonosított CD46 izoformák rövidebb vagy hiányzó transzmembrán domént és egy meglehetősen ritka citoplazmatikus farkat tartalmaztak. Ezen molekulák jelátvittele biztosan kóros, ugyanakkor víruskötő képességük változatlan maradt. Valószínűleg ezek a változások tehetők felelőssé az otosclerosisban tapasztalt zavartalan vírusreplikációért. A CD46 sajátos kifejeződési mintázata és az új izoformák megváltozott funkciói együttesen magyarázhatják az otosclerosis szerv- és vírusspecifikus patogenezisét. **KULCSSZAVAK:** CD46, kanyaróvírus, otosclerosis, csont remodelláció, alternatív „splicing”

SUMMARY: Otosclerotic bone is supposed to show unique CD46 expression pattern since otosclerosis is an organ-specific, complex bone remodeling disorder of the human otic capsule, which is associated to persisting measles virus infection. The general cellular receptor of measles virus is the CD46, which has 14 known splicing isoforms. Nucleic acid was extracted from ankylotic stapes footplates (N=99) removed during stapedectomies. Consecutive histologic-, CD46 specific immunohistologic analysis and multiple PCR amplifications were performed. Measles virus was detected by semi-nested RT-PCR. Splicing variants of CD46 were identified by nested RT-PCR and finally determined by mass sequencing of cDNA. Measles virus RNA was detectable only in histologically otosclerotic stapes footplates. Virus negative fixed stapes represent degenerative disorders of variable histopathology. Otosclerosis is featured by an increased number of osteoclasts showing strong CD46 immunoreaction in contrast to non-otosclerotic stapes fixations. Normal and non-otosclerotic stapes footplates show consistent expression of „c”, „d”, „e”, „f” and „l” CD46 splicing isoforms. In contrast, four novel CD46 splicing variants were additionally detected in otosclerosis: *os1*, *os2*, *os3* and *os4*. Newly described CD46 isoforms have shorter or missing transmembrane domain and a quite rare cytoplasmic tail with pathologic or uncommon signal transduction, however, virus binding ability remains equal and invariable. These changes may be responsible for the smooth virus replication. A special expression pattern and altered functions of CD46 could explain the organ specific and virus associated pathogenesis of otosclerosis.

KEYWORDS: CD46, measles virus, otosclerosis, bone remodeling, alternative splicing

Közlésre érkezett: 2008. 08. 30.

DE OEC, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika

Cím: 4032 Debrecen, Nagyerdei Krt. 98.,

Tel./Fax: (52) 414-763

E-mail: karosi@freemail.hu,

karositas@gmail.com

Bevezetés

Az otosclerosis az oticus capsula kóros csontátépülésével jellemzett, lassú kanyaróvírus fertőzés eredményeképpen létrejövő, gyulladásozottságú betegség (1–3). Az otosclerosis gócok döntően a stapes fülke környékén és a pericochleáris régióban alakulnak ki, vezetékes- és szenzorineurális halláscsökkenést

okozva (4). A kaukázusi fehér populációban a klinikai otosclerosis prevalenciája 0,4–0,6%, míg a vezetőes halláscsökkenések között 9–21%-os előfordulási arányt mutat (4). Az otosclerosis és a női nem kapcsolata jól ismert: a betegség kb. négyszer gyakrabban jelentkezik nőkben, amely egyébként az autoimmun betegségek tipikus jellemvonása. A szövettani (nem klinikai) otosclerosis kb. tízszer gyakoribb, mint a klinikai otosclerosis: patológiai tanulmányok szerint a temporális csontok 5–12%-ban észlelhető (3, 4). Korábban több szerző is megállapította, hogy az otosclerosis (stapes ankylosis) egyes esetei inkomplett penetranciával jellemzett, autoszómális domináns öröklésmentet követnek, azonban más esetekben a betegség nemzedékek átugrására is képes (5).

Az aktív otosclerost hypercelluláris és hypervascularizált csonttépülési góccok jellemzik (6, 7). A tágas pseudovasculáris üröket számos szabálytalan alakú osteoclast, többmagvú óriássejt, fibroblast és osztódó endothelsejt tölti ki (6, 7). A fonatos szerkezetű és erősen basophil festődést mutató csontalapállomány mennyisége jelentősen megnő (6). Az aktív otosclerosisban tapasztalt kórszövettani elváltozások meglehetősen hasonlítanak a Paget-kór csontremodellizációs gócaira (7). Az előrehaladott (kiégett) otosclerost hypocelluláris, eosinophil festődésű és fonatos szerkezetű osteoid alapállomány jellemzi (6).

Más szerzők és saját korábbi eredményeink alapján fontos hangsúlyoznunk, hogy az otosclerost csontban történő kanyaróvírus kimutatás kizárólag leíró eredménynek tekinthető, és nem ad információt az otosclerosis pathogenezisével kapcsolatban. Ennek megfelelően azt feltételeztük, hogy az otosclerost oticus capsula egyedülálló CD46 expressziós mintázatot mutat, amely egyrészt alapját képezheti az otosclerosis pathogenezisének, másrészt magyarázhatja a csökkent kanyaróvírus ellenes, humorális immunválaszt (7–9).

A kanyaróvírus emberi celluláris receptora a CD46 molekula (MCP – Membrane Cofactor Protein), amely kofaktor tevékenysége révén a szérum faktor I (SF-I) segítségével inaktíválja a C3b és C4b komplement komponenseket, megvédve ezzel a gazdaszervezet sejtjeit a komplement rendszer túlzott aktiválódásával szemben (10, 11). A CD46 „messenger” RNS-e (mRNS) egy, az 1. kromoszóma hosszú karján (1q32) elhelyezkedő génről íródik át, azonban az alternatív „splicing” során bekövetkező posztranszlációs módosításokat követően különböző izoformákat kódol (12). A CD46 egy I. típusú transzmembrán glikoprotein, amely 14 eddig ismert izoformával („splicing” variánsal) rendelkezik. Ezek az izoformák ugyan változatos mintázatban és mennyiségben, de minden sejtmaggal rendelkező emberi sejt felszínén kifejeződnek (12,

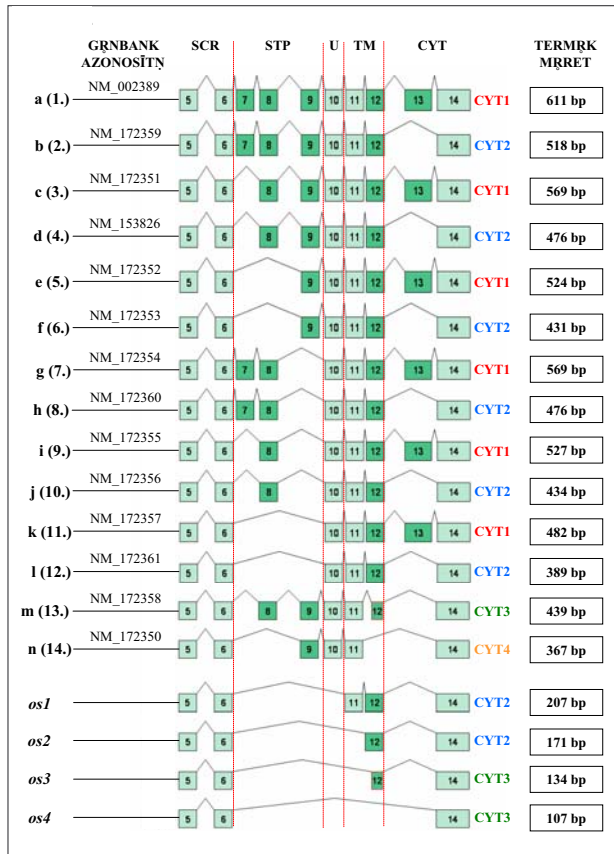
13). Fontos megjegyezni, hogy eddig nem írtak le sajátos szerepet vagy betegséget, amely a különböző CD46 izoformák ko-expressziójához kapcsolódna (12, 13). A CD46 az egyes emberi szövetekben igen különböző expressziós szinteket mutat. A CD46 erősen fejeződik ki az epitheliális sejtek a fibroblastok és a chondrocyták felszínén; közepesen a lymphocyták és az endothel sejtek felszínén; és alig kimutathatóan az osteoclastok és az osteocyták sejtmembránjában (7, 13).

A CD46 mRNS-ében az 1–6. exonok alkotják a konzervatív régiót (1. ábra) (12). Ezek az exonok felelősek a CD46 CCPs (Complement Control Protein repeats) és SCR (Short Consensus Repeat) moduljainak kódolásáért, amelyek a kanyaróvírus és a HHV6 (Human Herpes Virus 6) receptorai (1. ábra) (14, 15). A 7–9. exonok kódolják az erősen O-glikozilált STP (Serine-Threonine-Proline rich region) domént, amely fontos szerepet játszik az extracelluláris mátrixhoz való kötődésben és a *Neisseria*-fajok receptorként is ismert (1. ábra) (14–16). A 7–9. és a 13. exonok alkotják az alternatív „splicing” által leginkább érintett hypervariábilis régiót (12). A 10. exon kódoló funkciója ismeretlen. A 11–12. exonok kódolják a transzmembrán domént (1. ábra). A 13–14. exonok kódolják a CD46 molekula citoplazmatikus farkát, amely különböző kinázokat megkötvete, alapvető szerepet játszik a citoplazmatikus jelátvitel kezdeti szakaszában (1. ábra). Az általánosan elterjedt CD46 izoformák (a-1) két fő citoplazmatikus doménnel rendelkezhetnek: egy rövidebb CYT-1 (13. exon (stop kodon) és 14. exon; 17 aminosav) és egy hosszabb CYT-2 típusal (14. exon; 24 aminosav) (1. ábra) (12, 16). Azonban az „m” és az „n” izoformákat két meglehetősen ritka citoplazmatikus fark jellemzi, melyek jelátviteli folyamata ismeretlen: CYT-3 (14. exon; 25 aminosav) és CYT-4 (14. exon; 25 aminosav) (1. ábra) (12, 16). A CYT-1 típus esetén a C-terminális kazein-kináz II és protein-kináz C foszforilációs helyeket tartalmaz, míg a CYT-2 típus az src-kinázt és a kazein-kináz II-t köti, amely a CYT-1 és CYT-2 végű CD46 izoformák teljesen eltérő jelátviteli folyamatait tükrözi (12, 16).

Az emberi CD4+ lymphocytákban az aktivált CD46 molekulák keresztükötése Vav (GTPáz család tagja) és Rac (Related to PKA and PKC kinase) aktivációt indukál. A keresztükötés az Erk (extracellular signal-regulated kinase), a mitogén aktivált kináz (MAK), a p120CLB és a LAT (Linker for Activation of T-cells) adapter fehérjék foszforilációját is kiváltja (17, 18). A CD46 által mediált szignálok az emberi CD4+ T-sejtek TCR (T-cell receptor) dependens proliferációját és indukcióját is kiváltják, emellett hozzájárulnak a regulátor T1-sejtek kialakulásához is (17, 19, 20). Fontos hangsúlyozni, hogy a CD46 által

közvetített jelátvitel lényegesen nagyobb T-sejt aktivációt eredményez, mint a hagyományosan fontosnak tartott CD3 és CD28 függő folyamatok (19, 21).

A kanyaróvírus hemagglutininje az előbb említett CCPs régióhoz kötődik (21). A kanyaróvírus által így aktivált CD46 molekulák összekapcsolódnak a moe-



1. ábra: A CD46 14 exont (zöld téglalapok) tartalmazó mRNS-e 1 génről (1q32) íródik át és az alternatív „splicing” során 14 eddig ismert izoformát kódol. Az 1-4. exonok, amelyek a CCPs régiót (Complement Control Protein repeats) kódolják, nem láthatók ezen az ábrán, mert minden variánsban azonos, igen konzervatív szakaszként jelennek meg. A CCPs domént az SCR- (Short Consensus Repeat; 5-6. exonok) és az erősen O-glikozilált STP-kódoló régiók követik (Serine-Threonine-Proline rich; 7-9. exonok). Az STP-t a transzmembrán domén (TM; 11-12. exonok) és a citoplazmatikus farok követi (CYT; 13-14. exonok). A 10. exon egy ismeretlen (U) jelentőségű régiót kódol. A citoplazmatikus, jelátviteli doménnek négy típusa van: CYT-1 (13. és 14. exonok; 17 aminosav), CYT-2 (14. exon; 24 aminosav), CYT-3 (a 14. exon „frame shift”-je; 25 aminosav) és a CYT-4 („frame shift” a 14. exonban; 25 aminosav). Az otosclerosisos stapes mintákban négy új CD46 „splicing” variánst azonosítottunk, amelyeket os1, os2, os3 és os4 jelöléssel láttunk el (génbank regisztráció folyamatban). Az újonnan felfedezett CD46 variánsokból részlegesen hiányzott a transzmembrán domén, ezzel szemben a vírus receptor régió konzervatív módon megmaradt. Az os4 izoforma nagy valószínűséggel szolubilis fehérje és nem fejeződik ki a sejtfelületen. Az os1 és az os2 variánsokat a CYT-2 típusú, míg az os3 és az os4 variánsokat a meglehetősen ritka CYT-3 típusú citoplazmatikus domén jellemzte

sin-nel (Membrane Organizing Extension Spike Protein), amely csökkent IL-12 (Interleukin-12) termelést eredményez és hozzájárul az SHP-1 (inhibitory protein tyrosine-phosphatase) molekulák akkumulációjához a CD46 citoplazmatikus doménje körül (22). Ez a folyamat fokozza az IL12p40 (Interleukine-12 p40) termelést, amely végső soron szabályozza a Th1 (T helper 1 lymphocyte) és a Th2 (T helper 2 lymphocyte) sejtek arányát az immunválasz korai szakaszában (19, 22).

Tanulmányunkban megvizsgáltuk a különböző CD46 „splicing” variánsok expressziós mintázatát otosclerosisos, nem-otosclerosisos és normális stapes talpakban. Eredményeink igazolták az otosclerosisos asszociált alternatív „splicing” jelenlétét, amely egyedülálló expressziós mintázatot kialakítva felelős lehet az oticus capsulában kialakuló, perzisztáló kanyaróvírus fertőzésért.

Anyagok és módszerek

Betegek és kontroll minták

Százharminchétf stapes talpat vizsgáltunk (N=137, férfiak=57, nők=80). A minták közül 99 ankyloticus volt, ezeket stapedectomy során távolítottuk el és azonnal formalinban fixáltuk. A betegek átlagéletkora 37,33 év volt (tartomány: 19–67 év). A stapes ankylosis diagnózisát a klinikai vizsgálat, az audiometria és a tympanometria leleteire alapoztuk. Az 1000 Hz-en mért csont-lég köz minden esetben elérte a 30 dB-t. Tizenhárom beteg emlékezett gyermekkori kanyaróvírus fertőzésre és 31 másik beteg (1969 után született) kapott kanyaróvírus ellenes, monovalens védőoltást. A stapes fixáció a betegcsoport kétharmadában bilaterális volt, azonban egy betegtől csak egy minta származott, mivel a vizsgálat ideje alatt az esetek nagy részében csak egyoldali stapedectomy történt. Negatív kontrollként 38 negatív fülészeti anamnézissel bíró cadaver stapes mintáját használtuk (N=38, férfiak=16, nők=22), melyeket az exitust követő 24 órán belül távolítottunk el. A negatív kontrollok átlagéletkora 51,85 év volt (tartomány: 42–69 év). A mintákat 2005. októberétől 2008. februárjáig gyűjtöttük.

Szövetten és CD46-specifikus immunhisztokémiai vizsgálatok

A 137 stapes mintát 10%-os formalinban fixáltuk, majd 0,5 M-os Na-EDTA (nátrium etilén-diaminotetraacetát, 72 óra, 4 °C) dekalcináltuk. A mintákat 15%-os, tisztított zselatinba ágyaztuk (24 óra, 56 °C), majd 4%-os paraformaldehidben újrafixáltuk (24 óra, 20 °C). A szövettani blokkokat krioprotekció céljából 20%-os szacharóz-oldatba helyeztük (2 óra, 4 °C), majd kriomikrotómmal 10 µm vastagságúra metszet-

tük (–25°C). A metszeteket 0,1 M-os, nátrium-azidot tartalmazó PBS-oldatban (phosphate-buffered saline) tároltuk 4 °C-on. A 10 µm vastagságú, fagyaszott metszeteket mintánként három csoportra osztva a következők szerint vizsgáltuk: 1. Nukleinsav extrakció és RT-PCR; 2. Hematoxilin-eozin festés; 3. CD46-specifikus immunfluoreszcens reakció. A metszetek harmadik sorozatát normál kecske szérumot tartalmazó, 0,2 M-os PBS-ben mostuk, majd 0,2 mg/ml poliklonális kecske anti-humán primer CD46 antitest oldatban inkubáltuk (20 °C, 48 óra, folyamatos rázás) (R&D Systems, UK). A primer antitestet 0,2 M-os PBS-sel kimostuk, majd a metszeteket 0,008 mg/ml egér (15H6 klón) kecske-ellenes, FITC jelölt (fluorescein isothiocyanate isomer 1) IgG_{1K} oldattal inkubáltuk (20 °C, 12 óra, folyamatos rázás) (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). A metszeteket UV-fény áteresztő fedőanyaggal fedtük le (Vectashield, Vector Laboratories, CA, USA). A képek készítése UV-fény alatt, 96–123 ms expozíciós idővel történt, az archiválást jpeg fájl formátumban végeztük el (Axioskop2 MOT, Axiovision 3,0, Zeiss, Jena, Germany).

Nukleinsav extrakció

A homogenizált szövettani metszetekből TRI Reagent-oldattal a gyártó utasításai szerint (Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis, USA) kivontuk a teljes RNS tartalmat. A Tri Reagent-oldatot és a felszuszpendált anyagot erőteljesen összekevertük, majd szobahőmérsékleten 10 percig állni hagytuk. A szuszpenzióhoz kloroformot (100 µl; Sigma-Aldrich) adtunk, majd rázás és inkubálás következett (szobahőmérséklet, 10 perc). A mintákat 13 000 rpm fordulatszámot alkalmazva, 15 percen át, 4 °C-os hőmérsékleten centrifugáltuk (Jouan 5145C, France). A felülúszó vizes fázisát leszívtuk, majd ehhez izopropanolt (250 µl; Sigma-Aldrich) adtunk. Az RNS precipitációt egy éjszakán keresztül, –70 °C-on végeztük. A precipitáció végeztével a mintákat 13 000 rpm fordulatszámon 30 percen át, 4 °C-os hőmérsékleten lecentrifugáltuk. A kicsapódott RNS egy kis pehelyként (pellet) jelent meg a csövek alján. Az RNS pelyheket 70%-os etanollal átmostuk, kiszárítottuk, majd 20 µl DEPC-kezelt (diethyl-pirokarbonát), hősterilizált, desztillált vízben újra feloldottuk.

Kanyaróvírus kimutatás – RT-PCR

A kanyaróvírus nukleoproteint (NP) kódoló RNS-t specifikus primerekkel (MV2 5'–3': GTT CTT CCG AGA TTC CTG CCA és MV3 5'–3': GCA TCT GAA CTC GGT ATC AC) (1. táblázat) sokszorosítottuk. Az RT (reverz transzkriptáz) és a cDNS-PCR során *rTth*-enzimet alkalmaztunk (Applied Biosys-

tems, Lincoln, Foster City, USA). A komplementer DNS-t *Red-Taq DNS-polimerázzal* (Sigma-Aldrich) amplifikáltuk a „semi-nested” PCR során. Két NP RNS-specifikus primer kombinációt alkalmaztunk (MV3 és MV4 5'–3': AGC TCT CGC ATC ACT TGC TCT; MV2 és NP14 5'–3': GCA AGG AAG ATA GGA GGG TC) (1. táblázat). Az RNS minták validitását az emberi riboszómális RNS-re tervezett h36B4+ (5'–3': AGA TGC AGC AGA TCC GCA T) és h36B4– (5'–3': ATA TGA GGC AGG AGT TTC TCC AG) primerek alkalmazásával ellenőriztük. A celluláris kontroll RT-PCR során „enhanced avian” reverz-transzkriptázt (Sigma-Aldrich) és genomikus *Red-Taq DNS polimerázt* alkalmaztunk (Sigma-Aldrich). Az otosclerosisos stapes talpak pozitív kontrolljaként élő, attenuált, Edmonston-típusú kanyaróvírus törzset használtunk. A keresztszennyezések elkerülése végett, RNS-mentes negatív kontrollokat is beállítottunk.

A CD46 izoformák kimutatása – RT-PCR

Az RNS mintákat, mint kezdőanyagot használtuk a kétlépéses protokollt tartalmazó RT-PCR során (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems). Az RT reakció három hőmérsékleti lépcsőből állt: 10 perc 25 °C-on, 120 perc 37 °C-on, és 5 másodperc 85 °C-on. A reakció elegy (20 µl) a következőket tartalmazta: 100 pg RNS, 50 IU „MultiScribe Reverse Transcriptase” enzim, 10× RT puffer, 10 IU RNáz inhibitor, CD46 cDNS-specifikus antiszenz primer (CD46Krev 5'-GGA GTG GTT

1. táblázat.

A multiplex „semi-nested” RT-PCR során alkalmazott CD46- és kanyaróvírus nukleoprotein (NP) RNS-specifikus oligonukleotid primerek jellemzői

Primer	Szekvencia (5'-3')	Tm (°C)*	Exon	Kapcsolódási hely
<i>CD46 mRNS-specifikus primerek</i>				<i>CD46 grn</i>
46Kfor (+)	GAG TGT AAA GTG GTC AAA TGT CG	62.3	5.-6. határ	+1432 - +1470
46Krev (-)	GGA GTG GTT GAT TTA GTC TGG TAA	62.0	14.	+3394 - +3417
46Bfor (+)	TCG ATG GCA GCG ACA CAA	68.2	6.	+1567 - +1584
46Brev (-)	GGT AAG TGG CAT ATT CAG CTC CA	65.9	14.	+3376 - +3398
<i>Kanyaróvírus nukleoprotein RNS-specifikus primerek</i>				<i>MV** RNS genom</i>
MV3 (+)	GCA TCT GAA CTC GGT ATC AC	59.7	1.	+1267 - +1287
MV4 (-)	AGC TCT CGC ATC ACT TGC TCT	65.5	1.	+1458 - +1479
MV2 (-)	GTT CTT CCG AGA TTC CTG CCA	67.5	1.	+1588 - +1609
NP14 (+)	GCA AGG AAG ATA GGA GGG TC	61.5	1.	+1427 - +1450
*Tm: olvadáspont (melting temperature)				
**MV: kanyaróvírus (measles virus)				

GAT TTA GTC TGG TAA-3'; 1 μ M), végül dezoxiribonukleotid (dNTP) mix minden dNTP-re nézve 100 μ M-os végső koncentrációban (1. táblázat). A cDNS specifikus PCR „AccuTaq LA” DNS polimeráz (Sigma-Aldrich) felhasználásával történt, melyben a CD46 mRNS hipervariábilis régiójára tervezett primereket alkalmaztunk (CD46Kfor 5'-GAG TGT AAA GTG GTC AAA TGT CG-3' és CD46Krev) annak érdekében, hogy az alternatív transzkripció variánsok párhuzamosan is sokszorozódjanak (1. táblázat). Annealációs és extenziós profil: 60 °C és 68 °C, 35 cikluson keresztül, majd záró lépésként 2 perc 68 °C-on. Minden kísérlet során beállítottunk DNS-mentes negatív kontrollt is.

A cDNS tisztítása

A PCR termékeket (cDNS) 10%-os poli-akril-amid gélben szeparáltuk (sodium-dodecyl-sulphate poly-acryl-amide gel-electrophoresis; SDS PAGE), majd a gélből kivontunk. A géleket 20 percig 0,5 μ g/ml koncentrációjú etidium-bromiddal festettük. A DNS sávokat – amelyek megfeleltek az egyes CD46 „splicing” variánsoknak – UV fény alatt a gélekből szikével kivágtuk. A gél darabkákat 300 μ l elúciós pufferrel kezeltük (pH 8,0; 0,5 M ammónium-acetát, 1 mM ED-

2. táblázat.

Az otosclerosis és nem-otosclerosis stapes talpakban észlelt CD46 „splicing” variánsok relatív expressziós (kifejeződési) szintjeinek átlaga. A bemutatott CD46 expressziós mintázatok jellemzők minden egyes otosclerosis és nem-otosclerosis mintára

Nem-otosclerosis stapes talpak (N=72)		Otosclerosis stapes talpak (N=65)	
Kifejezett CD46 splicing variánsok (hiányzó exonok)	Relatív expressziós szint* - OD (SD)**	Kifejezett CD46 splicing variánsok (hiányzó exonok)	Relatív expressziós szint - OD
e (-7)	2.6 (0.33)	e (-7)	1.2 (0.01)
d (-7, -13)	6.3 (0.82)	d (-7, -13)	3.6 (0.23)
e (-7, -8)	2.4 (0.41)	e (-7, -8)	1.8 (0.08)
f (-7, -8, -13)	4.2 (0.53)	f (-7, -8, -13)	4.2 (0.27)
1 (-7, -8, -9, -13)	1 (0.11)	1 (-7, -8, -9, -13)	1 (0.03)
-	0	os1 (-7, -8, -9, -10, -13)	6.8 (0.44)
-	0	os2 (-7, -8, -9, -10, -11, -13)	6.7 (0.62)
-	0	os3 (-7, -8, -9, -10, -11, s12, -13)***	2.2 (0.21)
-	0	os4 (-7, -8, -9, -10, -11, -12, -13)	3.7 (0.13)

*Denzitometriás eredmények
**SD: standard deviáció
***s: rövidebb exon

TA; 24 óra, 37 °C). Az inkubációt követően a DNS-t a felülúszóból 100%-os etanollal precipitáltuk. A DNS pelyhet 70%-os etanollal mostuk, kiszárítottuk és 20 μ l TE pufferben (pH 7,5) reszuszpendáltuk.

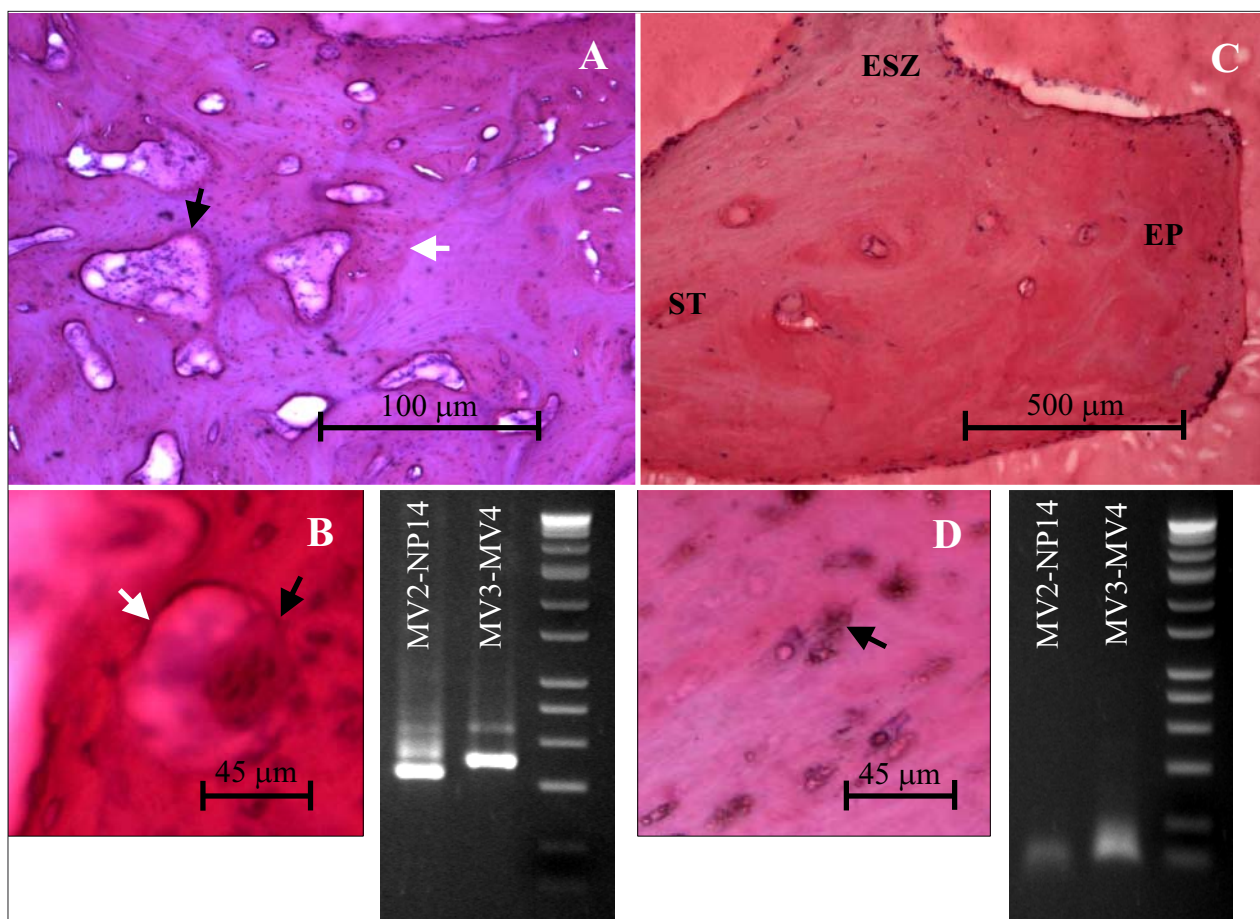
A CD46 izoformák szekvencia elemzése

A tisztított PCR terméket egy „nested” primer párral sokszorozítottuk (CD46Bfor 5'-TCG ATG GCA GCG ACA CAA-3' és CD46Brev 5'-GGT AAG TGG CAT ATT CAG CTC CA-3') majd szekvencia elemzést, szekvenálást végeztünk (1. táblázat). A szekvenálást „Big Dye terminator 3,1” szekvenáló kittel végeztük el (Applied Biosystems). A szekvenáló elegyet és a szekvenálás termékeit egy ABI PRISM 3100-Avant típusú génelemző DNS szekvenáló rendszerben visszaoldottuk (Applied Biosystems).

Eredmények

Az emberi celluláris RNS-t mind a 137 stapes talp mintában kimutattuk. Ennek megfelelően, minden minta alkalmas volt a kanyaróvírus kimutatásra és a CD46 „splicing” variánsainak tipizálására. A szövettani leletek erős összefüggést mutattak a kanyaróvírus-specifikus RT-PCR eredményeivel. A vírus eredetű nukleoprotein RNS-t kizárólag a szövettanilag is otosclerosis stapes talpakban tudtuk kimutatni (N=65) (2. ábra). A vírusnegatív (N=34) stapes talpak kórszövettanát nem-otosclerosis, degeneratív elváltozások jellemezték (2. ábra, 3. ábra). A harmincnégy, nem-otosclerosis stapes talp esetén a szövettani vizsgálat változatos eredményt adott: annuláris kalcifikáció (az elnevezés Prof. Dr. Z. Szabó Lászlótól származik) csökkent cellularitással és hypovascularizációval (N=28); haemosiderosis kiterjedt poláris, bipoláris osteolysisel és számos hemosziderin-tartalmú macrophággal (N=3); végül fibrosis poláris, perivascularis mononukleáris infiltrációval, kötőszövet akkumulációval és vaskos dobüregi mucosával (N=3) (2. táblázat, 2. ábra, 3. ábra). A negatív kontrollként alkalmazott cadaver stapes minták (N=38) nem tartalmaztak kanyaróvírus RNS-t. Az otosclerosis (N=65) szövettanilag vasculáris és pseudovasculáris elemekből álló osteolyticus góccok jellemezték, amelyek számos, erős CD46 immunreakciót adó osteoclastot, osteoblastot, fibroblastot és osztódó endothel sejtet tartalmaztak (3. ábra). Ezzel szemben a nem-otosclerosis stapes talpakban (N=34) és a cadaver stapes mintákban (N=38) csak az osteocyták felszínén tapasztaltunk alig észrevehető CD46 immunreakciót (3. ábra).

Előzetes eredményeink alapján egyértelművé vált, hogy a CD46 izoformák cDNS-ének szekvencia elemzése elkerülhetetlen a „splicing” variánsok tipizálásához, hiszen az RT-PCR során keletkező cDNS termé-

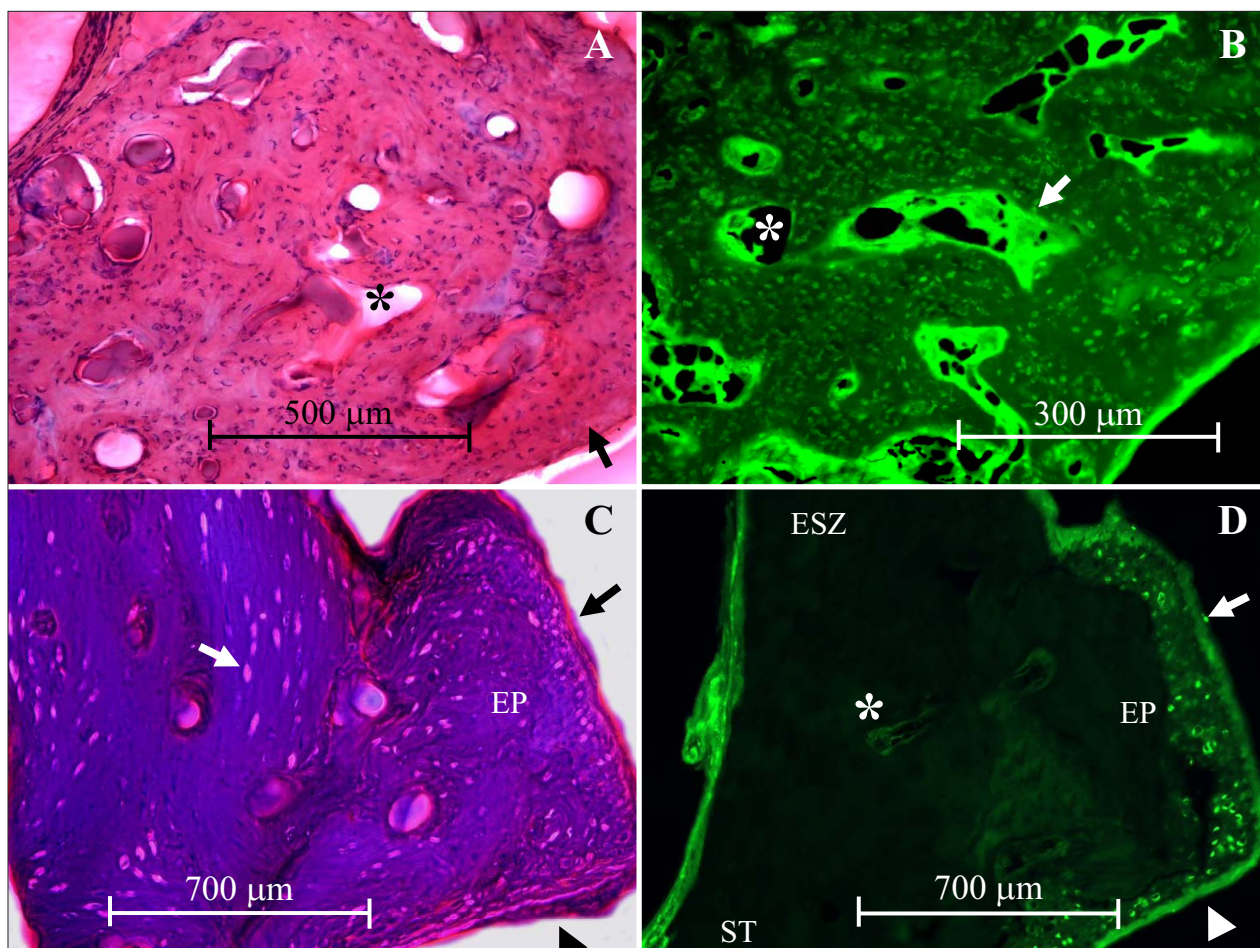


2. ábra: A kanyaróvírus NP RNS-ének RT-PCR kimutatása összefüggésben az otosclerosisos és nem-otosclerosisos stapes talpak szövettani leleteivel (hematoxilin-eozin). A: Közepes aktivitású (II. grádus) otosclerosisos góc a stapes talp elülső pólusában. A fekete nyíl egy tágas pseudovasculáris üregre mutat, amelyet szabálytalan alakú, felfújtt osteoclastok töltenek ki. A perivasculáris, sejtdús, élénken basophil területet fehér nyíl jelöli. A kanyaróvírus NP RNS mindkét „semi-nested” primer párral kimutatható volt (MV3-MV4, MV2-NP14). B: Egy multinucleáris osteoclastokkal (fekete nyíl) kitöltött, Howship-típusú pseudovasculáris lakúna (fehér nyíl) nagy nagyítású képe. C: Annuláris kalcifikáció hypocellularitással és csökkent vascularisatióval. A stapes talp (ST) megvastagodott, az elülső pólus (EP) szögletes és tömeges. Az elülső szár (ESZ) szabályos. A kanyaróvírus specifikus RT-PCR negatív volt. D: A lokalizált haemosiderosis nagy nagyítású képe. A haemosiderophágokat fekete nyíl mutatja

kek bázispárban kifejezett mérete között nagyon kis különbség volt (1. ábra, 4. ábra A). A cDNS szekven-
cia elemzése után megállapítottuk, hogy a normális
és a nem-otosclerosisos stapes talpakban (N=72) a
CD46 „c”(3.), „d”(4.), „e”(5.), „f”(6.) és „l”(12.) va-
riánsai mutattak konzisztens ko-expressziót (2. táblá-
zat, 4. ábra A). Az utólag elvégzett denzitometria je-
lentős különbséget igazolt a fenti „splicing” variánsok
expressziós szintjeiben: a „d” variáns fejeződött ki a
legnagyobb mennyiségben, ezt követte a „c”, „f”, „e”
és „l” izoformák expressziója (2. táblázat, 4. ábra A,
B). Az otosclerosisos stapes talp mintákban (N=65)
a „c”, „d”, „e”, „f” és „l” izoformák ko-expressziója
ugyancsak megjelent, bár az expressziós arányok kissé
különböztek: a legmagasabb kifejeződési szintet az
„f” és a „d” „splicing” variánsok adták (2. táblázat, 4.
ábra A, B). Rendkívül meglepő eredményként, négy
eddig ismeretlen CD46 „splicing” variáns jelenlétét is

kimutattuk minden egyes otosclerosisos stapes talp-
ban, melyeket *os1*, *os2*, *os3* és *os4* elnevezéssel illet-
tünk (2. táblázat, 1. ábra, 4. ábra A, 5. ábra). Mindegyik
újonnan felfedezett CD46 mRNS „splicing” variáns
tartalmazta a CD46 gén 1–6. és 14. exonjairól átíró-
dott, hibátlan RNS szekvenciákat (1. ábra, 5. ábra).
Továbbmenve, az *os1* elnevezésű izoforma tartalmazta
a 11. és a 12. exonokat is. Az *os2* esetén az alternatív
„splicing” nem érintette a 12. exont. Az *os3* transzkri-
pciója során az alternatív „splicing” egy a normális-
nál sokkal rövidebb 12. exont eredményezett, míg az
os4 esetén a teljes variábilis régió hiányzott (1. ábra,
5. ábra).

Fontos hangsúlyoznunk, hogy minden *os* variáns-
ban sikerült azonosítanunk az mRNS 5' végén elhe-
lyezkedő szignalizációs szekvenciát, amely az *endoplas-
maticus reticulumban* zajló fehérje transláció elin-
dításáért, és ennek megfelelően a fehérje szintézisért



3. ábra: A CD46 expresszió immunhisztokémiai bemutatása otosclerosisos és nem-otosclerosisos stapes ankylosis esetén. A: A stapes talp elülső pólusában elhelyezkedő, magas aktivitású (I. grádus), obliteratív otosclerosisos góc fénymikroszkópos képe (hematoxilín-eozin). Jellemző a hypercellularitás és a számos osteoclast jelenléte. A pseudovasculáris ürök szinte mirigyyszerű szerkezetet mutatnak (fekete csillag). A stapes talp vestibuláris felszínének hyalín porc rétegét fekete nyíl jelöli. B: Aktív, hypervascularisált, és hypercelluláris otosclerosisos góc igen erős, összefolyó CD46 immunreakcióval. A pseudovasculáris üröket (fehér csillag) CD46 pozitív osteoclastok töltik ki (fehér nyíl). C: Egy annuláris kalcifikációt mutató stapes talp polarizált fénymikroszkópos képe (hematoxilín-eozin). Fontos kiemelni az üres sejttárnnyékok jelenlétét (fehér nyíl) és a tömeges elülső pólust (EP), amely éles törött szélekkel rendelkezik (fekete nyíl). A fekete nyílhegyek jelölik a stapediovestibuláris felszínt. D: Annuláris kalcifikáció a megvastagodott stapes talp (ST) elülső pólusában (EP) igen gyenge CD46 immunreakcióval. Az elülső szár (ESZ) ép szerkezetű. A fehér nyíl és nyílhegy a stapediovestibuláris felszínt jelöli. A fehér csillag egy tágult eret mutat, melynek endotheliuma erősen CD46 pozitív

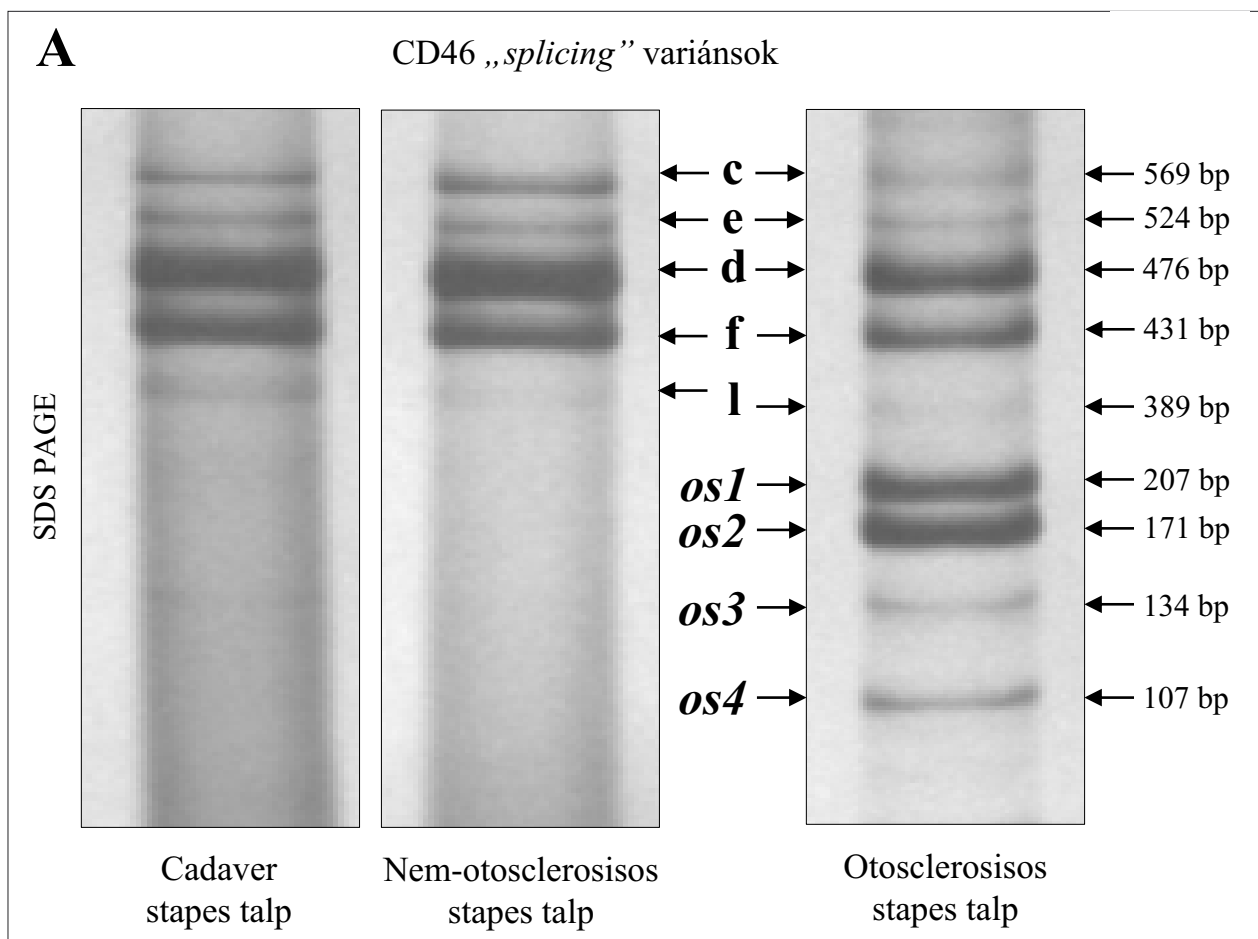
felelős (5. ábra). Ezen szignalizációs szakaszok jelenléte nélkül fehérjeszintézis biztosan nem történne, ezért az *os* variánsok felfedezése jelentőségét vesztené. Az *os1* variáns intakt transzmembrán domént kódol, ezzel szemben az *os2* és az *os3* elnevezésű variánsok által kódolt transzmembrán domének a normálnál lényegesen rövidebbek s a funkciójuk is ismeretlen (5. ábra). Az *os4* variáns nagy valószínűséggel egy citoplazmatikus, szolubilis CD46 izoforma (5. ábra). Az *os1* és az *os2* izoformákat a jól ismert és általánosan elterjedt CYT-2 típusú citoplazmatikus fark jellemezte, míg az *os3* és az *os4* jelű variánsok a meglehetősen ritkán előforduló CYT-3 típusú citoplazmatikus domént kódolták (5. ábra). Minden egyéb

változás mellett, a kanyaróvírus kötődéséért felelős domének konzervatívak maradtak (1. ábra, 5. ábra).

Az otosclerosisos stapes talpakban (N=65), az újonnan felfedezett *os1*, *os2*, *os3* és *os4* variánsok együttes kifejeződése (ko-expressziója) szignifikáns összefüggést mutatott a kanyaróvírus kimutathatóságával (N=65) ($p < 0,000$, Yates-korrigált, χ^2 próba).

Megbeszélés

Annak ellenére, hogy irodalmi adatok szerint eddig egyetlen ismert betegség sem mutatott összefüggést a különböző típusú és mintázatú CD46 izoforma ko-expresszióval, eredményeink statisztikailag meg-



4. ábra: A különböző CD46 variánsok elektroforézissel történő elkülönítése és azonosítása (SDS-PAGE)
 A: A CD46 mRNS-ének RT-PCR technikával történő sokszorosítása normális, nem-otosclerosis és otosclerosis stapes talpakban. A „c”, „d”, „e”, „f” és „l” izoformák ko-expresszióját minden mintában tapasztaltuk, szemben az otosclerosisos mintákkal, amelyekben négy új, eddig teljesen ismeretlen „*splicing*” variánst is azonosítottunk.

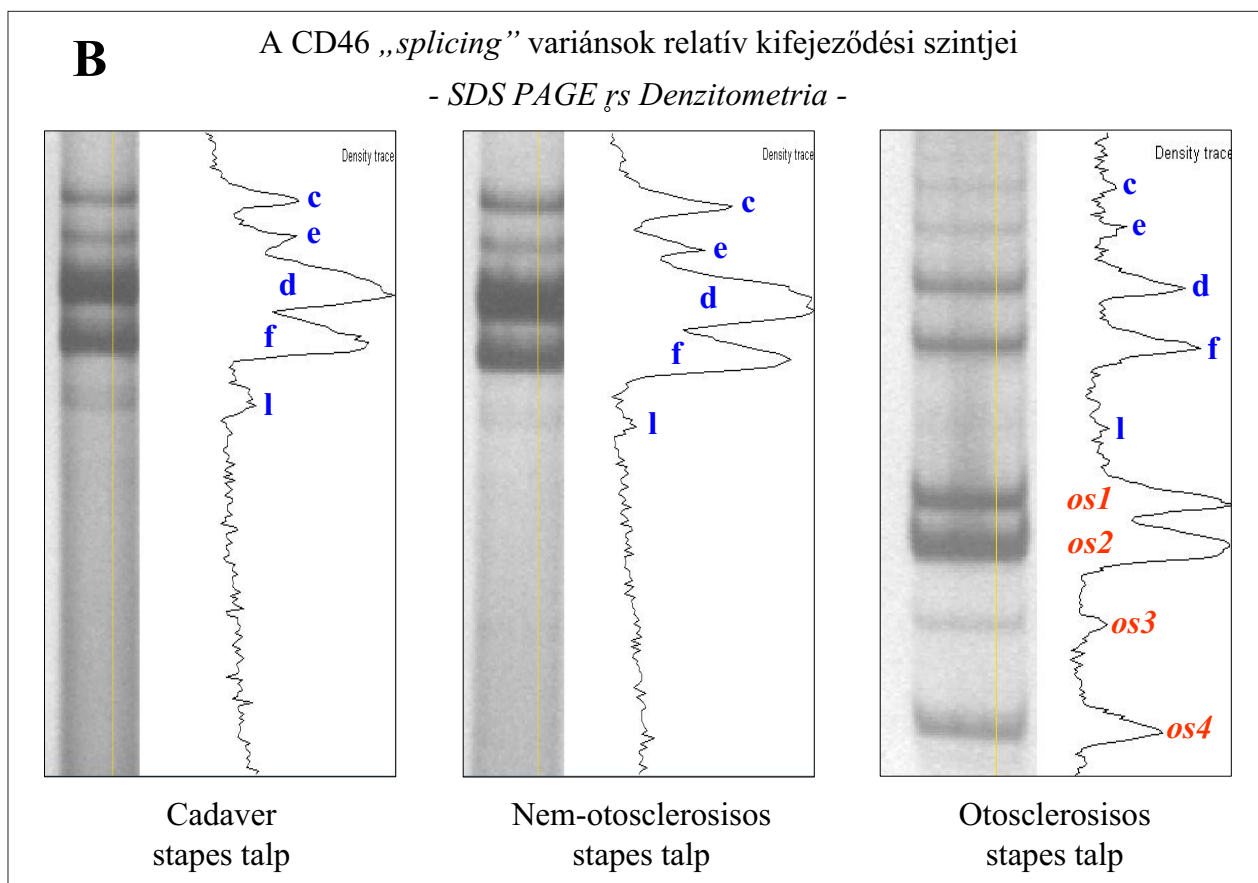
erősített módon igazolják az új CD46 variánsok és az otosclerosis vírus eredete közötti szoros kapcsolatot.

Az újonnan felfedezett és leírt CD46 izoformák rövidebb vagy hiányzó transzmembrán- és szokatlan citoplazmatikus doméneket tartalmaznak, azonban víruskötő képességük mindezek ellenére változatlan maradt. Ezek a változások funkcionális következményekkel járnak a citoplazmatikus jelátviteli folyamatokban, amelyek végső soron zavartalan kanyaróvírus replikációhoz vezethetnek az oticus capsulában. Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy a nem funkcionáló illetve a szolubilis CD46 molekulák anélkül teszik lehetővé a kanyaróvírus sejtekbe történő internalizációját, hogy a primer CD4+ T-sejtek TCR dependens aktivációja és a következményes B-sejt függő, vírus ellenes immunglobulin termelés bekövetkezne (19, 23, 24). Az otosclerosisos betegek kanyaróvírus ellenes szérumszintje szignifikánsan csökkent (8, 9). Az otosclerosisra jellemző csökkent illetve hiányzó kanyaróvírus ellenes, humorális immunválasz az újonnan felfedezett, defektív funkciókkal ren-

delkező CD46 izoformák oticus capsulán belüli expressziójának következménye lehet. A kanyaróvírus oticus capsula iránt mutatott organotropizmusának oka a vírusreceptorok különleges, szervhez kötött expressziós mintázata lehet (7, 25).

A CD46 transzmembrán és szolubilis izoformáit emberi szövetekben és transzgénikus egerekben egyaránt azonosították (14, 15). A transzgénikus egerekben egy alternatív módon átíródott (és módosított) exon felelős a szolubilis, citoplazmatikus CD46 variánsok kialakulásáért (14, 15). Fontos kiemelnünk, hogy ugyan találtak már szolubilis CD46 variánsokat különböző emberi testnedvekben, de az ezeket kódoló mRNS-t eddig még nem sikerült azonosítani, ezért ezeket a variánsokat eddig proteolitikus termékeknek tekintették (15). Jelen tanulmányunk közvetlen bizonyítékokat szolgáltat egy emberben kifejeződő, szolubilis CD46 variáns (*os4*) alternatív „*splicing*” által meghatározott keletkezésére.

Azok a fehérjék, amelyek egyetlen gén különböző „*splicing*” variánsainak formájában expresszálódnak,



4. ábra: A különböző CD46 variánsok elektroforézissel történő elkülönítése és azonosítása (SDS-PAGE)
B: A különböző CD46 „*splicing*” variánsok relatív expressziós szintjeinek vizsgálata denzitometria segítségével normális, nem-otosclerosisos és otosclerosisos stapes talp mintákban. A normális és a nem-otosclerosisos stapes talpakban a „d” variáns mutatta a legmagasabb expressziós szintet, amelyet a „c”, „f”, „e” és „l” izoformák kifejeződése követett. Otosclerosis esetén, a legmagasabb expressziót az os1 és az os2 variánsok mutatták.

ugyan nem követik a hagyományos öröklésmenteket, de nagyon könnyen utánozhatnak közülük egyet (5, 12). Az otosclerosis bizonytalan autoszómális domináns öröklésmentet követő, inkomplett penetranciával jellemzett, familiáris esetei nagy valószínűséggel a kanyaróvírus receptorok oticus capsulán belül bekövetkező, egyedülálló alternatív „*splicing*”-jának következményei. Egy lényeges kérdés azonban továbbra is felvetődik: a kanyaróvírus indukálja az új CD46 „*splicing*” variánsok kifejeződését vagy az új defektív CD46 izoformák vezetnek fokozott vírus affinitáshoz és zavartalan vírusreplikációhoz? Tapasztalataink alapján azt gondoljuk, hogy a válasz az alternatív „*splicing*” szabályozó fehérjéinek expressziójában rejlik, amelyek végső soron a CD46 speciális expressziós mintázatához és megváltozott funkcióihoz vezetnek, magyarázva ezzel az otosclerosis vírus asszociált és szervspecifikus etiopathogenezisét.

Összefoglalva, megállapíthatjuk, hogy a kanyaróvírus inkább trigger szerepet tölt be az otosclerosisos csontátépülés etiopathogenezisében és nem tekinthető valóságos etiológiai tényezőnek. A perzisztáló kanyaró-

vírus fertőzés és az otosclerosis etiológiai kapcsolatát egyértelműen akcidentális viszonyoknak tekinthetnénk a kanyaróvírus kötő CD46 receptorok szervspecifikus posztranszlációs érintettsége nélkül. Továbbmenve, az otosclerosisban tapasztalt kóros csontremodelláció alapját az új CD46 „*splicing*” variánsok expressziója alkothatja.

Köszönetnyilvánítás

Munkánk az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok Posztdoktori Ösztöndíjának (OTKA PD75371) és a Debreceni Egyetem Mecenatúra Pályázatának (DEOEC Mec 17/2008) anyagi támogatásával készülhetett el.

Irodalomjegyzék

1. Niedermeyer H.P., Arnold W. Otosclerosis: a measles virus associated inflammatory disease. *Acta Otolaryngol* 115 (2): 300–303, 1995.
2. Niedermeyer H.P., Arnold W., Schuster M., Baumann C., Kramer J., Neubert W.J., Sedlmeier R.: Persistent measles

OS1 – CYT2:

-CTGYGKGCAGTACAGTACTTGGGATCCCCCAGTTCCAAAGTGTCTTAAAG^{11.}ATGTTTGGGTCATTG
 CTGTGATTGTTATTGCCATAG^{12.}TTGTTGGAGTTGCAGTAATTTGTGTTGTCCCGTACAGATATCTTC
 AAAGGAGGAAGAAGAAAG^{14.}GAAAGCAGATGGTGGAGCTGAATATGCCACTTACC..... 3Æ
 G K A D G G A E Y A T Y QTKSTTPAEQRG

OS2 – CYT2:

-CTGYGKGCAGTACAGTACTTGGGATCCCCCAGTTCCAAAGTGTCTTAAAG^{12.}TTGTTGGAGTTGCAG
 TAATTTGTGTTGTCCCGTACAGATATCTTCAAAGGAGGAAGAAGAAAG^{14.}GAAAGCAGATGGTGGGA
 GCTGAATATGCCACTTACC..... 3Æ
 A E Y A T Y QTKSTTPAEQRG

OS3 – CYT3:

-CTGYGKGCAGTACAGTACTTGGGATCCCCCAGTTCCAAAGTGTCTTAAAG^{12.}ATATCTTCAAAGGAG
 GAAGAAGAAAG^{14.}GAAAGCAGATGGTGGAGCTGAATATGCCACTTACC..... 3Æ
 G R R K G K Q M V E L N M P L T RLNQPLQQSREAE

OS3 – CYT3:

-CTGYGTGCGTAMGTACTTGGGATCCCCCAGTTCCAAAGTGTCTTAAAG^{14.}GAAAGCAGATGGTGGAG
 D I F K G G R R K G K Q M V E
 CTGAATATGCCACTTACC..... 3Æ
 L N M P L T RLNQPLQQSREAE

5. ábra: Az új, otosclerosis-sal asszociált CD46 „splicing” variánsok cDNS-ének szekvencia analízise. Az os1 és az os2 izoformák a CYT-2 típusú citoplazmatikus domént kódolják (az aminosavakat kék betűk jelölik), ezzel szemben az os3 és az os4 variánsokat a CYT-3 típusú jelátviteli domének jellemzik. Ennek oka a 14. exon kezdeti szakaszának „frame shift”-jében rejlik, amelyet az alternatív „splicing” okoz (az aminosavakat zöld betűk jelölik). A számozott exonok kezdő nukleotidjait piros nyilak mutatják.

- virus infection and otosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110(10): 897–903, 2001.
- Karosi T, Kónya J, Z Szabó L., Sziklai I.: Measles virus prevalence in otosclerotic stapes footplate samples. *Otol Neurotol* 25(4): 451–456, 2004.
- Chole R.A., McKenna M.J.: Pathophysiology of otosclerosis. *Otol Neurotol* 22(2): 249–257, 2001.
- Van Den Bogaert K., Govaerts P.J., De Leenheer E.M., Schatteman I., Verstreken M., Chen W., Declau F., Cremers C.W., Van De Heyning P.H., Offeciers F.E., Somers T., Smith R.J., Van Camp G.: Otosclerosis: a genetically heterogeneous disease involving at least three different genes. *Bone*. 30(4): 624–630, 2002.
- Linthicum F.H. Jr.: Histopathology of otosclerosis. *Otolaryngol Clin North Am* 26(3): 335–352, 1993.
- Karosi T, Jókay I, Kónya J, Petkó M., Z. Szabó L., Sziklai I.: Expression of measles virus receptors in otosclerotic, non-otosclerotic and in normal stapes footplates. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264(6): 607–613, 2007.
- Lolow S.R., Encheva V.I., Kyurkchiev S.D., Edrev G.E., Kehayov I.R.: Antimeasles immunoglobulin G in sera of patients with otosclerosis is lower than that in healthy people. *Otol Neurotol* 22(6): 766–770, 2001.
- Karosi T, Kónya J, Petkó M., Z. Szabó L., Pytel J., Sziklai I.: Antimeasles IgG for serologic diagnosis of otosclerotic hearing loss. *Laryngoscope* 116 (3): 488–493, 2006.
- Erlenhofer C., Duprex W.P., Rima B.K., ter Meulen V., Schneider-Schaulies J.: Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol* 83(6): 1431–1436, 2002.
- Dhiman N., Jacobson R.M., Poland G.A.: Measles virus receptors: SLAM and CD46. *Rev Med Virol* 14(4): 217–229, 2004.
- Riley R.C., Tannenbaum P.L., Abbott D.H., Atkinson J.P.: Cutting edge: inhibiting measles virus infection but promoting reproduction: an explanation for splicing and tissue-specific expression of CD46. *J Immunol* 169(10): 5405–5409, 2002.
- Schneider-Schaulies J., Dunster L.M., Kobune F., Rima B., ter Meulen V.: Differential downregulation of CD46 by measles virus strains. *J Virol* 69(11): 7257–7259, 1995.
- Manchester M., Naniche D., Stehle T.: CD46 as a measles receptor: form follows function. *Virology* 274(1): 5–10, 2000.
- Liszewski M.K., Kemper C., Price J.D., Atkinson J.P.: Emerging roles and new functions of CD46. *Springer Semin Immunopathol* 27(3): 345–358, 2005.
- Riley-Vargas R.C., Gill D.B., Kemper C., Liszewski M.K., Atkinson J.P.: CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends in Immunol* 25(9): 496–503, 2004.

17. Zaffran Y., Destaing O., Roux A., Ory S., Nheu T., Jurdic P., Rabourdin-Combe C., Astier A.L.: CD46/CD3 costimulation induces morphological changes of human T cells and activation of Vav, Rac and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* **167**(12): 6780–6785, 2001.
18. Astier A., Trescol-Biemont M.C., Azocar O., Lamouille B., Rabourdin-Combe C.: Cutting edge: CD46, a new costimulatory molecular for T cells that induces p120CBL and LAT phosphorylation. *J Immunol* **164**(12): 6091–6095, 2000.
19. Kemper C., Chan A.C., Green J.M., Brett K.A., Murphy K.M., Atkinson J.P.: Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* **421**(6921): 388–392, 2003.
20. Karp C.L., Wysocka M., Wahl L.M., Ahearn J.M., Cuomo P.J., Sherry B., Trinchieri G., Griffin D.E.: Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* **273**(5272): 228–231, 1996.
21. Abdul Ajees A., Gunasekaran K., Volanakis J.E., Narayana S.V., Kotwal G.J., Murthy H.M.: The structure of complement C3b provides insights into complement activation and regulation. *Nature* **444**(7116): 221–225, 2006.
22. Kurita-Taniguchi M., Fukui A., Hazeki K., Hirano A., Tsuji S., Matsumoto M., Watanabe M., Ueda S., Seya T.: Functional modulation of human macrophages through CD46 (measles virus receptor): production of IL-12 p40 and nitric oxide in association with recruitment of protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to CD46. *J Immunol* **165**(9): 5143–5152, 2000.
23. Fugier-Vivier I., Servet-Delprat C., Rivaller P., Risoan M.C., Liu Y.J., Rabourdin-Combe C.: Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med* **186**: 813–823, 1997.
24. Kerdiles Y.M., Sellin C.I., Druelle J., Horvat B.: Immunosuppression caused by measles virus: role of viral proteins. *Rev Med Virol* **16**(1): 49–63, 2006.
25. Yanagi Y., Takeda M., Ohno S.: Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* **87**(10): 2767–2779, 2006.

ZUSAMMENFASSUNG: Die Otosklerose ist eine organ-spezifische, virus-induzierte, komplexe Störung der Knochen-Remodellisierung, deshalb haben wir vorausgesetzt, dass die otische Kapsel (und die Stapes-Fußplatte) über ein eigenartiges Masernvirus-Rezeptor-Muster verfügt. Der Rezeptor des Masernvirus ist das Molekül CD46, das über 14 bekannte „*splicing*“ Isoformen verfügt. Bei unseren Untersuchungen wurden den Fußplatten der operativ entfernten Steigbügel (N=99) die Nukleinsäuren entzogen. Parallel liefen histologische, CD46-spezifische immunhistochemische und multiplexe RT-PCR-Untersuchungen. Der Nachweis der Masernviren geschah mit der „*semi nested*“ RT-PCR-Technik, der Nachweis der CD46 „*splicing*“-Varianten mit der „*nested*“ RT-PCR-Technik, dann folgte die cDNS-Typisierung. Der Masernvirus konnte ausschließlich in den auch histologisch otosklerotischen Fußplatten identifiziert werden. Die virus-negativen fixierten Stapesfußplatten zeigten unterschiedliche histologische, degenerative Veränderungen. Die otosklerotischen Herde waren durch zahlreiche Osteoklasten mit starker CD46-Immun-

reaktion gekennzeichnet, im Gegensatz zu den nicht-otosklerotischen Stapesfixationen. In den normalen und nicht-otosklerotischen Stapesfußplatten fanden wir ausschließlich die Expression der CD46-Varianten „c“, „d“, „e“, „f“ és „I“. Demgegenüber konnten wir in den otosklerotischen Herden 4 bisher unbekannte CD46-„*splicing*“-Varianten identifizieren: *os1*, *os2*, *os3* und *os4*. Die neu entdeckten CD46-Isoformen enthalten kürzere oder keine Transmembran-Domene und einen sehr seltenen zytoplasmatischen Fortsatz. Die Signalvermittlung dieser Moleküle ist mit Sicherheit pathologisch, ihre Virus-Bindungsfähigkeit jedoch unverändert. Vermutlich können diese Veränderungen für die bei Otosklerose erfahrungsgemäß ungestörte Virusreplikation verantwortlich gemacht werden. Die eigenartig ausgeprägte Musterung des CD46-Moleküls und die veränderte Funktion der neuen Isoformen sind gemeinsam eine mögliche Erklärung für die organ- und virusspezifische Pathogenese der Otosklerose.

SCHLÜSSELWÖRTER: CD46, Masernvirus, Otosklerose, Knochen-Remodellisierung, Alternativ „*splicing*“