

Margit Vater

Dr.med.

Sialylierung von Zelloberflächenglykanen humaner Lymphozyten

Geboren am 08.02.1972 in Mannheim

Reifeprüfung am 15.06.1991 in Heidelberg

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991/92 bis SS 1998

Physikum am 27.08.1993 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Mannheim

Staatsexamen am 25.05.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr.rer.nat. R. Schwartz-Albiez

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sialylierung von Lymphozyten unterschiedlicher Differenzierungs- und Aktivierungsstadien sowie die zelluläre Expression und Struktur einzelner sialylierter Kohlenhydratepitope untersucht.

Hierzu wurden Lymphozyten im Durchflußzytometer analysiert, wodurch eine Messung der Gesamtsialylierung und der Expression sialylierter Epitope auf einzelnen Zellen mit intakter sterischer Anordnung der Oberflächenstrukturen möglich war.

Dabei wurde der Sialylierungsstatus der Lymphozyten mit Hilfe der α -2,6-Sialyltransferase aus Rattenleber ermittelt, welche eine durch CMP aktivierte fluoreszenzmarkierte Sialinsäure auf die freien Galaktosereste N-glykosidischer Glykoproteine überträgt. Dadurch wurde es möglich, sowohl die maximale Sialylierung der oberflächengebundenen Glykanstrukturen, als auch das Ausmaß der auf der Oberfläche von nativen Zellen vorhandenen Sialylierung zu untersuchen.

Sowohl die maximale, als auch die relative Sialylierung zeigen auffällige Veränderungen im Verlauf der zellulären Aktivierung, wobei auf in vivo und auf in vitro stimulierten Lymphozyten eine generelle Verminderung der relativen Sialylierung zu beobachten ist. Dies führt möglicherweise durch die verringerte negative Ladung der Oberflächenstrukturen zu einer verbesserten interzellulären Interaktion.

Um die Sialylierung von membranständigen Sialoglykanen genau zu untersuchen, wurden die zelluläre Verteilung sowie die molekulare Struktur einzelner Kohlenhydratepitope untersucht. Zu diesem Zweck wurden monoklonale Antikörper eingesetzt, welche bekannte Epitope wie CDw75, CDw76 und CDw60 auf der Zelloberfläche von Lymphozyten erkennen, und es wurden auch Antikörper gegen bisher unklassifizierte Epitope eingesetzt, wie 1B2, F6 und Z17. Die Expression der einzelnen Epitope wurde auf den einzelnen Zellpopulationen unterschiedlich differenzierter und aktivierter Lymphozyten untersucht. Dabei stellte sich eine sehr differenzierte Entwicklung der Expression der Epitope im Verlauf der zellulären Aktivierung heraus: Epitope wie CDw75 und CDw76, die als B-Zell-assoziierte Epitope bekannt sind, sind bei stimulierten Lymphozyten auch auf T-Lymphozyten stark exprimiert. Andererseits werden T-Zell-assoziierte Epitope wie CDw60, das F6- und das Z17-Epitop nach einer Stimulation der Lymphozyten auch auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten vermehrt gefunden.

Die untersuchten Kohlenhydratepitope CDw75 und CDw76 bzw. CDw60 und das F6- und Z17-Epitop weisen trotz ihrer unterschiedlichen Expression auf stimulierten Lymphozyten große strukturelle Ähnlichkeiten auf: So kann man nach den Ergebnissen dieser Arbeit für CDw75 und CDw76 eine komplexe Struktur mit terminaler α -2,6- und α -2,3-gebundener Sialinsäure postulieren. Obgleich das 1B2-Epitop durch terminale α -2,6- und α -2,3-gebundene Sialinsäure maskiert wird, handelt es sich bei diesem Epitop nicht um die desialylierte Struktur von CDw75 oder CDw76.

UM4D4 (CDw60) und F6 erkennen GD_3 mit endständiger α -2,8-gebundener 9-O-azetylierter Sialinsäure, während Z17 keine signifikante Sensitivität gegenüber der 9-O-Azetylerase aufweist, da es sich beim Z17-Epitop nicht ausschließlich um eine 9-O-azetylierte Struktur handelt.

Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit bei differenter zellulärer Expression können monoklonale Antikörper gegen diese Kohlenhydratepitope dazu eingesetzt werden, verschiedene zellspezifische Glykosylierungsvarianten auf Glykoproteinen und Glykolipiden zu untersuchen und dadurch Hinweise auf die Funktion dieser unterschiedlichen Glykosylierung zu erhalten.

Daher erscheint es äußerst vielversprechend, die zelluläre Verteilung und die molekulare Struktur von Kohlenhydratepitopen weiter zu untersuchen, zumal bereits ein klinischer Einsatz von monoklonalen Antikörpern, welche Kohlenhydratepitope erkennen, erprobt wird.