

Michael Karl Erdmann
Dr. med.

Expression und Funktion der CD60 Kohlenhydratstrukturen auf humanen tonsillären B- und T-Lymphozyten

Geboren am 04.04.1977 in Mainz

Reifeprüfung am 18.06.1996 in Mainz

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS1997/98 bis SS 1999

Physikum am 28.09.1999 an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Klinisches Studium an der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Praktisches Jahr in Mannheim / Kapstadt / Mannheim

Staatsexamen am 11.05.2004 an der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

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

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Struktur, Expression und Funktion der CD60 Sequenzen auf tonsillären B- und T-Lymphozyten.

Zu diesem Zweck wurden aus humanen Tonsillen isolierte B- und T-Zellen in der Durchflusszytometrie mit anti-CD60a mAb R24 (anti-GD3), anti-CD60b mAb UM4D4 und MT6004 (anti-9-O-GD3) und anti-CD60c mAb U5 (anti-7-O-GD3) untersucht. Die anti-CD60 mAb erkennen und unterscheiden spezifisch zwischen GD3 und dessen O-acetylierten Varianten auf intakten Zellen. Dies wurde durch differenzielle Enzymbehandlung (Neuraminidase, 9-O-Esterase) und durch Inkorporation exogener, gereinigter Glykolipide in die Plasmamembranen intakter B-Zellen mit anschließender Antikörperanfärbung gezeigt.

Da anti-CD60 mAb ihre Zielstruktur anhand der terminalen Sialinsäure erkennen, musste geklärt werden, ob die CD60 Sequenzen bei Lymphozyten ausschließlich als Glykosphingolipide oder auch auf Glykoproteinen vorliegen. Western Blots der Oberflächenproteine, Methanolextraktion von Membranlipiden und enzymatische Spaltung von Sialinsäure-enthaltenden Glykoproteinen zeigten, dass auf B-Lymphozyten die drei CD60 Sequenzen Glykosphingolipide als Träger besitzen. Dagegen gibt es Hinweise, dass bei T-Lymphozyten die CD60b Sequenz auf einem 65 kD Glykoprotein vorliegt.

In immunhistologischen Anfärbungen von Kryoschnitten des Tonsillengewebes zeigte sich in den B-zellreichen Keimzentren eine verstärkte Expression von CD60b und c während CD60 a vor allem in der angrenzenden T-Zellzone zu beobachten war. Weiterhin wiesen T-Zellen in der Immunhistologie weitaus höhere CD60c- als CD60b Expression auf. Die Auftrennung *in vivo* aktivierter B-Zellen mittels eines Percoll-Dichtegradienten bestätigte die geringe CD60a Expression von B-Lymphozyten und erhöhte CD60b und c während der *in vivo* Aktivierung. Der Zusammenhang zwischen Aktivierung von B- und T-Zellen und Expression verschiedener CD60 Sequenzen wurde mittels *in vitro* Stimulation der Lymphozyten untersucht. T-Zellen zeigten nach Aktivierung mit PHA eine erhöhte Expression der drei CD60 Sequenzen, wobei die CD60c Expression am stärksten zunahm. Während der *in vitro* Aktivierung von B-Zellen mit anti- μ /IL-4 oder Pansorbin veränderte sich die CD60c Expression nicht. Bei CD60b war über 48 Stunden eine von der Aktivierung unabhängige erhöhte Expression zu beobachten. Der Unterschied bei den CD60 Sequenzen zwischen *in vitro* und *in vivo* aktivierten B-Zellen ist in dem speziellen Mikromilieu der Keimzentren zu suchen, aus dem die B-Zellen während der Zellgewinnung isoliert wurden.

Neben Aktivierungsvorgängen findet in den Keimzentren vermehrt Apoptose von B-Zellen statt. Durch Anfärbung mit den frühapoptotischen Markern Annexin V und dem mAb Apo2.7 konnte in der Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass tonsilläre B-Zellen während 96 stündiger Kultur fast vollständig in den programmierten Zelltod eintreten. Während der spontanen sowie Staurosporin-induzierten Apoptose wies eine Population der B-Lymphozyten analog zur *in vitro* Aktivierung eine verstärkte CD60b Expression auf. CD60c blieb während der Apoptose unverändert. Es ist davon auszugehen, dass die während der *in vitro* Aktivierung bei B-Zellen beobachtete CD60b Zunahme auf eine Veränderung während des programmierten Zelltodes schließen lässt. Apoptoseinduktion bei T-Zellen mittels Staurosporin führt wie die *in vitro* Aktivierung zu einer erhöhten CD60c Expression. CD60b zeigte während des programmierten Zelltodes von T-Lymphozyten keine Veränderung.

Der Einfluss der CD60 Sequenzen auf Proliferation von T- und B-Zellen wurde anhand der Inkubation der Zellen mit anti-CD60 mAb mit und ohne weitere Stimuli mittels ³H-Thymidin einbaues untersucht. Bei B-Lymphozyten verstärkten anti-CD60b mAb MT6004 und CD60c mAb U5 die durch anti-IgM/IL-4 induzierte Proliferation. Bei T-Lymphozyten wiesen anti-CD60b mAb ebenfalls ko-proliferative Eigenschaften auf, während anti-CD60c mAb eigenständig proliferatives, mitogenes Potential besaßen.

Die Frage, wie Antikörper gegen die CD60 Sequenzen, die als membranständige Glykosphingolipide ohne zytoplasmatische Domäne vorliegen, ein intrazelluläres Signal auslösen können, wurde mit der „Raft“-Hypothese erklärt. Bei Raft handelt es sich um lipophile Membrandomänen die neben Glykosphingolipiden zahlreiche Rezeptor-Glykoproteine umfassen. Sie können auf Grund ihrer Konzentration in diesen Membranarealen ihre unterschiedlichen regulatorischen Funktionen ausüben. Mittels der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass auf B-Zellen CD60b und CD60c Sequenzen gemeinsam mit dem Gangliosid GM1 auf der Zellmembran in Raft-ähnlichen Arealen konzentriert vorliegen. Bei T-Zellen waren CD60b und GM1 ko-lokalisiert, während CD60c offensichtlich nicht in Rafts vorlag. Unterschiedliche Beteiligung von CD60 b und c an der Raftbildung bei B- und T-Zellen könnte kausal mit dem unterschiedlichen Einfluss der entsprechenden Antikörper auf die T- und B-Zellaktivierung zusammenhängen.

Über Immun-ko-präzipitation mittels der anti-CD60b und c mAb mit Antikörpern gegen die Proteinkinasen Lyn und Syk wurde die Beteiligung von CD60b und c an Aktivierungskomplexen untersucht. Im Western Blot zeigte sich, dass die für die B-Zellaktivierung typischen Proteinkinasen Lyn und Syk mit CD60b und c ko-präzipitieren.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergab sich folgendes Modell der CD60 Funktionen während der B-/T-Zellaktivierung: Während der B-Zell-Aktivierung wird der B-Zell-Rezeptor in Rafts verlagert, in denen sich die zytoplasmatischen Proteinkinasen Lyn und Syk für intrazelluläre Aktivierungssignal-Weiterleitung befinden. Zusätzliche Kreuzvernetzung der CD60b und c Trägerlipide durch anti-CD60 mAb führt zu weiterer Rekrutierung von den Proteinkinasen und Verstärkung des Signals durch Bildung bzw. Verschmelzung weiterer Rafts.

Bei CD60b Sequenzen auf T-Zellen könnte ein ähnliches Modell postuliert werden. CD60c bildet bei T-Lymphozyten durch eine homogene Raft-untypische Oberflächenverteilung und das proliferative Verhalten der anti-CD60c mAb eine Ausnahme, die genauerer Untersuchung bedarf.

Die beobachteten proliferativen und ko-proliferativen Eigenschaften der CD60 Sequenzen wurden anhand monoklonaler Antikörper untersucht. Ein natürlicher Ligand für die CD60 Sequenzen von tonsillären B-Zellen ist auf im Keimzentrum benachbarten Zellen wie follikulär dendritischen Zellen und T-Zellen zu suchen. Dieser Ligand muss hochspezifisch zwischen 7-O- und 9-O-acetyliertem GD3 unterscheiden können, da deren Kreuzvernetzung wie bei T-Zellen beobachtet unterschiedliche Funktion haben.