

Susanne Merx
Dr. med.

Einfluß der Glykosylierung auf die komplementinhibitorische Aktivität von humanem homologen Restriktionsfaktor CD59

Geboren am 11.05.1969 in Karlsruhe

Reifeprüfung am 03.05.1988 in Karlsruhe

Studiengang der Humanmedizin vom SS 1989 bis SS 1996

Physikum am 05.09.1991 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Coventry u. Rugby / England; Aarberg / Schweiz; Universität Heidelberg

Staatsexamen am 09.05.1996 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie

Doktorvater: Frau Prof. Dr. rer. nat. Gertrud-Maria Hänsch

CD59, unter anderem auch als P-18, MACIF, MIRL, 1F5, HRF20, MEM-43, H19 und Protectin bekannt, ist ein 18 - 25 kDa großes Glykoprotein, das weit verbreitet auf Zellmembranen des menschlichen Körpers gefunden wird und mittels eines Glykosylphosphatidylinositol-Ankers daran angeheftet ist. Seine Hauptfunktion ist es, Zellen vor der Lyse durch homologes Komplement zu schützen. CD59 übt seine Regulationsfunktion durch Inhibition des Einbaus von multiplen C9-Molekülen in C5b-9 aus. Dadurch kommt es nicht zur vollständigen Bildung des Membranangriffskomplexes und somit Lyse der Zelle. Zur Rolle der N-Glykosylierung des Asparagins an Position 18 (Asn-18) bei der homologen Restriktion gibt es verschiedene Untersuchungen mit unterschiedlichen Ergebnissen. Deglykosylierung führte vom Aktivitätsverlust bis zur Verbesserung der Komplementinhibition. Deshalb sollte in dieser Arbeit erneut untersucht werden, ob der N-glykosylierte Kohlenhydratrest einen Einfluß auf die funktionelle Aktivität von CD59 bei der komplementvermittelten Lyse von Zellen hat. Dazu wurden mittels "site-directed Mutagenesis" CD59-cDNS-Mutanten hergestellt, wovon drei dieser Mutanten die N-Glykosylierung durch Substitution des Codons für Asn-18 durch das Codon von Glycin (CD59-Gly) beziehungsweise Glutamin (CD59-Gln) beziehungsweise Arginin (CD59-Arg) verhinderten. Bei der vierten Mutante wurde das Codon für Serin an Position 20 (Ser-20) durch das Codon von Alanin (CD59-Ala) ausgetauscht und somit die Signalsequenz für die N-Glykosylierung verändert. Die CD59-cDNS-Mutanten wurden in einem geeigneten Expressionsvektor in Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen transfiziert und auf der Zelloberfläche exprimiert. Mittels Immunpräzipitation wurde nachgewiesen, daß das auf den CHO-Zellen exprimierte mutierte CD59-Protein in der nicht-glykosylierten Form auf der Zelloberfläche vorhanden war. Weiterhin wurde gezeigt, daß CD59 mittels eines Glykosylphosphatidylinositol-Ankers an die Membran angeheftet war. Zur Funktionsanalyse wurden glykosylierte und nicht-glykosylierte CD59/CHO-Klone ausgewählt, die eine ähnliche Anzahl von CD59-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche exprimierten. Die Molekülanzahl war mit der auf humanen Endothelzellen natürlicherweise exprimierten Anzahl von CD59-Molekülen vergleichbar. Die komplementinhibitorische Funktion der verschiedenen rekombinanten CD59-Proteine wurde mittels eines komplementvermittelten Laktatdehydrogenasefreisetzungstestes bestimmt. Weder die Substitution von Asn-18 durch Glutamin und Arginin, noch die Änderung der Signalsequenz der N-Glykosylierung durch Austausch von Ser-20 durch Alanin führte zu einem Verlust der funktionellen Aktivität. Die Substitution von Asn-18 durch Glutamin führte sogar zu einem verbesserten Schutz der Zellen vor komplementvermittelter Lyse. Diese Resultate weisen wie auch neuere Veröffentlichungen darauf hin, daß die N-Glykosylierung von CD59 nicht für

seine komplementinhibitorische Funktion benötigt wird und zeigen die Möglichkeit auf, potentere CD59-Moleküle herzustellen, die in komplementregulatorischen Therapien Anwendung finden könnten.