

Dirk Andreas Wipfler
Dr. med.

Die enzymatische Regulation der CD60-Expression humaner Lymphozyten

Geboren am 29.05.1981 in Karlsruhe
Staatsexamen am 19.11.2008 an der Universität Heidelberg

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

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, erste Erkenntnisse über die enzymatische Regulation der CD60-Expression humaner Lymphozyten zu gewinnen. Dazu wurden Lymphozyten aus der Tonsille, dem peripheren Blut und dem Thymus isoliert und in der Durchflusszytometrie deren CD60-Expression bestimmt. Neben der Oberfläche wurden nach Permeabilisierung der Zellmembran auch intrazelluläre Strukturen angefärbt. Dadurch konnte der Gesamtgehalt der Zellen an GD3 (CD60a, Antikörper R24), 9-OAcetyl-GD3 (CD60b, Antikörper MT6004) und 7-O-Acetyl-GD3 (CD60c, Antikörper U5) orientierend bestimmt und mit der Oberflächenexpression verglichen werden. Tonsilläre T-Lymphozyten zeigten sowohl an der Oberfläche als auch intrazellulär die höchsten mittleren Fluoreszenzwerte. Ebenfalls hohe Werte zeigten T-Zellen aus dem peripheren Blut. Darunter fielen zwei Populationen von T-Zellen auf, die an der Oberfläche entweder CD60-Strukturen exprimierten oder nicht. Intrazellulär zeigten diese Populationen keine Unterschiede in der CD60-Expression. Die übrigen Zellen, also B-Lymphozyten aus Tonsille und peripherem Blut sowie Thymozyten, wiesen einen deutlich geringeren CD60-Gehalt auf, insbesondere exprimierten diese Zellen nur wenig GD3 und dessen O-acetylierte Varianten an der Oberfläche. Thymozyten wurden anhand ihrer Differenzierungsmerkmale (CD3, CD4, CD8) in unterschiedliche Reifestadien eingeteilt und deren CD60-Expression ebenfalls bestimmt. Reifere Zellen zeigten dabei einen höheren CD60-Gehalt als unreifere Vorstufen.

Um Hinweise auf eine Beteiligung von CD60-Strukturen an Membranmikrodomänen (sog. Rafts) auf der Zelloberfläche nachzugehen, wurden Rafts tonsillärer B- und T-Zellen durch Triton-X-100-Lyse und anschließende Ultrazentrifugation isoliert. Diese Membrandomänen wurden daraufhin mit einer HPTLC aufgetrennt und GD3 und seine O-acetylierten Varianten mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern angefärbt. 9-O-Acetyl-GD3 konnte dabei als Bestandteil von Rafts in tonsillären B- und T-Zellen nachgewiesen werden. GD3 und 7-O-Acetyl-GD3 konnte in den isolierten Raftfraktionen nicht angefärbt werden. Da es allerdings indirekte Hinweise auf eine Raftassoziation dieser Ganglioside gibt, könnte hier deren Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze gelegen haben.

Mit Hilfe der Real-Time-PCR wurde die mRNA-Expression von Genen untersucht, die nachgewiesen bzw. möglicherweise an Auf- und Abbauvorgängen von GD3 und dessen O-acetylierten Varianten beteiligt sind. Eine höhere Expression der GD3-Synthase (ST8Sia1) zeigte sich in reifen T-Zellen und damit in den Zellen mit der höchsten CD60-Expression. Neu3 war in Thymozyten mit Abstand am höchsten und könnte hier als Oberflächen-exprimiertes Enzym für die geringe Menge an CD60 an der Oberfläche verantwortlich sein. Unterschiede in der Expression von CASD1 und H-Lse waren weniger deutlich, ein Einfluss auf das Verhältnis GD3/O-Acetyl-GD3 ist hier zwar denkbar, derzeit aber noch nicht sicher nachgewiesen. Insgesamt scheint die CD60-Expression auf mehreren Ebene reguliert zu sein, neben der Aktivität der beteiligten Enzyme spielt dabei wohl auch deren Lokalisation in bzw. auf der Zelle eine Rolle.

Die Aktivität der Sialinsäure-spezifischen O-Acetyltransferase (SOAT) wurde erstmals in humanen Lymphozyten nachgewiesen und quantifiziert. Daneben konnte durch Einsatz entsprechender Standards und der 9-O-Acetylerase aus Influenza C Virus das Produkt der SOAT als 7-O-Acetyl-GD3 identifiziert werden. Die Umlagerung der Acetyl-Gruppe an die 9-O-Position erfolgt also erst sekundär, vermutlich unter Beteiligung einer bisher unbekanntem Migrase.

Außerdem wurde durch Transfektionsexperimente überprüft, ob es sich bei dem von CASD1 kodierten Enzym tatsächlich wie vermutet um die Sialinsäure-spezifische O-Acetyltransferase handelt. Dabei wurde zwar eine Zunahme von 7-O-Acetyl-GD3 in CASD1-transfizierten COS-7-Zellen beobachtet, ein indirekter Einfluss von CASD1 auf die SOAT-Aktivität konnte aber nicht ausgeschlossen werden. Hier sind weitere Experimente notwendig, z. B. der Gene-Knockout durch siRNA in CD60c-positiven Melanomlinien. Die Identifizierung des Gens der SOAT ist eine wichtige Voraussetzung für künftige Experimente zur Aufklärung der Funktion von GD3 und dessen O-acetylierten Varianten. Unter anderem erwartet man dadurch bedeutende Fortschritte im Verständnis der GD3-vermittelten Apoptose und Möglichkeiten, diese pharmakologisch zu beeinflussen.