

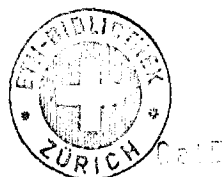
Diss. ETH Nr. 11964

**Flow cytometric analysis of glycosyltransferases
and their products**

A dissertation
submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences



presented by

Kristina Mrkoci Felner

Dipl. Natw. ETH

born 21st of September 1966

citizen of Croatia

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H. M. Eppenberger, examiner
Prof. Dr. E.G. Berger, co-examiner

1997

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Anwendung der Durchflusszytometrie auf Untersuchungen über die Biosynthese der Glykane. Die Durchflusszytometrie erlaubt den quantitativen Nachweis der Antigen-Expression anhand spezifischer Antikörper und Lektine in einzelnen Zellen. Die hier untersuchten Antigene sind entweder Glykosyltransferasen oder ihre Produkte wie Glykanstrukturen der Zelloberfläche. Gegenstand vorliegender Untersuchungen ist das Tn-Syndrom. Dieses ist die Folge einer spezifischen Repression der β 1,3 Galaktosyltransferase (β 1,3 Gal-T), einem Schlüsselenzym der Biosynthese von O-Glykanen. Eine Subpopulation von Zellen, welche das normalerweise verdeckte Tn-Antigen (GalNAc α -O-Ser/Thr) stabil exprimieren, wird in allen hämatopoietischen Stammlinien von Tn-Patienten nachgewiesen. Bei Zellen, die diesen Defekt nicht aufweisen, wird das TF-Antigen (Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr) exprimiert, das anschliessend mittels Sialyltransferasen durch Sialinsäure substituiert wird. Als Folge der unvollständigen Glykan-Biosynthese in Tn⁺-Zellen weisen diese Zellen einen reduzierten Gehalt an Sialinsäure auf.

In einer früheren Dissertation (Thurnher et al. 1993) wurde gezeigt, dass der Tn-Syndrom des Patienten R.R. auf einer stabilen und vollständigen Repression der β 1,3 Gal-T beruht. Um aufzuzeigen, ob dies für das Tn-Syndrom repräsentativ ist oder nur einen Ausnahmefall darstellt, waren Untersuchungen an mindestens einem weiteren Tn-Patienten notwendig. Diese Untersuchungen bilden den ersten Teil der Dissertation. Periphere Blutlymphozyten der Patientin M.Z. wurden auf den Tn-Phänotyp mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen Tn- und TF-Epitope untersucht. Eine Subpopulation von Tn⁺-T-Lymphozyten wurde mittels immunomagnetischer Zelltrennung angereichert, und die Fraktionen der Tn⁺- und TF⁺-Phänotypen einer limitierenden Verdünnungsreihe (limiting dilution) unterzogen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die resultierenden Zellkulturen auf Expression von

Tn- oder TF-Antigen charakterisiert. Tn⁺- und TF⁺-Zellen wurden auf β 1,3Gal-T-Aktivität mit Hilfe eines neu eingeführten Akzeptorsubstrates untersucht. In Tn⁺-Zellen wurde keine enzymatische Aktivität gefunden, hingegen wiesen die TF⁺-Zellen β 1,3Gal-T-Aktivität auf. Um zu testen, ob eine stabile Repression des β 1,3Gal-T-Gens auch für das Tn-Syndrom der Patientin M.Z. verantwortlich ist, haben wir diese etablierten Tn⁺-Zellkulturen mit 5-Azacytidin und Na n-Butyrat behandelt. Das erneute Auftreten von TF- und Sialinsäure-abhängigen CD43-Epitopen konnte mit Durchflusszytometrie gezeigt werden. Die Resultate lassen vermuten, dass die Repression des β 1,3Gal-T ein für das Tn-Syndrom repräsentativer pathogenetischer Mechanismus sein könnte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit arbeiteten wir mit O-Glykosylierungs-defizienten T-Lymphozyten der früher beschriebenen Tn-Syndrom-Patienten. Klonierte Tn⁺-Zellen wurden zunächst bezüglich ihrer Sialidierung charakterisiert. Zur Bestimmung des Sialinsäuregehalts wurde der Perjodsäure-Thiobarbitursäure-Nachweis für Sialinsäure in lymphoiden Zellen angepasst. Tn⁺-T-Lymphozyten zeigten eine Halbierung des Sialinsäure-Gehalts im Vergleich mit normalen TF⁺-T-Lymphozyten. Anschliessend wurde eine durchflusszytometrische Analyse dieser Tn⁺- und TF⁺-Zellen mit Fluoreszein-konjugierten Sialinsäure-spezifischen Pflanzenlektinen durchgeführt. Die Resultate sind mit dem erwarteten Ausmass der Hyposialidierung O-gebundener Glykane an Tn⁺-Zellen vereinbar. An N-gebundenen Glykanen wurden dagegen keine Glykosylierungsdefekte beobachtet. Zur Abklärung allfälliger Auswirkungen dieser Hyposialidierung *in vivo* wurden Bindungsstudien mit drei endogenen, sialinsäure-spezifischen Adhäsionsmolekülen, dem CD22, Sialoadhesin und myelin-assoziierten Glykoprotein, durchgeführt.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde eine durchflusszytometrische Methode für den intrazellulären Nachweis von Golgi-Glykosyltransferasen entwickelt und anschliessend angewendet.

Zur Entwicklung einer Methode für die intrazelluläre Färbung in Jurkat- und EBV-JY-Zellen, einer T- bzw. B-lymphoiden Zelllinie, wurden monoklonale

Antikörper gegen β 1,4Galaktosyltransferase verwendet. Durchflusszytometrische Messungen zeigten eine reproduzierbare Erhöhung der mittleren Fluoreszenz-Intensität gegenüber Kontrollmessungen. Es wurde eine „Laser-Scanning“-konfokale Immunofluoreszenz-Mikroskopie der gleichen Zellpräparate, die bei der Durchflusszytometrie verwendet wurden, durchgeführt. Eine praktisch ausschliessliche Färbung des Golgi-Apparats wurde in allen Zellen beobachtet. Diese Methode wurde auf die Anwendung von polyklonalen Antikörpern gegen β 1,4 Galaktosyltransferase und α 2,6 Sialyltransferase erweitert. Allerdings banden diese Antikörper unspezifisch an die Zelloberfläche von EBV-JY-Zellen, was bei Verwendung von F(ab)₂ Fragmenten deutlich reduziert werden konnte. Es wurde nur ein schwaches spezifisches Zelloberflächen-Signal für β 1,4Gal-T nachgewiesen.

Eine Stimulierung von T-Lymphozyten führt zu einer Veränderung der Zelloberflächen-Glykanstruktur. Dies kann die Folge einer differentiellen Expression der entsprechenden Glykosyltransferasen bezüglich der T-Lymphozyten-Aktivierung sein. Basierend auf enzymatischen Messungen konnte gezeigt werden, dass das Enzym β 1,4Gal-T eine erhöhte Aktivität in stimulierten T-Lymphozyten aufweist.

Wir haben unsere Methode für den intrazellulären Nachweis von Glykosyltransferasen angewendet, um aufzuzeigen, ob diese Verstärkung der Enzym-Expression mittels Durchflusszytometrie quantitativ ermittelt werden kann. Im Vergleich mit ruhenden T-Lymphozyten führte die Aktivierung zu einer Verdoppelung der β 1,4Gal-T Expression, was mit der Verdoppelung der Aktivität korrelierte

Die in dieser Dissertation vorgelegten Resultate erweisen die Anwendbarkeit der Durchflusszytometrie auf die Messung der Expression von Glycosyltransferasen und ihrer Produkte in Suspensionszellen. Dies wird die Möglichkeit eröffnen, die Kopplung zwischen Glycosyltransferase-Expression und ihrer Produkte quantitativ zu erfassen.

Summary

The present thesis deals with the application of flow cytometry to investigations on glycan biosynthesis. Flow cytometry allows detection and quantification of antigen expression using specific probes in single cells. The antigens investigated in this work are either glycosyltransferases or their products, e.g. cell-surface glycan structures. The object of the following study is the Tn-syndrome. This syndrome is due to a specific repression of a key enzyme in the O-glycan biosynthesis, the β 1,3 galactosyltransferase (β 1,3Gal-T). A subset of cells stably expressing the normally cryptic Tn antigen (GalNAc α -O-Ser/Thr) is detected in all hematopoietic lineages of Tn patients. In cells not affected by this defect, the TF antigen (Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr) is expressed, which is then substituted with sialic acid by sialyltransferases. As a result of the incomplete glycan biosynthesis in Tn⁺ cells, these cells have a reduced sialic acid content on the cell surface.

In a preceding thesis (Thurnher et al. 1993) the Tn-syndrome of patient R.R. has been reported to be due to a stable repression of β 1,3 Gal-T. However, in order to establish if this mechanism is representative for the Tn syndrome, investigations of at least another Tn patient were required. These investigations comprise the first part of this dissertation.

Peripheral blood lymphocytes from patient M.Z. were examined for the Tn-phenotype using flow cytometry and monoclonal antibodies against Tn- and TF-epitopes. A subpopulation of Tn⁺ T lymphocytes was enriched with immunomagnetic cell separation. The enriched fractions for the Tn⁺ and TF⁺ phenotype were subjected to limiting dilution. The resulting cell cultures were characterized for expression of Tn or TF antigen by flow cytometry. Positive Tn⁺ and TF⁺ cell cultures were assayed for β 1,3Gal-T activity using a newly introduced acceptor substrate. Whereas the TF⁺ cells exhibited β 1,3Gal-T activity, no enzyme activity was found in Tn⁺ cells. To test if a stable repression of the β 1,3Gal-T gene is also responsible for the Tn-syndrome in patient M.Z.,

we treated these established Tn⁺ cell cultures with 5-azacytidine and Na n-butyrate. Reoccurrence of TF and sialic acid-dependent CD43 epitopes on treated Tn⁺ cells could be demonstrated with flow cytometry. These results suggest that the repression of the β 1,3Gal-T could be a pathogenetic mechanism representative for the Tn-syndrome.

In the second part of this work, we used T-lymphocyte clones deficient in O-glycosylation, which have been established *ex vivo* from a previously described Tn-syndrome patient. Cloned Tn⁺ cells were characterized with respect to their sialylation. The periodic acid-thiobarbituric acid assay for determination of sialic acid was adapted to lymphoid cells. Tn⁺ T-lymphocytes showed a significant reduction of cell surface sialic acid content over normal TF⁺ T-lymphocytes. These Tn⁺ and TF⁺ cells were analyzed by flow cytometry using fluoresceinated sialic acid-dependent plant lectins. The results were compatible with the expected extent of hyposialylation of O-linked glycans on Tn⁺ cells. In contrast, no glycosylation defects on N-linked glycans were observed.

To investigate possible consequences of hyposialylation *in vivo*, quantitative binding assays with three endogenous sialic acid-dependent adhesion molecules (CD22, sialoadhesin, and myelin-associated glycoprotein) were performed. Again, the results reflected the known specificities of the adhesion molecules and confirmed that the hyposialylation of Tn⁺-T-lymphocytes is restricted to O-linked glycans.

In the third part of this work, a flow cytometric method for the intracellular detection of Golgi glycosyltransferases was developed and applied.

Monoclonal antibodies to β 1,4galactosyltransferase were used to establish a procedure for intracellular staining in Jurkat and EBV-JY cells, a T- and B-lymphoid cell line, respectively. Flow cytometric measurements of cells stained according to the established protocol showed a reproducible increase of mean fluorescence intensity over controls. Confocal laser scanning immunofluorescence microscopy of the same cell preparations as used for flow cytometry was carried out. Almost exclusive staining of the Golgi apparatus in all

cells was observed. The method was extended to the use of polyclonal antibodies to β 1,4galactosyltransferase and α 2,6sialyltransferase. Non-specific binding of these antibodies to the cell surface of EBV-JY cells was demonstrated, which could be reduced by using F(ab)'₂ fragments. Only weak cell surface expression of β 1,4Gal-T was detected.

Stimulation of T-lymphocytes is associated with changes in the cell surface glycan structure. This can be due to differential expression of the responsible glycosyltransferases upon T-lymphocyte activation. Based on activity measurements, β 1,4Gal-T was shown to be increased in stimulated T-lymphocytes.

We applied our method for intracellular detection of glycosyltransferases to show if this increase of enzyme expression could quantitatively be determined by flow cytometry. In comparison to resting T-lymphocytes, activation leads to a doubling of β 1,4Gal-T expression, which correlates with a doubling of the enzymic activity.

Taken together, the results presented in this thesis show the applicability of flow cytometry to the assessment of glycosyltransferase expression and their products. This will permit to acquire data on the quantitative assessment of the coupling between glycosyltransferase expression and their products.