

Kathrin Niemann
Dr. med.

Untersuchungen zu Eigenschaften und Funktion Gangliosid-abbauender Sialidasen verschiedener Zellkulturen

Geboren am 28.12.1971 in Hildesheim
Reifeprüfung am 29.05.1991 in Hildesheim
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991/92 bis WS 1997/98
Physikum am 15.09.1993 an der Universität des Saarlandes
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Menziken/Schweiz, Louisville/USA, Heidelberg
Staatsexamen am 11.11.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Michael Cantz

Ganglioside, Sialinsäure-haltige Glykolipide, sind in die Plasmamembran aller Vertebrata- und höherer Invertebrata-Zellen integriert. Indem sie transmembranäre Signaltransduktionsprozesse modulieren, können sie Einfluß auf die Differenzierung und Proliferation von Zellen nehmen. Da sich der qualitative und quantitative Gangliosidgehalt der Plasmamembran bei Erreichen des Zell-Zell-Kontakts, während des Zellzyklus und nach der Transformation ändert, scheint eine genaue Regulation des Gangliosidmusters für die Erfüllung ihrer Aufgaben besonders wichtig zu sein.

Der Katabolismus der Ganglioside und damit auch die Regulation des Gangliosidmusters erfolgt unter anderem über Gangliosid-spezifische Sialidasen - Enzyme, die terminale Sialinsäurereste von den Oligisaccharidketten der Ganglioside abspalten und deren Funktion noch weitgehend unerforscht ist. Ziel dieser Arbeit war es, die Gangliosid GM3-Sialidasen von HeLa-Zellen, menschlichen Hautfibroblasten sowie von transformierten Mäuse-Fibroblasten näher zu charakterisieren und im Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen Zellwachstum und GM3-Sialidase-Aktivität zu untersuchen.

In Fibroblasten konnte bereits früher mittels unterschiedlicher Detergentien eine Differenzierung zwischen lysosomaler und Plasmamembran-gebundener GM3-Sialidase vorgenommen werden. Bei meinen Untersuchungen wurden die Aktivitäten beider Enzyme in definierten Zeitabständen über einen Proliferationszeitraum von 84 Tagen beobachtet. Während dieser Zeit blieben beide Sialidasen auf einem konstanten Aktivitätsniveau.

Für die Messungen in HeLa-Zellen war es notwendig, die Methoden, die bereits zur Differenzierung der verschiedenen Gangliosid GM3-Sialidasen in Fibroblasten verwendet wurden, in HeLa-Zellen zu etablieren. Es konnte durch eine Inhibition mit Cu^{2+} -Ionen und eine Plasmamembranisolierung gezeigt werden, daß das Detergens Triton X-100 spezifisch ein Plasmamembran-gebundenes Enzym aktiviert. Dagegen konnte nachgewiesen werden, daß mit dem Detergens Glycodesoxycholol neben einem intrazellulären, wahrscheinlich lysosomalen Enzym auch Plasmamembran-gebundene Aktivität gemessen werden kann.

Mit Hilfe der sensitivierten Tests wurde eine Korrelation zwischen Zell-Wachstum und Plasmamembran-gebundener Sialidase-Aktivität untersucht. Die Wachstumskinetik der HeLa-Zellen wurde dabei am DNA-Gehalt festgemacht. Während der exponentiellen Wachstumsphase konnte mit zunehmender Zelldichte ein Anstieg der Plasmamembran-Sialidase auf das Doppelte der Ausgangsaktivität gemessen werden, während die 5'-Nucleotidase als Kontrollenzym für die Plasmamembran in allen Wachstumsphasen eher abnehmende Enzymaktivitäten zeigte. Die Inkubation von HeLa-Zellen in Anwesenheit des Sialidaseinhibitors 2-Desoxy-2,3-dehydro-N-Acetylneuraminsäure (NeuAc2en) reduzierte das Wachstum der behandelten Zellen deutlich. Neben einer Wachstumshemmung konnte durch Sialidase-Inhibition eine veränderte Morphologie der HeLa-Zellen beobachtet werden, die sich durch eine fibroblastoide Form mit „neuritenähnlichen“ Fortsätzen auszeichnete. Zur Klärung der Frage, ob NeuAc2en Differenzierungsprozesse in HeLa-Zellen induzieren kann, wurde die Expression des Differenzierungsmarkers Keratin in NeuAc2en behandelten HeLa-Zellen mit der Keratin-Expression von dbcAMP- und BrdU-behandelten Zellen verglichen. Dabei konnte im Western-Blot festgestellt werden, daß NeuAc2en das Muster der exprimierten Keratine auf andere Art und Weise ändert als die Differenzierungsinduktoren dbcAMP und BrdU. Welche molekularen Vorgänge diesem Phänomen zugrunde liegen, blieb unklar und könnte Ziel weiterer Forschung sein.

Insgesamt deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, daß die Gangliosid-spezifische Plasmamembran-Sialidase-Aktivität der HeLa-Zellen Einfluß auf die Proliferation und Differenzierungsprozesse der Zellen nehmen könnte.

Bei Sialidase-Bestimmungen in transformierten Mäuse-Fibroblasten und nicht-transformierten menschlichen Fibroblasten konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Plasmamembran-Sialidase-Aktivität und Transformation nachgewiesen werden, während die lysosomale Sialidase-Aktivität nach Transformation deutlich niedriger lag als die der nicht-transformierten Zellen.

