

Cristina Gabriela Ganea
Dr.med.

Nachweis von Katalase Isoformen in der Meerschweinchenleber

Geboren am 11.10.1969 in Ploiesti/Rumänien
Reifeprüfung am 11. 05.1989 in Oberhausen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1989 bis WS 1996
Physikum am 20. 08.1991 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg, Manchester, London
Praktisches Jahr in Paris, London, Heidelberg
Staatsexamen am 06.11.1996 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie
Doktorvater: Prof. Dr. Dr. A. Völkl

Eine trimodale Verteilung der Katalase in der Meerschweinchenleber (peroxisomal, zytosomal und nukleär) konnte bereits in immunozytochemischen Studien nachgewiesen werden. Die eingehende Analyse beider Katalasen nach ihrer Reinigung und Isolierung zeigte, dass die peroxisomale und die zytosolische Form der Katalase einen Molekulargewichtsunterschied von ca 1000 Da und verschiedene isoelektrische Punkte aufweisen.

Ausgehend von diesen Ergebnissen untersuchten wir, ob es sich um die heterotope Verteilung eines identischen Proteins handelt, oder, falls nicht welche weitere biochemische Unterschiede zwischen der peroxisomalen und der zytosolischen Katalase existieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten unsere Hypothese, dass Meerschweinchen-Katalase aus mehrere Isoformen besteht, deren Entstehung wahrscheinlich posttranslational bedingt ist.

In der 2 D Gelelektrophorese erhielten wir in der Auftrennung in der ersten Dimension fünf Untereinheiten der zytosolischen Katalase, aber nur zwei der peroxisomalen Katalase. Da deren Auftrennung in der zweiten Dimension (denaturierende SDS-PAGE) keine Molekulargewichtsunterschiede ergab ist anzunehmen, dass Unterschiede in der Oberflächenladung für die Auftrennung dieser Untereinheiten in der ersten Dimension verantwortlich sind. Eine Glykosilierung der zytosolischen Katalase, die diesen Unterschied erklären würde konnte nicht nachgewiesen werden. Dagegen konnte eine Assoziation von NADPH für die zytoplasmatische Katalase, nicht jedoch für die peroxisomale Form gezeigt werden (unveröffentlichte Befunde). Sie könnte ursächlich für die beobachtete Differenz der Molekulargewichte beider Isoformen in Frage kommen.

Auch bei der limitierten Proteolyse zeigten die peroxisomale und die zytosolische Katalase ein diskret unterschiedliches Proteolysemuster. Die Mikrosequenzierung der erhaltenen Peptidfragmente ergab jedoch keinen Unterschied in der Aminosäuresequenz. Die von unserer Arbeitsgruppe parallel dazu durchgeführte Sequenzierung von 23 Katalase-positiven Klonen erbrachte auch keine eindeutigen Sequenzunterschiede im codierenden Bereich. Sequenzdifferenzen erbrachte dagegen die Untersuchung der nicht kodierenden Sequenzabschnitte am 5'- und 3'Ende der verschiedenen Katalaseklone.

Die aus diesen Daten zu folgernde Homologie bzw. Identität der Aminosäuresequenzen spricht damit gegen ein posttranskriptionelles Prozessieren und macht posttranslationale Modifikationen als Ursache der erwähnten Unterschiede wahrscheinlich.

Auch im anschließenden Epitop Mapping in Immunoblots ergaben sich Unterschiede zwischen der peroxisomalen und zytosolischen Form der Katalase, die sich sowohl in der

Anzahl der erkannten Epitope aber auch in der Intensität des Signals der erkannten Banden manifestierten.

Diese Daten lassen darauf schließen, dass die Unterschiede zwischen den Katalasen eher im nicht kodierenden Bereich zu suchen sind, und dass der Molekulargewichtsunterschied in der Modifizierung einiger Aminosäuren begründet sein kann. Eine solche posttranslational bedingte Modifizierung von Aminosäuren muss aber auf die zytosolische Katalase beschränkt sein, da sie über das höhere Molekulargewicht verfügt. Auch eine, in den Peroxisomen stattfindende proteolytische Veränderung der zytosolischen Katalase könnte zur Entstehung von Katalase Isoformen führen.

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten biochemischen Untersuchungen zeigen, dass die Katalase in der Meerschweinchenleber verschiedene Isoformen hat, und dass die Entstehung dieser Isoformen am ehesten auf posttranslationale Modifizierung zurückgeführt werden kann. Zur endgültigen Klärung der Frage nach der Art der posttranslationalen Veränderungen könnte die Massenspektrometrie eingesetzt werden. Auch die interessante Frage nach der physiologischen Bedeutung dieser Isoformen bleibt noch offen.