

Dipl. Biol. Christian Oehler
Dr. sc. hum.

Reinigung, Charakterisierung und funktionelle Untersuchung einer membrangebundenen Gangliosid-spezifischen Sialidase aus neuralem Gewebe

Geboren am 13.10.1965 in Mannheim-Neckarau
Reifeprüfung am 24.05.1985 in Schwetzingen
Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1988/89 bis WS 1994/95
Vordiplom am 08.01.1991
Diplom am 24.01.1995

Promotionsfach: Pathologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. M. Cantz

Ganglioside, sialylierte Glykolipide der Plasmamembranen eukaryontischer Zellen, sind wichtige Modulatoren zellulärer Funktionen wie zum Beispiel Zelladhäsion, zelluläre Interaktion und Zell-Zell-Erkennung. Sie sind aber auch an der Regulation zellulärer Wachstums- und Differenzierungsprozesse beteiligt. Plasmamembran-ständige Ganglioside vermögen die Wirkung Membran-ständiger Rezeptoren zu modulieren. Ganglioside und deren Metaboliten sind an Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Aufgrund ihrer negativ geladenen Sialinsäurereste tragen Ganglioside zu den elektrischen Eigenschaften der Zellmembranen bei. Ganglioside können auch Ziele eines selbst-reaktiven Immunsystems sein. Onkogene Transformationen einer Zelle und neurodegenerative Prozesse gehen mit Veränderungen des Gangliosidmusters einher. All diese spezifischen Funktionen setzen eine strenge Kontrolle der Gangliosidzusammensetzung von Plasmamembranen voraus, sodass ein genaues Verständnis des Gangliosidmetabolismus auch große medizinische Bedeutung hat.

Für den Gangliosid-Katabolismus besitzen Sialidasen (Neuraminidase, EC 3.2.1.18) eine zentrale Bedeutung. Die in dieser Arbeit präsentierten Resultate ermöglichen nun ein besseres Verständnis der Funktionsweise einer humanen Plasmamembran-gebundenen Gangliosid-spezifischen Sialidase.

Nach Detergenz-Extraktion des Enzyms aus humanem Hirngewebe ermöglichte die Chromatografie an DEAE FF-Sepharose, CM FF-Sepharose, Heparin HiTrap-Sepharose, Resource Q-Sepharose und Gelfiltration an einer Superose 12-Säule die über 5000-fache Anreicherung der Enzymaktivität. Das gereinigte Enzym wurde hinsichtlich seiner Substratspezifität sowie seiner Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren charakterisiert.

Die Sialidase desialyliert bevorzugt einfachere Ganglioside wie GM3, GD3 und GM4. Komplexere Ganglioside wie GT1b und GQ1b sind dagegen schlechtere Substrate. Ganglioside mit nicht-terminaler Sialinsäure wie GM1 und GM2 sind demgegenüber keine Substrate der gereinigten Sialidase. Lyso-Ganglioside, d.h. Ganglioside ohne Fettsäure im Ceramid-Anteil, werden von der Sialidase deutlich schlechter umgesetzt als die korrespondierenden nativen Ganglioside. Ganglioside mit acetylierten Sialinsäuren, wie sie in manchen Tumoren vorkommen, werden ebenfalls schlechter als nicht-derivatisierte Glycolipide gespalten.

Der Sialidaseinhibitor 2-Desoxy-2,3-Didehydro-N-Acetylneuraminsäure (NeuAc2en), verschiedene Glycosaminoglycane, der synthetische virale Neuraminidase-Hemmer 4-Guanidino-NeuAc2en sowie die synthetischen Polyanionen Suramin und Dextransulfat erwiesen sich als potente Inhibitoren der Enzymaktivität. Nitrophenyl-Oxamsäure, ein Inhibitor vieler viraler, bakterieller und auch einiger Säuger-Sialidasen, ist ohne Wirkung auf die gereinigte Sialidase.

Durch die Fotoaffinitätsmarkierung mit einem ^{125}J -Arylazid-Derivat eines spezifischen Sialidaseinhibitors konnte der Sialidase nach Auftrennung der Fotoaffinitätsmarkierungs-Produkte in der SDS-Gelelektrophorese ein Molekulargewicht (MW) von 63.000 Da zugeordnet werden. Die spezifische Markierung der gereinigten Sialidase durch einen selbst erzeugten Peptid-Antikörper im Western-Blot erbrachte ein MW von 58.000 Da, und die SDS-Gelelektrophorese der hochreinen Fraktion ergab einen Wert von 59.400 Da für die stärkste Bande der Silberfärbung.

Funktionelle Versuche zur Sialidase-Aktivität intakter Zellen sprechen für ein auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran liegendes aktives Zentrum und beweisen das Vermögen des Enzyms, außerhalb seiner eigenen Membran liegende lösliche Substrate erkennen und desialylieren zu können.

Die Sialidase-Aktivität untersuchter Biopsien verschiedener Neuroblastome korrelierte mit der histo-pathologischen Klassifizierung dieser Tumoren. Dabei zeigten differenzierte, langsam-wachsende Neuroblastome (Shimada-Klassifikation 1) eine hohe Sialidase-Aktivität, während die schnell-wachsenden, wenig differenzierten Neuroblastome (Shimada-Klassifikation 4) eine sehr geringe Sialidase-Aktivität aufwiesen. Somit stellt die Bestimmung der Sialidase-Aktivität ein mögliches Kriterium zur biochemischen Klassifizierung von Biopsie-Material dar.