



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Endotoxin-induzierte Effekte auf ubiquitylierende Systeme humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMNC)

Autor: Dan Michael Suci
Institut / Klinik: Klinik für Unfallchirurgie
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. M. Majetschak

Dem Ubiquitin-Proteasom-System wird beim intrazellulären Proteinabbau, bei Sepsis und Entzündung als auch bei der Regulierung der zellulären Entzündungsantwort eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Es wird angenommen, daß bei diesem Regulierungsvorgang die Ubiquitylierung intrazellulärer Zielproteine als Erkennungszeichen für deren Abbau durch das 26S Proteasom dient. Nach inflammatorischen Reizen soll die intrazelluläre Protein-Ubiquitylierung zunehmen, so daß es zu einem erhöhten Abbau durch das 26S Proteasom kommen soll. Bislang wurden in humanen mononukleären Zellen weder die Ubiquitylierungsrate intrazellulärer Proteine als Ergebnis der totalen Ubiquitin-Protein-Ligase (tUbPL) Aktivität, noch die spezifische Ubiquitylierung von Calmodulin (Ubiquitin-Calmodulin-Ligase, uCaM-Synthetase) bestimmt. Zweck dieser Arbeit war die Bestimmung der zytosolischen Protein-Ubiquitylierungsrate und der uCaM-Synthetase Aktivität normaler und Endotoxin- (Lipopolysaccharid-/LPS-) stimulierter humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMNC).

PBMNCs von gesunden Probanden wurden über einen Zeitraum von 18 Stunden mit unterschiedlich hohen LPS-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden durch hypotone Lyse und Ultrazentrifugation zytosolische Extrakte gewonnen. Die tUbPL-Aktivität wurde bestimmt, indem die Inkorporierung von ^{125}I -Ubiquitin in die Gesamtmenge der Zellproteine autoradiographisch gemessen wurde. Die uCaM-Synthetase Aktivität wurde mit Hilfe des Affinitätsadsorptionstestes an Fluphenazin-Sepharose (FP-Sepharose) bestimmt.

Die Stimulation der Zellen mit Endotoxin (100 ng/ml LPS) hemmte die Aktivität von tUbPL um 57 % (-LPS: $130,0 \pm 1,1$ fkat/mg, n = 25; +100 ng/ml LPS: $56,3 \pm 14,7$ fkat/mg, n = 22). Die Aktivität der uCaM-Synthetase betrug in den Zellkulturen ohne LPS $67,5 \pm 3,9$ fkat/mg $+\text{Ca}^{2+}$ bzw. $18,8$ fkat/mg $-\text{Ca}^{2+}$ und in den Zellkulturen mit 100 ng/ml LPS $100,5 \pm 7,2$ fkat/mg $+\text{Ca}^{2+}$ bzw. $6,0 \pm 4,4$ fkat/mg $-\text{Ca}^{2+}$. LPS-Stimulation verursachte einen 1,5-fachen Anstieg der $+\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität bzw. 3-fachen Abfall der $-\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität, so daß die Ca^{2+} -Spezifität (Ratio $\pm \text{Ca}^{2+}$) der uCaM-Synthetase von 3,6 auf 16,8 erhöht wurde.

Die Arbeit konnte weitere Erkenntnisse für die Regulierungsvorgänge im Zusammenhang mit Sepsis und Ubiquitin-Proteasom System liefern. Ferner konnte erstmalig das Enzym uCaM-Synthetase in humanen Zellen nachgewiesen und dessen spezifische Aktivität bestimmt werden. Die gewonnenen Daten deuten sowohl auf unspezifische als auch auf spezifische regulatorische Einflüsse hin, welche durch Endotoxin auf das zytosolische ubiquitylierende System in humanen PBMNCs ausgeübt werden.