

Zusammenfassung

Identifizierung differentieller Proteine aus dem *E.coli* basierten *in vitro* Translationssystem

Dipl.-Biochemikerin Kerstin Mammeri

Mit Hilfe der hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese und anschließenden MALDI-Analyse wurden 21 Proteine identifiziert, die sich während der Proteinsynthese im *in vitro* Translationssystem verändert haben. Zuvor mussten einige methodische Probleme gelöst werden, die die Probenvorbereitung zur 2-DE betrafen. Die niedermolekularen Bestandteile mussten aus dem Standardreaktionsansatz entfernt und die Proteine angereichert werden. Es zeigte sich, dass die wichtigen, differentiellen Proteine nur durch schwache Spots nach der Färbung der Gele vertreten waren. Die Proben wurden daher mit Hilfe der Umkehrphasen-HPLC entsalzt, fraktioniert und aufkonzentriert.

Unter den differentiellen Proteinen befanden sich regulatorische Proteine, substratbindende Proteine, Proteinreparaturenzyme, RNA-bindende Proteine bisher nicht genau definierter Funktion und direkt in die Translation involvierte Proteine. Sie geben Hinweise auf den Gesamtzustand, Regulationsmechanismen und unerwünschte Nebenreaktionen im Lysat.

Beispielsweise konnte ausgehend von dem als differentiell erkannten Putrescin/Spermidin-periplasmatischen Transportprotein der Status und Einfluss dieser beiden Polyamine auf die Proteinsynthese geklärt werden. Aus dem Gesamtstatus der Polyamine konnte eine weitere wichtige Information entnommen werden: Agmatin, ein Abbauprodukt von Arginin und Ausgangsstoff für die Synthese von Putrescin und Spermidin erreichte während der Proteinsynthese einen schnellen Konzentrationsanstieg. Kurz vor Abbruch der Proteinsynthese wird ein Konzentrationsmaximum erreicht und die Agmatinsynthese eingestellt. Der schnelle Konzentrationsabfall der Aminosäure Arginin findet damit eine Erklärung.

Die zeitliche Abfolge des Agmatinoptimums, des gleichzeitigen Erreichens eines Plateaus der Protein- und mRNA-Konzentration, sowie der anschließenden Hydrolyse von ATP und GTP lassen einen regulierten Prozess vermuten. Das differentielle Protein HtrA, als Chaperon und Protease wirkend und in Eukaryonten als Gegenspieler des Apoptoseinhibitors bekannt, unterstreicht die These, dass der Abbruch der Proteinsynthese ein wichtiges Teilereignis in einem Regulationsnetzwerk sein könnte.