

Miriam Speer
Dr. med.

**Etablierung und Bewertung des zellfreien Proteinsynthesystems
Rapid Translation System 500 am Beispiel von Prorenin und Angiotensinogen**

Geboren am 16.10.1974 in Hamburg
Reifeprüfung am 17.06.1994 in Hamburg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1995 bis WS 2002/2003
Physikum am 19.03.1997 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Bangalore (Indien), Heidelberg, Melbourne (Australien)
Staatsexamen am 27.11.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach Pharmakologie
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Jörg Peters

In dieser Arbeit ging es darum, unglykosyliertes Prorenin für Aufnahmestudien und Funktionsstudien zu synthetisieren.

Außerdem sollte Angiotensinogen synthetisiert werden, für die Anwendung in Assays (für quantitative Prorenin- und Reninbestimmung) und die Untersuchung der Rolle der Glykosylierung.

In diesem Zusammenhang wurde das zellfreie Proteinsynthesystem RTS₅₀₀ der Firma Roche Diagnostics auf seine Anwendbarkeit hin getestet. Dabei ging es um die Unterschiede bei der Herstellung zweier völlig verschiedener Proteine.

Es wurde außerdem Prorenin in der Zellkultur synthetisiert, um die Ausbeute und die Anwendbarkeit des Verfahrens mit dem des RTS₅₀₀ zu vergleichen.

In der Arbeit gelang es, mithilfe entsprechender Genkonstrukte im RTS₅₀₀ unglykosyliertes Prorenin zu synthetisieren. Dieses war inaktiv und durch Trypsin zu Renin aktivierbar. Es war außerdem durch den Renininhibitor CH732 zu hemmen. Zudem gelang es, das Protein mit dem ans Konstrukt angehängten Strep-tag über eine Affinitätsäulenchromatographie zu reinigen.

Pro Ansatz im RTS₅₀₀ entstanden ca. 10 µg Protein. Davon waren nur ca. 10 ng zu Renin aktivierbar, also 0,1 %. Dieses resultierte vermutlich aus einer mangelhaften Proteinfaltung im RTS₅₀₀.

Es wurden verschiedene Methoden zur Verbesserung der Ausbeute des aktivierbaren Prorenins untersucht. Dabei war die vielversprechendste eine Verschiebung des das Protein umgebenden pH-Milieus. Es gelang mit diesem Verfahren eine Verbesserung der Aktivität von bis zu ca. 300 %.

Mit dem RTS₅₀₀ wurden nach Klonierung eines entsprechenden Genkonstruktes außerdem Angiotensinogen synthetisiert. Es entstanden ca. 41 µg in einem RTS₅₀₀-Ansatz von 1 ml. Das Aog wurde durch einen Aog-Antikörper erkannt. Die Reinigung gelang mithilfe eines His-tags mittels Affinitätsäulenchromatographie.

Da das Aog kein Enzym ist, konnte die korrekte Faltung nicht wie beim Prorenin anhand der Aktivität überprüft werden.

Zum Vergleich des RTS₅₀₀ mit herkömmlichen Methoden wurde ein Prorenin-Konstrukt zur Synthetisierung durch Leberzellen der Linie HepG2 kloniert. Dieses sollte aus den Zellen ausgeschleust werden und durch einen Strep-tag gereinigt werden. Die Synthetisierung des Prorenins in der Zellkultur gelang.

Es wurden größere Mengen Protein hergestellt. Davon war der Großteil inaktiv und aktivierbar. Die Reinigung des Proteins war nicht möglich, vermutlich durch Verlust des Strep-tags während der Ausschleusung des Prorenins aus den Zellen.

Schlussfolgerung

Das zellfreie Proteinsynthesystem RTS₅₀₀ ist funktionsfähig zur Synthetisierung von Proteinen. Dabei ist die Reinigung der entstandenen Proteine per Affinitätsäulenchromatographie möglich. Die korrekte Faltung des Proteins kann ein Problem darstellen.

Die Proteinexpression durch Zellen ist wesentlich aufwändiger als das vorgestellte System. Sie ist allerdings eher dazu geeignet, größere Mengen an Protein herzustellen, und es besteht nicht das Problem der mangelhaften Proteinfaltung.