



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

**Entwicklung eines Verfahrens zum Cross-linking des
membranständigen Progesteron bindenden Proteins (mPR) mit
interagierenden Proteinen**

Autor: Silke Ulm
Institut / Klinik: Institut für Klinische Pharmakologie
Doktorvater: Prof. Dr. M. Wehling

Verschiedene neue Publikationen berichten, dass neben den zeitverzögert auftretenden genomischen Steroideffekten auch alternative schnelle nicht-genomische Steroidwirkungen vorhanden sind. Bisher war über Aufbau und Struktur der diese Wirkungen vermittelnden nicht-genomischen Steroidrezeptoren wenig bekannt.

1996 gelang es aus Schweinelebermikrosomen ein 28 kDa schweres Protein zu identifizieren und zu klonieren, von dem angenommen wird, dass es schnelle Effekte des Progesterons vermittelt.

Ziel dieser Arbeit war deshalb Entwicklung eines Verfahrens zum Cross-linking des membranständigen mPR mit interagierenden Proteinen.

Nach Inkubation von Schweinelebermikrosomen mit verschiedenen cross-link Reagenzien gelang es, im Western Blot mittels mPR spezifischer Antikörper eine mPR cross-link Verbindung aus mPR und einem weiteren ca. 50 kDa schweren Protein (mPR2) darzustellen.

Die Optimierung der Reaktion gelang durch den Vergleich verschiedener cross-link Reagenzien, in unterschiedlichen Konzentrationen, bei verschiedenen Inkubationszeiten und unter Einsatz unterschiedlicher pH-Werte im Reaktionsansatz. Anschließend wurde die mPR cross-link Verbindung durch Kombination verschiedener chromatographischer Verfahren aufgereinigt.

Nach der erfolgreichen Aufreinigung war es das nächste Ziel das mit mPR ‚crossgelinkte‘ Protein zu identifizieren. Die mPR cross-link Verbindung wurde hierfür eluiert und gespalten. Es gelang zwei mögliche mPR2-Kandidaten mit einem MG von 50 und 53 kDa N-terminal zu sequenzieren. In Kontrollversuchen konnten die identifizierten Proteine jedoch nicht als mPR2 bestätigt werden.

Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren zum Cross-linking des mPR wird derzeit in unserer Arbeitsgruppe eingesetzt, um die Identität von mPR2 vollständig aufzuklären.