

Methoden zum Studium der Proteinfunktion



Methoden zum Studium der Proteinfunktion

- 1. Fragestellungen**
- 2. Antikörper und deren Herstellung**
- 3. Markierung und Detektion**
- 4. Methoden und ihre Anwendung**



Fragestellungen

Wieviel

Protein ist vorhanden?

Wo

ist das Protein lokalisiert?

Mit wem

ist das Protein assoziiert?

Wann

tritt das Protein auf?

Wie

ist das Protein aufgebaut?



Wieviel Protein ist vorhanden?

Wie ist die Konzentration des Proteins

- in der einzelnen Zelle?
- in einzelnen Organen?
- in verschiedenen Körperflüssigkeiten?

Fragestellungen: **wieviel?** wo? mit wem? wann? wie?



Wo ist das Protein lokalisiert?

In der Zelle

- in welchen Zellorganellen?
- membranassoziiert oder löslich?

In Organen und im Organismus

- in welchen Organen oder Organbestandteilen?
- intrazellulär oder extrazellulär?

Fragestellungen: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



Wann tritt das Protein auf?

Expression des Proteins in Abhängigkeit

- vom Entwicklungsstadium des Organismus?
- vom Zellzyklus?
- von Stimulantien (z. B. Hormone)?
- von äußeren Bedingungen (z. B. Temperatur, Nährstoffe)?

Fragestellungen: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



Wie ist das Protein aufgebaut?

Primär- und Sekundärstruktur

- Aminosäuresequenz?
- Helizes und Faltblätter?
- kovalente Modifikationen?

Tertiär- und Quartärstruktur

- funktionelle Domänen (z. B. Proteasedomäne)?
- Homo- oder Heteromer?

Fragestellungen: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?

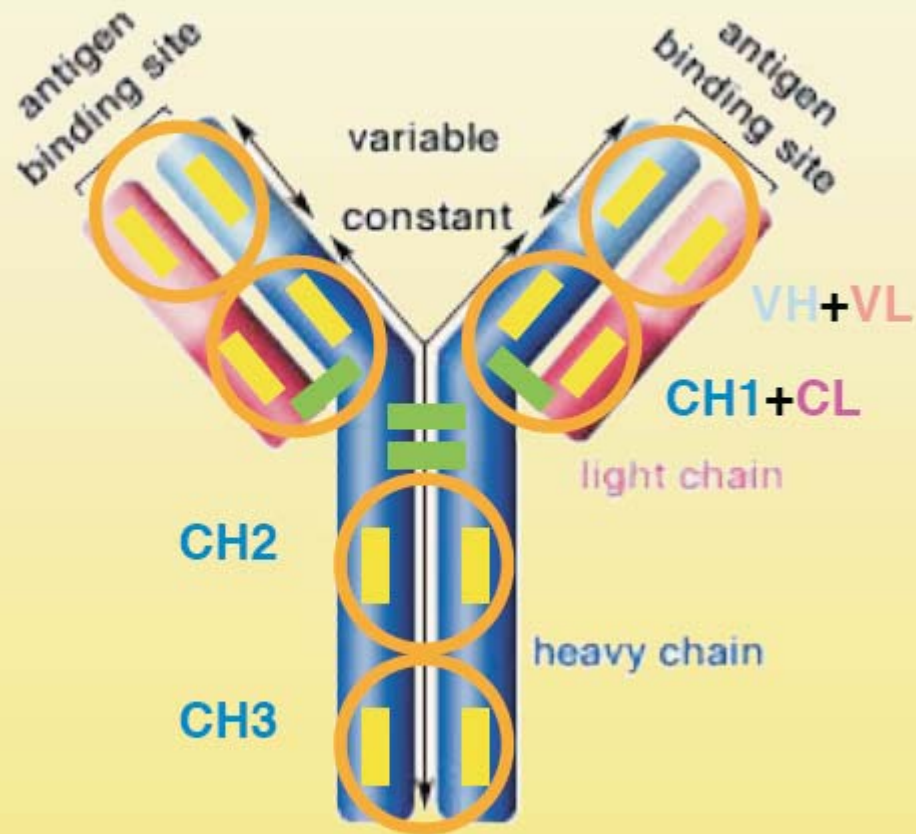


Antikörper und deren Herstellung

- **Struktur eines Antikörpers**
- **Basisprinzip der Verwendung**
- **polyklonale Antikörper**
- **monoklonale Antikörper**



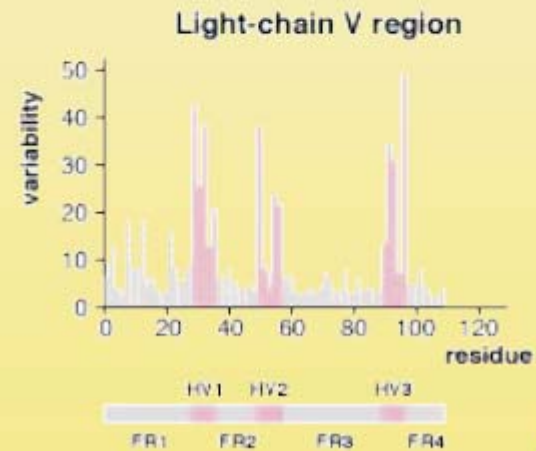
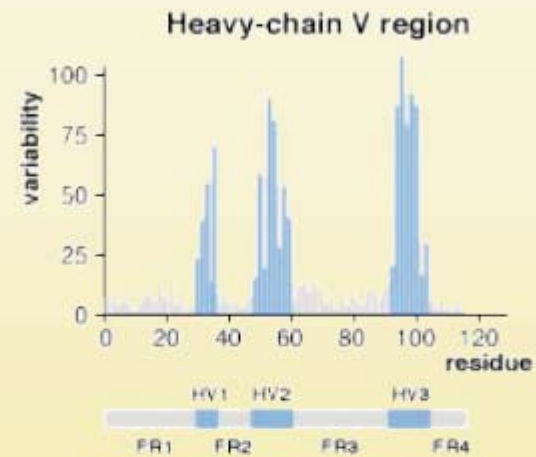
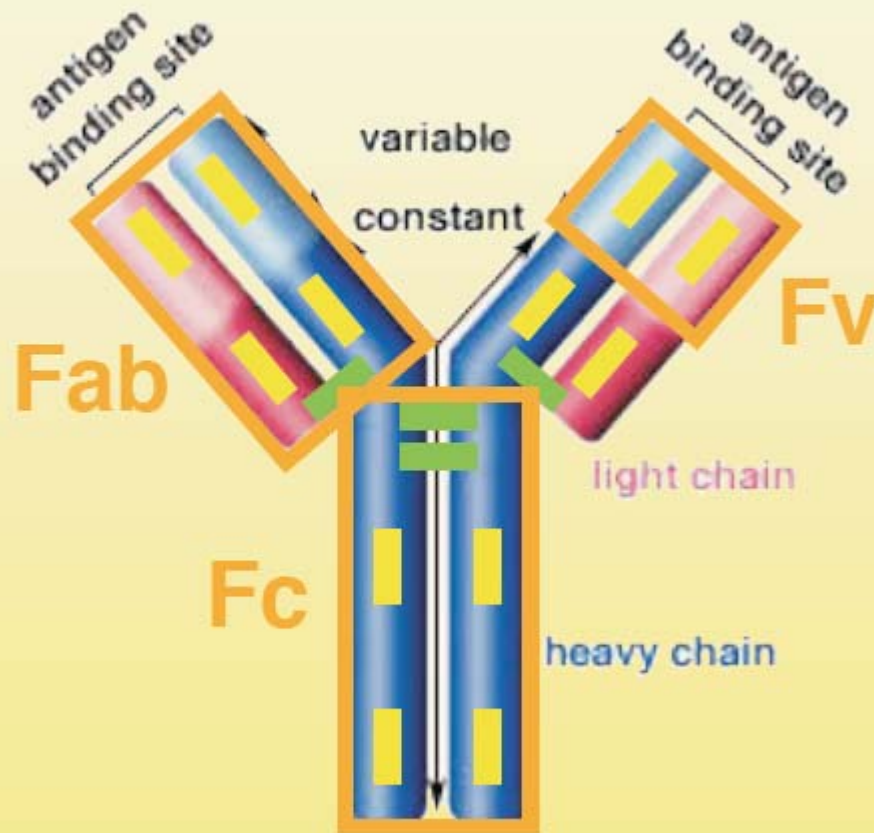
Antikörperstruktur



Antikörper: Struktur Basisprinzip polyklonal monoklonal



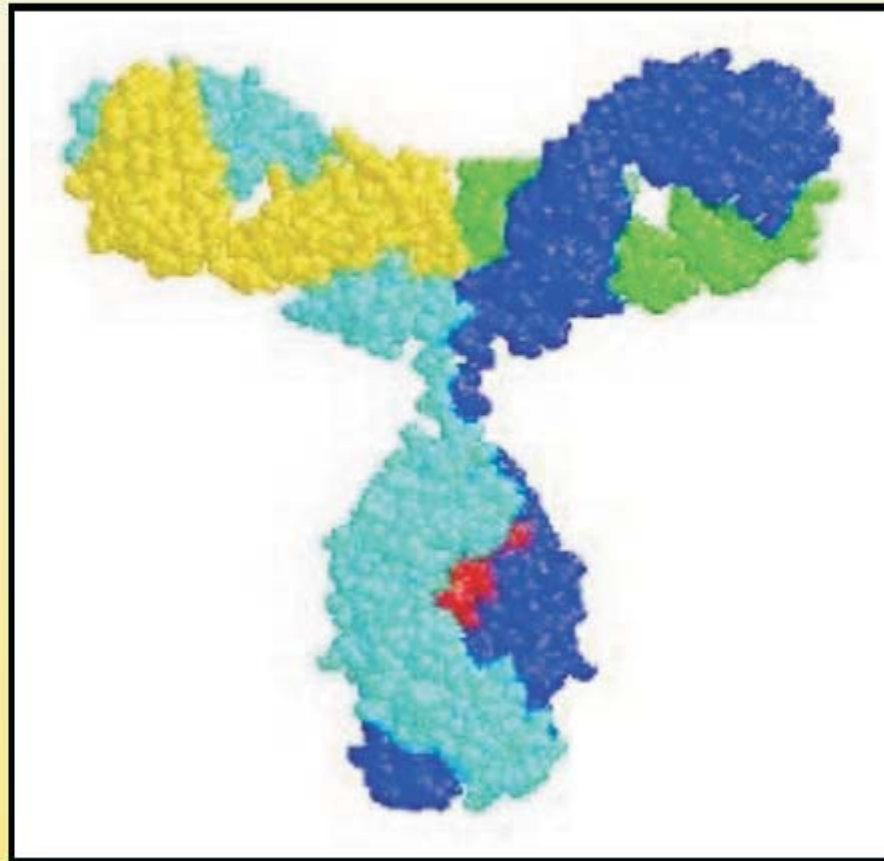
Antikörperstruktur



Antikörper: Struktur Basisprinzip polyklonal monoklonal



Antikörpermodell

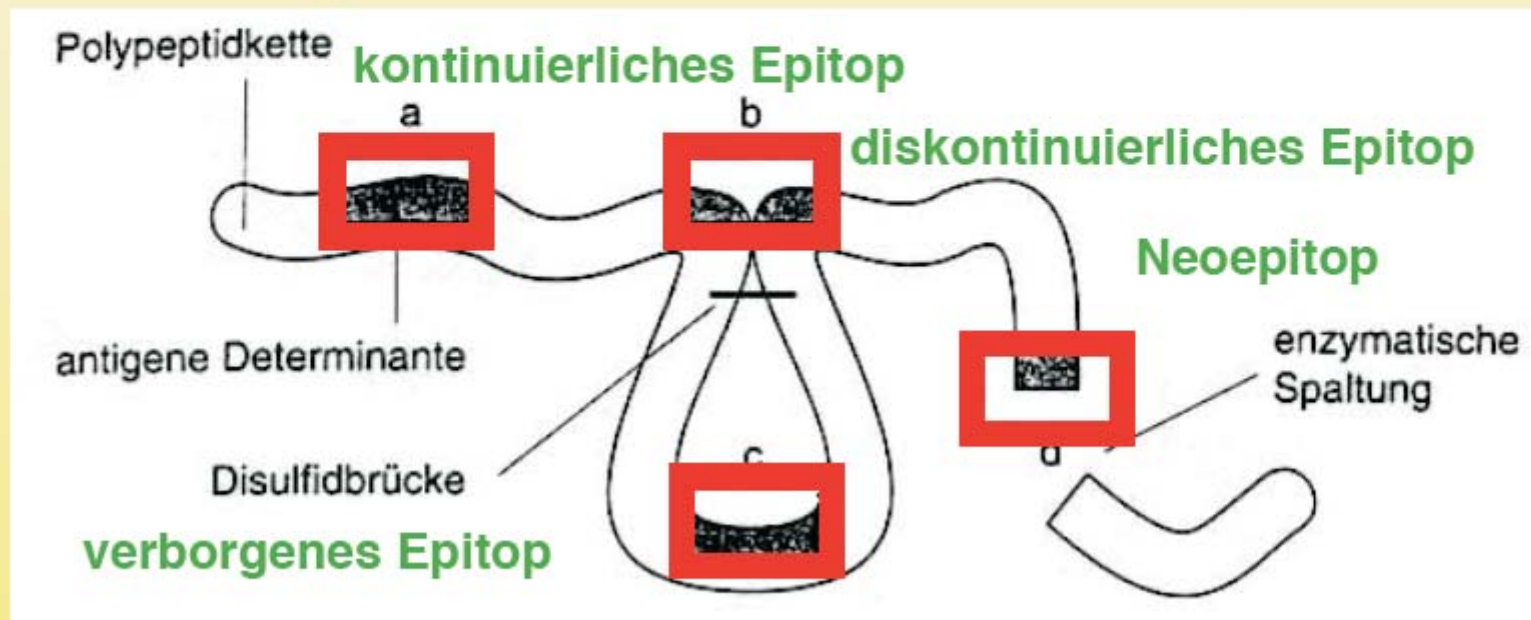


Antikörper: **Struktur** Basisprinzip polyklonal monoklonal



Epitope

Epitope sind die spezifischen Erkennungsstellen der Antikörper auf dem Antigen



Antikörper: Struktur Basisprinzip polyklonal monoklonal



Basisprinzip der Verwendung

Spezifische Bindung eines Antikörpers an
sein Zielantigen (Schlüssel–Schloß–Prinzip)

direkter Nachweis



Label

Primärantikörper

Antigen

Antikörper: Struktur **Basisprinzip** polyklonal monoklonal



Basisprinzip der Verwendung

Spezifische Bindung eines Antikörpers an
sein Zielantigen (Schlüssel–Schloß–Prinzip)

indirekter Nachweis



Label

Sekundärantikörper

Primärantikörper

Antigen

Antikörper: Struktur Basisprinzip polyklonal monoklonal



Basisprinzip der Verwendung

Spezifische Bindung eines Antikörpers an
sein Zielantigen (Schlüssel–Schloß–Prinzip)

indirekter Nachweis



Label

Sekundärantikörper

Primärantikörper

Antigen

Anwendungen

- Westernblot
- ELISA
- Immunfluoreszenz

Antikörper: Struktur Basisprinzip polyklonal monoklonal



Antikörper

Monoklonale Antikörper

- identische Antikörper
- erkennen ein einziges Epitop



Polyklonale Peptidantikörper

- verschiedene Antikörper
- erkennen ein einziges Epitop



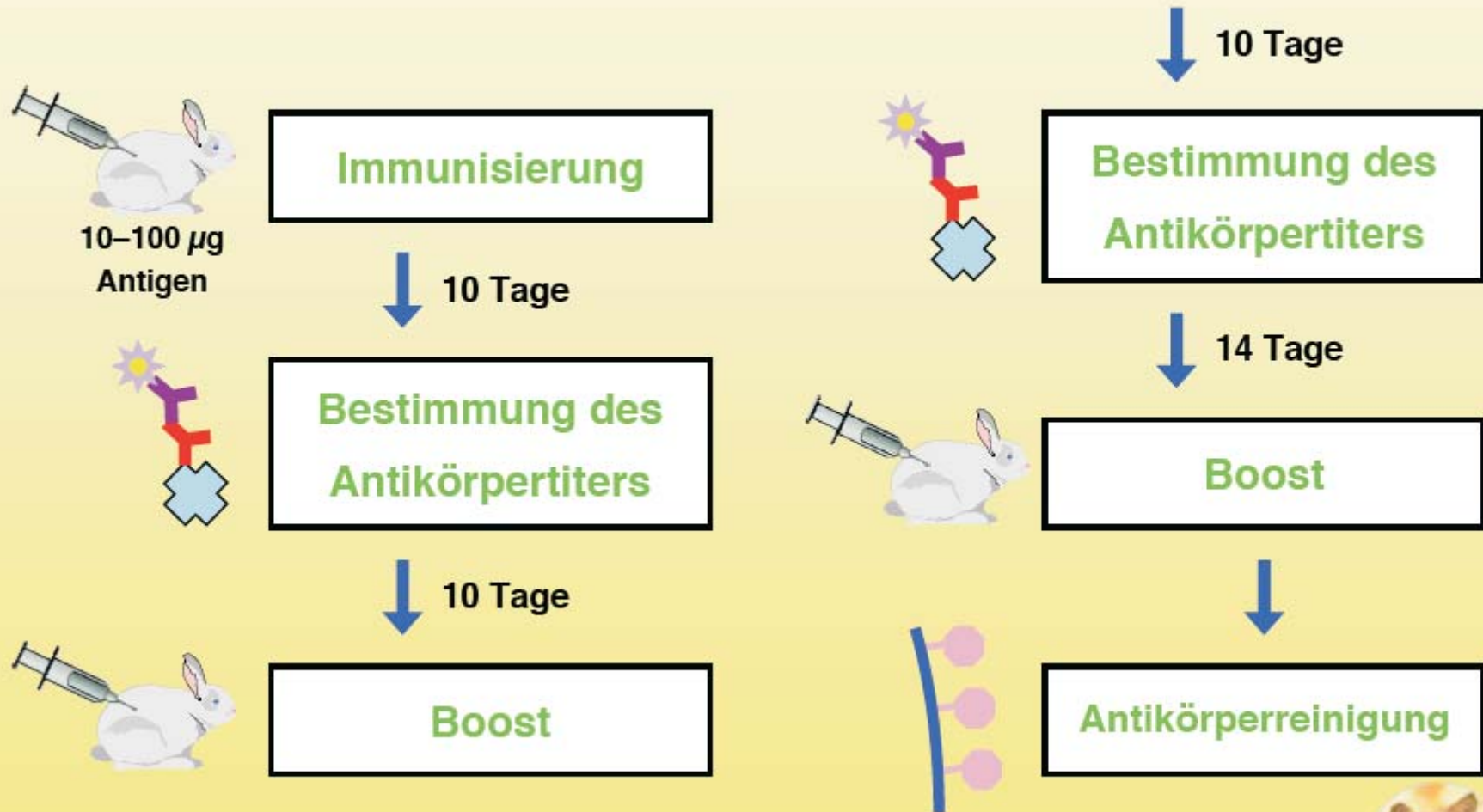
Polyklonale Antikörper

- verschiedene Antikörper
- erkennen verschiedene Epitope



Antikörper: Struktur Basisprinzip polyklonal monoklonal

Herstellung polyklonaler Antikörper



Antikörper: Struktur Basisprinzip polyklonal monoklonal



Herstellung monoklonaler Antikörper



Immunisierung

Isolierung von
Plasmazellen und
Lymphozyten
aus der Milz

10^8 Zellen
HGPRT⁺, Ig⁺

Myelomzellen
 2×10^7 Zellen
HGPRT⁻, Ig⁻

Myelomzellkultur

Fusion in
Polyethylenglykol

Selektion von
Hybridomzellen in
HAT-Medium

Hypoxanthin
Aminopterin
Thymidin

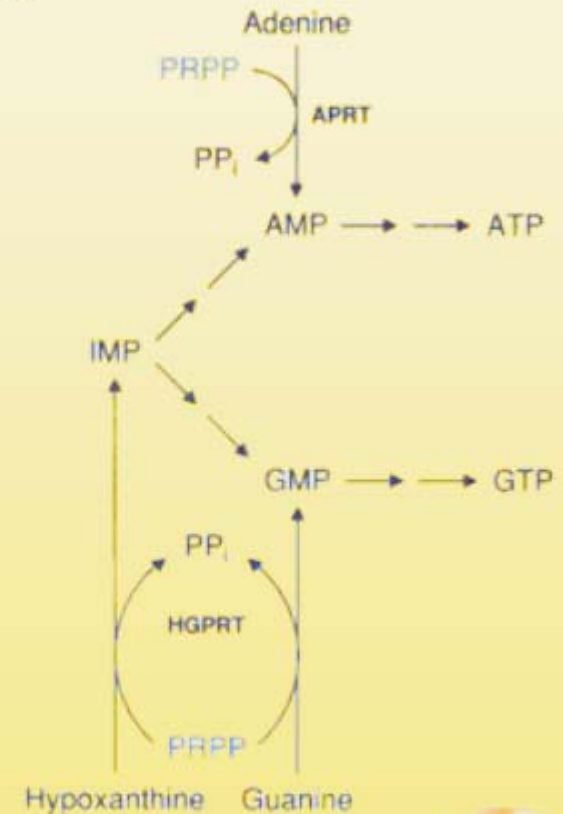
Antikörper: Struktur Basisprinzip polyklonal monoklonal



Herstellung monoklonaler Antikörper

Wirkungsweise des HAT-Mediums

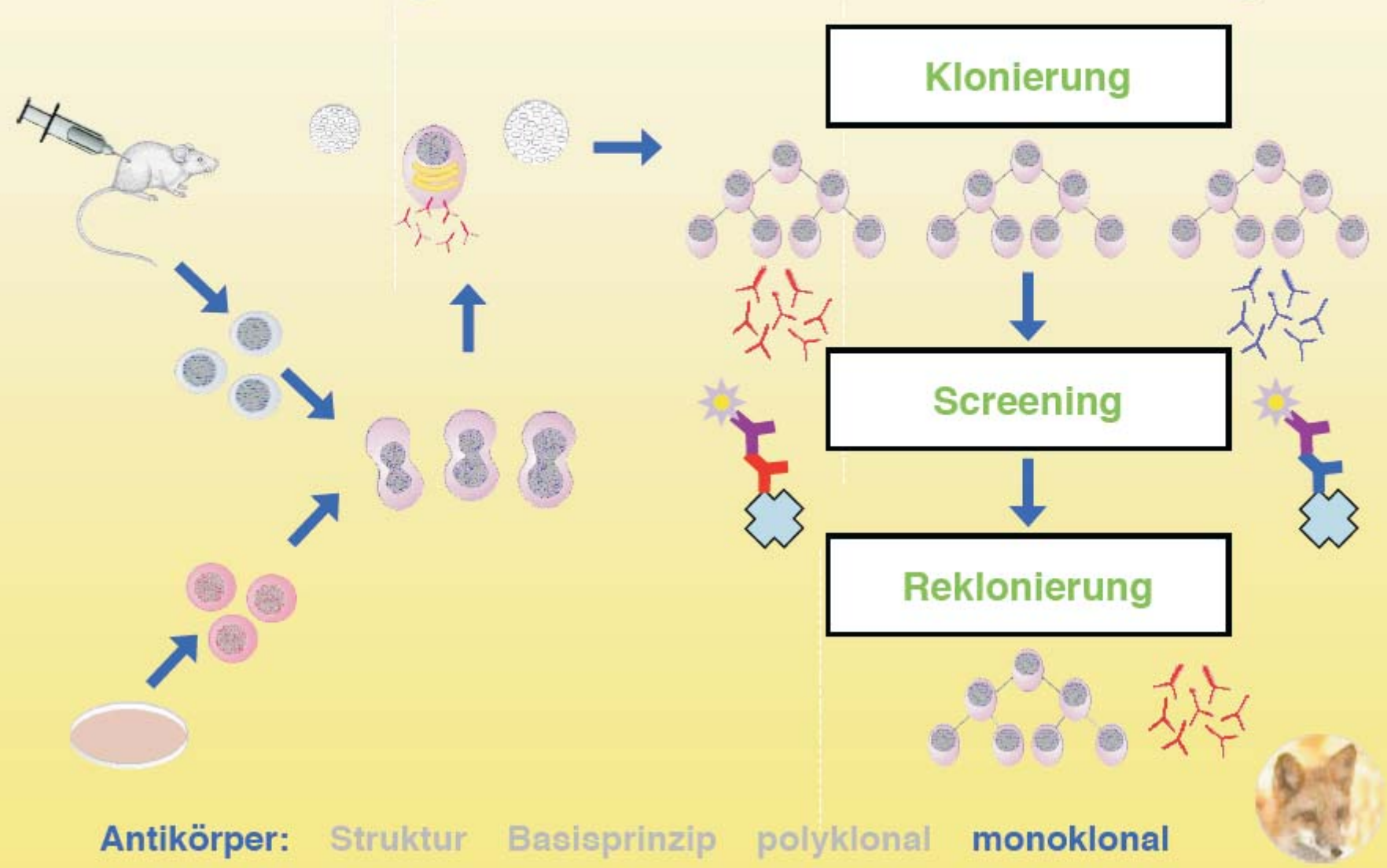
- **Aminopterin** hemmt die Synthese von Folsäure
- Folsäure ist für die Synthese von Nukleotiden erforderlich
- **Thymidin** ersetzt seine fehlende Synthese
- **Hypoxanthin** kann durch HGPRT zu weiteren Nukleotiden umgesetzt werden



Antikörper: Struktur Basisprinzip polyklonal **monoklonal**



Herstellung monoklonaler Antikörper



Antikörper: Struktur Basisprinzip polyklonal monoklonal

Funktionsanalyse

Grundprinzip des Nachweises

Markierung



Detektion



Markierung von Proteinen

metabolische Markierung

- [^{35}S]-Methionin und [^{35}S]-Cystein
- Bestandteile kovalenter Modifikationen (z. B. [^3H]-Palmitinsäure)
- *Tags* (z. B. His-*Tag*)
- Fusionsproteine (z. B. mit grünfluoreszierendem Protein)

[^{35}S]-Methionin

[^{35}S]-Cystein



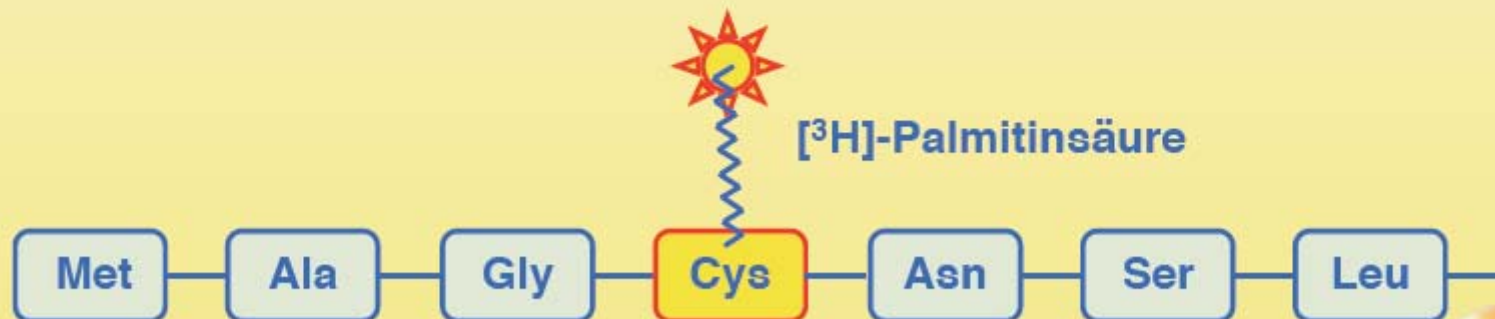
Markierung: metabolisch chemisch biochemisch



Markierung von Proteinen

metabolische Markierung

- $[^{35}\text{S}]$ -Methionin und $[^{35}\text{S}]$ -Cystein
- Bestandteile kovalenter Modifikationen (z. B. $[^3\text{H}]$ -Palmitinsäure)
- *Tags* (z. B. His-*Tag*)
- Fusionsproteine (z. B. mit grünfluoreszierendem Protein)



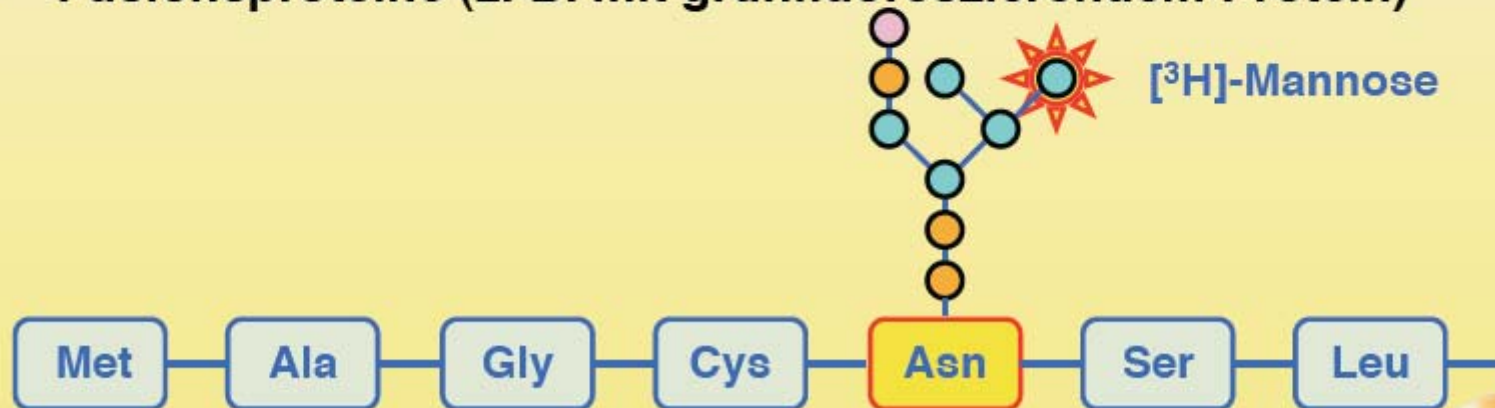
Markierung: metabolisch chemisch biochemisch



Markierung von Proteinen

metabolische Markierung

- [^{35}S]-Methionin und [^{35}S]-Cystein
- Bestandteile kovalenter Modifikationen (z. B. [^3H]-Palmitinsäure)
- *Tags* (z. B. His-*Tag*)
- Fusionsproteine (z. B. mit grünfluoreszierendem Protein)



Markierung: metabolisch chemisch biochemisch



Markierung von Proteinen

metabolische Markierung

- [^{35}S]-Methionin und [^{35}S]-Cystein
- Bestandteile kovalenter Modifikationen (z. B. [^3H]-Palmitinsäure)
- *Tags* (z. B. His-*Tag*)
- Fusionsproteine (z. B. mit grünfluoreszierendem Protein)



Markierung: metabolisch chemisch biochemisch



Markierung von Proteinen

metabolische Markierung

- [^{35}S]-Methionin und [^{35}S]-Cystein
- Bestandteile kovalenter Modifikationen (z. B. [^3H]-Palmitinsäure)
- *Tags* (z. B. His-*Tag*)
- Fusionsproteine (z. B. mit grünfluoreszierendem Protein)



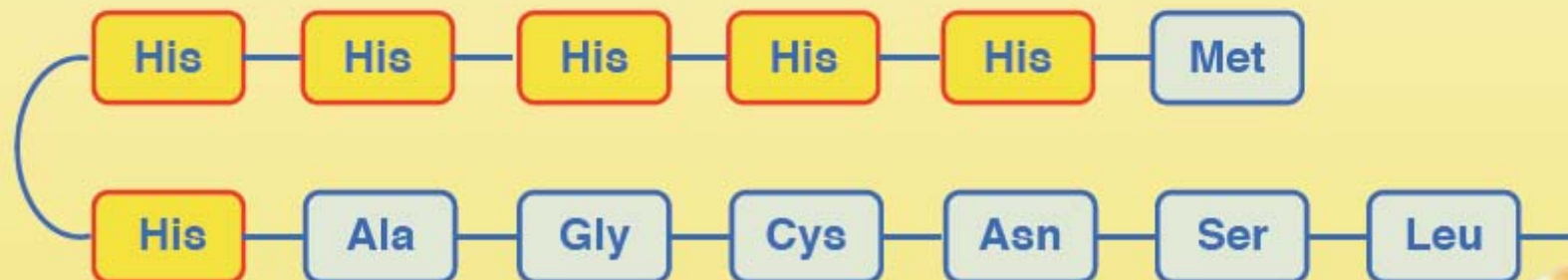
Markierung: metabolisch chemisch biochemisch



Markierung von Proteinen

metabolische Markierung

- [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein
- Bestandteile kovalenter Modifikationen (z. B. [³H]-Palmitinsäure)
- *Tags* (z. B. His-Tag)
- Fusionsproteine (z. B. mit grünfluoreszierendem Protein)



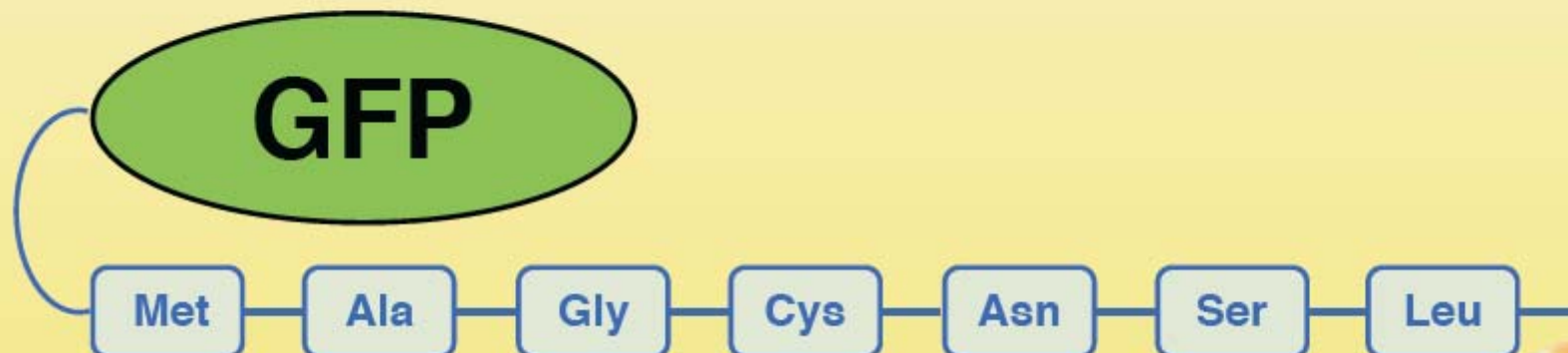
Markierung: **metabolisch** chemisch biochemisch



Markierung von Proteinen

metabolische Markierung

- [^{35}S]-Methionin und [^{35}S]-Cystein
- Bestandteile kovalenter Modifikationen (z. B. [^3H]-Palmitinsäure)
- *Tags* (z. B. His-*Tag*)
- Fusionsproteine (z. B. mit grünfluoreszierendem Protein)



Markierung: **metabolisch** chemisch biochemisch

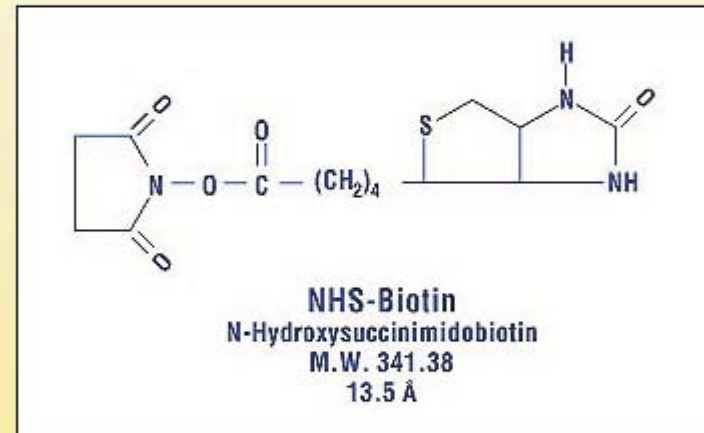


Markierung von Proteinen

metabolische Markierung

chemische Markierung

- ^{125}I od
- Biotin (Vitamin H)



Markierung: metabolisch chemisch biochemisch



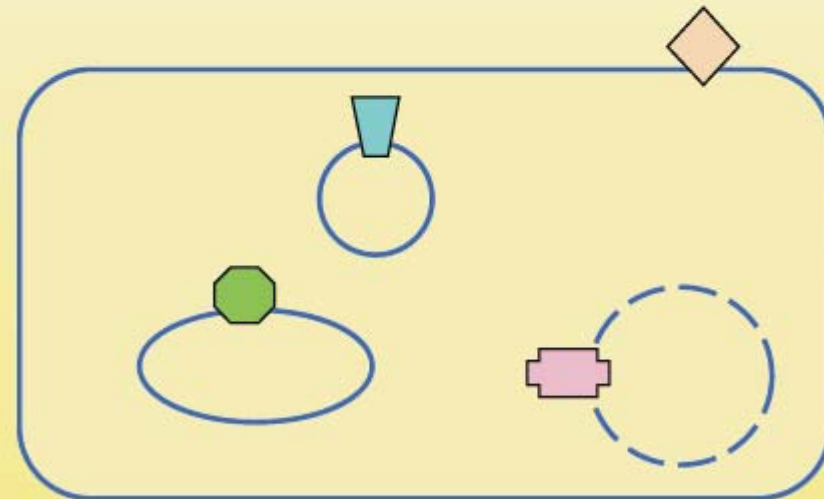
Markierung von Proteinen

metabolische Markierung

chemische Markierung

biochemische Markierung

- natürliche Liganden
(z. B. Hormone)
- Antikörper



Markierung: **metabolisch** chemisch **biochemisch**



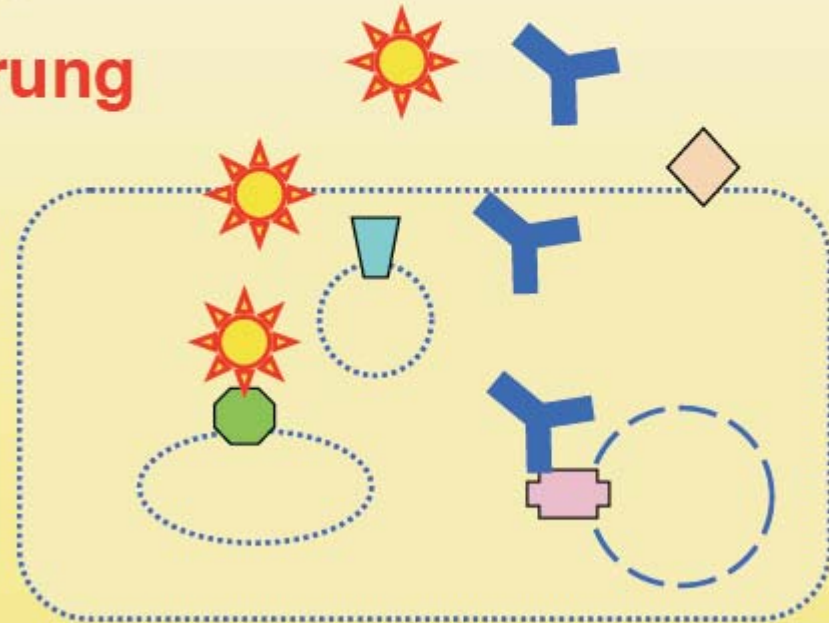
Markierung von Proteinen

metabolische Markierung

chemische Markierung

biochemische Markierung

- natürliche Liganden
(z. B. Hormone)
- Antikörper



Markierung: metabolisch chemisch **biochemisch**



Markierung von Proteinen

spezifisch

- *Tags*
- Fusionsproteine
- Liganden
- Antikörper



an ganzen Zellen

unspezifisch

- [³⁵S]-Methionin und -Cystein
- ¹²⁵Iod
- Biotin



nach Zellfraktionierung

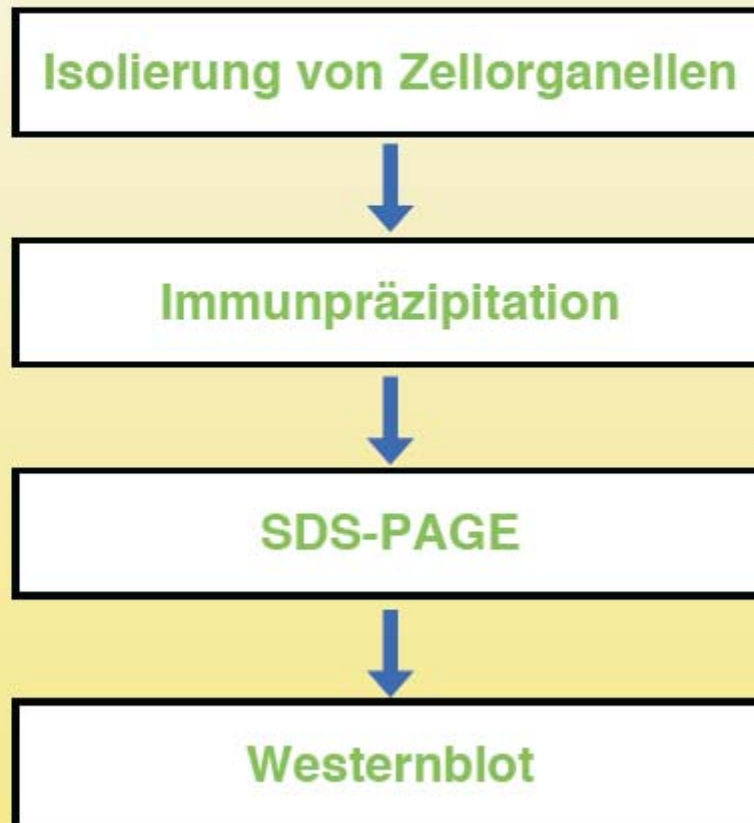
Detektion

Markierung: **metabolisch** chemisch biochemisch



Detektion markierter Proteine

bei unspezifischer Markierung



Detektion: nach Zellfraktionierung an ganzen Zellen

Detektion markierter Proteine

bei spezifischer Markierung

direkter Nachweis

- fluoreszierender Fusionsanteil
- markierter Primärantikörper / Ligand



indirekter Nachweis



Fluoreszenzmikroskopie
Elektronenmikroskopie

Detektion: nach Zellfraktionierung an ganzen Zellen



Methoden und ihre Anwendung

Wieviel Protein ist vorhanden?

- Westernblot / ELISA
- fluoreszenzaktiviertes Zellscanning (FACS)

Wo ist das Protein lokalisiert?

- Nachweis nach Zellfraktionierung
- Markierung von Zelloberflächenproteinen (Zell-ELISA, FACS)
- Immunfluoreszenzmikroskopie
- Immunelektronenmikroskopie

Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



Methoden und ihre Anwendung

Mit wem ist das Protein assoziiert?

- Koimmunpräzipitation
- Ligandenaffinitätschromatographie
- ELISA / RIA (wenn Kandidaten vorhanden)

Wann tritt das Protein auf?

- Lokalisation und Menge des Proteins in Abhängigkeit interner und externer Faktoren

Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



Methoden und ihre Anwendung

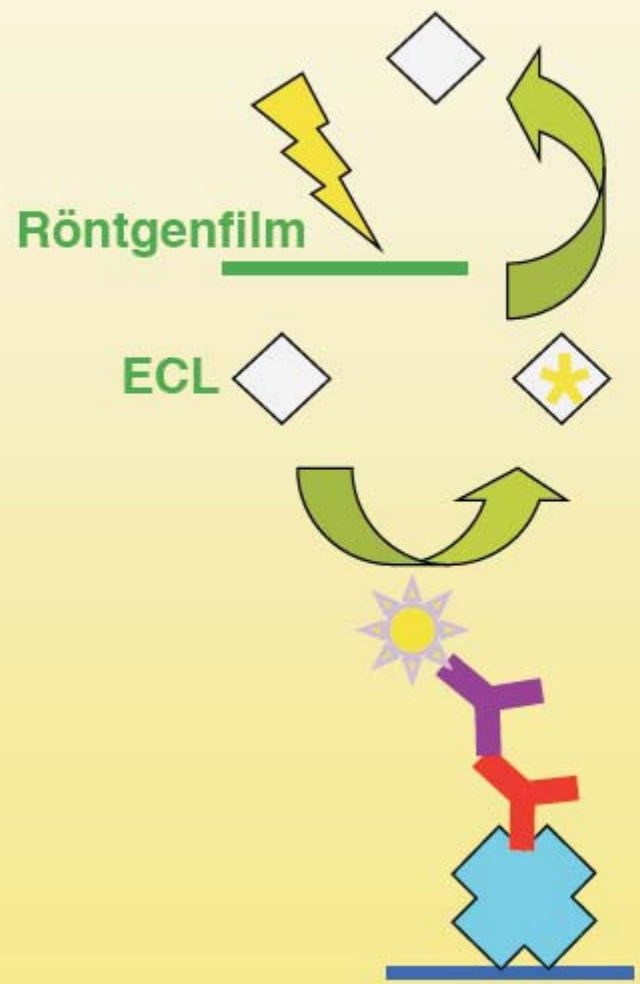
Wie ist das Protein aufgebaut?

- Sequenzvergleich
- Anzahl der Membrandomänen
- Massenspektrometrie
- CD-Spektren
- NMR-Spektren
- Röntgenstrukturanalyse

Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



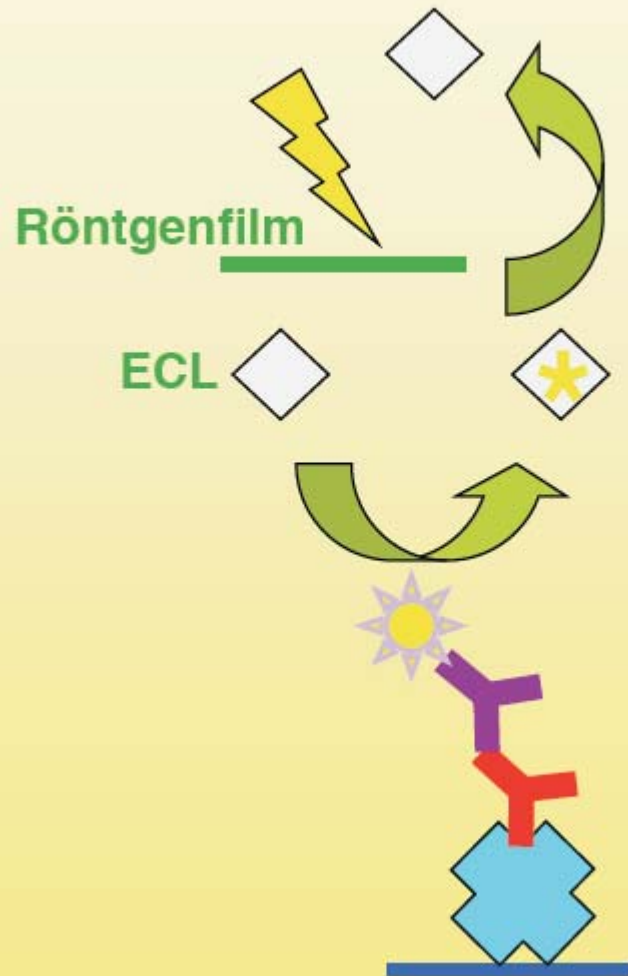
Westernblot



Methoden: **wieviel?** wo? mit wem? wann? wie?



Westernblot

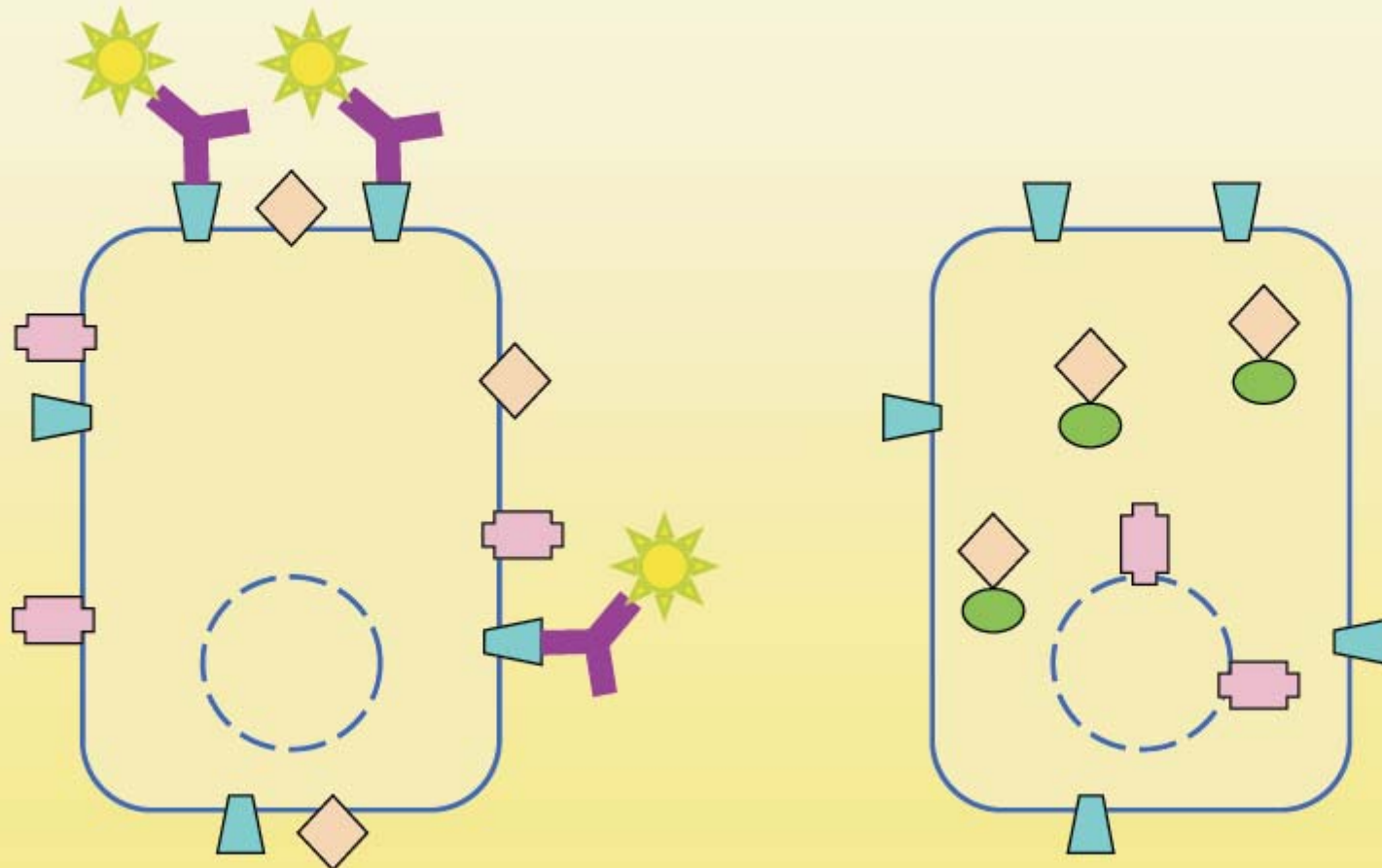


Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



FACS

fluoreszenzaktiviertes
Zellscanning, -sorting

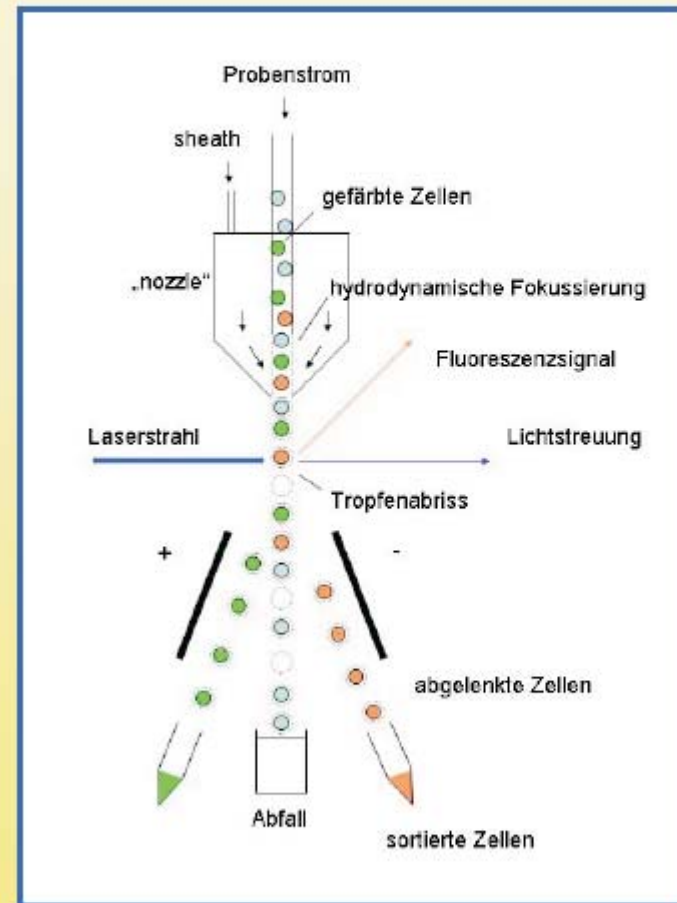
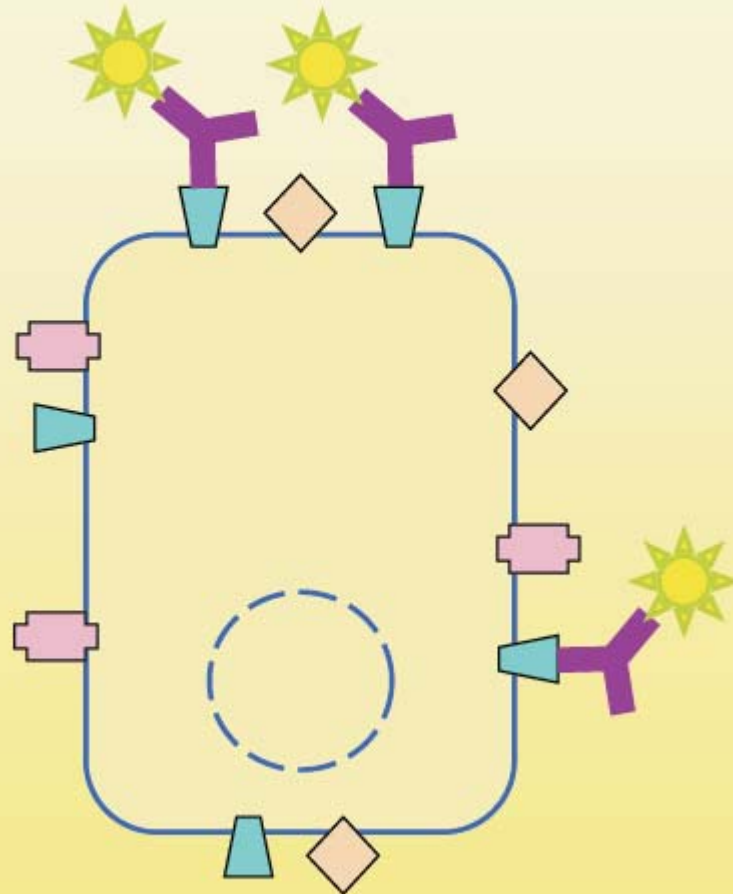


Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



FACS

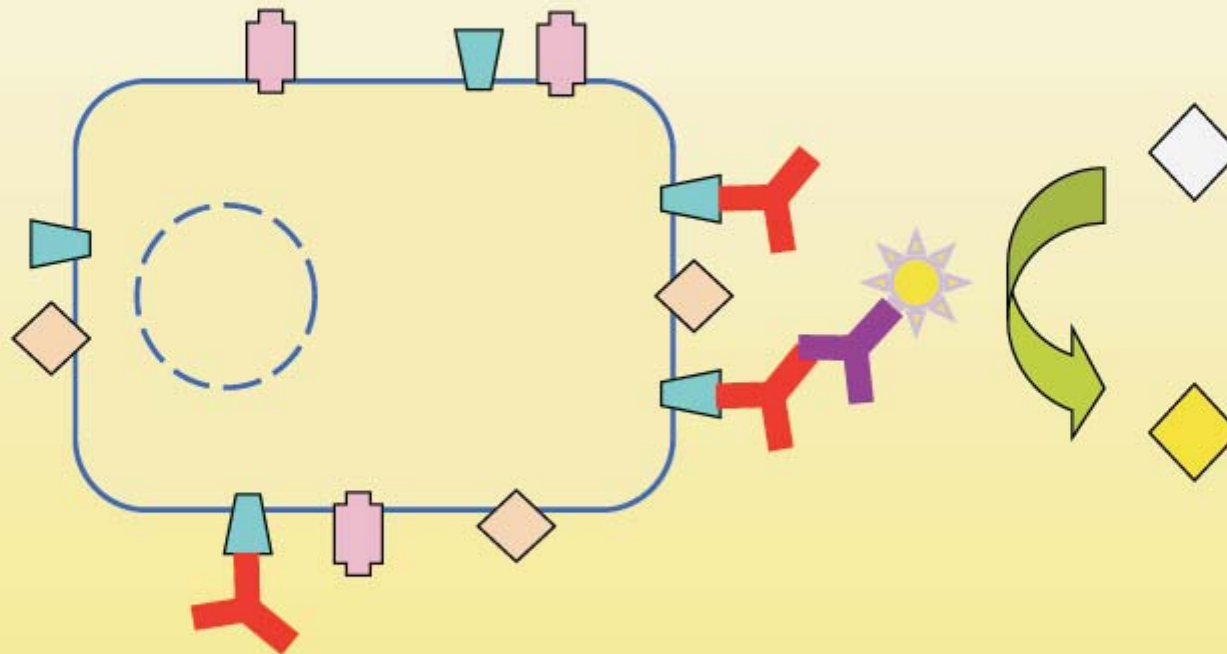
fluoreszenzaktiviertes
Zellscanning, -sorting



Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



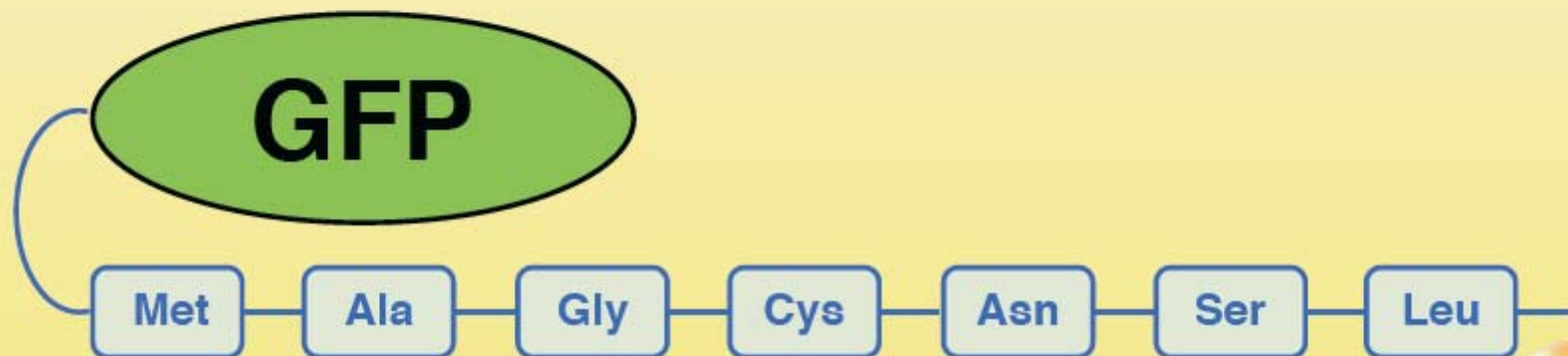
Zell-ELISA



Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



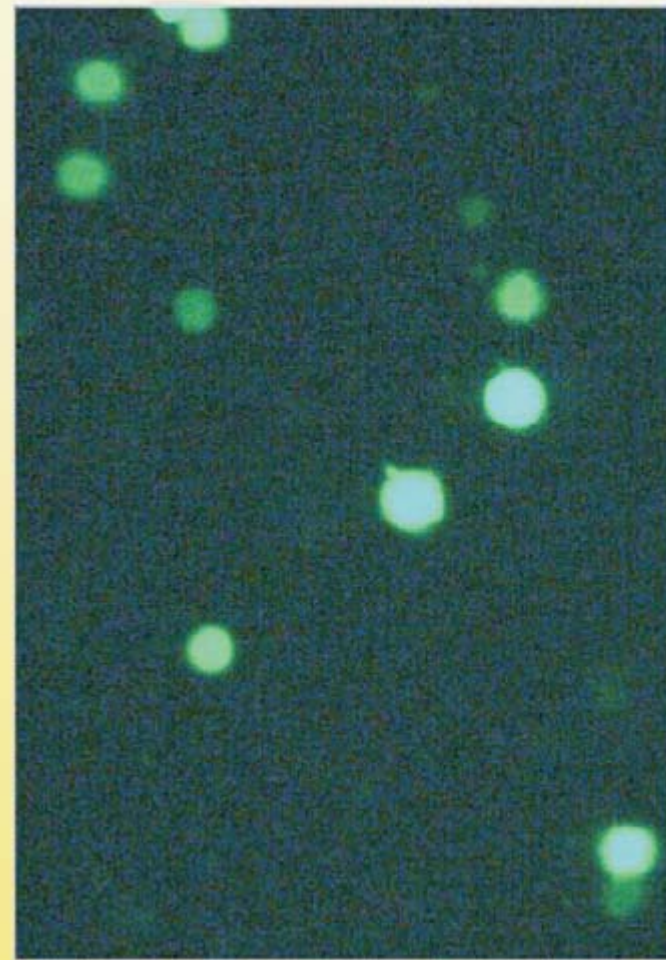
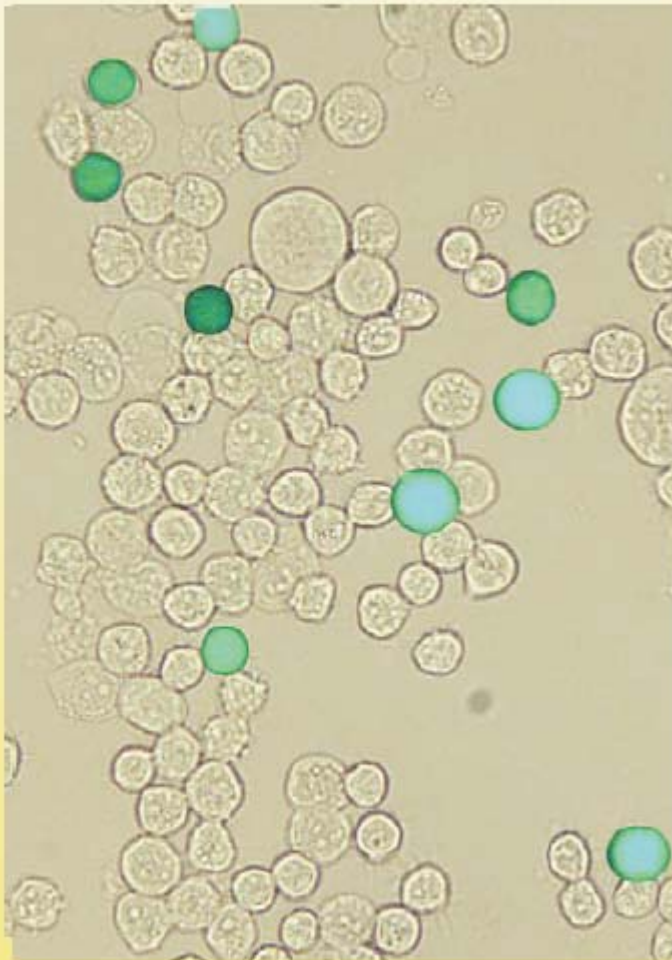
Fluoreszenzmikroskopie



Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



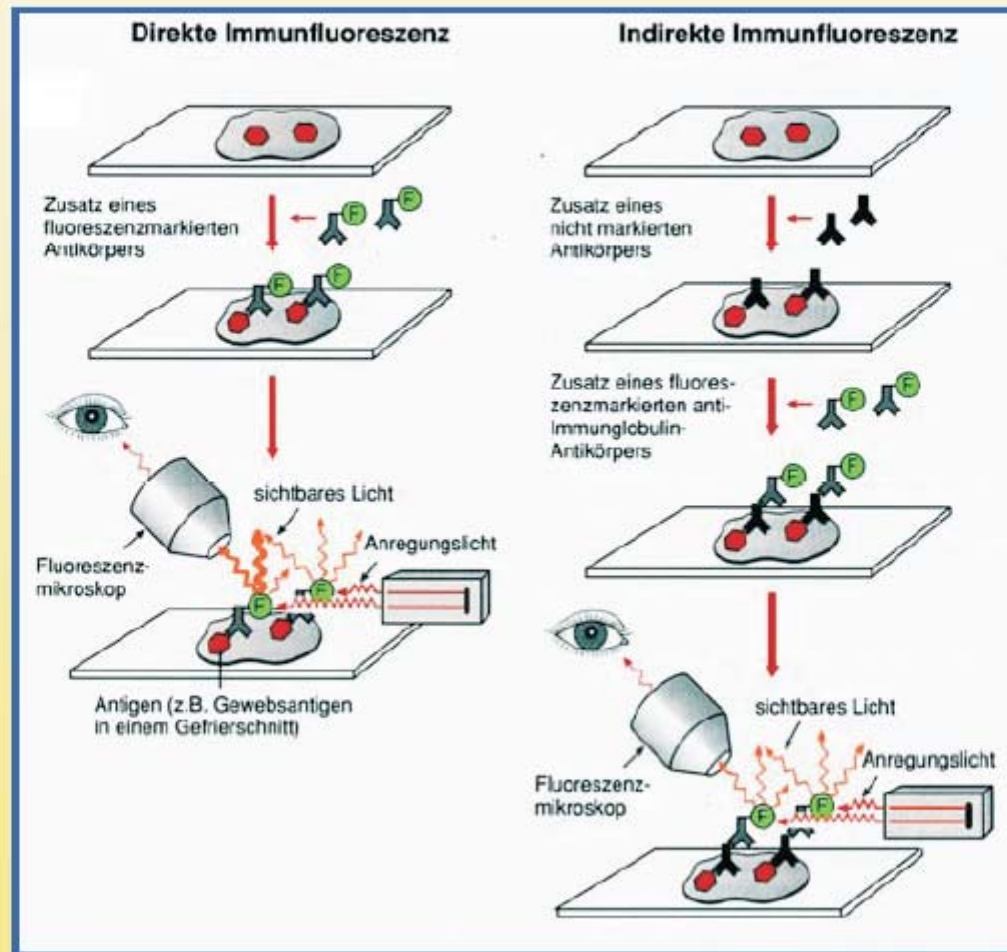
Fluoreszenzmikroskopie



Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



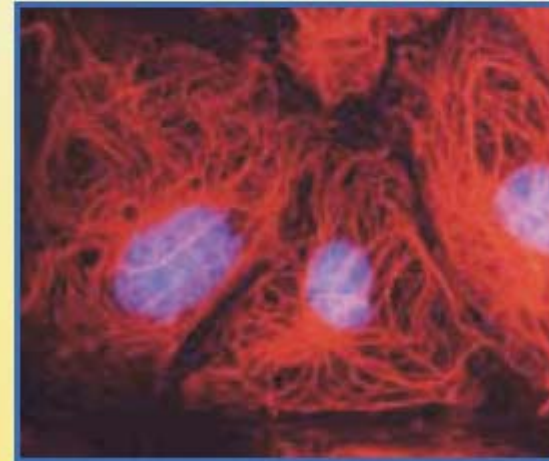
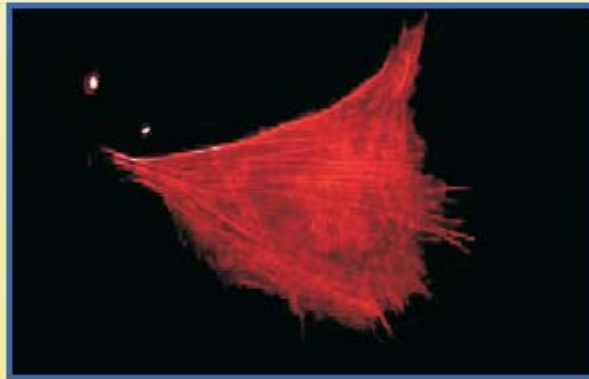
Immunfluoreszenzmikroskopie



Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



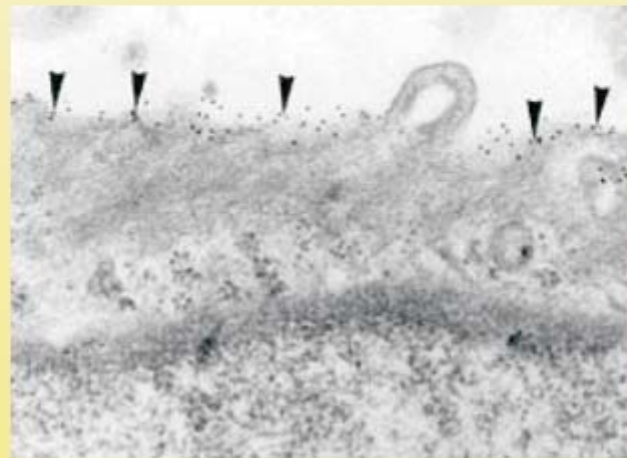
Immunfluoreszenzmikroskopie



Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



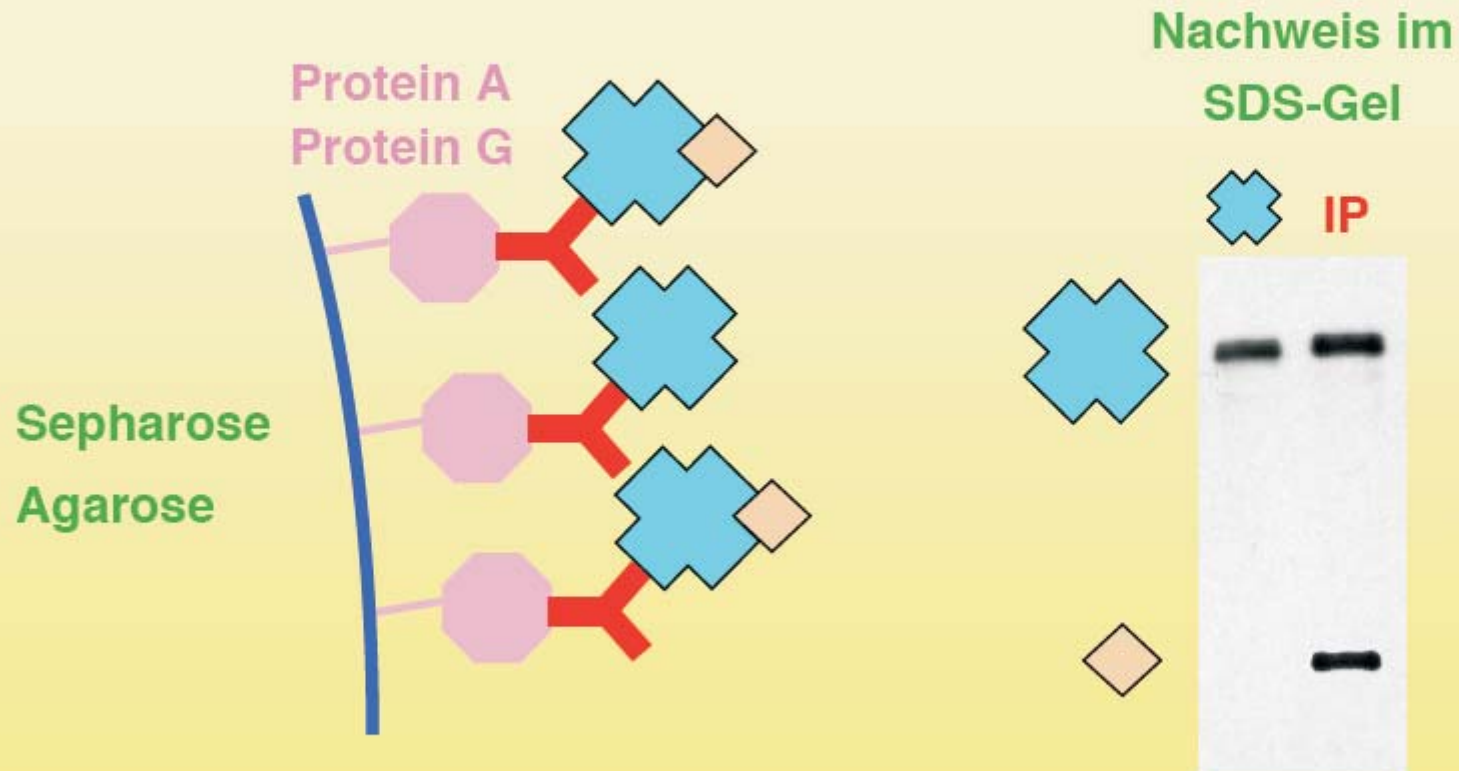
Immunelektronenmikroskopie



Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



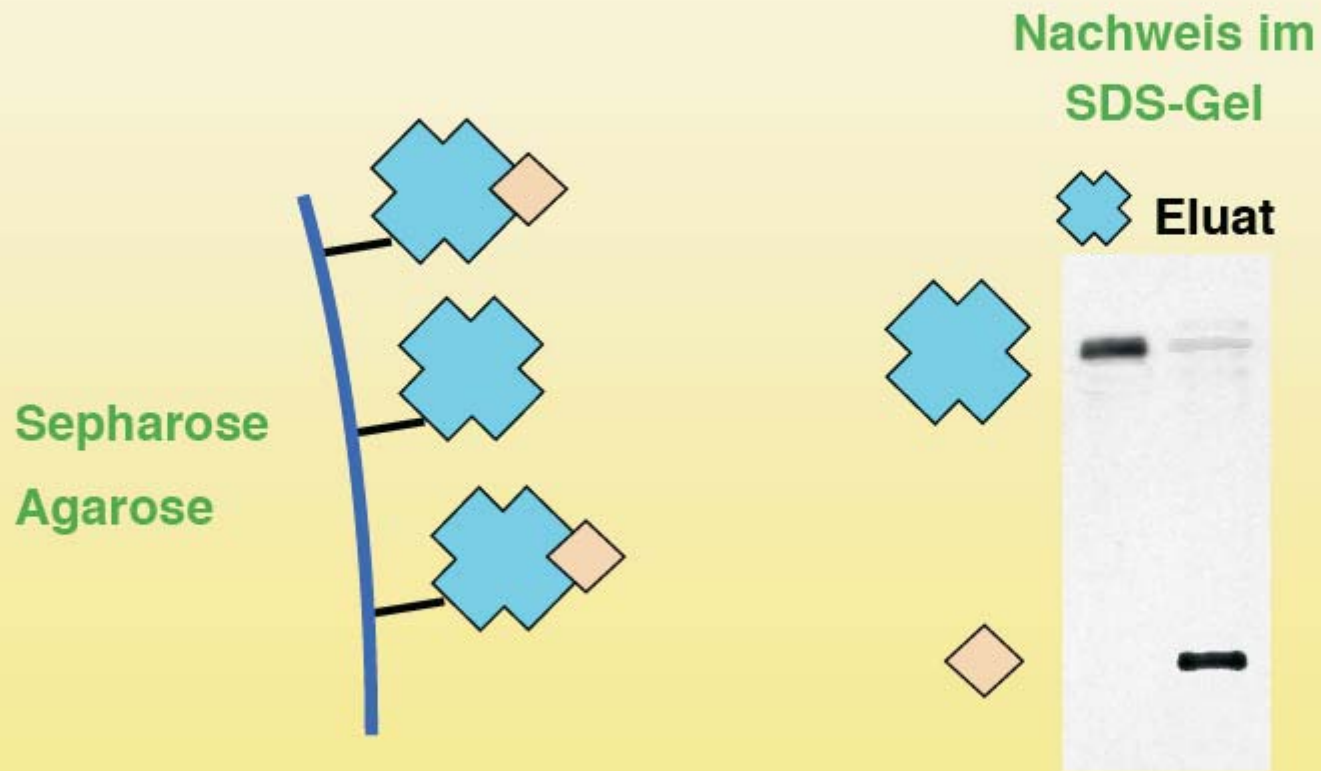
Koimmunpräzipitation



Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



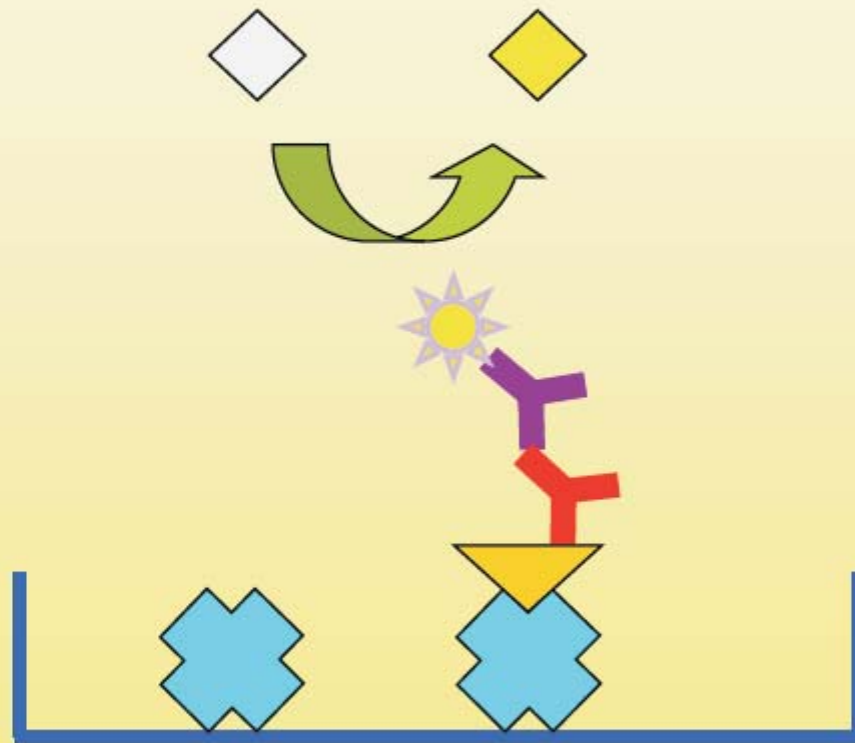
Ligandenaffinitätschromatographie



Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



ELISA



Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



Sequenzvergleich

bekanntes Protein



unbekanntes Protein



Methoden: wieviel? wo? mit wem? wann? wie?



Fragestellungen

Wieviel

Westernblot,
ELISA, FACS

Wo

Zellfraktionierung,
Zell-ELISA, IFM, IEM

Mit wem

ELISA, Koimmunpräzipitation,
Ligandenaffinitätschromatographie

Wann

Alle Methoden unter verschiedenen
Bedingungen für die Zelle

Wie

Sequenzvergleich, spektroskopische
Methoden, Röntgenstrukturanalyse

