

Molekularbiologie III

Inhalt

Vorwort

I Zellbiologie

- Zelladhäsion
- Zellzyklus
- Zelltod

II Entwicklungsbiologie

- Embryonalentwicklung
- Neurulation
- Keimblätter

III Viren

- allgemeine Eigenschaften

Therapie

Morphologie

Replikation

Einteilung

IV Tumore

Oncogenese

Oncogene und Tumorsuppressorgene

Klassifizierung

- Metastierung
- Tumorentwicklung
- Zusammenfassung

Vorwort

Die ersten 4 Themen sind ein Gemisch aus der Zusammenfassung von Utz, Mitschriften aus der Vorlesung und von den Kopien. Die letzten drei sind fast nur von Utz. Ich gebe keine Garantie auf Vollständigkeit und Korrektheit. Aber vielleicht hilft es ja trotzdem...

Ach ja, die Formatierung ist so schrecklich, weil ich es erst in WORD geschrieben habe, dann in Star writer weitergemacht und es dann wieder in WORD kopiert habe, sorry, ging nicht anders.

Und noch ein dickes danke an Utz ☺

I Zellbiologie

Zelladhäsion

○ Zell-Zell-Adhäsion

- Beispiel: Schwammpopulationen (erkennen Artspezifität: keine Zellmischung)

- Froschgewebe (Zellen aggregieren gewebespezifisch => Zellen können sich selbst erkennen)

- Chemoaffizitätstheorie: 1960

- Modulationstheorie: 70'er es existieren 100 tausende Oberflächenmarker (modifizierbar) daher

- Gewebedifferenzierung. Erste Forschung Entdeckung erster Zelladhäsionsmoleküle.

- Mit Hilfe mit Antikörpern Nachweis von Zell-Zell-Kontakte (Antikörper aus Myelomzellen)

Integrale Membranproteine stellen Verbindungen zwischen verschiedenen Zellen über einen homophilen oder heterophilen Bindungsmechanismus her.

Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle

Cadherine

für die Zell-Zell-Kontakte im Epithel zuständig - (Cadherine an Cadherine)

brauchen Ca

Lokalisation in der Zonula adherens

Aufrechterhaltung von Gewebestrukturen im adulten Organismus

Rolle bei der Gewebeorganisation während der

Embryonalentwicklung

Die differenzielle Expression von Cadherinen reguliert die

Prozesse in der Embryonalentwicklung

Regulation von Signaltransduktionswegen -Wg/Wnt-Signalweg

Verlust oder Mutation von Cadherin-Genen:

Progression in Richtung invasiver, maligner Phänotypen

bei epithelalen Tumoren

An der Membran:

Innen sind die Catenine über alpha-Aktinin mit F-Aktin-

Filamenten verbunden

Außen sind die Proteinstrukturen mit Ca²⁺ gebunden

Selektine

drei Typen, enthalten Lectin, mit Zuckern

L-Selektin (Leukozyten), E-Selektin, P-Selektin (nicht in den

Kopien)

Modell der Leukozyten-Rekrutierung aus dem peripheren Blut

(siehe Kopien)

vermitteln Interaktionen von Leukozyten mit Zellen des

mikrovaskuläre Epithels während

entzündlicher Prozesse

Lymphozyten-Hom

IgCAMs

Immunglobuline (Superfamilie); größte Gruppe, sind Ca unabhängig (größte Varianz in den Eigenschaften homophile, heterophile)

beeinflussen eine Vielzahl biologischer Prozesse:

Entwicklung des Nervensystems

Vermittlung von Zell-Zell-Interaktionen bei der

Immunantwort

Tabelle über die Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF)

Integrine

Hauptsächlich Matrixmoleküle (Extrazelluläre Matrix)

Ca²⁺/Mg²⁺ abhängig

Funktionen:

Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion

Zell-Wanderung auf Matrix

Proliferation, Apoptose und Differenzierung

Gewebe-Bildung und Aufrechterhaltung

Leukozyten-Wanderung aus den Blutgefäßen

Wundheilung und Blutgerinnung

Angiogenese (Entstehung von Blutgefäßen)

Tumorgenese und Metastasierung

Aufbau von Integrinen: (Grafik)

Integrin-Liganden-Bindung führt zur Bildung fokaler Adhäsionen

Aktivierung von Integrinen durch Inside-out-Signaling

-Annäherung

-Rollen

-Aktivierung

-feste Adhäsion

-Transmigration ins Gewebe durch das Endothel der Blutgefäße

NCAM/ neurales Zelladhäsionsmolekül

Struktur:

5 Ig-ähnliche Domänen; 2FN Typ III repeats
Isoformen von 180 kD, 140 kD and 120 kD
Kann polysialyliert sein

Expression auf:

Neuronen
Astrocyten
Oligodendrocyten
Schwann-Zellen
Immunsystem
Muskelzellen

Funktionen:

Adhäsion
Axonales Wachstum
Signaltransduktion

○ **extrazelluläre Matrix (ECM)/ Zell-Matrix-Adhäsion**

-Vorkommen in verschiedenen, spezialisierten Formen

Bindegewebe

Knorpel

Sehnen, Bänder

Knochen und Zähne

Basalmembranen

-Hochorganisierte Netzwerke

-Zusammensetzung variiert je nach Zelltyp und Gewebe

-Synthese durch lokale Zellen

Integrale Membranproteine binden heterophil an Moleküle der extrazellulären Matrix.

-Moleküle der ECM

Proteoglykane

Glykoproteine

-Kollagene

-Laminine

-Fibronectin

-Tenascin

○ **Bedeutung**

Proliferation (Zellteilung)

Bewegung (z. Bsp. in Blutkapillaren: Andocken an Endothel, Abbremsen, durchwandern des Endothels ins Gewebe, Auswachsen eines Axons)

-Transendotheliale Migration (z. Bsp. durch das Gewebe (Epithelien) wachsen)

-Differenzierung

-Apoptose

-Zell- und Gewebe-Architektur

Zellzyklus

○ **Caspasen**

Cysteiny-Aspartasen

enthalten Cystein im aktiven Zentrum, spalten Substrate nach Aspartat (DXXDcut) in jeder Zelle vorhanden

erst durch Signale aktiv (limitierte Proteolyse, d.h., durch zweimaliges Spalten entstehen eine große und eine kleine Untereinheit -> aktive Form: 2große und 2 kleine Untereinheiten, aktiviert bei Apoptose (??))

3 Gruppen

Regulation inflammatorischer Prozesse

□□ Initiatorcaspasen (z. Bsp. Caspase 8 und 9)
Weiterleitung apoptoschen Signals, Aktivierung "ausführender"
Caspasen

□□ Effektorcaspasen
Spaltung zellulärer Proteine => verantwortlich für morphologische
Veränderungen beim apoptischen Zelltod
Substrate
DNA-Reparaturenzyme (PARP)
DNasen (CAD)
Kernhüllenproteine (Lamine)
Cytoskelettproteine (Fodrin und Actin)

○ Phasen

bei frühen Zellen (Furchung): keine G1 und G2 Phase

M: 1h

Mitose: Kernteilung und Zellteilung

G1: 6-12h

RNA und Protein Synthese, DNA-Reparatur

Dauer bei Leberzellen bis zu einem Jahr

am Ende der Phase: Restriktionspunkt: nach Durchschreiten =>
zwangsläufig S-Phase

S: 6-8h

DNA-Verdopplung, RNA und Protein-Synthese

G2: 3-4h

RNA und Protein-Synthese

. **wichtige Wachstumsfaktoren**

p16, p21, p27, p53, Rb

- Cycline

regulatorische Einheiten: nur in bestimmten Zellzyklus-Phasen
vorhanden, schneller Abbau (<30 Minuten), sind entscheidend für den
Übergang von Phasen (z.B. bei DNA-Schäden: p53 Aktivierung => p21
Translation => Inhibition Cyclin-Cdk-Komplex

Zelltod

Apoptose ist der Mechanismus, der zum programmierten Zelltod führt
und damit zu einer gesteuerten Selbstzerstörung von Zellen, sie ist also
das zelluläre Selbstmordprogramm. Apoptose wurde erstmals 1972 von
KERR, WYLLIE und CURRIE beschrieben und von der Nekrose
abgegrenzt.

Einteilung der Apoptose:

Induktion Entzug von Wachstumsfaktoren, Hormonen, Zell-Zell-
Kontakten;

Aktivierung der Todesrezeptoren,
DNA-Schädigung;

Stoffwechsel- oder

Zellzyklusstörungen;

zytotoxische T-Zellen

Exekutionsphase

Endphase

Morphologie der Zelle während der Apoptose

verliert Kontakt zu Nachbarzellen

Veränderung der Phospholipidkomposition der Zellmembran:

Phosphatidylserin von der Innen- zur Außenseite (->Phagocytose),

Zellmembran bleibt intakt

„membrane blebbing“: bläschenartige Ausstülpungen der
Plasmamembran

Zellvolumen nimmt stark ab, wegen Wasser- und Ionenverlust, Dichte der Zelle nimmt zu
 Zellorganellen bleiben intakt (insbes. Mitochondrien, aktiver Prozess!)
 Verdichtung der Chromatinstruktur
 Spaltung der DNA durch Endonukleasen
 „apoptotic bodies“: Abschnürung membranumschlossener Vesikel, die Membranbestandteile enthalten
 Phagocytose der „apoptotic bodies“ durch Makrophagen oder durch Nachbarzellen

○ Apoptose	○ Nekrose
Induktion durch physiologische Signale	Induktion durch Noxen (Chemikalien)
Untergang einzelner Zellen	Untergang ganzer Zellgruppen
kontrollierter Stoffwechselprozess	Verlust der zellulären Homeostase
energieabhängiger Prozess	energieunabhängiger Prozess
aktiver Prozess (mit Proteinbiosynthese)	passiver Prozess (ohne ~)
Zellmembran intakt	Zellmembran wird durchlässig
Zellschrumpfung	Zellschwellung / Zellyse
intakte Lysosomen	Freisetzung lysosomaler Enzyme
keine inflammatorische Reaktion	heftige inflammatorische Reaktion
Phagocytose durch Nachbarzellen und Macrophagen	Phagozytose u.a. durch Entzündungszellen (Granulocyten und Makrophagen)
internukleosomale DNA-Fragmentierung	randomisierte DNA-Fragmentierung

II Entwicklungsbiologie

Embryonalentwicklung

Embryonalentwicklung der Maus (siehe Kopien)

Mausentwicklung:

Befruchtetes Ei:	Zona pellucida: Zellwand
	Mütterliche und väterliche Pronuclei
	Polkörperchen
2 Zellstadium	(1,5 Tage)
Monula (8 Zellen)	(2,5 Tage)
16 Zellstadium	(3 Tage)
Blastocyste:	Blastocoel (Zellflüssigkeit)
	Trophektoderm

Froschentwicklung:

Mittlere Blastula (4000 Zellen 7 Std. alt)
 Frühere Gastrula (20000 Zellen , 9 Std. alt)
 Blastocoel
 Späte Gastrula (12 Std. alt)

Neurulation

Entwicklung des Nervensystems

- neuronale Platte
- neuronales Rohr
- neuronaler Kamm

Keimblätter

Endoderm

Magen-Darm

Lunge

Leber

Mesoderm

Muskel

Knochen

Bindegewebe

Gefäße

Urogenitalsystem

Ectoderm

Haut

Nervensystem

Koordinaten

Pole

animaler

vegetativer

Achsen

dorsal - ventral Rücken - Bauch

anterior - posterior vorne, hinten

medial - lateral links, bzw. rechts von der Mitte

III Viren

Allgemeine Eigenschaften

Protein / Genom: DNA {RNA} Nukleinsäure liegt je nach Virusart als

Doppel- / Einzelstrang vor

keine Zellstruktur, kein eigener Stoffwechsel

Ausschliesslich von lebenden Zellen repliziert

Größe: 25 nm (Picornaviren bis 250x350 nm Pockenviren.

Vergleich: Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops: 300 nm

Bakterien: 500-50000 nm.

Aufbau: Komplexe aus viruskodiertem Protein und Nukleinsäure
einzelne Virusarten können zellkodierte Bestandteile mit sich tragen (Membranen, tRNA)

Vermehrung: nur in lebenden Zellen

Virus liefert Information in Form von Nukleinsäuren für einige wenige Proteine

lebende Zelle liefert die restlichen Enzyme für den

Proteinsyntheseapparat für die Strukturen, an denen die Syntheseschritte ablaufen

Befallen: Pflanzen

Bakterien à Bakteriophagen

Tier/ Mensch

Therapie

- **Antibiotika unempfindlich**
- **Interferone**
Gensequenzen sind bekannt, Substanzen können gentechnisch in beliebiger Menge produziert werden.
antiviral, zellteilungshemmend, immunmodulatorisch (Stimulation / Suppression von Antikörper-Produktion, zellulären Oberflächen Antigene, T-lymphozytenfunktion, NK-Zellfunktion)
Es werden antivirale Proteine synthetisiert.
Leukozyten Interferon (IFN alpha antiviral)
Fibroblasten Interferon (IFN beta antiviral)
Immuninterferon (gamma immunregulatorisch)
- **Chemotherapie**
- **Körperabwehr (Prostaglandine)**

Morphologie

- **nackt**
(Kapsomere, Nucleinsäuren)
ikosaedrisch
helikal
- **behüllt**
(Lipidhülle, Glycoproteine, Kapsomere, Nucleinsäuren)
ikosaedrisch
helikal

Replikation

- Adsorption** an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche,
Penetration
- Eindringen** des Virus & intrazelluläre Freisetzung Nucleinsäuren
- Vermehrung** der viralen Komponenten, viruskodierte Synthese:
Kapsid-, Nichtkapsidproteine
- Replikation Nucleinsäuren**
Unterscheidung, ob RNA in + oder - Form vorliegt, bzw. einzel- oder doppelsträngig oder DNA
normal
Retroviren (schreiben sich ins Genom hinein, können Oncogene in ihrer Sequenz tragen -> tragen zur Tumorentstehung bei)
- Zusammenbau** neue Kapsidproteine und replizierte Nucleinsäuren
- Freisetzung** Virenkinderchen aus der Zelle raus
Viruseigene Polymerase wandelt eigene DNA Sequenz in eine ein zellkonformen DN A Codonstrang um

benötigt um nRNA Sequenz in eine mRNA Polymerase (durch reverse Transkriptase) umzuwandeln (bringt jedes Virus mit um die aus dem Anticodon einen Codon zu erstellen).

Einteilung

- **DNA**
kubisch
-nackt (single strand, double strand)
-behüllt
...

komplex

-...

○ □ RNA

-...

IV Tumore

Oncogenese

pathologische Veränderungen des Genoms

Punktmutation, Carcinogene

Gentraslokation, Retroviren

genetische Disposition

experimentelle Definition von Oncogenen und

Tumorsuppressorgenen

Prozess der malignen Entartung

Genprodukte der Oncogene/Tumorsuppressorgenen (veränderte

Genprodukte und Biologie der entarteten Zelle)???

○ □ Ursachen

□ □ Basenaustauschfrequenz in vivo: 10^{-9} je Zellgeneration

-> effektive Reparaturmechanismen

□ □ Punktmutationen

Basentausch (Transition Pur<>Pur, Pyr<>Pyr, Transversion Pur<>Pyr)

silent mutation (keine Wirkung)

missense (andere As wird codiert)

non sense (keine As wird codiert)

Deletion/Insertion

frameshift (Ableserahmen wird verändert)

stop codon (entfernt oder früher taucht eines auf)

□ □ Chromosomenanomalien

Chromosomenabschnitte: Verdopplung

Verlust

Inversion

Chromosomenbrüche und Translokation

Veränderung der Chromosomenzahl (meist sekundär)

Folgen:

Genverluste (Deletion)

Genverstärkung (falsche Regulatoren)

falscher Expressionszeitpunkt

Fusionsgene

amplifizierte Gene

Verlust der Heterozygotie (LOH)

□ □ Cancerogene

Probleme im Organismus im Umgang mit Karzinogenen

Aktivierung durch P450 Monoxygenasen

unzureichende Entgiftung

elektrophile Addition

interkallierende Adukte

chemisch

polyzyklische Kohlenwasserstoffe

aromatische Amine

Nitrosamine

Metalle

physikalisch Strahlen

□ □ oncogene Retroviren

ROUS-SARCOMA-Virus (Huhn)

RNA-Viren mit reverser Transkriptase ???

○ **Reparatursysteme**

direkte Revision (Alkyltransferasen, Photolyasen)

Basenexzision

Nukleotidexzision

Tumorsuppressorgene

Rekombination (Strangaustausch mit nicht betroffenem Allel direkt nach der Replikation)

methylgesteuerte mismatch-Reparatur

Oncogene und Tumorsuppressorgene

Multiple Mutationen an beliebigen Stellen oder an wenigen Schlüsselstellen?

Transformierende DNA aus Tumoren und Viren

Punktmutationen in hotspots

Chromosomale Translokation in der Umgebung

spezifischer Gene

Spezifische zelluläre Gene sind kritisch verknüpft mit der Oncogenese

Funktionsgewinn bzw. -verstärkung insb. Durch

Einfluss falscher Regulator- mechanismen nach

Tranlocation, dominant Oncogene

Funktionsverlust insb. durch somatische

Punktmutation und vererbte Prädisposition; rezessiv

Tumorsuppressorgene

Retroviren können zelluläre Oncogene (c-onc) integrieren

und als virale Gene mit hoher Transformationspotenz (v-onc)

verbreiten

Klassifizierung

○ nach Histogenese

epitheliale Blastome

mesenchymale Blastome (Bindegewebe)

Melanome (des pigmentbildenden Gewebes)

Teratome (Mischgeschwülste, nicht bösartig, können sich zurückbilden)

○ Benennung

Name des Ausgangsgewebes + Endung „-blastom“ oder „-om“

Beispiele: Karzinome (mama Adenokarzinom)

 Sarkome: Bindegewebe

 Leukämien und Lymphome: Knochenmark und

Leukozyten oder

 Lymphknoten

benigne Tumore	maligne Tumore
langsames Wachstum	schnelles Wachstum
gut begrenzt	schlecht begrenzt
Spontanheilungen möglich	Metastasierung
kann in maligne Form übergehen	

Metastierung

○ Lymphogene

- Hämatogene
- Kanikuläre
- Implantationsmetastierung

Tumorentwicklung

gesunde Zelle -> **Initiation** (irreversible DNA-Schäden, Cancerogene) -> transformiert -> **Proliferation** (reversible exogene Stimulation, Wachstumsfaktoren) -> benigner Tumor (dereguliertes Wachstum) -> **Progression** (genom. Instabilität, multiple DNA-Schäden) -> maligner Tumor (unspezifisch, immortalisiert, autonome Absiedlung)

Mehrstufenkanzerogenese

Initiation	irreversible Genomveränderungen,
Summationswirkung	
Latenzperiode	Kofaktoren (es muss kein Tumor entstehen)
Tumormanifestation	wenn Tumor mit Auge sichtbar, zu spät

Zusammenfassung

- Ursache von Krebs sind akkumulierende genetische Veränderungen
 - durch Punktmutationen und Translokationen in Chromosomen
 - die spezifische Gene bzw. Genprodukte betreffen
 - und durch epigenetische Vorgänge begleitet sind
- betroffen sind vor allem Mechanismen
 - der Wachstumsregulation
 - der Differenzierung und DNA-Reparatur
 - der Kommunikation mit der Umgebung
- Die Veränderungen bewirken autonomes Verhalten durch
 - konstitutive Signalanschlaltung bzw. erhöhte Sensivität
 - Verlust der Kontrollmechanismen

Signaltransduktion über RAS...

VI Immunologie

Abwehr

- Immunabwehr
- unspezifisch
- Humorale Faktoren
- Komplementsystem
- Zytolyse
- Membranattacke
- Entzündung
- Opsonisation
- Ummantelung
- Inaktivierung Komplement

Lysozym
kann Bakterienzellwände spalten
Interferon
 Zell-vermittelte Abwehr
Phagocyten
NK-Zellen
spezifisch
 humorale Faktoren
Antikörper
 Zell-vermittelte Abwehr
T-Lymphocyten
Helferzellen
zytotoxische Zellen
 physikalische Barrieren
Haut
Blut-Hirn-Schranke
Mukosa (Auskleidung der Gastrointestinal-, Genitourinal- und
Respirationstrakte)
Spüleffekte (Tränen; Speichel, Schleim; vaginale Sekretion; Nasenhaare;
Husten / Niesen)

biochemische humorale Effekte

Haut pH
Ohrenschmalz (Fettsäure)
Talgdrüsen (ungesättigte Fettsäuren)
Schweiß (Milchsäure)
Lysozym
Gallensekret (bakterizid)
Magensaft (saurer pH durch HCl)

Grundlagen

Leukozyten

- Lymphocyten

entstehen alle aus pluripotenten Stammzellen aus dem

Knochenmark

- B-Zelle spez. B-Zell-Rezeptor

*Aktivierung durch T-Lymphocyten

- T-Zelle Reifung in Thymusdrüse TCR: T-Cell-Receptor

*klonale Selektionstheorie

*positive und negative Selektion

*Typen

-zytotoxische

-Helferzellen ? 1 und 2

- Thymocyten

- Phagocyten

- Helferzellen

- wichtige Rezeptoren/ Antigene

MHC: Class I und Class II

CD: 4+ und 8+

Immunität

- angeboren

- erworben

VII Analytik

von Kohlenhydraten

- Vorkommen

Glycolipide

Proteoglycane
Glycoproteine
○ □ Klassifizierung
Monosaccharide
Dionex-Methode
Oligosaccharide
Hydrolyse
chemisch
enzymatisch
Methanolyse

○ Nachweis
-als Reduktionsmittel unter basischen Bedingungen
Iodreaktion
Tollens-Reagenz
Fehlingsche Lösung
-colorimetrisch
Morgan-Elson-Test
Thiobarbitursäure-Test
-optisch
gekoppelt und ungekoppelt; Nachweis von NADP/NADPH bei 340 nm
-HPLC
für Sialinsäure
-Proteine
Lektine
Western-Blot
FACS
Selektine

○ □ □ **Modifizierung**
Inhibition Glycosyltransferasen
Knock-Out-Mäusen der Glycosyltransferasen
Inhibition N-Glycan-Biosynthese durch Substratanaloga
Biochemical Engineering von Sialinsäuren

Proteomanalytik

○ 2-D-Gelelektrophorese
○ Fraktionierung
○ MALDI-TOF-MS
○ PSD

○ **Differenzierung: Komplexität jenseits der Gensequenz**

Modulationsebenen Expression: beobachtbare Größen	
Transkription	
RNA-Prozessierung	mRNA -> cDNA
Translation	Polypeptide
posttranslantiene Modifikation	funktionale Proteine
Lokalisation	subzelluläre
Verteilung	

Sekundäre Genprodukte:
Metaboliten
Makromoleküle

diverse „kleine“ Moleküle
Glycane, Lipide

○ Ziele

Beschreibung der molekularen Basis von Lebensvorgängen
Welche Moleküle
in welcher Beziehung stehen sie: Verknüpfungen -> Netzwerke
wie interagieren sie
Metabolismus (Stoffe und Energie)
Zuordnung zu biologischen Funktionen durch Verknüpfung mit
biologischen Experimenten und klinischen Beobachtungen

○ Ausgangssituation

biologisches Phänomen (möglichst einfach & eindeutig)
komplexe Gemische (Lysate)
Homogenisate mit einer Vielzahl von Komponenten
Heterogenität innerhalb einer Komponente
Artifizielle fragmentgemische durch Spaltung (Komplexe
Mischung diverser Moleküle)

•vorliegende Hilfsmittel, Befunde
Sonden, substanz.- oder gruppenspezifisch:
cDNA, monoklonale AK, Lektine, Liganden
Vorbefunde:
Literatur, Datenbanken

○ Resultat

Identifizierung:
einzelner Komponenten mit Korrelation zum biologischen Phänomen
Phänomenspezifische Veränderung
an den Komponenten
an der Komposition
Dokumentation
Publikation
Speisung von Datenbanken
Gewinnung spezifischer Sonden

○ Methodik

Abbildung: Erstellung von Mustern (Fingerprinting)
Fraktionierung: Separierung und Anreicherung von Komponenten
Beschreibung: Bausteine, Sequenz, Struktur, physikal. und chem.
Eigenschaften
Identifizierung

○ Beispiel 1: Proteomanalytik

Frage: " Welche Proteine eines Zelltyp lassen sich nach maligner
Transformation
in veränderter Konzentration,
in veränderter Form
neu oder
gar nicht mehr finden?

Methode 2D<Elektrophorese

Gewebehomogenat
Solubilisation in Harnstoff

Isoelektrische Focussierung
Reduktion S-Alkylierung
SDS-Solubilisation
SDS-PAGE
Fixierung, Färbung
Bildverarbeitung

Analyse von Spots in 2D-Gelen

Protein (intakt)
Aminosäuren
Sequenzierung
MALDI-MS
DNA- und Protein-Datenbank
PSD: Messung von Peptidfragmentmustern ...siehe Skript

○ **Beispiel 2: Analyse von N-Glykanen**

Frage: "Wie ist ein Glykoprotein mit Oligosacchariden substituiert?"

Positionen im Polypeptid
Verteilung nach Ladung, Größe, Verzweigung
Besondere Strukturen (Verknüpfungen und Substituenten)
Detailaufklärung einzelner Strukturen

Funktionen von N-Glykanen

Allgemeine Löslichkeit	Spezifische
Antigenität	
Ladung	Liganden
Proteinfaltung	Aktivität
Stabilisierung	
Proteolyseschutz	

○ **Biosynthese → potentielle Strukturen**

Vektorielle Synthese
RER: Übertragung eines Vorläufer-OS auf wachsende Peptidkette
RER/Golgi: partieller Abbau der Vorläuferstruktur
Golgi: Verlängerung und Verzweigung - Reifung
Begrenzte Strukturvielfalt
Regulation des Strukturspektrums durch differenzierte Expression der spezifischen Transferasen

○ **Spezifität/ Heterogenität**

Sekundäres Genprodukt	Mikroheterogenität
innerhalb jeder Glykosylierungsstelle etc.	
Speziesspezifität	Abhängigkeit von
Stoffwechsellage	
Organspezifität	Sensitiv ggü. Toxinen
Proteinspezifität	
Peptidspezifität	

○ **Systematik der N-Glykan-Analyse**

Glykoprotein

Glykopeptid

N-Glykane

2AB-N-Glykane

Enzymatischer Abbau

Chromatographien MALDI-TOF-MS

identifizierte einzelne 2AB-N-Glykane

Fraktionierung nach Ladung (Anionenaustausch HPLC)
Hydrophile HPLC

○ MALDI-TOF-MS

Messen der molekularen Masse der desialysierte N-Glykane $[M+Na]^+$
Gesamtpool und Fraktionen

Zuordnung einer Summenformel/ Erstellung einer Datenbank
HNxHydHz

a priori keine Strukturinformation

Strukturzuordnung aufgrund

- RT in ≤ 4 Chromatographen

- spez. Enzymverdau

- Muster mit Enzymarrays

Bindungsstellen weiterer Lektine

RCA (Christpalme)

UEA (Stechginster)

LFA (Schnecke) alle Sialinsäuren

Methoden zur Detektion von Kohlenhydraten mittels spezifischer Antikörper oder Lektine

Western-Blot oder Lektin-Blot

Enzym (z.B. Peroxidase): Antikörper-Lektine

Laden der Proteinmischung mit SDS-Polyacrylamid-Gel \rightarrow Elektrophorese

Elektrophoretischer Transfer \rightarrow Nitrozellulose Membran

Inkubation mit Antikörper (klassisch) oder mit Lektin \rightarrow Autoradiogramm,

Fluorogramm, Farbreaktion

Vorteil: Identifizierung einzelner Proteine über die Größe

Nachteil: nur Proteine

"Fluorescence-activated Cell Scanning" (FACS)

Analyse von Einzelzellsuspensionen

Bestimmung von Oberflächenantigenen (Marker)

Zugabe von fluoreszenzmarkierter Antikörper

Zellen passieren den Laser \rightarrow Anregung der Fluoreszenz

Erfassung von zellulären Parametern wie Zell-Größe und Granularität

Methoden zur Veränderung der Struktur von Kohlenhydraten

Inhibition von Glycosyltransferasen im Golgi durch spezifische kompetitive Inhibitoren (Substratanaloga)

Geringe Veränderung der Kohlenhydratstruktur, gut geeignet zur Untersuchung der Funktion spezifischer Zuckerstrukturen

Herstellung von Knock-Out-Mäusen der Glycosyltransferasen

\rightarrow da Mäuse oft lebensfähig, Effekte in vivo zu beobachten

Transfektion embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) mit dem Targetvektor

Methoden zur Veränderung der Struktur von Kohlenhydraten

Inhibition von Enzymen der N-Glycoan-Biosynthese durch natürliche Substratanaloga

III Rekombinante Proteinexpression

Mechanismus

über reverse Transkriptase cDNA aus mRNA (des gewünschten Produktes), in Plasmid-Vektor (mit Marker) in Zellkultur (E.coli z.B.), Selektion der Expressionsplasmide, in Wirtszellen, Lyse, Reinigung -> rekombinantes Protein

Anwendung

- Analyse inter- und intramolekularer Wechselwirkungen
- Strukturanalyse
- Aufklärung Reaktionsmechanismen
- Analyse Proteinfaltungswege
- Therapie

Vorteile

- Spezifität
- Selektivität
- Affinität

Nachteile

- geringe Stabilität
 - T
 - pH
 - Oxidation
 - Abbau
- geringe Halbwertszeit
- Applikation
- Unfähigkeit der Membranpassage
- Immunogenität**