

Analytik von Proteinen, DNA/RNA und Zellen

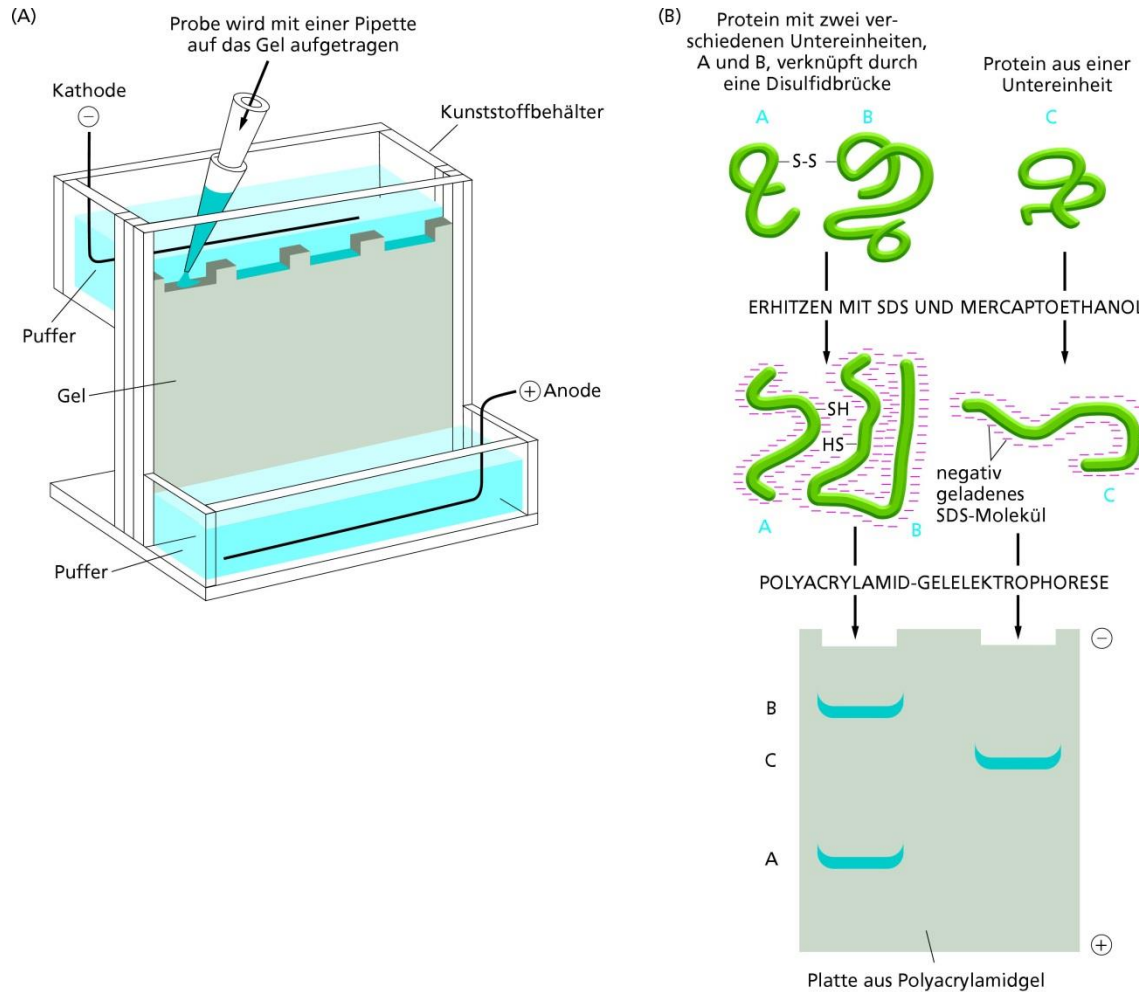
Prof. Dr. med. Volker Mailänder

Lernziele

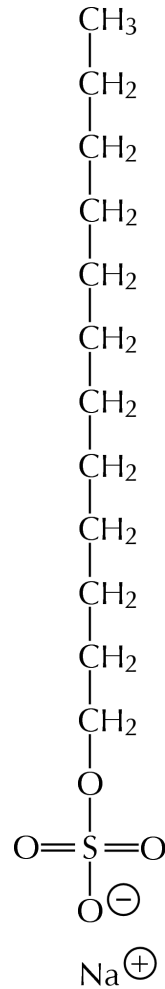
- Welche Prinzipien werden zum Auftrennen von Protein benutzt?
- Wie erfolgt die Sequenzaufklärung von Proteinen?
- Wie erfolgt die Präparation größerer Mengen an Proteinen?
- Welche Prinzipien werden zum Auftrennen von DNA benutzt?
- Wie erfolgt die Sequenzaufklärung von DNA?
- Wie erfolgt die Präparation größerer Mengen an DNA?
- Wie werden damit Zellen und Tiere manipuliert?

Auftrennung von Proteinen

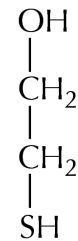
Proteine: Trennung aufgrund von Größe (Länge)



SDS und Mercaptoethanol

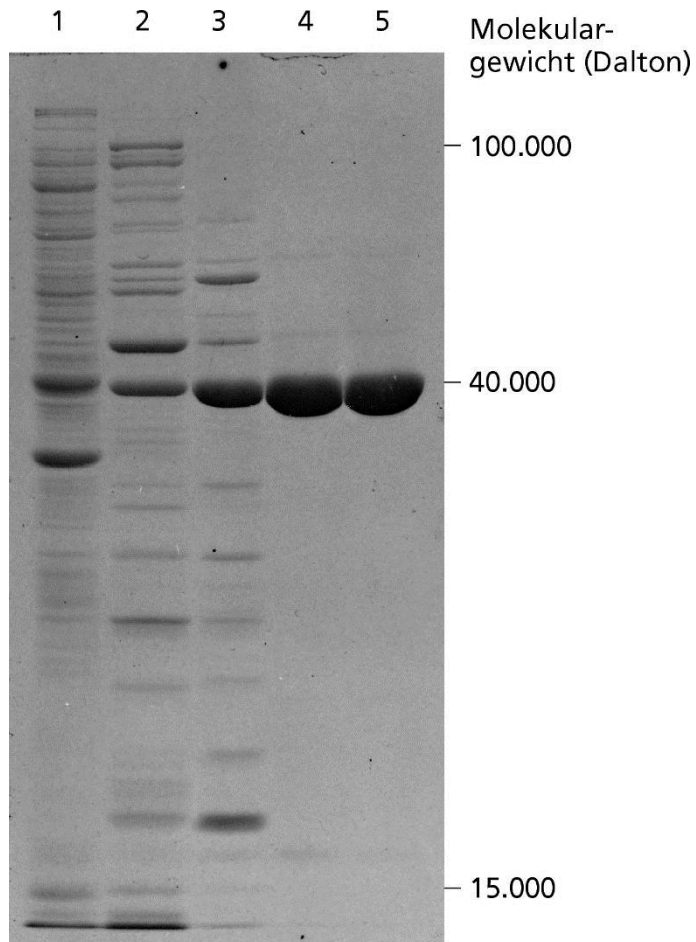


SDS



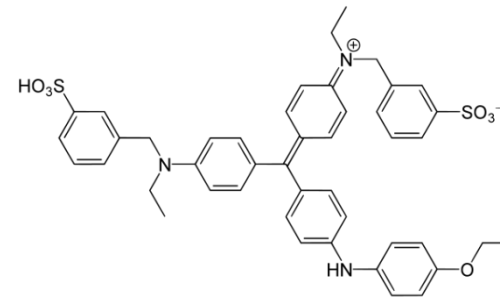
β-Mercaptoethanol

Reeles Gelbild

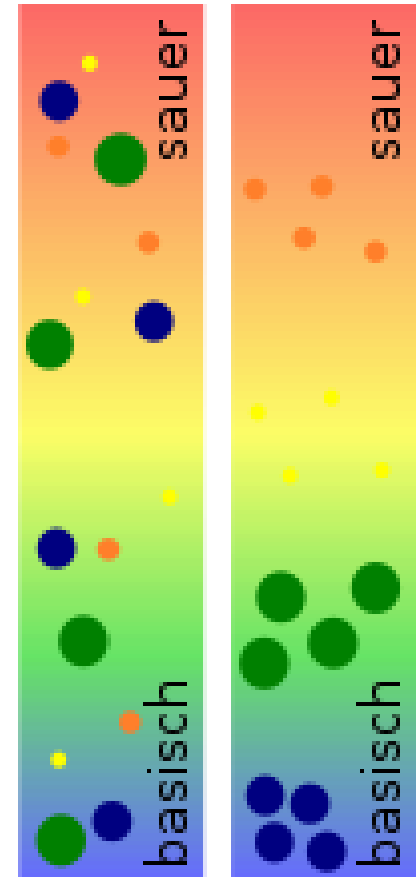
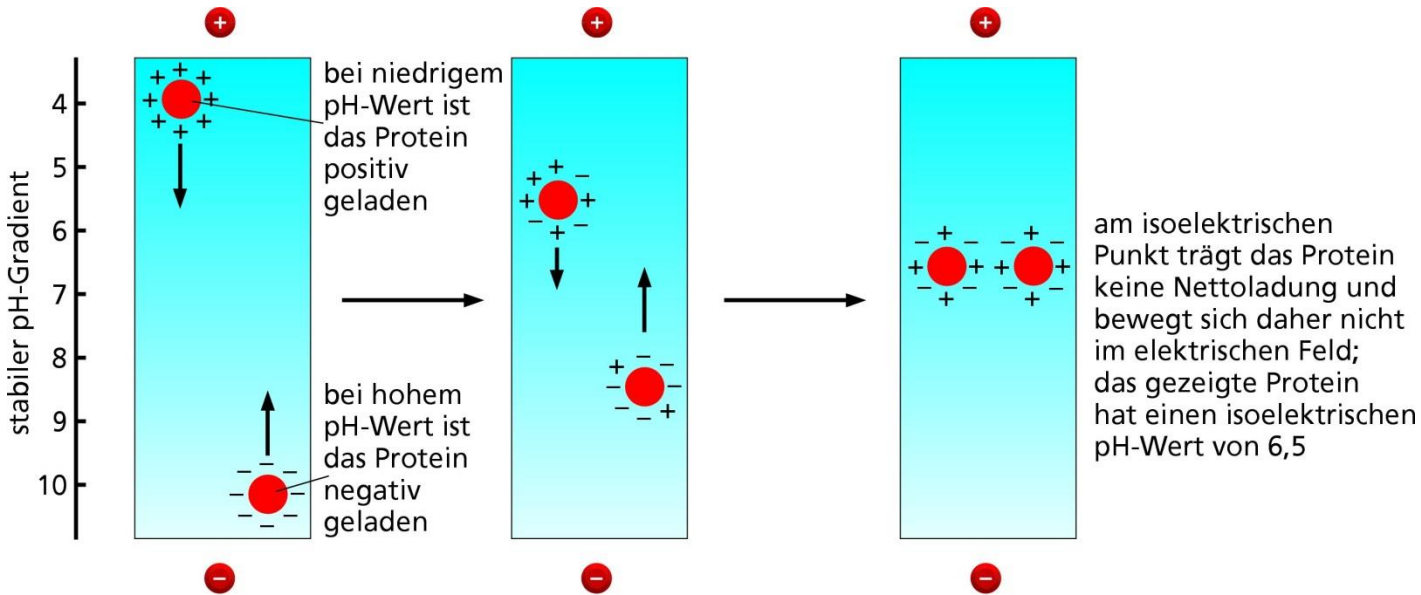


Sichtbarmachung:

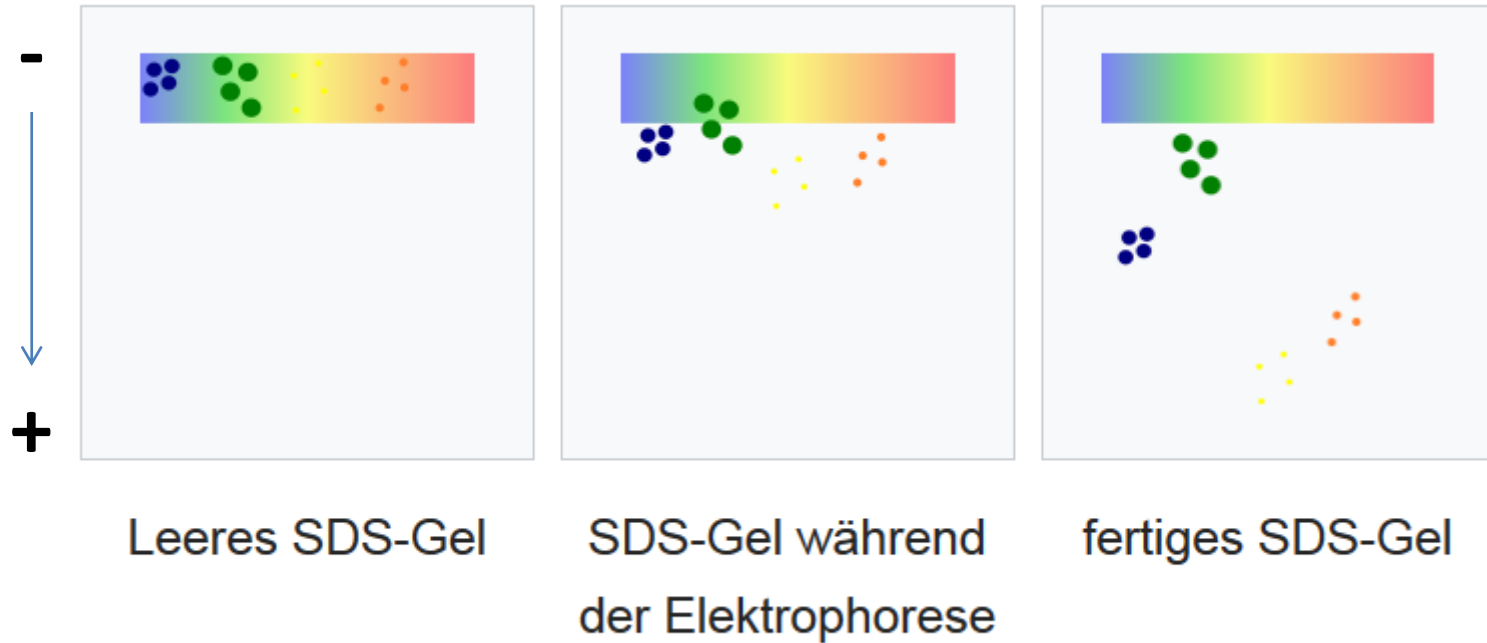
- Silberfärbung
- Coomassie-Blau (lagert sich an basische Seitenketten an)



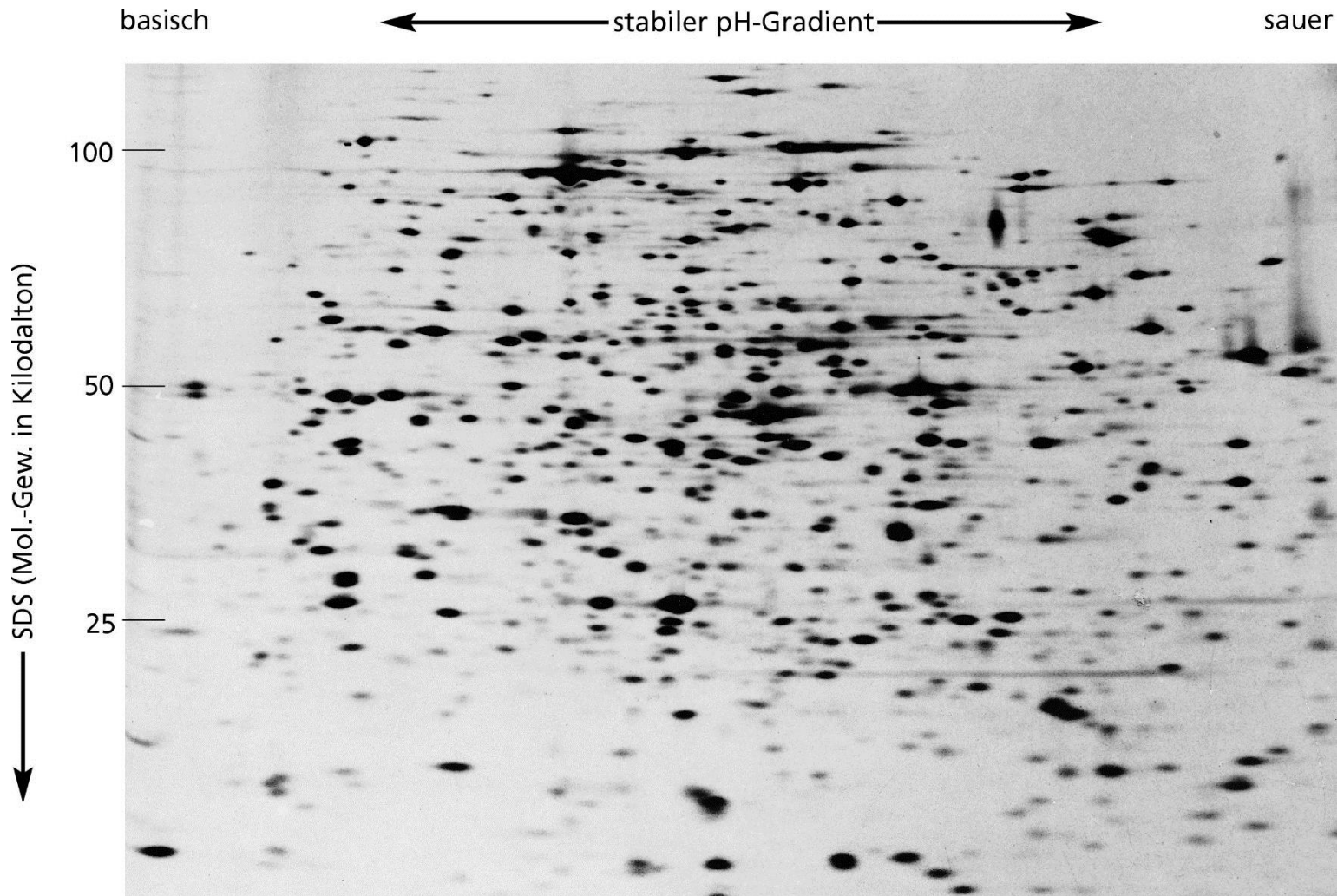
Trennung aufgrund von isoelektrischem Punkt des Proteins



2D Gelelektrophorese



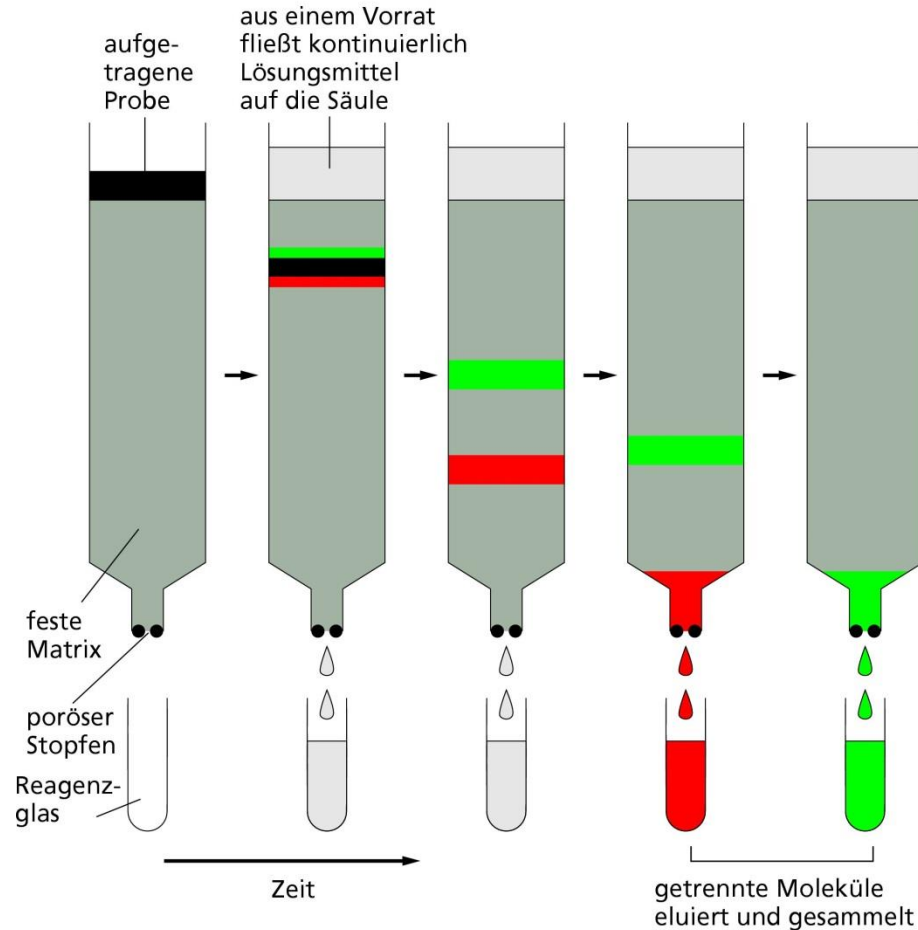
2D Gelelektrophorese



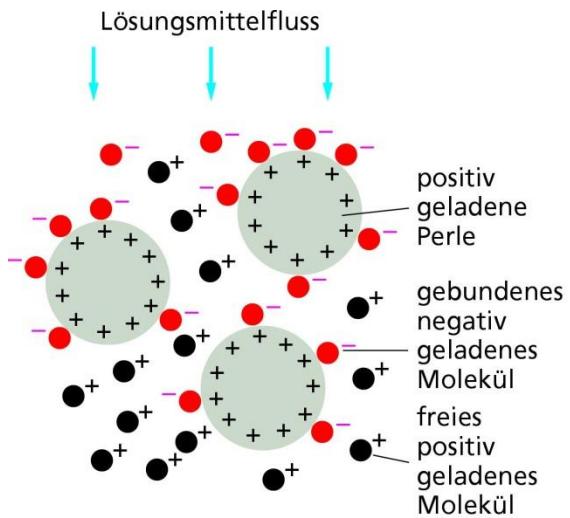
Präparation großer Proteinmengen

Technische Aufreinigung: Chromatographie

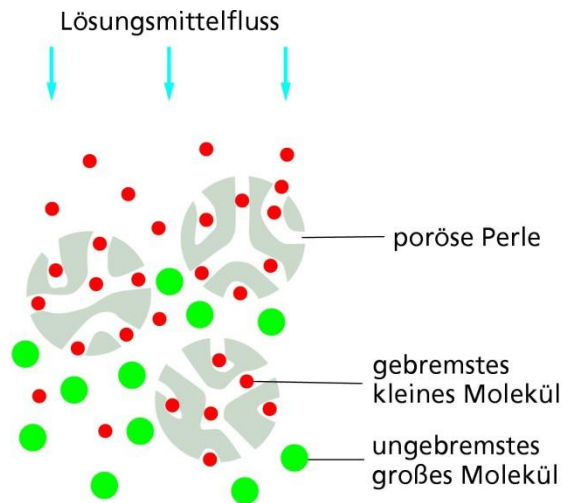
SÄULENCHROMATOGRAPHIE



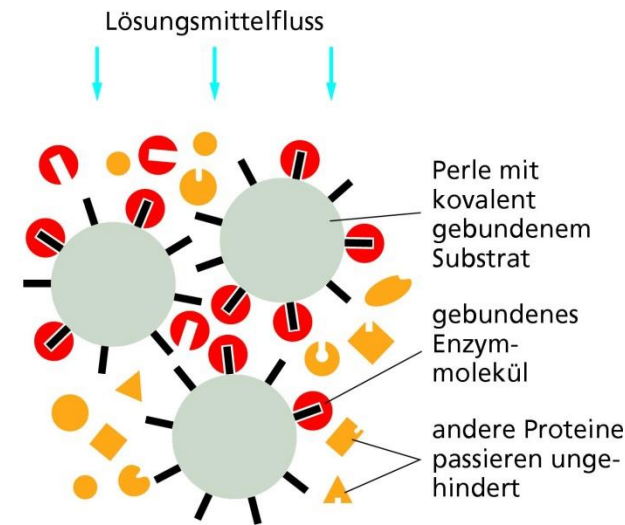
Arten von Säulenchromatographie



(A) IONENAUSTAUSCH-CHROMATOGRAPHIE

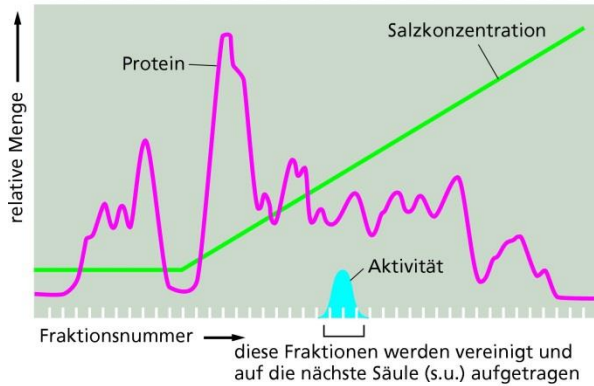


(B) GELFILTRATIONS-CHROMATOGRAPHIE

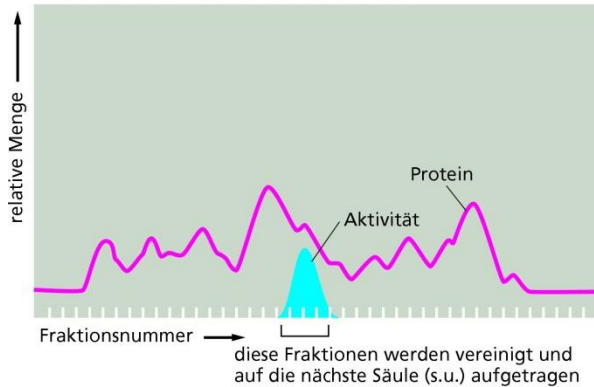


(C) AFFINITÄTS-CHROMATOGRAPHIE

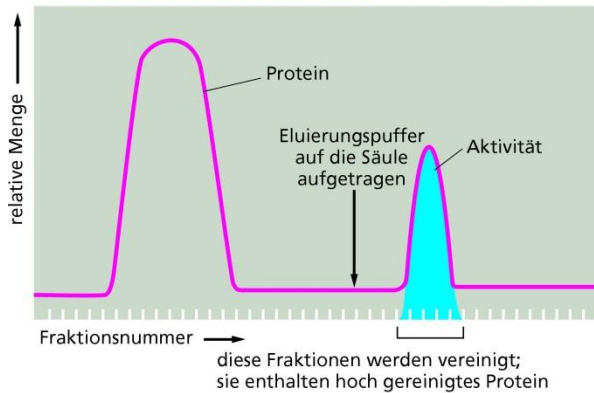
(A) IONENAUSTAUSCH-CHROMATOGRAPHIE



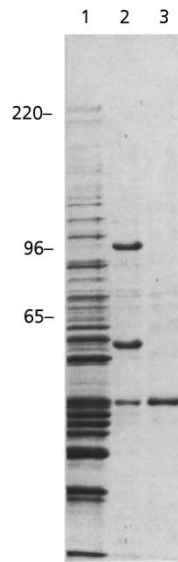
(B) GELFILTRATIONS-CHROMATOGRAPHIE



(C) AFFINITÄTS-CHROMATOGRAPHIE



(D)

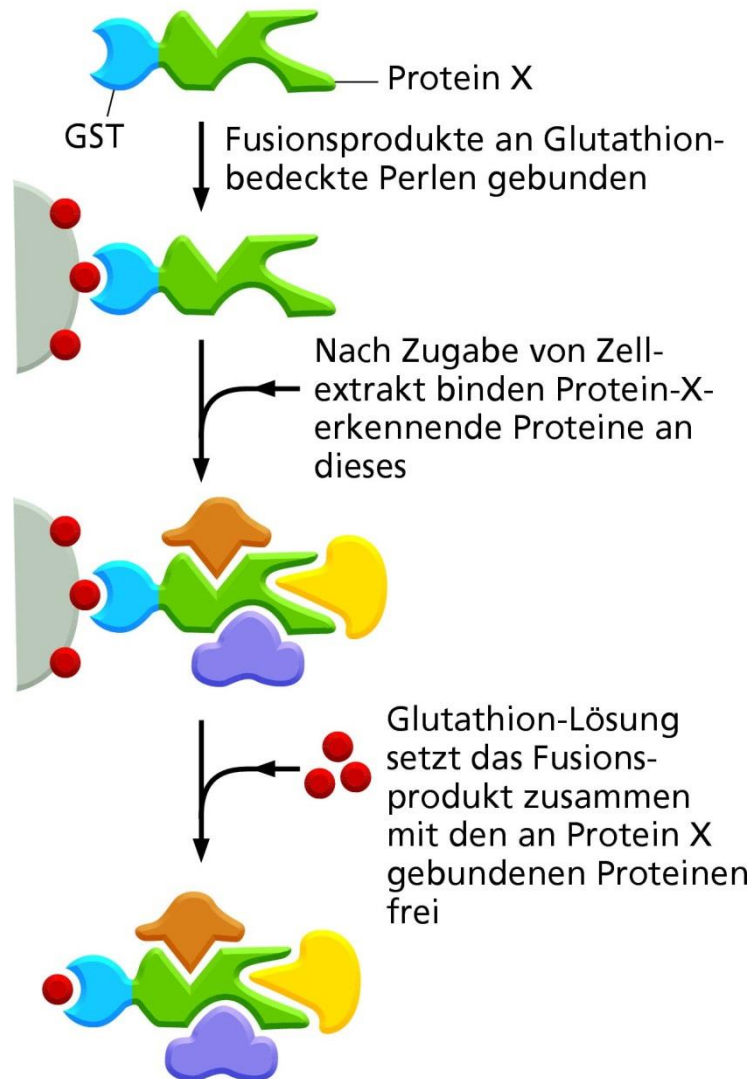


Spur 1: Hefe-Proteine

Spur 2: Affinitätschromatographie
mit Cyclin B2

Spur 3: Affinitätschromatographie
mit Cyclin B3

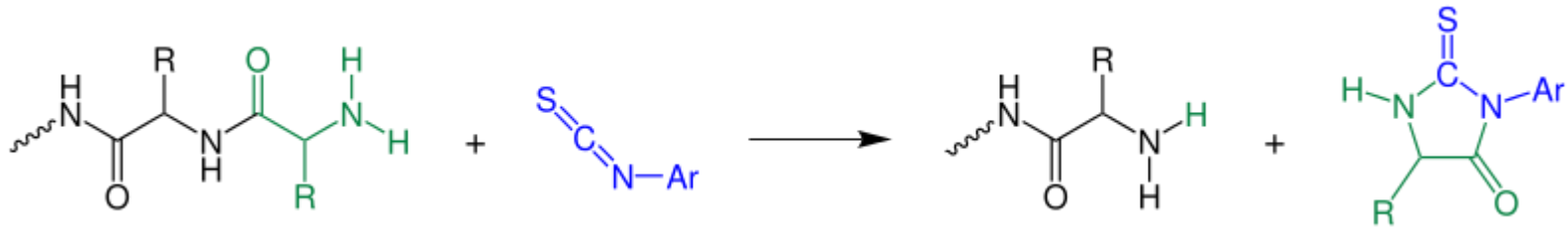
Rekombinante DNA-Techniken ermöglichen eine Fusion von Protein X und Glutathion-S-Transferase (GST)



Glutathion (GSH), auch γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine, ist ein Tripeptid,

Protein Sequenzierung

Proteinsequenzierung: Edman Reaktion



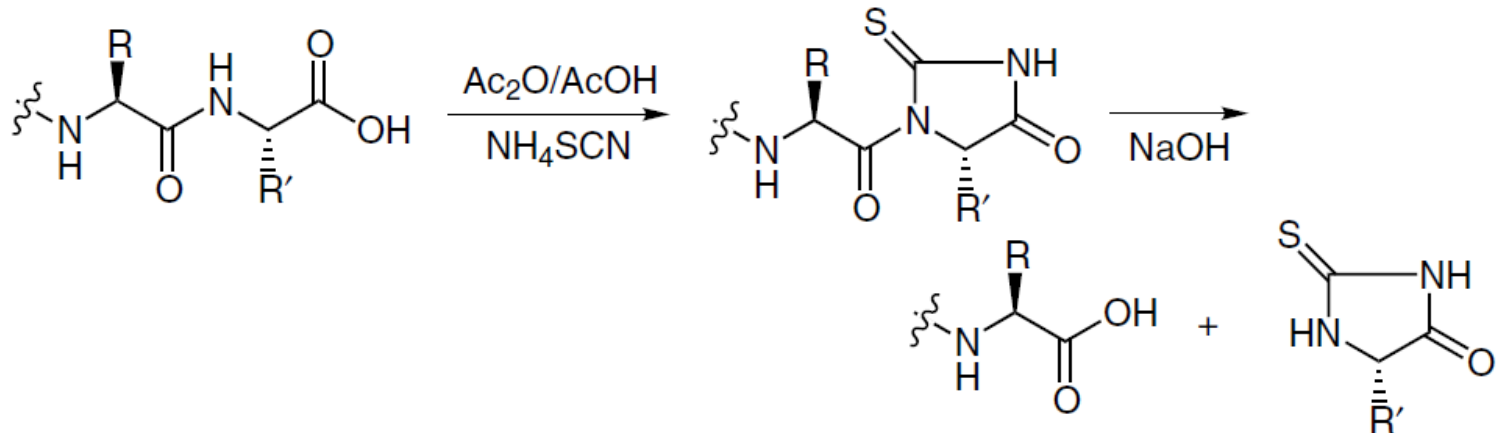
N-terminale Aminosäure des Proteins wird unter Einwirkung von Phenylisothiocyanat abgespalten

-> Verkürzung Proteinkette

-> Phenylthiohydantoin-Derivat (PTH-Derivat)

R = Alkylrest oder Wasserstoff, Ar = Phenylrest, geschlängelte Linie = beliebig lange Fortsetzung der Proteinkette.

Proteinsequenzierung: Schlack-Kumpf- Abbau



Ausschluss von Sauerstoff (ungewünschte Oxidationen zu verhindern, z. B. von Cysteinen zu Cysteinsulfonsäuren oder Disulfidbrücken)

1. Aktivierung: bei 60 bis 80 °C wird die endständige Carboxygruppe mittels Essigsäureanhydrid in Eisessig acetyliert
2. Kupplung: Unter Beteiligung der hochreaktiven Thiocyanensäure bildet sich ein Hydantoinring aus.
3. Abspaltung: Durch Einwirken von NaOH oder KOH

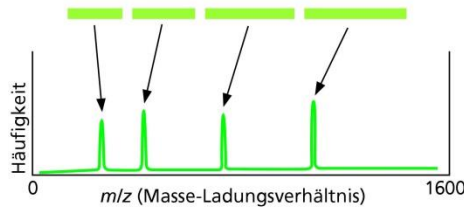
Das anschließende Entfernen der Base stellt dabei eine experimentelle Schwierigkeit dar, weil das Auswaschen potentiell mit einem Verlust an Peptid verbunden ist.

Proteinsequenzbestimmung



Protein von Interesse

DURCH TRYPSINVERDAU WERDEN PEPTIDE FREIGESETZT, UND IHRE MASSE WIRD MIT HILFE DER MALDI-TOF-MASSENSPEKTROMETRIE BESTIMMT



PROTEINSEQUENZ-DATENBANKEN WERDEN NACH ÜBEREINSTIMMUNGEN MIT THEORETISCH BERECHNETEN MASSEN VON ALLEN TRYPSIN-ERZEUGTEN PEPTIDEN DURCHSUCHT

IDENTIFIZIERUNG DER ENTSPRECHENDEN GENE

(A)

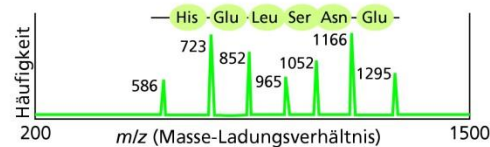


JEDER MASSENSPEKTROMETER-DURCHGANG FÜHRT ZU DEN PEPTIDMASSEN, WIE IN (A)



JEDES PEPTID WIRD DANN AN DEN PEPTIDBINDUNGEN WEITER FRAGMENTIERT

MASSEN DER FRAGMENTE WERDEN IN EINEM ZWEITEN GEKOPPELTEN MASSENSPEKTROMETER (MS/MS) GEMESSEN



MASSENUNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN FRAGMENTEN KÖNNEN VERWENDET WERDEN, UM EINE TEILWEISE AMINOSÄURESEQUENZ ZU ERSTELLEN. DIE DATEN ERLAUBEN MÖGLICHERWEISE DIE IDENTIFIZIERUNG DES GENS ODER UNTERSTÜTZEN SEINE KLONIERUNG

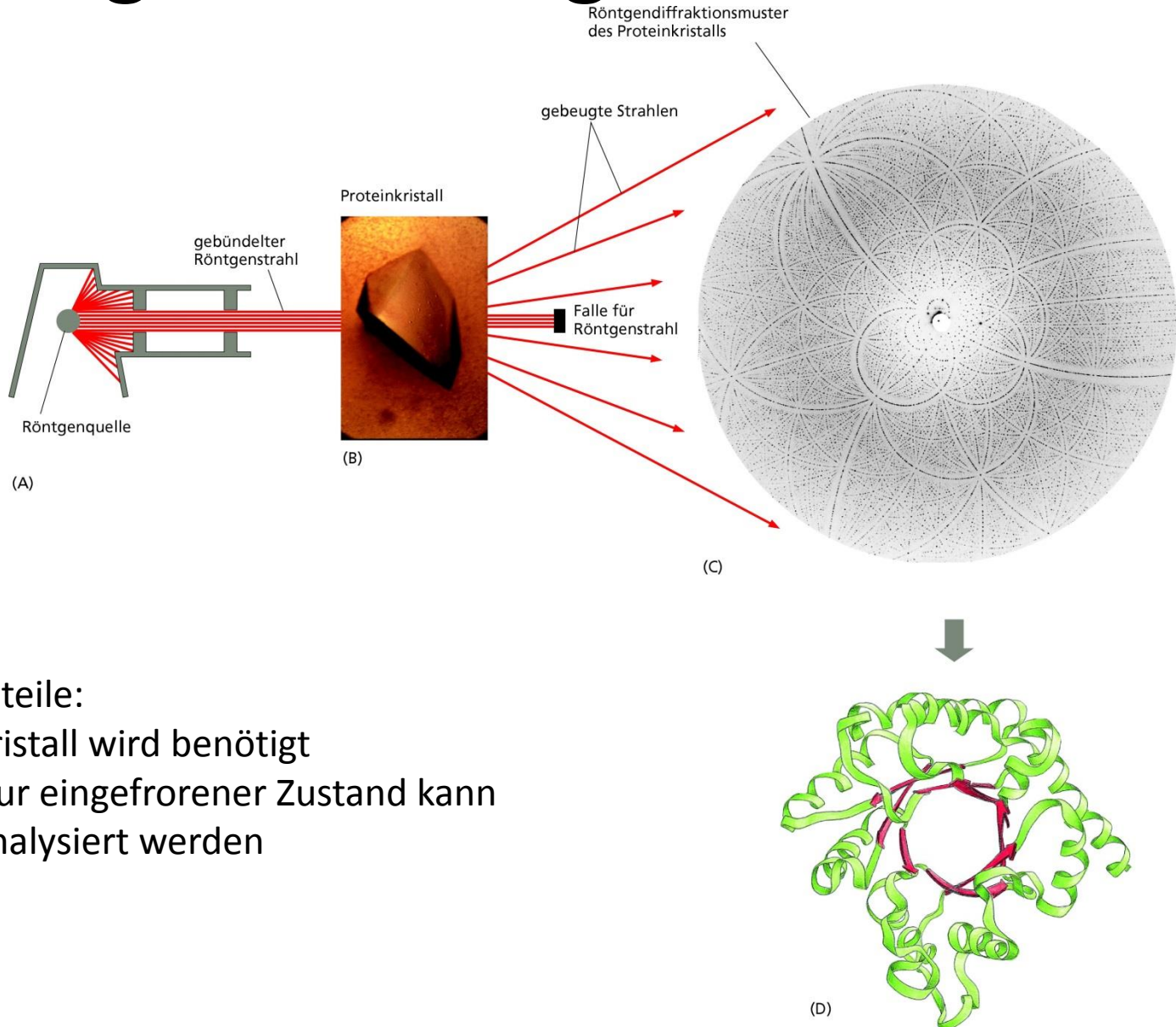
(B)

Wie wurden die einzelnen Enzyme entdeckt?

- Proteingemisch aus einer Zelle hat eine bestimmte Eigenschaft: z.B. enzymatisch
- Auftrennung über Chromatographie und Bestimmung der Aktivität in den Fraktionen
- Weitere Auftrennung über Hintereinanderschaltung von verschiedenen Trennmethode oder Affinitätschromatographie (Substrat/Bindungspartner an immobile Phase)
- Auftrennung auf 1D oder 2D Gel zum Nachweis der Reinheit
- Proteinsequenzierung

Aufklärung von Tertiärstrukturen der Proteine

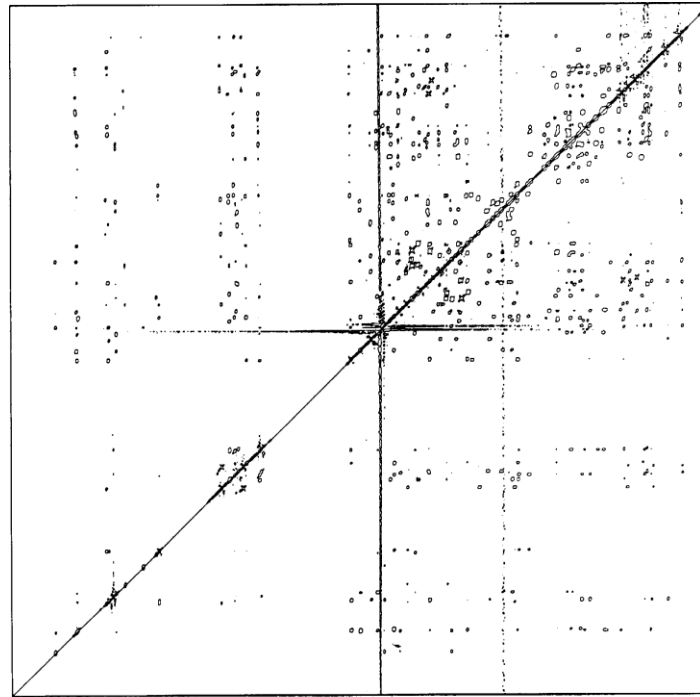
Röntgenstreuung -> 3D Struktur



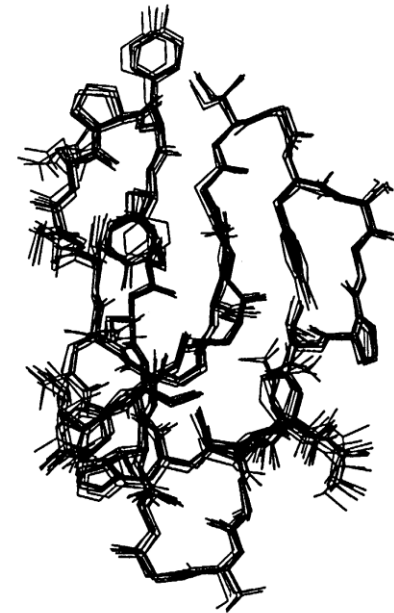
Nachteile:

- Kristall wird benötigt
- Nur eingefrorener Zustand kann analysiert werden

NMR -> 3D Struktur



(A)



(B)

© 2011 Wiley-VCH, Weinheim
Alberts - Molekularbiologie der Zelle
ISBN: 978-3-527-32384-5 Abb. 08-29

Abstand der Wasserstoffatome zueinander kann ermittelt werden.

Komplexe Rechenoperationen sind notwendig

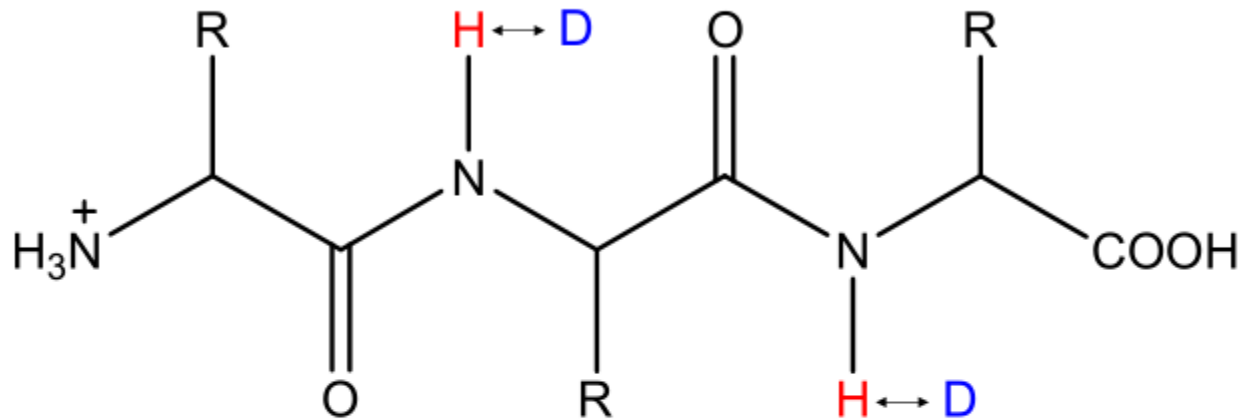
In Lösung möglich

Zugabe von Liganden möglich

Vorgang der Faltung von Proteinen kann ermittelt werden.

HDX = Hydrogen Deuterium Exchange

HDX at the molecular level



Low exchange rates :

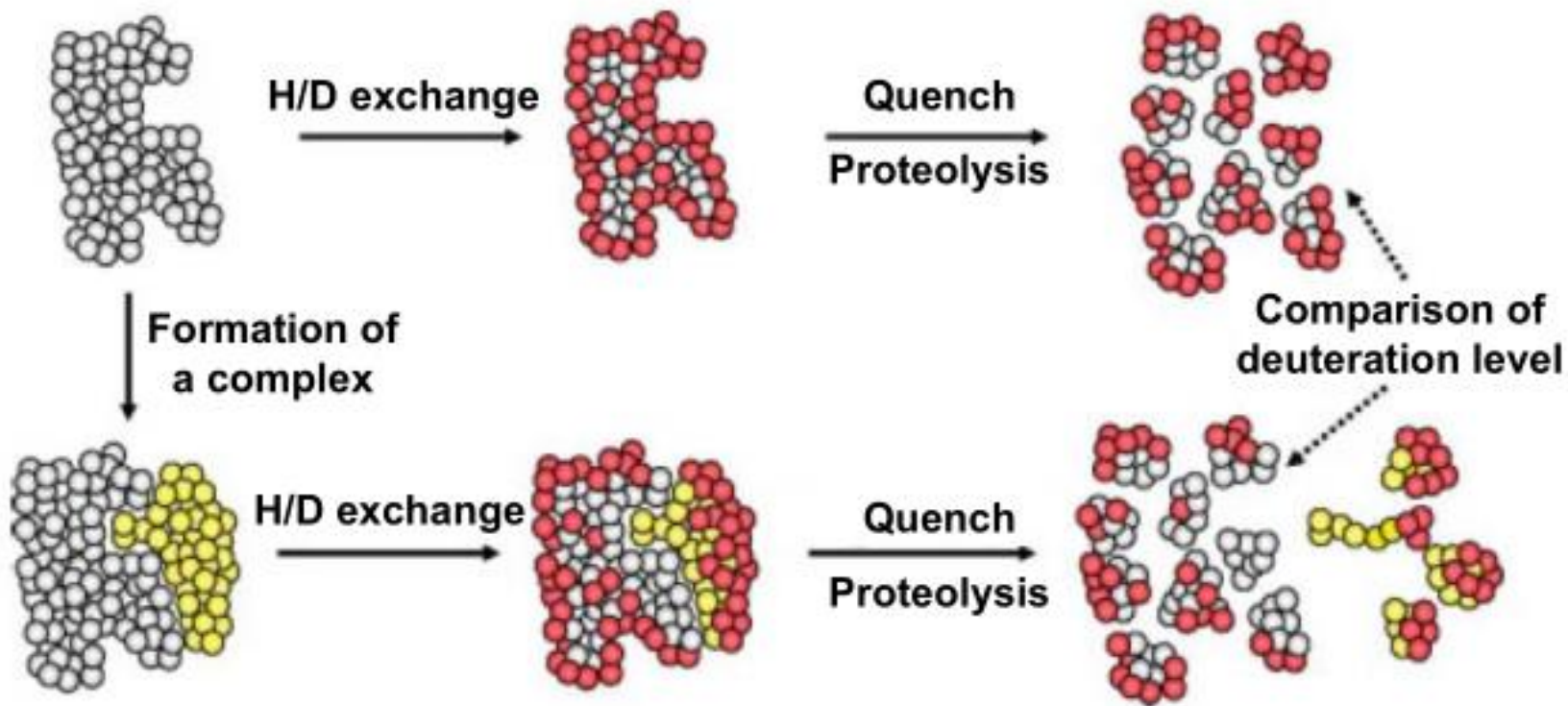
α -helices, β -sheets and core of the protein.

High exchange rates:

Loops, turns and solvent accessible regions.

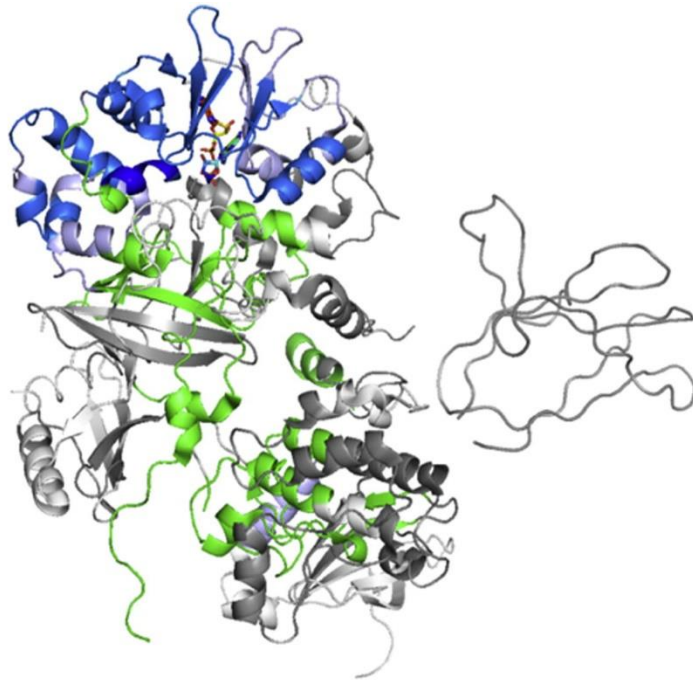


HDX at the macromolecular level

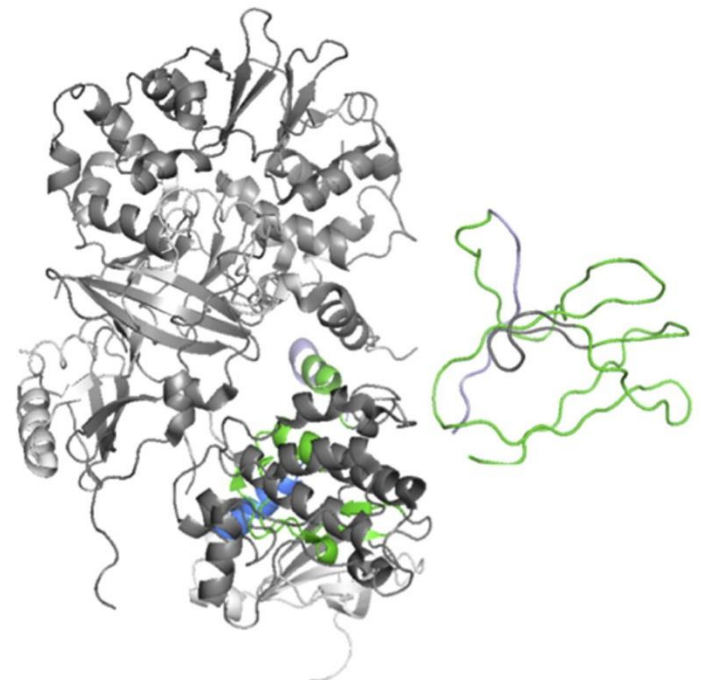


Bindungsstellen von Liganden und komplexe Veränderungen der Konformation

A



AMPK221 +/- AMP



AMPK221 +/- A769662



DNA/RNA

Detektion von DNA/RNA

- Proteine können aufgrund von Größe und Ladung getrennt werden.
- Protein = eine Einheit
- Ein Gen = _____

- Wie isolieren wir ein Gen?
- Wie kommen wir an die Information eines Gens?
- > Wie synthetisieren wir ein Gen?

Werkzeuge für DNA Manipulation

Erste DNA-Quelle für DNA Manipulationen:

Erste Enzyme, um DNA zu manipulieren:

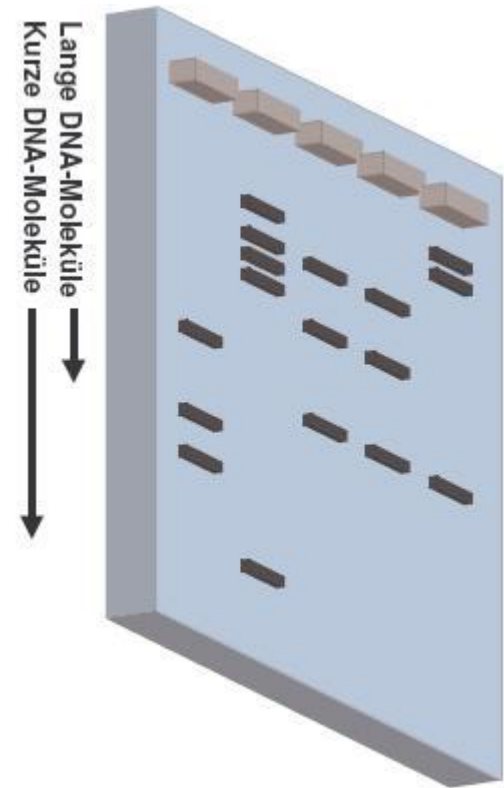
Plasmid DNA

- Mehrere Kopien einer Plasmid DNA pro Bakterium z.T. mehrere hundert Kopien
- > aufgrund von Mehrzahl stört bakterielle DNA nicht
- Bakterielle DNA fällt unter anderen Bedingungen aus: z.B. bei 95 °C
- Aufreinigung von Plasmid DNA entweder per Silica-Beads oder Phenol-Chloroform Extraktion
- RNase dient dazu, die RNA vorher oder nachher weg zu bekommen.

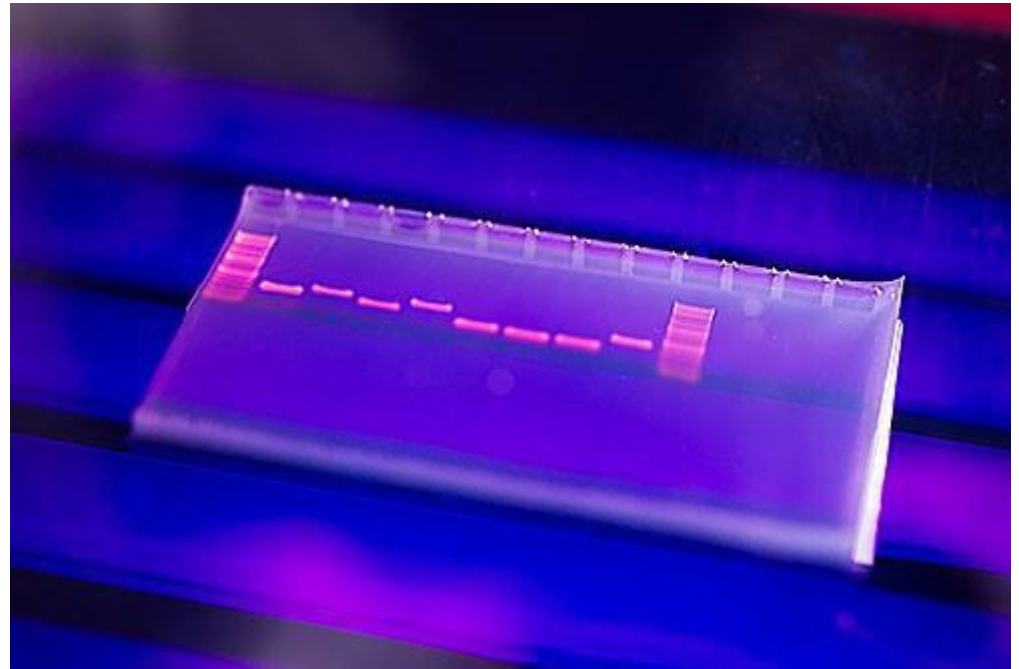
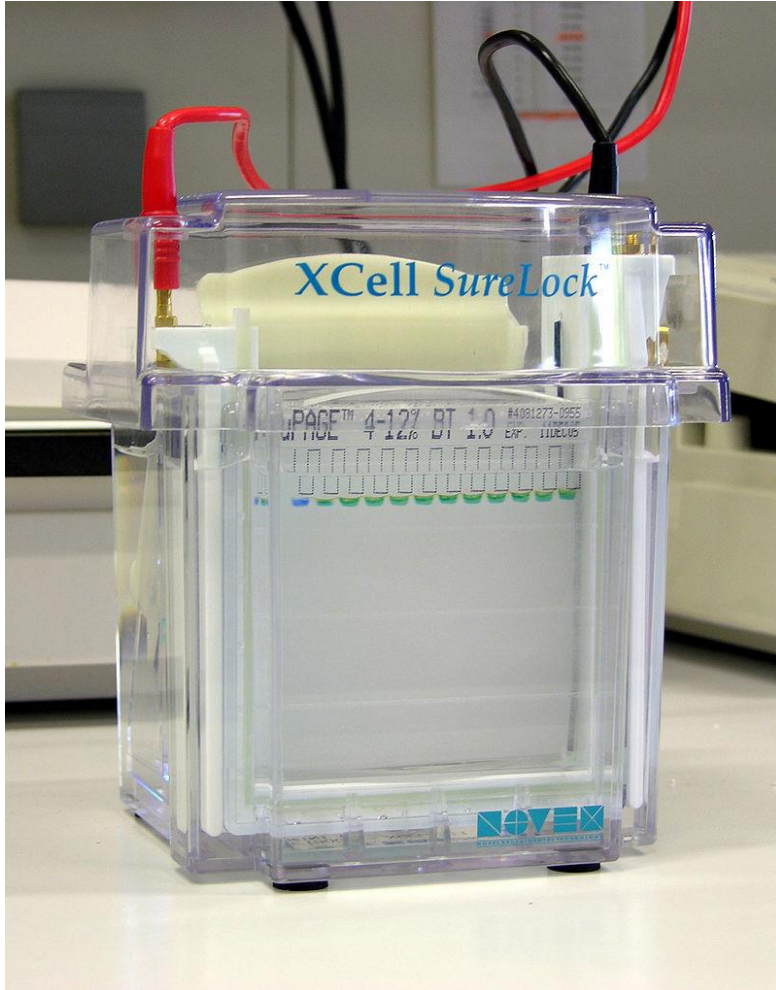
DNA Gelelektrophorese

- Alle DNA-Moleküle besitzen eine negative elektrische Nettoladung.
- Diese ist nahezu unabhängig vom pH-Wert des Mediums. Für alle DNA-Moleküle ist das Verhältnis von Ladung/Masse etwa gleich.
- Eine elektrophoretische Trennung wird daher im Wesentlichen nach Unterschieden in der Molekülgröße und Molekülform erfolgen.
- Zur elektrophoretischen Auftrennung wird die Methode der Trägergelelektrophorese angewendet.

- Gelmedium: Polyacrylamid, Agaroses, (Stärke)
- Anfärgung mittels Ethidiumbromid (klassisch, kanzerogen) oder Ersatzstoffen (SYBR Green, SYBR Gold, Methylenblau, Nilblau A, Acridinorange)

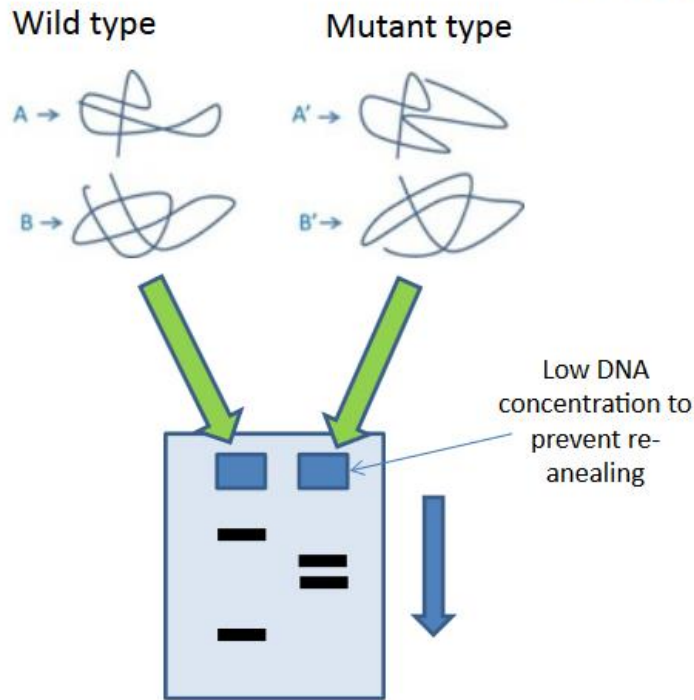


DNA Gelelektrophorese

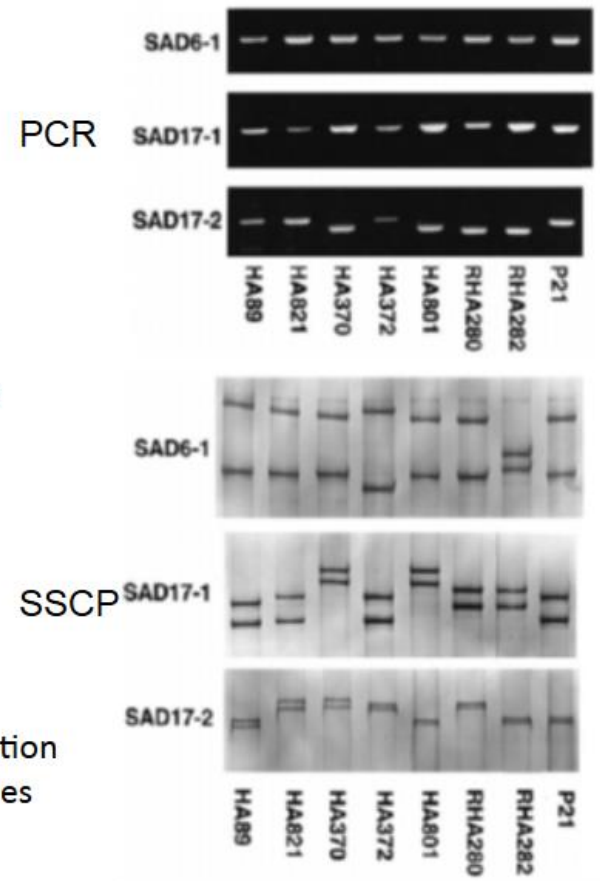


Single strand conformation polymorphism = SSCP

SSCP

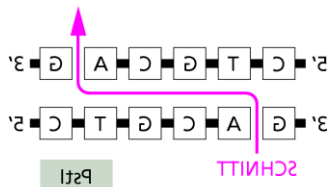
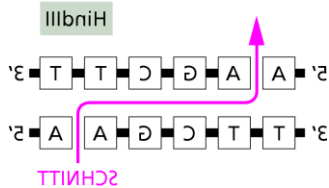
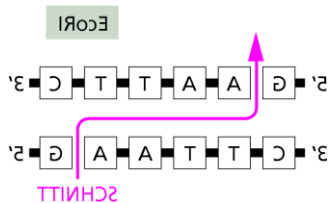
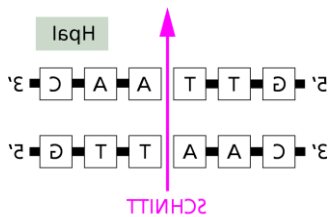


The electrophoretic mobility of separation is a function of the shape of the folded, single-stranded molecules



(Hongtrakul et al. 1998)

Werkzeuge zur Plasmid/DNA Manipulation: Restriktionsendonukleasen

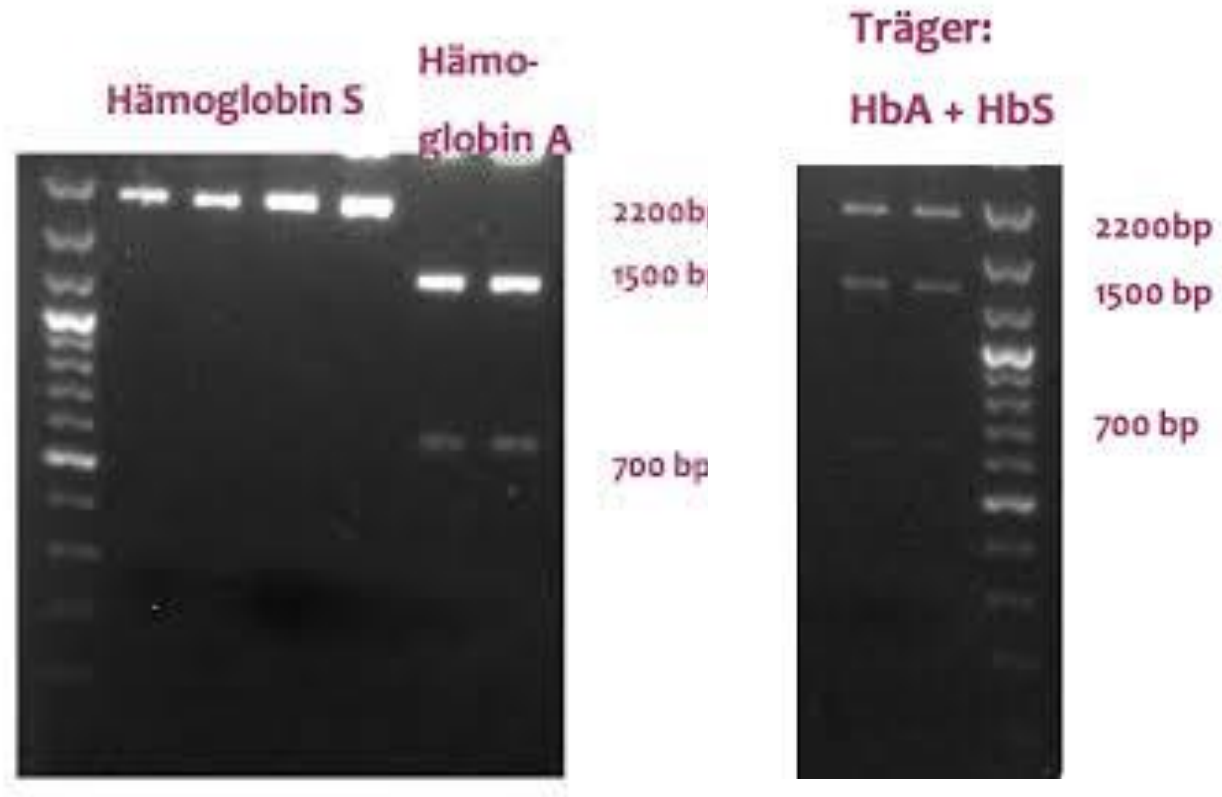


- Können glatte Enden erzeugen („bland ends“)
- Oder auch ungepaarte Nukleotide („sticky ends“)

Vorteile/Nachteile von bland ends/sticky ends:

Sichelzellanämie wird durch eine Punktmutation ausgelöst

Codon 5 6 7
DNA-Sequenz HbA: CCT-GAG-GAG
DNA Sequenz HbS: CCT-GTG-GAG
MstII-Erkennungs-
Sequenz: CCT-NAG-GAG



Zusammefügen von DNA Abschnitten

Zusammenfügen von DNA

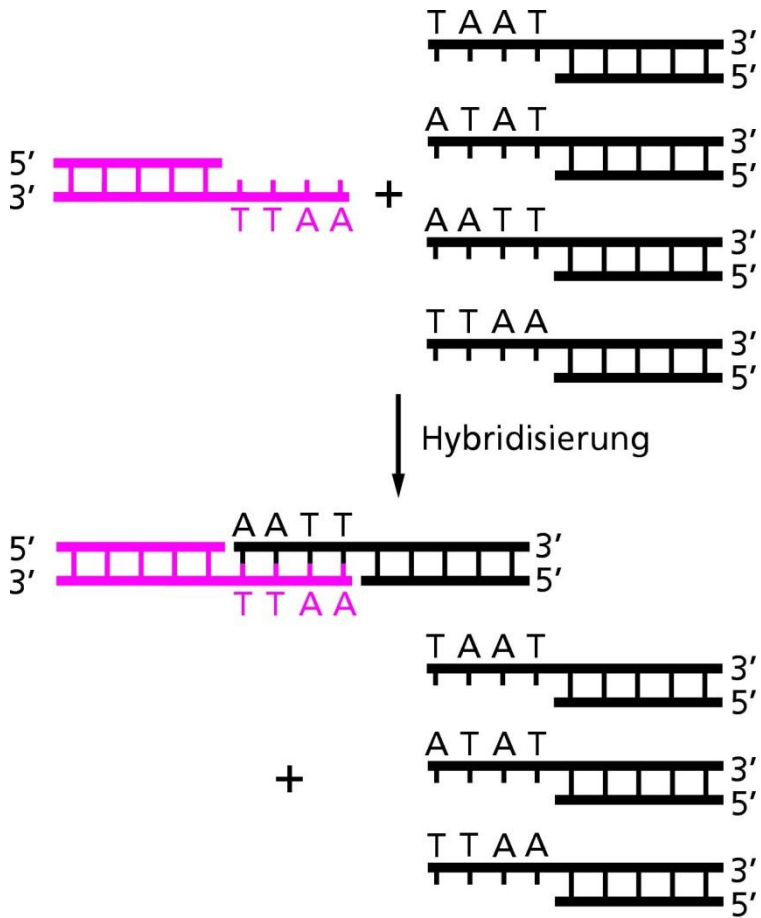
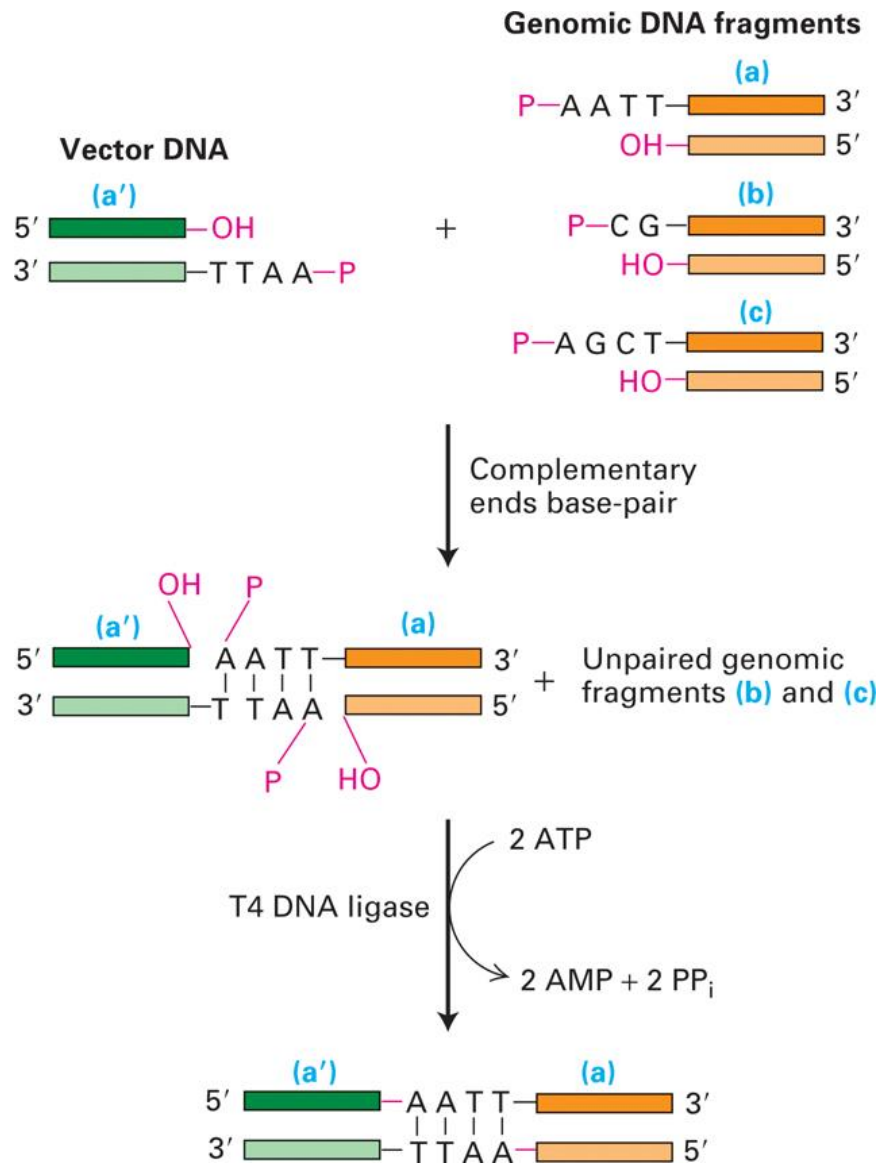


Figure 5.12 Ligation of restriction fragments with complementary sticky ends.

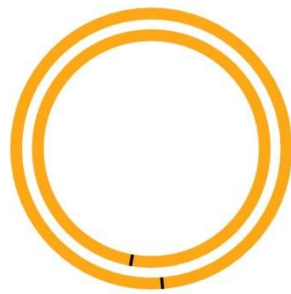


Klonieren durch ein Enzym: Ligase

zirkulär doppelsträngige
Plasmid-DNA
(Klonierungsvektor)

zu klonierendes
DNA-Fragment

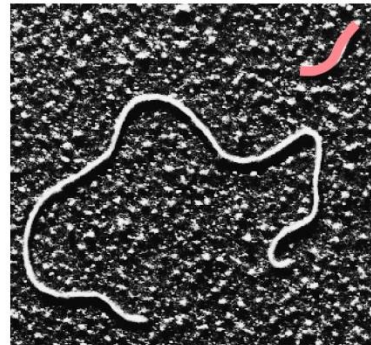
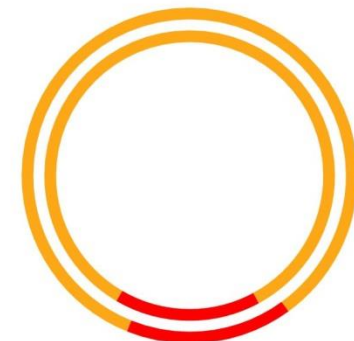
rekombinante DNA



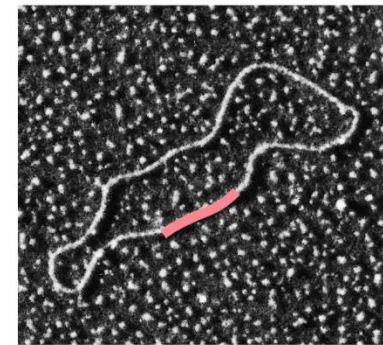
SPALTUNG
MIT EINER
RESTRIKTIONS-
ENDONUCLEASE



KOVALENTE
VERKNÜPFUNG
DURCH
DNA-LIGASE

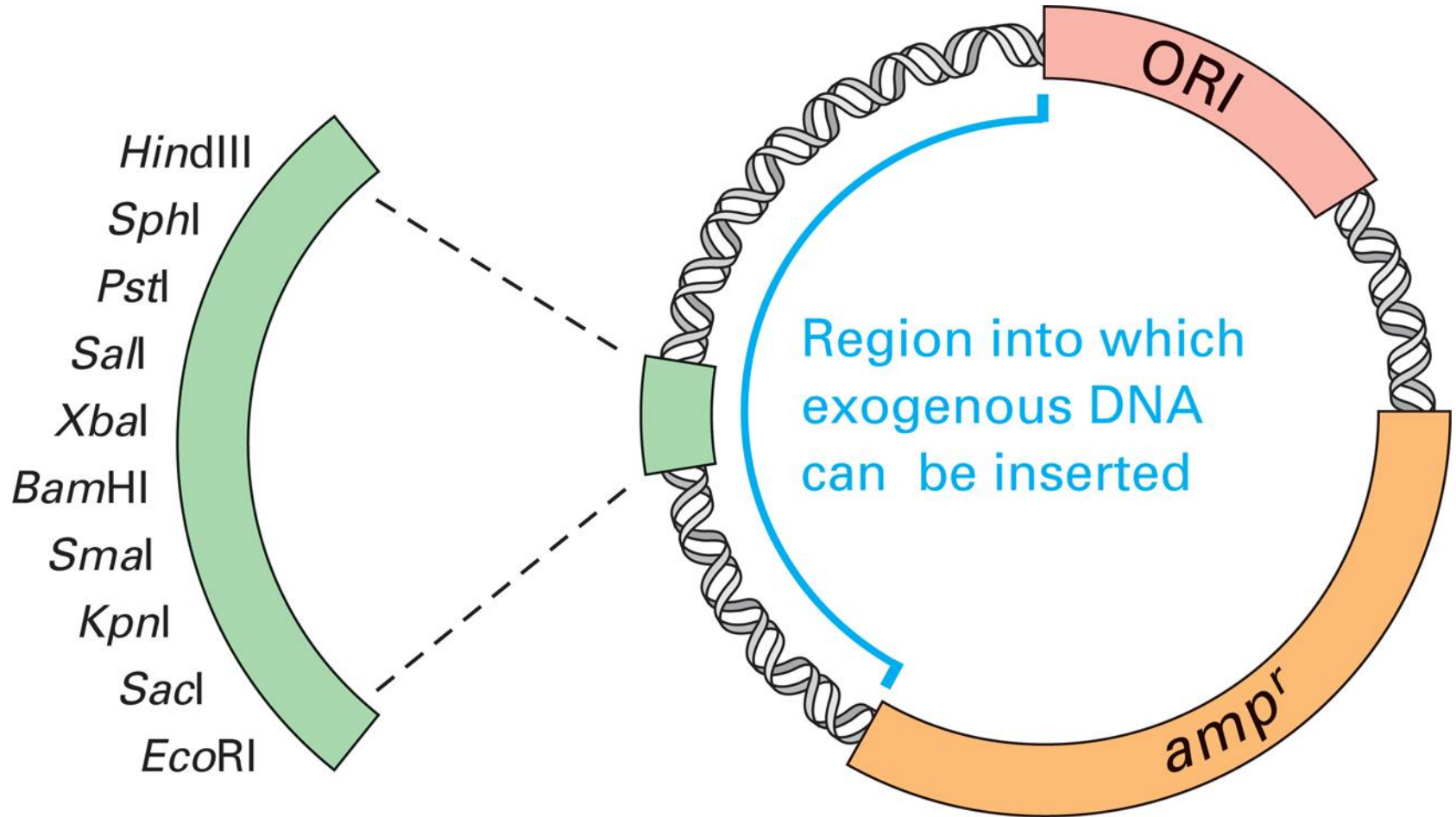


200 nm



200 nm

Figure 5.13 Basic components of a plasmid cloning vector that can replicate within an *E. coli* cell.



Polylinker

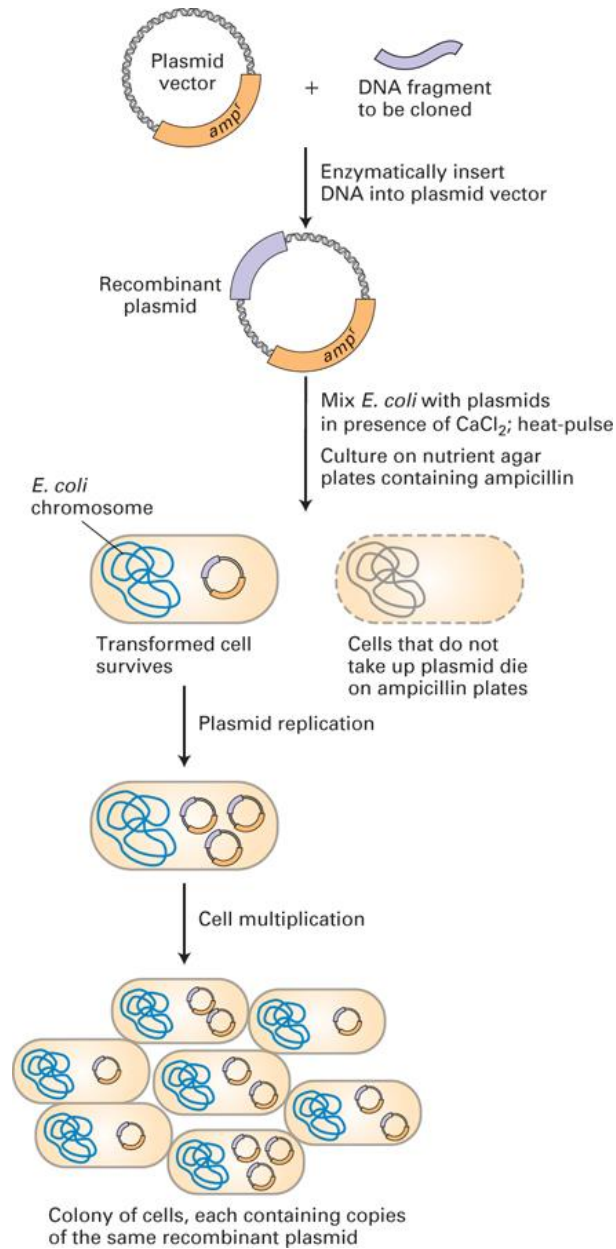
= „multiple Cloning Site“, Kasette

Plasmid

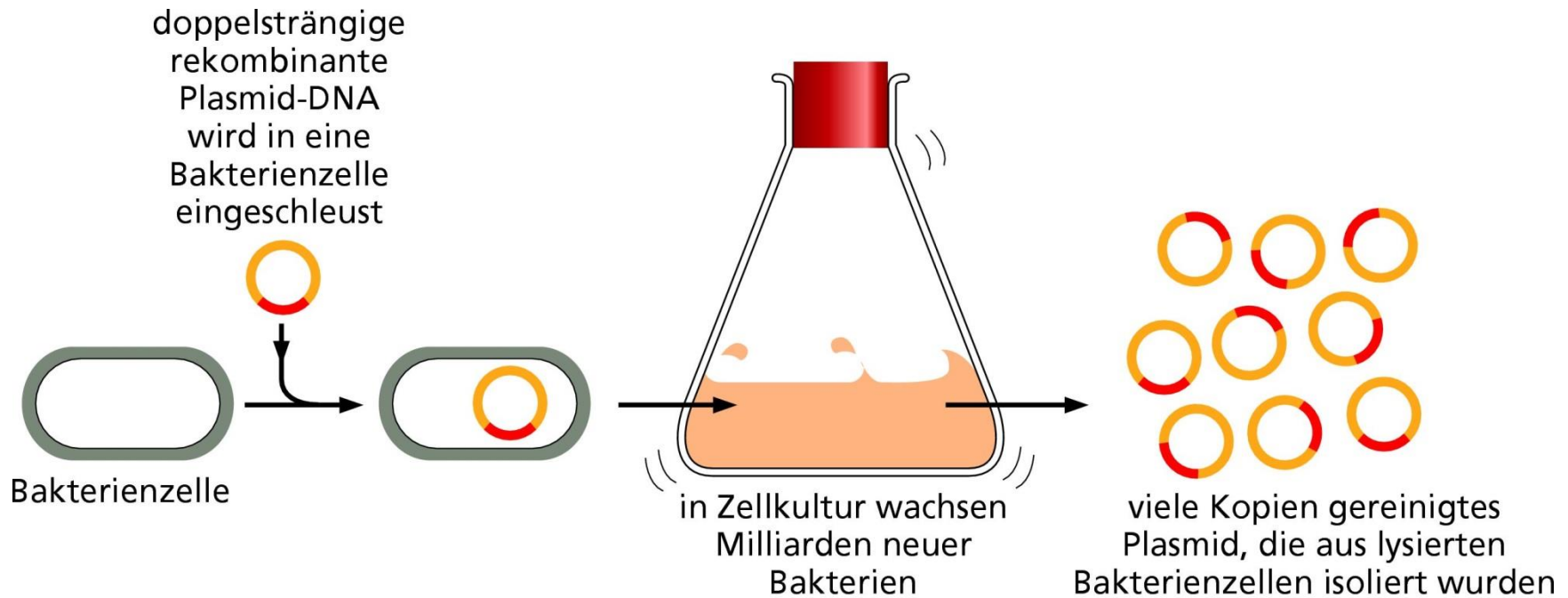
cloning vector

Vermehrung von DNA und Veränderung von DNA

Experimental Figure 5.14 DNA cloning in a plasmid vector permits amplification of a DNA fragment.



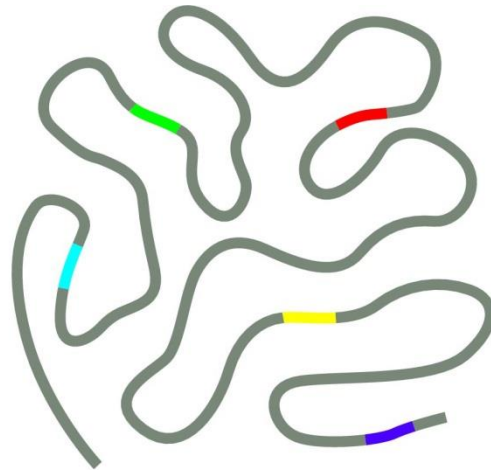
Vermehrung von Plasmiden



© 2011 Wiley-VCH, Weinheim
Alberts - Molekularbiologie der Zelle
ISBN: 978-3-527-32384-5 Abb. 08-40

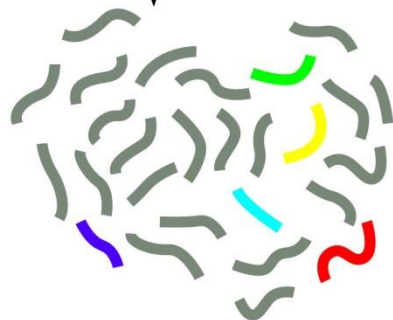
Was ist der Vermehrungsfaktor von Bakterien nach 24 h bei einer Generationszeit von 30 min?

Nutzung von Restriktionsenzymen



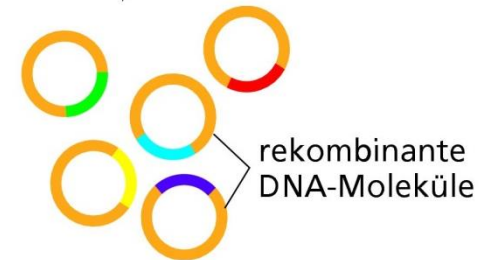
Menschen-DNA doppelsträngig

SCHNEIDEN
MIT RESTRIKTIONS-
ENDONUCLEASE



Millionen von genomischen
DNA-Fragmenten

EINFÜGEN VON
DNA-FRAGMENTEN
IN PLASMIDE

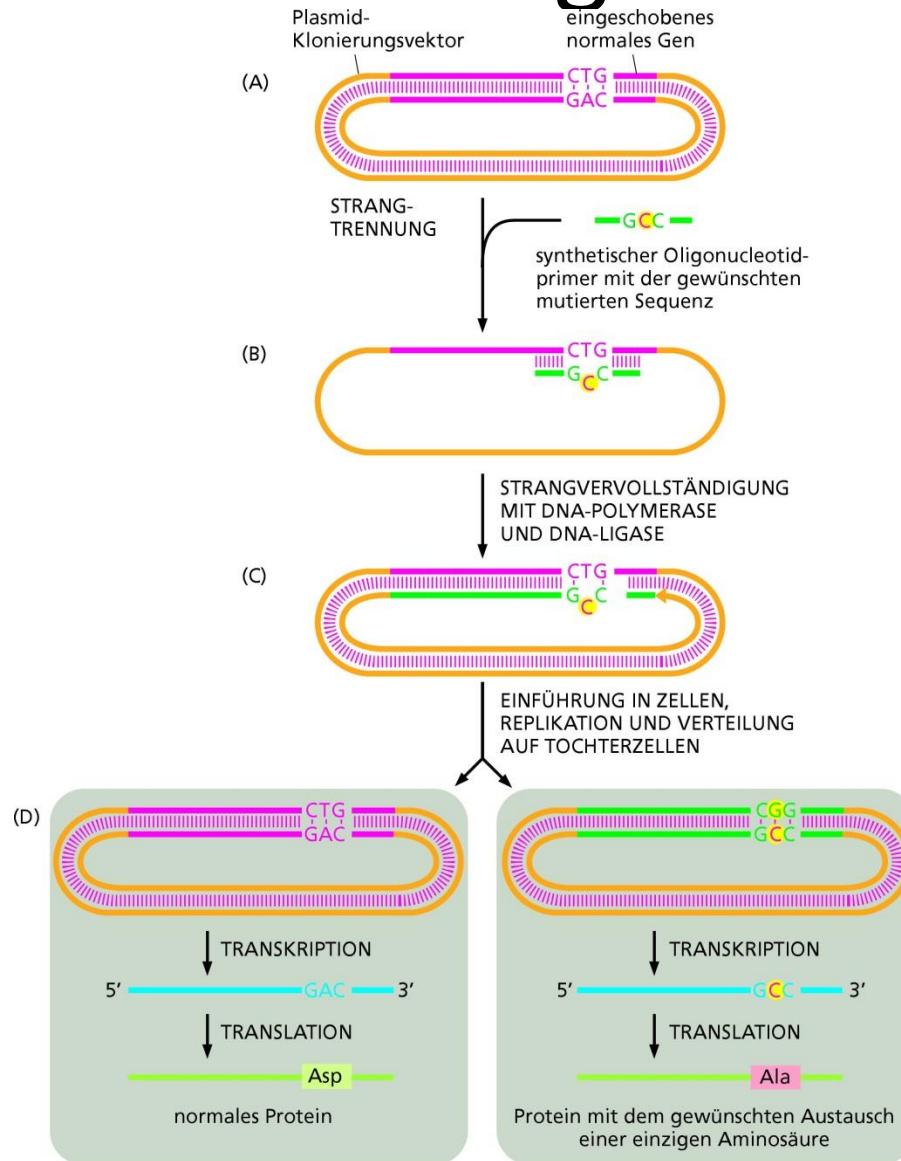


EINFÜHREN DER
PLASMIDE
IN BAKTERIEN

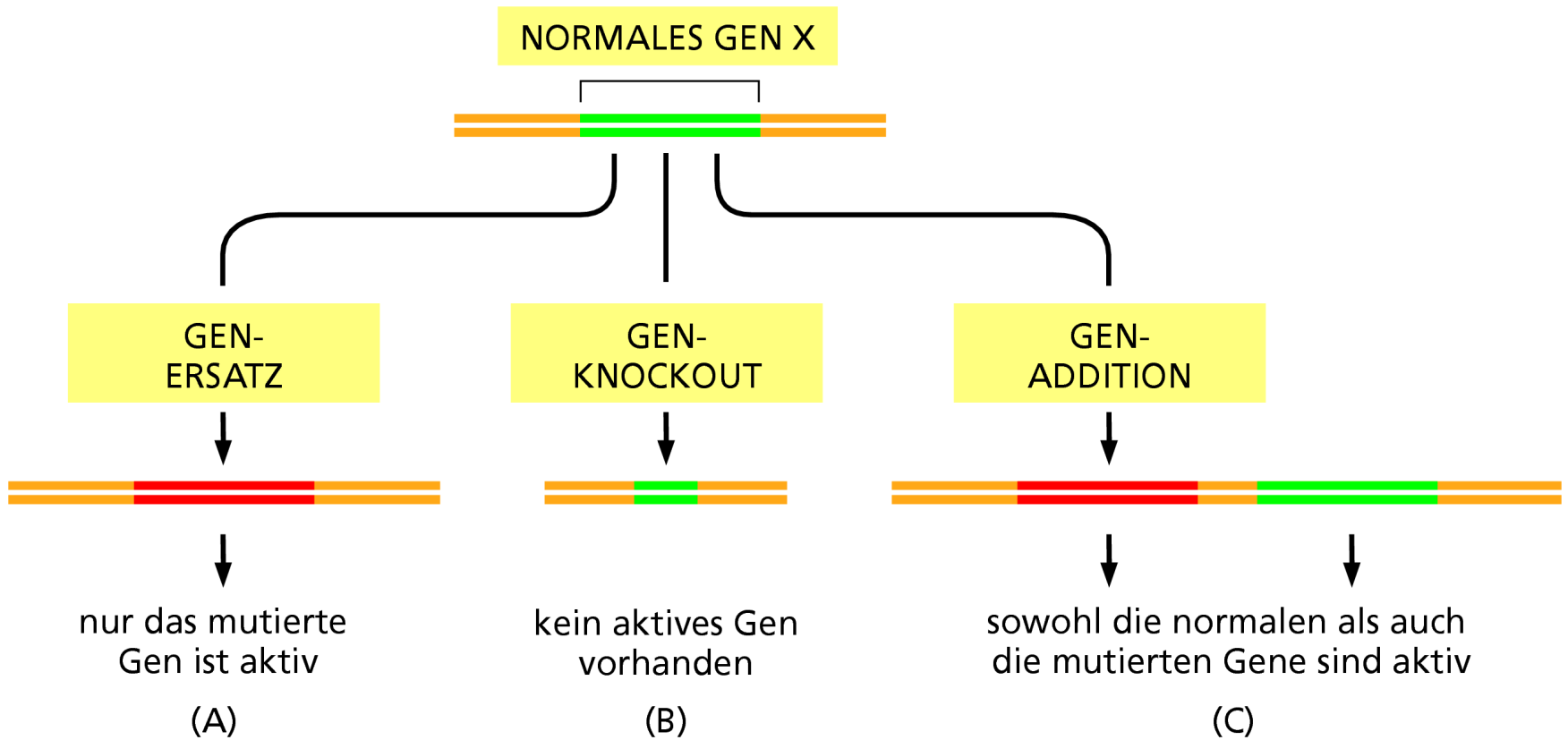


menschliche genomische DNA-Bibliothek

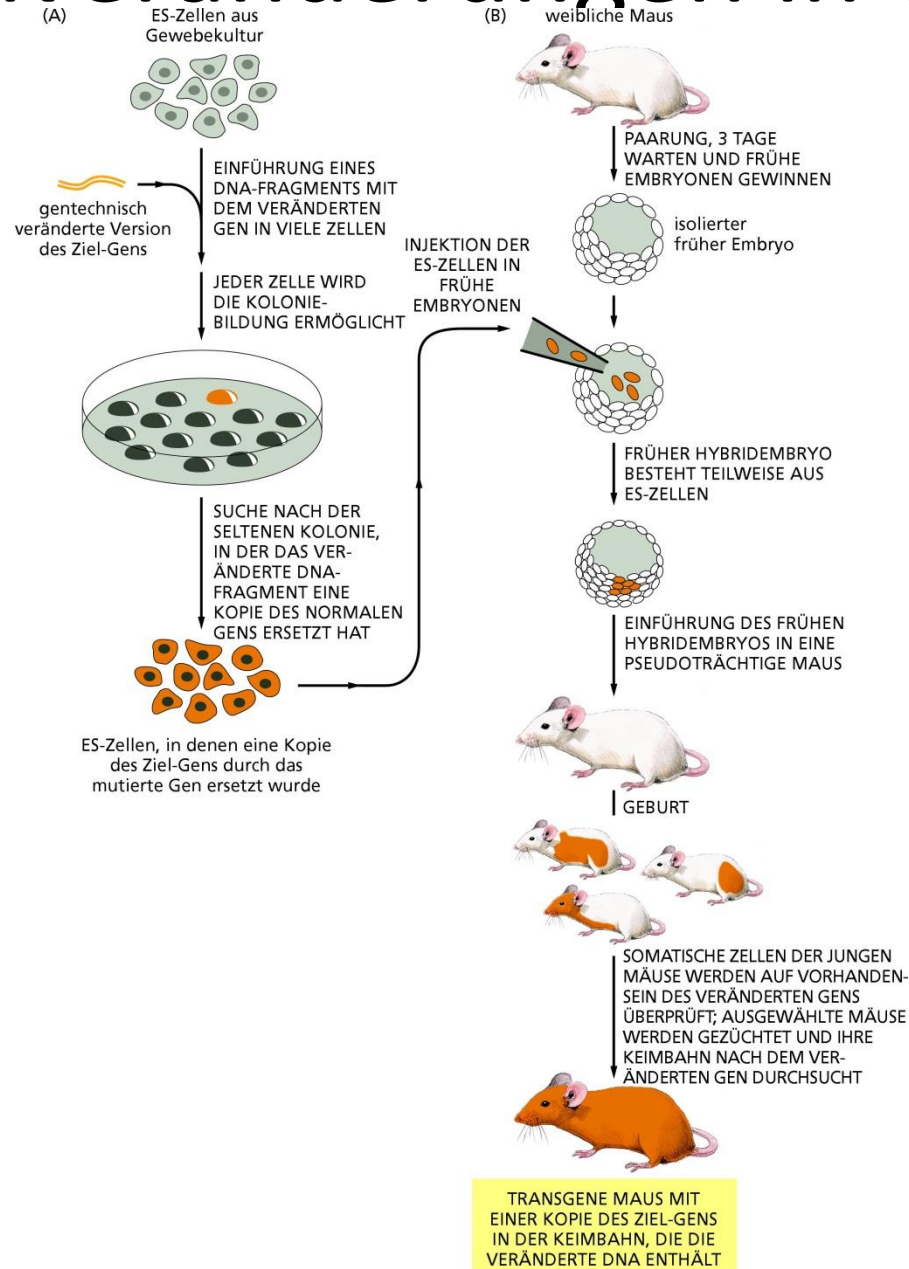
Genveränderungen einführen



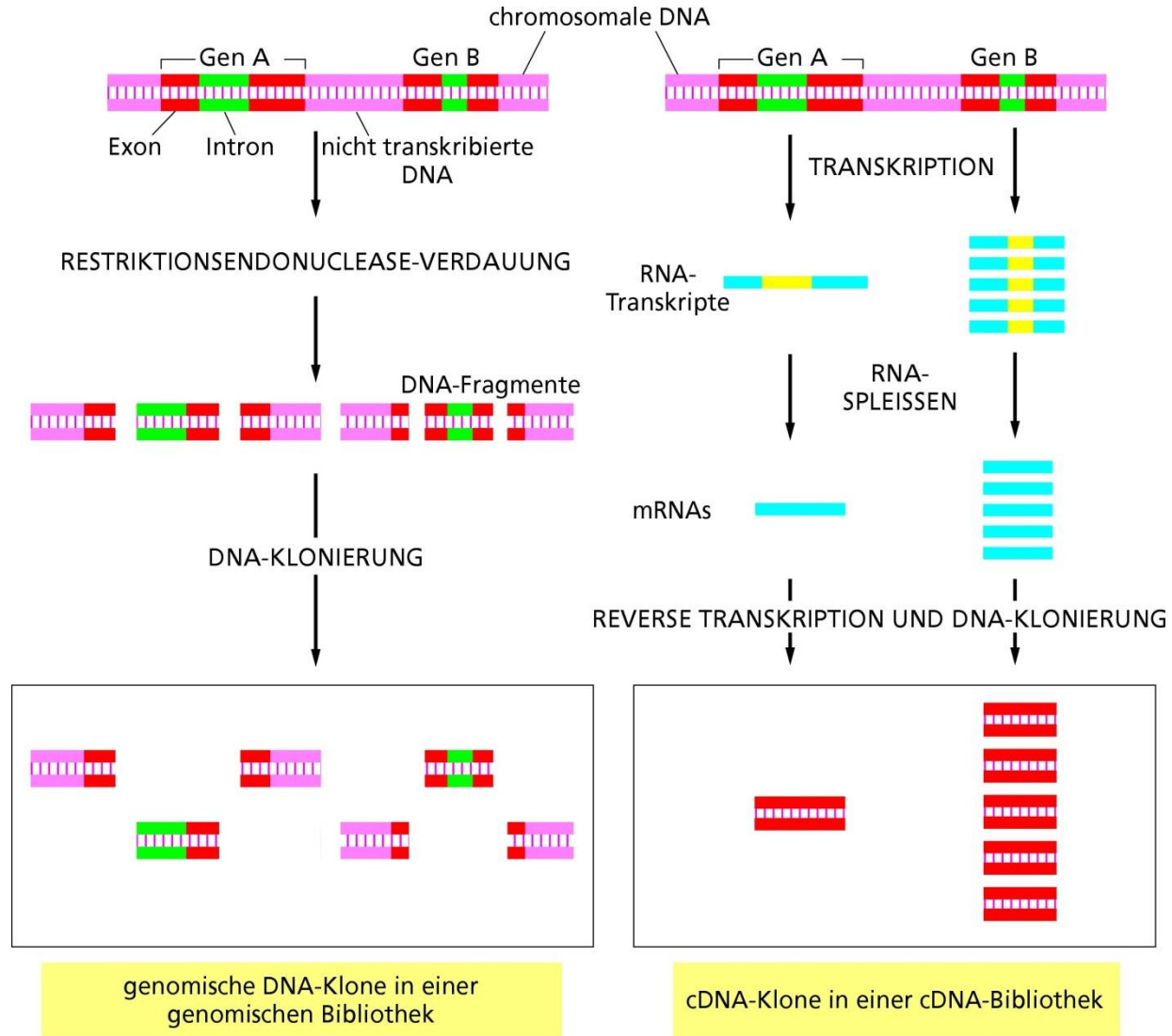
Genveränderungen einführen



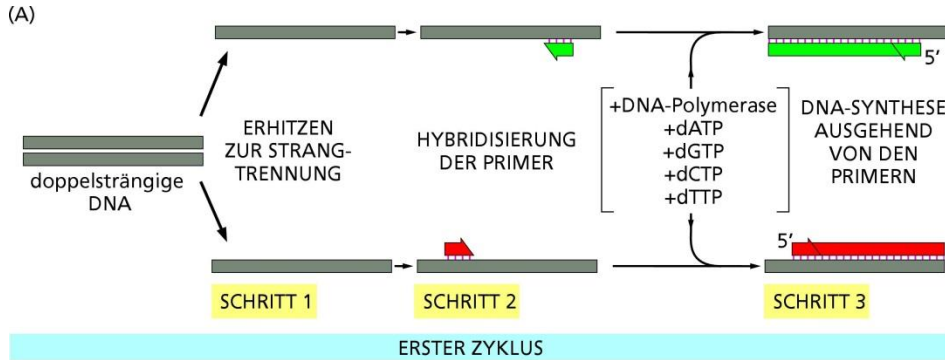
Genveränderungen in vivo



Quellen von DNA/RNA



Polymerase-Kettenreaktion

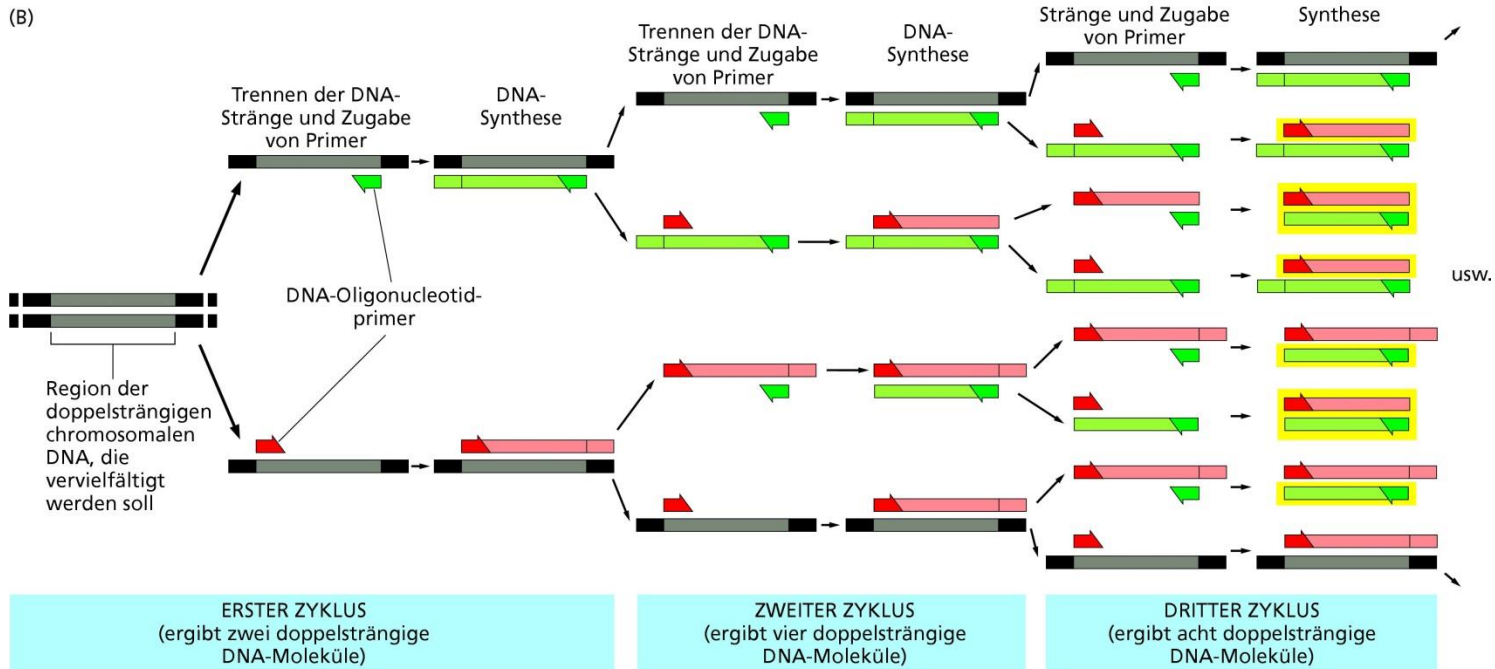


Temperaturprofil nötig:

95 °C = Strangtrennung

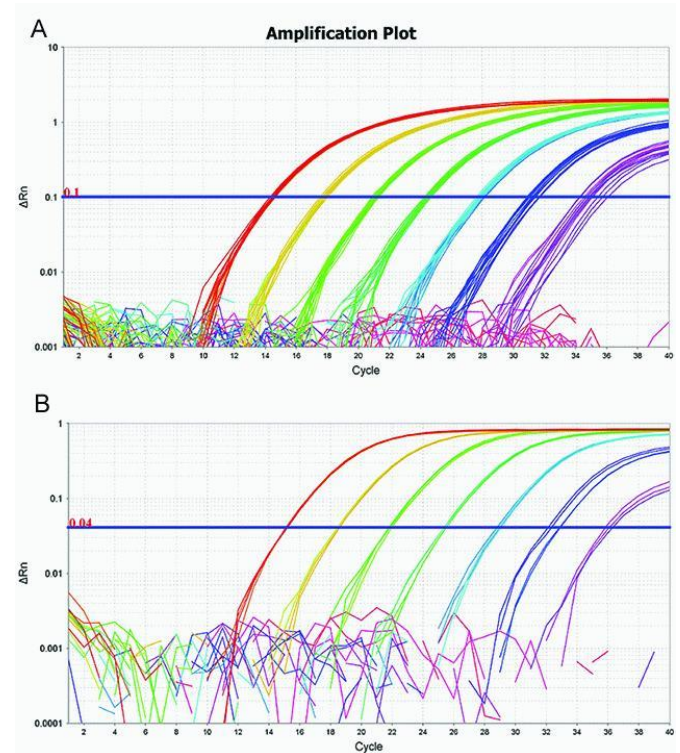
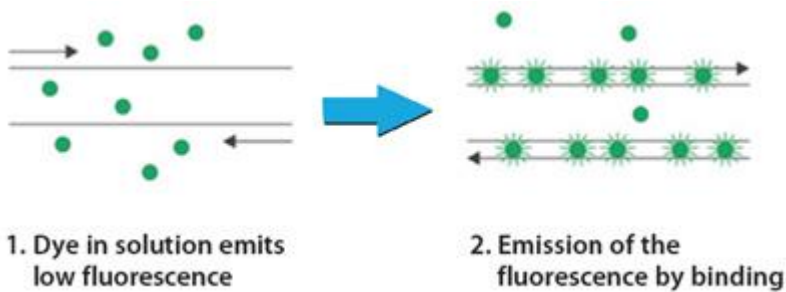
z.B. 58 °C = Primer hybridisieren

72 °C = Elongation

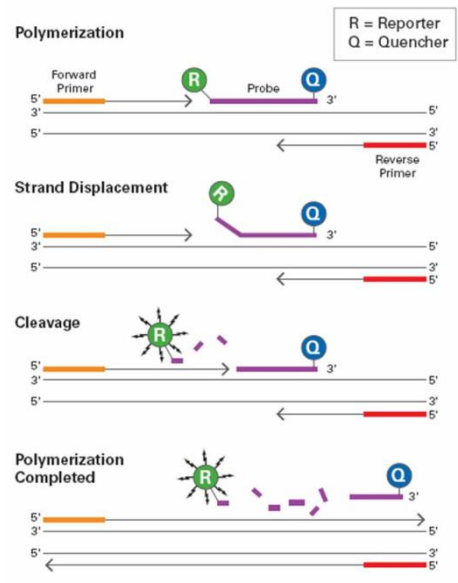


Quantitative PCR

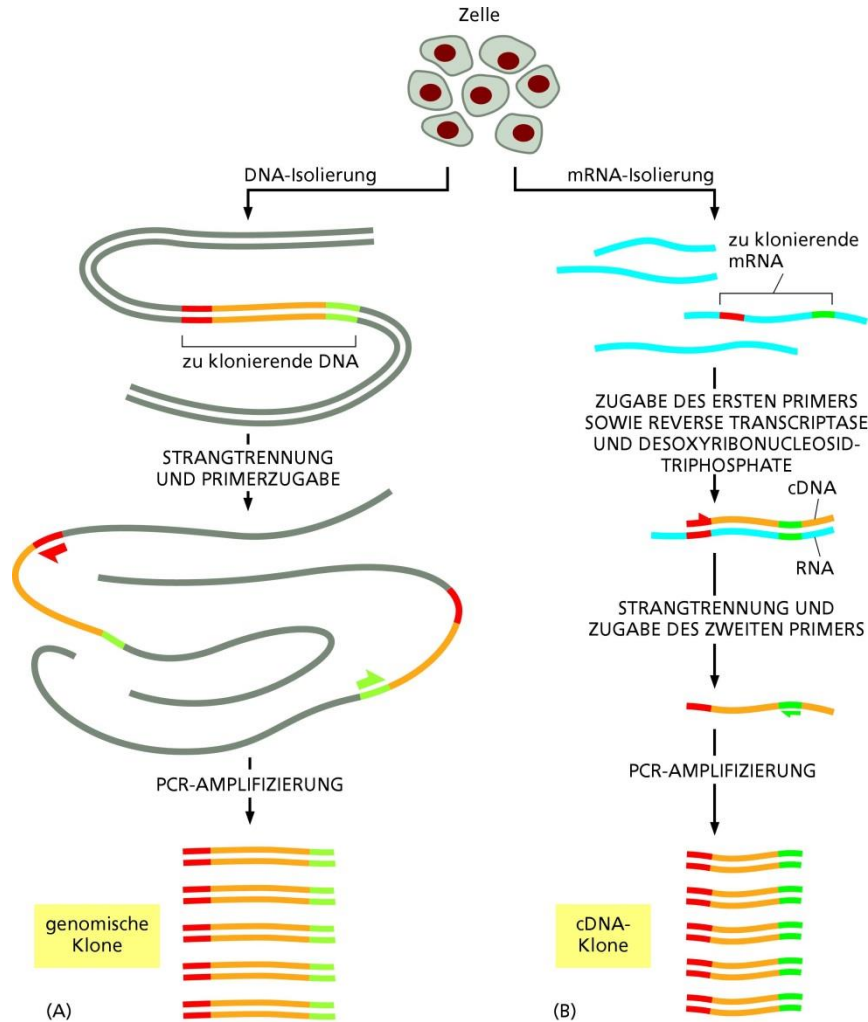
1. Möglichkeit: Fluoreszente Farbstoffe für dsDNA



2. Möglichkeit: Fluoreszente Marker



Auch mRNA lässt sich vervielfältigen



Enzym:
Reverse Transkriptase

Wer hat's erfunden
(die reverse Transkriptase?)

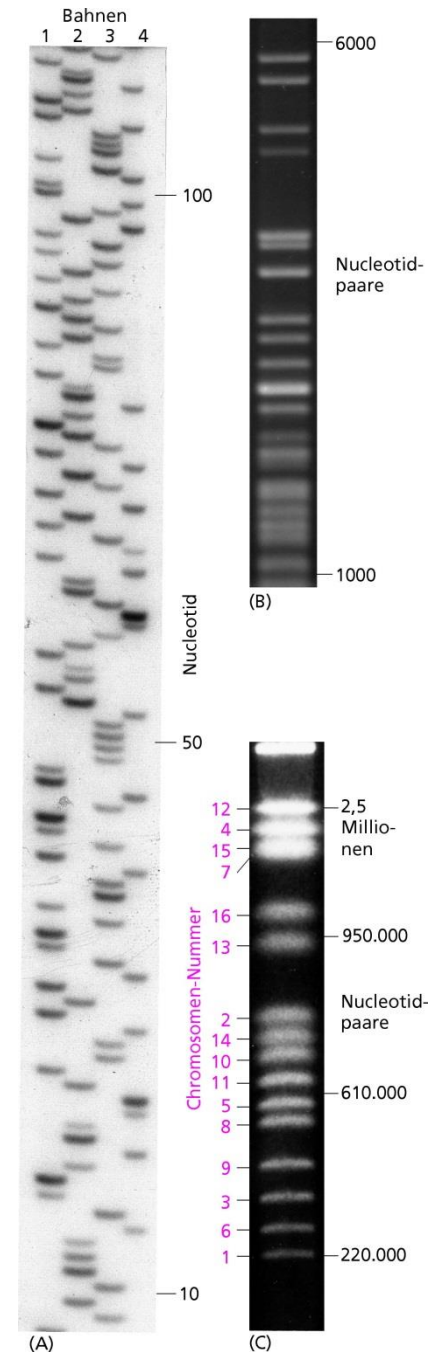
DNA Sequenzbestimmung

Trennmöglichkeiten

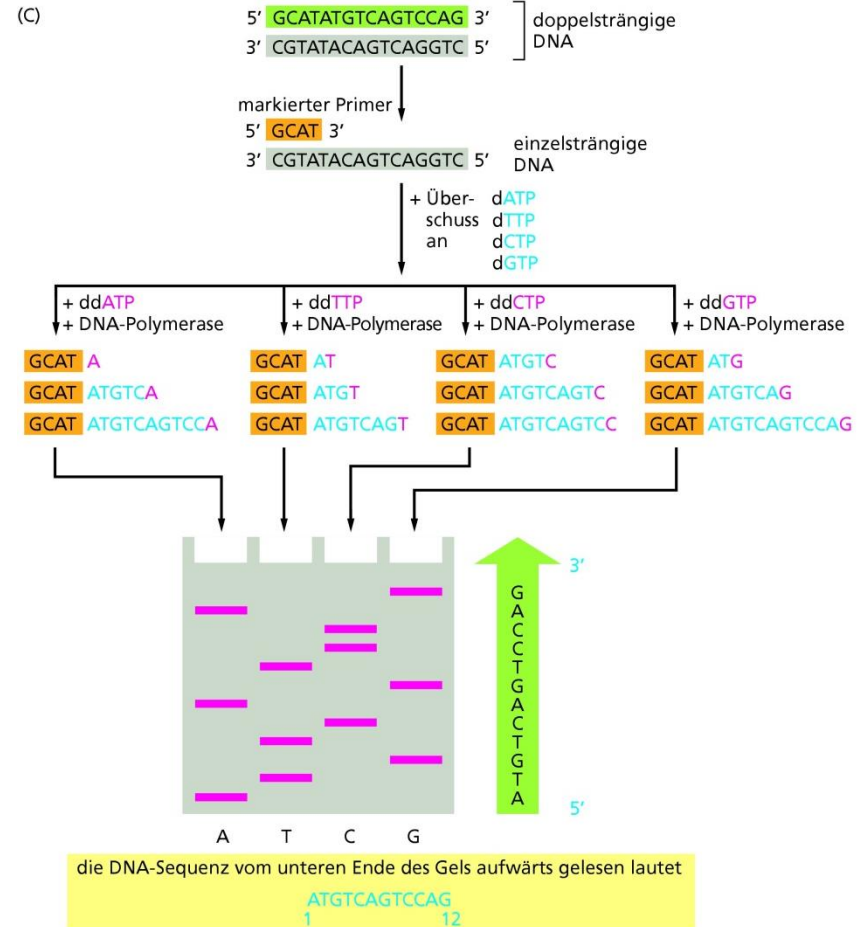
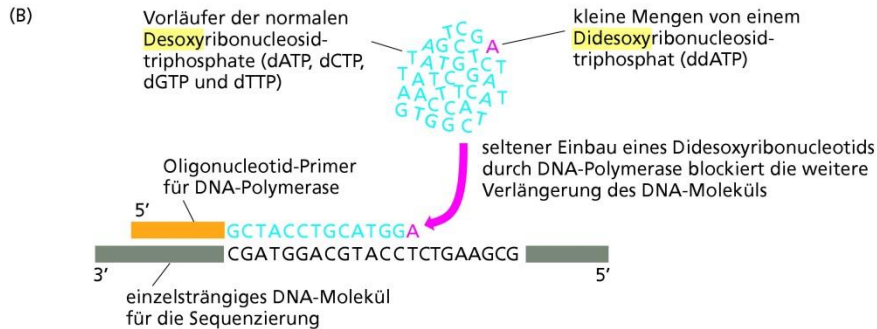
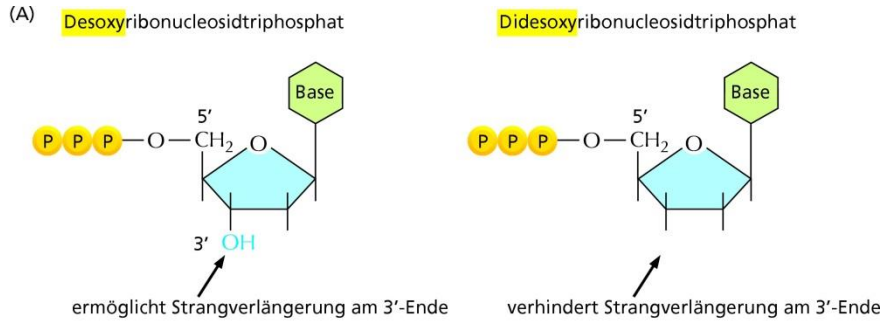
Bis hin zu einzelnen Basenpaaren

Aber auch bis zu einigen Millionen Basenpaaren

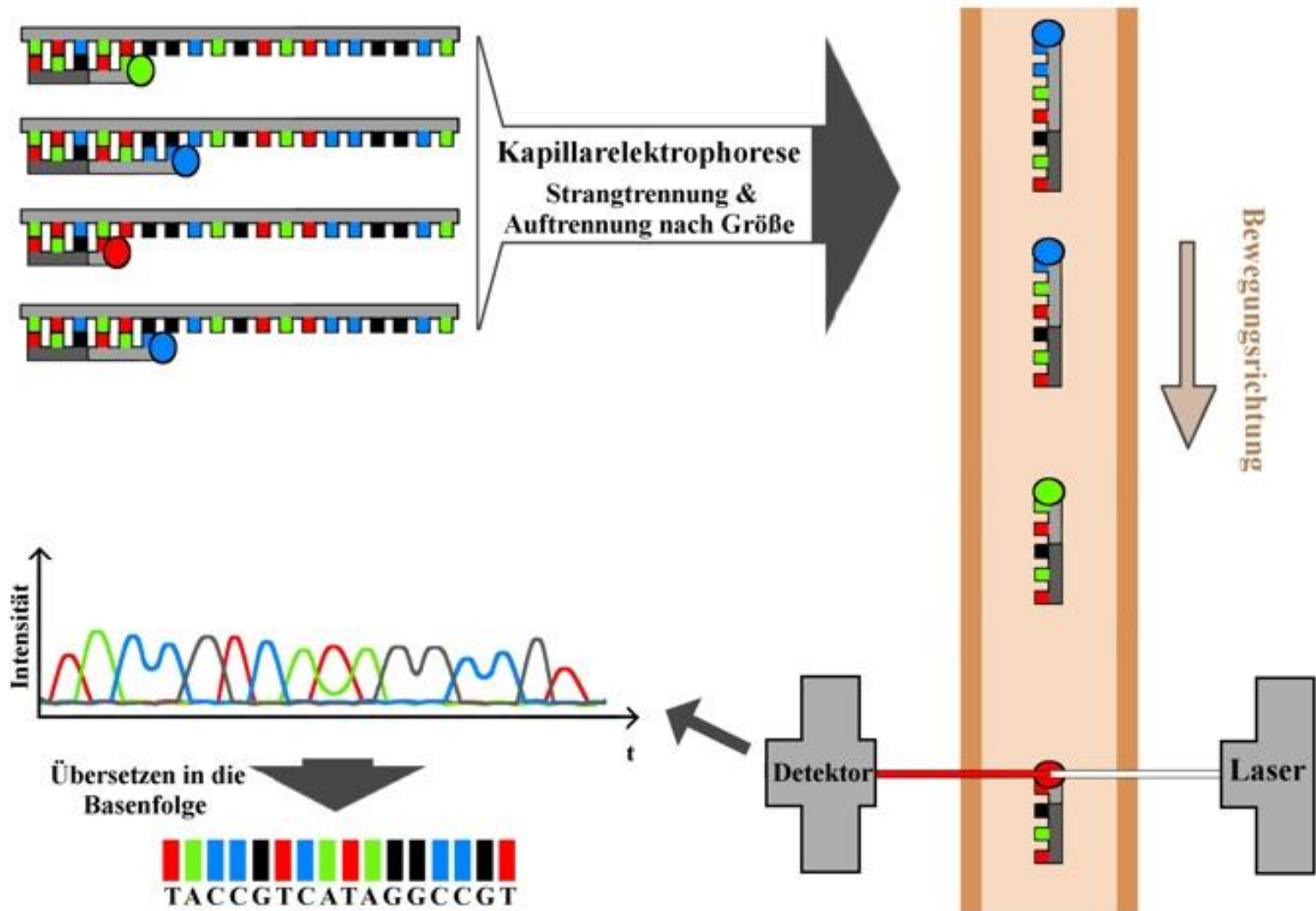
- Je nach Dichte des Gels
- Je nach elektrophoretischem Protokoll (z.T. gepulst)
- z.T. werden Zellen direkt auf dem Gel lysiert und die DNA dann aufgetrennt



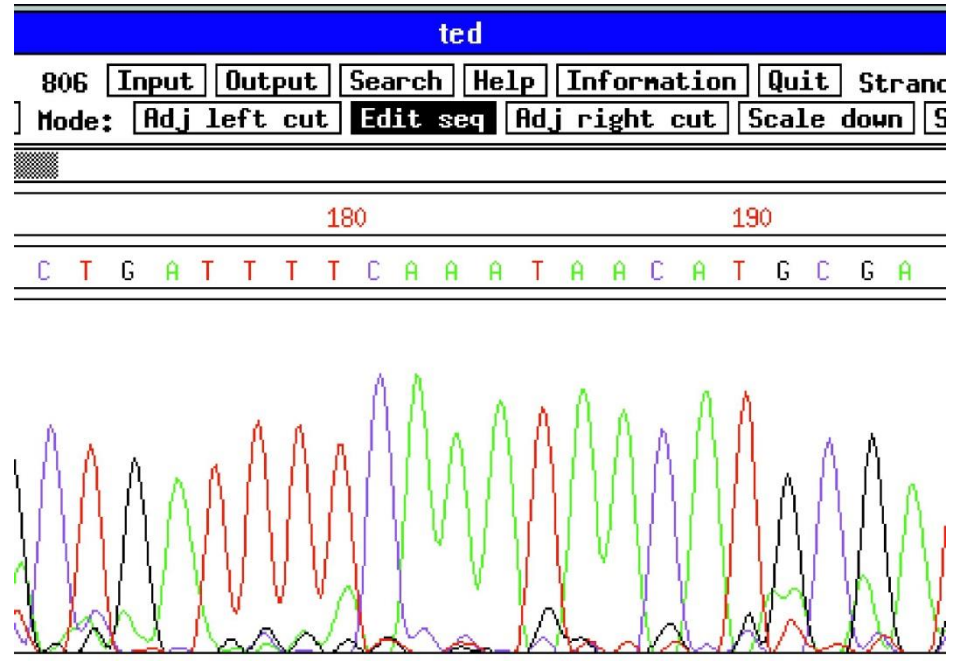
DNA Sequenzierung



Fluoreszenzmarkierte Dideoxy-Nukleotidtriphosphate und Kapillarelektrophorese

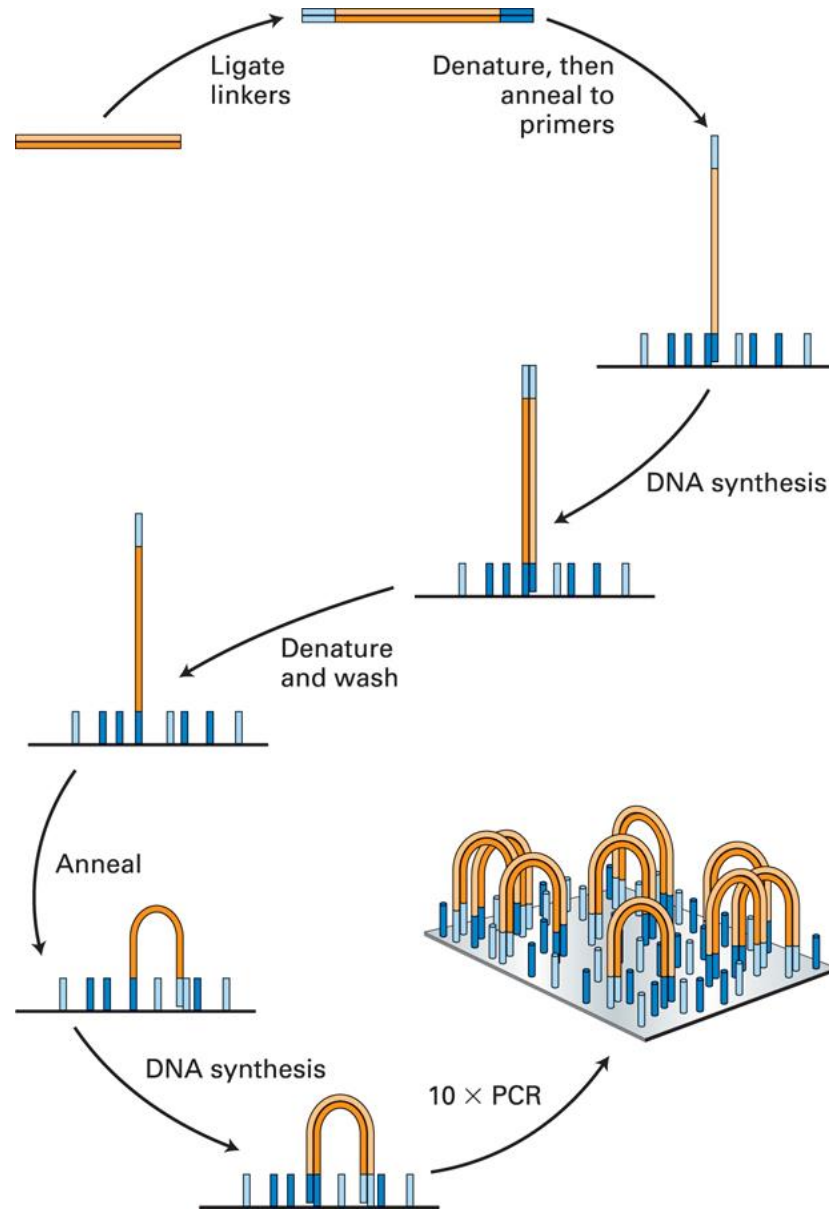


Fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotidtriphosphate und Kapillarelektrophorese



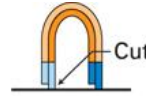
© 2011 Wiley-VCH, Weinheim
Alberts - Molekularbiologie der Zelle
ISBN: 978-3-527-32384-5 Abb. 08-51

Moderne Sequenzierung I



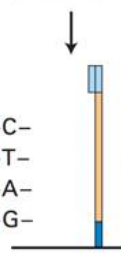
Moderne Sequenzierung II

1 Cut one DNA strand, denature, and wash, leaving single-strand

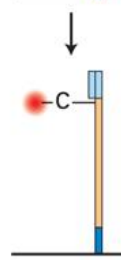


2 Add new primer, then fluorescently labeled dNTPs; one dNTP binds, wash away excess

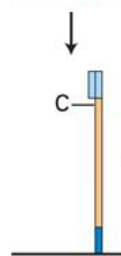
-C-
-T-
-A-
-G-



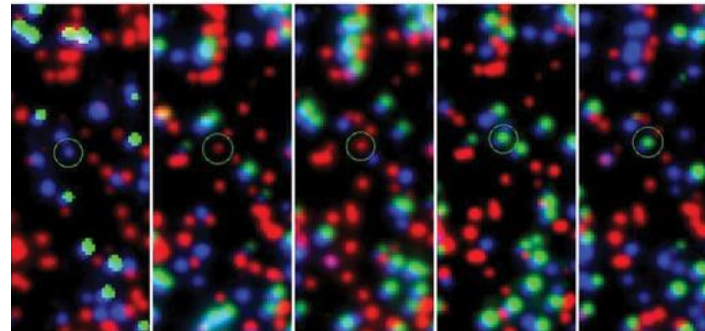
3 Fluorescent imaging to determine which dNTP bound



4 Chemically remove bound fluorophore and wash

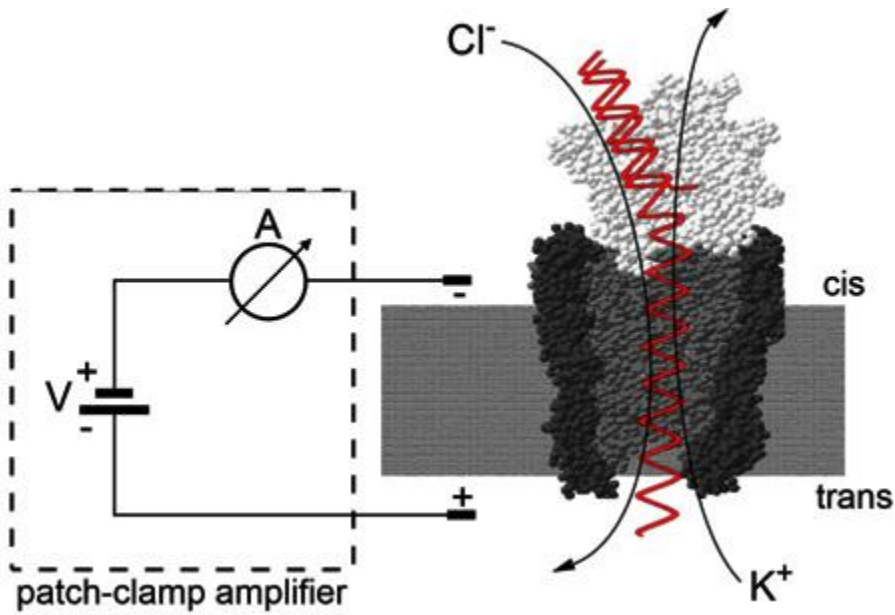


5 Repeat until DNA strand is replicated

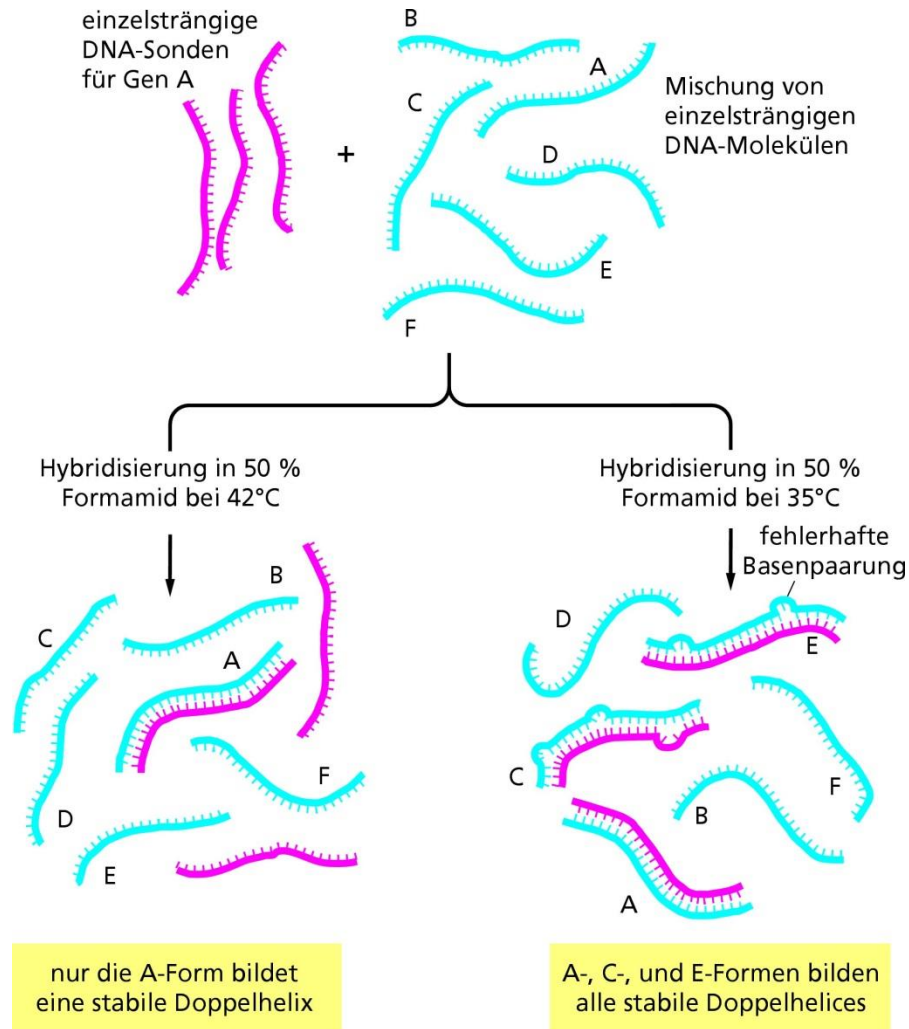


Nanoporen

a)

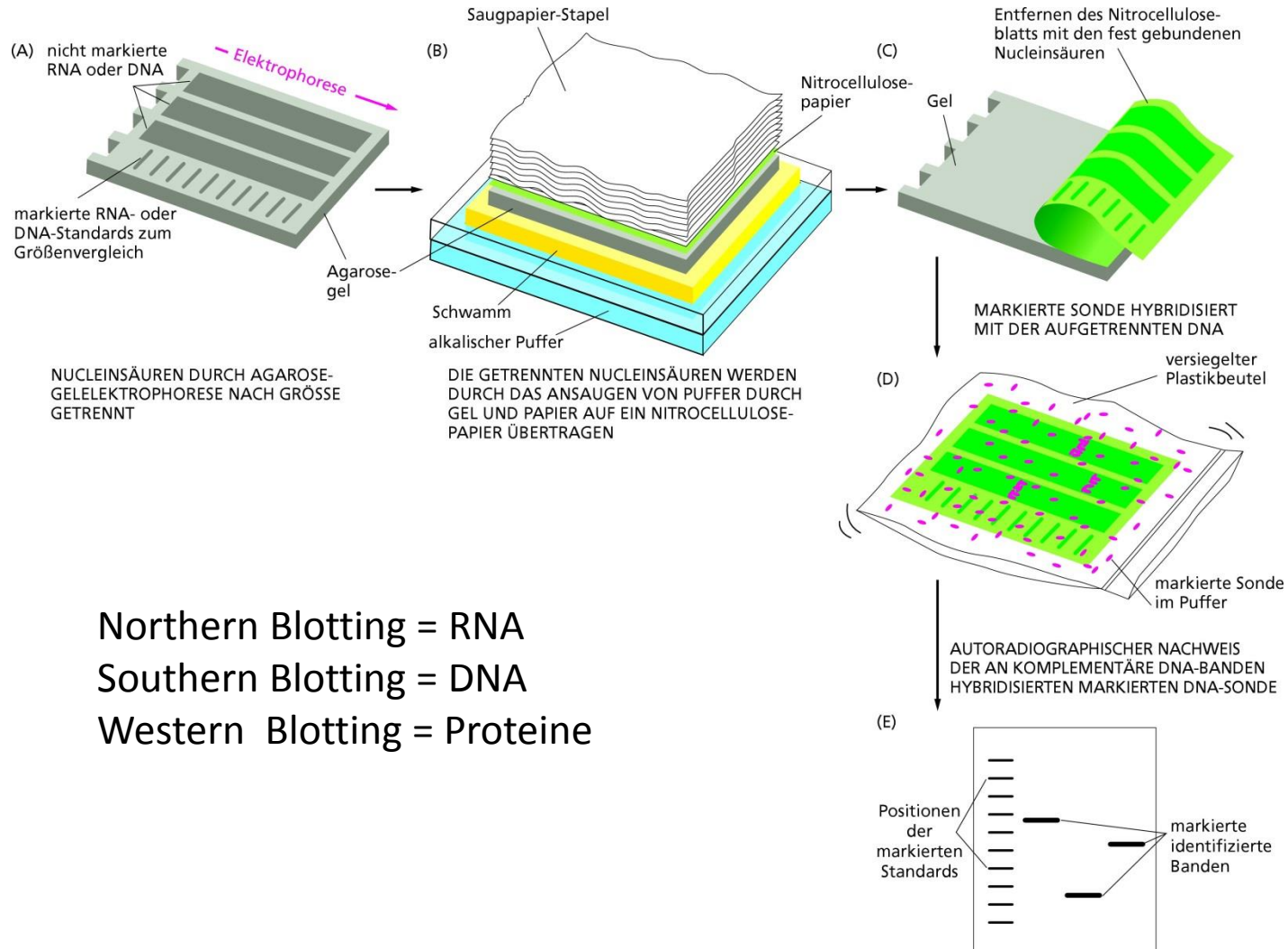


Weitere Analysen der aufgetrennten DNA



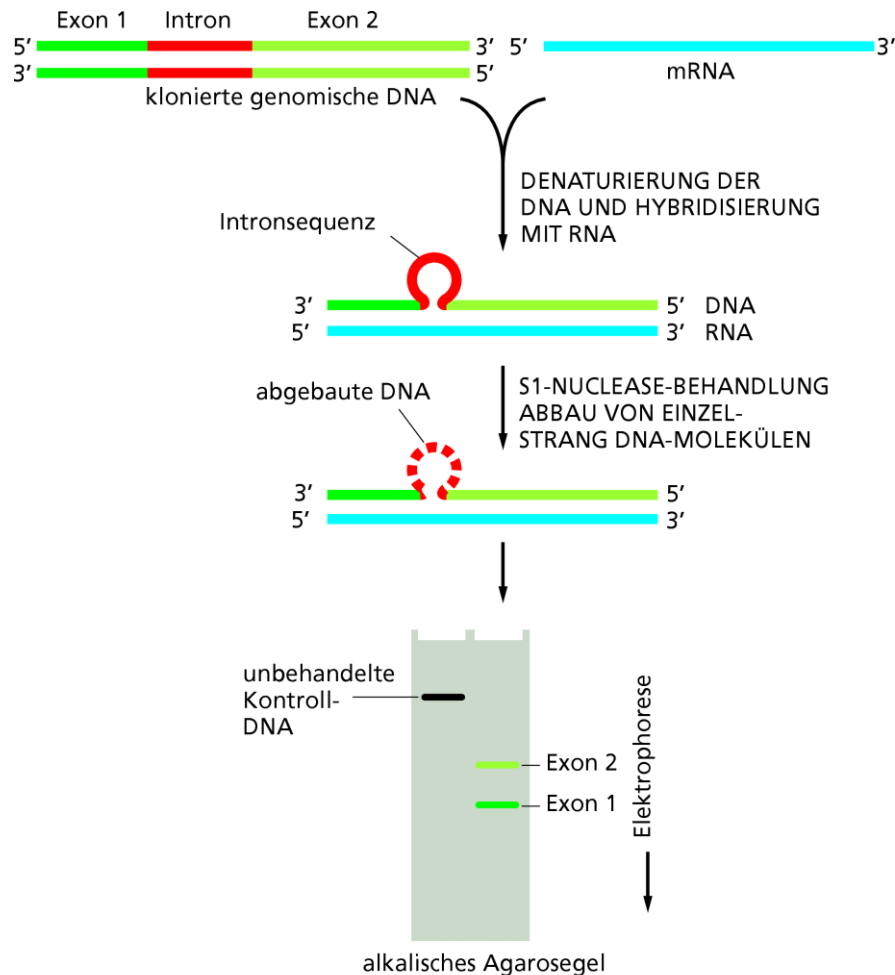
Weitere Analyse von DNA und Proteinen

Blotting

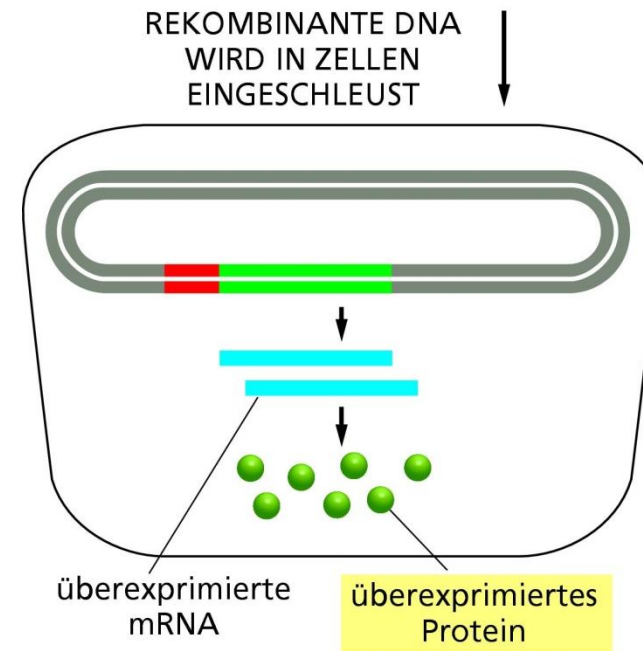
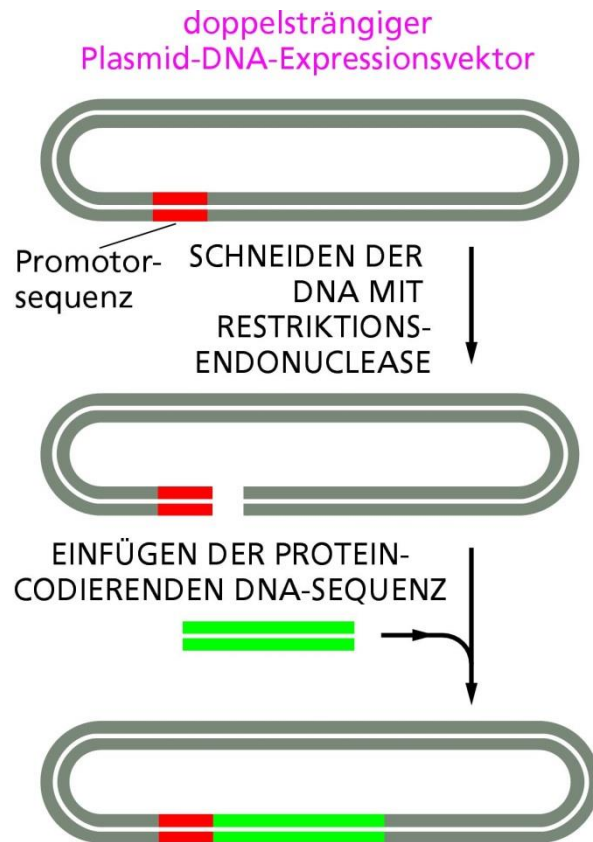


Northern Blotting = RNA
Southern Blotting = DNA
Western Blotting = Proteine

Nutzung der unvollständigen Hybridisierung



Überexpression von Proteinen

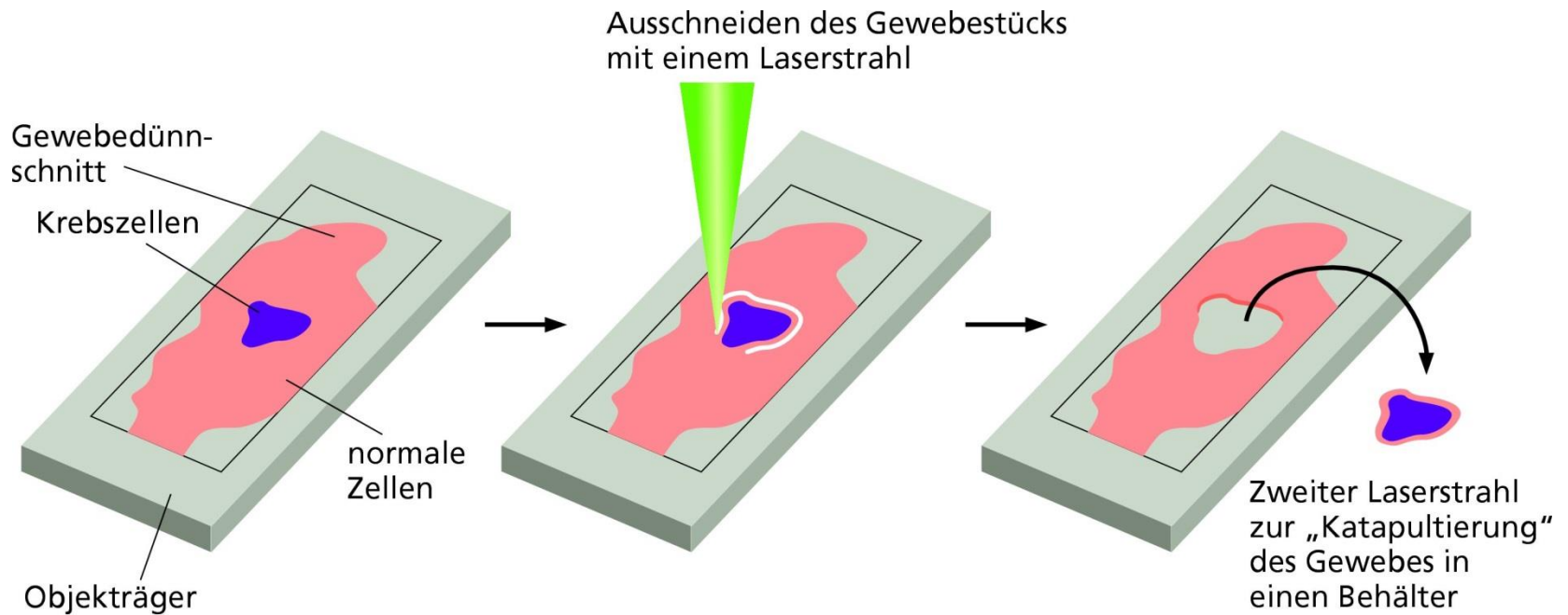


© 2011 Wiley-VCH, Weinheim
Alberts - Molekularbiologie der Zelle
ISBN: 978-3-527-32384-5 Abb. 08-48

In Bakterien: technisch relativ, einfach, keine Glykolysierung, u.U. nicht korrekt gefaltet.

Zelle und Organismen: DNA zur Manipulation

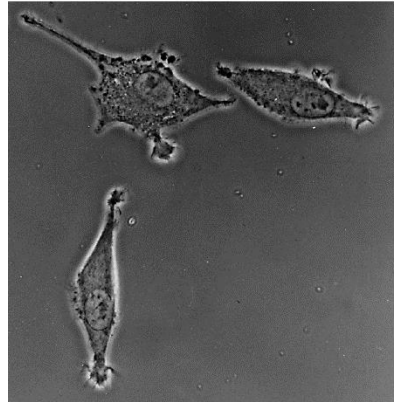
Analyse von Geweben



© 2011 Wiley-VCH, Weinheim
Alberts - Molekularbiologie der Zelle
ISBN: 978-3-527-32384-5 Abb. 08-03

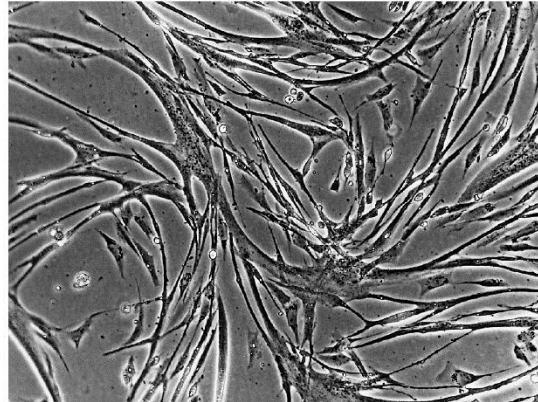
Problem: Reinheit

Ausweg: Zellkulturen



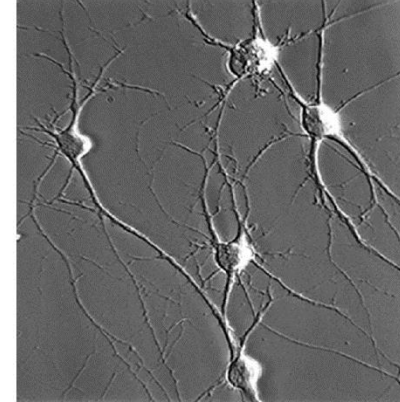
(A)

20 μm



(B)

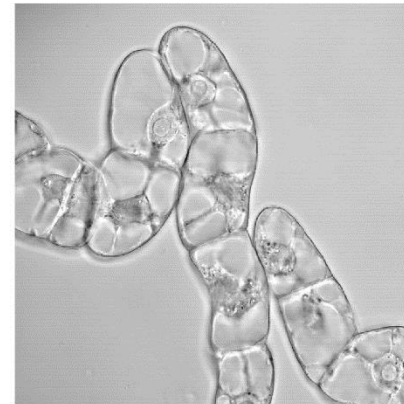
100 μm



(C)

50 μm

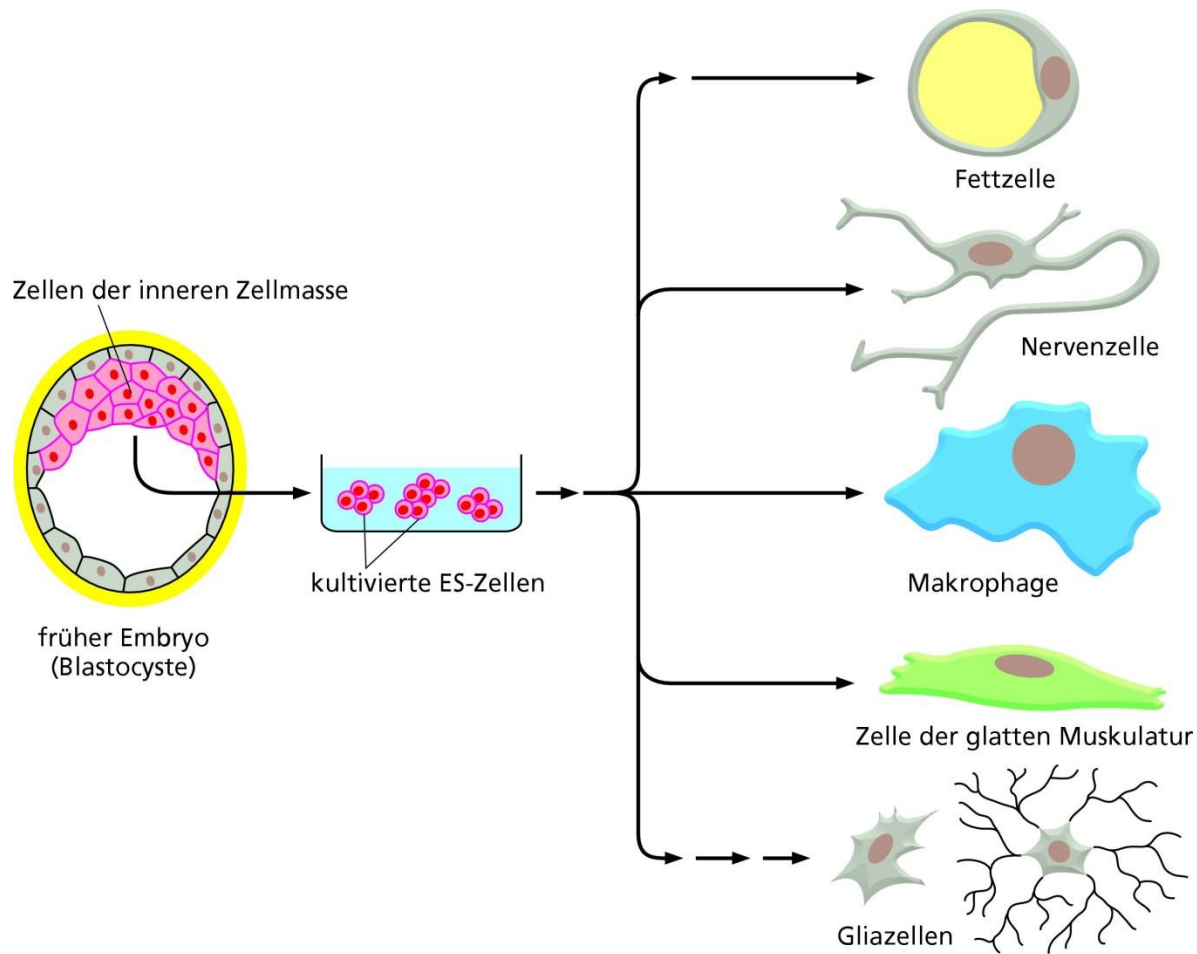
- A) Fibroblasten
- B) Myoblasten
- C) Neuronenzellen
- D) Tabak-Pflanzenzellen



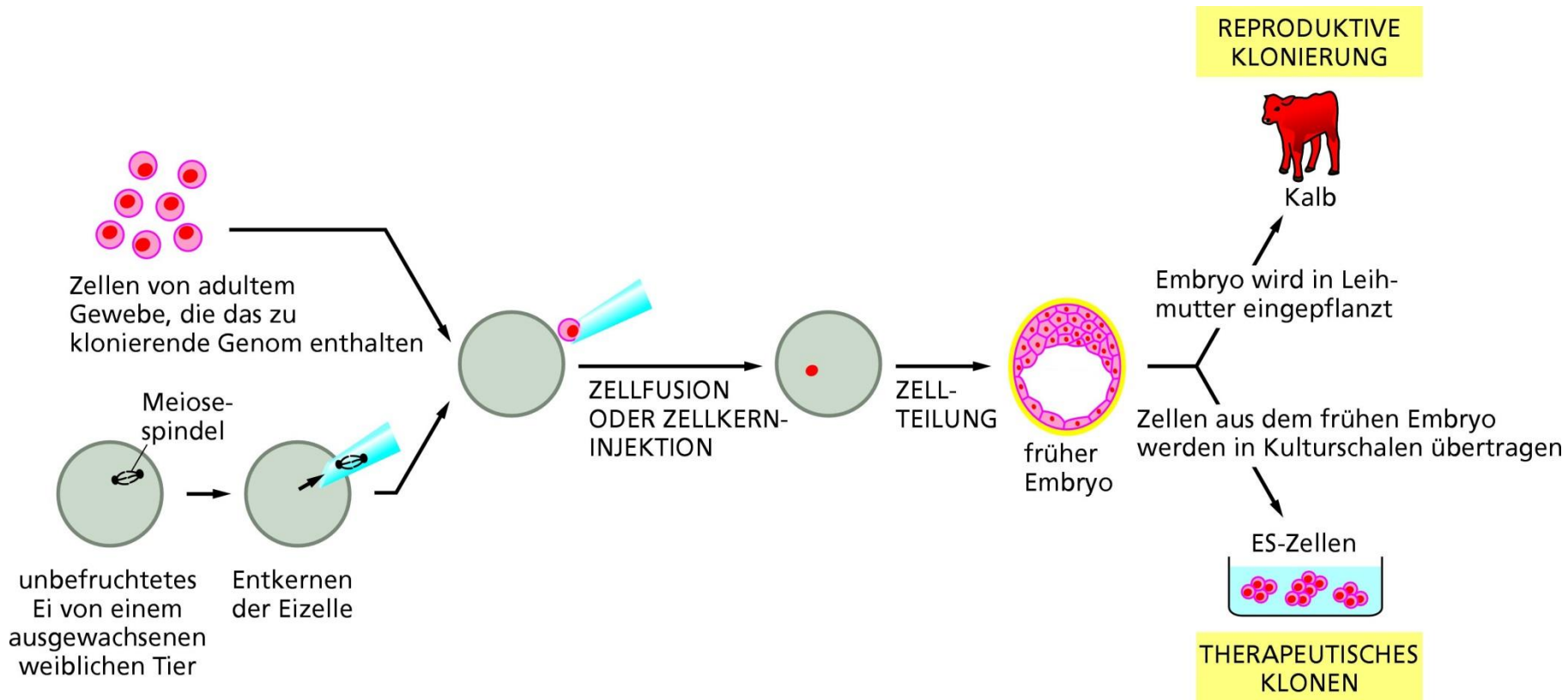
(D)

50 μm

Embryonale Stammzellen



Kombination aus adultem Gewebe (Kern) und Eizelle (Zytoplasma)



Lernergebnisse

- Größe und Ladung sowie Bindung zu Bindungspartner (Liganden, andere Proteine, Antikörper) können für Auftrennung von Proteinen genutzt werden
- Präparation größerer Mengen an Proteinen durch Säulenchromatographie
- Sequenzaufklärung von Proteinen: chemisch vom N- oder C-terminalen Ende bzw. per Massenspektrometrie
- Auftrennen von DNA: Größe und Konformation
- Sequenzaufklärung von DNA: Sanger Sequenzierung (ddNTPs) bzw. über neue Methoden (Bindung an Festphase, Nanoporen)
- Präparation größerer Mengen an DNA: Plasmide, PCR
- Zelle und Tiere werden durch Plasmide bzw. Viren manipuliert