

## **Biochemische Methoden**

- Woche 1-5: Prof. N. Sträter  
Fr. 11.00 - 12.30 Uhr, BBZ, EG, Seminarraum
- Woche 6-10: Prof. R. Hoffmann  
Do. 8.00 - 9.30 Uhr, kleiner Hörsaal, Chemie

### **Teil 2: Reinigung und Analyse von Proteinen**

Proteine: Grundlagen, Präparation und Quantifizierung (heute)

Chromatographie: SEC, RPC, IEC und HIC (29.05.2008)

Gelelektrophorese: SDS-PAGE, 2-DE und Blotting (05.06.2008)

Immunologische Methoden und Enzymassays (12.06.2008)

Massenspektrometrie: ESI- und MALDI-MS (19.06.2008)

## Weiterführende Literatur

1. Lottspeich, Engels: Bioanalytik  
Elsevier Spektrum Akademischer Verlag  
ISBN 3-8274-1520-9
2. T. Rabillaud: Proteome Research: Two-Dimensional Gel  
Electrophoresis and Identification Methods  
Springer Verlag  
ISBN 3-540-65792-4
3. PDF-Dokumente: Chromatographie + Elektrophorese  
[http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/  
Content/orderonline\\_handbooks](http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/orderonline_handbooks)

# **Proteine**

## **Grundlagen, Präparation und Quantifizierung**

### **1. Aminosäuren**

Struktur und funktionelle Gruppen

Proteinogene Aminosäuren

Modifikationen

### **2. Proteine**

Aufbau, Variabilität

Eigenschaften

### **3. Proteintrennung**

Homogenisierung, Zellaufschluss

Isolierung

Fraktionierung

### **4. Proteinbestimmung**

Biuret-Assay

BCA-Assay

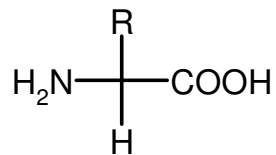
Lowry-Assay

Bradford-Assay

## Proteinogene Aminosäuren

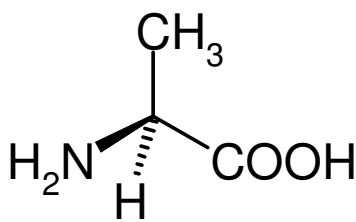
- Proteine sind aus eine Satz von 20 Aminosäuren aufgebaut (Translation der Gensequenz)
- Alles  $\alpha$ -Aminosäuren (Prolin: Iminosäure)

**Allgemeine Struktur:**

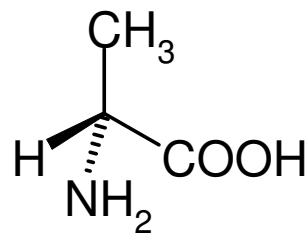


**Chirales Zentrum:**

z.B. L- und D-Alanin



(+) L-Alanin



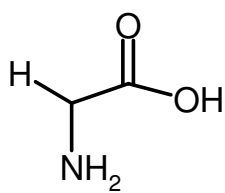
(-) D-Alanin

In Proteinen liegen nur L-Aminosäuren vor (außer Glycin)

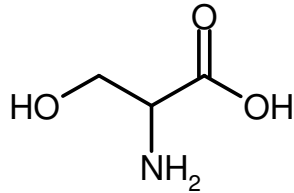
Peptide können auch D-Aminosäuren enthalten

# Proteinogene Aminosäuren I

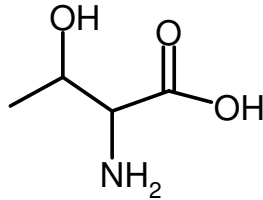
## Polare $\alpha$ -Aminosäuren



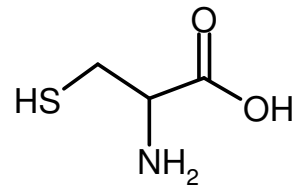
Glycin  
Gly, G



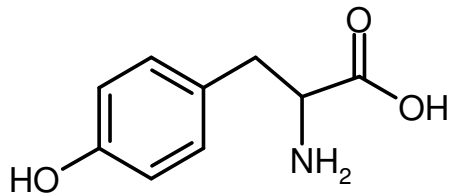
Serin  
Ser, S



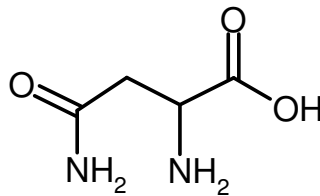
Threonin  
Thr, T



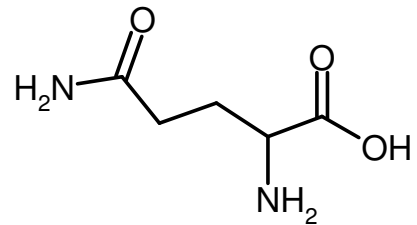
Cystein  
Cys, C



Tyrosin  
Tyr, Y

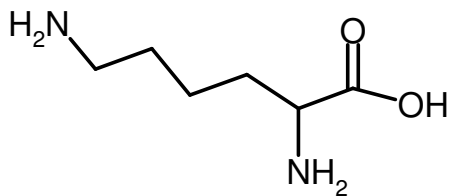


Asparagin  
Asn, N

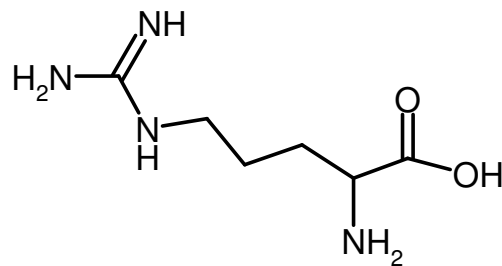


Glutamin  
Gln, Q

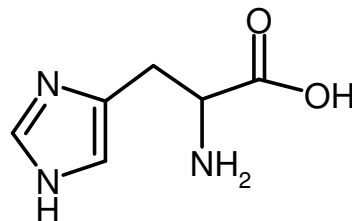
## Basische $\alpha$ -Aminosäuren



Lysin  
Lys, K



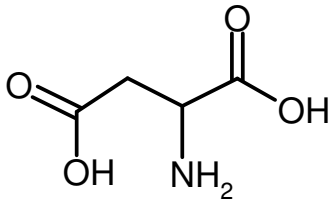
Arginin  
Arg, R



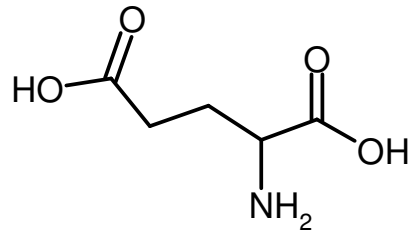
Histidin  
His, H

# Proteinogene Aminosäuren II

## Saure $\alpha$ -Aminosäuren

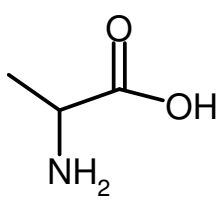


Asparaginsäure  
Asp, D

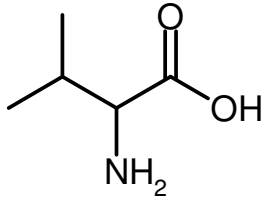


Glutaminsäure  
Glu, E

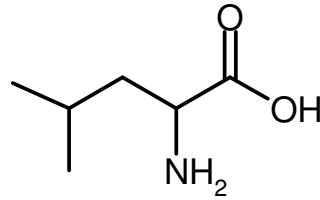
## Hydrophobe $\alpha$ -Aminosäuren



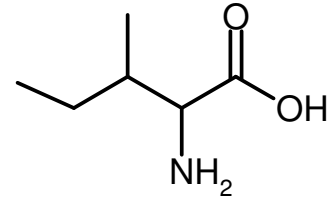
Alanin  
Ala, A



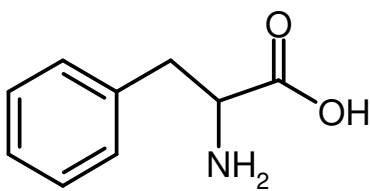
Valin  
Val, V



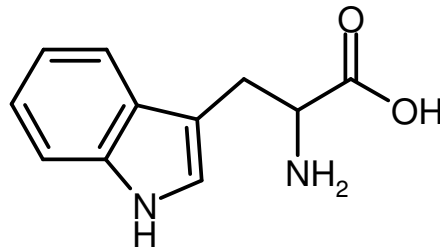
Leucin  
Leu, L



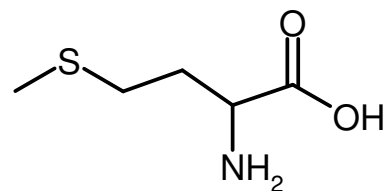
Isoleucin  
Ile, I



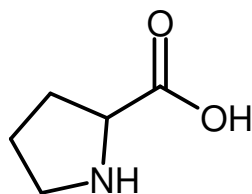
Phenylalanin  
Phe, F



Tryptophan  
Trp, W



Methionin  
Met, M



Prolin  
Pro, P

(Iminosäure)

# Proteinogene Aminosäurereste

## Physikalisch-chemische Eigenschaften:

- Zwitterionen-Charakter ( $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CHR}-\text{COO}^-$ )
- gut löslich in Wasser
- schlecht löslich in polaren Lösungsmitteln  
z.B. Ethanol, Aceton
- farblose Feststoffe
- hoher Schmelzpunkt ( $>200^\circ\text{C}$ )

## Spektroskopische Methoden:

- UV-Spektroskopie
- IR-Spektroskopie
  - $^+\text{H}_3\text{N}-$ :  $3070\text{ cm}^{-1}$ , 2 Banden  $1500-1600\text{ cm}^{-1}$
  - $-\text{COO}^-$ :  $1560-1600\text{ cm}^{-1}$
  - $-\text{COOH}$ :  $1700-1730\text{ cm}^{-1}$   
Mehrere bei  $2500-3030\text{ cm}^{-1}$
- NMR-Spektroskopie ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  usw.)
- Massenspektrometrie (MALDI- und ESI-MS)

## Trennmethoden:

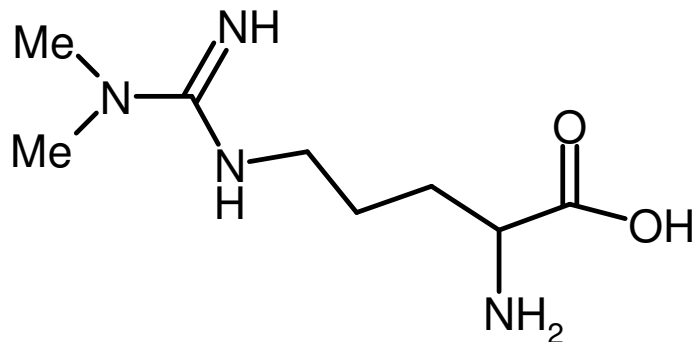
- Chromatographie
- Elektrophorese

## Modifizierte Aminosäurereste

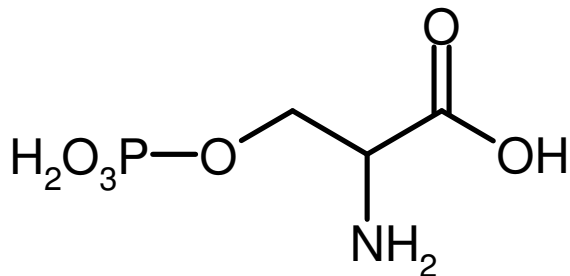
- cotranslational oder posttranslational
- reversibel oder irreversibel (auch von Protein abhängig)
- enzymatisch oder nicht-enzymatisch

### Beispiele:

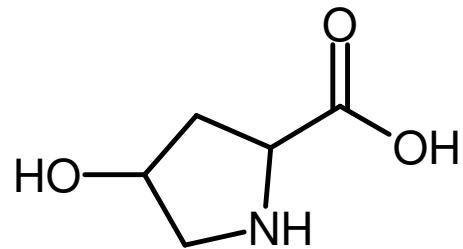
Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Hydroxylierung, Glykosylierung, Sulfatierung, Desamidierung, Oxidation usw.



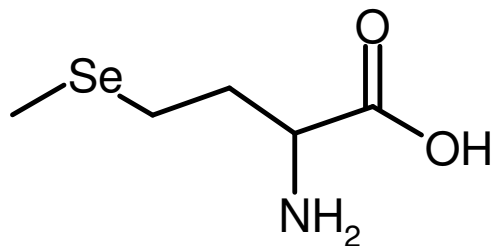
N<sub>G</sub>,N<sub>G</sub>-Dimethylarginin



O-Phosphoserin



4-Hydroxyprolin



Seleno-Methionin

# Proteine

## Größe

Peptide: von 200 - ca. 10.000 g/mol (2 - 100 AS)

Proteine: ca. 10.000 g/mol bis >500.000 g/mol (100 - 5000 AS)

Mittleres Molekulargewicht eines Aminosäurerests

ca. 110 g/mol (100mer  $\approx$  11.000 g/mol = 11 kDa)

## Saure Proteine

hoher Anteil an Asparagin- und Glutaminsäure (pI < 4)

## Basische Proteine

hoher Anteil an Lysin, Arginin und Histidin (pI > 10)

## “Typische” Proteine

Molekulargewicht: 25-40 kDa und pI: 4-9

ca. 80% aller (humanen) Proteine

# Proteinstruktur

- Primärstruktur (Sequenz)
- Sekundärstruktur ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt, Turn, usw.)
- Tertiärstruktur (räumliche Anordnung aller Atome, Raumstruktur)
- Quartärstruktur (Komplex mehrerer Proteine)

Viele Proteine haben eine stabile Tertiärstruktur (z.B. globulär)

Einige Proteine sind flexibel (ungeordnet)

Proteinketten oft über Disulfidbrücken verknüpft

intra- oder intermolekular

gegebenenfalls reduzierten (Thiole) und alkylieren

## nativ

korrekte Struktur des Proteins (aus natürlicher Umgebung)  
bleibt erhalten (biologisch aktive Form)

## Denaturierung

Struktur des Proteins (Tertiär- und Quartärstruktur) wird  
"zerstört" ➡ ungefaltet oder partiell entfaltet

## Renaturierung (Rückfaltung)

Protein nimmt wieder seine native Struktur an

# Proteintrennung - Herausforderungen

Proteine sind sehr vielfältig bezüglich ihrer Eigenschaften wie Größe, Ladung, Polarität, Struktur usw.

## Proteinpool

Theorie: Proteinlänge: 100 Reste:  $20^{100}$  mögliche Proteine!

## Humangenom

	ca. 25.000 Gene	
Pro Zelle aktiviert:	ca. 10.000 Gene	☛ 10.000 Proteine
Splicing:	x5	☛ 50.000 Proteine
Modifikationen:	x10-20	☛ 1 Mio. Proteine (?)
Gewebe:	Mehrere Zelltypen	☛ X Mio. Proteine

**Konzentration:** sehr unterschiedlich (Differenz bis Faktor  $10^{12}$ )

## Ziel

1. Ein Protein aus dieser Mischung gezielt isolieren

Wiederfindung: 100%

Reinheit: 100%

Native, biologisch aktive Struktur

2. Alle Proteine trennen

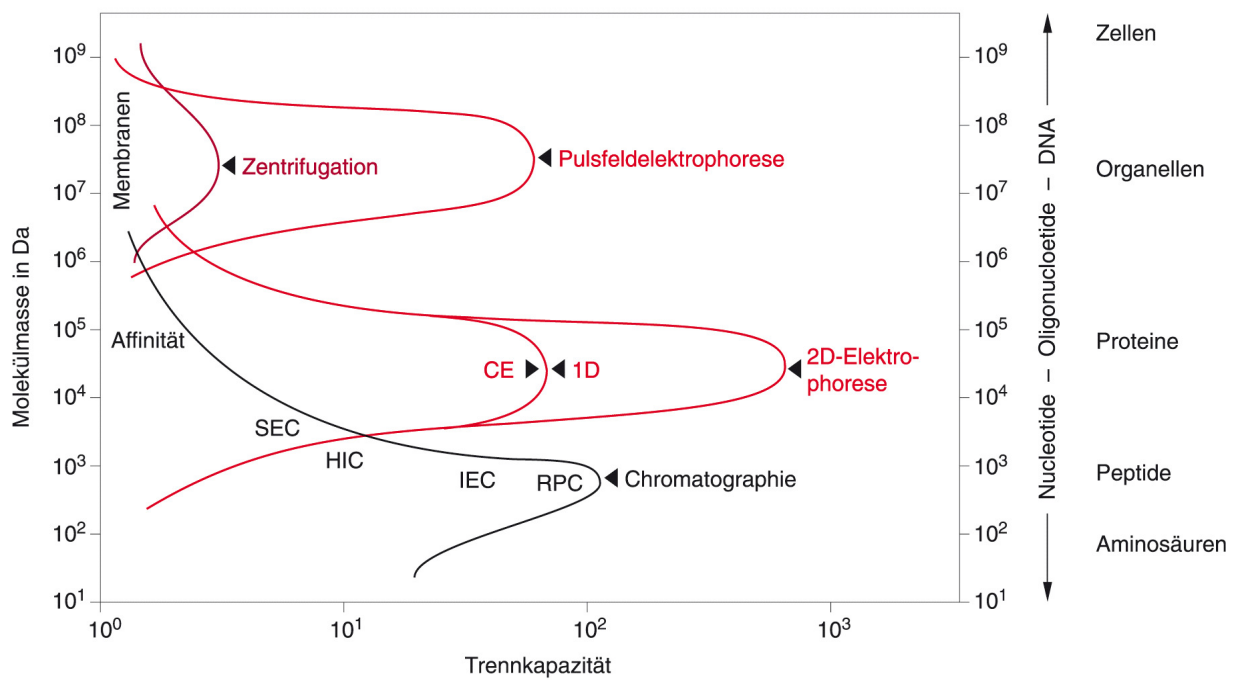
bis heute unmöglich!

# Trennkapazität der Trennmethode

## Trennkapazität

Anzahl der theoretisch trennbaren Komponenten einer Verbindung (ideale Bedingungen)

Teil I: Proteinanalytik

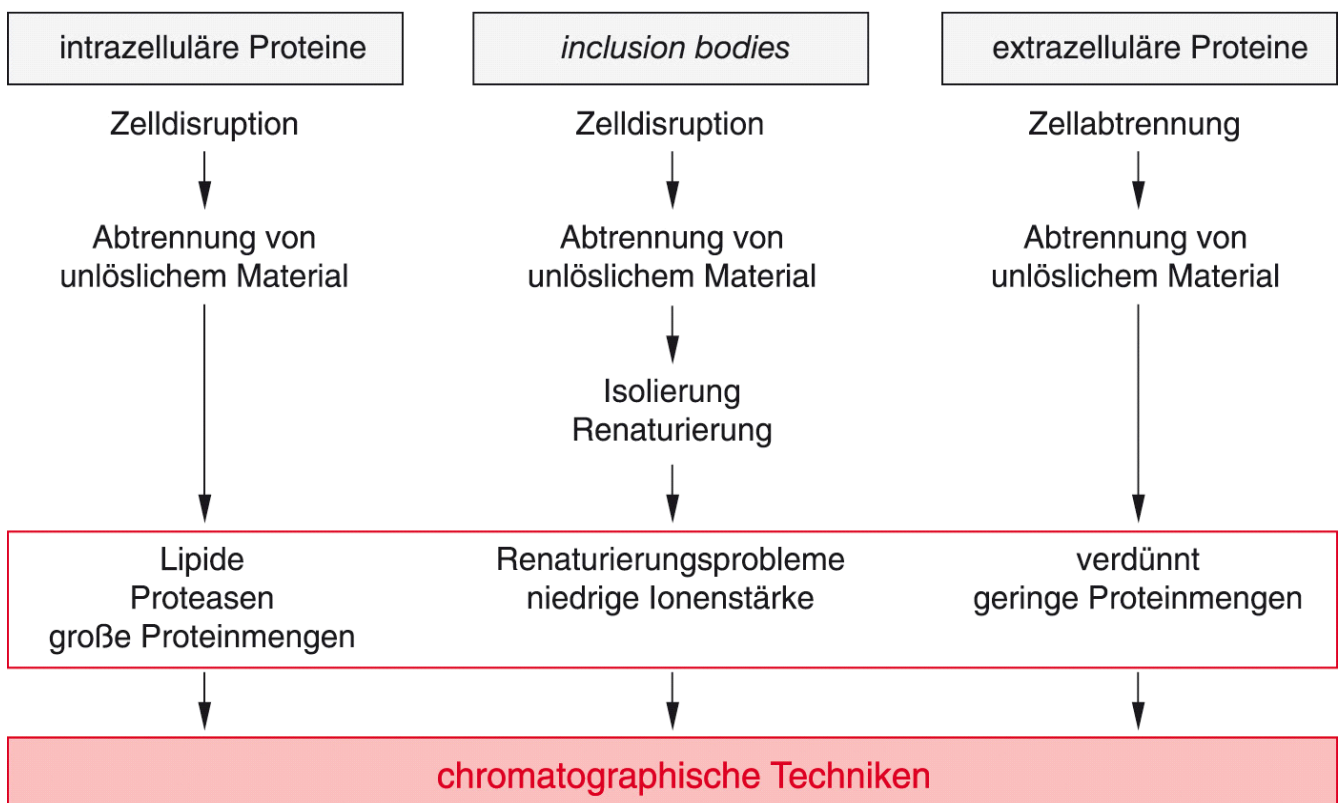


Aus Lottspeich/Engels, *Bioanalytik*, 2. Aufl., © 2006 Elsevier GmbH

- Chromatographie - hohe Auflösung für kleine Moleküle
- Elektrophorese - hohe Auflösung für große Moleküle
- Zentrifugation - hohe Auflösung für sehr große Moleküle und Organellen

# Proteinreinigung - Strategie

1. Isolierung der Proteine (z.B. aus Zellen, Gewebe, Organ)
2. Abtrennung nicht-proteinogener Bestandteile (Zentrifugation)
3. Fraktionierung der Proteine nach Größe, Ladung etc.
4. Hochauflösende Techniken
  - 4a. Chromatographie (eventuell mehrdimensional)
  - 4b. Elektrophorese



Aus Lottspeich/Engels, *Bioanalytik*, 2. Aufl., © 2006 Elsevier GmbH

# Homogenisierung - Zellaufschluss

## Homogenisierung

Zellverband zerstören möglichst ohne Zellen aufzubrechen

## Zellaufschluss

von Zelltyp abhängig

manche Zellen sehr empfindlich (z.B. Leukozyten, Säugerzellen)  
andere relativ stabil (Hefe, Bakterien, Pflanzenzellen)

- Scherkräfte
  - Pipette, durch Sieb pressen, Glaspistill
- Osmolyse (osmotische Lyse)
  - hypotonische Umgebung (z.B. dest. Wasser, Blutzellen)
  - Für Zellen ohne Zellwand
  - Sonst: Zellwände enzymatisch abbauen (Lysozym)
- Gefrier-Tau-Technik
- Trocknung (z.B. Mikroorganismen, Hefe)
  - getrocknete Substanz im Mörser mit Pistill zerreiben
- Detergenzien
- (Wassermischbare) organische Lösungsmittel
  - z.B. Aceton, Lipide werden extrahiert, Zellen entwässert
- Vibrationszelmühle (Schütteln mit Glasperlen)
- Zermahlen gefrorenen Materials
- Messerhomogenisator
- Ultraschall

# Isolierung

## Extraktion mit wässrigen Lösungen

Wasser (Puffer)

Säuren oder Basen (z.B. Trichloressigsäure, denaturierend)

mit Detergenzien

## Fällung (Präzipitation)

am isoelektrischen Punkt

durch organische Lösungsmittel (Ethanol, Aceton)

mit Neutralsalz (Aussalzen)

z.B. mit Ammoniumsulfat (>0,5 mol/L, mehrere Stunden)

Proteine meist nativ gefällt (Aktivität bleibt erhalten)

## Hofmeister-Reihe

- antichaotrope Salze besonders gute und schonende Fällungsmittel
- chaotrope Salze: halten Proteine in Lösung



Kationen:	$\text{NH}_4^+$	$\text{K}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{C}(\text{NH}_2)_3^+$	(Guanidin)				
Anionen:	$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{CH}_3\text{COO}^-$	$\text{Cl}^-$	$\text{Br}^-$	$\text{NO}_2^-$	$\text{ClO}_3^-$	$\text{I}^-$	$\text{SCN}^-$

Aus Lottspeich/Engels, *Bioanalytik*, 2. Aufl., © 2006 Elsevier GmbH

## Enzymaktivität

- bei nativen Aufarbeitungstechniken bleiben viele Enzyme aktiv
- da Präparationen mehrere Stunden bis Tage dauern, können viele Nebenreaktionen auftreten

### Beispiele

Proteasen (Endo- und Exoproteasen): spalten Proteine

Phosphatasen: spalten Phosphatgruppen ab

Daher

- niedrige Temperaturen
- schnelle Aufarbeitung
- Inhibitoren zusetzen

Substanz	Konzentration	Inhibitor von
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	0,1 - 1 mmol/L	Serinproteasen
Aprotinin	0,01 - 0,3 µmol/L	Serinproteasen
ε-Amino-n-capronsäure	2 - 5 mmol/L	Serinproteasen
Antipain	70 µmol/L	Cysteinproteasen
Leupeptin	1 µmol/L	Cysteinproteasen
Pepstatin A	1 µmol/L	Aspartatproteasen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	0,5 - 1,5 µmol/L	Metalloproteasen

# Methoden der Fraktionierung

## Zentrifugation

Zellen und Zellorganellen

Präzipitate

## Dialyse

Zur Entsalzung

Abtrennung "kleiner" Moleküle

auch als Mikrodialyse

## Ultrafiltration

Membran mit verschiedenen großen Poren

mittels Zentrifugation, Druck, Vakuum

## Diafiltration

Ultrafiltration mit konstantem Volumen

# Proteinbestimmung

## Einwaage

nach Gefriertrocknung oder Hitzetrocknung möglich  
aber großer Fehler, nicht für kleine Mengen geeignet  
Problem: Verunreinigungen

## Aminosäureanalyse

sehr genau (Fehler <5%)  
auch Aussage zur Racemisierung möglich  
Nachteile: hoher Aufwand, relativ teuer  
Problem: Verunreinigungen

## UV-Absorption

möglich, aber nur für bekannte Proteine (Standard!)  
Nachteile: geringe Empfindlichkeit, relativ ungenau  
Problem: Verunreinigungen

## Kolorimetrische Bestimmung

Farbstoff einbringen  
Komplexbildung  
Reduktion  
chemische Bindung (z.B. Thiolgruppe, Fluoreszenz)  
von Aminosäurezusammensetzung und Sequenz abhängig

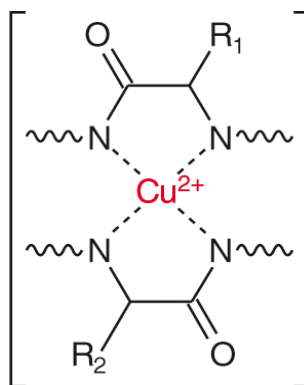
## Färbetests - Proteinquantifizierung

- auf bestimmten Konzentrationsbereich anwendbar
- Absorption gegen Konzentration auftragen
- dynamischer Bereich
- Quantifizierung über Standardverdünnungsreihe
- Mehrfachbestimmung durchführen

### Biuret-Assay

Komplexbildung mit Kupfersulfat im basisch-wässrigen System

- relativ unempfindlich (1-10 µg/mL)



- Absorption bei 550 nm messen
- Signal korreliert mit Anzahl der Peptidbindungen
- Tyrosin verstärkt Signal
- Störend: Redoxreagenzien
- Tolerabel: Detergenzien wie SDS

~ : Polypeptidkette

Aus Lottspeich/Engels, Bioanalytik, 2. Aufl., © 2006 Elsevier GmbH

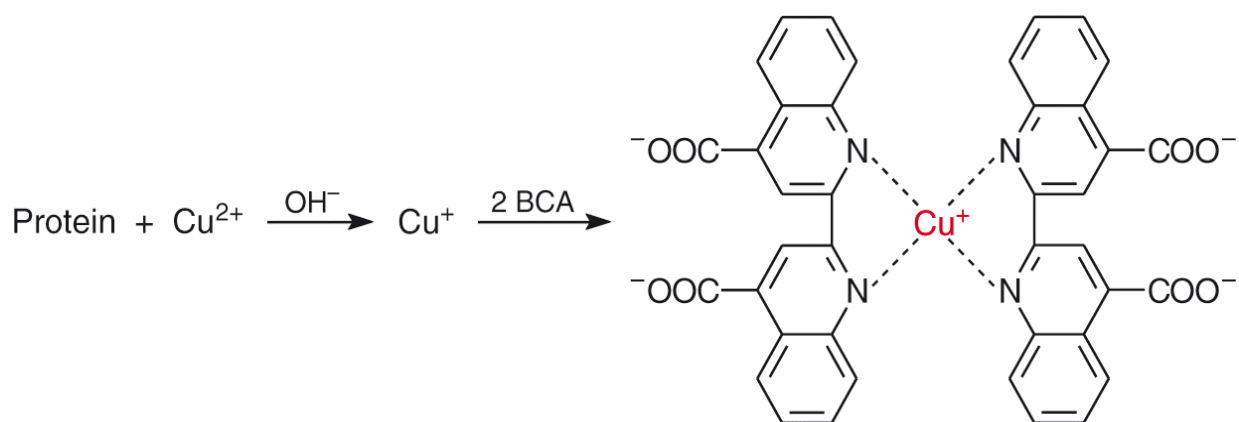
### Lowry-Assay

Kombination des Biuret-Assays mit Folin-Cicalteau-Phenol-Reagenz

- Bildung des obigen Protein-Kupfer-Komplexes
- Reduktion von Molybdat oder Wolframat durch Tyrosin, Tryptophan (Cystein, Histidin)
- $\text{Cu}^{2+}$  wird wahrscheinlich zu  $\text{Cu}^+$  reduziert
- tiefblaue Farbe (650 nm), sehr empfindlich (0,1-1 µg/mL)

## Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)

- kombiniert Biuret-Assay mit Bicinchoninsäure (BCA)
- Reaktion wie bei Biuret-Assay
- Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$
- BCA- $\text{Cu}^+$ -Komplex
- Sensitivität: 0,1-1  $\mu\text{g/mL}$  ( $\lambda=562 \text{ nm}$ )



Aus Lottspeich/Engels, *Bioanalytik*, 2. Aufl., © 2006 Elsevier GmbH

## Bradford-Assay

- Saurer Farbstoff (Coomassie-Brillantblau)
- In Gegenwart von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm
- Unterschiedliche Proteine ergeben unterschiedlich intensiv gefärbte Komplexe