

# Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>1 Das tägliche Brot</b>                     | 3  |
| 1.1 Puffer herstellen                          | 3  |
| 1.2 Protein bestimmen                          | 4  |
| 1.2.1 BCA-Test                                 | 5  |
| 1.2.2 Bradford-Test                            | 5  |
| 1.2.3 Lowry-Test                               | 5  |
| 1.2.4 Ferner liefern                           | 6  |
| 1.3 Gele                                       | 6  |
| 1.3.1 SDS-Gele                                 | 6  |
| 1.3.2 Native Gele                              | 9  |
| 1.3.3 Zweidimensionale Elektrophorese          | 10 |
| 1.4 Gele färben                                | 12 |
| 1.4.1 Fixieren                                 | 12 |
| 1.4.2 Färben                                   | 12 |
| 1.4.3 Trocknen                                 | 15 |
| 1.5 Fällen und Konzentrieren                   | 16 |
| 1.5.1 Denaturierende Fällung                   | 16 |
| 1.5.2 Native Fällung                           | 16 |
| 1.5.3 Konzentrieren                            | 17 |
| 1.6 Blotten                                    | 18 |
| 1.6.1 Proteinfärbung auf Blots                 | 20 |
| 1.6.2 Blocken                                  | 21 |
| 1.6.3 Immunfärbung                             | 22 |
| 1.6.4 $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung                | 24 |
| 1.6.5 Ligandenfärbung                          | 24 |
| 1.7 Autoradiographie                           | 25 |
| <b>2 Ligandenbindung</b>                       | 29 |
| 2.1 Radioaktive Ligandenmarkierung             | 30 |
| 2.1.1 Iodierung von Peptiden und Proteinen     | 30 |
| 2.1.1.1 The day after                          | 33 |
| 2.1.2 Iodierung von Molekülen mit niedrigem MG | 34 |
| 2.1.3 Isolierung einzelner iodierter Spezies   | 34 |
| 2.1.4 Vor- und Nachteile des Iodierens         | 35 |
| 2.1.5 Tritiiieren                              | 37 |
| 2.2 Bindung                                    | 38 |
| 2.2.1 Isolierung von Membranen                 | 38 |
| 2.2.2 Bindungstest                             | 40 |
| 2.2.3 Bindungstests mit Membranen              | 41 |
| 2.2.4 Entwicklung von Membranbindungstests     | 44 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.2.5    | Bindungstests mit löslichen Proteinen            | 45        |
| 2.2.6    | Keine Bindung, was tun?                          | 51        |
| 2.3      | Auswertung von Bindungsdaten                     | 53        |
| 2.3.1    | Die Bindung ist im Gleichgewicht                 | 53        |
| 2.3.1.1  | Bestimmung von $K_D$ und $B_{\max}$              | 55        |
| 2.3.1.2  | Bindungshemmung                                  | 60        |
| 2.3.1.3  | Irrtümer   | 61        |
| 2.3.1.4  | Hügeliges  | 63        |
| 2.3.2    | Kinetik  | 67        |
| 2.4      | Vernetzen von Liganden                           | 69        |
| 2.4.1    | Dreikomponentenvernetzung (3K-Vernetzung)        | 70        |
| 2.4.1.1  | Homofunktionelle Vernetzer                       | 72        |
| 2.4.1.2  | Heterofunktionelle Vernetzer                     | 72        |
| 2.4.1.3  | 3K-Vernetzungsexperimente                        | 74        |
| 2.4.2    | Photoaffinitätsvernetzung                        | 74        |
| 2.4.2.1  | Herstellung eines Photoaffinitätsliganden        | 74        |
| 2.4.2.2  | Zur Strategie der Photoaffinitätsvernetzung      | 75        |
| 2.4.2.3  | Photoaffinitäts-Vernetzungsexperimente           | 76        |
| 2.4.3    | Kontrollen bei Vernetzungsversuchen              | 76        |
| 2.5      | Sinniges   | 77        |
| <b>3</b> | <b>Membranproteine solubilisieren</b>            | <b>81</b> |
| 3.1      | Seifen   | 81        |
| 3.1.1    | Saubere Begriffe                                 | 81        |
| 3.1.2    | Vom Umgang mit Seifen                            | 83        |
| 3.2      | Solubilisieren                                   | 86        |
| 3.2.1    | Solubilisierungskriterien                        | 91        |
| 3.2.2    | Physikalische Parameter solubilisierter Proteine | 92        |
| <b>4</b> | <b>Proteinnachweis durch Funktionsmessung</b>    | <b>94</b> |
| 4.1      | Translokatoren                                   | 94        |
| 4.1.1    | Liposomen  | 95        |
| 4.1.2    | Proteoliposomen                                  | 97        |
| 4.2      | Rekonstitution                                   | 98        |
| 4.2.1    | Rekonstitution aus einer Lösung                  | 98        |
| 4.2.2    | Rekonstitution in vorgefertigte Liposomen        | 100       |
| 4.3      | Fluxtest   | 100       |
| 4.3.1    | Influxtest                                       | 102       |
| 4.3.2    | Effluxtest                                       | 105       |
| 4.4      | Aufbauende Überlegungen                          | 106       |

|   |     |
|---|-----|
| <b>5 Säubern und Putzen</b>                             | 108 |
| 5.1 Putziges  | 108 |
| 5.2 Konventionelle Reinigungsmethoden                   | 111 |
| 5.2.1 Zur Säulentchnik                                  | 112 |
| 5.2.2 Reinigung nach Größenunterschieden                | 113 |
| 5.2.2.1 Gelfiltration                                   | 113 |
| 5.2.2.2 Präparative Gelelektrophorese                   | 115 |
| 5.2.3 Reinigung nach Ladungsunterschieden               | 116 |
| 5.2.3.1 Ammoniumsulfatfällung                           | 116 |
| 5.2.3.2 Ionenaustauscher                                | 116 |
| 5.2.3.3 Isoelektrische Fokussierung                     | 117 |
| 5.2.3.4 Chromatofokussierung                            | 120 |
| 5.2.3.5 Hydroxyapatit                                   | 122 |
| 5.2.4 Hydrophobe Chromatographie                        | 123 |
| 5.3 Affinitätschromatographie                           | 124 |
| 5.3.1 Lektinchromatographie                             | 124 |
| 5.3.2 Ligandenchromatographie                           | 126 |
| 5.3.2.1 Einführung                                      | 126 |
| 5.3.2.2 Die Rolle des Liganden                          | 128 |
| 5.3.2.3 Die Rolle der Matrix                            | 128 |
| 5.3.2.4 Wie geht man vor?                               | 130 |
| 5.4 Die Reinheitsprobe                                  | 132 |
| 5.5 Ausschlagen   | 133 |
| <b>6 Antikörper</b>                                     | 136 |
| 6.1 Herstellung von polyklonalen Antikörpern            | 140 |
| 6.1.1 Antigen   | 140 |
| 6.1.2 Adjuvans  | 141 |
| 6.1.3 Injektion und Serumgewinnung                      | 142 |
| 6.1.4 Reinigung von Antikörpern                         | 143 |
| 6.2 Immunpräzipitation                                  | 144 |
| 6.2.1 Immunpräzipitation mit immobilisiertem Protein A  | 145 |
| 6.2.2 Immunpräzipitation mit immobilisiertem Antikörper | 146 |
| 6.3 Immunoaffinitätschromatographie                     | 146 |
| 6.4 Antikörper gegen ungereinigte Proteine              | 147 |
| 6.5 Immunologische Nachweistechiken                     | 149 |
| <b>7 Mikrosequenzierung</b>                             | 154 |
| 7.1 Zubereiten des Proteins                             | 155 |
| 7.2 Blockierte N-Termini                                | 156 |
| 7.3 Spaltung des Proteins in Peptide                    | 156 |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 7.3.1     | Proteasenverdau  | 157        |
| 7.3.2     | Bromcyan- und Säurespaltung                            | 158        |
| 7.4       | Carboxyterminale Sequenzierung                         | 158        |
| 7.5       | Massig Sequenzieren                                    | 159        |
| 7.5.1     | Massenspektrometrie                                    | 159        |
| 7.5.2     | Probenvorbereitung                                     | 160        |
| 7.5.3     | Leitersequenzierung von Peptiden                       | 163        |
| 7.5.4     | Die Möglichkeiten des MALDI-TOF-Massenspektrometers    | 168        |
| <b>8</b>  | <b>Untereinheiten</b>                                  | <b>170</b> |
| 8.1       | Stöchiometrie & Merigkeit (S&M)                        | 170        |
| 8.1.1     | Über die Schwierigkeiten bei Stöchiometriebestimmungen | 170        |
| 8.1.2     | S&M mit Röntgenstrukturanalyse                         | 171        |
| 8.1.3     | S&M mit Hybridisierungsexperimenten                    | 171        |
| 8.1.4     | S&M mit Vernetzungsexperimenten                        | 173        |
| 8.1.4.1   | Vernetzung von Homooligomeren                          | 174        |
| 8.1.4.2   | Struktur von Homooligomeren                            | 177        |
| 8.1.4.3   | Vernetzung von Heterooligomeren                        | 177        |
| 8.1.5     | S&M mit Aminosäureanalysen oder Antikörpern            | 179        |
| 8.2       | Was unsre Welt im Innersten zusammenhält               | 182        |
| <b>9</b>  | <b>Glykoproteine</b>                                   | <b>184</b> |
| 9.1       | Wie, Wo und Wozu werden Proteine glykosyliert?         | 184        |
| 9.2       | Nachweis von Glykoproteinen in Gelen                   | 185        |
| 9.3       | Nachweis von Glykoproteinen auf Blots                  | 185        |
| 9.3.1     | Nichtselektive Glykoproteinfärbung                     | 185        |
| 9.3.2     | Selektive (Lektin-) Färbung                            | 187        |
| 9.4       | Deglykosylierung                                       | 190        |
| 9.4.1     | Glykosylierungshemmer                                  | 190        |
| 9.4.2     | Endoglykosidasen                                       | 190        |
| 9.4.3     | Chemische Deglykosylierung                             | 195        |
| 9.5       | Die Zuckerketten                                       | 196        |
| 9.5.1     | Monosaccharidzusammensetzung                           | 196        |
| 9.5.2     | Aufbau und Sequenz                                     | 196        |
| 9.5.2.1   | Ablösung der Oligosaccharide von Glykoproteinen        | 197        |
| 9.5.2.2   | Markierung von Oligosacchariden                        | 197        |
| 9.5.2.3   | Trennung von Oligosacchariden                          | 198        |
| 9.5.2.4   | Sequenzierung von Oligosacchariden                     | 199        |
| <b>10</b> | <b>Der Schatz im Silbersee</b>                         | <b>202</b> |
| 10.1      | Vom Paper  | 202        |
| 10.2      | Vom Schreiben eines Papers                             | 203        |

---

|           |                                       |            |
|-----------|---------------------------------------|------------|
| <b>11</b> | <b>Durch die Wüste</b>                | <b>205</b> |
| <b>12</b> | <b>Wer, was, wo?</b>                  | <b>207</b> |
| 12.1      | Lieferanten                           | 207        |
| 12.2      | Lieferanten gegliedert nach Produkten | 211        |
|           | <b>Das Letzte</b>                     | <b>212</b> |
|           | <b>Register</b>                       | <b>213</b> |