

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	XV
1 Was will die Proteinanalytik? Eine Einführung (M. Holtzhauer).....	1
2 Chromatographie (M. Holtzhauer)	7
2.1 Gelfiltration.....	12
2.2 Ionenaustauschchromatographie (IEC)	20
2.3 Hydrophobe Chromatographie und Umkehrphasen- Chromatographie	23
2.4 Metallchelat-, kovalente und thiophile Chromatographie	28
2.5 Affinitätschromatographie	30
2.6 Hochleistungs-Flüssigchromatographie.....	42
Literatur.....	45
3 Aminosäure-Sequenzanalyse und Massenspektrometrie (M. Holtzhauer und R. Kraft)	46
3.1 N-terminale Aminosäure-Sequenzanalyse	47
3.2 C-terminale Aminosäure-Sequenzanalyse	56
3.3 Peptidmapping	59
3.4 Massenspektrometrie	60
Literatur	69
4 Optische Spektroskopie (H. Welfle)	70
4.1 Physikalische Grundlagen	72
4.1.1 Welle-Teilchen-Dualismus des Lichtes	72
4.1.1.1 Licht als elektromagnetische Welle	72
4.1.1.2 Korpuskel-Charakter des Lichtes	73
4.1.2 Anregung von elektronischen Übergängen, Schwin- gungen und Rotationen	74
4.1.2.1 Anregungsbedingungen	75
4.1.2.2 Elektronenanregung	77
4.1.2.3 Anregung von Schwingungen	81
4.1.3 Absorptionsgesetz	84

4.2	Spektrometer	86
4.3	Absorptionsspektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Bereich des Lichtes	89
4.3.1	Einleitung	89
4.3.2	Absorptionsspektren von Proteinen im ultravioletten und sichtbaren Bereich des Lichtes	90
4.3.3	Differenzspektroskopie	95
4.3.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen aus der Absorption bei 280 nm	99
4.3.5	Lineardichroismus	101
4.4	Circulardichroismus (CD)	103
4.4.1	Grundlagen	103
4.4.1.1	Polarisation des Lichtes	104
4.4.1.2	Optische Rotationsdispersion und Circulardichroismus	107
4.4.2	Aufbau eines Circulardichrographen	111
4.4.3	CD-Spektren von Proteinen	113
4.4.3.1	Analyse der Sekundärstruktur	113
4.4.3.2	Analyse von Konformationsänderungen	120
4.5	Fluoreszenz-Spektroskopie	123
4.5.1	Grundlagen	123
4.5.1.1	Absorption und Emission	123
4.5.1.2	Quantenausbeute	124
4.5.1.3	Strahlungslose Desaktivierung	124
4.5.1.4	Fluoreszenz-Lebensdauer τ_f und Lebensdauer τ des angeregten Zustandes	127
4.5.2	Bestimmung von Fluorophor-Abständen aus dem Energietransfer (FÖRSTER-Transfer)	128
4.5.3	Fluoreszenz-Polarisation	131
4.5.4	Zeitaufgelöste Fluoreszenz	133
4.5.5	Fluoreszenzspektren von Proteinen	134
4.5.6	Fluoreszenzsonden in der Proteinanalytik	140
4.6	Infrarot-spektroskopische Untersuchungen an Proteinen	143
4.6.1	Einleitung	143
4.6.2	Amidschwingungen und Proteinkonformation	144
4.6.3	FOURIER-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektrometer	146
4.6.4	Messung der IR-Spektren von Proteinen	149
4.6.5	Auswertung der IR-Spektren von Proteinen	152
4.7	RAMAN-Spektroskopie	158
4.7.1	Einleitung	158
4.7.2	Meßtechnik	161
4.7.3	RAMAN-Spektren von Proteinen	164
4.7.4	Resonanz-RAMAN (RR)-Spektroskopie von Proteinen ..	167
4.7.5	FOURIER-Transform-RAMAN-Spektroskopie im nahen Infrarot-Bereich	169

4.7.6	Oberflächenverstärkte RAMAN-Spektroskopie (SERS und SERRS)	169
Literatur		170
5	NMR-Spektroskopie – Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen in Lösung	
(E. Kleinpeter)		171
5.1	Physikalische und methodische Grundlagen	171
5.2	Das NMR-Spektrum	175
5.2.1	Die Chemische Verschiebung	175
5.2.2	Kopplungskonstante J	178
5.2.3	Integrale Signalintensität	184
5.2.4	Linienbreite	186
5.2.5	Relaxationszeiten T_1 und T_2	186
5.2.6	Kern (Nuclear)-OVERHAUSER-Effekt (NOE)	187
5.3	Informationen aus NMR-Parametern zur Peptid- und Proteinstruktur	189
5.4	Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie	192
5.5	Zuordnungsstrategien für Peptid- und Proteinstrukturen mittels mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie und Molecular Modelling	198
Literatur		201
6	ESR-Spektroskopie - eine Analysenmethode für paramagnetische Zentren in Proteinen	
(G. Laßmann)		202
6.1	Einleitung	202
6.2	Grundlagen der ESR	203
6.2.1	Prinzip der ESR	203
6.2.2	ESR-Spektrenparameter	204
6.2.2.1	g-Faktor	204
6.2.2.2	Hyperfeinstruktur	205
6.2.2.3	Linienbreiten (Relaxationszeiten)	206
6.2.2.4	Intensität	207
6.2.3	ESR-Spektrometer (Prinzipieller Aufbau)	207
6.2.3.1	Probentemperierung und Küvettenform (X-Band-ESR)	209
6.2.4	Spezialtechniken der ESR	209
6.2.4.1	Verbesserung der spektralen Auflösung	210
6.2.4.2	Techniken zur Analyse kurzlebiger Radikale	211
6.2.4.3	Räumliche Auflösung (Imaging)	213
6.3	Paramagnetische Zentren in Proteinen	214
6.3.1	Metallkomplexe im aktiven Zentrum von Enzymen	214
6.3.2	Natürliche Radikale und Enzymfunktion	216
6.3.2.1	Proteingebundene Aminosäureradikale	216
6.3.2.2	Radikale bei Enzymreaktionen (Redoxenzyme)	224

6.3.3	Radikale als Defekte in bestrahlten Proteinen	225
6.3.4	Radikalische Spinsonden – Konformationsdynamik von Proteinen	225
6.3.4.1	Prinzip der Spinmarkierung	226
6.3.4.2	Kovalente Proteinmarkierung	227
6.3.4.3	Nichtkovalente Proteinmarkierung	228
6.3.4.4	Markierte Effektormoleküle	228
Literatur		228
7	Lichtstreuung und Sedimentationsanalyse	
(J. Behlke)		230
7.1	Einleitung	230
7.2	Lichtstreuung	230
7.2.1	Grundlagen der klassischen Lichtstreuung	231
7.3	Dynamische Lichtstreuung	235
7.3.1	Grundlagen der dynamischen Lichtstreuung	235
7.4	Sedimentationsverhalten von Proteinen	237
7.4.1	Experimentelle Bestimmung der Sedimentations- koeffizienten mit der analytischen Ultrazentrifuge	239
7.4.2	Aktive Enzymsedimentation	244
7.4.3	Nachweis einer molekularen Heterogenität	245
7.4.4	s-M-Beziehung	249
7.4.5	Flotation	249
7.5	Diffusion	251
7.5.1	Experimentelle Bestimmung der Diffusionskoeffizienten	253
7.5.1.1	Analyse integraler Konzentrationsverteilungskurven ..	254
7.5.1.2	Analyse differentieller Konzentrations- verteilungskurven	254
7.6	Das partielle spezifische Volumen	255
7.6.1	Wägemethoden	255
7.6.2	Schwingungsmethoden	256
7.6.3	Zentrifugationsmethoden	256
7.6.4	Rechnerische Bestimmung	256
7.7	Trennleistung der analytischen Ultrazentrifugen	257
7.8	Sedimentationsgleichgewichts-Experimente	258
7.8.1	Technik des Sedimentationsgleichgewichts- Experiments	262
7.8.2	Auswertung von Sedimentationsexperimenten	265
7.9	Berechnung weiterer Molekülparameter aus den Primärdaten ..	266
7.9.1	Molekülgestalt	266
7.9.2	Das Molekülvolumen	267
7.9.3	Der Virialkoeffizient	268
7.9.4	Konformationsänderungen	269
7.9.5	Assoziationsgleichgewichte	270
Literatur		275

8 Thermodynamische Untersuchungen an Proteinen	
(W. Pfeil)	276
8.1 Grundgleichungen	276
8.2 Kalorimetrie	280
8.2.1 Mischungs- und Titrationskalorimeter	280
8.2.2 Scanning-Kalorimetrie	285
8.3 Ligandenbindung	292
8.4 Proteinfaltung und Proteinstabilität	301
8.5 Weitere analytische Anwendungen thermodynamischer Methoden	307
8.5.1 Der Enzymthermistor	307
8.5.2 Die kalorimetrische Reinheitsanalyse von Lipiden	308
8.5.3 Kalorimetrie an lebenden Mikroorganismen	309
Literatur	310
9 Bioinformatik: Proteinsequenzen und Sekundärstruktur-Vorhersagen	
(K. Rohde)	311
9.1 Verfahren von CHOU und FASMAN	312
9.2 Die GOR-Methode	314
9.3 Die SIMPA-Methode von GARNIER und LEVIN	315
9.4 Die Verfahren von LIM sowie von FINKELSTEIN und PTITSYN	316
9.5 Grenzen einer Generation von Vorhersageverfahren	316
9.6 Datenbanken und Forschungsnetze	318
9.7 Ähnlichkeit von Sequenzen und Alignments	322
9.8 Strukturvorhersage durch Sequenzhomologie	324
9.9 Die Methode von BENNER und GERLOFF	326
9.10 Das PHD-Verfahren von ROST und SANDER	327
9.11 Vorhersagen über die Sekundärstruktur hinaus	331
Literatur	333
10 Markierungsmethoden	
(M. Holtzhauer)	334
10.1 Kovalente Markierung	335
10.1.1 Radioaktive Markierung	336
10.1.2 Nichtradioaktive Markierung	341
10.1.2.1 Das Biotin-(Strept-)Avidin-System	343
10.1.2.2 Markierungen mit Haptenen	343
10.1.2.3 Markierungen mit Fluoreszenz- und Spinmarkern	345
10.1.2.4 Affinitätsmarkierung	347
10.1.2.5 Enzym-Konjugate	348
10.1.2.6 Quervernetzung von Proteinen (cross-linking)	352
10.2 Adsorptive und biospezifische, nichtkovalente Markierung	354
Literatur	355

11 Elektrophoretische Techniken

(M. Holtzhauer)	356
11.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	357
11.1.1 SDS-PAGE	359
11.1.2 Nichtdenaturierende PAGE und Affinitäts- elektrophorese	363
11.2 Agarose-Gelelektrophorese und Immunelektrophorese	365
11.3 Isoelektrische Fokussierung und zweidimensionale Elektrophorese	367
11.3.1 Isoelektrische Fokussierung	367
11.3.2 Zweidimensionale Elektrophorese	368
11.4 Nachweisverfahren in der Elektrophorese	369
11.4.1 Färbemethoden	369
11.4.2 Autoradiographie und Chemolumineszenz	372
11.4.3 Zymogramme	373
11.5 Blottingtechniken	373
11.6 Kapillarelektrophorese	376
Literatur	378

12 Immunchemie

(M. Holtzhauer)	379
12.1 Einleitung, Klassifizierung und Aufbau von Antikörpern	379
12.2 Quantitative Proteinbestimmungen	386
12.3 Antikörpergewinnung	389
12.3.1 Immunisierung	389
12.3.2 Polyklonale Antikörper	391
12.3.3 Monoklonale Antikörper	395
12.3.4 Phagen-Display-Technik	397
12.4 Antikörper-Reinigung und -Fragmentierung	399
12.5 Bispezifische Antikörper	402
12.6 Immunoblotting-Techniken	403
12.7 Immunoassays	405
12.7.1 Heterogene Immunoassays	408
12.7.2 Homogene Immunoassays	413
12.7.3 Immunosensoren	415
12.8 Epitopmapping	415
12.9 Immunaффinitätschromatographie und Immunpräzipitation	416
12.10 Katalytische Antikörper (Abzyme)	422
Literatur	425

13 Biochemische Methoden: Rezeptoren und Enzyme

(M. Holtzhauer)	426
13.1 Charakterisierung von Rezeptoren (Rezeptor-Bindungstests) ..	426
13.2 Bestimmung von Enzym-Parametern	438
Literatur	448