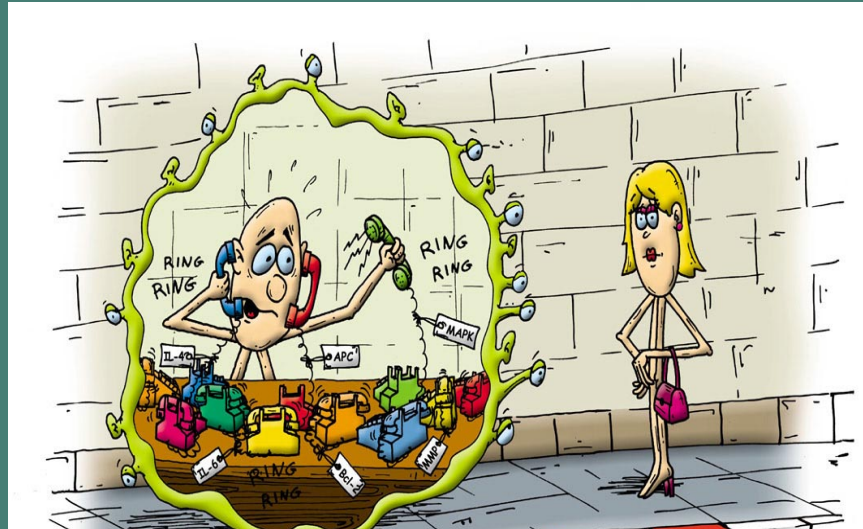


Molekulare Mechanismen der Signaltransduktion



03 - Nachweismethoden

Folien:

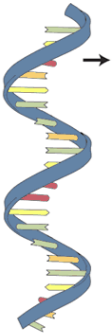
<http://tinyurl.com/Modul-MMS>

Nachweismethoden



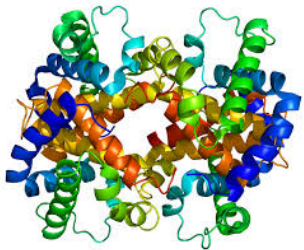
DNA

Southern Blot, Sequenzierung, NGS, PCR, Restriktion, CAPS, SSLP, DNaseI Verdau, CHIP, Y1H, histochemische Promotoranalysen,



RNA

Northern Blot, RT-PCR, RT-qPCR, Microarrays, RNAseq, *in situ* Hybridisierung, miRNA, lncRNA,



Protein

Western Blot, Immunoprecipitation, Lokalisation, Y2H, BIFC, Kristallstrukturanalyse, Enzymassays, structure-function analysis, proteomics

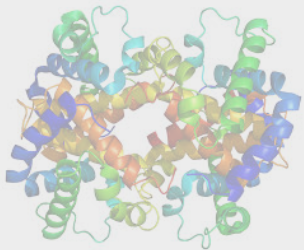
Nachweismethoden

DNA

Southern Blot, Sequenzierung, NGS, PCR, Restriktion, CAPS, SSLP, DNaseI Verdau, CHIP, Y1H, histochemische Promotoranalysen,

- Fragestellung/Ziel der Analyse
- technische + finanzielle Voraussetzungen
- Materialverfügbarkeit
- Zeit
-

ideale
(oder machbare)
Methode



protein

Western Blot, Immunoprecipitation, Lokalisation, Y2H, BIFC, Kristallstrukturanalyse, Enzymassays, structure-function analysis, proteomics

grundlegende Aspekte

Globale/unspezifische Nachweismethoden

- “omics”
 - ✓ genomics - Genomsequenzierungen (NGS)
 - ✓ transcriptomics - macroarrays, microarrays, RNAseq
 - ✓ proteomics - HPLC, UPLC, GC/MS
 - ✓ metabolomics - LC/MS, UPLC, GC/MS(MS), etc
- (Übersichts-)farbstoffe
-

grundlegende Aspekte

Globale/unspezifische Nachweismethoden

- “omics”
 - ✓ genomics - Genomsequenzierungen (NGS)
 - ✓ transcriptomics - macroarrays, microarrays, RNAseq
 - ✓ proteomics - HPLC, UPLC, GC/MS
 - ✓ metabolomics - LC/MS, UPLC, GC/MS(MS), etc
- (Übersichts-)farbstoffe
-

Spezifische Nachweismethoden

- PCR, Marker Nachweise (SSLP, CAPS, etc)
- Gen-spezifische Sequenzierung
- Antikörper-basierte Nachweise (z.B. Western Blot)
- Sonden-basierte Nachweise (z.B. Northern Blot)
- Interaktionsnachweise
- Reportergene + “tagging”
-

grundlegende Aspekte

Globale/unspezifische Nachweismethoden

- “omics”
 - ✓ genomics - Genomsequenzierungen (NGS)
 - ✓ transcriptomics - macroarrays, microarrays, RNAseq
 - ✓ proteomics - HPLC, UPLC, GC/MS
 - ✓ metabolomics - LC/MS, UPLC, GC/MS(MS), etc
- (Übersichts-)farbstoffe
-

Muster erkennen
→ Gengruppen
→ biol. Prozesse
einzelne Faktoren
mit starker Reaktion
(*candidate approaches*)

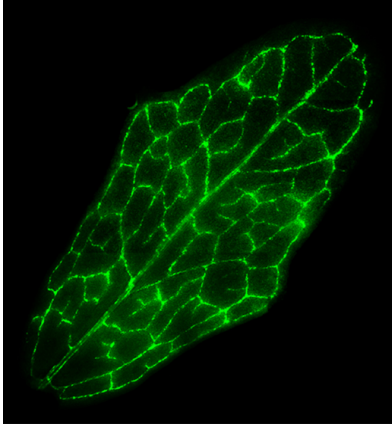
Spezifische Nachweismethoden

- PCR, Marker Nachweise (SSLP, CAPS, etc)
- Gen-spezifische Sequenzierung
- Antikörper-basierte Nachweise (z.B. Western Blot)
- Sonden-basierte Nachweise (z.B. Northern Blot)
- Interaktionsnachweise
- Reportergene + “tagging”
-

Analyse spezifischer
Komponenten
→ Sequenz/Mutation
→ Lokalisation
→ Quantifikation
→ Interaktion

Reportergene /-proteine

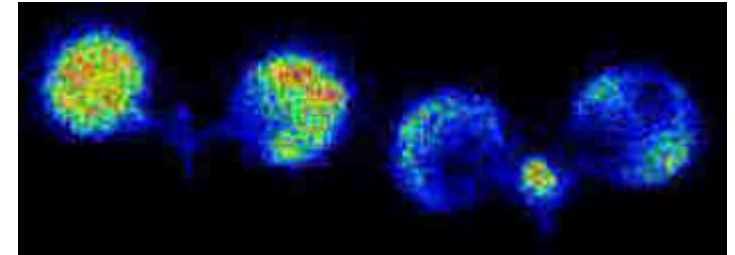
Welche (standard) Reporter gibt es?



GFP(-like) (Fluoreszenz)



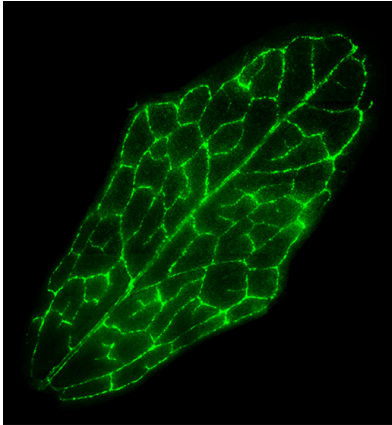
GUS (Farbkristalle)



Luciferase (Bioluminiszenz)

Reportergene /-proteine

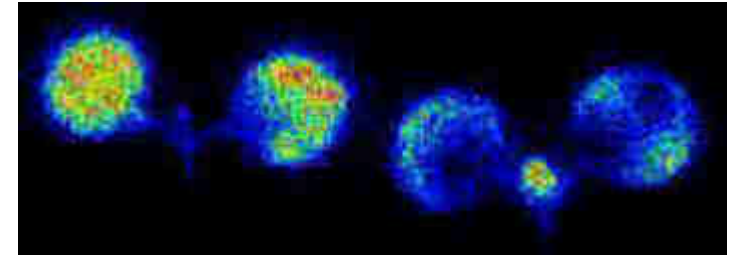
Welche (standard) Reporter gibt es?



GFP(-like) (Fluoreszenz)



GUS (Farbkristalle)
+ andere Enzyme

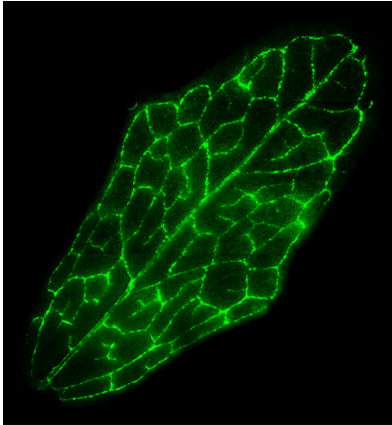


Luciferase (Biolumineszenz)



Reportergene /-proteine

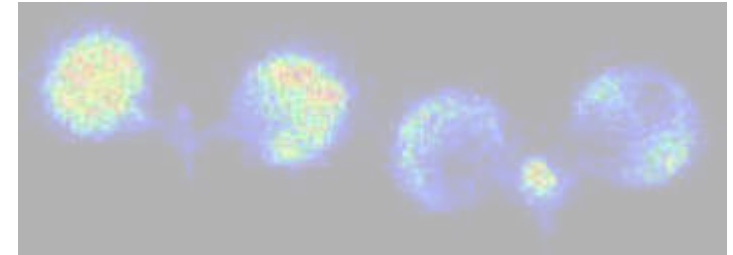
Welche (standard) Reporter gibt es?



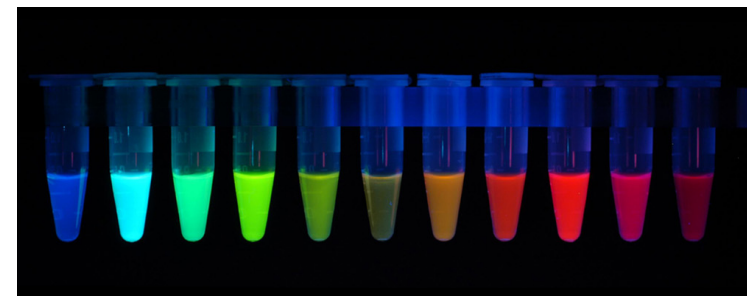
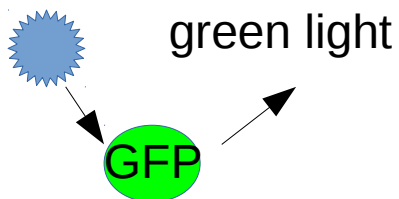
GFP(-like) (Fluoreszenz)



GUS (Farbkristalle)



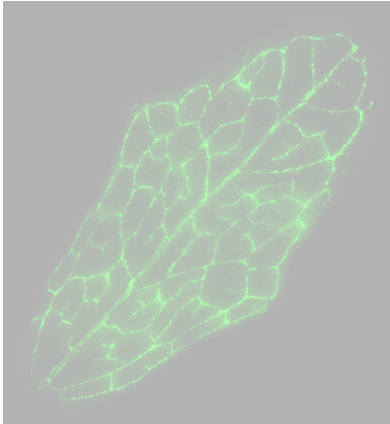
Luciferase (Biolumineszenz)



heute: große Farbauswahl!

Reportergene /-proteine

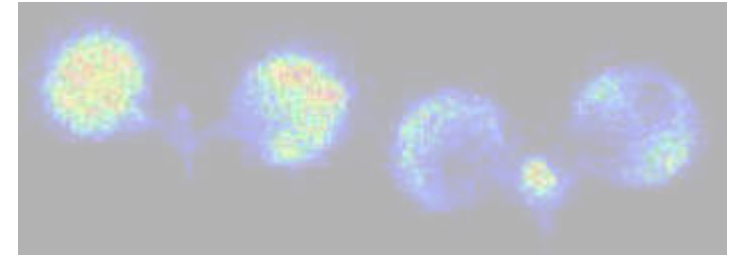
Welche (standard) Reporter gibt es?



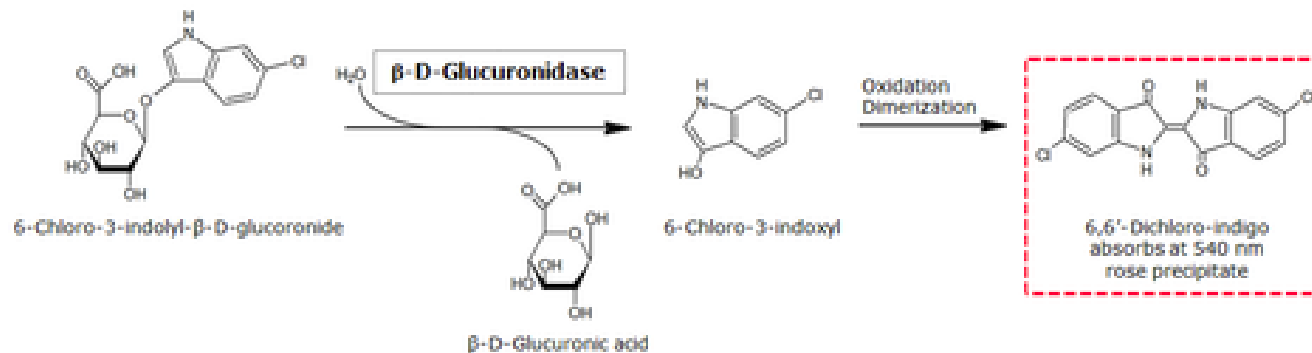
GFP(-like) (Fluoreszenz)



GUS (Farbkristalle)

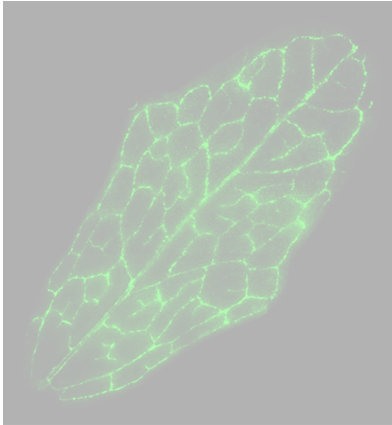


Luciferase (Bioluminiszenz)



Reportergene /-proteine

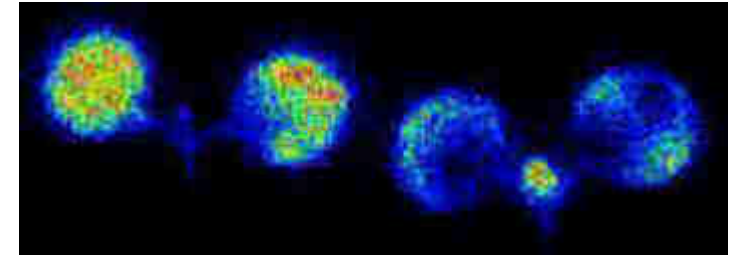
Welche (standard) Reporter gibt es?



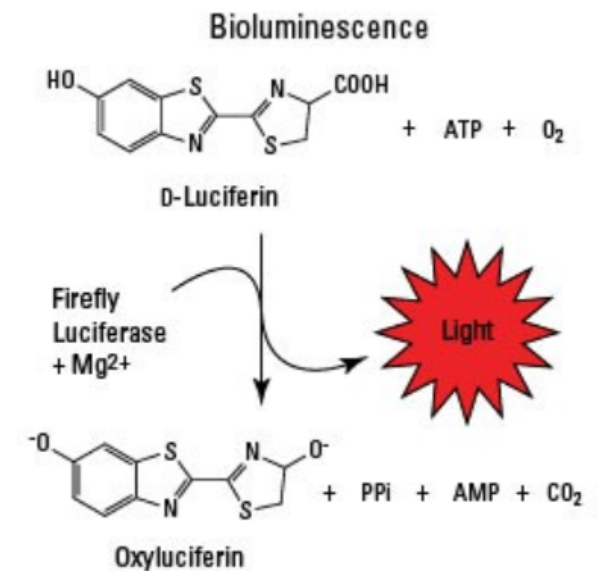
GFP(-like) (Fluoreszenz)



GUS (Farbkristalle)



Luciferase (Biolumineszenz)

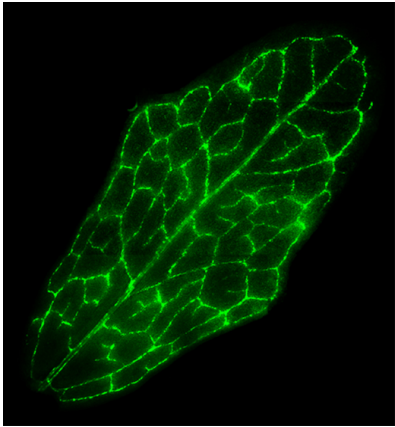


<http://www.ipb-halle.de/uploads/pics/Blatt-GFP.jpg>

<http://www.plantcell.org/content/suppl/2005/01/13/tpc.104.028449.DC1/028449SupplFig3.jpg>

<http://millar.bio.ed.ac.uk/images/s4supe.jpg>

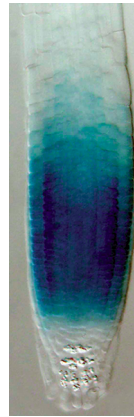
Vor- und Nachteile



GFP

- sensitiv → subzellulär
- nicht-invasiv
- Echtzeit Analyse
- “tag” rel. klein (238AS)

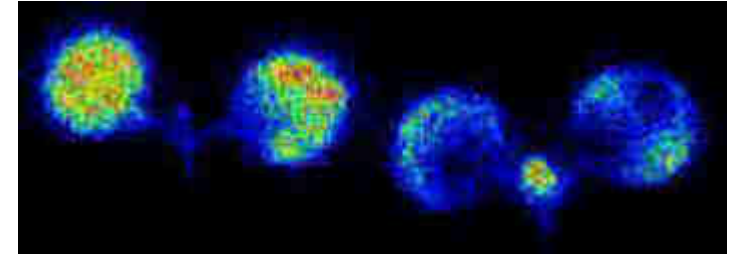
- qualitativer Nachweis
- aufwändig + Mikroskop
-



GUS

- schnell + einfach
- kein Equipment nötig
- “haltbar”

- qualitativer Nachweis
- invasiv
- “tag” groß (603 AS)



LUC

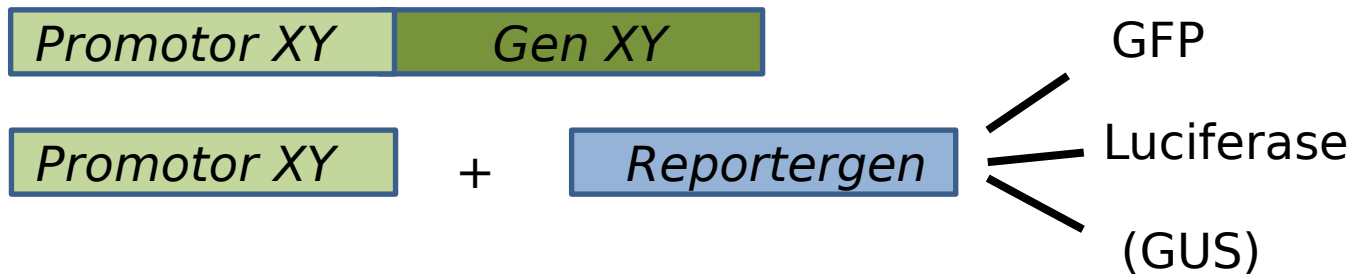
- sensitiv
- quantifizierbar
- nicht-invasiv
- Echtzeit Analyse
- untersch. Größen

- technisch aufwändig
- teuer
- “tag” teilw. groß (503 AS)

Nutzen von Reportergenen /-proteinen

→ Promotoranalysen
= transcriptional fusion

→ Protein-“Verfolgung”
= translational fusion

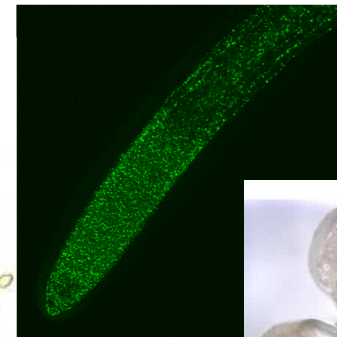


Aktivierung



Nachweis der mRNA

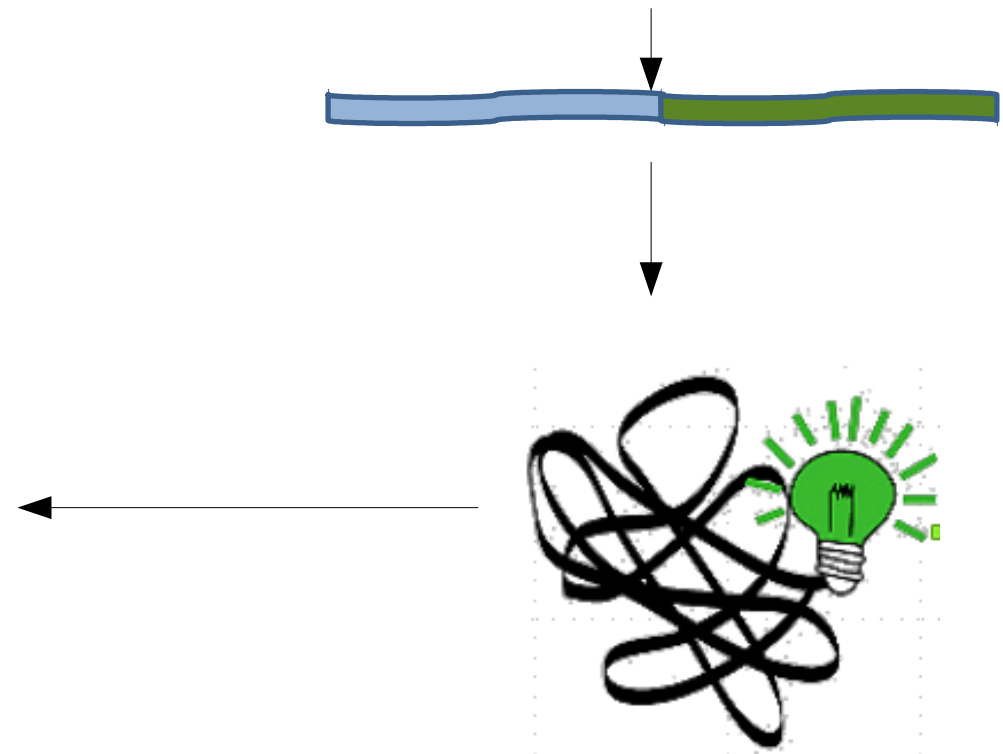
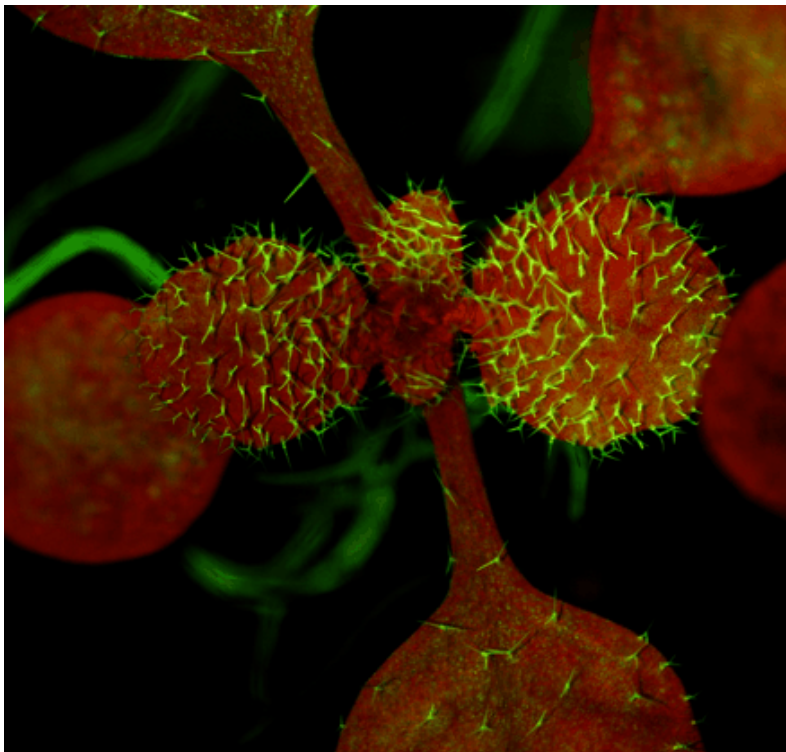
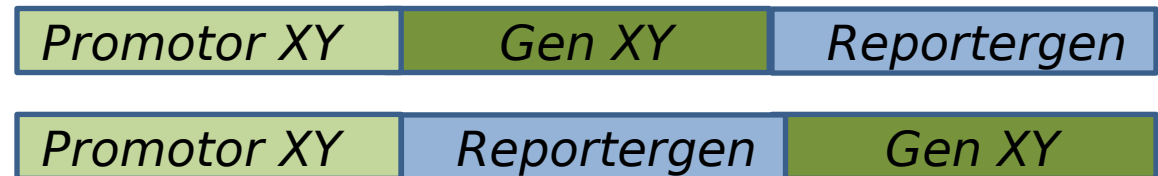
Nachweis der Proteinaktivität



Nutzen von Reportergenen /-proteinen

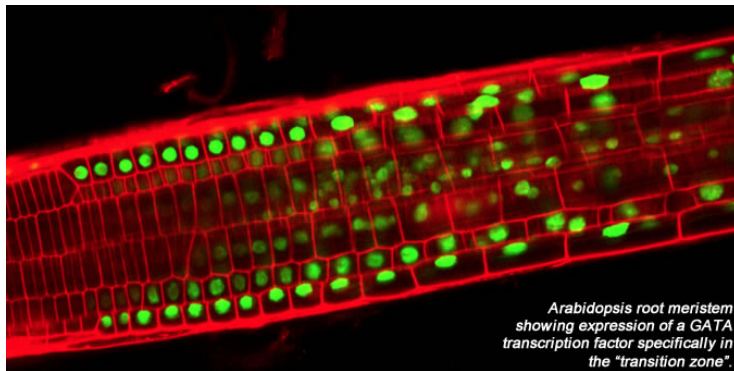
→ Promotoranalysen
= transcriptional fusion

→ Protein-“Verfolgung”
= translational fusion



type of fusion not visible in read out

→ Promotoranalysen
= transcriptional fusion



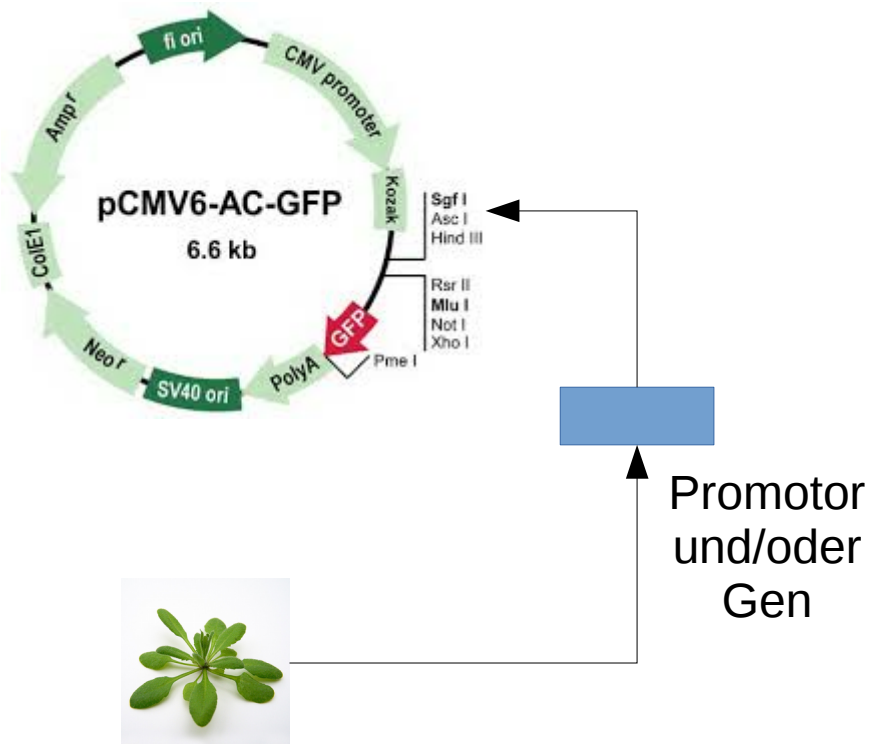
→ Protein-“Verfolgung”
= translational fusion



Arabidopsis root tip, protein localisation with fluorescence tagging. Translational fusion pSHR::SHR::GFP (Laser Scanning Confocal Microscopy) - [NATURE, 413, 307-311, (2001)]

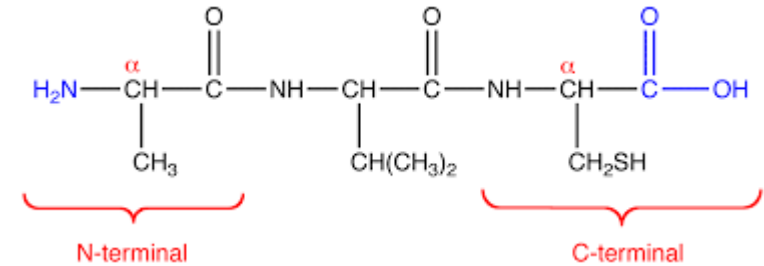
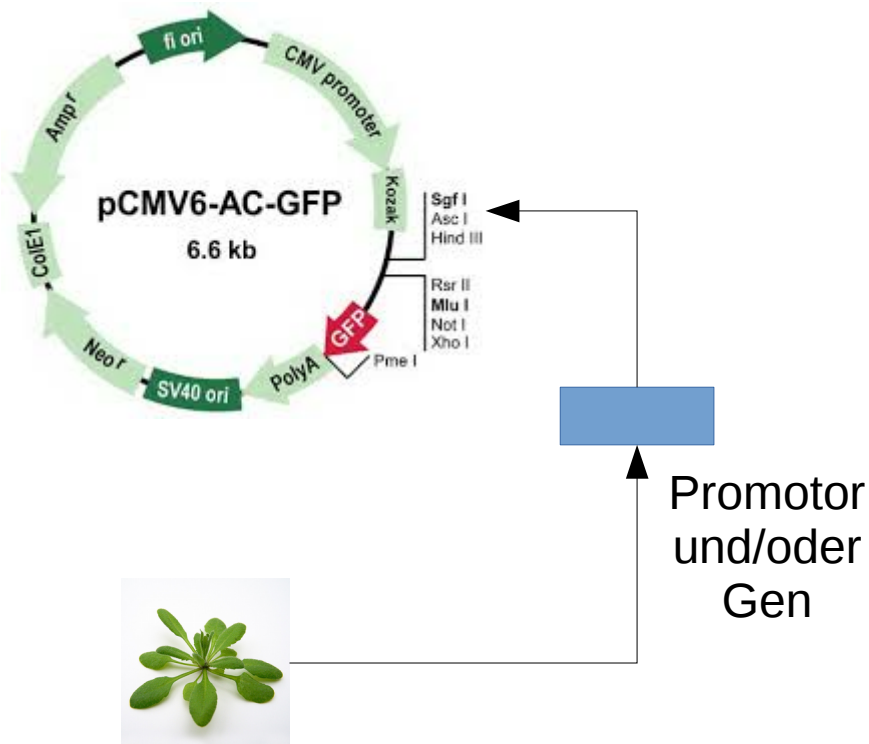
Reportergene /-proteine

N-terminal fusion with GFP



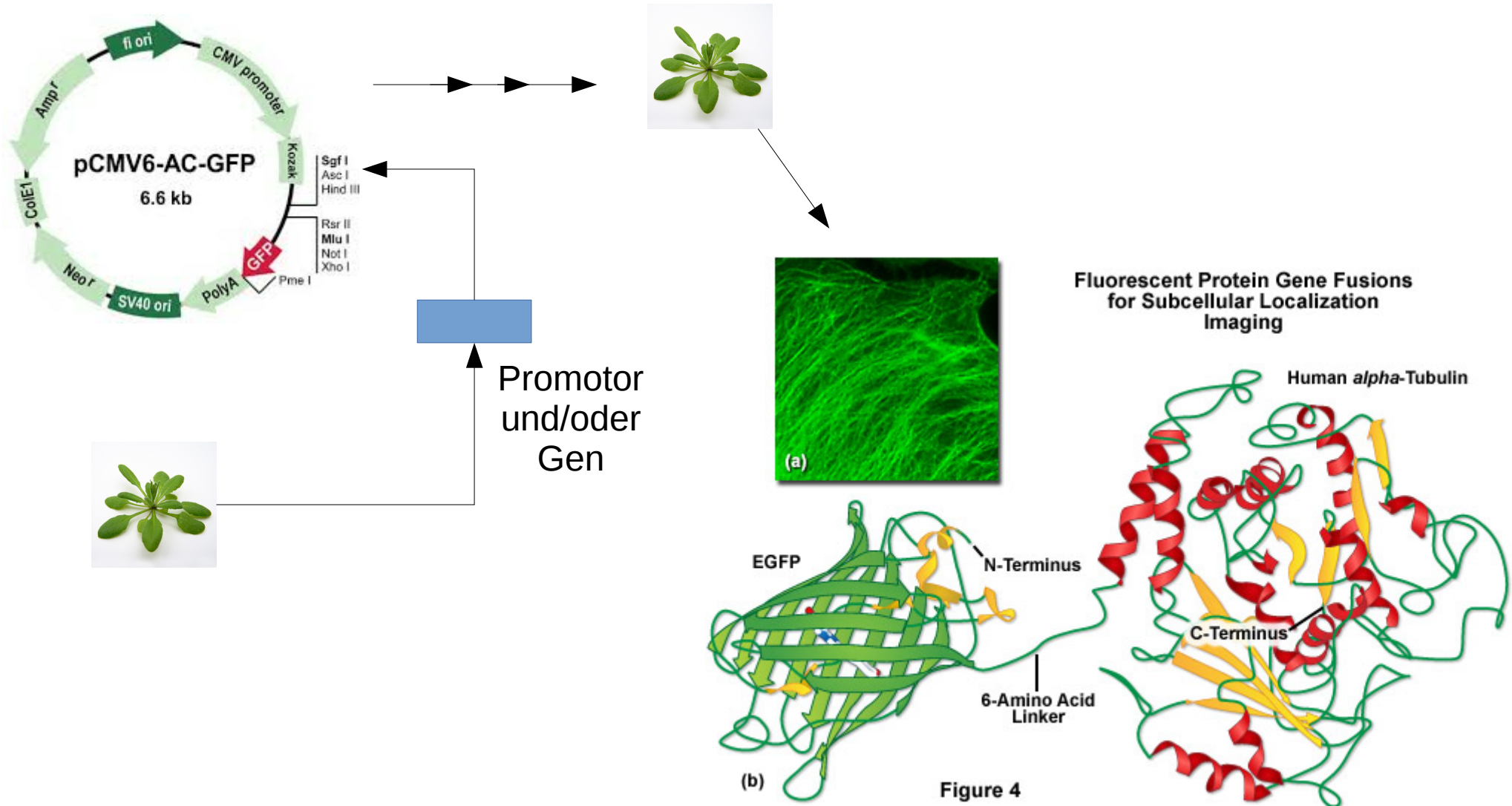
Reportergene /-proteine

N-terminal fusion with GFP



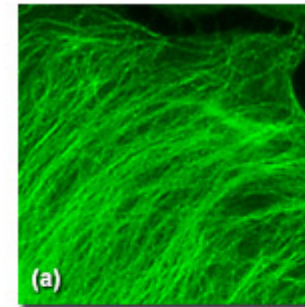
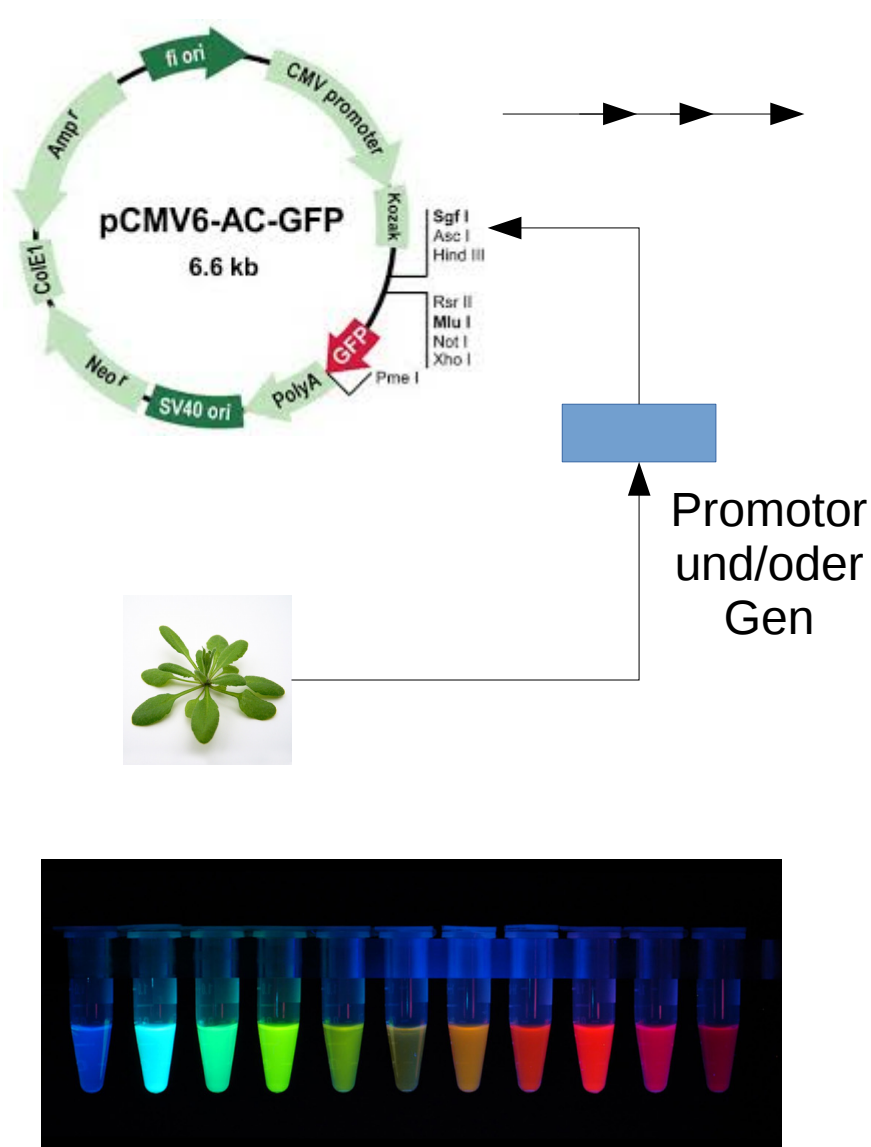
Reportergene /-proteine

N-terminal fusion with GFP



Reportergene /-proteine

N-terminal fusion with GFP



Fluorescent Protein Gene Fusions for Subcellular Localization Imaging

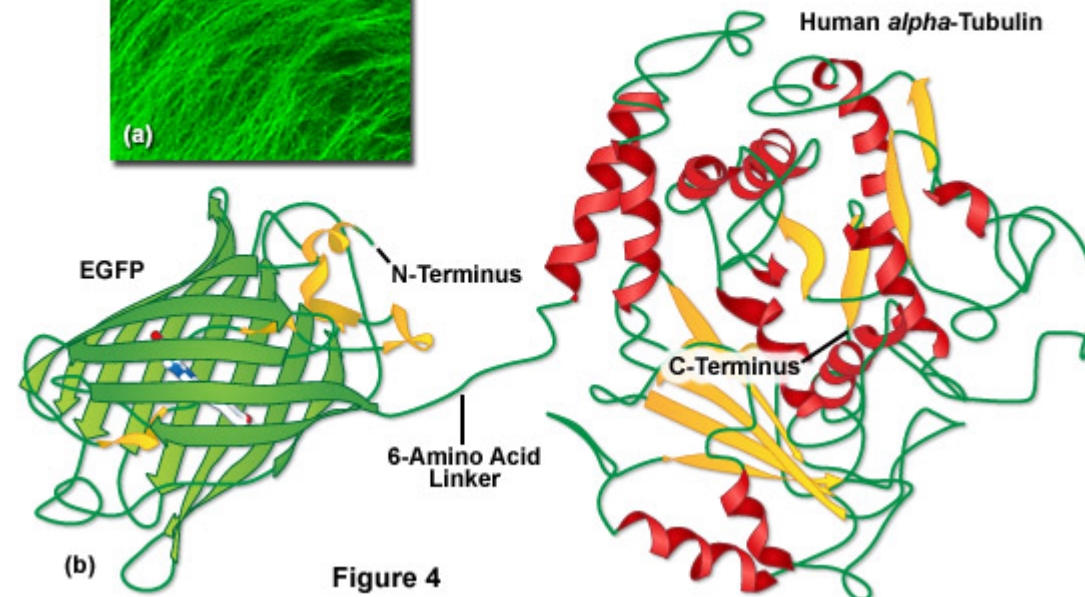


Figure 4

Proteinnachweise

Fragen:

- Menge eines Proteins in Reaktion auf einen Stimulus / genetische Veränderungen
- Lokalisation eines Proteins
- Interaktion eines Proteins mit bekanntem /unbekannten Protein(en)
- Regulation der Aktivität
- Enzymatische / Bindungs-Eigenschaften
- Proteinstruktur (tertiär, quartär)
- Veränderungen des Proteoms in Reaktion auf Stimulus / genetische Veränderungen
-

Proteinnachweise

Fragen:

- Menge eines Proteins in Reaktion auf einen Stimulus / genetische Veränderungen

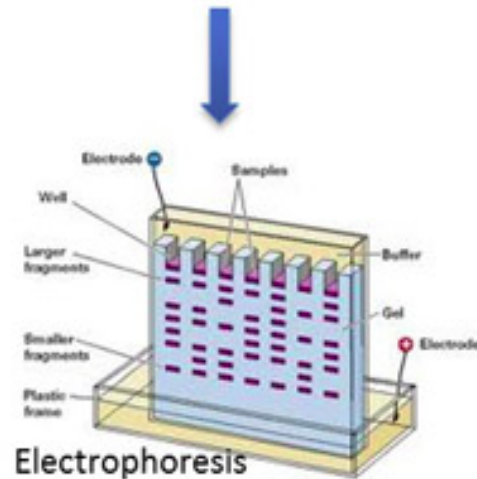
—————▶ **Western Blot**

Western Blot

Rohextrakt
gereinigte Extrakte
Zellfraktionen
in vitro Exprimierte
Proteine

Zugabe von
Protease-Inhibitoren!!!

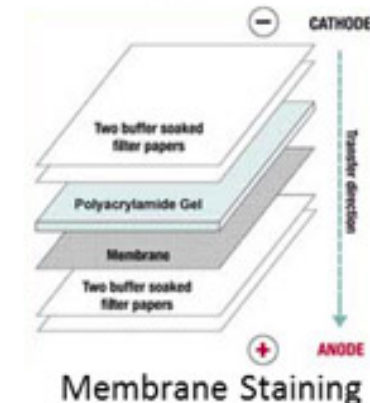
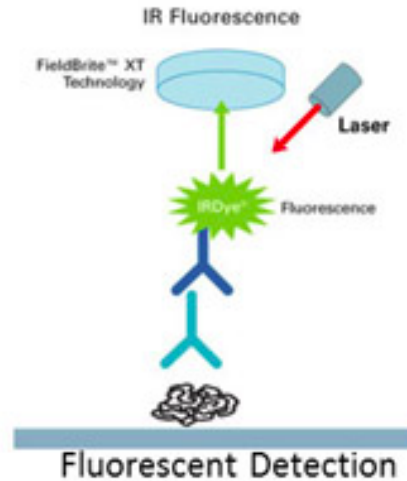
Sample Preparation



Transfer

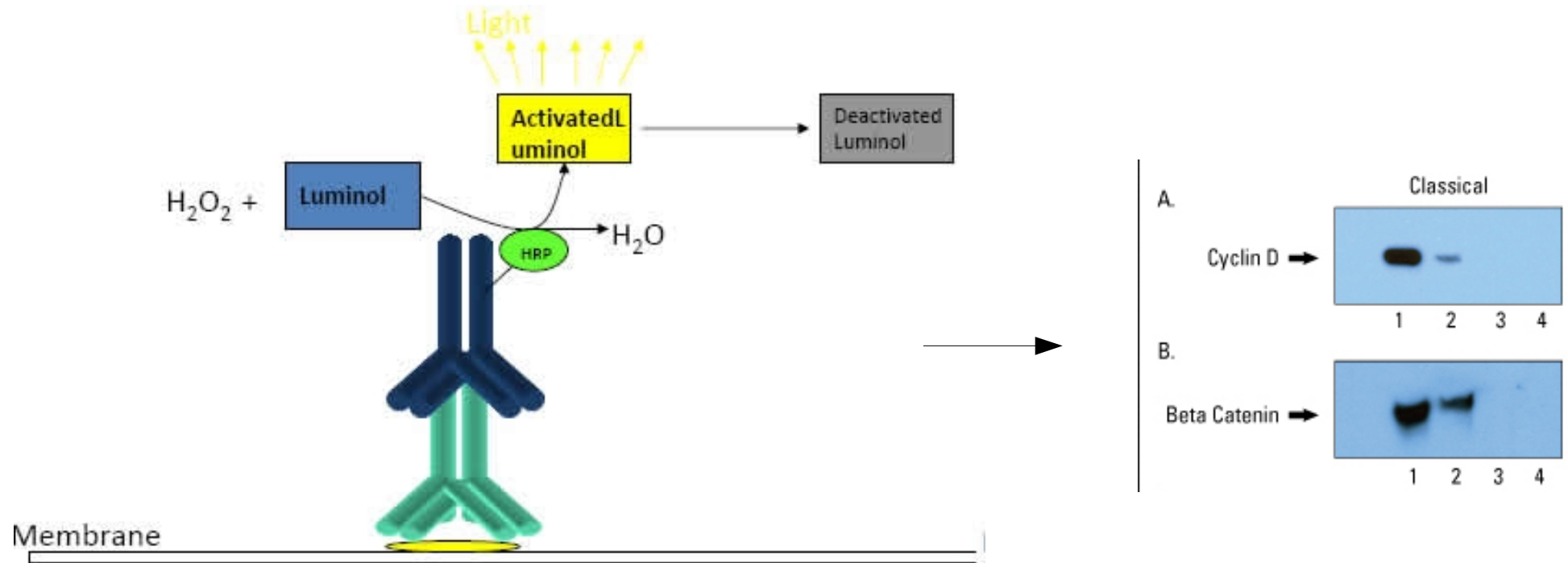


Workflow



Detektionssysteme
radioaktiv
fluoreszenz
enzymatisch

Western Blot Detektion



HRP = horseradish peroxidase - Enzym das Luminol aktiviert → dabei wird Licht freigesetzt

→ kann auf Röntgenfilm detektiert werden → sehr sensitiv!

Nachteil: Quantifizierung ist nur anhand der Bilder möglich (pixel density)

erfordert spezifischen Antikörper gegen das Zielprotein! oder.....

Generierung (spezifischer) Antikörper



Test gegen
Proteinextrakt
(Western Blot)

Isolierung der AKs
aus Blut

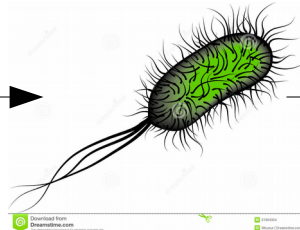
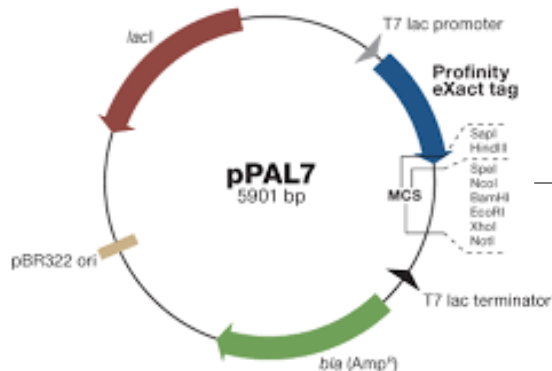
Test gegen
reines Protein
(Western Blot)



Immunisierung

Protein:
Expression
Extraktion
Reinigung

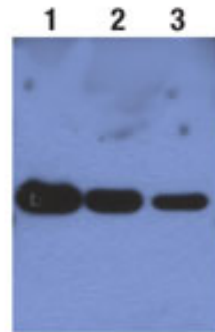
Gen



Generierung (spezifischer) Antikörper



Test gegen
Proteinextrakt
(Western Blot)

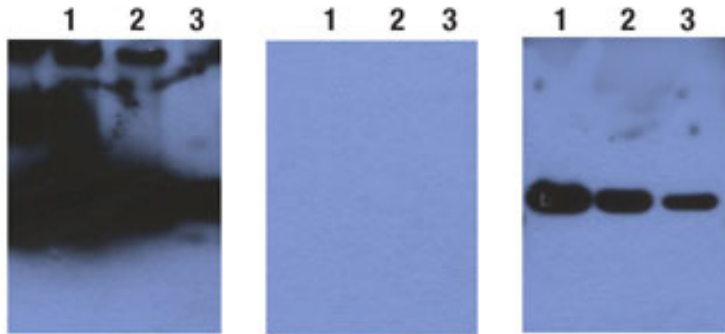


spezifischer
AK
→ carry on....

Generierung (spezifischer) Antikörper



Test gegen
Proteinextrakt
(Western Blot)

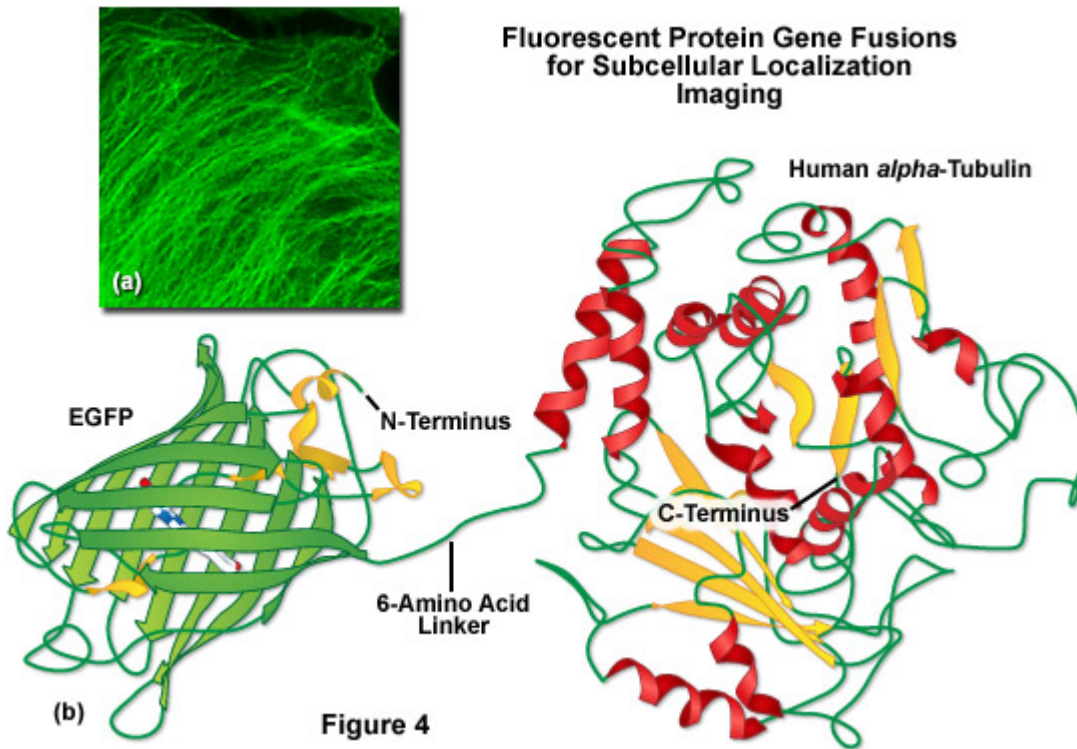


spezifischer
AK
→ carry on....

Mist!

- Optimierung des Western Blots
- neuen AK produzieren
- protein taggen

Protein tagging



indirekter Nachweis des Proteins mittels Antikörper



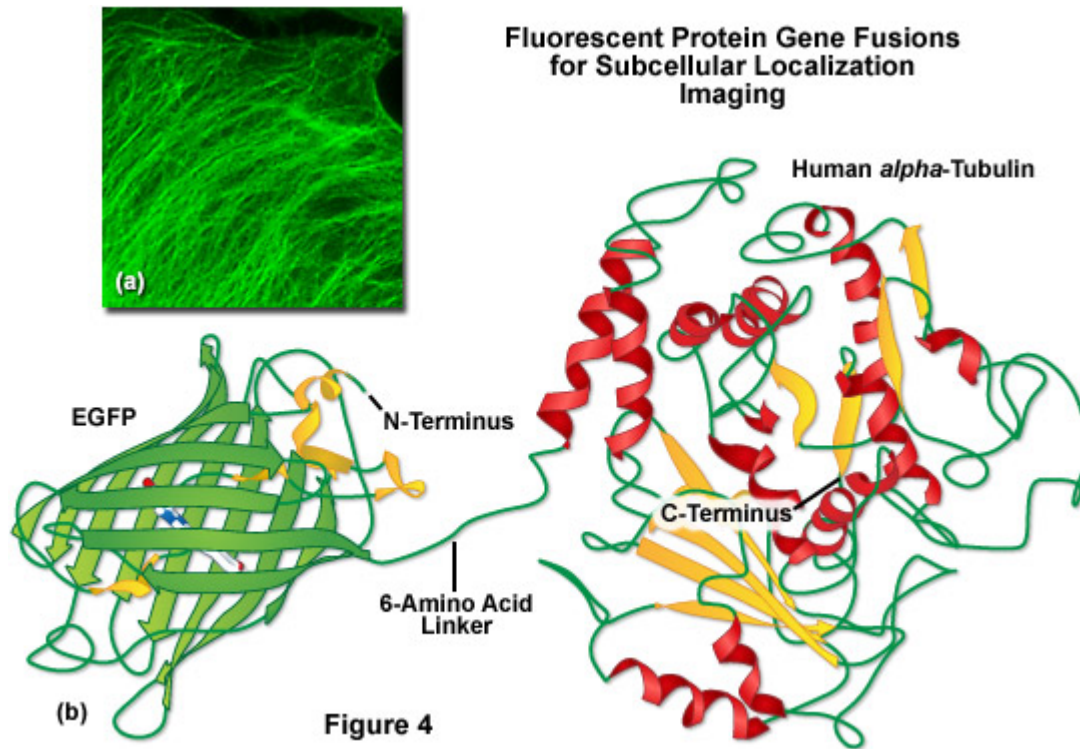
Anhängen eines “tags” für den es einen spezifischen Antikörper gibt



transiente/stabile Transformation



Protein tagging



indirekter Nachweis des Proteins mittels Antikörper

Anhängen eines “tags” für den es einen spezifischen Antikörper gibt

GFP (238 AS) immer noch relativ groß

- **FLAG-tag**, (DYKDDDDDK)
- **HA-tag** (YPYDVPDYA)
- **Myc-tag**, (EQKLISEEDL)

je 3-6x

transiente/stabile Transformation



Interaktion von Proteinen

Frage: Interaktion von zwei bestimmten Proteinen?

- **Yeast-2-hybrid (Y2H)**

heterologe Expression beider Proteine in Hefe, Interaktion wird über Reportergene / Wachstumsselektion nachgewiesen

- **(Co-) immunoprecipitation**

in vitro oder *in vivo* gebildete Proteinkomplexe werden über Antikörper aufgereinigt und im Western Blot nachgewiesen

- **BIFC / split-YFP**

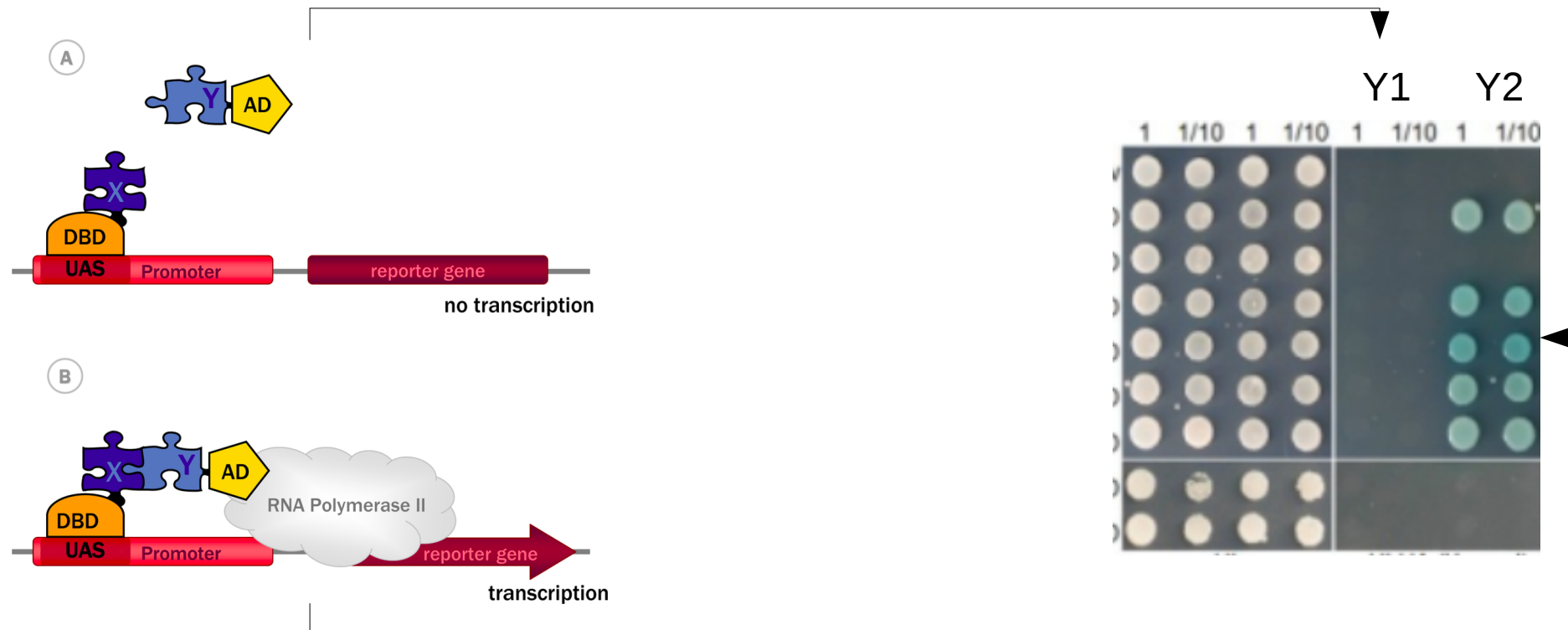
in vivo Nachweis der Interaktion. Proteine werden mit jeweils $\frac{1}{2}$ des YFPs fusioniert. Bei Interaktion → YFP fluoreszenz

Y2H

Jedes der beiden fraglichen Proteine wird mit einer Hälfte eines Transkriptionsfaktors aus Hefe fusioniert:

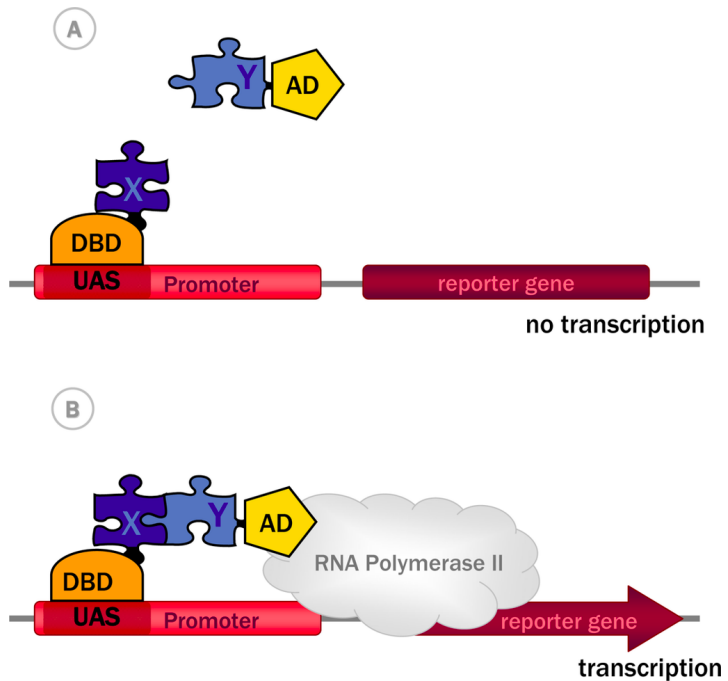
x + DBD (DNA binding domain)

y + AD (activation domain)



Jedes der beiden fraglichen Proteine wird mit einer Hälfte eines Transkriptionsfaktors aus Hefe fusioniert:

x + DBD (DNA binding domain)
y + AD (activation domain)



- rel. einfach + quantifizierbar
- eukaryotisches System (→ Kern!, Modifizierungen)
- hoher Durchsatz möglich
- “fishing” nach unbekannten Interaktoren möglich (cDNA Bibliotheken)

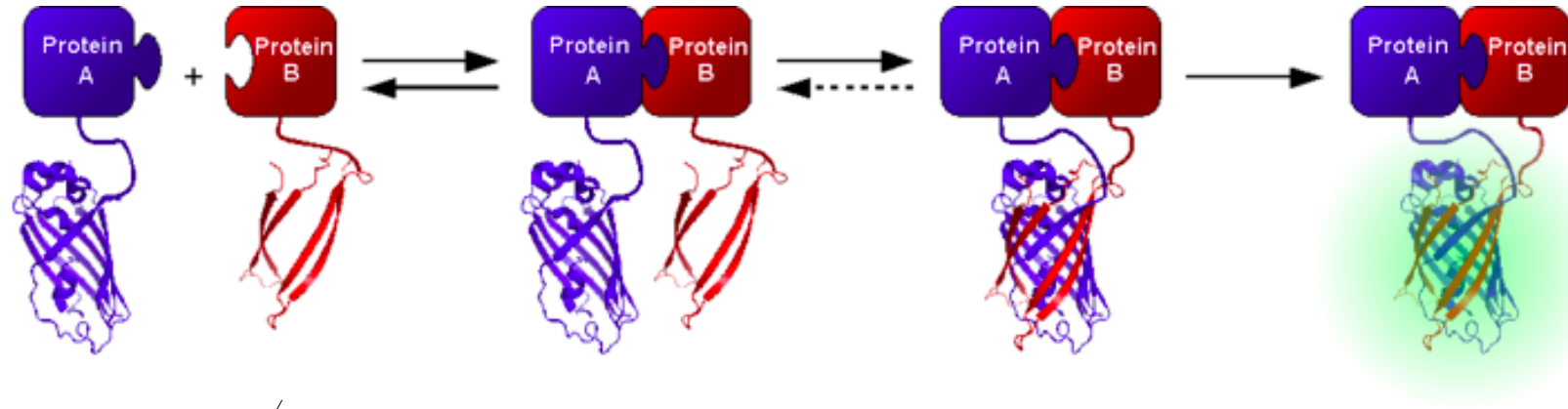
- heterologes System
→ u. U. fehlende Co-Faktoren
- rel. häufig Falsch-Positive / Negative



Absicherung durch 2. Methode

BIFC / split-YFP

bi-molecular fluorescence complementation (BIFC)



- “natürliches” System
→ Co-Faktoren vorhanden

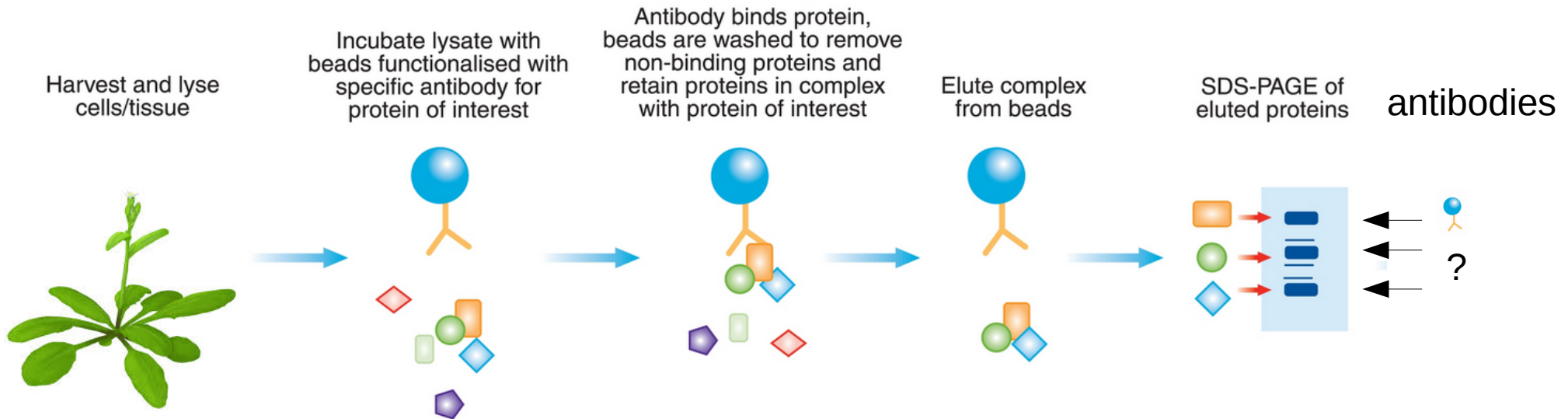
Protein
A

Nucleus Overlay

- tags können Interaktion/Lokalisation beeinflussen
- Bindung der YFP-Hälften ist irreversibel

Co-immunoprecipitation

Frage: Interaktion von zwei (oder mehr) bestimmten Proteinen?



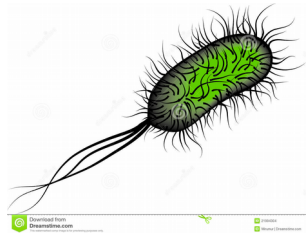
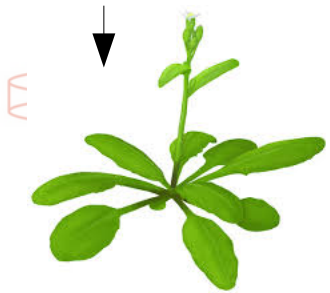
- “natürliches” System
→ Co-Faktoren vorhanden

- Antikörper (spezifisch)
- tags (wenn nötig) können Interaktion beeinflussen
- Konzentration d. Zielproteine?

Co-immunoprecipitation

Proteinmenge(n) zu niedrig

Überexpression
d. Proteine



Incubate lysate with
beads functionalised with
specific antibody for
protein of interest

Antibody binds protein,
beads are washed to remove
non-binding proteins and
retain proteins in complex
with protein of interest

Elute complex
from beads

SDS-PAGE of
eluted proteins

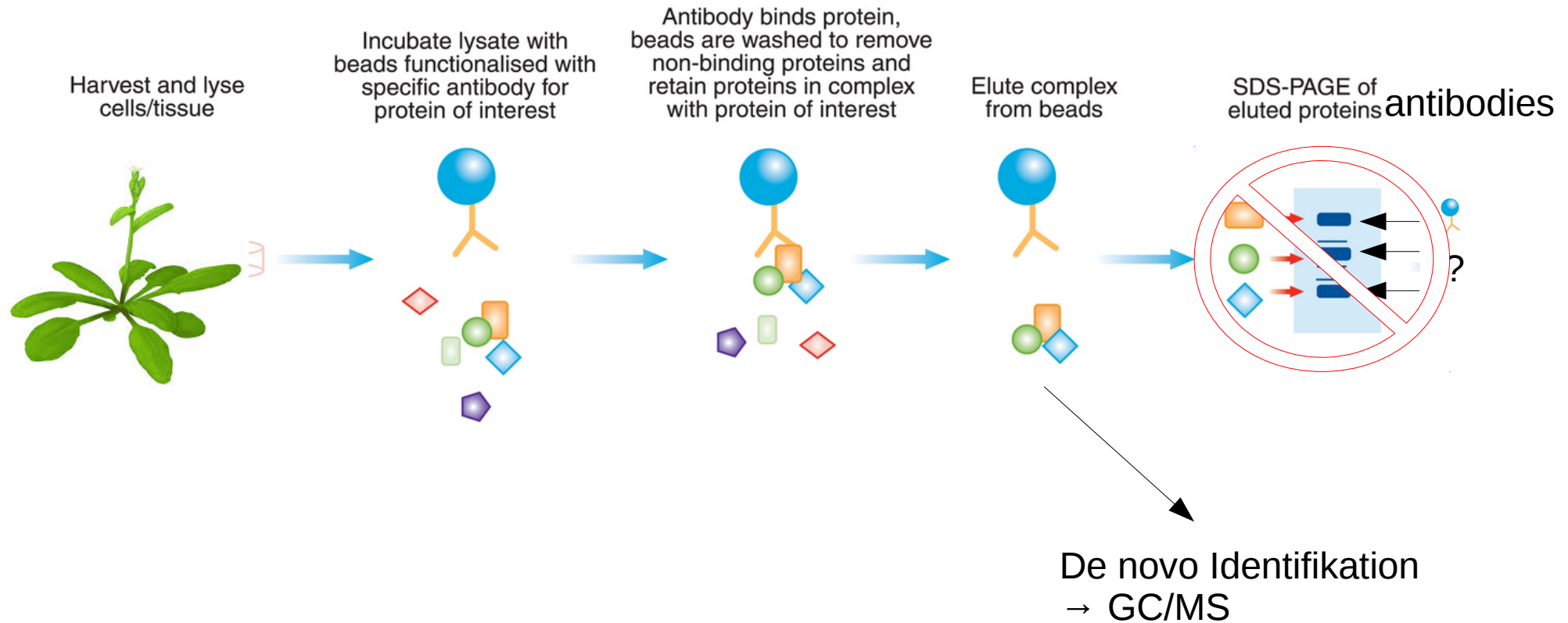
antibodies

Anreicherung d. Proteine

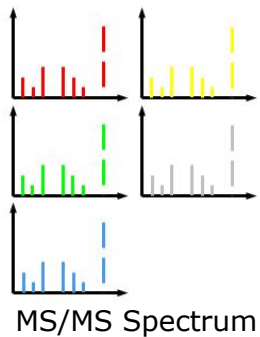
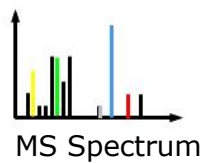
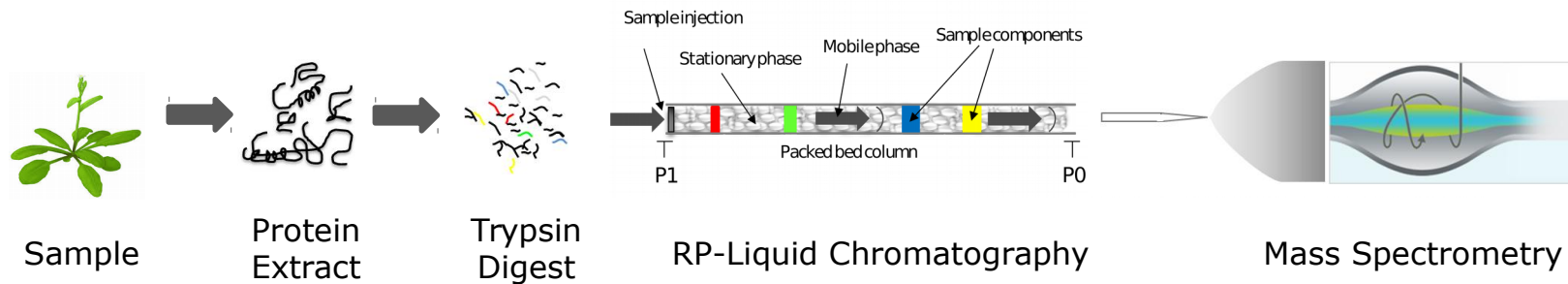
Expression/Anreicherung
d. Proteine in *E.coli*

Co-immunoprecipitation

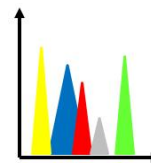
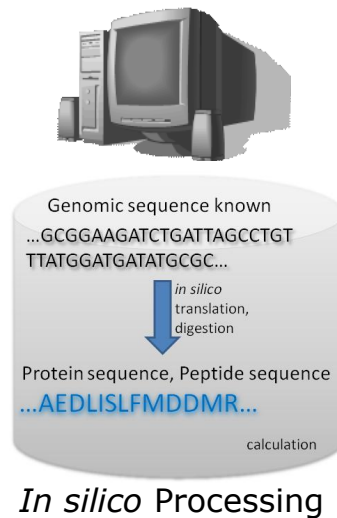
Ziel: Identifikation von unbekannten Interaktionspartnern



Mass spectrometry based proteomics

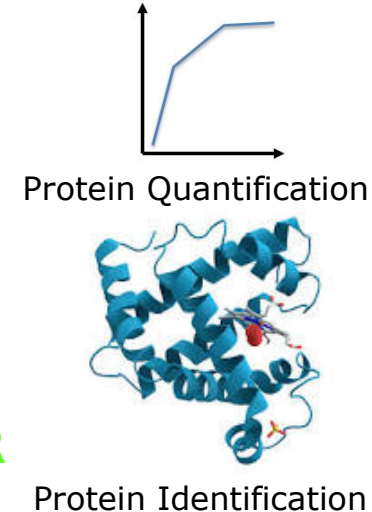


Database



Peptide Identification

GGGLVR
MANDDGLIR
SPTFLHDGGK
LVADQHIPLIK
HHDEWFYTPWGR

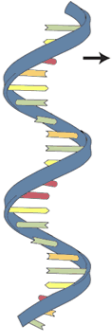


Nachweismethoden



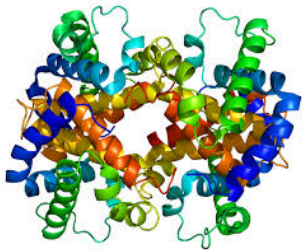
DNA

Southern Blot, Sequenzierung, NGS, PCR, Restriktion, CAPS, SSLP, DNaseI Verdau, CHIP, Y1H, histochemische Promotoranalysen,



RNA

Northern Blot, RT-PCR, RT-qPCR, Microarrays, RNAseq, *in situ* Hybridisierung, miRNA, lncRNA,

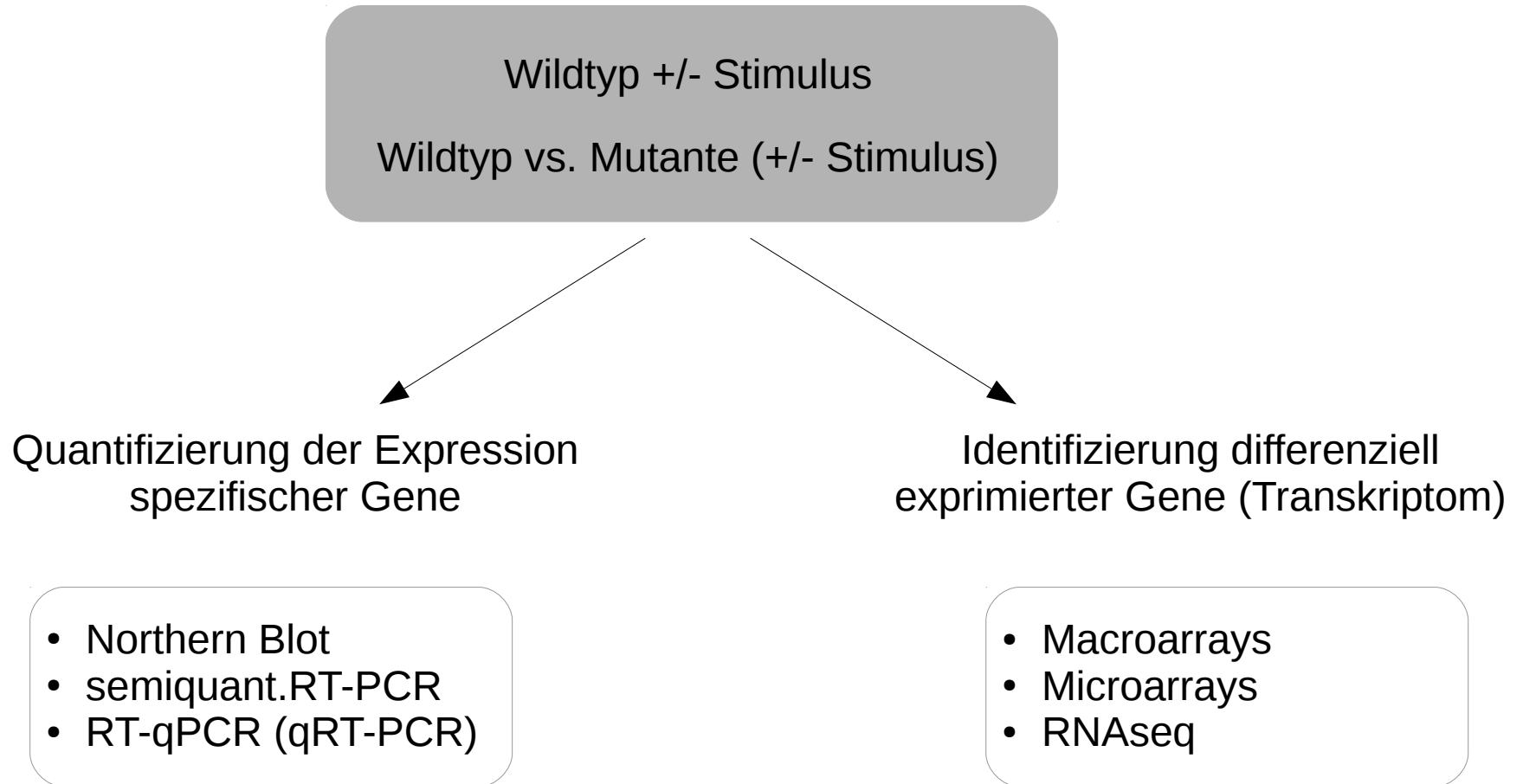


Protein

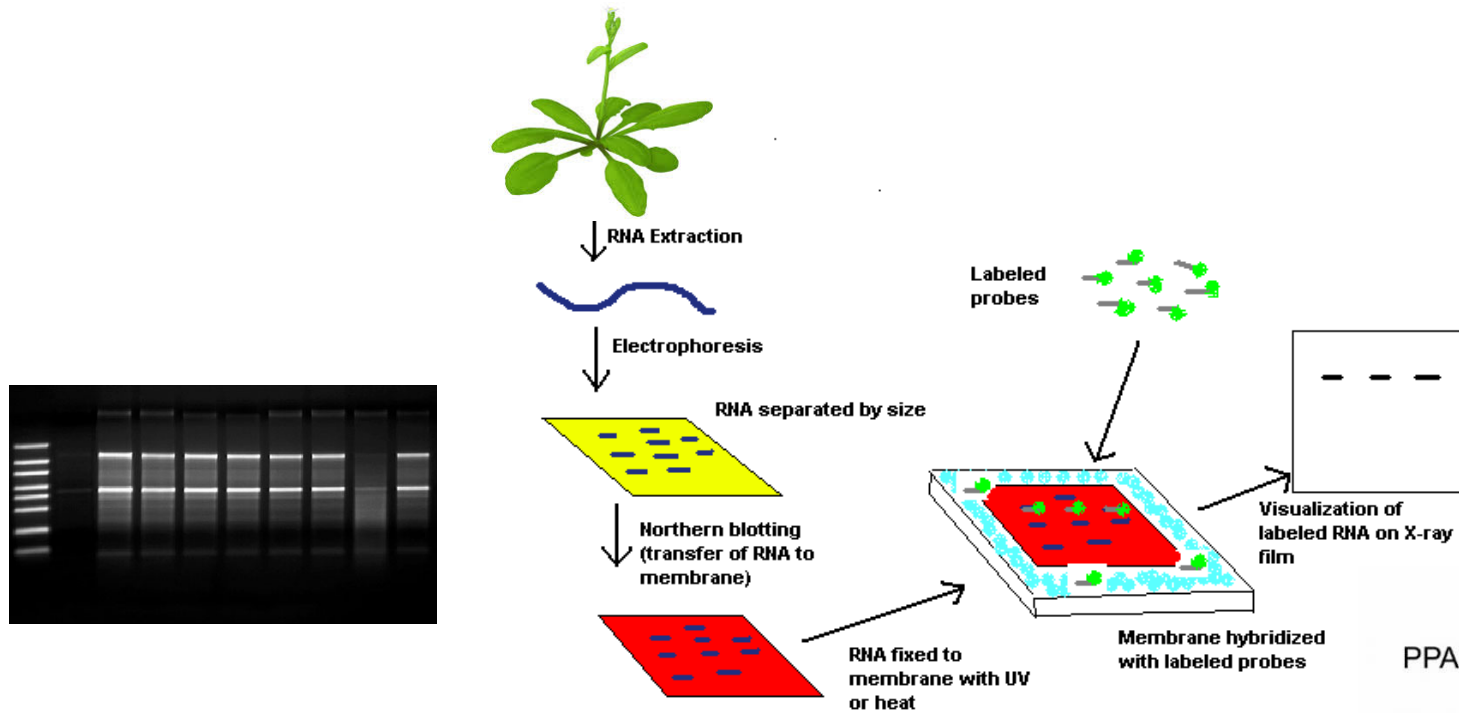
Western Blot, Immunoprecipitation, Lokalisation, Y2H, BIFC, Kristallstrukturanalyse, Enzymassays, structure-function analysis, proteomics

RNA Analysen

Frage:

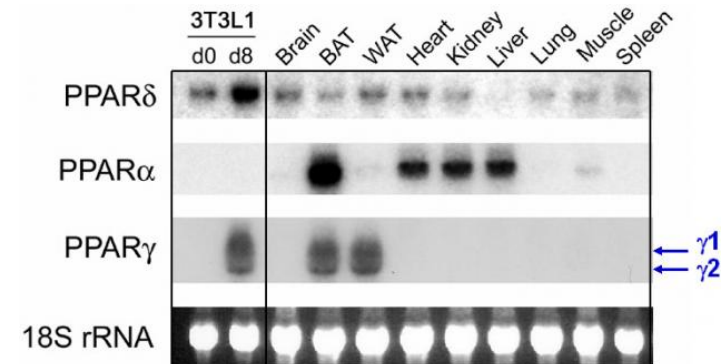


Norther Blot



- rel. einfach + günstig
- Detektion von Splice Varianten möglich

- schlechte Quantifizierbarkeit
- I.d.R. → radioaktive Sonden (Lab)
- viel Material (5 µg total RNA)



semiquantitative RT-PCR

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction RT-PCR

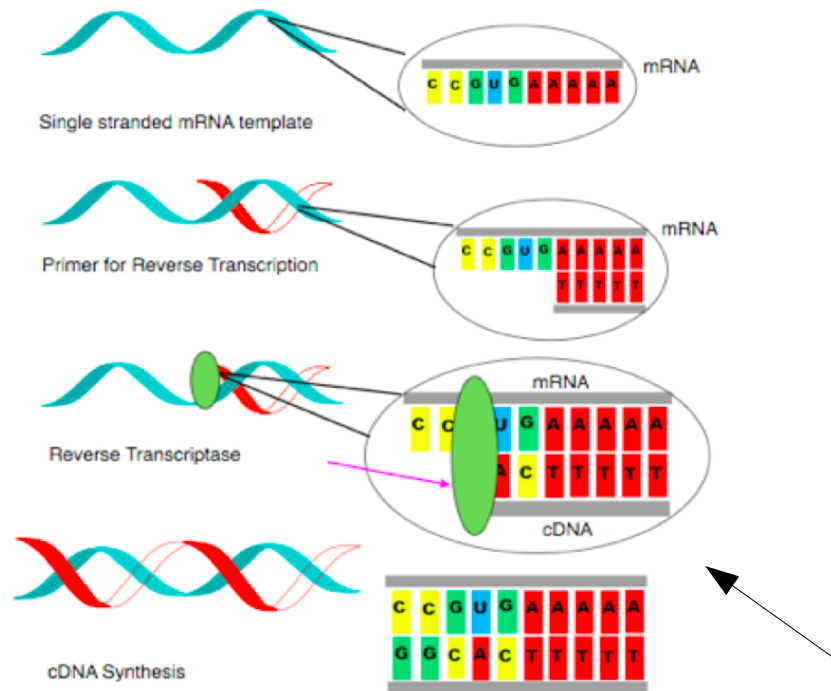
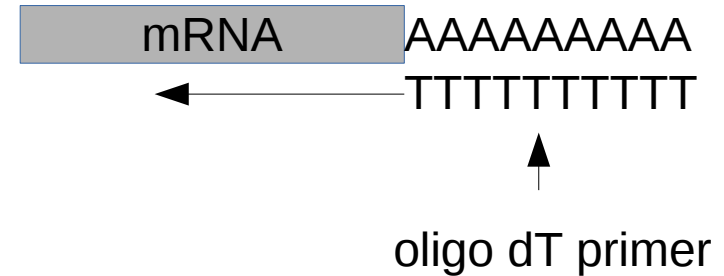
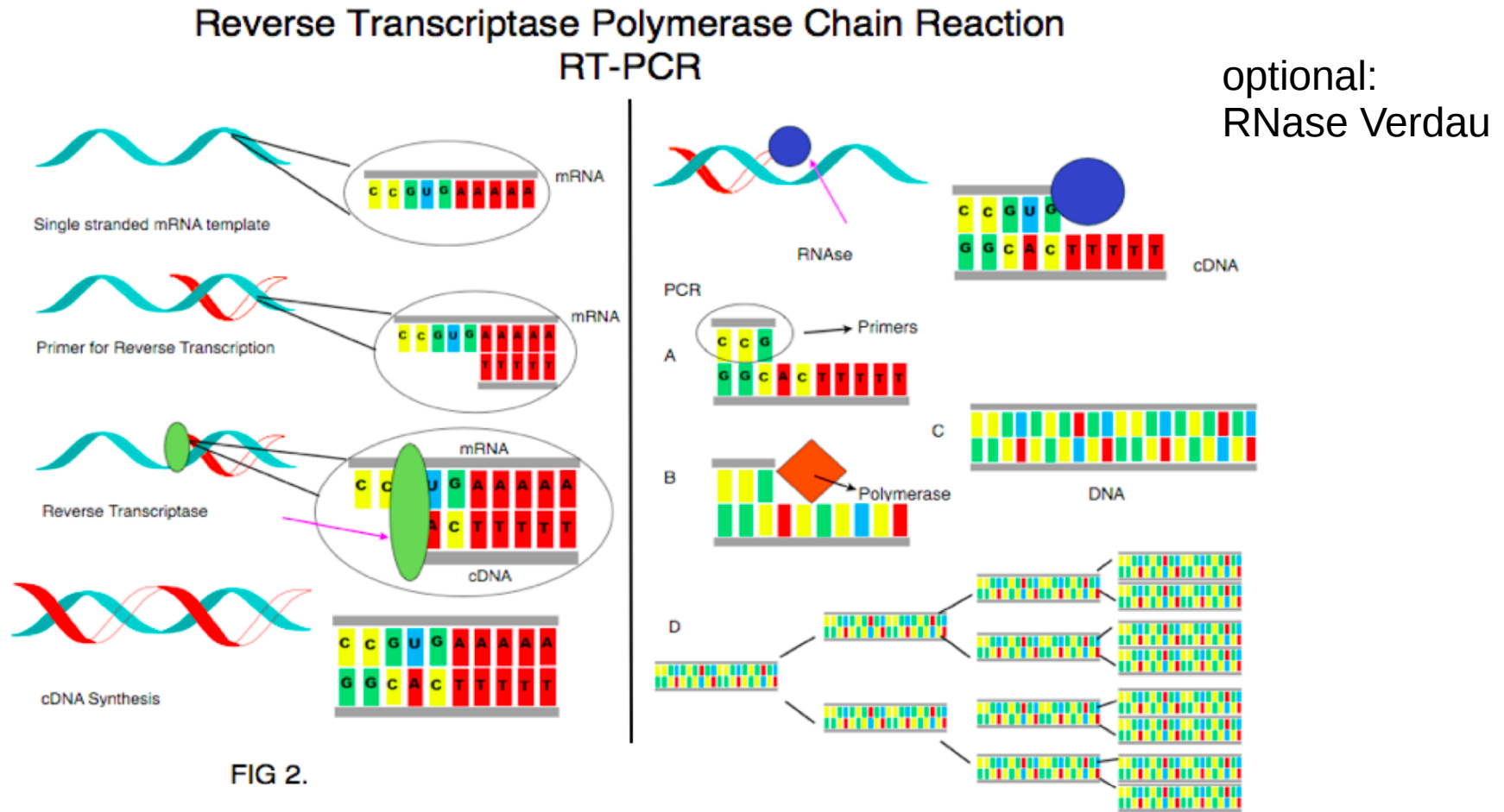


FIG 2.



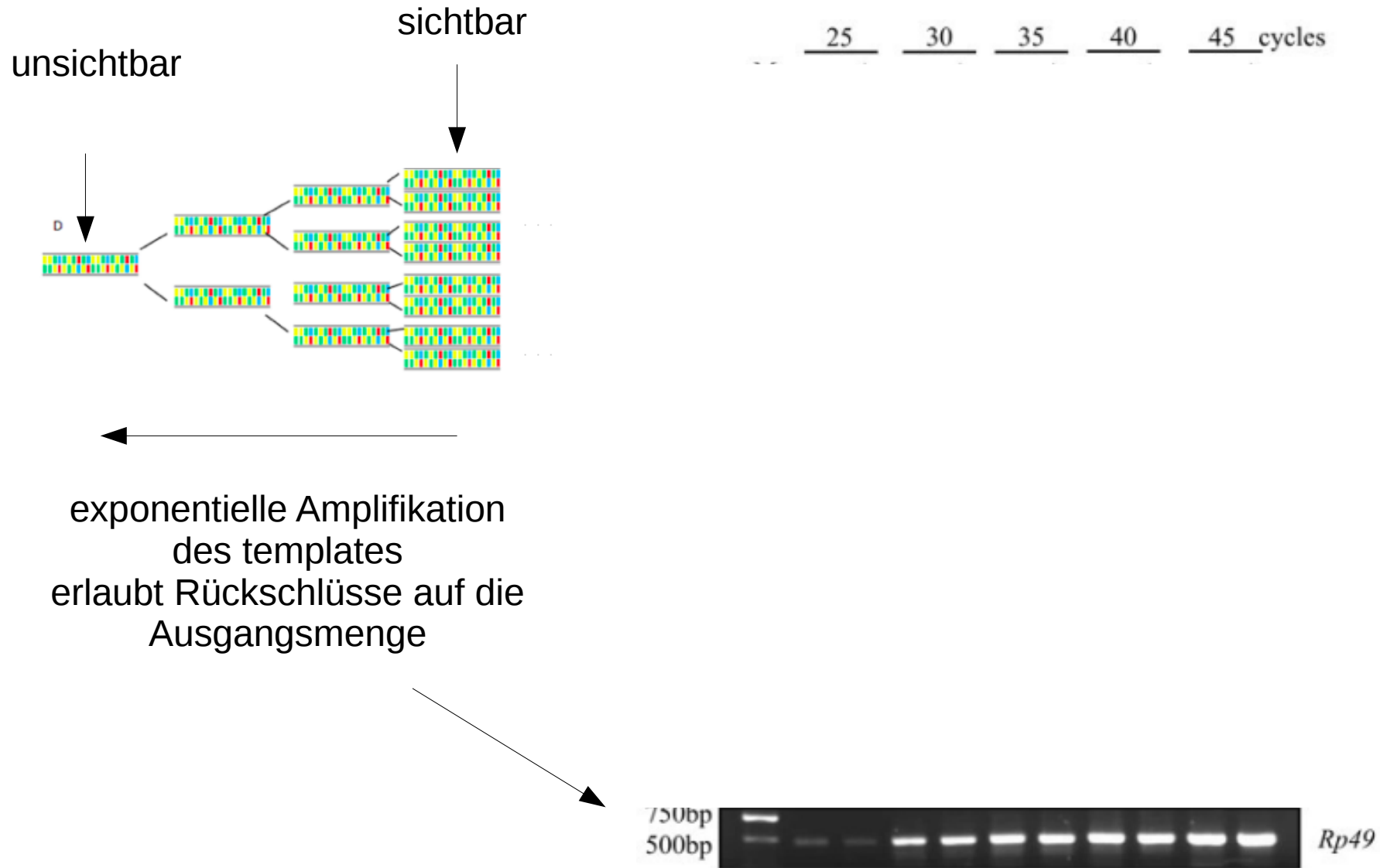
Erststrangsynthese
= Hybridmolekül
(mRNA + complementary/copy DNA)

semiquantitative RT-PCR



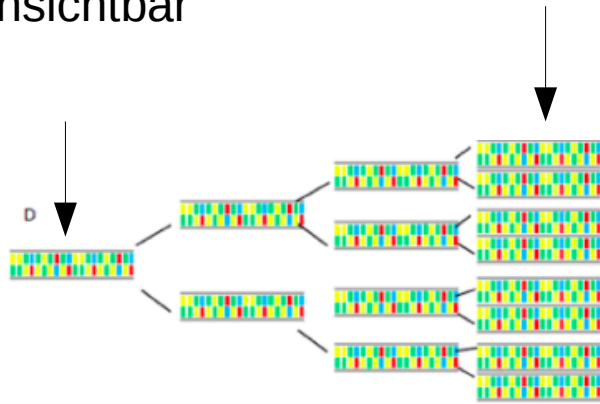
Amplifikation spezifischer Gene
mittels Gen-spezifischer Primer

semiquantitative RT-PCR

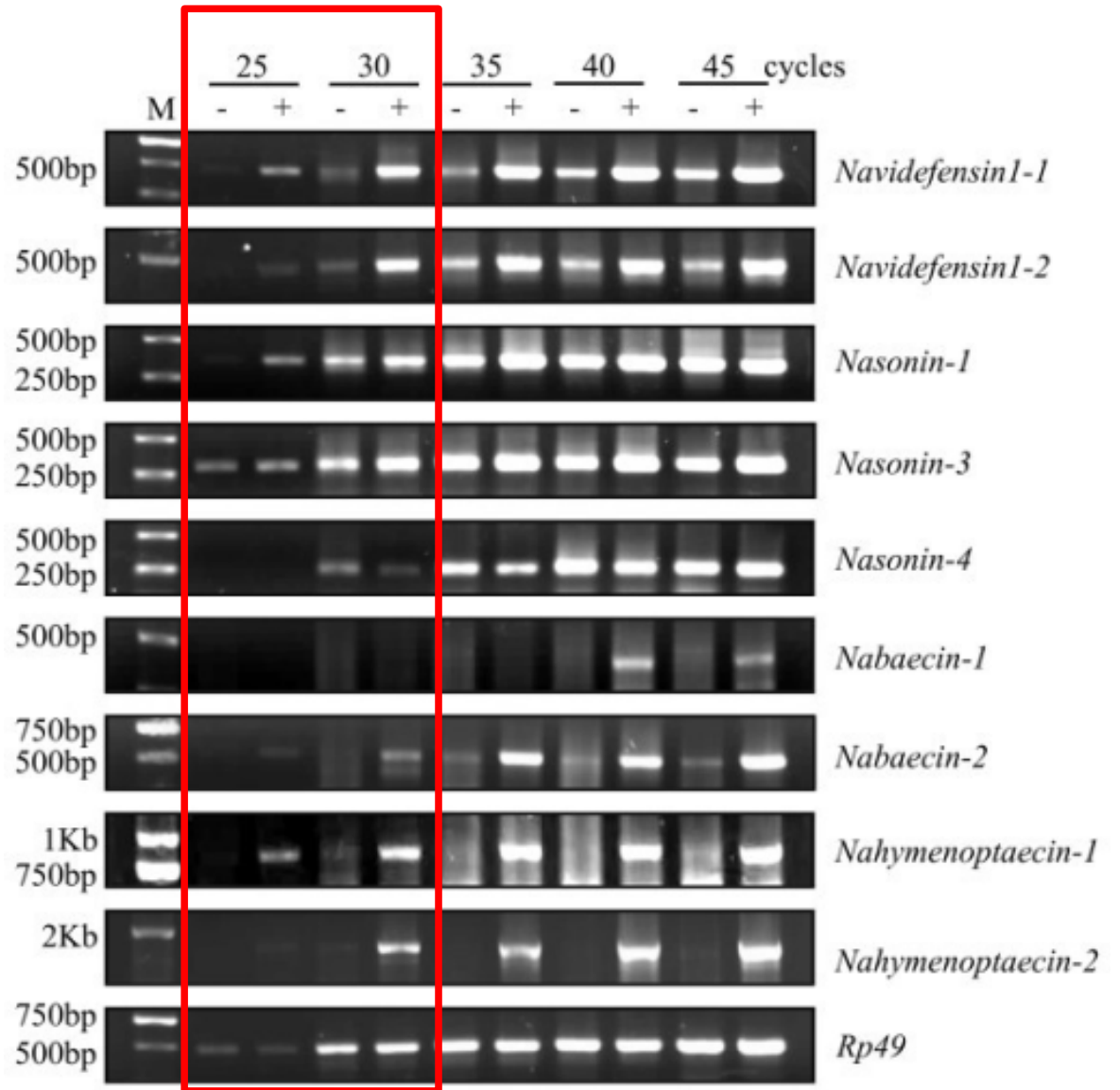


semiquantitative RT-PCR

unsichtbar sichtbar

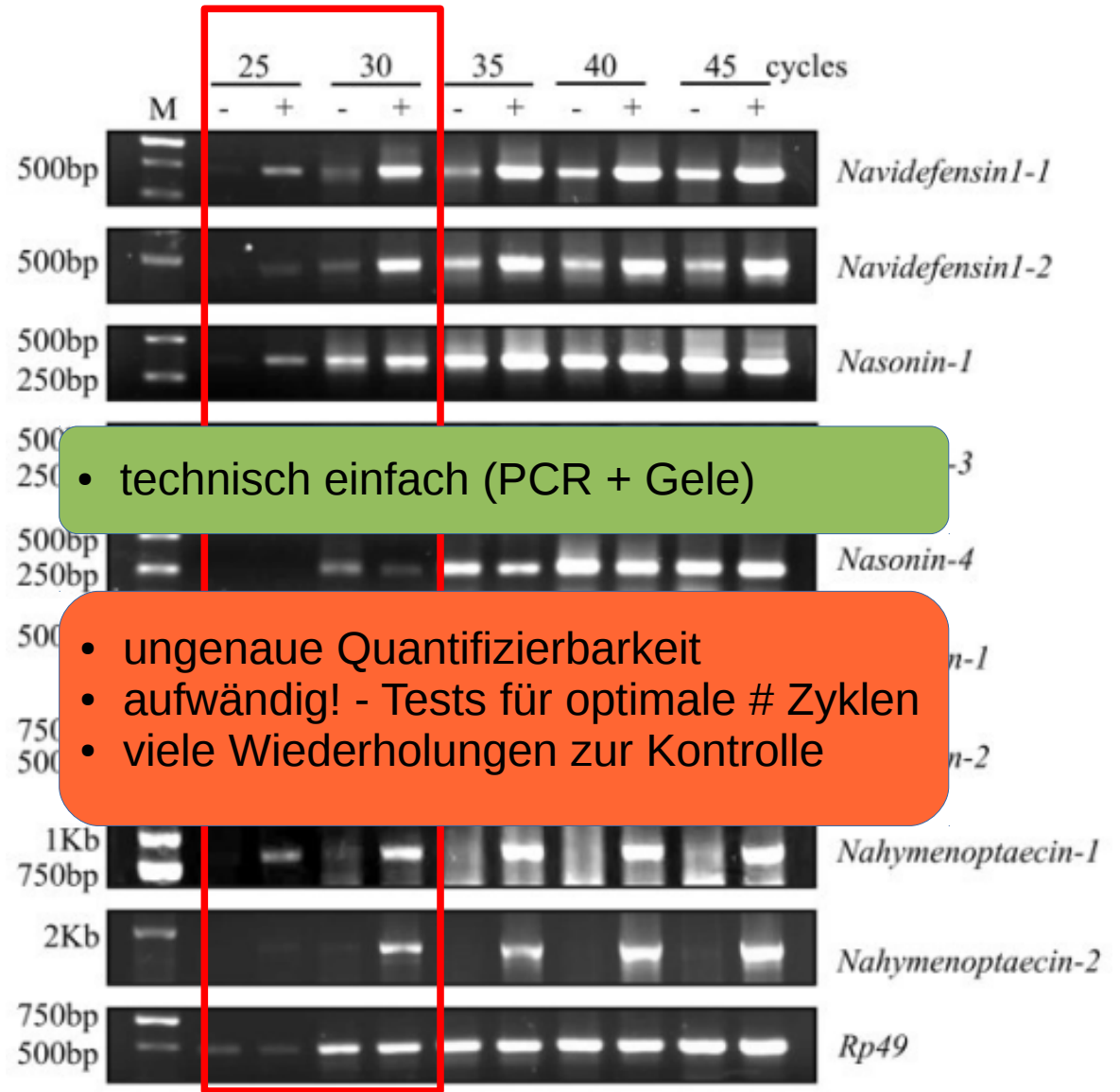
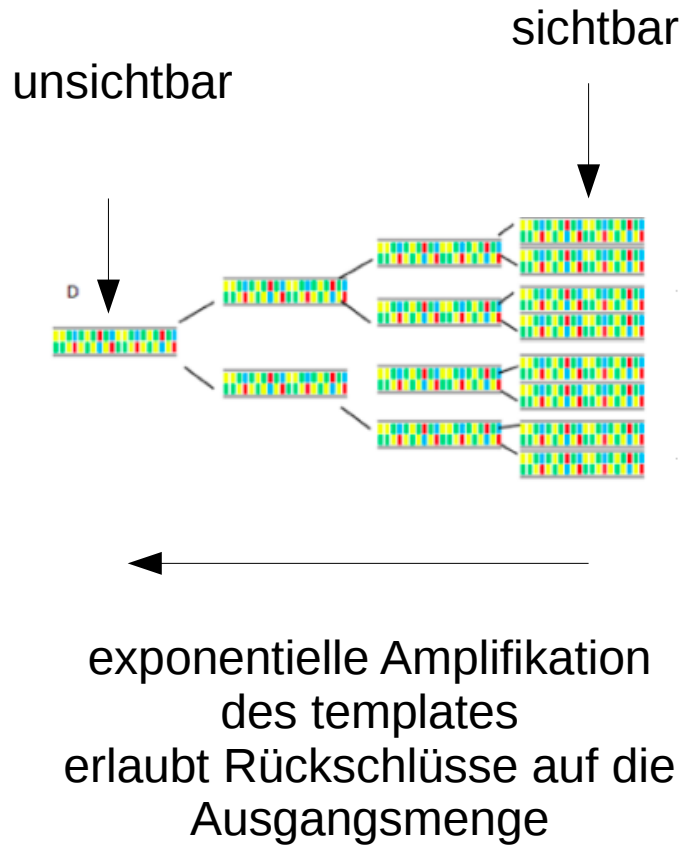


exponentielle Amplifikation
des templates
erlaubt Rückschlüsse auf die
Ausgangsmenge



Plateauphase erreicht
oder Anstieg nicht mehr messbar

semiquantitative RT-PCR

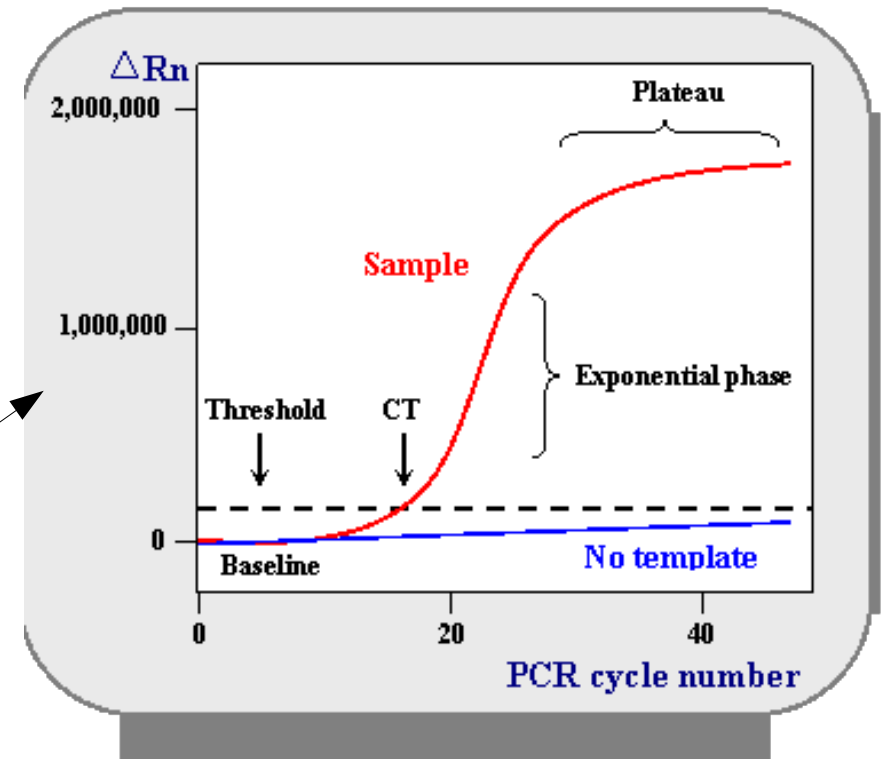
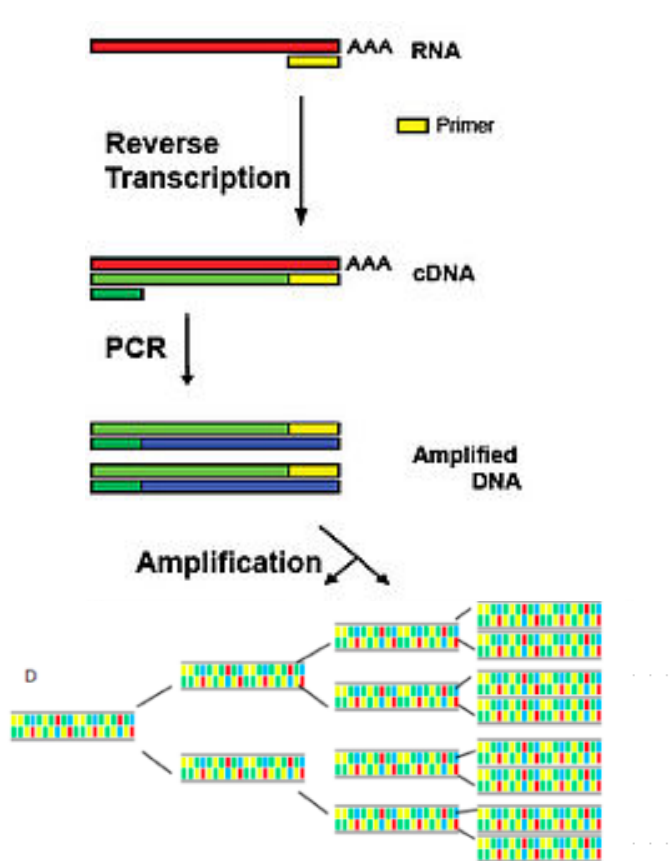


• technisch einfach (PCR + Gele)

- ungenaue Quantifizierbarkeit
- aufwändig! - Tests für optimale # Zyklen
- viele Wiederholungen zur Kontrolle

Plateauphase erreicht
oder Anstieg nicht mehr messbar

RT-qPCR (qRT-PCR, real time PCR)

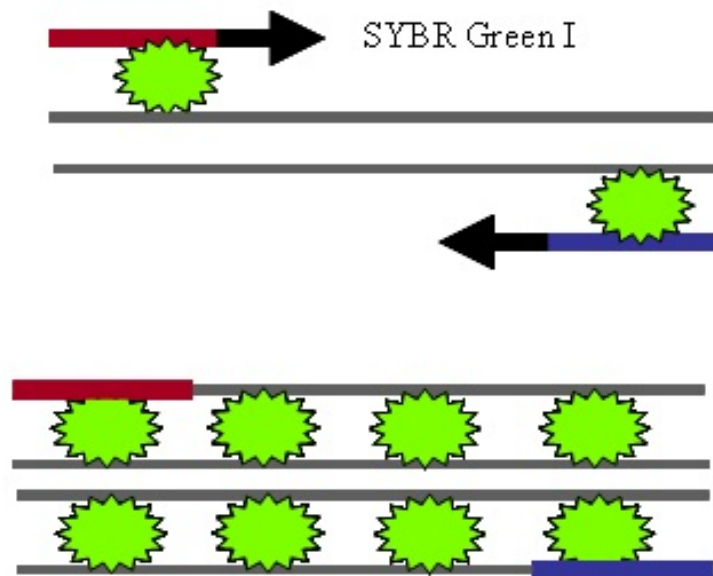


Quantifizierung nach jedem Zyklus oder
Echtzeit-Verfolgung der Reaktion
→ genauere Aussagen

RT-qPCR

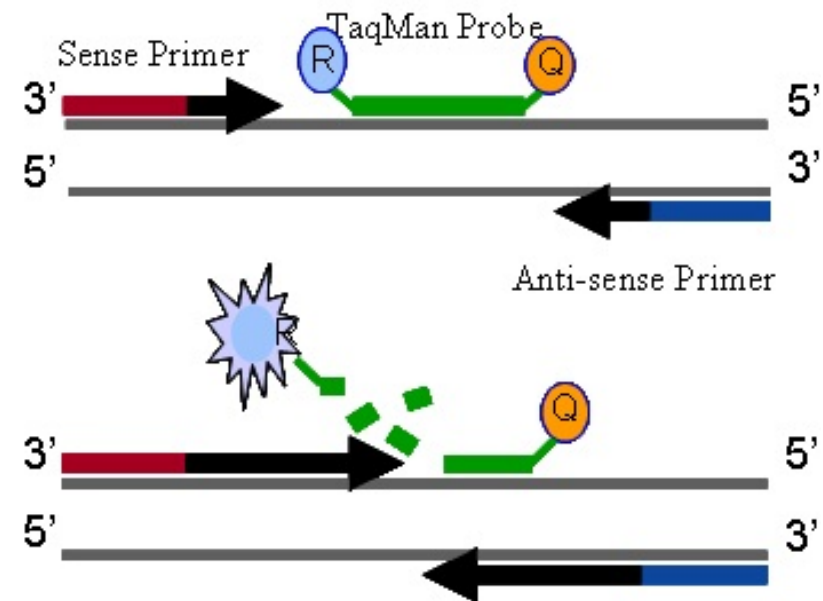
cDNA template
(cDNA of "all" mRNAs of a sample)

DNA-interkalierende
Farbstoffe
(SYBR green, EVA green,...)



A

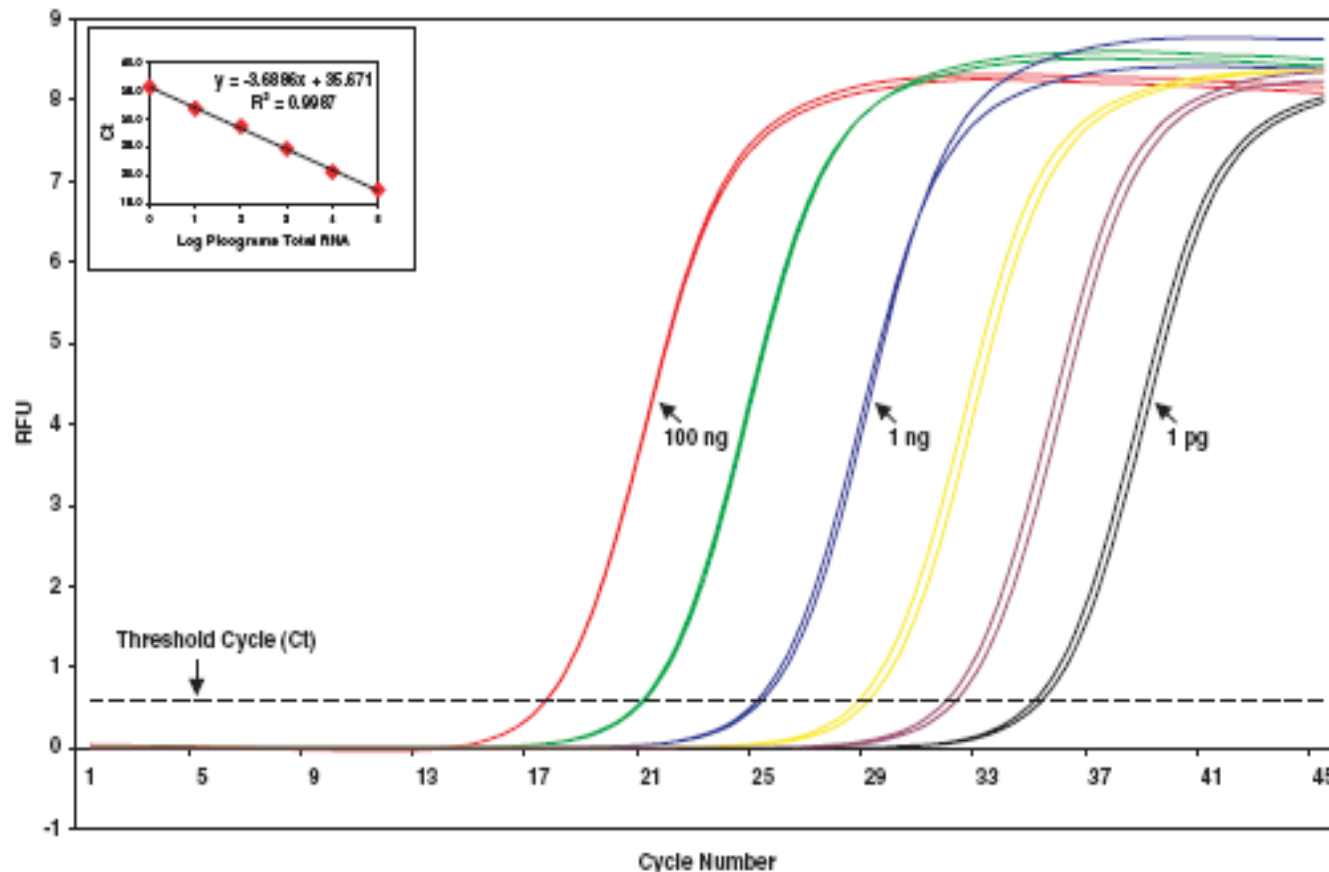
Gen-spezifische Sonden



B

Messung nach jedem PCR Zyklus
→ Echtzeit Quantifizierung der DNA Menge

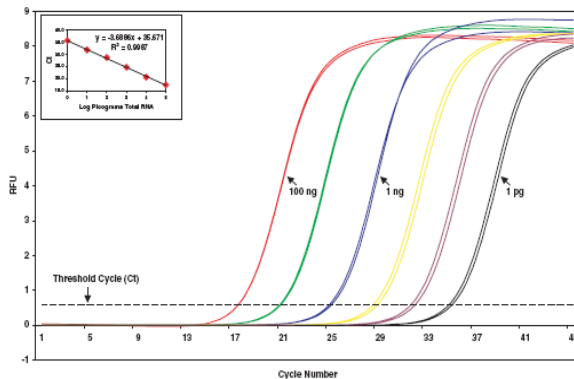
qPCR



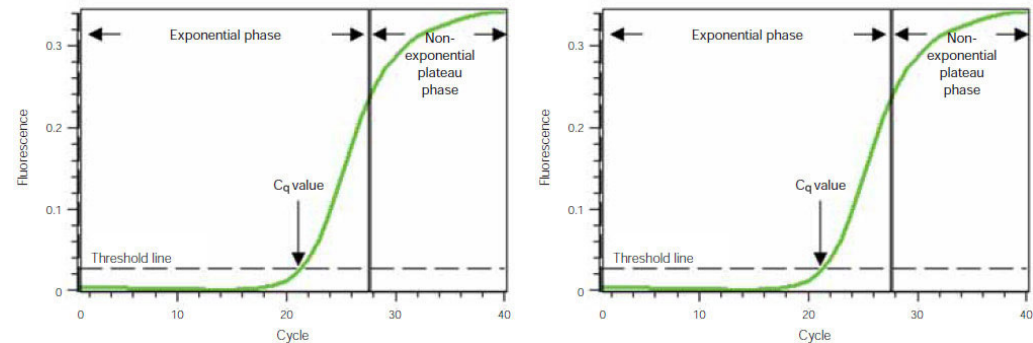
Threshold cycle: Zyklusanzahl bei dem der Eintritt in die Exponentielle Phase erfolgt
→ je früher das geschieht (je kleiner der Ct) desto höher war die Ausgangsmenge des templates

qPCR Auswertung

absolute Quantifizierung



relative Quantifizierung



- spezifischer Nachweis der Expression
- Quantifizierbar (genau)
- sensitiv+ reproduzierbar

- rel. teuer
- technisch aufwändig (Spez. Gerät)

konstitutiv
exprimiertes
Kontrollgen

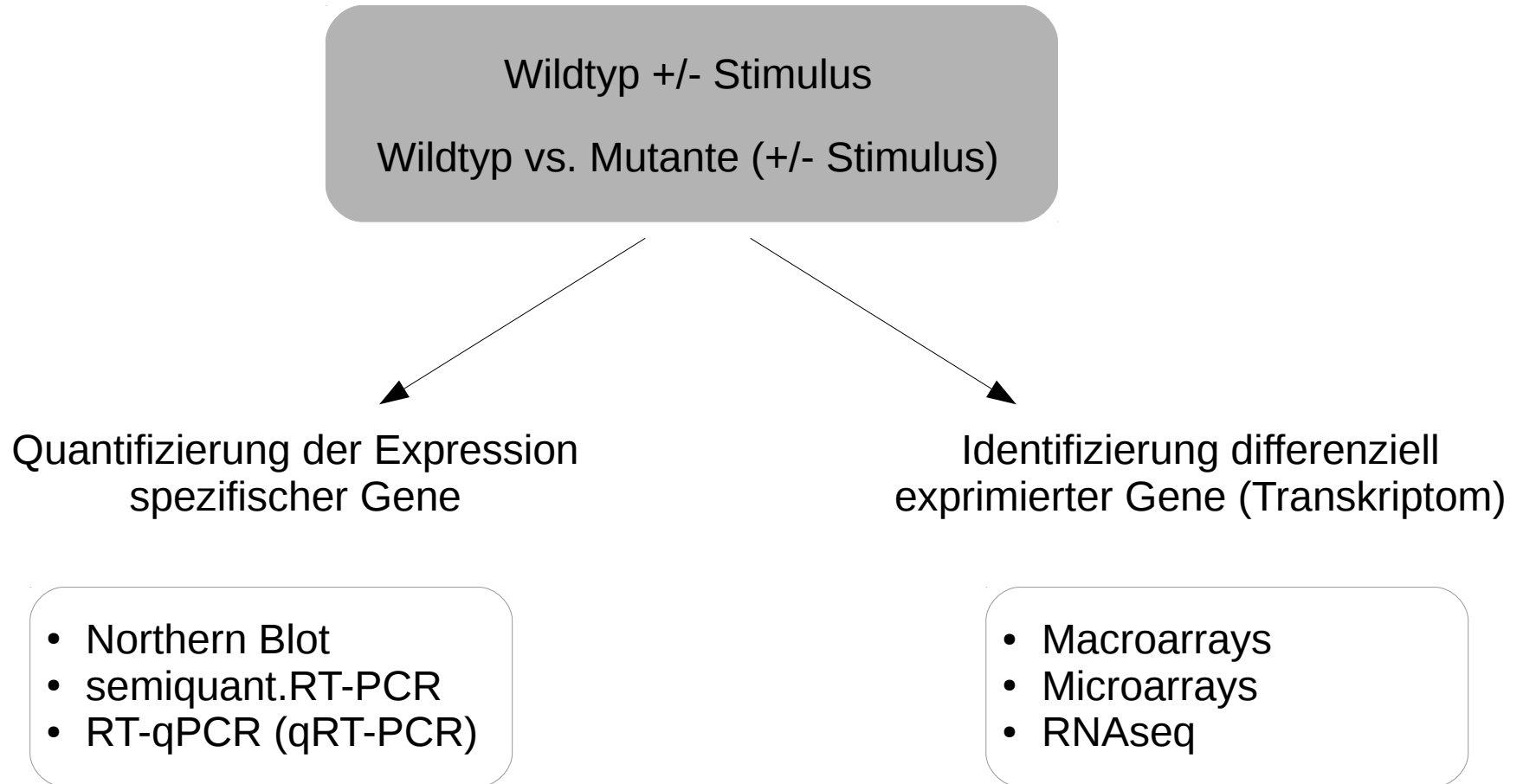
gene of
interest

$$\Delta CT \text{ Wert} = CT_{\text{kontrolle}} - Ct_{\text{goi}}$$

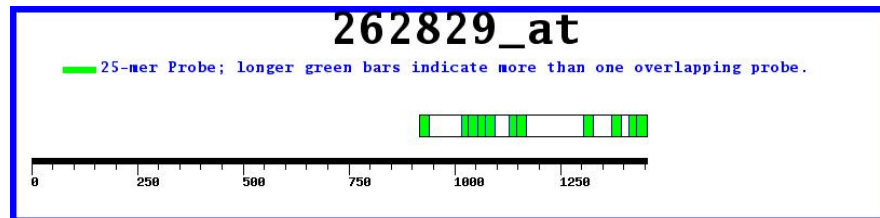
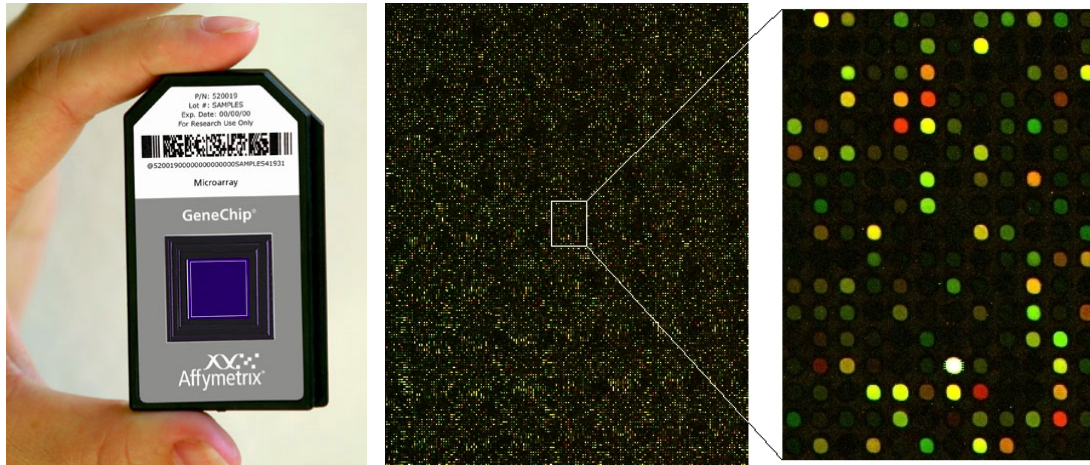
$$2^{\Delta CT} \text{ Wert} = \text{rel. Expressionswert}$$

RNA Analysen

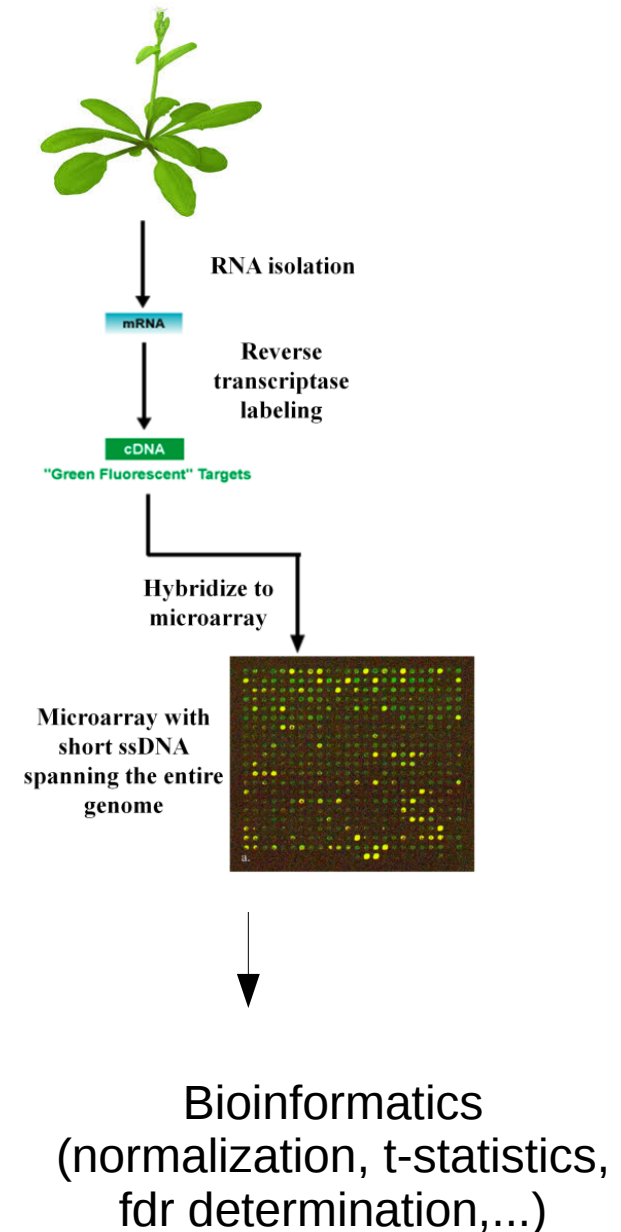
Frage:



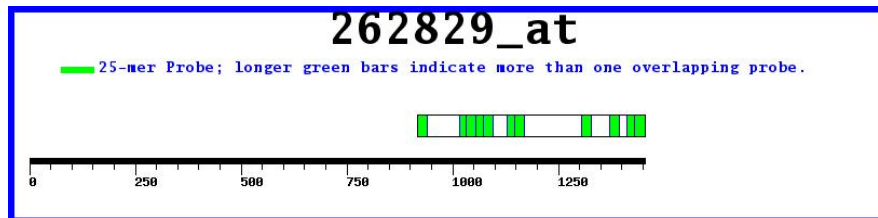
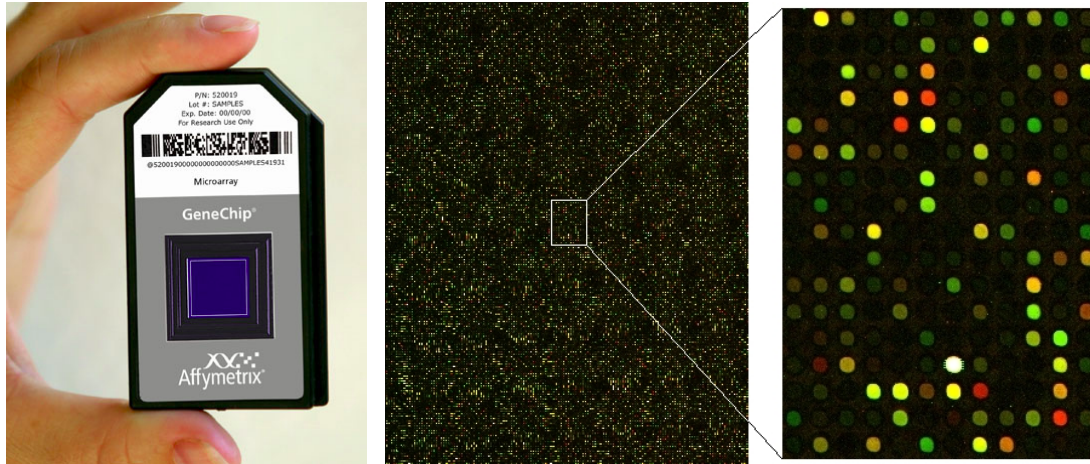
microarray expression analysis



→ 8-12 25 nt Sonden/Gen
→ Fluoreszenzwert des Gens



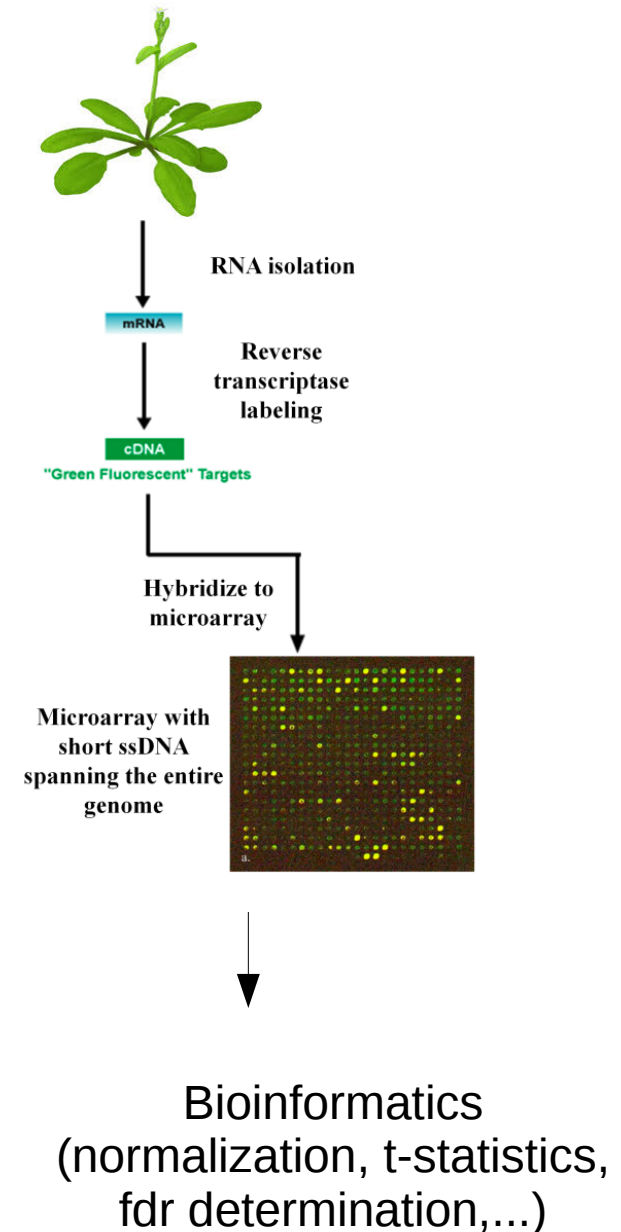
microarray expression analysis



8 12 25 nt Sonden/Con

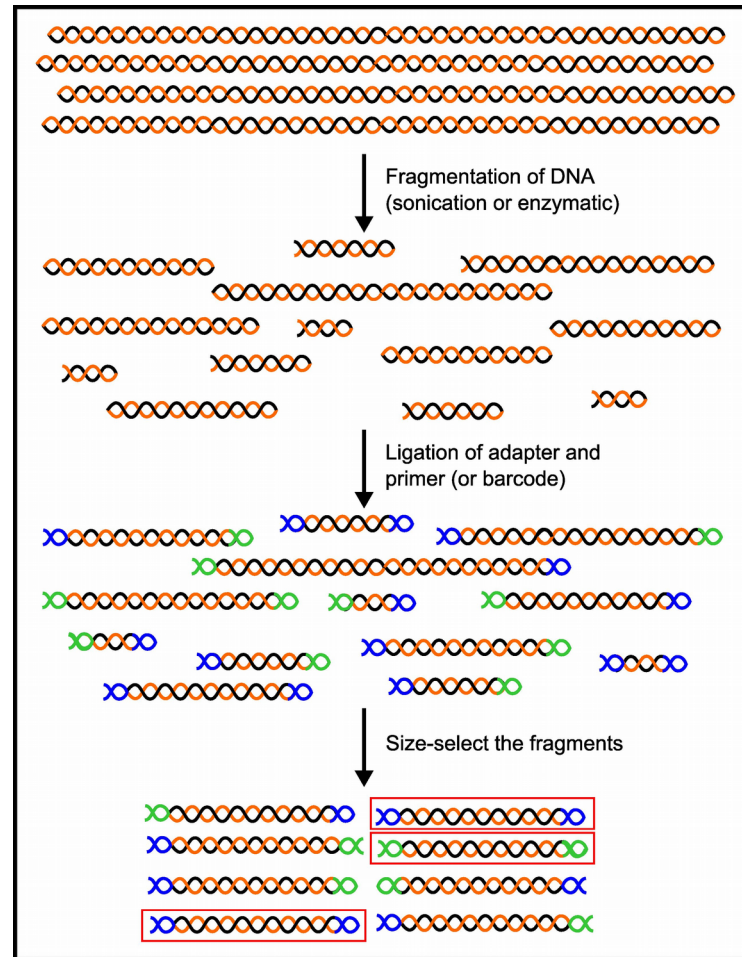
- (rel.) spezifische Info des Transcriptoms
- Quantifizierbar
- etablierte Auswertungssoftware /-pipelines

- (rel.) teuer
- technisch aufwändig (Spez. Gerät) bzw. Firma finden
- eingeschränkte *dynamic range* (Messbereich)



Next Generation Sequencing (NGS)

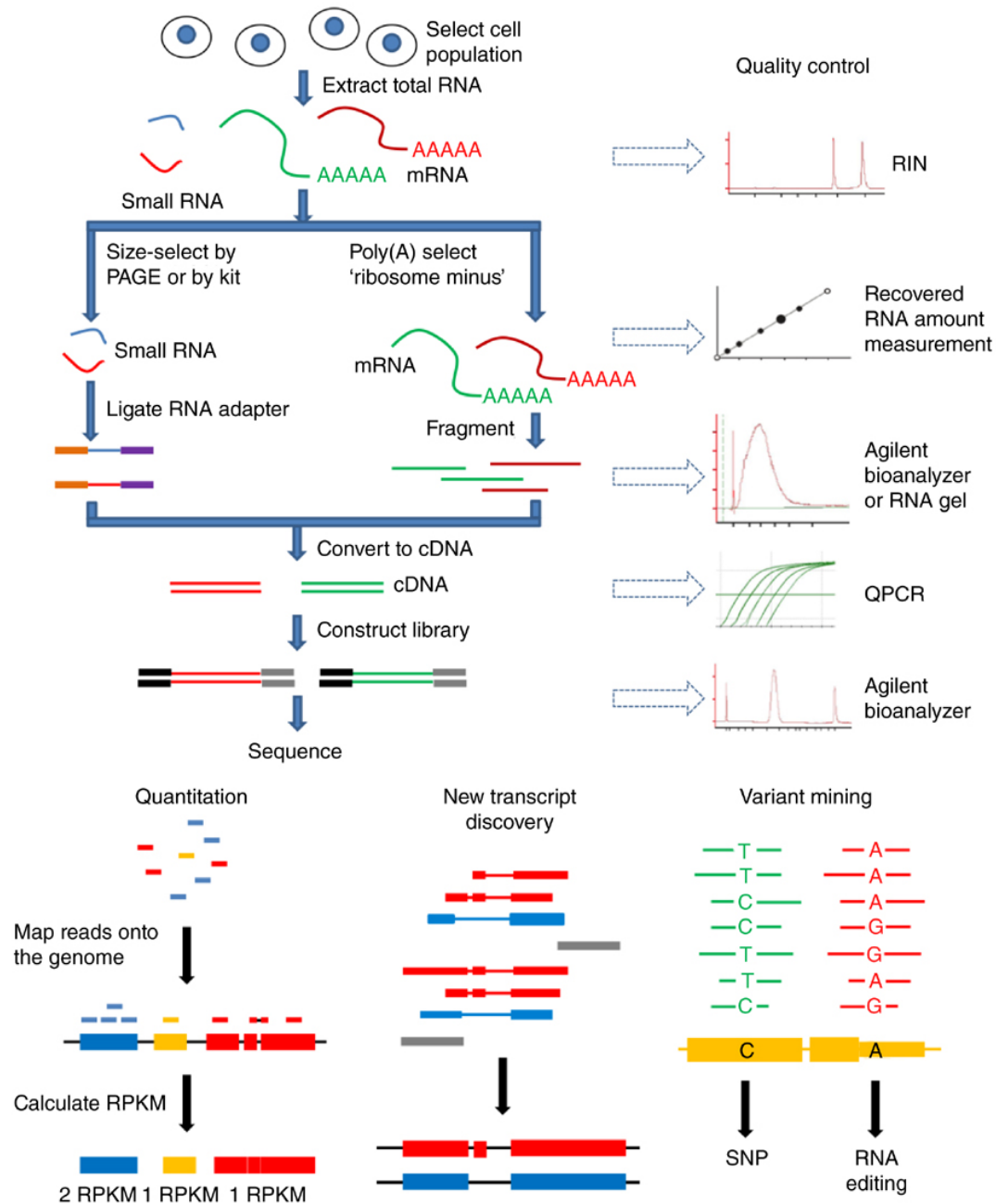
→ DNA oder RNA (cDNA) als template



Bioinformatik

Sequenzierung

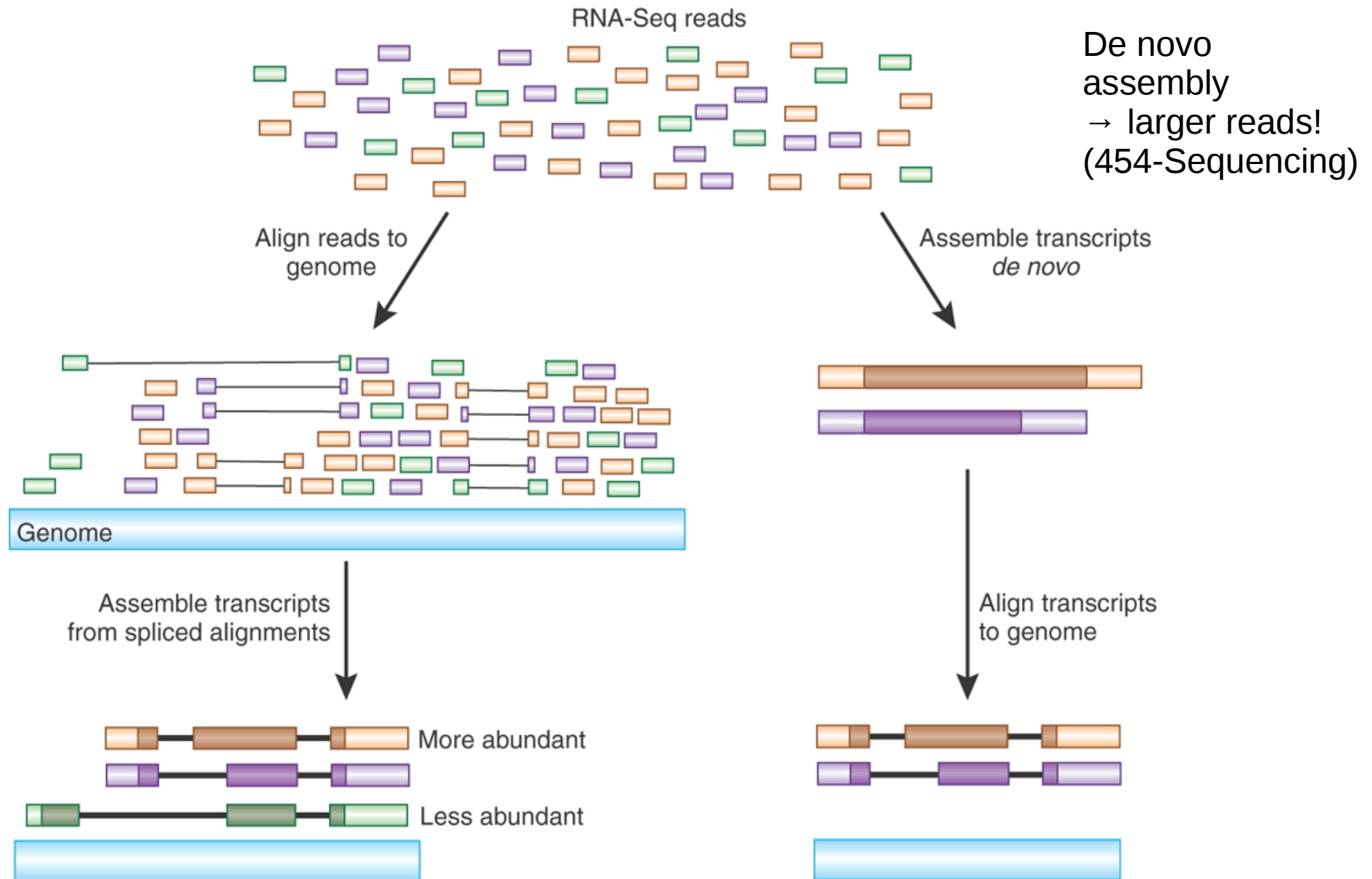
RNAseq



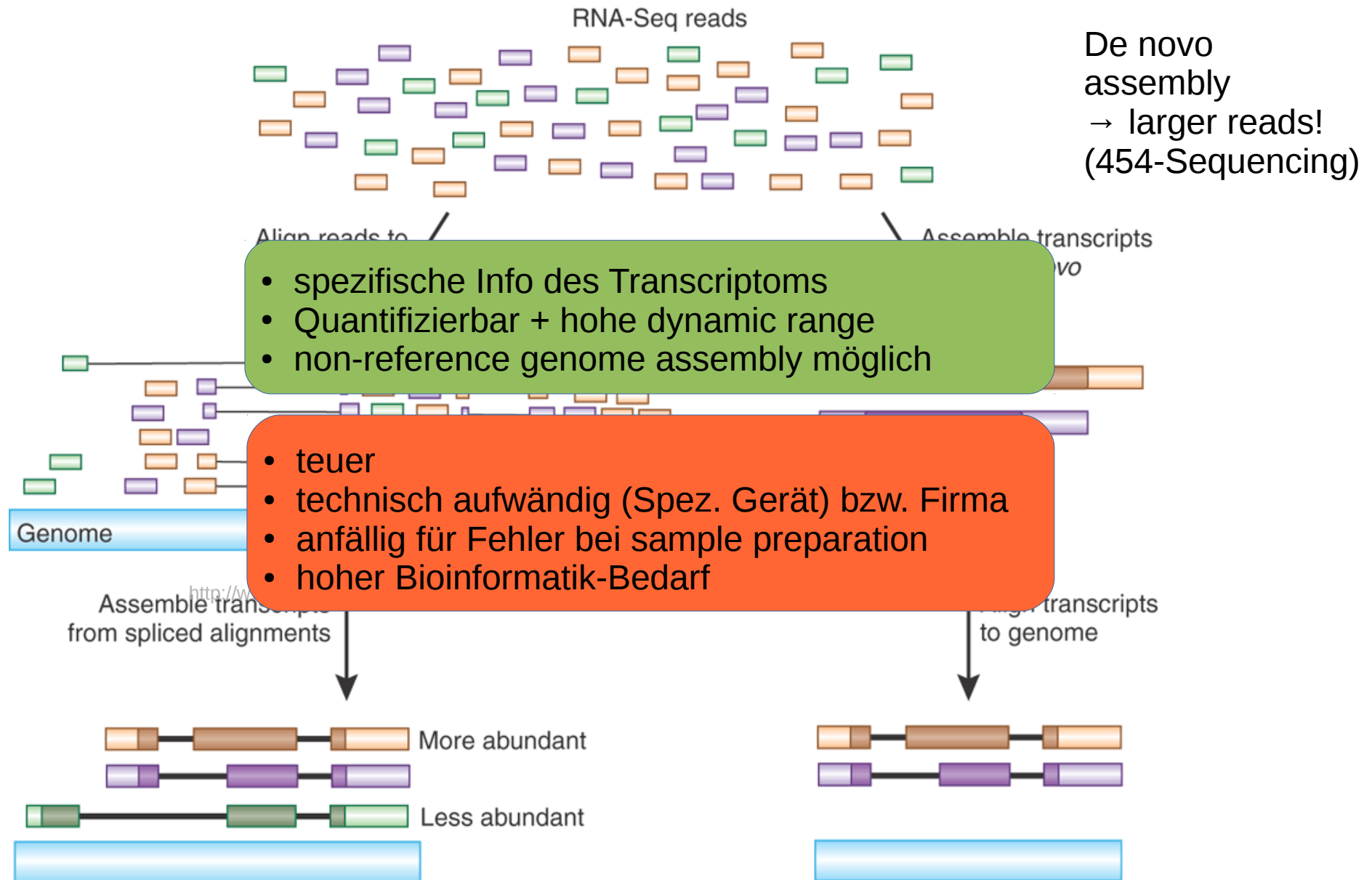
RNA Extraktion + Library prep:
Abhängig vom Ziel der Analyse!
(mRNA, miRNA, splice variants....)

Art der Analyse/Auswertung hängt
von Frage ab + von Qualität der
Daten

RNAseq data analysis



RNAseq data analysis

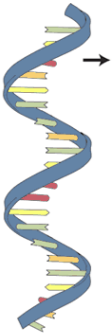


Nachweismethoden



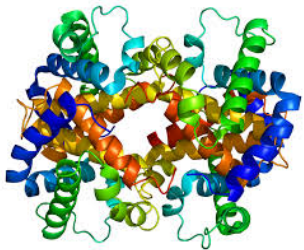
DNA

Southern Blot, Sequenzierung, NGS, PCR, Restriktion, CAPS, SSLP, DNaseI Verdau, CHIP, Y1H, histochemische Promotoranalysen,



RNA

Northern Blot, RT-PCR, RT-qPCR, Microarrays, RNAseq, *in situ* Hybridisierung, miRNA, lncRNA,



Protein

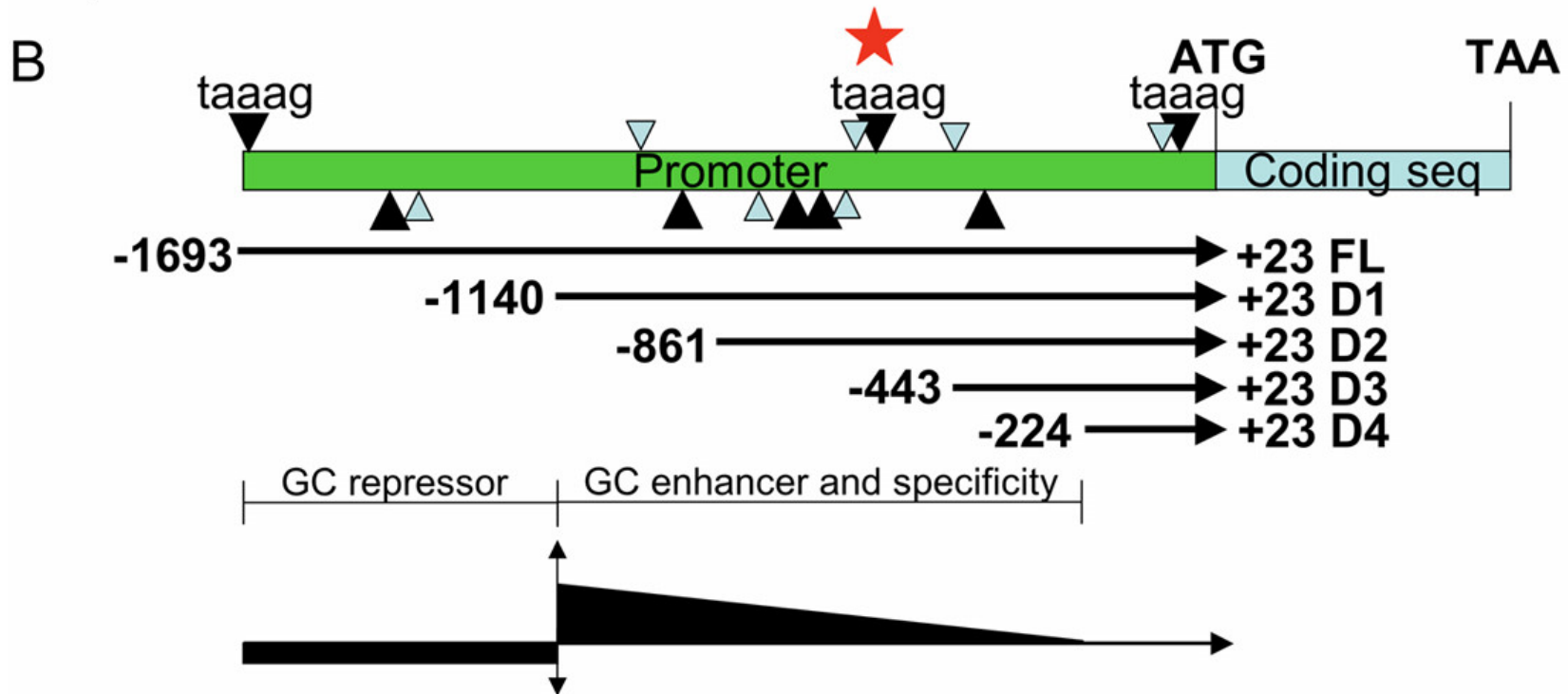
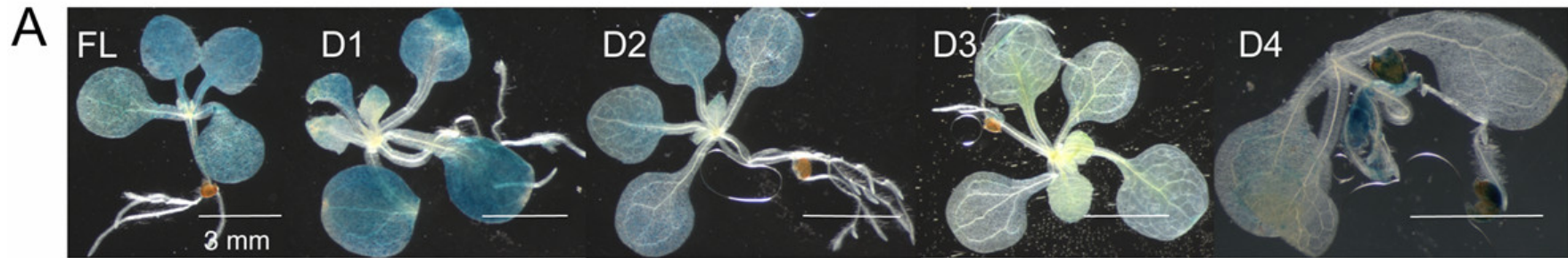
Western Blot, Immunoprecipitation, Lokalisation, Y2H, BIFC, Kristallstrukturanalyse, Enzymassays, structure-function analysis, proteomics

DNA Nachweismethoden

Fragen/Ziele

- Genominformationen
 - de novo Genomsequenzierung (NGS-basiert) → ähnlich der RNAseq Methode
 - Sehr anspruchsvoll bei großen und/oder polyploiden Genomen!
- Identifikation von kausalen Mutationen (genetische screens)
 - klassische Ansätze: Auskreuzen und 3 Punkt Kartierung
 - mapping by sequencing (NGS-basiert) → Mutante, Rückkreuzung oder Auskreuzung
- Promotoranalysen
 - Promoter:Reporter Konstrukte (transkriptionelle Fusionen), Promotordeletionen
 - CHIP Analysen → Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA Abschnitte
- Epigenetische Regulation (→ Analyse von DNA Methylierungen)
-

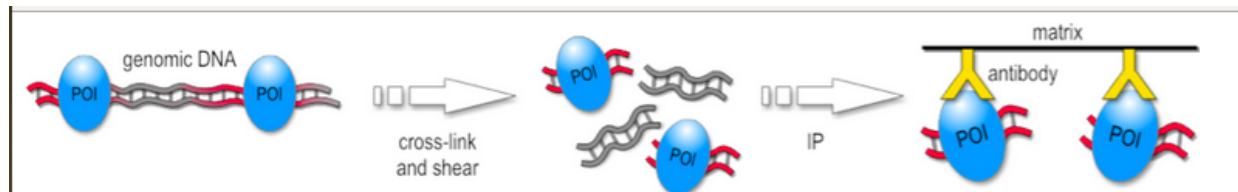
Promotoranalysen



CHIP

Chromatin immuno precipitation (CHIP)

→ Identifizierung / Quantifizierung von Transkriptionsfaktor-DNA Interaktionen



- direkter Nachweis des TFs an DNA
- gut Quantifizierbar

bekannte target genes

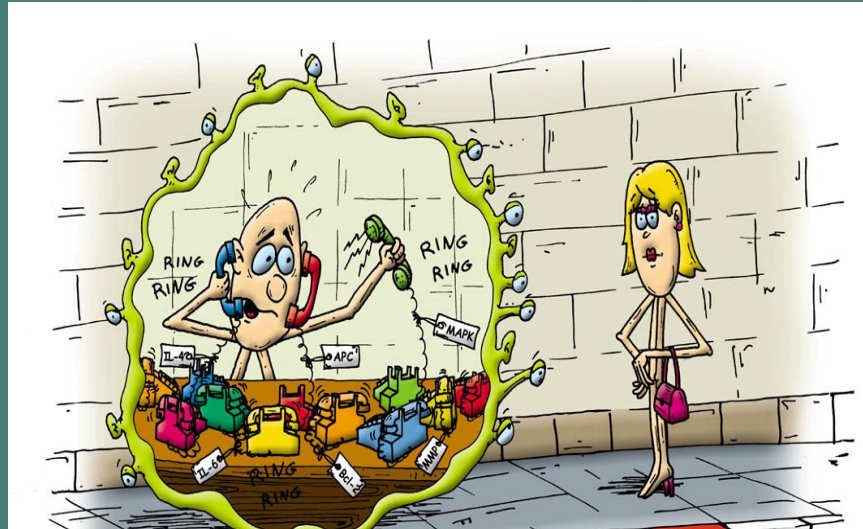
- guter Antikörper oder nötig
- TF level oft niedrig → Überexpression (potentielle Artefakte)
- aufwändig

RNAseq Analyse
Identifizierung
potentieller target genes

Generelle Aspekte

- Jede Nachweismethode kann nur so gut sein wie die zu analysierenden Proben
 - Zeit und Bedingungen der Probennahme gut planen!
 - Haltbarkeit von Material testen/beachten
 - gute Dokumentation → Reproduzierbarkeit
- quantitative Daten sind qualitativen (fast) immer überlegen!!!!
- Kontrollen!!!! Ideal: positiv- und negativ-Kontrollen
- Wenn möglich: immer statistische Auswertung der Daten (→ echte Unterschiede?)
- Ergebnis-offen denken und handeln
- biologische Replikate (technische nur dort wo nötig) - technische + biol. Replikate nie in den gleichen “statistischen Topf werfen”

Molekulare Mechanismen der Signaltransduktion



04 - Lesen, Schreiben, Präsentieren
+ Methodisches? → mail an carolin.delker@landw.uni-halle.de

Folien:
<http://tinyurl.com/Modul-MMS>