

Inhaltsverzeichnis

Vorwort V

Autorenverzeichnis XIX

Abkürzungen XXI

Teil I Grundlagen der Zell- und Molekularbiologie 1

1 **Die Zelle ist die Grundeinheit des Lebens** 3
M. Wink

2 **Aufbau und Funktion der zellulären Makromoleküle** 29

M. Wink

2.1 Aufbau und Funktion der Zucker 8

2.2 Strukturen der Membranlipide 10

2.3 Aufbau und Funktion der Proteine 14

2.4 Aufbau von Nucleotiden und Nucleinsäuren (DNA und RNA) 22

3 **Struktur und Funktion der Zelle** 29

M. Wink

3.1 Aufbau der Eukaryotenzelle 29

3.1.1 Aufbau und Funktion der Cytoplasmamembran 29

3.1.1.1 Membranpermeabilität 30

3.1.1.2 Transportvorgänge an Biomembranen 31

3.1.1.3 Rezeptoren und Signaltransduktion an der Biomembran 34

3.1.2 Das Endomembransystem der Eukaryotenzelle 38

3.1.3 Mitochondrien und Chloroplasten 40

3.1.4 Cytoplasma 46

3.1.5 Cytoskelett 47

3.1.6 Zellwände 50

3.2 Aufbau von Bakterien 51

3.3 Aufbau von Viren 52

3.4 Differenzierung der Zellen 54

4 **Biosynthese und Funktion der Makromoleküle**

(DNA, RNA und Proteine) 59

M. Wink

4.1 Genome, Chromosomen und Replikation 59

4.1.1 Genomgröße 59

4.1.2 Aufbau und Funktion der Chromosomen 64

4.1.3 Mitose und Meiose 66

4.1.4 Replikation 68

4.1.5 Mutationen und Reparaturmechanismen 69

4.2	Transkription: Vom Gen zum Protein	73
4.3	Proteinbiosynthese (Translation)	78
5	Verteilung der Proteine in der Zelle (Protein Sorting)	83
	<i>M. Wink</i>	
5.1	Import und Export von Proteinen über die Kernpore	84
5.2	Import von Proteinen in Mitochondrien und Chloroplasten	85
5.3	Proteintransport in das Endoplasmatische Reticulum	87
5.4	Vesikeltransport vom ER via Golgi-Apparat zur Cytoplasmamembran	88
6	Evolution und Diversität der Organismen	93
	<i>M. Wink</i>	
6.1	Prokaryoten	93
6.2	Eukaryoten	93
Teil II	Standardmethoden der Molekularen Biotechnologie	101
7	Isolierung und Reinigung von Proteinen	103
	<i>T. Wieland, M. Lutz</i>	
7.1	Einleitung	103
7.2	Herstellung eines proteinhaltigen Extrakts	104
7.3	Gelelektrophoretische Trennmethoden	106
7.3.1	Das Prinzip der Elektrophorese	106
7.3.2	Native Gelelektrophorese	106
7.3.3	Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	106
7.3.4	Zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese, Isoelektrische Fokussierung (IEF)	108
7.3.5	Detektion von Proteinen in Gelen	108
7.4	Präzipitationsmethoden	109
7.5	Säulenchromatographische Methoden	110
7.5.1	Allgemein verwendbare Trennprinzipien	110
7.5.1.1	Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration)	110
7.5.1.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	112
7.5.1.3	Ionen austausch-Chromatographie	112
7.5.1.4	Chromatographie an Hydroxylapatit	113
7.5.2	Gruppenspezifische Trennprinzipien	114
7.5.2.1	Chromatographie an Protein A oder Protein G	114
7.5.2.2	Chromatographie an Cibacron Blue (Blaugel)	114
7.5.2.3	Chromatographie an Lektinen	114
7.5.2.4	Chromatographie an Heparin	115
7.5.3	Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen	115
7.5.3.1	Chromatographie an Chelatbildnern	116
7.5.3.2	Chromatographie an Glutathion-Matrizes	116
7.6	Beispiele	116
7.6.1	Beispiel 1: Aufreinigung der Nucleosiddiphosphat-Kinase aus dem Cytosol der Stäbchenzellen der Rinderretina	116
7.6.2	Beispiel 2: Reinigung von rekombinantem His ₆ -RGS16 nach Expression in <i>E. coli</i>	118
8	Peptid- und Proteinanalytik mit Elektrospray-Tandem- Massenspektrometrie	119
	<i>A. Schlosser, W. D. Lehmann</i>	
8.1	Einleitung	119
8.2	Prinzip der Massenspektrometrie	119
8.3	Massenpräzision, Auflösung und Isotopenverteilung	120

8.4	Prinzip der Elektrospray-Ionisation	120
8.5	Tandem-Massenspektrometer	122
8.5.1	Massenanalysatoren	122
8.5.2	Triple-Quadrupol	122
8.5.3	LTQ und LTQ-Orbitrap	123
8.5.4	Q-TOF	123
8.5.5	Q-FT-ICR	123
8.6	Sequenzierung von Peptiden mittels MS/MS	124
8.7	Proteinidentifizierung mittels MS/MS-Daten und Proteindatenbanken	125
8.7.1	Datenbanksuche mit MS/MS-Rohdaten	125
8.8	Molekülmassenbestimmung von Proteinen	126
8.9	Analyse kovalenter Proteinmodifikationen	127
8.10	Relative und Absolute Quantifizierung	129
9	Isolierung von DNA und RNA	131
	<i>H. Weiher, R. Zwacka, I. Herr</i>	
9.1	Einführung	131
9.2	DNA-Isolierung	132
9.3	RNA-Isolierung	133
9.3.1	Messenger-RNA (mRNA)-Anreicherung	134
10	Chromatographie und Elektrophorese von Nucleinsäuren	135
	<i>H. Weiher, R. Zwacka, I. Herr</i>	
10.1	Einführung	135
10.2	Chromatographische Trennung von Nucleinsäuren	135
10.3	Elektrophorese	136
10.3.1	Agarose-Gelelektrophorese-Submarine-Technik	136
10.3.2	Pulsed-Field-Agarose-Gelelektrophorese	137
10.3.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	137
11	Hybridisierung von Nucleinsäuren	139
	<i>H. Weiher, R. Zwacka, I. Herr</i>	
11.1	Bedeutung der Basenpaarung	139
11.2	Experimentelle Hybridisierung, kinetische und thermodynamische Kontrolle	139
11.3	Analysetechniken	140
11.3.1	Klondetektion, Southern-Blot, Northern-Blot und Gendiagnose	140
11.3.2	Systematische Gendiagnose und Expressions-Screening mithilfe von Gen-Arrays	141
11.3.3	<i>In situ</i> -Hybridisierung	141
12	Enzyme zur Modifikation von Nucleinsäuren	143
	<i>A. Groth, R. Zwacka, H. Weiher, I. Herr</i>	
12.1	Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen)	143
12.2	Ligasen	145
12.3	Methyltransferasen	145
12.4	DNÄ-Polymerasen	146
12.5	RNA Polymerasen und Reverse Transkriptasen	147
12.6	Nucleaseen	147
12.7	T4-Polynukleotid-Kinase	148
12.8	Phosphatasen	148
13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	149
	<i>A. Mohr, H. Weiher, I. Herr, R. Zwacka</i>	
13.1	Einleitung	149
13.2	Techniken	149

13.2.1	Standard-PCR 149
13.2.2	RT-PCR 151
13.2.3	Quantitative/Real-Time-PCR 151
13.2.4	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 153
13.3	Anwendungsgebiete 153
13.3.1	Genomanalyse 153
13.3.2	Klonierungsmethode 153
13.3.3	Expressionsstudien 154
14	Sequenzierung von DNA 155
	<i>R. Zwacka, A. Mohr, I. Herr, H. Weiher</i>
14.1	Einleitung 155
14.2	DNA-Sequenzierungsmethoden 155
14.2.1	Chemische Sequenzierungsmethode (Maxam-Gilbert-Methode) 156
14.2.2	Enzymatische Sequenzierung (Sanger-Methode) 156
14.2.3	Pyrosequenzierung 157
14.3	Strategien für die Sequenzierung des humanen Genoms 158
14.4	Praktische Bedeutung der DNA-Sequenzierung 158
15	Klonierungsverfahren 159
	<i>T. Wieland, S. Lutz</i>
15.1	Einleitung 159
15.2	Herstellung rekombinanter Vektoren 160
15.2.1	Das Insert 160
15.2.2	Der Vektor 162
15.2.3	Essentielle Bestandteile von Vektoren 163
15.2.3.1	Der bakterielle Replikationsursprung (<i>origin of replication, ori</i>) 163
15.2.3.2	Die Antibiotikaresistenz 163
15.2.3.3	Der Polylinker 163
15.2.4	Klonieren mit Rekombinationssystemen 164
15.2.5	Weitere Bestandteile von Vektoren für prokaryotische Expressionssysteme 165
15.2.5.1	Der Promotor 165
15.2.5.2	Die Ribosomenbindungsstelle 165
15.2.5.3	Die Terminationssequenz 166
15.2.5.4	Die Fusionssequenz 166
15.2.6	Weitere Bestandteile eukaryotischer Expressionsvektoren 166
15.2.6.1	Eukaryotische Expressionsvektoren für Hefen 167
15.2.6.2	Eukaryotische Expressionsvektoren für Säugerzellen 168
15.2.6.3	Virale Expressionssysteme für Säugerzellen 171
15.2.7	Nonvirale Einbringung heterologer DNA in Wirtsorganismen (Transformation, Transfektion) 172
15.2.7.1	Transformation von Prokaryoten 172
15.2.7.2	Transformation von Hefezellen 173
15.2.7.3	Transfektion von Säugerzellen 173
16	Expression rekombinanter Proteine 175
	<i>T. Wieland, S. Lutz</i>
16.1	Einleitung 175
16.2	Expression von rekombinanten Proteinen in Wirtsorganismen 176
16.2.1	Expression in <i>E. coli</i> 179
16.2.2	Expression in Hefen 180
16.2.3	Expression in Insektenzellen 182
16.2.3.1	Expression mithilfe rekombinanter Baculoviren 182
16.2.3.2	Expression von Proteinen in stabil transfizierten Insektenzellen 183
16.2.4	Expression von Proteinen in Säugerzellen 184
16.3	Expression in zellfreien Systemen 185

16.3.1	Expression von Proteinen in Reticulocytenlysaten	186
16.3.2	Proteinexpression mit <i>E. coli</i> -Extrakten	186
17	Patch-Clamp-Technik	187
	<i>R. Kraft</i>	
17.1	Biologische Membranen und Ionenkanäle	187
17.2	Physikalische Grundlagen und Patch-Clamp-Konfigurationen	188
17.3	Anwendungen der Patch-Clamp-Methode	190
18	Zellzyklusmessungen	193
	<i>S. Wölfl, A. Kitanovic</i>	
18.1	Untersuchung des Zellzyklus	193
18.2	Experimentelle Analyse des Zellzyklus	195
	Eine Beobachtung des Zellzyklus kann in nichtsynchronen (asynchronen) und synchronen Kulturen durchgeführt werden	196
18.2.1	Herstellung synchroner Zellkulturen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	196
18.2.1.1	Zentrifugale Elutriation	196
18.2.1.2	Zentrifugale Elutriation	197
18.2.2	Nachweis der Zellzyklusstadien	198
18.2.2.1	Knospungsindex	198
18.2.2.2	Fluoreszenzfärbung des Kerns	198
19	Mikroskopie-Techniken	203
	<i>S. Diekmann</i>	
19.1	Elektronenmikroskopie	203
19.1.1	Kryo-Elektronenmikroskopie	204
19.1.2	Elektronen-Tomographie	205
19.2	Rasterkraftmikroskopie	205
19.2.1	Messung intramolekularer Bindungskräfte	207
19.3	Lichtmikroskopie	207
19.3.1	Phasenkontrastmikroskopie	208
19.3.2	Polarisations- und Interferenzmikroskopie	208
19.3.3	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	209
19.3.4	Nanoskopie	210
19.4	Mikroskopie in der lebenden Zelle	211
19.4.1	Untersuchung Fluoreszenz-markierter Proteine <i>in vivo</i>	212
19.4.2	FRAP	213
19.4.3	FCS	213
19.4.4	FRET, FLIM	214
20	Laseranwendungen	217
	<i>M. Vogel, R. Fink</i>	
20.1	Laserprinzip	217
20.2	Eigenschaften der Laserstrahlung	219
20.3	Aufbau und Lasertypen	219
20.4	Anwendungen	220
20.4.1	Laser-Scan-Mikroskopie	220
20.4.2	Optische Pinzette	221
20.4.3	Laser-Mikrodissektion	222
Teil III	Schwerpunktthemen der Molekularen Biotechnologie	223
21	Genomik und Funktionelle Genomik	225
	<i>S. Wiemann, M. Frohme</i>	
21.1	Einleitung	225
21.2	Technologieentwicklung in der DNA-Sequenzierung	227

21.3	Genomsequenzierung 228
21.3.1	Kartierung 228
21.3.1.1	Restriction Mapping und Restriction Fingerprinting 231
21.3.1.2	BAC-End-Sequenzierung 231
21.3.1.3	Genetische Kartierung 233
21.3.1.4	Radiation Hybrid-Mapping 234
21.3.1.5	HAPPY-Mapping 235
21.3.1.6	Kartierung durch Hybridisierung 235
21.3.1.7	STS, ESTs, SNPs und Sequenzlängen-Polymorphismen (AFLP) 238
21.3.1.8	FISH, Fibre Fish, Optical Mapping und CGH 239
21.3.2	Zeitachse der Genomsequenzierung 240
21.3.3	Genom-Sequenzierungsstrategien 242
21.3.3.1	Konventioneller Ansatz – <i>Random-Shotgun-Strategie</i> 242
21.3.3.2	Die <i>Whole-Genome-Shotgun-Strategie</i> 243
21.3.3.3	Die Sequenzierung des menschlichen Genoms 245
21.3.4	Ausblick der Genomsequenzierung 246
21.4	cDNA-Projekte 247
21.4.1	cDNA-Bibliotheken repräsentieren mRNA der Zelle 247
21.4.2	Die Herstellung von cDNA-Bibliotheken 249
21.4.3	EST-Projekte zur Genidentifizierung 251
21.4.4	Voll-Länge-Projekte zur Herstellung von Ressourcen für die Funktionelle Genomik 253
21.5	Funktionelle Genomik 255
21.6	Die Identifizierung und Analyse einzelner Gene 257
21.6.1	Positional Cloning 257
21.6.2	Gene Trap 260
21.6.3	DNA-RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung 261
21.6.4	Tissue-Arrays 261
21.7	Die Untersuchung transkriptioneller Aktivität 262
21.7.1	SAGE 263
21.7.2	Subtraktive Hybridisierung 264
21.7.3	RNA-Fingerprinting 266
21.7.4	Array basierende Techniken 268
21.7.4.1	Makroarrays 271
21.7.4.2	Mikroarrays 272
21.7.4.3	Globale und spezifische Arrays 274
21.7.5	Spezifität und Sensitivität 275
21.8	Zellbasierte Methoden 276
21.8.1	GFP-Techniken 276
21.8.2	Alternativen zu GFP 277
21.8.3	FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer 278
21.8.4	FRAP – Fluorescence Recovery After Photobleaching 279
21.8.5	Zellbasierte Assays 280
21.8.5.1	Assay Design 280
21.8.5.2	Pipettiersysteme 280
21.8.5.3	Datenaufnahme 281
21.8.5.4	Datenanalyse 282
21.9	Die funktionelle Analyse ganzer Genome 283
21.9.1	Genotypisches Screening in der Hefe 283
21.9.2	Phänotypisches Screening in der Maus 284
22	Bioinformatik 287
	<i>B. Brors</i>
22.1	Einleitung 287
22.2	Datenquellen 288
22.2.1	Primärdatenbanken: EMBL/GenBank/DDJB, PIR, SwissProt 288
22.2.2	Genomdatenbanken: Ensembl, GoldenPath 289

22.2.3	Motivdatenbanken: BLOCKS, Prosite, PFAM, ProDom, SMART	289
22.2.4	Molekulare Strukturdatenbanken: PDB, SCOP	289
22.2.5	Transkriptomdatenbanken: SAGE, ArrayExpress, GEO	290
22.2.6	Referenzdatenbanken: PubMed, OMIM, GeneCards	290
22.2.7	Pathway-Datenbanken, <i>Gene Ontology</i>	291
22.3	Sequenzanalyse	291
22.3.1	Kyte-Doolittle, Helical Wheel, Signalsequenzanalyse	291
22.3.2	Paarweiser Vergleich (<i>Alignment</i>)	293
22.3.2.1	Lokal/global	294
22.3.2.2	Optimal/heuristisch	294
22.3.3	<i>Alignment</i> -Statistik	294
22.3.4	Multiples <i>Alignment</i>	295
22.4	Evolutionäre Bioinformatik	296
22.4.1	Statistische Modelle der Evolution	297
22.4.2	Zusammenhang mit Score-Matrizen	298
22.4.3	Phylogenetische Analyse	298
22.5	Genvorhersage	300
22.5.1	Neuronale Netze oder Hidden-Markov-Modelle auf Grundlage der Hexanucleotidzusammensetzung	300
22.5.2	Vergleich mit ESTs oder anderen Genomen (Fugu, Maus)	301
22.6	Bioinformatik in der Transkriptom- und Proteomanalyse	302
22.6.1	Vorverarbeitung, Normalisierung	302
22.6.2	Merkmalsauswahl	303
22.6.3	Ähnlichkeitsmaße: Euklidische Distanz, Korrelation, Manhattan-, Mahalanobis-Distanz, Entropiemaße	304
22.6.4	Unüberwachte Lernverfahren: Clusterung, Hauptkomponentenana- lyse, Multidimensionale Skalierung, Korrespondenzanalyse	304
22.6.5	Überwachte Lernverfahren: Lineare Diskriminanzanalyse, Entscheidungsbäume, <i>Support Vector Machines</i> , künstliche neuronale Netze	305
22.6.6	Analyse der Überrepräsentation funktioneller Kategorien	307
22.7	Bioinformatische Software	308
23	Zelluläre System-Biologie	309
	R. König, B. Brors, H. Schmidt-Glenewinkel, S. Legewie	
23.1	Einleitung	309
23.2	Zelluläre Netzwerkanalyse mit <i>Top-Down</i> -Ansätzen	310
23.2.1	Motivation	310
23.2.2	Definitionen und Rekonstruieren der Netzwerke	311
23.2.3	Anreicherungstests von Gengruppen	312
23.2.4	Attribute zur Netzwerktopologie	313
23.2.4.1	Skalenfreie Netze	313
23.2.4.2	Dreiecksmotive	314
23.2.4.3	Zentralität und weitere Topologiemerkmale	314
23.2.5	Maschinenlernverfahren finden essentielle Enzyme	316
23.2.6	Elementare Flussmoden (<i>Elementary flux modes</i>)	317
23.2.7	Rekonstruieren der Regulation durch Bool'sche und Bayes'sche Netzwerke	319
23.3	Überblick zur <i>Bottom-Up</i> -Modellierung biochemischer Netzwerke	320
23.3.1.1	Motivation	320
23.3.1.2	Modellkomplexität	320
23.3.1.3	Modellerstellung	321
23.3.2.4	Modellsimulation	322
23.3.1.5	Modellkalibrierung	323
23.3.1.6	Modelbestätigung	325
23.3.1	Biologische Beispiele	325

24	Protein–Protein- und Protein–DNA-Interaktionen 269
	<i>P. Uetz, E. Pohl</i>
24.1	Protein–Protein-Interaktionen 332
24.1.1	Klassifikation und Spezifität: Proteindomänen 332
24.1.2	Proteinnetzwerke und -komplexe 333
24.1.3	Strukturmerkmale interagierender Proteine 333
24.1.4	Welche Kräfte vermitteln eine Protein–Protein-Interaktion? 335
24.1.4.1	Thermodynamik 335
24.1.4.2	Energetik 336
24.1.5	Methoden zur Untersuchung von Protein–Protein-Interaktionen 337
24.1.6	Regulation von Protein–Protein-Interaktionen 337
24.1.7	Theoretische Vorhersage von Protein–Protein-Interaktionen 340
24.1.7.1	Vorhersage von interagierenden Proteinen anhand von Genomsequenzen 340
24.1.7.2	Phylogenetische Profile 340
24.1.8	Biotechnische und medizinische Anwendungen von Protein–Protein-Interaktionen 341
24.2	Protein–DNA-Interaktionen 341
24.2.1	Sequenzspezifische DNA-Bindung 341
24.2.2	Thermodynamische Überlegungen zu Protein–DNA-Komplexen 342
24.2.3	Methoden zum Studium von Protein–DNA-Wechselwirkungen 342
24.2.3.1	Strukturelle Klassifizierung von Protein–DNA-Komplexen 343
24.2.4	Regulatorische Netzwerke und Systembiologie 343
24.2.5	Medizinische Bedeutung von Protein–DNA-Wechselwirkungen 345
24.2.6	Biotechnologische Anwendungen von Protein–DNA-Interaktionen 345
24.2.6.1	Synthetische Biologie 346
25	Wirkstoffforschung 347
	<i>M. Koegl, R. Tolle, U. Deuschle, C. Kremoser</i>
25.1	Einleitung 347
25.2	Wirkstoffe und Wirkorte 347
25.2.1	Identifizierung von potenziellen Targets im menschlichen Genom 349
25.2.2	Vergleichende Genomanalyse 350
25.2.3	Experimentelle Target-Identifizierung <i>In-vitro</i> -Methoden 351
25.2.4	Experimentelle Target-Identifizierung – Modellorganismen 352
25.2.5	Experimentelle Target-Identifizierung am Menschen 352
25.2.6	Der Unterschied zwischen Target-Kandidaten und echten Targets 353
25.2.7	Biologicals 355
25.2.8	DNA und RNA als neue therapeutische Ansätze 355
25.2.9	Schutz von Targets durch Patente 356
25.2.10	Substanzbanken dienen als Reservoir zur Wirkstofffindung 357
25.2.11	Screening im Hochdurchsatz 358
25.2.12	Screening-Assays müssen von hoher Qualität sein 359
25.2.13	Virtuelles Liganden-Screening 361
25.2.14	Effizienz und Potenz beschreiben die Aktivität von Wirkstoffen 361
25.2.15	Leitstrukturen werden chemisch optimiert (<i>lead-optimization</i>) 362
25.3	Die präklinische Pharmakologie und Toxikologie 362
25.4	Die klinische Entwicklung 364
25.5	Die klinische Prüfung 364

26	Drug Targeting und Prodrugs	367
	<i>G. Fricker</i>	
26.1	Drug Targeting	367
26.1.1	Passives Targeting mittels Ausnutzung physiologischer Besonderheiten des Zielgewebes	368
26.1.2	Physikalisches Targeting	368
26.1.3	Aktives Targeting	369
26.1.4	Zelluläre Trägersysteme	373
26.2	Prodrugs	373
26.2.1	Prodrugs zur Verbesserung der Wirkstofflöslichkeit	374
26.2.2	Prodrugs zur Erhöhung der Stabilität	374
26.3	Penetration von Wirkstoffen durch biologische Membranen	374
26.4	Prodrugs zur Verlängerung der Wirkungsdauer	376
26.5	Prodrugs zur zielgerichteten Wirkstoffabgabe	376
26.6	Prodrugs zur Verringerung von Nebenwirkungen	377
27	Molekulare Diagnostik in der Medizin	379
	<i>S. Wölfl, R. Gessner</i>	
27.1	Anwendungen der Molekularen Diagnostik	379
27.1.1	Einführung	379
27.1.2	Monogene und polygene Krankheiten	380
27.1.3	Individuelle Variabilität im Genom: Forensik	382
27.1.4	Individuelle Variabilität im Genom: HLA-Typisierung	382
27.1.5	Individuelle Variabilität im Genom: Pharmakogenomik	382
27.1.6	Individuelle Variabilität im Genom: Anfälligkeit für Infektionskrankheiten	383
27.1.7	Virusdiagnose	383
27.1.8	Mikrobielle Diagnose und Resistenzdiagnose	384
27.2	Welche molekularen Variationen müssen nachgewiesen werden?	385
27.2.1	Punktmutationen	385
27.2.2	Insertionen und Deletionen	386
27.2.3	Nucleotidwiederholungen	386
27.2.4	Deletion oder Duplikation von Genen	387
27.2.5	Rekombination zwischen Chromosomen	387
27.2.6	Epigenetische Veränderungen	388
27.3	Verfahren der Molekularen Diagnostik	388
27.3.1	DNA/RNA-Aufreinigung	389
27.3.2	Bestimmung bekannter Sequenzvariationen	389
27.3.2.1	Direkter Längenpolymorphismus	389
27.3.2.2	RFLP (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen)	389
27.3.2.3	ACRS (<i>amplification-created restriction sites</i>)	390
27.3.2.4	ARMS (amplification refractory mutation system)	391
27.3.2.5	MS-PCR	391
27.3.2.6	Allelspezifische Hybridisierung	391
27.3.2.7	LCR	392
27.3.2.8	Minisequenzierung	392
27.3.2.9	Pyrosequenzierung	392
27.3.2.10	Quantitative PCR	393
27.3.2.11	Chip-Technologie	394
27.3.2.12	Aufbau und Herstellung von Mikroarrays	394
27.3.2.13	Bestimmung unbekannter Mutationen	396
27.4	Ausblick	397

28	Rekombinante Antikörper und Phagen-Display 399 <i>S. Dübel</i>
28.1	Einführung 399
28.2	Warum rekombinante Antikörper? 401
28.2.1	Rekombinante Antikörper lassen sich ohne Immunisierung <i>in vitro</i> gewinnen 401
28.2.2	Antikörper mit neuen Eigenschaften können erzeugt werden 401
28.3	Gewinnung spezifischer rekombinanter Antikörper 402
28.3.1	Bereitstellung der Vielfalt an Antikörpergenen 402
28.3.2	Selektionssysteme für rekombinante Antikörper 403
28.3.2.1	Transgene Mäuse 403
28.3.2.2	<i>In-vitro</i> -Selektionssysteme 404
28.4	Herstellung rekombinanter Antikörper 407
28.4.1	Rekombinante Produktionssysteme 407
28.4.2	Reinigung rekombinanter Antikörper und ihrer Fragmente 407
28.5	Formate für rekombinante Antikörper 409
28.5.1	Monospezifische Antikörperfragmente 409
28.5.1.1	Fab-Fragmente 409
28.5.1.2	Fv-Fragmente 411
28.5.1.3	Single-chain-Antikörperfragmente (scFv) 411
28.5.1.4	Single-chain-Fab-Fragmente (scFab) 411
28.5.1.5	Disulfidbrücken stabilisierte Fv-Fragmente (dsFv) 412
28.5.1.6	V _H - und Kamel-Antikörper 412
28.5.2	Multivalente Antikörperfragmente 412
28.5.2.1	Bifunktionelle Antikörperfragmente 413
28.5.2.2	Bispezifische Antikörper 413
28.6	Anwendungen für rekombinante Antikörper 416
28.6.1	Klinische Anwendungen 416
28.6.2	Anwendungen in der Forschung und der <i>In-vitro</i> -Diagnostik 417
28.6.2.1	Rekombinante Antikörper mit kontrollierbarer Kreuzreakтивität 417
28.6.2.2	Intrazelluläre Antikörper 417
28.6.2.3	Rekombinante Antikörper für die Proteomforschung 417
28.7	Ausblick 418
29	Genetisch veränderte Mäuse (Transgene und Knock(in)out-Mäuse) und deren Bedeutung in der Biomedizin 419 <i>R. Sprengel</i>
29.1	Überblick 419
29.2	Transgene Mäuse 420
29.2.1	Die retrovirale Infektion 420
29.2.2	Die Pronukleus-Injektion 421
29.3	Die homologe Rekombination: Knock-in/out-Mäuse 422
29.4	Konditional regulierte Genexpression 424
29.5	Die Bedeutung genetisch veränderter Mäuse in der Biomedizin 425
29.5.1	Alzheimer-Krankheit 425
29.5.2	Amyotrophe Lateralsklerose 425
29.5.3	Mentale Erkrankungen 426
29.6	Ausblick 426
30	Gentherapie: Strategien und Vektoren <i>A. Groth, I. Herr</i>
30.1	Einführung 429
30.2	Prinzipien der somatischen Gentherapie 430
30.3	Die Keimbahntherapie 432
30.4	Rückschläge in der Gentherapie 432
30.5	Vektoren für die Gentherapie 433
30.5.1	Retrovirale Vektoren 434

- 30.5.2 Adenovirale Vektoren 436
30.5.3 Adeno-assoziierte Vektoren (AAV) 438
30.5.4 Andere virale Vektoren 440
30.6 Spezifische Expression 441
- 31 Modifizierte DNA, PNA und ihre Anwendungen in der Medizin und Biotechnologie 443**
N. Metzler-Nolte, A. Sosniak
- 31.1 Einleitung 443
31.2 Modifizierte Nucleinsäuren 444
31.2.1 Phosphorthioate 444
31.2.2 Methylphosphonate 446
31.2.3 Peptid-Nucleinsäuren (PNA) 446
31.3 Wechselwirkung von DNA-Analoga mit komplementärer DNA und RNA 447
31.3.1 Schmelztemperatur 447
31.3.2 Mismatch-Empfindlichkeit 449
31.4 RNA Interferenz 450
31.4.1 Biogenese kleiner RNA Moleküle 450
31.4.1.1 Biogenese von siRNAs 450
31.4.1.2 Biogenese von miRNAs 450
31.4.2 Einlagerung in den *RNA-induced silencing complex (RISC)* 451
31.4.3 Posttranskriptionale Repression durch miRNA und siRNA 451
31.5 Anwendungen 453
31.5.1 Antisense-Technik mit DNA-Analoga 453
31.5.2 siRNA in biotechnologischen Anwendungen 454
31.5.2.1 Design von siRNAs 455
31.5.2.2 Nicht vektorielle Applikationen 456
31.5.2.3 Vektorielle Applikationen 456
31.5.3 Vergleich von RNAi mit DNA-Analoga für Antisense-Anwendungen 458
- 32 Pflanzliche Biotechnologie 459**
H. Hillebrand, R. Hell
- 32.1 Einleitung 459
32.1.1 Die „grüne“ Gentechnologie – eine neue Methode auf dem Weg zu traditionellen Zielen 459
32.1.2 Besondere Anforderungen und aktuelle Forschungsgebiete der Pflanzenbiotechnologie 460
32.2 Genregulation 461
32.3 Produktion transgener Pflanzen 462
32.3.1 Transformationssysteme 463
32.3.1.1 *Agrobacterium* als natürliches Transformationssystem 463
32.3.1.2 Biolistische Methode: *Gene Gun* 465
32.3.1.3 Plastidentransformation 467
32.3.1.4 Virale Systeme 468
32.4 Selektion transformierter Pflanzenzellen 468
32.4.1 Anforderungen an ein optimales Selektionsmarkersystem 469
32.4.2 Negative Selektionsmarkersysteme 470
32.4.3 Positive Selektionsmarkersysteme 471
32.4.4 Gegenselektion mit bifunktionalen Markergenen 472
32.4.5 Visuelle Marker 472
32.4.6 Selektionssysteme, Gentechniksicherheit und markerfreie Pflanzen 473
32.5 Regeneration transgener Pflanzen 475
32.5.1 Verfahren der Regeneration 475
32.5.2 Zusammensetzung von Regenerationsmedien 475

32.6	Analyse pflanzlicher Genome: Nachweis und Charakterisierung transgener Pflanzen 476
32.6.1	DNA- und RNA-Nachweise 476
32.6.2	Proteinnachweise 478
32.6.3	Genetische und molekulare Karten 478
32.6.4	Stabilität transgener Pflanzen 479
33	Biokatalyse in der chemischen Industrie 481
	<i>M. Breuer, B. Hauer</i>
33.1	Einleitung 481
33.2	Biotransformationen/enzymatische Verfahren 485
33.3	Entwicklung eines Enzyms für die industrielle Biokatalyse 487
33.3.1	Identifizierung neuartiger Biokatalysatoren 487
33.3.2	Verbesserung von Biokatalysatoren 489
33.3.3	Produktion von Biokatalysatoren 489
33.3.4	Ausblick 490
33.3.5	Fallbeispiel 1: Screening nach neuen Nitrilasen 490
33.3.6	Fallbeispiel 2: Verwendung bekannter Enzyme für neue Reaktionen: Lipasen zur Herstellung optisch aktiver Amine und Alkohole 491
33.3.7	Fallbeispiel 3: Enzymoptimierung mit rationalen und evolutiven Methoden 493
33.4	Fermentative Verfahren 493
33.4.1	Verbesserung fermentativer Verfahren 494
33.4.2	Klassische Stammbiotypierung 494
33.4.3	Metabolic Engineering 496
33.4.4	Fallbeispiel 4: Fermentative Herstellung von <i>n</i> -Butanol 497
33.4.5	Fallbeispiel 5: Herstellung von Glutaminsäure mit <i>Corynebacterium glutamicum</i> 498
33.4.5.1	Molekularer Mechanismus der Glutamatüberproduktion 499
33.4.6	Fallbeispiel 6: Herstellung von Lysin mit <i>Corynebacterium glutamicum</i> 500
33.4.6.1	Molekularer Mechanismus der Lysinbiosynthese 500
33.4.6.2	Deregulierung des Schlüsselenzyms Aspartat-Kinase 501
33.4.7	Genomforschung und funktionelle Genomik 502
33.4.8	Fallbeispiel 7: Fermentative Penicillinproduktion 503
33.4.9	Fallbeispiel 8: Vitamin-B2-Produktion 503
33.4.9.1	Riboflavinbiosynthese 504
33.4.9.2	Klassische Stammbiotypierung 504
Teil IV	Wirtschaftliche Perspektiven der Molekularen Biotechnologie 505
34	Industrielle Umsetzung (Biotech-Industrie, Märkte und Chancen) 507
	<i>J. Schüler</i>
34.1	Geschichtlicher Überblick und Begriffsdefinitionen 507
34.2	Industrielle Anwendungsbereiche der molekularen Biotechnologie 508
34.2.1	Rote Biotechnologie 509
34.2.1.1	Biopharmazeutische Wirkstoffentwicklung 509
34.2.1.2	Drug Delivery 512
34.2.1.3	Zell- und Gentherapie 512
34.2.1.4	<i>Tissue Engineering/Regenerative Medizin</i> 513
34.2.1.5	Pharmakogenomik und personalisierte Medizin 514
34.2.1.6	Molekulardiagnostika 515
34.2.1.7	Systembiologie 516
34.2.2	Grüne Biotechnologie 516
34.2.2.1	Transgene Pflanzen 516
34.2.2.2	Genomik-Ansätze in der grünen Biotechnologie 517

34.2.2.3	„Novel Food“ und „Functional Food“	517
34.2.2.4	Tierzucht	518
34.2.3	Weisse und graue Biotechnologie	518
34.3	Status Quo der Biotech-Industrie weltweit	518
34.3.1	Globaler Überblick	519
34.3.2	USA	519
34.3.3	Europa	519
34.3.4	Deutschland	519
35	Patente und Schutz von Ideen	521
	<i>C. Amshoff</i>	
35.1	Allgemeine Einführung	521
35.1.1	Übersicht über die Besonderheiten im Gewerblichen Rechtsschutz	522
35.1.2	Aspekte des Patentrechts	522
35.1.2.1	Kriterien für die Patentfähigkeit	523
35.1.2.2	Rechte aus dem Patent	525
35.2	Biotechnologische Erfindungen	526
35.2.1	Patentierbare biotechnologische Gegenstände	527
35.2.1.1	Allgemeine Merkmale für patentierbare, biotechnologische Gegenstände	527
35.2.1.2	Beispiele aus der Praxis	528
35.2.2	Nichtpatentierbare biotechnologische Erfindungen	529
35.2.3	Ethische Überlegungen	530
36	Zulassung von Arzneimitteln in der Europäischen Union und den Vereinigten Staaten	531
	<i>G. Walsh</i>	
36.1	Einführung	531
36.2	Regulierung innerhalb der Europäischen Union	531
36.2.1	Der regulatorische Rahmen der EU	531
36.2.2	EMA	532
36.2.3	Neue Wege der Arzneimittelzulassung	534
36.2.3.1	Das zentralisierte Verfahren	534
36.2.3.2	Gegenseitige Anerkennung	535
36.3	Regulierung in den USA	535
36.3.1	CDER und CBER	536
36.3.2	Das Zulassungsverfahren	537
36.4	Die Einführung und Regulierung von Biosimilars	539
36.5	Internationale Harmonisierung der Regulierung	540
37	Zusammenspiel zwischen Big Pharma und Biotech-Start-up-Unternehmen	543
	<i>C. Kremoser</i>	
37.1	Entwicklung der pharmazeutischen und der biotechnologischen Industrie	543
37.2	Was unterscheidet Biotechnologie- von Pharmafirmen?	547
37.3	Kulturelle Unterschiede zwischen Big Pharma und Biotech	548
38	Das kleine 1x1 der Firmengründung	551
	<i>C. Kremoser</i>	
38.1	Die ersten Schritte zur eigenen Firma	551
38.2	Businessplan	552
38.3	Finanzierung und Risikokapital	555
38.4	Mitarbeiter: Rekrutierung, Entlohnung, Erfolgsbeteiligung	559
38.5	Die ersten Schritte mit der eigenen Firma, Erfolgsfaktoren	563

39	Marketing	565
	<i>C. Kremoser</i>	
39.1	Einführung	565
39.2	Welche Arten von <i>Deals</i> gibt es?	566
39.2.1	Was wird an Meilensteinen bzw. Lizenzgebühren bei einer Biotech/Pharma-Kooperation wirklich gezahlt?	567
39.3	<i>Public Relations</i> (PR) und <i>Investor Relations</i> (IR) für Biotech-Firmen	568

Anhang	571
---------------	------------

Weiterführende Literatur	573
---------------------------------	------------

Glossar	589
----------------	------------

<i>M. Wink</i>	
----------------	--

Sachverzeichnis	629
------------------------	------------