

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 (<i>Protein Sorting</i>)	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 Trennmethode	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	Ionenaustausch-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-Matrices	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 (Restriktionsendonucleasen)	143
12.2	Ligasen	145
12.3	Methyltransferasen	145
12.4	DNA-Polymerasen	146
12.5	RNA Polymerasen und Reverse Transkriptasen	147
12.6	Nucleasen	147
12.7	T4-Polynucleotid-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 in vivo	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	Schwerpunktt Themen 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/DBJ, 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	<i>Multiples 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, Hauptkomponentenanalyse, 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 Boole'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	Modellbestätigung	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. Koegele, 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	<i>Screening</i> im Hochdurchsatz	358
25.2.12	<i>Screening</i> -Assays müssen von hoher Qualität sein	359
25.2.13	Virtuelles Liganden- <i>Screening</i>	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 (<i>amplification refractory mutation system</i>)	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 Kreuzreaktivität	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 <i>Knock(in)out</i>-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: <i>Knock-in/out</i> -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
	<i>N. Metzler-Nolte, A. Sosniak</i>	
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 <i>RNA-induced silencing complex</i> (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
	<i>H. Hillebrand, R. Hell</i>	
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	<i>Agrobacterium</i> als natürliches Transformationssystem	463
32.3.1.2	Biolistische Methode: <i>Gene Gun</i>	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 Stammoptimierung	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-B ₂ -Produktion	503
33.4.9.1	Riboflavinbiosynthese	504
33.4.9.2	Klassische Stammentwicklung	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	Tissue Engineering/Regenerative Medizin	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 1×1 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