

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 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	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 Massenanalytoren 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**
H. Weiher, R. Zwacka, I. Herr
- 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**
H. Weiher, R. Zwacka, I. Herr
- 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**
H. Weiher, R. Zwacka, I. Herr
- 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 *In situ*-Hybridisierung 141

- 12 Enzyme zur Modifikation von Nucleinsäuren 143**
A. Groth, R. Zwacka, H. Weiher, I. Herr
- 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**
A. Mohr, H. Weiher, I. Herr, R. Zwacka
- 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</i> , ori)	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. Wöflfl, A. Kitanovic</i>	
18.1	Untersuchung des Zellzyklus	193
18.2	Experimentelle Analyse des Zellzyklus	195
	Eine Beobachtung des Zellzyklus kann in nichtsynchro-	
	(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	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/DDBJ, 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, *Gene Ontology* 291
- 22.3 Sequenzanalyse 291
- 22.3.1 Kyte-Doolittle, Helical Wheel, Signalsequenzanalyse 291
- 22.3.2 Paarweiser Vergleich (*Alignment*) 293
- 22.3.2.1 Lokal/global 294
- 22.3.2.2 Optimal/heuristisch 294
- 22.3.3 *Alignment*-Statistik 294
- 22.3.4 Multiples *Alignment* 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, *Support Vector Machines*, 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 *Top-Down*-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 (*Elementary flux modes*) 317
- 23.2.7 Rekonstruieren der Regulation durch Bool'sche und Bayes'sche Netzwerke 319
- 23.3 Überblick zur *Bottom-Up*-Modellierung biochemischer Netzwerke 320
- 23.3.1.1 Motivation 320
- 23.3.1.2 Modellkomplexität 320
- 23.3.1.3 Modellerstellung 321
- 23.3.1.4 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	<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*G. Fricker*

- 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*S. Wölfel, R. Gessner*

- 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 (*amplification-created restriction sites*) 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 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**
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 Stammpoptimierung	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 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	<i>Tissue Engineering</i> /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**
C. Amshoff
- 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**
G. Walsh
- 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**
C. Kremoser
- 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**
C. Kremoser
- 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

M. Wink

Sachverzeichnis 629