

Inhaltsübersicht

1 Bioanalytik – eine eigenständige Wissenschaft 1

Teil I Proteinanalytik

| | | |
|----|---|-----|
| 2 | Proteinreinigung | 13 |
| 3 | Proteinbestimmungen | 35 |
| 4 | Enzymatische Aktivitätstests | 47 |
| 5 | Mikrokalorimetrie | 59 |
| 6 | Immunologische Techniken | 77 |
| 7 | Chemische Modifikation von Proteinen und Proteinkomplexen | 125 |
| 8 | Spektroskopie | 151 |
| 9 | Lichtmikroskopische Verfahren – Imaging | 201 |
| 10 | Spaltung von Proteinen | 229 |
| 11 | Chromatographische Trennmethoden | 243 |
| 12 | Elektrophoretische Verfahren | 269 |
| 13 | Kapillarelektrophorese | 303 |
| 14 | Aminosäureanalyse | 335 |
| 15 | Proteinsequenzanalyse | 349 |
| 16 | Massenspektrometrie | 367 |
| 17 | Protein-Protein-Wechselwirkungen | 425 |
| 18 | Biosensorik | 461 |

Teil II 3D-Strukturaufklärung

| | | |
|----|--|-----|
| 19 | Magnetische Resonanzspektroskopie von Biomolekülen | 475 |
| 20 | Elektronenmikroskopie | 527 |
| 21 | Rasterkraftmikroskopie | 565 |
| 22 | Röntgenstrukturanalyse | 575 |

Teil III Spezielle Stoffgruppen

| | | |
|----|---|-----|
| 23 | Analytik synthetischer Peptide | 601 |
| 24 | Kohlenhydratanalytik | 617 |
| 25 | Lipidanalytik | 663 |
| 26 | Analytik posttranslati onaler Modifikationen: Phosphorylierung und Acetylierung von Proteinen | 697 |

Teil IV Nucleinsäureanalytik

| | | |
|----|---|-----|
| 27 | Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren | 719 |
| 28 | Aufarbeitung von Nucleinsäuren | 739 |
| 29 | Hybridisierung und Nachweist echniken von Nucleinsäuren | 787 |
| 30 | Polymerasekettenreaktion | 827 |
| 31 | DNA-Sequenzierung | 859 |
| 32 | Analyse der epigenetischen Modifikationen | 897 |
| 33 | Protein-Nucleinsäure-Wechselwirkungen | 911 |

Teil V Systematische Funktionsanalytik

| | | |
|----|--|------|
| 34 | Sequenzanalyse | 959 |
| 35 | Analyse von Promotorstärke und aktiver RNA-Synthese | 981 |
| 36 | Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA zur Genomanalyse in der molekularen Cytogenetik | 1005 |
| 37 | Physikalische und genetische Genkartierung | 1015 |
| 38 | Differenzielle Genaktivität | 1037 |
| 39 | DNA-Microarray-Technologie | 1047 |
| 40 | Oligonucleotide als zellbiologische Werkzeuge | 1059 |
| 41 | Proteomanalyse | 1077 |
| 42 | Metabolomics und Peptidomics | 1103 |
| 43 | Interactomics – systematische Protein-Protein-Wechselwirkungen | 1113 |
| 44 | Chemische Biologie | 1121 |
| 45 | Toponomalyse | 1139 |
| 46 | Systembiologie | 1159 |

Anhang

| | |
|--|------|
| Anhang 1: Strahlenschutz im Labor | 1173 |
| Anhang 2: Biologische Sicherheit | 1175 |
| Anhang 3: Aminosäuren und posttranslational e Modifikationen | 1177 |
| Anhang 4: Symbole und Abkürzungen | 1179 |

Index 1183

Inhalt

| | | | |
|---|-----|---|----|
| Vorwort | V | 3.3.1 Iodierungen | 46 |
| | | Weiterführende Literatur | 46 |
| Autoren | XXI | | |
| 1 Bioanalytik – eine eigenständige Wissenschaft | 1 | 4 Enzymatische Aktivitätstests | 47 |
| 1.1 Paradigmenwechsel in der Biochemie: von der Proteinchemie zur Systembiologie | 2 | 4.1 Die Triebkraft chemischer Reaktionen | 47 |
| 1.1.1 Klassische Strategie | 2 | 4.2 Die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen | 48 |
| 1.1.2 Holistische Strategie | 3 | 4.3 Katalysatoren | 49 |
| 1.2 Methoden begründen Fortschritt | 3 | 4.4 Enzyme als Katalysatoren | 49 |
| 1.2.1 Proteinanalytik | 5 | 4.5 Geschwindigkeit enzymgesteuerter Reaktionen | 50 |
| 1.2.2 Molekularbiologie | 6 | 4.6 Michaelis-Menten-Theorie | 50 |
| 1.2.3 Bioinformatik | 8 | 4.7 Bestimmung von K_m und V_{max} | 51 |
| 1.2.4 Funktionsanalyse | 8 | 4.8 Inhibitoren | 52 |
| | | 4.8.1 Kompetitive Inhibitoren | 53 |
| | | 4.8.2 Nichtkompetitive Inhibitoren | 53 |
| | | 4.9 Aufbau eines Testsystems | 53 |
| | | 4.9.1 Analyse der physiologischen Funktion | 54 |
| | | 4.9.2 Auswahl der Substrate | 54 |
| | | 4.9.3 Detektionssystem | 54 |
| | | 4.9.4 Zeitabhängigkeit | 55 |
| | | 4.9.5 pH-Wert | 55 |
| | | 4.9.6 Auswahl der Puffersubstanz und der Ionenstärke | 56 |
| | | 4.9.7 Temperatur | 56 |
| | | 4.9.8 Substratkonzentration | 56 |
| | | 4.9.9 Kontrollen | 57 |
| | | Weiterführende Literatur | 57 |
| | | 5 Mikrokalorimetrie | 59 |
| | | 5.1 Differential scanning calorimetry (DSC) | 60 |
| | | 5.2 Isothermal titration calorimetry (ITC) | 67 |
| | | 5.2.1 Bindung von Liganden an Proteine | 68 |
| | | 5.2.2 Bindung von Molekülen an Membranen: Einbau und periphere Bindung | 71 |
| | | 5.3 Pressure perturbation calorimetry (PPC) | 74 |
| | | Weiterführende Literatur | 75 |
| | | 6 Immunologische Techniken | 77 |
| | | 6.1 Antikörper | 77 |
| | | 6.1.1 Antikörper und Immunabwehr | 77 |
| | | 6.1.2 Antikörper als Reagens | 78 |
| | | 6.1.3 Eigenschaften von Antikörpern | 78 |
| | | 6.1.4 Funktionelle Struktur von IgG | 80 |
| | | 6.1.5 Antigenbindungsstelle (Haftstelle) | 81 |
| | | 6.1.6 Handhabung von Antikörpern | 82 |
| | | 6.2 Antigene | 83 |
| | | 6.3 Antigen-Antikörper-Reaktion | 85 |
| | | 6.3.1 Immunagglutination | 86 |
| Teil I Proteinanalytik | | | |
| 2 Proteinreinigung | 13 | | |
| 2.1 Eigenschaften von Proteinen | 13 | | |
| 2.2 Proteinlokalisierung und Reinigungsstrategie | 16 | | |
| 2.3 Homogenisierung und Zellaufschluss | 17 | | |
| 2.4 Die Fällung | 20 | | |
| 2.5 Zentrifugation | 21 | | |
| 2.5.1 Grundlagen | 21 | | |
| 2.5.2 Zentrifugationstechniken | 24 | | |
| 2.6 Abtrennung von Salzen oder hydrophilen Verunreinigungen | 26 | | |
| 2.7 Konzentrierung | 28 | | |
| 2.8 Detergenzien und ihre Entfernung | 29 | | |
| 2.8.1 Eigenschaften von Detergenzien | 29 | | |
| 2.8.2 Entfernen von Detergenzien | 32 | | |
| 2.9 Probenvorbereitung für die Proteomanalyse | 34 | | |
| Weiterführende Literatur | 34 | | |
| 3 Proteinbestimmungen | 35 | | |
| 3.1 Quantitative Bestimmung durch Färbetests | 37 | | |
| 3.1.1 Biuret-Assay | 38 | | |
| 3.1.2 Lowry-Assay | 38 | | |
| 3.1.3 Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) | 39 | | |
| 3.1.4 Bradford-Assay | 40 | | |
| 3.2 Spektroskopische Methoden | 41 | | |
| 3.2.1 Messungen im UV-Bereich | 41 | | |
| 3.2.2 Fluoreszenzmethode | 43 | | |
| 3.3 Radioaktive Markierung von Peptiden und Proteinen | 44 | | |

| | | | | | |
|--------------------------|--|-----|-----------|--|-----|
| XII | Inhalt | | | | |
| 6.3.2 | Immunpräzipitation | 87 | 8.5.4 | Spezielle Fluoreszenztechniken: FRAP, FLIM, FCS, TIRF | 192 |
| 6.3.3 | Immunbindung | 100 | 8.5.5 | Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) | 192 |
| 6.4 | Komplementfixation | 111 | 8.5.6 | Einzelmolekülspektroskopie | 193 |
| 6.5 | Methoden der zellulären Immunologie | 112 | 8.6 | Methoden mit polarisiertem Licht | 194 |
| 6.6 | Alteration biologischer Funktionen | 114 | 8.6.1 | Lineardichroismus | 195 |
| 6.7 | Herstellung von Antikörpern | 115 | 8.6.2 | Optische Rotationsdispersion und Circulardichroismus | 198 |
| 6.7.1 | Arten von Antikörpern | 115 | | Weiterführende Literatur | 200 |
| 6.7.2 | Neue Antikörpertechniken (<i>antibody engineering</i>) | 116 | 9 | Lichtmikroskopische Verfahren – Imaging | 201 |
| 6.7.3 | Optimierte monoklonale Antikörperkonstrukte mit Effektorfunktionen für den therapeutischen Einsatz | 120 | 9.1 | Wegbereiter der Mikroskopie – von einfachen Linsen zu hochauflösenden Mikroskopen | 201 |
| 6.7.4 | Ausblick: künftige Erweiterung der Bindungskonzepte | 123 | 9.2 | Moderne Anwendungsbereiche | 202 |
| Widmung | | 124 | 9.3 | Physikalische Grundlagen | 203 |
| Weiterführende Literatur | | 124 | 9.4 | Nachweismethoden | 210 |
| 7 | Chemische Modifikation von Proteinen und Proteinkomplexen | 125 | 9.5 | Präparationsmethoden | 217 |
| 7.1 | Chemische Modifikation funktioneller Gruppen von Proteinen | 126 | 9.6 | Spezielle fluoreszenzmikroskopische Analytik | 219 |
| 7.2 | Modifizierung als Mittel zur Einführung von Reportergruppen | 134 | | Weiterführende Literatur | 227 |
| 7.2.1 | Untersuchungen an natürlich vorkommenden Proteinen | 134 | 10 | Spaltung von Proteinen | 229 |
| 7.2.2 | Untersuchungen an überexprimierten oder mutierten Proteinen | 138 | 10.1 | Proteolytische Enzyme | 229 |
| 7.3 | Protein- <i>cross-linking</i> zur Analyse von Proteinwechselwirkungen | 139 | 10.2 | Strategie | 230 |
| 7.3.1 | Bifunktionelle Reagenzien | 139 | 10.3 | Denaturierung | 231 |
| 7.3.2 | Photoaffinitätsmarkierung | 140 | 10.4 | Spaltung von Disulfidbrücken und Alkylierung | 231 |
| Weiterführende Literatur | | 149 | 10.5 | Enzymatische Fragmentierung | 233 |
| 8 | Spektroskopie | 151 | 10.5.1 | Proteasen | 234 |
| 8.1 | Physikalische Prinzipien und Messtechniken | 152 | 10.5.2 | Proteolysebedingungen | 238 |
| 8.1.1 | Physikalische Grundlagen optischer spektroskopischer Messmethoden | 152 | 10.6 | Chemische Fragmentierung | 239 |
| 8.1.2 | Wechselwirkung Licht-Materie | 152 | 10.7 | Ausblick | 242 |
| 8.1.3 | Absorptionsmessungen | 160 | | Weiterführende Literatur | 242 |
| 8.1.4 | Photometer | 163 | 11 | Chromatographische Trennmethode | 243 |
| 8.1.5 | Kinetische spektroskopische Untersuchungen | 164 | 11.1 | Instrumentierung | 243 |
| 8.2 | UV/VIS/NIR-Spektroskopie | 166 | 11.2 | Chromatographische Theorie | 244 |
| 8.2.1 | Grundlagen | 166 | 11.3 | Die physiko-chemischen Charakteristika der Peptide und Proteine | 248 |
| 8.2.2 | Chromoproteine | 167 | 11.4 | Chromatographische Trennmethode für Peptide und Proteine | 250 |
| 8.3 | IR-Spektroskopie | 174 | 11.4.1 | Ausschlusschromatographie | 251 |
| 8.3.1 | Grundlagen | 174 | 11.4.2 | Hochleistungs- <i>reversed-phase</i> -Chromatographie (HP-RPC) | 251 |
| 8.3.2 | Molekülschwingungen | 175 | 11.4.3 | Hochleistungsnormalphase-Chromatographie (NPC) | 253 |
| 8.3.3 | Messtechniken | 177 | 11.4.4 | Hochleistungs-Hydrophile-Interaktions- chromatographie (HP-HILIC) | 253 |
| 8.3.4 | Infrarotspektroskopie von Proteinen | 180 | 11.4.5 | Hochleistungs- <i>aqueous</i> -Normalphase- chromatographie (HP-ANPC) | 254 |
| 8.4 | Raman-Spektroskopie | 183 | 11.4.6 | Hochleistungs-Hydrophobe-Interaktions- chromatographie (HP-HIC) | 254 |
| 8.4.1 | Grundlagen | 183 | 11.4.7 | Hochleistungsionenaustausch- chromatographie (HP-IEX) | 257 |
| 8.4.2 | Raman-Experimente | 184 | 11.4.8 | Hochleistungsaffinitäts- chromatographie (HP-AC) | 257 |
| 8.4.3 | Resonanz-Raman-Spektroskopie | 186 | 11.5 | Methodenentwicklung für die analytische Chromatographie am Beispiel der HP-RPC | 258 |
| 8.5 | Fluoreszenzspektroskopie | 187 | 11.5.1 | Entwicklung und Optimierung einer Methode | 258 |
| 8.5.1 | Grundlagen | 187 | 11.6 | Multidimensionale HPLC | 263 |
| 8.5.2 | Fluoreszenzspektren als Emissionsspektren und als Aktionsspektren | 189 | | | |
| 8.5.3 | Fluoreszenzuntersuchungen mit intrinsischen und extrinsischen Fluorophoren | 190 | | | |

| | Inhalt | XIII |
|-----------|---|------------|
| 11.6.1 | Aufreinigung von individuellen Peptiden und Proteinen in der MD-HPLC | 264 |
| 11.6.2 | Trennung von komplexen Peptid- und Proteinmischungen mit der MD-HPLC | 265 |
| 11.6.3 | Methodenstrategien für die MD-HPLC | 265 |
| 11.6.4 | Entwurf eines effektiven MD-HPLC-Schemas für Peptide und Proteine | 266 |
| 11.7 | Schlussbemerkung | 268 |
| | Weiterführende Literatur | 268 |
| 12 | Elektrophoretische Verfahren | 269 |
| 12.1 | Geschichtlicher Überblick | 269 |
| 12.2 | Theoretische Grundlagen | 271 |
| 12.3 | Instrumentierung und Durchführung von Gelelektrophoresen | 274 |
| 12.3.1 | Probenvorbereitung | 276 |
| 12.3.2 | Gelmedien für Elektrophoresen | 276 |
| 12.3.3 | Nachweis und Quantifizierung der getrennten Proteine | 278 |
| 12.3.4 | Zonenelektrophorese | 280 |
| 12.3.5 | Porengradientengele | 281 |
| 12.3.6 | Puffersysteme | 282 |
| 12.3.7 | Disk-Elektrophorese | 282 |
| 12.3.8 | Saure Nativelektrophorese | 284 |
| 12.3.9 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 284 |
| 12.3.10 | Kationische Detergenselektrophorese | 285 |
| 12.3.11 | Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese | 285 |
| 12.3.12 | Isoelektrische Fokussierung | 286 |
| 12.4 | Präparative Verfahren | 290 |
| 12.4.1 | Elektroelution aus Gelen | 290 |
| 12.4.2 | Präparative Zonenelektrophorese | 291 |
| 12.4.3 | Präparative isoelektrische Fokussierung | 292 |
| 12.5 | Trägerfreie Elektrophorese | 293 |
| 12.6 | Hochauflösende zweidimensionale Elektrophorese | 294 |
| 12.6.1 | Probenvorbereitung | 296 |
| 12.6.2 | Vorfraktionierung | 296 |
| 12.6.3 | Erste Dimension: IEF in IPG-Streifen | 297 |
| 12.6.4 | Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 298 |
| 12.6.5 | Detektion und Identifizierung der Proteine | 298 |
| 12.6.6 | Differenzgelelektrophorese (DIGE) | 298 |
| 12.7 | Elektroblotting | 300 |
| 12.7.1 | Blotsysteme | 300 |
| 12.7.2 | Transferpuffer | 302 |
| 12.7.3 | Blotmembranen | 302 |
| | Weiterführende Literatur | 302 |
| 13 | Kapillarelektrophorese | 303 |
| 13.1 | Geschichtlicher Überblick | 303 |
| 13.2 | Aufbau der Kapillarelektrophorese | 304 |
| 13.3 | Grundprinzipien der Kapillarelektrophorese | 305 |
| 13.3.1 | Injektion der Proben | 305 |
| 13.3.2 | Der Motor: elektroosmotischer Fluss (EOF) | 306 |
| 13.3.3 | Joulesche Wärmeentwicklung | 307 |
| 13.3.4 | Detektion | 308 |
| 13.4 | Die Methoden der Kapillarelektrophorese | 310 |
| 13.4.1 | Kapillarzonenelektrophorese (CZE) | 310 |
| 13.4.2 | Kapillaraффinitätselektrophorese (ACE) | 315 |
| 13.4.3 | Micellarelektrokinetische Chromatographie (MEKC) | 316 |
| 13.4.4 | Kapillarelektrochromatographie (CEC) | 319 |
| 13.4.5 | Chirale Trennungen | 320 |
| 13.4.6 | Kapillargelelektrophorese (CGE) | 321 |
| 13.4.7 | Isoelektrische Fokussierung (CIEF) | 322 |
| 13.4.8 | Isotachophorese (ITP) | 326 |
| 13.5 | Spezielle Techniken | 327 |
| 13.5.1 | Online-Probenkonzentrierung | 327 |
| 13.5.2 | Fraktionierung | 328 |
| 13.5.3 | Mikrochipelektrophorese | 330 |
| 13.6 | Ausblick | 332 |
| | Weiterführende Literatur | 332 |
| 14 | Aminosäureanalyse | 335 |
| 14.1 | Probenvorbereitung | 336 |
| 14.1.1 | Saure Hydrolyse | 336 |
| 14.1.2 | Alkalische Hydrolyse | 337 |
| 14.1.3 | Enzymatische Hydrolyse | 337 |
| 14.2 | Freie Aminosäuren | 337 |
| 14.3 | Flüssigchromatographie mit optischer Detektion | 338 |
| 14.3.1 | Nachsäulenderivatisierung | 338 |
| 14.3.2 | Vorsäulenderivatisierung | 340 |
| 14.4 | Aminosäureanalyse mit massenspektrometrischer Detektion | 344 |
| 14.5 | Datenauswertung und Beurteilung der Analysen | 345 |
| | Weiterführende Literatur | 347 |
| 15 | Proteinsequenzanalyse | 349 |
| 15.1 | N-terminale Sequenzanalyse: der Edman-Abbau | 351 |
| 15.1.1 | Reaktionen des Edman-Abbaus | 351 |
| 15.1.2 | Identifizierung der Aminosäuren | 353 |
| 15.1.3 | Die Qualität des Edman-Abbaus: die repetitive Ausbeute | 353 |
| 15.1.4 | Instrumentierung | 355 |
| 15.1.5 | Probleme der Aminosäuresequenzanalyse | 358 |
| 15.1.6 | Stand der Technik | 361 |
| 15.2 | C-terminale Sequenzanalyse | 362 |
| 15.2.1 | Chemische Abbaumethoden | 362 |
| 15.2.2 | Peptidmengen und Qualität des chemischen Abbaus | 364 |
| 15.2.3 | Abbau der Polypeptide mit Carboxypeptidasen | 364 |
| | Weiterführende Literatur | 366 |
| 16 | Massenspektrometrie | 367 |
| 16.1 | Ionisationsmethoden | 368 |
| 16.1.1 | Matrixassistierte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) | 368 |
| 16.1.2 | Elektrospray-Ionisation (ESI) | 373 |
| 16.2 | Massenanalytoren | 380 |
| 16.2.1 | Flugzeitanalysator (TOF) | 382 |
| 16.2.2 | Quadrupolanalysator | 385 |
| 16.2.3 | Elektrische Ionenfallen | 388 |
| 16.2.4 | Magnetische Ionenfalle | 390 |
| 16.2.5 | Orbital-Ionenfalle | 391 |
| 16.2.6 | Hybridgeräte | 392 |
| 16.3 | Ionendetektoren | 397 |

| XIV | Inhalt | | |
|-----------|---|-----|--|
| 16.3.1 | Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) | 397 | Weiterführende Literatur 458 |
| 16.3.2 | Faraday-Becher | 398 | |
| 16.4 | Fragmentierungstechniken | 399 | 18 Biosensorik 461 |
| 16.4.1 | Kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) | 399 | 18.1 Trockenchemie-Teststreifen und Diabetes 462 |
| 16.4.2 | Prompte und metastabile Zerfälle (ISD, PSD) | 400 | 18.2 Biosensoren 462 |
| 16.4.3 | Photoneninduzierte Dissoziation (PID, IRMPD) | 402 | 18.2.1 Das Konzept der Biosensoren 462 |
| 16.4.4 | Erzeugung von Radikalen (ECD, HECD, ETD) | 402 | 18.2.2 Aufbau und Funktion von Biosensoren 463 |
| 16.5 | Massenbestimmung | 404 | 18.2.3 Zellsensoren 467 |
| 16.5.1 | Berechnung der Masse | 404 | 18.2.4 Immunsensoren 468 |
| 16.5.2 | Einfluss der Isotopie | 405 | 18.3 Von der Enzymelektrode für Glucose zum elektronischen DNA-Biochip 470 |
| 16.5.3 | Kalibrierung | 409 | 18.4 Miniaturisierte Biosensor-Systeme 470 |
| 16.5.4 | Bestimmung der Ladungszahl | 409 | 18.5 Trends bei Biosensoren 471 |
| 16.5.5 | Signalverarbeitung und -auswertung | 409 | Weiterführende Literatur 472 |
| 16.5.6 | Ableitung der Masse | 410 | |
| 16.5.7 | Probleme | 410 | |
| 16.6 | Identifizierung, Nachweis und Strukturaufklärung | 411 | |
| 16.6.1 | Identifizierung | 412 | |
| 16.6.2 | Nachweis | 413 | |
| 16.6.3 | Strukturaufklärung | 413 | |
| 16.7 | LC-MS und LC-MS/MS | 420 | |
| 16.7.1 | LC-MS | 420 | |
| 16.7.2 | LC-MS/MS | 422 | |
| 16.7.3 | Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) | 422 | |
| 16.8 | Quantifizierung | 423 | |
| | Weiterführende Literatur | 424 | |
| 17 | Protein-Protein-Wechselwirkungen | 425 | |
| 17.1 | Das <i>two-hybrid</i> -System | 425 | |
| 17.1.1 | Das Konzept des <i>two-hybrid</i> -Systems | 425 | |
| 17.1.2 | Die Elemente des <i>two-hybrid</i> -Systems | 426 | |
| 17.1.3 | Konstruktion des Köderproteins | 428 | |
| 17.1.4 | Welche Köderproteine eignen sich für das <i>two-hybrid</i> -System? | 429 | |
| 17.1.5 | Aktivator-Fusionsprotein und cDNA-Bibliotheken | 429 | |
| 17.1.6 | Durchführung des <i>two-hybrid</i> -Screenings | 430 | |
| 17.1.7 | Modifizierte Anwendungen und Weiterentwicklungen der <i>two-hybrid</i> -Technologie | 435 | |
| 17.1.8 | Biochemische und funktionale Analyse der Interaktoren | 436 | |
| 17.2 | TAP-tagging und Reinigung von Proteinkomplexen | 437 | |
| 17.3 | <i>In-vitro</i> -Interaktionsanalyse: GST-pulldown | 441 | |
| 17.4 | Ko-Immunpräzipitation | 442 | |
| 17.5 | Far-Western | 443 | |
| 17.6 | Plasmonenspektroskopie (<i>surface plasmon resonance</i>) | 443 | |
| 17.7 | Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer – FRET | 446 | |
| 17.7.1 | Interaktions- und Strukturanalyse mittels FRET | 446 | |
| 17.7.2 | Experimentelle Bestimmung der FRET-Effizienz | 447 | |
| 17.7.3 | Methoden der FRET-Messung | 448 | |
| 17.7.4 | Verwendete Sonden | 449 | |
| 17.8 | Analytische Ultrazentrifugation | 451 | |
| 17.8.1 | Instrumentelle Grundlagen | 451 | |
| 17.8.2 | Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente | 452 | |
| 17.8.3 | Sedimentationsgleichgewichtsexperimente | 456 | |
| | | | Teil II 3D-Strukturaufklärung |
| | | | 19 Magnetische Resonanzspektroskopie von Biomolekülen 475 |
| | | | 19.1 NMR-Spektroskopie von Biomolekülen 475 |
| | | | 19.1.1 Theorie der NMR-Spektroskopie 476 |
| | | | 19.1.2 Eindimensionale NMR-Spektroskopie 480 |
| | | | 19.1.3 Zweidimensionale NMR-Spektroskopie 485 |
| | | | 19.1.4 Dreidimensionale NMR-Spektroskopie 492 |
| | | | 19.1.5 Signalzuordnung 495 |
| | | | 19.1.6 Bestimmung der Proteinstruktur 500 |
| | | | 19.1.7 Proteinstrukturen und mehr – ein Ausblick 506 |
| | | | 19.2 EPR-Spektroskopie an biologischen Systemen 509 |
| | | | 19.2.1 Grundlagen der EPR-Spektroskopie 510 |
| | | | 19.2.2 cw-EPR-Spektroskopie 511 |
| | | | 19.2.3 <i>g</i> -Wert 512 |
| | | | 19.2.4 Elektronenspin-Kernspin-Kopplung (Hyperfeinkopplung) 512 |
| | | | 19.2.5 <i>g</i> - und Hyperfeinanisotropie 513 |
| | | | 19.2.6 Elektronenspin-Elektronenspin-Kopplung 516 |
| | | | 19.2.7 Gepulste EPR-Experimente 517 |
| | | | 19.2.8 Weitere Anwendungsbeispiele für EPR 522 |
| | | | 19.2.9 Generelle Bemerkungen zur Aussagekraft von EPR-Spektren 524 |
| | | | 19.2.10 Vergleich EPR/NMR 524 |
| | | | Danksagung 525 |
| | | | Weiterführende Literatur 526 |
| | | | 20 Elektronenmikroskopie 527 |
| | | | 20.1 Transmissionselektronenmikroskopie – Instrumentation 529 |
| | | | 20.2 Präparationsverfahren 530 |
| | | | 20.2.1 Native Proben in Eis 531 |
| | | | 20.2.2 Negativkontrastierung 533 |
| | | | 20.2.3 Bedampfung mit Schwermetallen 534 |
| | | | 20.2.4 Markierung von Proteinen 535 |
| | | | 20.3 Abbildung im Elektronenmikroskop 536 |
| | | | 20.3.1 Auflösung des Transmissionselektronenmikroskops 536 |
| | | | 20.3.2 Wechselwirkungen des Elektronenstrahls mit dem Objekt 537 |
| | | | 20.3.3 Kryoelektronenmikroskopie 540 |

| | | | | | |
|--|--|-----|--|--|-----|
| 20.4 | Bildanalyse und Bildverarbeitung elektronenmikroskopischer Aufnahmen | 541 | 23.4 | Charakterisierung der Struktur synthetischer Peptide | 612 |
| 20.4.1 | Bildpunktgröße | 542 | 23.5 | Analytik von Peptidbibliotheken | 613 |
| 20.4.2 | Fourier-Transformation | 542 | | Weiterführende Literatur | 616 |
| 20.4.3 | Analyse von Kontrastübertragungsfunktion und Objekteigenschaften | 545 | 24 Kohlenhydratanalytik | | 617 |
| 20.4.4 | Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses | 546 | 24.1 | Allgemeine stereochemische Grundlagen | 618 |
| 20.4.5 | Korrespondenzanalyse und Klassifizierung | 551 | 24.1.1 | Die Reihe der D-Zucker | 618 |
| 20.5 | Dreidimensionale Elektronenmikroskopie | 553 | 24.1.2 | Stereochemie der D-Glucose | 619 |
| 20.5.1 | 3D-Rekonstruktion von Einzelpartikeln | 554 | 24.1.3 | Wichtige Monosaccharidbausteine | 620 |
| 20.5.2 | 3D-Rekonstruktion von regelmäßig angeordneten Molekülkomplexen | 557 | 24.1.4 | Die Reihe der L-Zucker | 621 |
| 20.5.3 | Elektronentomographie individueller Objekte | 558 | 24.1.5 | Die glykosidische Bindung | 622 |
| 20.6 | Analyse komplexer 3D-Datensätze | 559 | 24.2 | Die Proteinglykosylierung | 625 |
| 20.6.1 | Hybridmodelle: Kombination von EM- und Röntgenstruktur-Daten | 559 | 24.2.1 | Aufbau der N-Glykane | 626 |
| 20.6.2 | Segmentierung von Tomogrammen | 560 | 24.2.2 | Der Aufbau der O-Glykane | 626 |
| 20.6.3 | Identifizierung von Proteinkomplexen in Zeltomogrammen | 560 | 24.3 | Analyse der Proteinglykosylierung | 627 |
| 20.7 | Perspektiven der Elektronenmikroskopie | 562 | 24.3.1 | Analyse auf der Basis des intakten Glykoproteins | 628 |
| | Weiterführende Literatur | 563 | 24.3.2 | Massenspektrometrische Analysen auf der Basis der Glykopeptide | 634 |
| 21 Rasterkraftmikroskopie | | 565 | 24.3.3 | Freisetzung und Isolierung des N-Glykan-Pools | 637 |
| 21.1 | Funktionsprinzip des Rasterkraftmikroskops | 566 | 24.3.4 | Analyse des N-Glykan-Pools | 639 |
| 21.2 | Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe | 567 | 24.3.5 | Analyse einzelner N-Glykane | 646 |
| 21.3 | Präparationsverfahren | 568 | 24.4 | Genom, Proteom, Glykom | 657 |
| 21.4 | Abbilden biologischer Makromoleküle | 569 | 24.5 | Schlussbetrachtung | 660 |
| 21.5 | Kraftspektroskopie einzelner Moleküle | 571 | | Weiterführende Literatur | 661 |
| 21.6 | Detektion des funktionellen Zustands und der Wechselwirkung einzelner Proteine | 572 | 25 Lipidanalytik | | 663 |
| | Weiterführende Literatur | 573 | 25.1 | Aufbau und Einteilung von Lipiden | 663 |
| 22 Röntgenstrukturanalyse | | 575 | 25.2 | Extraktion von Lipiden aus biologischem Material | 666 |
| 22.1 | Röntgenkristallographie | 576 | 25.2.1 | Flüssigphasenextraktion | 666 |
| 22.1.1 | Kristallisation | 576 | 25.2.2 | Festphasenextraktion | 667 |
| 22.1.2 | Kristalle und Röntgenbeugung | 579 | 25.3 | Methoden der Lipidanalytik | 668 |
| 22.1.3 | Das Phasenproblem | 583 | 25.3.1 | Chromatographische Methoden | 668 |
| 22.1.4 | Modellbau und Strukturverfeinerung | 588 | 25.3.2 | Massenspektrometrie | 673 |
| 22.2 | Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) | 589 | 25.3.3 | Immunassays | 673 |
| 22.2.1 | Apparativer Aufbau | 590 | 25.3.4 | Weitere Methoden in der Lipidanalytik | 674 |
| 22.2.2 | Theorie | 591 | 25.3.5 | Online-Kopplung verschiedener Analyse-systeme | 675 |
| 22.2.3 | Auswertung | 593 | 25.4 | Analytik ausgewählter Lipidklassen | 677 |
| 22.2.4 | Ausblick: Methodenweiterentwicklungen | 594 | 25.4.1 | Gesamtlipidextrakte | 677 |
| 22.3 | Freier Elektronen-LASER (FEL) | 595 | 25.4.2 | Fettsäuren | 678 |
| 22.3.1 | Apparativer Aufbau und Theorie | 595 | 25.4.3 | Unpolare Neutrallipide | 679 |
| 22.3.2 | Proben | 596 | 25.4.4 | Polare Esterlipide | 681 |
| 22.3.3 | Auswertung | 596 | 25.4.5 | Lipidhormone und intrazelluläre Signaltransduktoren | 685 |
| | Weiterführende Literatur | 597 | 25.5 | Lipidvitamine | 689 |
| | | | 25.6 | Lipidomanalytik | 692 |
| | | | 25.6 | Ausblick | 694 |
| | | | | Weiterführende Literatur | 695 |
| Teil III Spezielle Stoffgruppen | | | | | |
| 23 Analytik synthetischer Peptide | | 601 | 26 Analytik posttranslationaler Modifikationen: Phosphorylierung und Acetylierung von Proteinen | | 697 |
| 23.1 | Prinzip der Peptidsynthese | 601 | 26.1 | Funktionelle Bedeutung von Phosphorylierungen und Acetylierungen | 697 |
| 23.2 | Untersuchung der Reinheit synthetischer Peptide | 606 | | | |
| 23.3 | Charakterisierung und Identität synthetischer Peptide | 608 | | | |

XVI Inhalt

| | | | | | |
|--------------------------|---|-----|-----------|--|-----|
| 26.1.1 | Phosphorylierung | 697 | 28 | Aufarbeitung von Nucleinsäuren | 739 |
| 26.1.2 | Acetylierung | 698 | 28.1 | Restriktionsanalyse | 739 |
| 26.2 | Strategien zur Analyse der posttranslationalen Phosphorylierung und Acetylierung von Proteinen und Peptiden | 699 | 28.1.1 | Prinzip der Restriktionsanalyse | 739 |
| 26.3 | Trennung und Anreicherung phosphorylierter und acetylierter Proteine und Peptide | 701 | 28.1.2 | Historischer Überblick | 740 |
| 26.4 | Detektion phosphorylierter und acetylierter Proteine und Peptide | 704 | 28.1.3 | Restriktionsenzyme | 740 |
| 26.4.1 | Detektion mittels enzymatischer, radioaktiver, immunchemischer und fluoreszenzbasierender Methoden | 704 | 28.1.4 | Der Restriktionsansatz und seine Anwendungen | 743 |
| 26.4.2 | Detektion phosphorylierter und acetylierter Proteine mittels Massenspektrometrie | 705 | 28.2 | Elektrophorese | 749 |
| 26.5 | Lokalisation und Identifizierung posttranslational modifizierter Aminosäuren | 706 | 28.2.1 | Gelelektrophorese von DNA | 750 |
| 26.5.1 | Lokalisation phosphorylierter und acetylierter Aminosäuren mittels Edman-Sequenzierung | 706 | 28.2.2 | Gelelektrophorese von RNA | 757 |
| 26.5.2 | Lokalisation phosphorylierter und acetylierter Aminosäuren mittels massenspektrometrischer Fragmentationenanalyse | 707 | 28.2.3 | Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) | 758 |
| 26.6 | Quantitative Analyse posttranslati- onaler Modifikationen | 713 | 28.2.4 | Zweidimensionale Gelelektrophorese | 761 |
| 26.7 | Zukunft der Analytik posttranslati- onaler Modifikationen | 713 | 28.2.5 | Kapillargelelektrophorese | 764 |
| Weiterführende Literatur | | 715 | 28.3 | Färbemethoden | 764 |

Teil IV Nucleinsäureanalytik

| | | | | | |
|--------------------------|--|-----|--------------------------|--|-----|
| 27 | Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren | 719 | 28.3.1 | Fluoreszenzfarbstoffe | 764 |
| 27.1 | Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren | 719 | 28.3.2 | Silberfärbung | 767 |
| 27.1.1 | Phenolextraktion | 719 | 28.4 | Nucleinsäureblotting | 767 |
| 27.1.2 | Gelfiltration | 720 | 28.4.1 | Blottingverfahren | 767 |
| 27.1.3 | Ethanolpräzipitation der Nucleinsäuren | 721 | 28.4.2 | Wahl der Membranen | 767 |
| 27.1.4 | Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren | 722 | 28.4.3 | Southern-Blotting | 768 |
| 27.2 | Isolierung genomischer DNA | 723 | 28.4.4 | Northern-Blotting | 771 |
| 27.3 | Isolierung niedermolekularer DNA | 725 | 28.4.5 | Dot- und Slot-Blotting | 772 |
| 27.3.1 | Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien | 725 | 28.4.6 | Kolonie- und Plaquehybridisierungen | 772 |
| 27.3.2 | Isolierung niedermolekularer DNA aus eukaryotischen Zellen | 730 | 28.5 | Fragmentisolierung | 774 |
| 27.4 | Isolierung viraler DNA | 730 | 28.5.1 | Reinigung über Glas- <i>beads</i> | 774 |
| 27.4.1 | Isolierung von Phagen-DNA | 730 | 28.5.2 | Reinigung über Gelfiltrations- oder <i>reversed-phase</i> -Säulen | 774 |
| 27.4.2 | Isolierung von DNA aus eukaryotischen Viren | 731 | 28.5.3 | Elektroelution | 775 |
| 27.5 | Isolierung einzelsträngiger DNA | 732 | 28.5.4 | Andere Methoden | 775 |
| 27.5.1 | Isolierung von M13-DNA | 732 | 28.6 | LC-MS von Oligonucleotiden | 776 |
| 27.5.2 | Trennung von einzel- und doppelsträngiger DNA | 733 | 28.6.1 | Prinzip der Synthese von Oligonucleotiden | 776 |
| 27.6 | Isolierung von RNA | 733 | 28.6.2 | Untersuchung der Reinheit und Charakterisierung von Oligonucleotiden | 778 |
| 27.6.1 | Isolierung von cytoplasmatischer RNA | 734 | 28.6.3 | Massenspektrometrische Untersuchung von Oligonucleotiden | 780 |
| 27.6.2 | Isolierung von poly(A) ⁺ -RNA | 735 | 28.6.4 | IP-RP-HPLC-MS-Untersuchung eines Phosphorothioat-Oligonucleotids | 781 |
| 27.7 | Isolierung von Nucleinsäuren unter Verwendung von magnetischen Partikeln | 736 | Weiterführende Literatur | | 785 |
| 27.8. | <i>Lab-on-a-chip</i> | 737 | 29 | Hybridisierung und Nachweistech- niken von Nucleinsäuren | 787 |
| Weiterführende Literatur | | 738 | 29.1 | Grundlagen der Hybridisierung | 788 |
| | | | 29.1.1 | Prinzip und Durchführung der Hybridisierung | 789 |
| | | | 29.1.2 | Spezifität der Hybridisierung und Stringenz | 790 |
| | | | 29.1.3 | Hybridisierungsformate | 791 |
| | | | 29.2 | Sonden zur Nucleinsäureanalytik | 798 |
| | | | 29.2.1 | DNA-Sonden | 799 |
| | | | 29.2.2 | RNA-Sonden | 800 |
| | | | 29.2.3 | PNA-Sonden | 801 |
| | | | 29.2.4 | LNA-Sonden | 802 |
| | | | 29.3 | Markierungsverfahren | 802 |
| | | | 29.3.1 | Markierungspositionen | 804 |
| | | | 29.3.2 | Enzymatische Markierungsreaktionen | 805 |
| | | | 29.3.3 | Photochemische Markierungsreaktionen | 807 |
| | | | 29.3.4 | Chemische Markierungsreaktionen | 807 |
| | | | 29.4 | Nachweissysteme | 808 |
| | | | 29.4.1 | Färbemethoden | 808 |
| | | | 29.4.2 | Radioaktive Systeme | 808 |
| | | | 29.4.3 | Nichtradioaktive Systeme | 810 |

| | | | | | |
|-----------|---|-----|-----------|--|-----|
| 29.5 | Amplifikationssysteme | 820 | 32 | Analyse der epigenetischen Modifikationen | 897 |
| 29.5.1 | Targetamplifikation | 822 | 32.1 | Überblick über die Detektionsmethoden der DNA-Methylierung | 898 |
| 29.5.2 | Targetspezifische Signalamplifikation | 822 | 32.2 | Methylierungsanalyse mit der Bisulfittechnik | 899 |
| 29.5.3 | Signalamplifikation | 823 | 32.2.1 | Amplifikation und Sequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA | 900 |
| | Weiterführende Literatur | 825 | 32.2.2 | Restriktionsanalyse nach Bisulfit-PCR | 901 |
| 30 | Polymerasekettenreaktion | 827 | 32.2.3 | Methylierungsspezifische PCR | 903 |
| 30.1 | Möglichkeiten der PCR | 827 | 32.3 | Analyse der DNA mit methylierungs-spezifischen Restriktionsenzymen | 904 |
| 30.2 | Grundlagen | 828 | 32.4 | Methylierungsanalyse durch Methylcytosin-bindende-Domäne-Proteine | 906 |
| 30.2.1 | Instrumentierung | 828 | 32.5 | Methylierungsanalyse durch Methylcytosin-spezifische Antikörper | 906 |
| 30.2.2 | Amplifikation von DNA | 830 | 32.6 | Methylierungsanalyse durch DNA-Hydrolyse und <i>nearest-neighbor</i> -Assays | 907 |
| 30.2.3 | Amplifikation von RNA (RT-PCR) | 833 | 32.7 | Analyse von epigenetischen Modifikationen des Chromatins | 908 |
| 30.2.4 | Optimierung der Reaktion | 835 | 32.8 | Chromosomenkonformationsanalyse | 909 |
| 30.2.5 | Quantitative PCR | 836 | 32.9 | Ausblick | 910 |
| 30.3 | Spezielle PCR-Techniken | 839 | | Weiterführende Literatur | 910 |
| 30.3.1 | Nested PCR | 839 | 33 | Protein-Nucleinsäure-Wechselwirkungen | 911 |
| 30.3.2 | Asymmetrische PCR | 840 | 33.1 | DNA-Protein-Wechselwirkungen | 911 |
| 30.3.3 | Einsatz von degenerierten Primern | 840 | 33.1.1 | Grundlagen der DNA-Protein-Erkennung: helikale Doppelstränge | 911 |
| 30.3.4 | Multiplex-PCR | 841 | 33.1.2 | DNA-Krümmung | 912 |
| 30.3.5 | <i>Cycle sequencing</i> | 841 | 33.1.3 | DNA-Topologie | 914 |
| 30.3.6 | <i>In-vitro</i> -Mutagenese | 842 | 33.2 | DNA-Bindungsmotive | 915 |
| 30.3.7 | Homogene PCR-Detektionsverfahren | 842 | 33.3 | Spezielle Analysemethoden | 916 |
| 30.3.8 | Quantitative Amplifikationsverfahren | 842 | 33.3.1 | Filterbindung | 916 |
| 30.3.9 | <i>In-situ</i> -PCR | 843 | 33.3.2 | Gelelektrophorese | 917 |
| 30.3.10 | Weitere Verfahren | 843 | 33.3.3 | Bestimmung von Dissoziationskonstanten | 920 |
| 30.4 | Kontaminationsproblematik | 844 | 33.3.4 | Analyse der Dynamik von DNA-Protein-Komplexen | 921 |
| 30.4.1 | Vermeidung von Kontaminationen | 844 | 33.4 | DNA- <i>footprint</i> -Analysen | 923 |
| 30.4.2 | Dekontamination | 845 | 33.4.1 | Markierung der DNA | 925 |
| 30.5 | Anwendungen | 846 | 33.4.2 | Primer- <i>extension</i> -Analyse für DNA | 925 |
| 30.5.1 | Nachweis von Infektionskrankheiten | 846 | 33.4.3 | Hydrolyse-Methoden | 926 |
| 30.5.2 | Nachweis von genetischen Defekten | 848 | 33.4.4 | Chemische Reagenzien für Modifikation von DNA-Protein-Komplexen | 928 |
| 30.5.3 | Humangenomprojekt | 850 | 33.4.5 | Interferenzbedingungen | 930 |
| 30.6 | Alternative Verfahren der Amplifikation | 852 | 33.4.6 | Chemische Nucleasen | 932 |
| 30.6.1 | <i>Nucleic acid sequence based amplification</i> (NASBA) | 852 | 33.4.7 | Genomweite DNA-Protein-Interaktionsanalysen | 933 |
| 30.6.2 | <i>Strand displacement amplification</i> (SDA) | 852 | 33.5 | Physikalische Analysen | 934 |
| 30.6.3 | <i>Helicase dependent amplification</i> (HDA) | 854 | 33.5.1 | Fluoreszenz-Methoden | 934 |
| 30.6.4 | <i>Ligase chain reaction</i> (LCR) | 855 | 33.5.2 | Fluorophore und Markierungsverfahren | 934 |
| 30.6.5 | Q β -Amplifikation (Q β <i>amplification</i>) | 856 | 33.5.3 | Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) | 935 |
| 30.6.6 | <i>Branched DNA amplification</i> (bDNA) | 857 | 33.5.4 | Molekulare Lichtsonden (<i>molecular beacons</i>) | 936 |
| 30.7 | Ausblick | 857 | 33.5.5 | <i>Surface plasmon resonance</i> (SPR) | 936 |
| | Weiterführende Literatur | 858 | 33.5.6 | <i>Scanning force microscopy</i> (SFM) | 937 |
| 31 | DNA-Sequenzierung | 859 | 33.5.7 | <i>Optical tweezer</i> | 938 |
| 31.1 | Gelgestützte DNA-Sequenzierungsverfahren | 860 | 33.5.8 | <i>Fluorescence correlation spectroscopy</i> (FCS) | 938 |
| 31.1.1 | Sequenzierung nach Sanger: das Didesoxy-verfahren | 864 | 33.6 | RNA-Protein-Wechselwirkungen | 939 |
| 31.1.2 | Markierungstechniken und Nachweisverfahren | 871 | 33.6.1 | Funktionsvielfalt der RNA | 939 |
| 31.1.3 | Chemische Spaltung nach Maxam und Gilbert | 875 | 33.6.2 | RNA-Sekundärstrukturparameter und ungewöhnliche Basenpaarungen | 939 |
| 31.2 | Gelfreie DNA-Sequenzierungsmethoden | 882 | 33.6.3 | Dynamik der RNA-Protein-Erkennung | 940 |
| 31.2.1 | Sequenzierung durch Strangsynthese (<i>sequencing by synthesis</i>) | 883 | | | |
| 31.2.2 | Sequenzierung durch Ligation | 889 | | | |
| 31.2.3 | Einzelmolekül-Sequenzierung (<i>single molecule sequencing</i>) | 891 | | | |
| 31.2.4 | Andere Verfahren | 894 | | | |
| | Weiterführende Literatur | 894 | | | |

| | | | | | |
|--------|---|-----|--------|---|------|
| 33.7 | Charakteristische RNA-Bindungsmotive | 942 | 35.2 | Analyse der RNA-Synthese <i>in vivo</i> | 992 |
| 33.8 | Spezielle Methoden zur Analyse von RNA-Protein-Komplexen | 943 | 35.2.1 | <i>Nuclear-run-on-Assay</i> | 993 |
| 33.8.1 | Limitierte enzymatische Hydrolyse | 944 | 35.2.2 | Markierung naszierender RNA mit 5-Fluorouridin | 993 |
| 33.8.2 | Markierungsmethoden | 944 | 35.3 | Die <i>in-vitro</i> -Transkription klonierter Gene in Extrakten und Proteinfractionen | 994 |
| 33.8.3 | Primer- <i>extension</i> von RNA | 945 | 35.3.1 | Komponenten des <i>in-vitro</i> -Transkriptionsansatzes | 994 |
| 33.8.4 | Gebräuchliche RNAsen | 945 | 35.3.2 | Herstellung transkriptionsaktiver Extrakte und Proteinfractionen | 995 |
| 33.8.5 | Chemische Modifikation von RNA-Protein-Komplexen | 946 | 35.3.3 | Promotorspezifische Matrizen-DNA und Detektion der <i>in-vitro</i> -Transkripte | 995 |
| 33.8.6 | Chemische Quervernetzung | 949 | 35.4 | Die <i>in-vivo</i> -Analyse von Promotoren in Säugerzellen | 998 |
| 33.8.7 | Einbau photoreaktiver Nucleotide | 950 | 35.4.1 | Plasmidvektoren für die Analyse von <i>cis</i> -aktiven Elementen in Säugerzellen | 998 |
| 33.8.8 | Genomweite Identifizierung von Transkriptionsstartstellen (TSS) | 951 | 35.4.2 | Einschleusen von Fremd-DNA in Säugerzellen | 1000 |
| 33.9 | Genetische Methoden | 952 | 35.4.3 | Die Charakterisierung der <i>in-vivo</i> -Transkripte der klonierten Promotoren | 1001 |
| 33.9.1 | <i>Tri-hybrid</i> -Methode | 952 | | Weiterführende Literatur | 1003 |
| 33.9.2 | Aptamere und das Selex-Verfahren | 953 | | | |
| 33.9.3 | Gezielte Mutationen in Bindedomänen | 954 | | | |
| | Weiterführende Literatur | 955 | | | |

Teil V Systematische Funktionsanalytik

| | | | | | |
|-----------|--|-----|-----------|---|------|
| 34 | Sequenzanalyse | 959 | 36 | Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA zur Genomanalyse in der molekularen Cytogenetik | 1005 |
| 34.1 | Sequenzanalyse und Bioinformatik | 959 | 36.1 | Methoden zur Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA | 1006 |
| 34.2 | Datenbanken | 960 | 36.1.1 | Markierungsstrategie | 1006 |
| 34.2.1 | Datenabruf | 961 | 36.1.2 | DNA-Sonden | 1006 |
| 34.3 | Webdienste | 964 | 36.1.3 | Markierung der DNA-Sonden | 1007 |
| 34.4 | Sequenzzusammensetzung | 965 | 36.1.4 | <i>In-situ</i> -Hybridisierung | 1008 |
| 34.5 | Muster in Sequenzen | 966 | 36.1.5 | Fluoreszenzauswertung der Hybridisierungssignale | 1008 |
| 34.5.1 | Sequenzsignale: funktionale Motive | 967 | 36.2 | Anwendungen: FISH und CGH | 1009 |
| 34.5.2 | Transkriptionsfaktor-Bindestellen | 968 | 36.2.1 | Analyse genomischer DNA durch FISH | 1009 |
| 34.5.3 | Identifizierung codierender Bereiche in DNA | 968 | 36.2.2 | Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) | 1011 |
| 34.5.4 | Proteinlokalisierung | 969 | | Weiterführende Literatur | 1014 |
| 34.5.5 | Sekundärstruktur | 970 | 37 | Physikalische und genetische Genkartierung | 1015 |
| 34.6 | Homologie | 970 | 37.1 | Genetische Kartierung: Lokalisierung von Loci im Genom | 1015 |
| 34.6.1 | Identität, Ähnlichkeit und Homologie | 970 | 37.1.1 | Rekombination | 1015 |
| 34.6.2 | Alignment | 971 | 37.1.2 | Genetische Marker | 1017 |
| 34.6.3 | Optimales Alignment | 973 | 37.1.3 | Kopplungsanalyse – die Erstellung genetischer Karten | 1019 |
| 34.6.4 | Alignment für schnelle Datenbanksuchen: BLAST | 974 | 37.1.4 | Die genetische Karte des menschlichen Genoms | 1021 |
| 34.6.5 | Profilbasierte Datenbanksuchen: PSI-BLAST | 975 | 37.1.5 | Genetische Kartierung von Krankheitsgenen | 1022 |
| 34.7 | Multiple Alignment und Konsensussequenzen | 977 | 37.2 | Physikalische Kartierung | 1023 |
| 34.8 | Sequenz und Struktur | 978 | 37.2.1 | Restriktionskartierung ganzer Genome | 1023 |
| 34.9 | Ausblick | 979 | 37.2.2 | Kartierung mittels rekombinanter Klone | 1025 |
| | Weiterführende Literatur | 980 | 37.2.3 | Erstellung der physikalischen Karte | 1026 |
| 35 | Analyse von Promotorstärke und aktiver RNA-Synthese | 981 | 37.2.4 | Isolierung und Identifizierung von Genen | 1029 |
| 35.1 | Methoden zur Analyse von RNA-Transkripten | 981 | 37.2.5 | Transkriptkarten des menschlichen Genoms | 1031 |
| 35.1.1 | Überblick | 981 | 37.2.6 | Gen und vererbare Krankheit – die Mutationsuche | 1032 |
| 35.1.2 | Nuclease-S1-Analyse von RNA | 982 | 37.3 | Integration der Genkarten | 1033 |
| 35.1.3 | Ribonuclease-Protektionsassay (RPA) | 986 | | | |
| 35.1.4 | Primerverlängerung (<i>primer extension</i>) | 988 | | | |
| 35.1.5 | Northern-Blot, Dot- und Slot-Blot | 990 | | | |
| 35.1.6 | Quantitative Polymerasekettenreaktion (<i>real-time-PCR</i>) | 991 | | | |

| | | | | | |
|-----------|---|------|-----------|--|------|
| 37.4 | Das menschliche Genom | 1035 | 40.1.4 | Einsatz von antisense-Oligonucleotiden in Zeltkultur und in Tiermodellen | 1064 |
| | Weiterführende Literatur | 1035 | 40.1.5 | Antisense-Oligonucleotide als neue Arzneimittel | 1065 |
| 38 | Differenzielle Genaktivität | 1037 | 40.2 | Ribozyme | 1066 |
| 38.1 | Grundprinzip des <i>differential display</i> | 1037 | 40.2.1 | Entdeckung und Klassifikation von Ribozymen | 1066 |
| 38.2 | Experimentelle Durchführung des <i>differential display</i> | 1038 | 40.2.2 | Anwendungen von Ribozymen | 1067 |
| 38.2.1 | RNA-Isolierung | 1038 | 40.3 | RNA-Interferenz und microRNAs | 1068 |
| 38.2.2 | Synthese der cDNA | 1039 | 40.3.1 | Grundlagen der RNA-Interferenz | 1068 |
| 38.2.3 | Amplifikation durch die erste PCR | 1039 | 40.3.2 | RNA-Interferenz durch Expressionsvektoren | 1069 |
| 38.2.4 | Modifikationen der PCR und der Nachweisreaktion | 1040 | 40.3.3 | Anwendungen der RNA-Interferenz | 1070 |
| 38.2.5 | Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 1041 | 40.3.4 | microRNAs | 1070 |
| 38.2.6 | Aufreinigung von PCR-Produkten | 1042 | 40.4 | Aptamere: hoch affine RNA- und DNA-Oligonucleotide | 1072 |
| 38.2.7 | Northern-Blot-Analyse | 1042 | 40.4.1 | Selektion von Aptameren | 1072 |
| 38.2.8 | Klonierung der cDNAs | 1042 | 40.4.2 | Anwendungen von Aptameren | 1074 |
| 38.2.9 | Alternative zur Northern-Blot-Analyse: Microarray-Analysen | 1043 | 40.5 | Ausblick | 1075 |
| 38.3 | Leistungsfähigkeit des <i>differential display</i> | 1043 | | Weiterführende Literatur | 1076 |
| 38.3.1 | Abgeleitete Methoden | 1043 | 41 | Proteomanalyse | 1077 |
| 38.3.2 | Methodenkombinationen mit <i>differential display</i> | 1043 | 41.1 | Definition der Ausgangsbedingungen und der Fragestellung, Projektplanung | 1080 |
| 38.3.3 | <i>Differential display</i> und Microarray-Analyse | 1044 | 41.2 | Probenvorbereitung | 1081 |
| 38.4 | Einsatzmöglichkeiten des <i>differential display</i> | 1044 | 41.3 | Die quantitative Analyse des Proteoms mit <i>top-down</i> -Strategien | 1083 |
| | Weiterführende Literatur | 1045 | 41.3.1 | Labelfreie <i>top-down</i> -Proteomanalysen | 1083 |
| 39 | DNA-Microarray-Technologie | 1047 | 41.3.2 | Isotopenlabelbasierte <i>top-down</i> -Proteomanalysen | 1088 |
| 39.1 | RNA-Analysen | 1048 | 41.4 | <i>Bottom-up</i> -Proteomstrategie | 1095 |
| 39.1.1 | Analyse der Transkriptmengen | 1048 | 41.4.1 | Labelfreie <i>bottom-up</i> -Proteomanalysen | 1096 |
| 39.1.2 | RNA-Reifung | 1049 | 41.4.2 | Isotopenlabelbasierte <i>bottom-up</i> -Proteomanalysen | 1097 |
| 39.1.3 | RNA-Struktur und Funktionalität | 1049 | 41.5 | <i>Targeted proteomics</i> | 1098 |
| 39.2 | DNA-Analysen | 1049 | 41.6 | Bioinformatik | 1099 |
| 39.2.1 | Genotypisierung | 1049 | 41.7 | Diskussion und Ausblick | 1100 |
| 39.2.2 | Epigenetische Studien | 1050 | | Weiterführende Literatur | 1101 |
| 39.2.3 | DNA-Sequenzierung | 1051 | 42 | Metabolomics und Peptidomics | 1103 |
| 39.2.4 | Analyse der Kopienzahl genomischer DNA-Abschnitte | 1052 | 42.1 | Systembiologie und Metabolomics | 1105 |
| 39.2.5 | Protein-DNA-Interaktionen | 1053 | 42.2 | Technologische Plattformen für Metabolomics | 1106 |
| 39.3 | Molekülsynthese | 1054 | 42.3 | Metabolomisches Profiling | 1107 |
| 39.3.1 | DNA-Synthese | 1054 | 42.4 | Peptidomics | 1108 |
| 39.3.2 | Herstellung von RNAi | 1054 | 42.5 | Metabolomics Knowledge Mining | 1109 |
| 39.3.3 | Chipgebundene Proteinexpression | 1055 | 42.6 | Datamining | 1110 |
| 39.4 | Neue Ansätze | 1055 | 42.7 | Anwendungsfelder | 1110 |
| 39.4.1 | Genomweite Identifizierung funktionell-essenzieller Gene | 1055 | | Weiterführende Literatur: | 1111 |
| 39.4.2 | Eine universelle Chipplattform | 1056 | 43 | Interactomics – systematische Protein-Protein-Wechselwirkungen | 1113 |
| 39.4.3 | Strukturanalysen | 1057 | 43.1 | Protein-Microarrays | 1113 |
| 39.4.4 | Jenseits von Nucleinsäuren | 1057 | 43.1.1 | Sensitivität durch Miniaturisierung – <i>ambient analyte assay</i> | 1114 |
| | Weiterführende Literatur | 1058 | 43.1.2 | Von DNA- zu Protein-Microarrays | 1115 |
| 40 | Oligonucleotide als zellbiologische Werkzeuge | 1059 | 43.1.3 | Anwendungen von Protein-Microarrays | 1117 |
| 40.1 | Antisense-Oligonucleotide | 1060 | | Weiterführende Literatur | 1119 |
| 40.1.1 | Wirkweisen von antisense-Oligonucleotiden | 1061 | | | |
| 40.1.2 | Triplexbildende Oligonucleotide | 1062 | | | |
| 40.1.3 | Modifikationen von Oligonucleotiden zur Steigerung der Nucleasestabilität | 1062 | | | |

| | | | |
|-----------|---|------|--|
| XX | Inhalt | | |
| 44 | Chemische Biologie | 1121 | |
| 44.1 | Chemische Biologie – innovative chemische Ansätze zum Studium biologischer Fragestellungen | 1121 | |
| 44.2 | Chemische Genetik – kleine organische Moleküle zur Modulation von Proteinfunktionen | 1123 | |
| 44.2.1 | Das Studium von Proteinfunktionen mit kleinen organischen Molekülen | 1125 | |
| 44.2.2 | Vorwärts und rückwärts gerichtete Chemische Genetik | 1127 | |
| 44.2.3 | Chemo-genomische Ansätze am Beispiel der <i>bump-and-hole</i> -Methode | 1128 | |
| 44.2.4 | Identifizierung von Kinase-Substraten mithilfe der ASKA-Technologie | 1131 | |
| 44.2.5 | Biologische Systeme mit kleinen organischen Molekülen schaltbar machen | 1132 | |
| 44.3 | Ligation exprimierter Proteine – Symbiose aus Chemie und Biologie zum Studium von Proteinfunktionen | 1133 | |
| 44.3.1 | Analyse lipidierter Proteine | 1134 | |
| 44.3.2 | Analyse phosphorylierter Proteine | 1136 | |
| 44.3.3 | Konditionales Proteinspleißen | 1136 | |
| | Weiterführende Literatur | 1137 | |
| 45 | Toponomanalyse | 1139 | |
| 45.1 | Lichtmikroskopische Methoden im Hochdurchsatz | 1139 | |
| 45.2 | Antikörperbasierte Toponomanalyse mit Multi-Epitop-Ligand-Kartierung (MELK) | 1140 | |
| 45.2.1 | Konzept des Proteintoponom | 1141 | |
| 45.2.2 | <i>Imaging cycler robots</i> : Grundlage einer Toponomlesetechnologie | 1142 | |
| 45.2.3 | Ein Beispiel: Spezifität und Selektivität des Zelloberflächentoponom | 1144 | |
| 45.2.4 | Methoden der Toponomanalyse | 1144 | |
| 45.2.5 | Zusammenfassung und Ausblick | 1151 | |
| 45.3 | Abbildende Massenspektrometrie | 1151 | |
| 45.3.1 | Analytische Mikrosonden | 1151 | |
| | 45.3.2 Images: Massenspektrometrische Rasterbilder | 1152 | |
| | 45.3.3 SMALDI-MS: Das Matrixdilemma | 1153 | |
| | 45.3.4 SIMS- und ME-SIMS-Imaging: die Erweiterung des Massenbereichs | 1154 | |
| | 45.3.5 Auflösung versus Nachweisgrenze | 1154 | |
| | 45.3.6 MS-Imaging als phänomenologische Methode | 1154 | |
| | 45.3.7 MALDI-Imaging als exakte Methode | 1155 | |
| | 45.3.8 Identifizierung und Charakterisierung | 1156 | |
| | Weiterführende Literatur | 1157 | |
| | 46 Systembiologie | 1159 | |
| | 46.1 Ziele der Systembiologie | 1159 | |
| | 46.1.1 Definition | 1159 | |
| | 46.2 Methodische Ansätze | 1160 | |
| | 46.2.1 Modellaufbau | 1160 | |
| | 46.2.2 Induktiver versus deduktiver Lösungsansatz | 1161 | |
| | 46.2.3 Mathematische Werkzeuge | 1163 | |
| | 46.3 Beispiele für systembiologische Modelle | 1163 | |
| | 46.3.1 Studien in der pharmakologischen Forschung | 1163 | |
| | 46.3.2 Signaltransduktion JAK/STAT | 1166 | |
| | 46.3.3 Rückkopplungsprozesse bei der Aktivierung von T-Lymphocyten | 1167 | |
| | 46.3.4 Signaltransduktion EGF-Rezeptor/MAPK | 1168 | |
| | 46.4 Hürden und Perspektiven für die Systembiologie | 1168 | |
| | 46.5 Internationale Forschungsnetzwerke | 1169 | |
| | Weiterführende Literatur | 1170 | |
| | Anhang | | |
| | Anhang 1: Strahlenschutz im Labor | 1173 | |
| | Anhang 2: Biologische Sicherheit | 1175 | |
| | Anhang 3: Aminosäuren und posttranslationale Modifikationen | 1177 | |
| | Anhang 4: Symbole und Abkürzungen | 1179 | |
| | Index | 1183 | |