

Inhaltsübersicht

1 Bioanalytik – eine eigenständige Wissenschaft	1
---	---

Teil I Proteinanalytik

2 Proteinreinigung	9
3 Proteinbestimmungen	35
4 Enzymatische Aktivitätstests	49
5 Immunologische Techniken	67
6 Chemische Modifikation von Proteinen und Proteinkomplexen	103
7 Spektroskopie	131
8 Spaltung von Proteinen	179
9 Chromatographische Trennmethode	195
10 Elektrophoretische Verfahren	217
11 Kapillarelektrophorese	253
12 Aminosäureanalyse	285
13 Proteinsequenzanalyse	297
14 Massenspektrometrie	323

Teil II 3D-Strukturaufklärung

15 NMR-Spektroskopie von Biomolekülen	371
16 Elektronenmikroskopie	413
17 Röntgenstrukturanalyse	451

Teil III Spezielle Stoffgruppen

18 Analytik synthetischer Peptide	467
19 Kohlenhydratanalytik	485
20 Lipidanalytik	537

Teil IV Nucleinsäure-Analytik

21	Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren	571
22	Aufarbeitung von Nucleinsäuren	593
23	Hybridisierung und Nachweistechiken	635
24	Polymerase-Kettenreaktion	673
25	DNA-Sequenzierung	705
26	Analyse der genomischen DNA-Methylierung	735
27	Protein-DNA-Wechselwirkungen	747

Teil V Funktionsanalytik

28	Sequenzdatenanalyse	781
29	Proteomanalyse	815
30	Genomanalyse mit Methoden der molekularen Cytogenetik	829
31	Physikalische und genetische Genkartierung	845
33	Analyse von Promotorstärke und aktiver RNA-Synthese	877
✓34	Protein-Protein-Wechselwirkungen: das Two-Hybrid-System	901
✗35	Assoziationen zwischen Makromolekülen: Analytische Ultrazentrifugation	915
36	Gezielte Genmodifikation	921
37	Oligonucleotide als zellbiologische Werkzeuge	941
38	Überexpression	959

Anhang	979
---------------	-----

Index	1017
-------	------

Inhalt

1	Bioanalytik – eine eigenständige Wissenschaft	1
----------	--	----------

Teil I Proteinanalytik

* 2	Proteinreinigung	9
2.1	Eigenschaften von Proteinen	9
2.2	Proteinlokalisierung und Reinigungsstrategie	13
2.3	Homogenisierung und Zellaufschluss	14
2.4	Die Fällung	17
2.5	Zentrifugation	18
2.5.1	Grundlagen	20
2.5.2	Zentrifugationstechniken	21
2.6	Abtrennung von Salzen oder hydrophilen Verunreinigungen	24
2.7	Konzentrierung	27
2.8	Detergenzien und ihre Entfernung	27
2.8.1	Eigenschaften von Detergenzien	28
2.8.2	Entfernen von Detergenzien	31
2.9	Probenvorbereitung für die Proteomanalyse	33
	Weiterführende Literatur	33
* 3	Proteinbestimmungen	35
3.1	Quantitative Bestimmung durch Färbetests	37
3.1.1	Biuret-Assay	39
3.1.2	Lowry-Assay	39
3.1.3	Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)	40
3.1.4	Bradford-Assay	41
3.2	Spektroskopische Methoden	42
3.2.1	Messungen im UV-Bereich	43
3.2.2	Fluoreszenzmethode	45
3.3	Radioaktive Markierung von Peptiden und Proteinen	45
3.3.1	Iodierungen	47
	Weiterführende Literatur	48
4	Enzymatische Aktivitätstests	49
4.1	Grundlagen der Enzymkinetik	50
4.2	Maßeinheiten der Enzymaktivität	50
4.3	Messtechniken	52
4.3.1	Photometrische Aktivitätstests	52
4.3.2	Kontinuierliche und diskontinuierliche Tests	53
4.4	Einflussgrößen auf die Enzymaktivität	54
4.4.1	pH-Wert und Puffersystem	54
4.4.2	Temperatur	55

4.4.3	Auswahl des Substrats	56
4.4.4	Substratkonzentration	57
4.4.5	Enzymkonzentration	59
4.4.6	Enzymstabilität	60
4.5	Aufbau eines Testsystems	60
4.6	Störquellen und Fehlermöglichkeiten	62
	Weiterführende Literatur	64
× 5	Immunologische Techniken	67
5.1	Antikörper	69
5.1.1	Antikörper und Immunabwehr	69
5.1.2	Antikörper als Reagenz	69
5.1.3	Eigenschaften von Antikörpern	70
5.1.4	Funktionelle Struktur von IgG	71
5.1.5	Antigenbindungsstelle (Haftstelle)	72
5.1.6	Handhabung von Antikörpern	73
5.2	Antigene	73
5.3	Antigen-Antikörper-Reaktion	75
5.3.1	Immunagglutination	76
5.3.2	Immunpräzipitation	77
5.3.3	Immunbindung	89
5.3.4	Western-Blotting: Proteintransfer, Immobilisierung und Immundetektion	94
5.4	Herstellung von Antikörpern	100
5.4.1	Arten von Antikörpern	101
	Weiterführende Literatur	102
6	Chemische Modifikation von Proteinen und Proteinkomplexen	103
6.1	Chemische Modifikation funktioneller Gruppen von Proteinen	104
6.2	Modifizierung als Mittel zur Einführung von Reportergruppen	113
6.2.1	Untersuchungen an natürlich vorkommenden Proteinen	113
6.2.2	Untersuchungen an überexprimierten oder mutierten Proteinen	117
6.3	Protein-Cross-Linking zur Analyse von Protein-Wechselwirkungen	118
6.3.1	Bifunktionelle Reagenzien	119
6.3.2	Photoaffinitätsmarkierung	121
	Weiterführende Literatur	130
7	Spektroskopie	131
7.1	Physikalische Prinzipien und Messtechniken	132

7.1.1	Physikalische Grundlagen optischer spektroskopischer Messmethoden	132
7.1.2	Wechselwirkung Licht-Materie	133
7.1.3	Absorptionsmessungen	141
7.1.4	Photometer	144
7.1.5	Kinetische spektroskopische Untersuchungen	145
7.2	UV/VIS/NIR-Spektroskopie	147
7.2.1	Grundlagen	147
7.2.2	Chromoproteine	148
7.3	IR-Spektroskopie	156
7.3.1	Grundlagen	156
7.3.2	Molekülschwingungen	157
7.3.3	Messtechniken	158
7.3.4	Infrarotspektroskopie von Proteinen	160
7.4	Raman-Spektroskopie	163
7.4.1	Grundlagen	163
7.4.2	Raman-Experimente	164
7.4.3	Resonanz-Ramanspektroskopie	166
7.5	Fluoreszenzspektroskopie	167
7.5.1	Grundlagen	167
7.5.2	Fluoreszenzspektren als Emissionsspektren und als Aktionsspektren	169
7.5.3	Fluoreszenzuntersuchungen mit intrinsischen und extrinsischen Fluorophoren	171
7.6	Methoden mit polarisiertem Licht	172
7.6.1	Lineardichroismus	172
7.6.2	Optische Rotationsdispersion und Circular dichroismus	176
	Weiterführende Literatur	178
8	Spaltung von Proteinen	179
8.1	Proteolytische Enzyme	179
8.2	Strategie	180
8.3	Denaturierung	181
8.4	Spaltung von Disulfidbrücken und Alkylierung	182
8.5	Enzymatische Fragmentierung	183
8.5.1	Proteasen	185
8.5.2.	Proteolysebedingungen	189
8.6	Chemische Fragmentierung	190
8.7	Ausblick	193
	Weiterführende Literatur	194
9	Chromatographische Trennmethoden	195
9.1	Prinzip der Chromatographie	195
9.1.1	Grundbegriffe	196
9.1.2	Instrumentierung	196
9.1.3	Stationäre Phasen	197
9.1.4	Detektion der chromatographischen Trennung	197
9.2	Chromatographische Theorie	198
9.3	Reinigungsstrategie für Peptide und Proteine	201
9.4	Ionenaustausch-Chromatographie	202
9.5	Hydroxyapatit-Chromatographie	204
9.6	Reversed-Phase-Chromatographie	205
9.7	Hydrophobe Interaktionschromatographie	208

9.8	Affinitätschromatographie	209
9.9	Ausschlusschromatographie	213
	Weiterführende Literatur	215
10	Elektrophoretische Verfahren	217
10.1	Geschichtlicher Überblick	218
10.2	Theoretische Grundlagen	219
10.3	Instrumentierung und Durchführung von Gelelektrophoresen	223
10.3.1	Probenvorbereitung	224
10.3.2	Gelmedien für Elektrophoresen	225
10.3.3	Nachweis und Quantifizierung der getrennten Proteine	227
10.3.4	Zonenelektrophorese	229
10.3.5	Porengradientengele	230
10.3.6	Puffersysteme	231
10.3.7	Disk-Elektrophorese	231
10.3.8	Saure Nativelektrophorese	233
10.3.9	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	233
10.3.10	Blaue Nativ-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	234
10.3.11	Isoelektrische Fokussierung	235
10.4	Präparative Verfahren	241
10.4.1	Elektroelution aus Gelen	241
10.4.2	Präparative Zonenelektrophorese	241
10.4.3	Präparative isoelektrische Fokussierung	242
10.5	Hochauflösende zweidimensionale Elektrophorese	243
10.6	Trägerfreie Elektrophorese	246
10.7	Elektroblotting	247
10.7.1	Blotsysteme	248
10.7.2	Der Blotvorgang	249
10.7.3	Die Wahl der geeigneten Blotmembran	250
	Weiterführende Literatur	252
* 11	Kapillarelektrophorese	253
11.1	Geschichtlicher Überblick	253
11.2	Prinzip der Kapillarelektrophorese	254
11.3	Gerätetechnik	254
11.3.1	Injektion der Proben	255
11.3.2	Detektion	256
11.4	Theoretische Grundlagen	258
11.4.1	Elektroosmotischer Fluss	259
11.4.2	Joulesche Wärmeentwicklung	260
11.5	Trennprinzipien in der CE	260
11.6	Kapillarzonenelektrophorese (CZE)	261
11.6.1	Elektrodispersion	263
11.6.2	Auflösung	264
11.6.3	Trennungsoptimierung	264
11.7	Kapillaraffinitätselektrophorese (CAE)	267
11.8	Micellarelektrokinetische Chromatographie (MEKC)	269
11.8.1	Theoretische Grundlagen	269
11.8.2	Chirale MEKC	271
11.9	Kapillargelelektrophorese (CGE)	273
11.10	Isoelektrische Fokussierung (CIEF)	274
11.10.1	Einschrittfokussierung	276

11.10.2	Fokussierung mit Druck-/Spannungsmobilisierung	276
11.10.3	Fokussierung mit chemischer Mobilisierung	277
11.11	Isotachophorese (ITP)	278
11.12	Spezielle Applikationen	279
11.12.1	Online-Probenkonzentrierung	279
11.12.2	CE-MS-Kopplung	281
11.12.3	Fraktionierung	281
11.13	Ausblick	283
	Weiterführende Literatur	284
* 12	Aminosäurenanalyse	285
12.1	Probenvorbereitung	286
12.1.1	Saure Hydrolyse	286
12.1.2	Alkalische Hydrolyse	287
12.1.3	Enzymatische Hydrolyse	287
12.2	Freie Aminosäuren	288
12.3	Derivatisierung	288
12.3.1	Nachsäulenderivatisierung	288
12.3.2	Vorsäulenderivatisierung	291
12.4	Datenauswertung und Beurteilung der Analysen	295
	Weiterführende Literatur	296
* 13	Proteinsequenzanalyse	297
13.1	<i>N</i> -terminale Sequenzanalyse: Der Edman-Abbau	299
13.1.1	Reaktionen des Edman-Abbaus	299
13.1.2	Identifizierung der Aminosäuren	301
13.1.3	Die Qualität des Edman-Abbaus: Die repetitive Ausbeute	302
13.1.4	Instrumentierung	302
13.1.5	Probleme der Aminosäuresequenzanalyse	307
13.1.6	Stand der Technik	311
13.2	<i>C</i> -terminale Sequenzanalyse	312
13.2.1	Chemische Abbaumethoden	313
13.2.2	Peptidmengen und Qualität des chemischen Abbaus	318
13.2.3	Abbau der Polypeptide mit Carboxypeptidasen	318
13.2.4	Carboxy-terminale Leitersequenzierung	320
	Weiterführende Literatur	322
* 14	Massenspektrometrie	323
14.1	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/ Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)	324
14.1.1	Ionisierungsprinzip	324
14.1.2	Massenanalyse der Ionen mit dem Flugzeitmassenspektrometer	327
14.1.3	Detektion der Ionen	331
14.1.4	Molekulargewichtsbestimmung mit MALDI	332
14.1.5	Sequenzierung von Peptiden mit MALDI	339
14.1.6.	Kopplung von MALDI-MS und PAGE	347
14.2	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	348
14.2.1	Ionisierungsprinzip	349
14.2.2	ESI-Quelle und Interface	352

14.2.3	Massenanalyse der Ionen mit dem Quadrupolmassenspektrometer	354
14.2.4	Massenanalyse mit der Ionenfalle	357
14.2.5	Molekulargewichtsbestimmung mit ESI-MS	359
14.2.6	Strukturanalyse mit ESI-MS	363
14.2.7	Sequenzierung von Peptiden mit ESI-MS	365
	Weiterführende Literatur	368

Teil II 3D-Strukturaufklärung

15	NMR-Spektroskopie von Biomolekülen	371
15.1	Theorie der NMR-Spektroskopie	372
15.1.1	Kernspin und Energiequantelung	372
15.1.2	Continuous-Wave-Spektroskopie	374
15.1.3	Gepulste Fourier-Transformations- spektroskopie	374
15.1.4	Besetzungszahlen und Gleichgewichts- magnetisierung	375
15.1.5	Die Bloch-Gleichungen	376
15.1.6	Relaxation	376
15.2	Eindimensionale NMR-Spektroskopie	377
15.2.1	Das 1D-Experiment	377
15.2.2	Spektrale Parameter	378
15.3	Zweidimensionale NMR-Spektroskopie	383
15.3.1	Aufbau eines 2D-Spektrums	383
15.3.2	Das COSY-Spektrum	386
15.3.3	Das TOCSY-Spektrum	386
15.3.4	Das NOESY-Spektrum	387
15.3.5	Homonukleare 2D-NMR-Experimente von Proteinen: Grenzen der Anwendung	388
15.3.6	Heteronukleare NMR	388
15.3.7	HSQC	389
15.4	Dreidimensionale NMR-Spektroskopie	389
15.4.1	NOESY-HSQC- und TOCSY-HSQC- Experiment	391
15.4.2	HCCH-TOCSY- und HCCH-COSY- Experiment	391
15.4.3	Tripelresonanzexperimente	391
15.5	Signalzuordnung	394
15.5.1	Sequentielle Zuordnung homonuklearer Spektren	394
15.5.2	Auswertung heteronuklearer 3D-Spektren	396
15.5.3	Selektive Aminosäuremarkierung	397
15.5.4	Sequentielle Zuordnung mit Tripelreso- nanzspektren	397
15.6	Bestimmung der Proteinstruktur	401
15.6.1	Randbedingungen für die Strukturrechnung	401
15.6.2	Bestimmung der Sekundärstruktur	402
15.6.3	Berechnung der Tertiärstruktur	404
15.7	Proteinstrukturen und mehr – ein Ausblick	409
15.7.1	Bestimmung der Dynamik	409
15.7.2	Untersuchung von Protein-Ligand- Komplexen	409
15.7.3	Proteinfaltung	410
	Weiterführende Literatur	410

16	Elektronenmikroskopie	413
16.1	Transmissionselektronenmikroskopie – Instrumentation	414
16.2	Präparationsverfahren	417
16.2.1	Negativkontrastierung	417
16.2.2	Bedampfung mit Schwermetallen	419
16.2.3	Einbettung in Eis	420
16.2.4	Zweidimensionale Kristallisation von Proteinen	421
16.3	Abbildung von Molekülen im Elektronenmikroskop	422
16.3.1	Auflösung eines Transmissionselektronen- mikroskops	422
16.3.2	Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit dem Objekt	424
16.4	Bildanalyse, Bildverarbeitung und 3D-Rekonstruktion	427
16.4.1	Fourier-Transformation	428
16.4.2	Analyse der Kontrastübertragungsfunktion und der Kristallinität des Objekts	430
16.4.3	Digitalisierung	433
16.4.4	Erhöhung des Signal-zu-Rausch- Verhältnisses	433
16.4.5	Korrespondenzanalyse und Klassifizierung	437
16.4.6	Dreidimensionale Elektronenmikroskopie	439
16.5	Rastersondenmikroskopie	443
16.5.1	Rastertunnelmikroskopie	445
16.5.2	Rasterkraftmikroskopie	446
	Weiterführende Literatur	448
17	Röntgenstrukturanalyse	451
17.1	Kristallisation	451
17.2	Kristalle und Röntgenbeugung	453
17.3	Das Phasenproblem	457
17.3.1	Isomorpher Ersatz: SIR und MIR	457
17.3.2	Multiple anomale Dispersion (MAD)	459
17.3.3	Molekularer Ersatz (MR)	460
17.4	Modellbau und Strukturverfeinerung	461
	Weiterführende Literatur	463

Teil III Spezielle Stoffgruppen

18	Analytik synthetischer Peptide	467
18.1	Prinzip der Peptidsynthese	467
18.2	Untersuchung der Reinheit synthetischer Peptide	473
18.3	Charakterisierung und Identität synthetischer Peptide	474
18.4	Charakterisierung der Struktur synthetischer Peptide	479
18.5	Analytik von Peptidbibliotheken	480
	Weiterführende Literatur	483
19	Kohlenhydratanalytik	485
19.1	Allgemeine stereochemische Grundlagen	486
19.1.1	Die Reihe der D-Zucker	486
19.1.2	Stereochemie der D-Glucose	487

19.1.3	Wichtige Monosaccharidbausteine	488
19.1.4	Die Reihe der L-Zucker	489
19.1.5	Die glykosidische Bindung	490
19.2	Die Proteinglykosylierung	494
19.2.1	Aufbau der N-Glykane	495
19.2.2	Der Aufbau der O-Glykane	497
19.3	Glykoanalytik am intakten Glykoprotein	498
19.3.1	Ist mein Protein glykosyliert?	498
19.3.2	Charakterisierung der Glykosylierung mittels Lectinen	501
19.3.3	Isoelektrische Fokussierung	502
19.3.4	Analyse der neutralen Monosaccharid- komponenten	502
19.3.5	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)	505
19.4	Freisetzung und Isolierung des N-Glykanpools	506
19.4.1	Enzymatische Freisetzung mittels PNGase F	506
19.4.2	Enzymatische Freisetzung mittels Endoglykosidasen	507
19.4.3	Chemische Freisetzung mittels Hydrazinolyse	507
19.5	Isolierung einzelner N-Glykane	508
19.6	Charakterisierung der Glykane im Glykanpool	509
19.6.1	Mapping nicht-derivatisierter N-Glykane	509
19.6.2	Mapping derivatisierter N-Glykane	514
19.6.3	Mapping mittels Kapillarelektrophorese (HPCE)	517
19.7	Glykoanalytik isolierter N-Glykane (Strukturanalyse)	519
19.7.1	Kompositionsanalyse	519
19.7.2	Methylierungsanalyse	522
19.7.3	Sequenzierung in Verbindung mit Gelfiltration	524
19.7.4	FAB-MS (Fast Atom Bombardment- Massenspektrometrie)	524
19.7.5	¹ H-NMR-Spektroskopie	526
19.8	Schlussbetrachtung	534
	Weiterführende Literatur	534
20	Lipidanalytik	537
20.1	Aufbau und Einteilung von Lipiden	537
20.2	Extraktion von Lipiden aus biologischem Material	539
20.2.1	Flüssigphasenextraktion	539
20.2.2	Festphasenextraktion	540
20.3	Methoden der Lipidanalytik	542
20.3.1	Chromatographische Methoden	542
20.3.2	Massenspektrometrie	547
20.3.3	Immunoassays	548
20.3.4	Weitere Methoden in der Lipidanalytik	548
20.3.5	Online-Kopplung verschiedener Analysesysteme	550
20.4	Analytik ausgewählter Lipidklassen	553
20.4.1	Gesamtlipidextrakte	553
20.4.2	Fettsäuren	553
20.4.3	Unpolare Neutrallipide	554

20.4.4	Polare Esterlipide	556
20.4.5	Lipidhormone und intrazelluläre Signaltransduktoren	560
20.5	Lipidvitamine	563
20.6	Ausblick	567
	Weiterführende Literatur	567

Teil IV Nucleinsäure-Analytik

21	Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren	571
21.1	Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	571
21.1.1	Phenolextraktion	571
21.1.2	Gelfiltration	572
21.1.3	Ethanolpräzipitation der Nucleinsäuren	573
21.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	574
21.2	Isolierung genomischer DNA	576
21.3	Isolierung niedermolekularer DNA	578
21.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	578
21.3.2	Isolierung niedermolekularer DNA aus eukaryontischen Zellen	584
21.4	Isolierung viraler DNA	585
21.4.1	Isolierung von Phagen-DNA	585
21.4.2	Isolierung von DNA aus eukaryontischen Viren	586
21.5	Isolierung einzelsträngiger DNA	587
21.5.1	Isolierung von M13-DNA	587
21.5.2	Trennung von einzel- und doppelsträngiger DNA	588
21.6	Isolierung von RNA	589
21.6.1	Isolierung von cytoplasmatischer RNA	590
21.6.2	Isolierung von poly(A) ⁺ -RNA	591
	Weiterführende Literatur	592
22	Aufarbeitung von Nucleinsäuren	593
22.1	Restriktionsanalyse	593
22.1.1	Prinzip der Restriktionsanalyse	593
22.1.2	Historischer Überblick	594
22.1.3	Restriktionsenzyme	594
22.1.4	Der Restriktionsansatz und seine Anwendungen	597
22.2	Elektrophorese	603
22.2.1	Gelelektrophorese von DNA	605
22.2.2	Gelelektrophorese von RNA	612
22.2.3	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	614
22.2.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese	617
22.3	Färbemethoden	621
22.3.1	Fluoreszenzfarbstoffe	621
22.3.2	Silberfärbung	623
22.4	Nucleinsäure-Blotting	624
22.4.1	Blotting-Verfahren	624
22.4.2	Wahl der Membranen	625
22.4.3	Southern-Blotting	626
22.4.4	Northern-Blotting	628
22.4.5	Dot- und Slot-Blotting	629

22.4.6	Kolonie- und Plaque-Hybridisierungen	630
22.5	Fragmentisolierung	631
22.5.1	Elektroelution	631
22.5.2	Reinigung über Gelfiltrations- oder Reversed-Phase-Säulen	633
22.5.3	Andere Methoden	633
	Weiterführende Literatur	634
* 23	Hybridisierung und Nachweistechiken	635
23.1	Grundlagen der Hybridisierung	636
23.1.1	Prinzip und Durchführung der Hybridisierung	637
23.1.2	Spezifität der Hybridisierung und Stringenz	638
23.1.3	Hybridisierungsformate	640
23.2	Sonden zur Nucleinsäureanalytik	643
23.2.1	DNA-Sonden	644
23.2.2	RNA-Sonden	645
23.2.3	PNA-Sonden	646
23.3	Markierungsverfahren	647
23.3.1	Markierungspositionen	649
23.3.2	Enzymatische Markierungsreaktionen	650
23.3.3	Photochemische Markierungsreaktionen	652
23.3.4	Chemische Markierungsreaktionen	652
23.4	Nachweissysteme	653
23.4.1	Färbemethoden	653
23.4.2	Radioaktive Systeme	654
23.4.3	Nichtradioaktive Systeme	655
23.5	Amplifikationssysteme	666
23.5.1	Targetamplifikation	668
23.5.2	Targetspezifische Signalamplifikation	669
23.5.3	Signalamplifikation	669
	Weiterführende Literatur	671
* 24	Polymerase-Kettenreaktion	673
24.1	Möglichkeiten der PCR	673
24.2	Grundlagen	675
24.2.1	Instrumentierung	675
24.2.2	Amplifikation von DNA	676
24.2.3	Amplifikation von RNA (RT-PCR)	679
24.2.4	Optimierung der Reaktion	681
24.2.5	Quantitative PCR	682
24.3	Spezielle PCR-Techniken	686
24.3.1	Nested-PCR	686
24.3.2	Asymmetrische PCR	686
24.3.3	Einsatz von degenerierten Primern	687
24.3.4	Multiplex-PCR	687
24.3.5	Cycle-Sequencing	688
24.3.6	In-vitro-Mutagenese	688
24.3.7	Weitere Verfahren	690
24.4	Kontaminationsproblematik	690
24.4.1	Vermeidung von Kontaminationen	691
24.4.2	Dekontamination	692
24.5	Anwendungen	693
24.5.1	Nachweis von Infektionskrankheiten	693
24.5.2	Nachweis von genetischen Defekten	694
24.5.3	Humangenomprojekt	698
24.6	Alternative Verfahren der Amplifikation	699

XVI	INHALT	
24.6.1	NASBA (<i>nucleic acid sequence based amplification</i>)	699
24.6.2	SDA (<i>strand displacement amplification</i>)	699
24.6.3	LCR (<i>Ligase-Kettenreaktion</i>)	701
26.6.4	bDNA (<i>branched DNA amplification</i>)	702
24.7	Ausblick	703
	Weiterführende Literatur	703
25	DNA-Sequenzierung	705
25.1	Gelgestützte DNA-Sequenzierungsverfahren	709
25.1.1	Sequenzierung nach Sanger: das Didesoxy-Verfahren	709
25.1.2	Markierungstechniken und Nachweisverfahren	719
25.1.3	Chemische Spaltung nach Maxam und Gilbert	724
25.2	Gelfreie DNA-Sequenzierungsmethoden	731
	Weiterführende Literatur	733
26	Analyse der genomischen DNA-Methylierung	735
26.1	Detektionsmethoden der DNA-Basemethylierung: Definitionen	736
26.2	Detektionsmethoden	736
26.2.1	Niedrigste horizontale Auflösung: Detektion und Quantifizierung des Gesamtgehaltes an einem methylierten Nucleosid und seiner Dinucleotid- zusammensetzung	736
26.2.2	Mittlere horizontale Auflösung: Kartierung einer Teilmenge aller modifizierten Stellen auf Nucleotidsequenz-Ebene	739
26.2.3	Höchste horizontale Auflösung: Kartierung aller modifizierten Stellen auf Nucleotid- sequenz-Ebene	741
	Weiterführende Literatur	745
27	Protein-DNA-Wechselwirkungen	747
27.1	Nachweisverfahren für Protein-DNA- Wechselwirkungen	747
27.1.1	Filterbindung	748
27.1.2	EMSA	748
27.1.3	McKay-Assay	750
27.1.4	Southwestern und verwandte Techniken	750
27.2	Analyse der Proteinbindungsstelle auf der DNA	752
27.2.1	In vitro-Footprints	752
27.2.2	Weitere in vitro-Methoden zur Analyse von Proteinbindungsstellen auf der DNA	767
27.2.3	Direkte genomische Sequenzierung und in vivo/in situ-Footprints	767
27.3	Native elektrophoretische Verfahren zur Analyse von Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur	774
	Weiterführende Literatur	778

Teil V Funktionsanalytik

28	Sequenzdatenanalyse	781
28.1	Bioinformatik	782
28.1.1	Bioinformatik im Internet	783
28.2	Sequenzanalyse	785
28.2.1	Sequenzsignale: Funktionale Motive	786
28.2.2	Identifizierung codierender Bereiche	787
28.2.3	Peptideigenschaften	788
28.2.4	Ein neuronales Netz zur Erkennung von Sekretionssignalsequenzen	789
28.2.5	Sekundärstrukturanalysen	790
28.2.6	Sequenzmotive	794
28.3	Phylogenetische Analyse	794
28.4	Suche nach homologen Sequenzen	795
28.4.1	Identität, Ähnlichkeit und Homologie	796
28.4.2	Die Mutationsdatenmatrix (MDM)	796
28.4.3	Dotplots	803
28.4.4	Optimales Alignment: <i>dynamic programming</i>	803
28.4.5	Multiple Alignments	805
28.4.6	Alignment für schnelle Datenbanksuchen	807
28.4.7	Profilbasierte Datenbanksuchen	808
28.5	Wege zur Tertiärstruktur	809
28.5.1	Homologiemodellierung	809
28.5.2	Threading	809
28.5.3	Ab-initio-Strukturvorhersagen	811
28.6	Ausblick	812
	Weiterführende Literatur	813
29	Proteomanalyse	815
29.1	Methoden der Proteomanalyse	818
29.1.1	Definition der Ausgangsbedingungen und Fragestellung	818
29.1.2	Probenvorbereitung	819
29.1.3	Trennung der Proteine	819
29.1.4	Bildverarbeitung und Quantifizierung der Proteine	821
29.1.5	Identifizierung und Charakterisierung der Proteine	822
29.1.6	Bioinformatik	824
29.2	Diskussion und Ausblick	826
	Weiterführende Literatur	827
30	Genomanalyse mit Methoden der molekularen Cytogenetik	829
30.1	Die Technik der Fluoreszenz-in-situ- Hybridisierung	830
30.1.1	Historischer Überblick und technische Durchführung	830
30.1.2	FISH-Sonden	831
30.1.3	Nachweis durch Fluoreszenzfarbstoffe	832
30.1.4	Experimentelle Durchführung	834
30.2	Anwendungen von FISH für die Analyse genomischer DNA	837
30.2.1	FISH bei Metaphasechromosomen	837
30.2.2	Fiber-FISH	839

30.2.3	Interphasecytogenetik	840
30.2.4	Vergleichende genomische Hybridisierung	840
30.2.5	Dreidimensionale Genomstruktur	842
	Weiterführende Literatur	844
31	Physikalische und genetische Genkartierung	845
31.1	Genetische Kartierung:	
	Lokalisierung von Loci im Genom	845
31.1.1	Rekombination	845
31.1.2	Genetische Marker	847
31.1.3	Kopplungsanalyse – die Erstellung genetischer Karten	849
31.1.4	Die genetische Karte des menschlichen Genoms	852
31.1.5	Genetische Kartierung von Krankheitsgenen	853
31.2	Physikalische Kartierung	854
31.2.1	Restriktionskartierung ganzer Genome	854
31.2.2	Kartierung mittels rekombinanter Klone	856
31.2.3	Erstellung der physikalischen Karte	857
31.2.4	Isolierung und Identifizierung von Genen	860
31.2.5	Transkriptkarten des menschlichen Genoms	862
31.2.6	Gen und vererbte Krankheit – die Mutationssuche	862
31.3	Integration der Genkarten	863
31.4	Das Humangenom-Projekt	864
	Weiterführende Literatur	865
32	Differentielle Genaktivität	867
32.1	Grundprinzip des Differential Display	867
32.2	Experimentelle Durchführung des Differential Display	868
32.2.1	RNA-Isolierung	868
32.2.2	Synthese der cDNA	868
32.2.3	Amplifikation durch die erste PCR	869
32.2.4	Modifikationen der PCR und der Nachweisreaktion	870
32.2.5	Polyacrylamidgelelektrophorese	870
32.2.6	Aufreinigung von PCR-Produkten	871
32.2.7	Northern-Blot-Analyse	871
32.2.8	Klonierung der cDNAs	872
32.2.9	Alternative zur Northern-Blot-Analyse: Differential Screening	872
32.2.10	Alternativen zur Klonierung	872
32.3	Leistungsfähigkeit des Differential Display	873
32.3.1	Differentielle Hybridisierung	873
32.3.2	Subtraktionshybridisierung	873
32.3.3	Stärken des Differential Display	874
32.3.4	Schwächen des Differential Display	874
32.4	Einsatzmöglichkeiten des Differential Display	875
	Weiterführende Literatur	875
33	Analyse von Promotorstärke und aktiver RNA-Synthese	877
33.1	Methoden zur Analyse von RNA-Transkripten	877
33.1.1	Überblick	877

33.1.2	Nuclease-S1-Analyse von RNA	878
33.1.3	Ribonuclease-Protektionsassay (RPA)	882
33.1.4	Primerverlängerung (Primer Extension)	885
33.1.5	Northern-Blotting, Dot- und Slot-Blotting	886
33.1.6	Quantitative Polymerasekettenreaktion	888
33.2	Analyse der RNA-Syntheserate in vivo (Nuclear-Run-on-Assay)	889
33.2.1	Zellaufschluss	889
33.2.2	Die Nuclear-Run-on-Transkription und Detektion der Transkripte	890
33.3	Die in-vitro-Transkription klonierter Gene in Extrakten und Proteinfractionen	890
33.3.1	Komponenten des in-vitro-Transkriptions- ansatzes	891
33.3.2	Herstellung transkriptionsaktiver Extrakte und Proteinfractionen	891
33.3.3	Promotorspezifische Matrizen-DNA und Detektion der in-vitro-Transkripte	892
33.4	Die in-vivo-Analyse klonierter Promotoren in Säugerzellen	895
33.4.1	Plasmidvektoren für die Analyse von <i>cis</i> -aktiven Elementen in Säugerzellen	895
33.4.2	Einschleusen von Fremd-DNA in Säugerzellen	897
33.4.3	Die Charakterisierung der in-vivo- Transkripte der klonierten Promotoren	898
Weiterführende Literatur		900
34	Protein-Protein-Wechselwirkungen: das Two-Hybrid-System	901
34.1	Das Konzept des Two-Hybrid-Systems	902
34.2	Die Elemente des Two-Hybrid-Systems	904
34.3	Konstruktion des Köderproteins für das Two-Hybrid-System und Analyse seiner biologischen Aktivität	905
34.4	Aktivatorfusionsprotein und cDNA- Bibliotheken	908
34.5	Durchführung des Two-Hybrid-Screenings	909
34.6	Biochemische und funktionale Analyse der Interaktoren	912
34.7	Modifizierte Anwendungen und Weiterentwicklungen der Two-Hybrid- Technologie	913
Weiterführende Literatur		914
35	Assoziationen zwischen Makromolekülen: Analytische Ultrazentrifugation	915
35.1	Instrumentelle Grundlagen	915
35.2	Grundtypen von Experimenten	916
35.3	Sedimentationsgleichgewichts-Experimente	917
Weiterführende Literatur		919
36	Gezielte Genmodifikation	921
36.1	In vitro-Mutagenese	922
36.2	Strategien zur gezielten Gendisruption	924
36.3	Vom DNA-Konstrukt zur Maus	926

36.3.1	Mikroinjektion von ES-Zellen in Blastocysten und Morulaaggregation von ES-Zellen	926
36.3.2	Pronucleusinjektion von DNA, virale Infektion	929
36.4	Das Cre/loxP-Rekombinasesystem als Beispiel für einen Genschalter	931
36.5	Strategien zur gezielten Genmodifikation unter Verwendung von Genschaltern	932
36.6	Konditionale Mutagenese	935
	Weiterführende Literatur	939
37	Oligonucleotide als zellbiologische Werkzeuge	941
37.1	Die Geschichte der Oligonucleotide	941
37.2	Antisense-Oligodesoxyribonucleotide	943
37.2.1	Mögliche Mechanismen der Expressionshemmung	944
37.2.2.	Modifikationen von Oligodesoxyribonucleotiden zur Steigerung der intrazellulären Stabilität	945
37.2.3	Kombination von Antisense-Oligodesoxyribonucleotiden mit funktionellen Gruppen	948
37.2.4	Antisense-Oligonucleotide als neue Arzneimittel	949
37.2.5	Chimäre Oligodesoxyribonucleotide	950
37.3	Triplex-bildende Oligodesoxyribonucleotide	951
37.4	Ribozyme	952
37.5	Aptamere: Hochaffine RNA- und DNA-Oligonucleotide	953
37.6	Anwendungen und Ausblick	956
	Weiterführende Literatur	957

38	Überexpression	959
38.1	Probleme und Lösungsstrategien	960
38.1.1	Toxizität	960
38.1.2	Proteolyse	960
38.1.3	Translation und Codon-Auswahl	961
38.1.4	Modifikationen	961
38.1.5	Disulfidverbrückung	962
38.1.6	Aggregation und Bildung von Inclusion Bodies (Einschlusskörpern)	962
38.2	Möglichkeiten der Überexpression	963
38.2.1	Überexpression als Inclusion-Body-Protein	963
38.2.2	Überexpression als Fusionsprotein	963
38.2.3	Sekretion bei Prokaryonten	967
38.2.4	Oberflächenexpression	968
38.3	Expressionssysteme in <i>E. coli</i>	969
38.4	Expression in grampositiven Bakterien	971
38.5	Expression in Hefe	971
38.5.1	Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	972
38.5.2	Expression in methylotrophen Hefen	972
38.5.3	Cytosolische Expression	972
38.5.4	Sekretion in Hefe	973
38.6	Genexpression in Insektenzellen	974
38.7	Expression in Säugerzellkulturen	975
38.8	Expression in transgenen Tieren	976
38.9	Expression in pflanzlichen Systemen	976
	Weiterführende Literatur	977
Anhang		979
Anhang 1	Strahlenschutz im Labor	981
Anhang 2	Aminosäuren und posttranslationale Modifikationen	1007
Anhang 3	Abkürzungen	1011
Index		1017