

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 posttranslatiionaler 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 Nachweistechiken 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	Topomanalyse	1139
46	Systembiologie	1159

Anhang

Anhang 1: Strahlenschutz im Labor	1173
Anhang 2: Biologische Sicherheit	1175
Anhang 3: Aminosäuren und posttranslationalen 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	13.4.2	Kapillaraффinitätselektrophorese (ACE)	315
11.6.2	Trennung von komplexen Peptid- und Proteinmischungen mit der MD-HPLC	265	13.4.3	Micellarelektrokinetische Chromatographie (MEKC)	316
11.6.3	Methodenstrategien für die MD-HPLC	265	13.4.4	Kapillarelektrochromatographie (CEC)	319
11.6.4	Entwurf eines effektiven MD-HPLC-Schemas für Peptide und Proteine	266	13.4.5	Chirale Trennungen	320
11.7	Schlussbemerkung	268	13.4.6	Kapillargelelektrophorese (CGE)	321
Weiterführende Literatur		268	13.4.7	Isoelektrische Fokussierung (CIEF)	322
			13.4.8	Isotachophorese (ITP)	326
12	Elektrophoretische Verfahren	269	13.5	Spezielle Techniken	327
12.1	Geschichtlicher Überblick	269	13.5.1	Online-Probenkonzentrierung	327
12.2	Theoretische Grundlagen	271	13.5.2	Fraktionierung	328
12.3	Instrumentierung und Durchführung von Gelelektrophoresen	274	13.5.3	Mikrochipelektrophorese	330
12.3.1	Probenvorbereitung	276	13.6	Ausblick	332
12.3.2	Gelmedien für Elektrophoresen	276	Weiterführende Literatur		332
12.3.3	Nachweis und Quantifizierung der getrennten Proteine	278	14	Aminosäureanalyse	335
12.3.4	Zonenelektrophorese	280	14.1	Probenvorbereitung	336
12.3.5	Porengradientengele	281	14.1.1	Saure Hydrolyse	336
12.3.6	Puffersysteme	282	14.1.2	Alkalische Hydrolyse	337
12.3.7	Disk-Elektrophorese	282	14.1.3	Enzymatische Hydrolyse	337
12.3.8	Saure Nativelektrophorese	284	14.2	Freie Aminosäuren	337
12.3.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	284	14.3	Flüssigchromatographie mit optischer Detektion	338
12.3.10	Kationische Detergenselektrophorese	285	14.3.1	Nachsäulenderivatisierung	338
12.3.11	Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese	285	14.3.2	Vorsäulenderivatisierung	340
12.3.12	Isoelektrische Fokussierung	286	14.4	Aminosäureanalyse mit massenspektrometrischer Detektion	344
12.4	Präparative Verfahren	290	14.5	Datenauswertung und Beurteilung der Analysen	345
12.4.1	Elektroelution aus Gelen	290	Weiterführende Literatur		347
12.4.2	Präparative Zonenelektrophorese	291	15	Proteinsequenzanalyse	349
12.4.3	Präparative isoelektrische Fokussierung	292	15.1	N-terminale Sequenzanalyse: der Edman-Abbau	351
12.5	Trägerfreie Elektrophorese	293	15.1.1	Reaktionen des Edman-Abbaus	351
12.6	Hochauflösende zweidimensionale Elektrophorese	294	15.1.2	Identifizierung der Aminosäuren	353
12.6.1	Probenvorbereitung	296	15.1.3	Die Qualität des Edman-Abbaus: die repetitive Ausbeute	353
12.6.2	Vorfraktionierung	296	15.1.4	Instrumentierung	355
12.6.3	Erste Dimension: IEF in IPG-Streifen	297	15.1.5	Probleme der Aminosäuresequenzanalyse	358
12.6.4	Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	298	15.1.6	Stand der Technik	361
12.6.5	Detektion und Identifizierung der Proteine	298	15.2	C-terminale Sequenzanalyse	362
12.6.6	Differenzgelelektrophorese (DIGE)	298	15.2.1	Chemische Abbaumethoden	362
12.7	Elektroblotting	300	15.2.2	Peptidmengen und Qualität des chemischen Abbaus	364
12.7.1	Blotsysteme	300	15.2.3	Abbau der Polypeptide mit Carboxypeptidasen	364
12.7.2	Transferpuffer	302	Weiterführende Literatur		366
12.7.3	Blotmembranen	302	16	Massenspektrometrie	367
Weiterführende Literatur		302	16.1	Ionisationsmethoden	368
13	Kapillarelektrophorese	303	16.1.1	Matrixassistierte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)	368
13.1	Geschichtlicher Überblick	303	16.1.2	Elektrospray-Ionisation (ESI)	373
13.2	Aufbau der Kapillarelektrophorese	304	16.2	Massenanalytoren	380
13.3	Grundprinzipien der Kapillarelektrophorese	305	16.2.1	Flugzeitanalysator (TOF)	382
13.3.1	Injektion der Proben	305	16.2.2	Quadrupolanalysator	385
13.3.2	Der Motor: elektroosmotischer Fluss (EOF)	306	16.2.3	Elektrische Ionenfallen	388
13.3.3	Joulesche Wärmeentwicklung	307	16.2.4	Magnetische Ionenfalle	390
13.3.4	Detektion	308	16.2.5	Orbital-Ionenfalle	391
13.4	Die Methoden der Kapillarelektrophorese	310	16.2.6	Hybridgeräte	392
13.4.1	Kapillarzonenelektrophorese (CZE)	310	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	Teil II 3D-Strukturaufklärung
16.6.1	Identifizierung	412	19 Magnetische Resonanzspektroskopie von Biomolekülen 475
16.6.2	Nachweis	413	19.1 NMR-Spektroskopie von Biomolekülen 475
16.6.3	Strukturaufklärung	413	19.1.1 Theorie der NMR-Spektroskopie 476
16.7	LC-MS und LC-MS/MS	420	19.1.2 Eindimensionale NMR-Spektroskopie 480
16.7.1	LC-MS	420	19.1.3 Zweidimensionale NMR-Spektroskopie 485
16.7.2	LC-MS/MS	422	19.1.4 Dreidimensionale NMR-Spektroskopie 492
16.7.3	Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS)	422	19.1.5 Signalzuordnung 495
16.8	Quantifizierung	423	19.1.6 Bestimmung der Proteinstruktur 500
Weiterführende Literatur		424	19.1.7 Proteinstrukturen und mehr – ein Ausblick 506
17 Protein-Protein-Wechselwirkungen		425	19.2 EPR-Spektroskopie an biologischen Systemen 509
17.1	Das <i>two-hybrid</i> -System	425	19.2.1 Grundlagen der EPR-Spektroskopie 510
17.1.1	Das Konzept des <i>two-hybrid</i> -Systems	425	19.2.2 cw-EPR-Spektroskopie 511
17.1.2	Die Elemente des <i>two-hybrid</i> -Systems	426	19.2.3 <i>g</i> -Wert 512
17.1.3	Konstruktion des Köderproteins	428	19.2.4 Elektronenspin-Kernspin-Kopplung (Hyperfeinkopplung) 512
17.1.4	Welche Köderproteine eignen sich für das <i>two-hybrid</i> -System?	429	19.2.5 <i>g</i> - und Hyperfeinanisotropie 513
17.1.5	Aktivator-Fusionsprotein und cDNA-Bibliotheken	429	19.2.6 Elektronenspin-Elektronenspin-Kopplung 516
17.1.6	Durchführung des <i>two-hybrid</i> -Screenings	430	19.2.7 Gepulste EPR-Experimente 517
17.1.7	Modifizierte Anwendungen und Weiterentwicklungen der <i>two-hybrid</i> -Technologie	435	19.2.8 Weitere Anwendungsbeispiele für EPR 522
17.1.8	Biochemische und funktionale Analyse der Interaktoren	436	19.2.9 Generelle Bemerkungen zur Aussagekraft von EPR-Spektren 524
17.2	TAP-tagging und Reinigung von Proteinkomplexen	437	19.2.10 Vergleich EPR/NMR 524
17.3	<i>In-vitro</i> -Interaktionsanalyse: GST-pulldown	441	Danksagung 525
17.4	Ko-Immunpräzipitation	442	Weiterführende Literatur 526
17.5	Far-Western	443	20 Elektronenmikroskopie 527
17.6	Plasmonenspektroskopie (<i>surface plasmon resonance</i>)	443	20.1 Transmissionselektronenmikroskopie – Instrumentation 529
17.7	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer – FRET	446	20.2 Präparationsverfahren 530
17.7.1	Interaktions- und Strukturanalyse mittels FRET	446	20.2.1 Native Proben in Eis 531
17.7.2	Experimentelle Bestimmung der FRET-Effizienz	447	20.2.2 Negativkontrastierung 533
17.7.3	Methoden der FRET-Messung	448	20.2.3 Bedampfung mit Schwermetallen 534
17.7.4	Verwendete Sonden	449	20.2.4 Markierung von Proteinen 535
17.8	Analytische Ultrazentrifugation	451	20.3 Abbildung im Elektronenmikroskop 536
17.8.1	Instrumentelle Grundlagen	451	20.3.1 Auflösung des Transmissionselektronenmikroskops 536
17.8.2	Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente	452	20.3.2 Wechselwirkungen des Elektronenstrahls mit dem Objekt 537
17.8.3	Sedimentationsgleichgewichtsexperimente	456	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 Nachweistechniken 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
33.8	Spezielle Methoden zur Analyse von RNA-Protein-Komplexen	943
33.8.1	Limitierte enzymatische Hydrolyse	944
33.8.2	Markierungsmethoden	944
33.8.3	Primer- <i>extension</i> von RNA	945
33.8.4	Gebräuchliche RNasen	945
33.8.5	Chemische Modifikation von RNA-Protein-Komplexen	946
33.8.6	Chemische Quervernetzung	949
33.8.7	Einbau photoreaktiver Nucleotide	950
33.8.8	Genomweite Identifizierung von Transkriptionsstartstellen (TSS)	951
33.9	Genetische Methoden	952
33.9.1	<i>Tri-hybrid</i> -Methode	952
33.9.2	Aptamere und das Selex-Verfahren	953
33.9.3	Gezielte Mutationen in Bindedomänen	954
	Weiterführende Literatur	955

35.2	Analyse der RNA-Synthese <i>in vivo</i>	992
35.2.1	<i>Nuclear-run-on-Assay</i>	993
35.2.2	Markierung naszierender RNA mit 5-Fluorouridin	993
35.3	Die <i>in-vitro</i> -Transkription klonierter Gene in Extrakten und Proteinfractionen	994
35.3.1	Komponenten des <i>in-vitro</i> -Transkriptionsansatzes	994
35.3.2	Herstellung transkriptionsaktiver Extrakte und Proteinfractionen	995
35.3.3	Promotorspezifische Matrizen-DNA und Detektion der <i>in-vitro</i> -Transkripte	995
35.4	Die <i>in-vivo</i> -Analyse von Promotoren in Säugerzellen	998
35.4.1	Plasmidvektoren für die Analyse von <i>cis</i> -aktiven Elementen in Säugerzellen	998
35.4.2	Einschleusen von Fremd-DNA in Säugerzellen	1000
35.4.3	Die Charakterisierung der <i>in-vivo</i> -Transkripte der klonierten Promotoren	1001
	Weiterführende Literatur	1003

Teil V Systematische Funktionsanalytik

34	Sequenzanalyse	959
34.1	Sequenzanalyse und Bioinformatik	959
34.2	Datenbanken	960
34.2.1	Datenabruf	961
34.3	Webdienste	964
34.4	Sequenzzusammensetzung	965
34.5	Muster in Sequenzen	966
34.5.1	Sequenzsignale: funktionale Motive	967
34.5.2	Transkriptionsfaktor-Bindestellen	968
34.5.3	Identifizierung codierender Bereiche in DNA	968
34.5.4	Proteinlokalisierung	969
34.5.5	Sekundärstruktur	970
34.6	Homologie	970
34.6.1	Identität, Ähnlichkeit und Homologie	970
34.6.2	Alignment	971
34.6.3	Optimales Alignment	973
34.6.4	Alignment für schnelle Datenbanksuchen: BLAST	974
34.6.5	Profilbasierte Datenbanksuchen: PSI-BLAST	975
34.7	Multiple Alignment und Konsensussequenzen	977
34.8	Sequenz und Struktur	978
34.9	Ausblick	979
	Weiterführende Literatur	980
35	Analyse von Promotorstärke und aktiver RNA-Synthese	981
35.1	Methoden zur Analyse von RNA-Transkripten	981
35.1.1	Überblick	981
35.1.2	Nuclease-S1-Analyse von RNA	982
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

36	Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA zur Genomanalyse in der molekularen Cytogenetik	1005
36.1	Methoden zur Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA	1006
36.1.1	Markierungsstrategie	1006
36.1.2	DNA-Sonden	1006
36.1.3	Markierung der DNA-Sonden	1007
36.1.4	<i>In-situ</i> -Hybridisierung	1008
36.1.5	Fluoreszenzauswertung der Hybridisierungssignale	1008
36.2	Anwendungen: FISH und CGH	1009
36.2.1	Analyse genomischer DNA durch FISH	1009
36.2.2	Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)	1011
	Weiterführende Literatur	1014
37	Physikalische und genetische Genkartierung	1015
37.1	Genetische Kartierung: Lokalisierung von Loci im Genom	1015
37.1.1	Rekombination	1015
37.1.2	Genetische Marker	1017
37.1.3	Kopplungsanalyse – die Erstellung genetischer Karten	1019
37.1.4	Die genetische Karte des menschlichen Genoms	1021
37.1.5	Genetische Kartierung von Krankheitsgenen	1022
37.2	Physikalische Kartierung	1023
37.2.1	Restriktionskartierung ganzer Genome	1023
37.2.2	Kartierung mittels rekombinanter Klone	1025
37.2.3	Erstellung der physikalischen Karte	1026
37.2.4	Isolierung und Identifizierung von Genen	1029
37.2.5	Transkriptkarten des menschlichen Genoms	1031
37.2.6	Gen und vererbare Krankheit – die Mutationsuche	1032
37.3	Integration der Genkarten	1033

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 Weiterführende Literatur 1156 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