



Deckblatt

Zum Klausurbogen der Modulprüfung „Methoden der Biotechnologie I: Molekularbiologie“ (MSc-MBT-1) vom 16.12.2010

Name: _____

Vorname: _____

Matrikelnummer: _____

geboren am (TMJ): _____ in: _____

Straße: _____

Postleitzahl: _____ Wohnort: _____

Maximal zu erreichende Punktzahl: 60

Die Klausur besteht aus insgesamt 8 Seiten (1 Deckblatt + 7 Seiten).

Bitte geben Sie auf jeder Seite Ihren Namen an. Bei der Korrektur können nur solche Seiten berücksichtigt werden, die eindeutig mit Ihrem Namen gekennzeichnet sind. Bitte prüfen Sie sorgfältig, ob die Klausur vollständig ist. Fehlende Seiten werden als nicht beantwortete Fragen gewertet.

Wir wünschen Ihnen viel Erfolg!

Punktzahl	Note

Unterschrift des verantwortlichen Hochschullehrers:

Name:	Vorname:
-------	----------

--	--

Name:	Vorname:
-------	----------

Aufgabe 1

(3 Punkte)

Erklären Sie kurz das Prinzip/Vorgehensweise eines *Enzym Linked Immunosorbent Assays* (ELISA) (Sandwich/direkte Methode):

(1) Mit *coating*-Antikörper Mikrotiterplatte beschichten; (2) Zugabe der Probe und Inkubation; (3) Waschen; (4) Zugabe des Detektions-Antikörpers gekoppelt mit Enzym; (5) Waschen; (6) Zugabe eines zum Enzym passenden Substrats, das zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird (je 0,5 Punkte)

Aufgabe 2

(7 Punkte)

Beschreiben Sie kurz die Methoden der a) Pyrosequenzierung (3 P) und b) Sanger-Sequenzierung (3 P) und c) vergleichen Sie diese hinsichtlich Vor- und Nachteilen (1 P).

a) einzelsträngiger Template-Strang, Primer, Primerannealing, 4 Enzyme (DNA Polymerase, Luciferase, ATP sulfurylase, Apyrase), APS, Luciferin, eins von den 4 dNTPs wird zugegeben, wenn Einbau – dann PPi – dann sulfate und ATP – dann oxyluciferin und Licht, Abbau der nicht eingebauten dNTP durch Apyrase (3 Punkte)

b) einzelsträngiger Template-Strang, Primer (markiert), Primerannealing, Polymerase und dNTPs (markiert), 4 x ddNTPs (markiert), PAGE oder CE, Auswertung (3 Punkte)

c) Sanger: lange Leseweiten

Pyro: automatisierbar, parallelisierbar im Hochdurchsatz

(1 Punkt)

	Name:	Vorname:	
Aufgabe 3	(3 Punkte)		

Beschreiben Sie das Prinzip eines DNA Microarrays zur Analyse des Transkriptoms einer Tumorzelle gegenüber einer normalen Zelle?

mRNA aus Tumor, und aus gesundem Gewebe isolieren, umschreiben in cDNA, dabei den einen cDNA Pool mit einem Farbstoff, den anderen mit einem zweiten Farbstoff markieren, beide cDNA-Pools mischen und mit Microarray hybridisieren, Intensitäten der beiden Farbstoffe getrennt auslesen und darstellen.

In einem Microarray-Spot befindet sich ein PCR Fragment oder ein Oligonukleotid aus einem Gen, d.h. man hat mindestens so viele Spots auf dem Array wie Gene (falls das Genom abgedeckt sein soll)

Aufgabe 4

(1,5 Punkte)

Welche Möglichkeiten des natürlichen Gentransfers gibt es? Kurze stichwortartige Beschreibung!

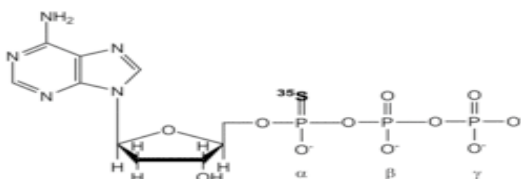
Transformation: Aufnahme freier DNA
 Transduktion: Übertragung durch Virus
 Konjugation: F-Faktor/Zell-Zell-Kontakt

je 0,25 Punkte (Methode, Erklärung)

Aufgabe 5

(3 Punkte)

Zeichnen Sie die Strukturformel des bei der radioaktiven Sequenzierung nach der Sanger-Methode benutzten ³⁵S-dATP.



Gesamt	Gesamt Seite

Name:		Vorname:	
Aufgabe 6	(3 Punkte)	<input type="text"/>	

Nennen Sie a) die zwei zentralen Signalmoleküle und b) den zentralen Regulator der natürlichen Transformation in *Bacillus subtilis*. Welches Prinzip liegt c) der koordinierten Expression der Gene des Transformationsapparates in *B. subtilis* zugrunde? (erläutern Sie dies stichpunktartig)

Antwort:

- a. ComX (Pheromon) und CSF (competence stimulating factor),
- b. ComK Transkriptionsaktivator
- c. ComK Boxen in den Promotorbereichen der Kompetenzgene

Aufgabe 7

(5 Punkte)

Beschreiben Sie in Stichworten die molekularen Vorgänge bei der Mismatch-Reparatur in *E. coli*.

Mismatch bei Replikation, MutS erkennt Mismatch, MutS induziert Knick in DNA, MutS hat ATPase-Funktion und rekrutiert MutL das wiederum MutH rekrutiert. MutH ist eine Endonuklease, die einen Bruch in dem nicht-methylierten, d.h. neu synthetisierten Strang der DNA einführt. Helikase UvrD entwindet DNA, Exonuclease spaltet Nukleotide ab, PolIII füllt auf, Ligation mit Ligase

	Name:	Vorname:	
Aufgabe 8		(2,5 Punkte)	

Die 1. Untereinheit der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) der mitochondrialen Atmungskette der beiden Pilze *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) und *Podospora anserina* werden durch die mitochondriale DNA (mtDNA) kodiert. Eine Funktionsverlustmutation in dem diese Untereinheit kodierenden Gen ist bei Anzucht auf Medien mit Zuckern wie Glucose NICHT letal, sondern führt zu einem charakteristischen Phänotyp. Wie sieht dieser Phänotyp aus?

Bei der Hefe: (1,5 P)

„Petite“ Phänotyp (0,5 P), Im Vergleich zum Wildstamm langsames Wachstum auf Nährmedium mit fermentierbaren Zuckern (z.B. Glucose) (0,5 P). Kein Wachstum auf Medium mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle (0,5 P)

Bei *Podospora anserina*: (1 P)

im Vergleich zum Wildstamm langsamerer Wuchs (0,5 P)
verlängerte Lebensspanne (0,5 P)

Aufgabe 9	(6 Punkte)	
------------------	------------	--

Wie registriert *Escherichia coli* die Verfügbarkeit von Sauerstoff in seinem Ökosystem? Beschreiben Sie den Aufbau und die Funktion von zwei unterschiedlichen, zur Veränderung der Genexpression führenden Sensorsystemen.

Antwort:

1. FNR (Fumarat-Nitrat-Reduktaseregulator), Transkriptionsaktivator, Redoxzustand wird gemessen über Eisen-Schwefel-Zentrum, wird durch Oxidation inaktiv (Zerfall), keine Transkription
2. ArcA/B, Zwei-Komponenten-System, Sensorkinase ArcB misst Redoxzustand in den Membranen über Oxidation/Reduktion von Thiolen/Disulfiden, in reduzierter Form wird der Responeregulator ArcA phosphoryliert, dieser verändert dann die Genexpression.

Je Nennung 0,5 P.

Gesamt	Gesamt Seite

Name:		Vorname:	
Aufgabe 10	(2 Punkte)		

Welcher Elongationsfaktor 'transportiert' aminosäurebeladene tRNAs zum Ribosom?
Welche enzymatische Aktivität hat dieser Elongationsfaktor?

EF-Tu, GTPase (je 1 Punkt)

Aufgabe 11

(4 Punkte)

Nennen Sie die vier Teilschritte der natürlichen Transformation

Kompetenzinduktion, DNA-Bindung, DNA-Aufnahme, Integration der aufgenommenen DNA ins Genom durch Rekombination (oder Plasmidrekonstitution).

Aufgabe 12

(2 Punkte)

Auf welcher Untereinheit befindet sich das Peptidyltransferasezentrum des Ribosoms?
Welche Reaktion katalysiert es? Welches Biomakromolekül ist für diese katalytische Aktivität verantwortlich?

große Untereinheit (0,5 P), Peptidbindungsknüpfung (1 P),
RNA: Ribosom= Ribozym (0,5 P)

Gesamt	Gesamt Seite

Name:	Vorname:
-------	----------

Aufgabe 13

(2 Punkte)

Wie werden Stopcodons auf der mRNA erkannt?

Durch die proteine: release-faktoren rf1 und rf 2 (2 Punkte)

Aufgabe 14

(3 Punkte)

Sie wollen mithilfe einer 50% (w/v) Glucose-Stammlösung 100 ml einer 28 mM Glucose-Lösung herstellen. Wie gehen Sie vor? Erläutern Sie nachvollziehbar Ihr Vorgehen? Mw-Glucose= 180

50% = 500 g/l (1 P) --> 500/180 --> 2,8 M (1 P) --> Faktor 100 --> 1 ml + 99 ml H2O (1 P)

Aufgabe 15

(3 Punkte)

An welchem Prozeß ist die DNA-Gyrase beteiligt? Welche Reaktionen katalysiert sie? Wo kommt sie vor?

DNA-Replikation 1 P

Führen negative Überwindungen in ds-DNA ein/Relaxieren pos. Überwindungen 1P

Prokaryonten (Bakterien) 1 P

Gesamt	Gesamt Seite

Name:	Vorname:
-------	----------

Aufgabe 16

(3 Punkte)

Wie kann man beweisen, dass bakterielle DNA semi-konservativ repliziert wird? Erläutern Sie das Experiment.

Meselson-Stahl-Experiment:

Zellen in ^{15}N -Medium --> nur schwere DNA (1P)

Wechsel in ^{14}N -Medium: nach einer Generation nur mittelschwere $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -DNA (1P)

Weiteres Wachstum auf ^{14}N -Medium --> mittelschwere DNA: ^{14}N -DNA erst 1:1 (0,5 P), dann wird mittelschwere DNA verdünnt wird verdünnt (0,5 P)

Aufgabe 17

(4 Punkte)

Erklären Sie das Prinzip der 2D-PAGE.

Auftrennung der Proteine nach ihrem IEP in einem PA-Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradient

Übertragung des Gelstreifen auf PA-Gel (SDS-PAGE)

Trennung nach Größe auf 2. Dimension

Aufgabe 18

(3 Punkte)

Welche Eigenschaften muss ein Expressionsvektor zur Expression von Genen in Hefe haben, der in *E. coli* und Hefe repliziert werden kann?

2 Replikationsursprünge fuer *E. coli* und Hefe, 2 Selektionsmarker *E. coli* und Hefe, Hefepromotor, Hefeterminator

Gesamt	Gesamt Seite