

Fragenkatalog

Gentechnik und Biotechnologie

1. Fermentationstypen nach Gaden nennen und den Zusammenhang zwischen Produktbildung und Wachstum des jeweiligen Typen erklären. (Pf.S30)

- Typ I: Die Produktbildung hängt vom Substratverbrauch ab und ist diesem weitgehend proportional, ebenso ist das Wachstum. Es werden Primärmetabolite gebildet wie z.B. Ethanol und Milchsäure. Verwendung bei Alkoholproduktion.
- Typ II: Produktbildung hängt vom Substratverbrauch indirekt ab: Das Produkt entsteht indirekt aus dem primären Energiestoffwechsel. Beim Verlauf der spezifischen Raten wird deutlich, daß Wachstum und Substratverbrauch eng zusammenhängen. In der Wachstumsphase ist die Bildung des Produktes auch noch gering. In der Produktphase sind der spezifische Substratverbrauchs- und die spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit sehr ähnlich. Wachstum zeigt "kleines" Maximum. BSP. Zitronensäureproduktion
- Typ III: Produktbildung hängt nicht vom Substratverbrauch ab. Hierzu gehören die komplexen Produkte Antibiotika, Vitamine etc. Sie werden oft auch Sekundärmetabolite genannt. Hier kann man klar in die Wachstums- und Produktionsphase unterteilen.

2. Gram-Färbung

- **Färben der Bakterien mit Kristallviolett**
gram+ und gram- färben sich an
- **Behandlung mit Lugolscher Lösung (KI/I2)**
Bildung größerer Farbstoffkomplexe(dunkelblau). Die Lösung lagert sich im Mureinnetz an, durch Anreicherung mit Alkohol erfährt die Zellwand einen Wasserentzug und das Mureinnetz zieht sich zusammen. Eine Entfärbung ist nicht mehr möglich
- **Behandlung mit 96% Alkohol**
gram+ behalten die Färbung, gram- entfärben sich aufgrund ihres anderen Zellwand Aufbaus (Lipidschicht wird aufgehoben und Farbmoleküle werden herausgewaschen.)
- **Evtl. Gegenfärbung mit Fuchsin oder Safranin T**
Gram- färben sich rosa

3. Mindestens 2 Vorteile von Säugetierzellen als Expressionssystem & mind. 3 Nachteile

- **Vorteile:**
 - führen posttranslationale Modifikationen durch (Glykosylierung, Faltung)
 - für zuckerreiche Proteine geeignet (Blutgerinnungsfaktoren)
 - sezernieren die Proteine ins Kulturmedium
- **Nachteile:**
 - langsameres Wachstum (Verdopplungsrate 12-24h)
 - geringe Produktionsleistung
 - große Empfindlichkeit
 - teures Kulturmedium (fötale Kälberserum)
- **Beispiel:** Blutgerinnungsfaktoren, FSH(Folikel stimulierendes Hormon), Erythropoetin

4. Meristemkultur, Haploidenkultur, Kalluskultur

- **Meristemkultur:**

In vitro Kultivierung teilungsaktiver Bildungsgewebe (Meristeme z.B. Sprossspitzen, Wurzelspitzen). Wichtig für die Gewinnung von pathogen- bzw. virusfreier Pflanzen etc.

Spenderpflanze -> Meristem -> Segmentierung -> Mehrmalige Mikroverteilung – Spross bildet sich zuerst aus -> Wechsel des Nährmediums Cytokine und Auxine -> Bewurzelung -> Auspflanzung in Töpfen und Aufzucht im Gewächshaus
- **Haploidenkultur**

Junge Antheren oder Fruchtknoten in Oberflächenkultur; wachsen nach Hormonzusatz zu unfruchtbaren haploiden vollständigen Pflanzen aus. Durch Cholizinzusatz (Mitosegift) – haploider Chromosomensatz wird verdoppelt.
- **Adventivbildung**

Organentwicklung erfolgt aus nicht meristematischen Gewebereichen z.B. Blatt. Ausdifferenzierte Zellen werden nach Phytohormonbehandlung wieder meristematisch.
- **Kalluskultur**

Kallus= unorganisiert wachsendes Wundgewebe, das bei Pflanzen aus den Schnittflächen der Explantate entsteht

a.) Organogenese: undifferenzierte Zellen werden durch Phytohormone ausgebildet. Abhängig vom Verhältnis der Phytohormone zueinander

mehr Auxine weniger Cytokine = Wurzelwachstum; umgekehrt
Sprosswachstum

b) Somatische Embryogenese: Wurzeln und Sprosse entwickeln sich gleichzeitig von einem gemeinsamen Zentrum aus (künstlicher Samen)

- **Künstlicher Samen:** somatische Embryoide werden in Alginat eingebettet und mit einem Kunststoffpolymer ummantelt

5. 4 Vorteile und Nachteile biotechnologischer Verfahren

- Nutzung nachwachsender Rohstoffe, statt fossiler
- Verminderte Umweltbelastung durch Ausschluss aggressiver Medien
- Verminderter Energiebedarf, da bei Raumtemperatur und unter Normaldruck gearbeitet wird
- Einzig mögliche Herstellungswege für bestimmte Produkte
- Vielstufige Verfahren in der Chemie werden durch einen Fermentationsprozess mit geringen Nebenprodukten abgekürzt

- Arbeiten unter sterilen Bedingungen
- Zusammensetzung komplexer Nährmedien schwankt
- Aufwändige Aufreinigung der Rohprodukte
- Ausbeutenschwankung bei instabilen Systemen
- Beseitigung von Bioabfallmassen
- Einhaltung gesetzlicher Sicherheitsvorschriften
- Hohe Kosten

6. Antisense RNA und Beispiel in der Pflanzenzucht?

Antisense RNA unterdrückt die Expression bestimmter Gene, durch Unterdrückung der Translation. Dabei wird die kodierende Sequenz eines endogenen Gens in umgekehrter Orientierung zusätzlich in das Genom der Zielpflanze eingefügt. Die Antisense RNA bildet mit der mRNA nicht translatierbare Komplexe

Antimatschtomate (FlavrSavr- Tomate): Unterdrückung der Polygalacturonidase-Bildung

7. Transfektionen von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* S.102

- weltweit vorkommendes gram- Bodenbakterium
- kann an den Wurzelhälsen von Pflanzen Wucherungen hervorrufen
- Träger der gen. Information für die Tumorinduktion (Ti-Plasmid)
- bei der Infektion wird ein Teil des Ti-Plasmids in das Kerngenom von Pflanzenzellen

A. tumefaciens heftet sich an die verwundete Pflanzenzelle, diese sendet chemotaktische Signale und aktiviert die Virulenzregion. Die Virulenzregion des Ti-Plasmids aktiviert die T-Region und diese wird als lineare, einzelsträngige DNA ins Pflanzenchromosom integriert. Auxine und Cytokine lösen dann das Tumorstadium aus. -> können nicht zu intakten Pflanzen regeneriert werden.

Transfektion: erfolgt durch Animpfen der Gewebekultur mit rekombinanten mit A. tumefaciensstämmen oder Vektoren, so können die Zellen zu intakten und fertilen Pflanzen herangezogen werden.

A: Direktes Verfahren:

- Gemeinsame Inkubation von Protoplasten und Vektor (geeignete Vektorplasmide, z.B. Ti-Plasmid)
- Nach Regeneration der Zellwand Einbetten in z.B. Agarose
- Selektion der transfizierten Zellen in Selektionsmedien
- Regeneration zu intakten Pflanzen

B: Indirektes Verfahren

- Gemeinsame Inkubation von Protoplasten und transfizierten Agrobakterien
- Entfernung der Agrobakterien durch Waschen und Kultivierung auf antibiotikahältigem Medium
- Einbetten in z.B. Agarose
- Selektion der transfizierten Zellen
- Regeneration zu intakten Pflanzen

8. Northern Blot, Southern Blot und Western Blot

- **Northern Blot:**

- qualitativer und quantitative Nachweis von RNA durch Hybridisierung mit bekannten DNA Fragmenten
- gelelektrophoretische Auftrennung der RNA Präparation unter denaturierenden Bedingungen (Alkali, Formaldehyd oder Harnstoff)
- Transfer der Aufgetrennten RNA Fragmente auf eine Membran (Nylon oder Nitrocellulose) und Fixierung
- spezifischer RNA Nachweis durch Hybridisierung mit markierten DNA Sonden

- **Southern Blot:**

- DNA-Transfer-Technik zur Erkennung von **DNA** mit bestimmten Basensequenzen

Auftragemenge: 0,2 - 10 µg DNA

- zunächst Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese
- Transfer aller aufgetrennten DNA-Fragmente auf eine Nitrocellulose- oder Nylon Membran („Blotting“) mittels Diffusion oder Elektroblothing
- Fixierung auf Nitrocellulose durch 2 h „Backen“ bei 80°C oder auf Nylonmembran durch Bestrahlung mit UV 254 nm
- Hybridisierung mit markierten DNA-Sonden (komplementär zu den gesuchten Genen) in einem verschlossenen Plastikbeutel (3 - 16 h)
- Autoradiographie oder nicht-radioaktive Visualisierung der hybridisierten DANN

Western Blot

- spezifischer Nachweis von **Proteinen** mit enzymmarkierten Antikörpern nach gel-elektrophoretischer Auftrennung und Blot auf eine Membran
- es werden Membranen aus Nylon, Nitrocellulose oder Polyvinylidendifluorid (PVDF) verwendet
- für die Kopplung an Antikörper werden verwendet: Meerrettichperoxidase (POD) β-Galactosidase (β-Gal) alkalische Phosphatase (AP)
- für die Sichtbarmachung werden präzipitierende chromogene Substrate oder Chemilumineszenz-Substrate verwendet

9. Gentechnikregisterordnung und 4 Rubriken nennen:

ist eine Verordnung basierend auf dem Gentechnikgesetz

- Zugelassene Erzeugnisse, die aus GVO bestehen oder GVO enthalten und nicht Lebensmittel oder Futtermittel sind (24)
- Zugelassenen Gentechnische Lebensmittel, die aus GVO bestehen oder GVO enthalten (25)
- Freisetzung von GVO (kein Eintrag)
- Anbaustandorte von GVO (kein Eintrag)

10. Charakteristika für Pilze im biotechnologischen Wachstum + 2Beispiele

- Pilze besitzen einen echten Zellkern -> Eukaryonten
- Pilze haben eine Zellwand aus Chitin und haben keine Plastiden
- Kohlenstoffgewinnung erfolgt heterotroph
- Vegetationskörper ist ein Mycel

- Wachstum in Hyphenform – Nährstoffe können im Mycel verteilt werden
- An den Hyphenspitzen stehen immer neue Nährstoffe zu Verfügung
- Mycel kann Kulturmedien durchdringen und erreicht so Substrate, die in Ihrer Diffusion eingeschränkt sind
- Es werden lytisch wirkende Proteine (Proteasen, Lipasen) zum Durchdringen der Medien sezerniert

- Bilden in stationärer Wachstumsphase eine große Menge an Sekundärstoffen (Antibiotika)
- Biotechnologische Nutzung: Sekundärstoffgewinnung, Biotransformation, Bioremediation, Produktion rekombinanter Proteine
- Beispiel: *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Mugor* sp.

11. Was ist ein Vollmedium? Was ist ein Minimalmedium?

- **Vollmedien:** sind Nährmedien, die Zusätze enthalten die der Organismus selbst produzieren könnte
- **Minimalmedien:** chemisch definierte „synthetische Medien“

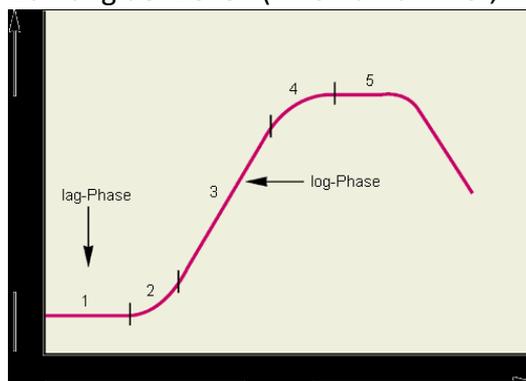
12. Was sind Muteine? Beispiel? Mögliche Vorteile?

Muteine sind modifizierte Naturstoffe z.B. Insulin Lispro
 ->absichtliche Modifikation authentischer Biomoleküle

Vorteil: Verbesserung der Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit, bessere Verträglichkeit

13. 4 Möglichkeiten zum Bestimmen von Wachstum: Wachstumskinetik

- Messung des Proteingehaltes
- Messung der Nucleinsäuremenge
- Photometrische Trübungsmessung
- Zählung der Zellen (Thoma-Kammer, Neubauer-Kammer)



- 1.lag Phase(Latenzphase)
- 2.Progressive Phase
- 3.Log Phase
- 4.Dezerlationsphase
(Entschleunigung)
- 5.Stationäre Phase (Idealfall)
- 6.Absterbephase

14. Wie lassen sich MO-Zellen aufschließen?

- **tierische Zellen** Gefrieren und anschließendes Vermahlen,osmotischer Schock
- **pflanzliche Zellen** lassen sich durch Scherkräfte nach dem Trocknen gut aufschließen

- **Mikroorganismen** wegen geringer Größe und Stabilität schwer aufzuschließen
Aufschluß durch Scherkräfte in Lösung (Homogenisator), Ultraschallaufschluß

15. Was bedeutet VbA und was regelt es?

=Verordnung biologischer Arbeitsstoffe; =Mikroorganismen, Zellkulturen und Humanendoparasiten die Infektionen und/oder sensibilisierende oder toxische Wirkungen hervorrufen können

- Zuordnung von biologischen Arbeitsstoffen zu einer von 4 Risikogruppen
- Ermittlung und Beurteilung der Gefahren
- Hygiene, Expositionsvermeidungen, Impfung
- Ausstattung, persönliche Schutzausrüstung, sicher Handhabung
- Desinfektion
- Zusätzliche Schutzmaßnahmen bei beabsichtigter Verwendung
- Meldepflicht bei höheren Risikogruppen
- Informationen und Unterweisung der Arbeitnehmerinnen

16. AcMNPV? Wo eingesetzt?

Autographa californica Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus

Befällt Schmetterlinge der Gattung Lepidoptera -> ist ein Baculovirus

Wird verwendet zur Dezimierung von Schadinsekten

17. Was ist die Hybridoma-Technik und wofür wird es verwendet?

=Fusion von tierischen und Menschlichen Zellen

wobei antikörperproduzierende Zellen (B-Zellen) mit Myelomzellen (Krebszellen)

fusioniert werden, dabei werden monoklonale Antikörper hergestellt-> Herstellung von Antikörpern in großen Mengen

Verwendung: als Arzneimittel, in der Diagnostik, und in der Forschung

18. Vorteile und Nachteile von transgenen Pflanzen als Expressionssysteme:

- **Vorteile:**
 - Kostengünstig im Vergleich zu Säugerzellkultur
 - Korrekte Faltung und weitgehend korrekte Prozessierung rekombinanter Proteine
 - keine Gefahr der Verunreinigung
 - bei Anreicherung in Samen/Früchten erhöhte Transport und Lagerfähigkeit
- **Nachteile:**
 - Gefahr der Auskreuzung und unkontrollierten Verbreitung
 - Gefahr von Kontamination der Pflanzen bei Feldanbau
 - geringfügig andere Glykosylierung

19. Was ist reverse Osmose und wofür wird es verwendet?

ist ein physikalisches Verfahren zur Konzentrierung von in Flüssigkeiten gelösten Stoffen, bei der mit Druck der natürliche Osmose-Prozess umgekehrt wird.

Das Medium, in dem die Konzentration eines bestimmten Stoffes verringert werden soll, ist durch eine halbdurchlässige (semipermeable) Membran von dem Medium getrennt, in dem die Konzentration erhöht werden soll. Dieses wird einem Druck ausgesetzt, der höher sein muss als der Druck, der durch das osmotische Verlangen zum Konzentrationsausgleich entsteht. Dadurch können die Moleküle des Lösungsmittels gegen ihre „natürliche“ osmotische Ausbreitungsrichtung wandern. Das Verfahren drückt sie in das Kompartiment, in dem gelöste Stoffe weniger konzentriert vorliegen.

Z.B. Herstellung von alkoholfreiem Bier

20. Wie oft teilen sich die Zellen bei Pilzen und bei Pflanzen und Tieren?

Pilze: alle 1-2h

Pflanzen: Verdopplungszeit bei 20-150h

tierische Zellen: alle 24h

Bakterien: 15-20min

21. Was ist ein ARS-Vektor(autonome replicable sequences)? Wofür wird er verwendet?

-ringförmige Vektoren, die den Replikationsstartpunkt des Hefegenoms tragen und Teile von bakteriellen Plasmiden mit Markergenen enthalten
tragen zur Transformation der Hefezelle bei

22. Was spricht für die Verwendung von immobilisierten Zellen?

- Verringerte Empfindlichkeit gegenüber Scherkräften in Bioreaktoren
- Kontinuierliche Prozessführung aufgrund von Wiederverwendbarkeit

23. Herstellung von Penicillin:

- **Produzenten:** Hochleistungsstämme von *P.chrysogenum*
- **Fermenter:** mit bis zu 200000l Fassungsvermögen
- Komplexes Nährmedium
- Zusatz von Phenyllessigsäure während der Produktion
- Extraktion des Produkts mit Amyl- oder Butylacetat im Gegenstromverfahren

24. Was sind Plantibodies? Wofür kann man sie verwenden/einsetzen?

sind humane oder tierische Antikörper, die in den Pflanzen produziert werden und in der Diagnostik, zur Therapie oder passiven Immunisierung eingesetzt werden
-> essbare Impfung

25. Was sind orphan Drugs? Nach welchen Kriterien verläuft die Zulassung? Welche Anreize gibt es zu deren Herstellung?

=Arzneimittel zur Behandlung seltener Leiden – wenig rentable AM

- **Kriterien:**
 - AM zur Vorbeugung, Diagnose oder Behandlung einer Krankheit von der in der EU <5 von 10.000 Menschen betroffen sind
 - AM, deren Inverkehrbringung ohne Anreize vermutlich nicht genügend Gewinne bringen würde, um die notwendigen Investitionen rechtfertigen
 - AM müssen für die betroffenen von erheblichen Nutzen sein
- **Anreize:**
 - 10 Jahre Marktexklusivität
 - Forschungshilfe für kleine und mittlere Unternehmen

26. Arzneistoffe die mithilfe von Säugetierzellen hergestellt werden:

- Blutgerinnungsfaktoren
 - Follikel stimulierendes Hormon FSH
 - Erythropoetin
 - Tissue plasminogen activator TPA
- > alle aus CHO

27. Was ist eine taq Polymerase? In welchem Organismus? Wo kommt dieser Organismus natürlich vor? Wofür verwendet?

Taq Polymerase sind Enzyme der Bakterie *Thermus aquaticum*, die man im Yellow Stone Park in heißen Quellen gefunden hat und die eine hohe Temperatur von über 95°C aushalten ohne zu denaturieren

Wird bei der Polymerase Kettenreaktion verwendet zur Synthese der komplementären DNA Strängen bei 70°C

28. Was ist mikrobielle Biotransformation?

Prozess bei dem dem Nährmedium zugesetzte Vorstufen mit Hilfe von Mikroorganismen in das gewünschte Zielprodukt umgewandelt werden

29. Nennen sie jeweils 4 Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryoten:

- **Prokaryoten:**
 - Nukleoid (Kernäquivalent) ohne Membran
 - zirkuläres DNA Molekül
 - haben im Cytoplasma keine Kompartimente

- 70S Ribosomen 30+50
- Zellwand aus Murein
- Geißeln zur Fortbewegung

- **Eukaryonten:**

- echten Zellkern (Nucleus), der von einer Membran umgeben ist
- DNA ist aufgeteilt in Chromosomen
- besitzen im Cytoplasma Mitochondrien und ER
- 80S Ribosomen 60+40
- Zellwand nur bei Pilzen

30. Nennen sie jeweils zwei vor und Nachteile beim Einsatz von Hefezellen:

Zellen	Vorteile	Nachteile
<i>Escherichia coli</i>	Kurze Generationszeit Kurze Fermentationszeiten Relativ einfache Kultivierung Kostengünstige Ausgangsstoffe Sicherheitsstämme verfügbar	Bildung von Einschlusskörperchen (kann aber auf Grund leichter Reinigung wieder vorteilhaft sein) Keine posttranslationalen Modifikationen
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Relativ einfache Kultivierung Keine Einschlusskörperchen Modifikationen möglich	Andere Glykosylierung als bei Säugern Proteine evtl. immunogen
CHO-Zellen	Div. Vektorsysteme etabliert Genamplifikation möglich Glykosylierung der beim Mensch ähnlich	Kultur aufwändig und teuer Ausbeuten eher niedrig

31. Nennen Sie die biotechnologischen Besonderheiten von Pilzen (insbesondere Fadenpilze) und nennen sie mindestens zwei Pilzarten, die in der Biotechnologie verwendet werden:

- Wachstum in Hyphenform -> Nährstoffe können im Mycel verteilt werden
- An den Hyphenspitzen stehen immer neue Nährstoffe zu Verfügung
- Mycel kann Kulturmedium durchdringen -> erreicht Substrate, die in ihrer Diffusion eingeschränkt sind
- Sezernierung von lytisch wirkenden Proteinen (Lipasen, Proteasen) beim Durchdringen eines Mediums
- Bildung von hohen Mengen an Sekundärstoffen in stationärer Phase

- Zygomyceten (Mucor sp.), Ascomyceten (Aspergillus niger/oryzae)

32. Erklären sie das Prinzip der Penicillinmethode zur Mutantenanreicherung!

- Zellsuspension Ampicillin-empfindlicher Bakterien -> Mutation
- Gemisch von Wildtyp und Mutanten -> Wachstum in Kompletmedium
- Wildtyp und Mutanten wachsen -> Wachstum auf Minimalmedium mit Ampicillin
- Nur Wildtyp wächst, wird durch Ampicillin abgetötet -> Ampicillin entfernen und Wachstum auf Vollmedium
- Nur Mutanten wachsen -> Replika Plattierung auf Minimal- und Kompletmedium
- Auxotrophe Mutanten wachsen nur auf Kompletmedium

33. Beschreiben Sie das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)!

dabei kommt es zu einer millionenfachen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten in wenigen Stunden -> 3 Schritte im PCR-Automaten (Thermocycler)

- **Trennung der DNA-Doppelhelix**
Dies erfolgt bei 95°C, wobei die H-Brücken in der Doppelhelix gelöst werden und zwei Einzelstränge entstehen. Mit Hilfe von Taq-Polymerase (Thermus aquaticus); verhindert Denaturierung der Proteine
- **Abkühlen**
auf ca 40-65°C, damit die zugegebenen Primer binden können -> sie sind für eine bestimmte Gensequenz relevant und markieren den Startpunkt
- **Elongation**
Verlängerung der Primer und Synthese der komplementären DNA-Stränge mittel Taq-DNA-Polymerase bei 70°C
- Ein Zyklus ist nach 5-6min abgeschlossen
- Anwendung: pränatalen Diagnostik, Lokalisation von Gendefekten, Vaterschaftsbestimmung, Ahnenforschung, Kriminalistik

34. Definieren sie Transformation, Transduktion und Transfektion!

Transformation = Übertragung von DNA in prokaryontischen Zellen

Transduktion = Übertragung von DNA in prokaryontischen Zellen mit Hilfe von Bakteriophagen

Transfektion = Übertragung von DNA in eukaryontischen Zellen

35. Wie transfektiert man Insektenzellen? BEVS Methode

man infiziert sie mit dem Baculovirus (besitzt eine ringförmige DNA von 88-200kb)

Länge), als Folge werden in großen Mengen das Protein Polyhedrin produziert und dann wird das Polyhedrin Gen ersetzt

Vorteile der BEVS-Technik: rekombinante Proteine zeigen ähnliche biologische Eigenschaften wie die nativen Proteine
ermöglicht die meisten posttranslationalen Modifikationen von Säugerzell-Expressionssystemen, wie Proteintransport, Disulfidbrückenbindung, Phosphorylierung, Glykosylierung, Einbau von Fettsäuren
hohe Sicherheit (Baculovirus befällt nur Zellen von Invertebraten)

Nachteile unterschiedlicher Einbau von Zuckerresten bei der N-Glykosylierung
geringere Produktivität als *E. coli*

36. Was ist ein Bioreaktor nennen Sie 3 Arten!

Sind Apparaturen in denen Enzyme, Zellen, Organe oder Organismen für Produktionszwecke inkubiert bzw. kultiviert werden
dabei gibt es anaerobe und aerobe Prozesse, Berücksichtigung der Prozessparameter (Temperatur, pH-Wert, Nährstoffe)
Durchmischung erfolgt mechanisch (Propellerrührer, Schrägplattrührer, Kreuzbalkenrührer), pneumatisch oder hydrodynamisch (Pumpen)

- **Laborreaktor (50L)**
- **Versuchsreaktor (50-5000L)**
- **Betriebsreaktor (5000-800000L)**
Rührkesselreaktor, Gärtassenreaktor, Trommelreaktor, Airliftreaktor

37. Was muss ein Nährmedium enthalten?

- Kohlenstoff und Stickstofflieferanten
- Phosphor und Schwefelhaltige Verbindungen PO₄, SO₄
- Spurenelemente Zn, Mn
- Anorganische Ionen Ca, Mg, K, Na

38. Nennen sie zwei Möglichkeiten zur chemischen und physikalischen Immobilisierung von Enzymen.

chemische; Adsorption und ionische Wechselwirkung (=idale, da Proteine nicht verändert werden) und noch kovalente Bindung z.B. Azid- oder Azo-Methode

Physikalische; Einbettung in Polymermatrix (Ager, Gelatine, Pektine) -> Diffusion des Substrates sehr stark eingeschränkt, Mikroverkapselung, Membran Einschluss->beste Möglichkeit

39. Wie reinigt man Plasmid DNA?

spezielle Abtrennung der Plasmid DNA in Mini-Preps

Plasmid DNA muss vorher zur Entfernung der allgegenwärtigen DNasen

autoklaviert werden

Selektive Adsorption von Plasmid DNA an Glasfaser oder Silica-Materialien in

Gegenwart chaotroper Reagenzien (Guanidin-HCl)

Isolierung der Plasmid DNA aus der Bakteriensuspension

40. Nennen Sie 4 biotechnologische Anwendungen von Enzymreaktoren:

- Chemische Modifizierung von Steroiden
- Stärkeverarbeitung
- Herstellung von Aminosäuren mittels Aminosäuredehydrogenase
- Enzymatische Aspartamsynthese mittels Thermolysin
- Herstellung von L-Asparaginsäure aus Fumarsäure

41. Nennen Sie 3 Resistenzmechanismen von Antibiotika in Bakterien:

- Umbau des Targets für das Antibiotikum am MO (andere Expression des Proteins)
- Störung der Aufnahme oder schneller Export des Antibiotikums (Schleimschicht oder säureresistente Bakterien)
- Enzymatische Modifikation des Antibiotikums (Spaltung)

42. Nennen Sie jeweils zwei Vor und Nachteile von Säugetierzellen bzw. Escherichia Coli als Expressionssystem:

- **Säugetier:**
 - führen posttranslationale Modifikationen durch (Faltung, Glykosylierung)
 - für zuckerreiche Proteine geeignet
 - sezernieren die Proteine ins Kulturmedium

 - langsames Wachstum
 - geringe Produktionsleistung
 - große Empfindlichkeit
 - teures Kulturmedium
- **E.Coli**
 - leicht und preiswert kultivierbar
 - leicht über Plasmide transformierbar
 - sehr stoffwechselaktiv

 - Bakterien fehlt die Enzymausstattung zum Herausschneiden der Introns
 - ein Codon kann für E.Coli unüblich sein

- keine posttranslationale Modifikation
- Proteine werden nicht richtig gefaltet

43. Erklären Sie die bakterielle Wachstumskurve – Siehe Frage 13

44. Was sind Biolistics?

- Transfektion von Säugetierzellen
- Beschuss mit Goldkugeln, die mit DNA beladen wurden
- Zielzellen sind Muskelzellen, fibroblasten, oder Tumorzellen
- bei Säugerzellen weniger erfolgreich als bei Pflanze

45. Nennen Sie 4 Sicherheitsstufen von biogenen AST und je ein Beispiel:

Sicherheitsstufe	Risiko für Mensch und Umwelt	Beispiele
S1	Nicht vorhanden	Laborstämme von <i>E. coli</i> , Backhefe, transgene Pflanzen und Tiere
S2	Gering	Manche <i>Pseudomonas</i> -Stämme, <i>Xanthomonas</i>
S3	Mäßig	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , Pflanzenviren
S4	Hoch	Stark humanpathogene Mikroorganismen

46. Was sind essbare Impfstoffe? Nennen Sie jeweils Vor und Nachteile!

dabei werden Impfstoffe durch den Verzehr essbarer Pflanzenteile aufgenommen, der Impfstoff muss roh genießbar sein und die Magenpassage überstehen
z.B. transgene Erbsen gegen E.coli als Futtermittelzusatz für Ferkel

- +Kostengünstig
- +können lokal angebaut werden
- +kein med. Fachwissen nötig
- schwankende Impfstoffkonzentration
- unkontrollierte Ausbreitung
- Gefahr der Immuntoleranz
- Haltbarkeit

47. Biotechnologische Verfahren – einzelne Schritte

- Substratvorbereitung
- Produktionsprozess (Fermentation)
- Produktionsaufbereitung

48. *Saccharomyces cerevisiae* vier Merkmale

- wegen der umgebenden Zellwand können die Vektoren nicht direkt in die Hefezelle eingebracht werden
- durch enzymatische Verdauung der Zellwand müssen erst Sphäroblasten

gewonnen werden

- nach Behandlung mit CaCl₂ Lösung können diese DNA aufnehmen
- durch Kultivierung in einem speziellen Nährmedium wird anschließend die Zellwand wieder regeneriert

Leicht und preiswert fermentierbar

- gibt die Proteine ins Kulturmedium ab
- Reinigung weniger aufwändig
- Glykosylierungen werden durchgeführt, aber mit anderen Zuckern als bei menschlichen Zellen

49. Was wird im Gentechnikgesetz geregelt?

- Arbeit mit GVO in geschlossenen Systemen (Laboratorien)
 - anmelde und genehmigungspflicht
 - Sicherheitsvorkehrungen
- Freisetzung von GVO
 - zu Forschung und Entwicklungszwecken
 - Genehmigungspflicht
- Inverkehrbringung von Lebensmitteln die aus GVO bestehen oder GVO enthalten
- Kennzeichnung von Erzeugnissen die GVO enthalten
- Genetische Analyse und Gentherapie beim Menschen
- Gentechnikkommission
- Gentechnikbuch
- Kontrollen und Strafbestimmung

50. Elicitierung:

Häufige pflanzliche Abwehrreaktion bei mikrobiellen Angriffen: Bildung von **Phytoalexinen** (niedermolekulare NST mit antimikrobieller Aktivität)
Auslöser der Phytoalexinbildung ☐ **Elicitoren** (häufig Zellwandbestandteile Pflanzenpathogenen)

Elicitoren in der pflanzlichen Zell- und Gewebekultur:

- Pilzpräparationen
- UV-Licht
- Schwermetallsalze

Elicitierung kann zu einer starken Steigerung der Sekundärstoffproduktion führen

51. Zusammensetzung der Expressionsvektoren:

Enthalten neben üblichen Plasmidkomponenten auch induzierbare Promotoren

- induzierbarer Promotor -> lac-Promotor
- RBS =Ribosomenbindungsstelle
- ATC =Startcodon
- MCS = Fremdgeneinbaustelle
- lacZ-Sequenz für blau-weiß Screenin

52. Protoplastenisolierung und Fusionierung bei pflanzlichen Zellen:

Protoplastenisolierung:

Zellwandabbau mit **Cellulasen, Hemicellulasen** und **Pektinasen** (Gleichzeitig ☐ Simultantechnik, Nacheinander ☐ Sukzedantechnik

Protoplastenfusion:

-**Chemisch** induzierte Fusion (pH 10.5, Ca⁺⁺ - Ionen, 10-50 % Polyethylenglykol)

- **elektrisch** induzierte Fusion

☐ **Heterokaryon** (nach Verschmelzen der Zytoplasmamembranen)

☐ **Hybrid** (nach Verschmelzen der Zellkerne miteinander)

Selektion der gewünschten Hybride:

- Manuelle Selektion
- Mutantenkomplementierung
- Farb- oder Fluoreszenzmarkierung und anschließende Zellsortierung
- Selektion doppeltresistenter Hybride

53. In welchen Eigenschaften unterscheiden sich Pflanzenzellen von

Mikroorganismenzellen im Bioreaktor + 4 Unterschiede:

Parameter	Mikroorganismen	Pflanzenzellen
Durchmesser (µm)	1 bis 10	40 bis 200
Volumen (µm ³)	1 bis 40	900 000
Aggregatbildung	Selten	Fast immer
Inokulum	Niedrig	Hoch
Ansprüche an Belüftung	Hoch	Niedrig
Empfindlichkeit gegenüber		
Scherkräften	Niedrig	Hoch
Wachstumsphase	1 Tag	1 bis 2 Wochen
Produktionsphase	Einige Tage	Einige Wochen
Wachstum und Produktion korreliert	Selten	Häufig
Lokalisation des Produkts	Häufig extrazellulär	Meist intrazellulär
Produktaufarbeitung	Prozessbegleitende Entwicklung	Meist vorhanden
Konkurrierende Verfahren	Chemische Synthese, effektiverer mikrobieller Prozess	Pflanze im Feldanbau

Eigenschaften von Pflanzenzellen in Kultur

- Volumen der Zellen etwa 10.000 mal größer als bei Bakterien
 - ☒ langsamerer Stoffwechsel
 - ☒ niedrigere Produktionsraten
 - ☒ geringere O₂-Zufuhr nötig
 - langsamere Zunahme der Biomasse als bei Mikroorganismen
 - Wachstum oft mit Produktbildung korreliert ☒ hohe Zelldichte erwünscht
 - Unspezialisierte Kalluszellen können Stoffe der intakten Pflanze oft nicht bilden(enge Verknüpfung von morphologischer Differenzierung und Sekundärstoffwechsel)
- Produktion des gewünschten Stoffes oft nur während bestimmten Entwicklungsstadien, in bestimmten Organen und Geweben
- ☒☒☒☒oft ist es unmöglich, einen Stoff, den man aus der intakten Pflanze in großen Mengen gewinnen kann, in Pflanzenzellkultur zu produzieren

54. Vorteile von immobilisierten Pflanzenzellen:

Vorteile:

- Wiederverwertbarkeit nach Mediumtausch erlaubt kontinuierliche Prozessführung
- geringere Empfindlichkeit gegenüber Scherkräften

Voraussetzungen:

- Produkte müssen ans Medium abgegeben werden
- Produktbildung und Wachstum müssen getrennt voneinander stattfinden

Immobilisierungstechniken:

- Einbetten in Polyurethan-Schaumstoff
- Einbetten in Gele (z.B. Alginat)

55. Isolierung von RNA:

- Extraktion von Zellen oder Gewebe mit Guanidin und heißen Phenol
- Extraktion von Zellen oder Gewebe mit Guanidinisothiocyanat und anschließendem CsCl Gradientenzentrifugation

56. Mutagenese und Selektion:

- Ziel ist die Ausbeutungssteigerung, sowie die Entfernung von Nebenprodukten und die Verbesserung der Produktionseigenschaft eines Mikroorganismus

- Physikalische Erzeugung:
 - UV-Strahlung = Punktmutation,
 - Ionisierende Strahlung = Doppelstrangbruch
- Chemische Erzeugung:
 - Rasterverschiebungsmutagen = Insertion und Deletion
 - Basenaustauschmutagen = Transversion und Transition

- Transposons
=DNA-Sequenzen, die ihre Position innerhalb des Genoms verändern können
- Durchführung:
Aufnahme einer Inaktivierungskurve; optimal 80-99% Inaktivierung
im Phänotyp der überlebenden Organismen wird auf gewisse Eigenschaften
selektiert
- In Suspensionskultur
-penicillintechnik nach Lederberg und Davis
- In Oberflächenkultur
-Penicillintechnik nach Adelberg und Myers
-Replika Plattierung
-> Siehe Penicillin-Methode Frage:

57. Reverse Transkriptase:

RNA-abhängige DNA-Polymerase

- wird verwendet um mRNA in cDNA umzuschreiben
- wird aus Virus-infizierten Zellen gewonnen; z.B. aus Knochenmarkzellen von
Geflügel, die mit dem Avian-Myeloblastose-Virus (AMV) oder dem Rous-Sarkom-
Virus (RSV) infiziert wurden
- die Reverse Transkriptase verfügt über drei enzymatische Aktivitäten: 5'→3'
Polymerase
5'→3' Exoribonuclease (hydrolysiert DNA Einzelstränge)
3'→5' Exoribonuclease

58. Was versteht man unter dem Begriff „molecular pharming“?

Einsatz von gentechnisch veränderten Pflanzen oder Tieren zur Produktion von
Arzneimittelwirkstoffen:

z.B. Enzyme, Insulin, Zytokine, Plantibodies, Plantigenes

59. Welche Stabilitätsprobleme können bei der Verwendung von rekombinanten Peptiden oder Proteinen als Arzneistoffe auftreten:

- **Chemische Instabilitätsreaktion**
chemische-strukturelle Modifikation der Peptidstruktur
-Deamidierung, Oxidation, Hydrolyse, isomerisierung
- **Physikalische Instabilitätsreaktion**
Änderung der räumlichen Struktur ohne chemisch-kovalente Änderung der
Peptidstruktur
-Denaturierung, Adsorption, Aggregation, Assoziation

- Vorteile rekombinanter WST:
 - ☐ weniger toxisch
 - ☐ nicht kanzerogen oder teratogen
 - ☐ aufgrund spezifischer Wirkung oft geringere Risiken
- Wichtigste derzeitige Anwendungsgebiete rekombinanter WST: Antithrombotika; Asthma; Antigene; Diabetes; Hepatitis; Krebs; Multiple Sklerose; Rheuma; Psoriasis; Stoffwechselstörungen; Transplantation; Wachstumsstörungen; Wundheilung
- Wichtigste Substanzklassen der derzeit zugelassenen rekombinanten WST:
 - ☐ Antikörper ☐ Wachstumsfaktoren ☐ Hormone ☐ Enzyme ☐ Inhibitoren/
 - Rezeptorantagonisten ☐ Gerinnungsfaktoren ☐ Enzyme

60. Welche 3 Verfahren der Arzneimittelzulassung gibt es? Welches davon ist für biotechnisch hergestellte Arzneimittel vorgeschrieben?

National: in Österreich: Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen (BASG) / AGES PharmMed.

EU-weit:

-zentralisiertes Zulassungsverfahren (Verordnung (EG) Nr. 726/2004)

wichtigstes Verfahren für innovative AM

Zulassungsantrag wird bei der EMA (London) eingereicht

Zulassung erfolgt aufgrund des EMA-Gutachtens durch die Europäische Kommission für die gesamte EU

-nicht zentralisiertes Zulassungsverfahren bzw. Verfahren der gegenseitigen Anerkennung

Nach Erstzulassung in einem Mitgliedsstaat kann Anerkennung in anderen EU-Staaten beantragt werden

Zulassung biotechnologisch hergestellter AM erfolgt über das zentrale Verfahren

61. Nennen sie zwei Kohlenstoffquellen und Stickstoffquellen für biotechnologische Prozesse:

- Zucker, Zuckeralkohole, Alkohole, Mailmehlextrakt, Melasse,
- Ammoniumsalze, Aminosäuren, Nitrate

62. Was versteht man in der Gentechnologie unter Vektoren? Welche Eigenschaften besitzen sie?

=sind Hilfsmittel in der Gentechnik um fremdes Erbmateriale in Zellen einzuschleusen

(Genfähren)

- besitzen ein Replikationssystem, meist in Form eines Replikationsursprungs (*ori*), eventuell mit der zusätzlichen genetischen Information für notwendige Proteinfaktoren
- tragen Markergene, meist in Form von Antibiotika-resistenzen, auf deren Expression hin selektiert werden kann
- weisen Klonierungsstellen auf, d.h. Basensequenzen mit Erkennungsstellen für bestimmte Restriktions-endonukleasen

63. Nennen sie 4 Methoden zur Transfektion von Säugetierzellen:

- Mikroinjektion direkt in den Zellkern
- Kalziumphosphat-Präzipitation
- Elektroporation
- Lipofektion
- Virusinfektion
- Biolistics

64. Wo greifen Beta-Lactam-Antibiotika an und nennen sie 2 Beispiele

- greifen an der Biosynthese der bakteriellen Zellwand an
- Penicillin und Cephalosporin, Ampicillin

65. Was sind Auxine und Cytokine

- Phytohormone
- Auxine regen Zellwachstum, Sprosswachstum und Wurzelwachstum an
- Cytokine regen Zellteilung, Sprossausbildung und Knospenausbildung an

66. Was ist Gentechnik? Was ist Biotechnologie?

Gentechnik=Methoden die der Isolierung, Charakterisierung, Vermehrung und Neukombination von Genen dienen

Biotechnologie=Prozesse zur Herstellung von Produkten durch lebende Organismen oder isolierte Enzyme

67. 4 Parameter, die die Umsetzungsgeschwindigkeit beeinflussen:

Wachstum = irreversible Zunahme der Biomasse (Wachstum wird gemessen als Zunahme der Zellmasse pro Volumeneinheit)

- **Spezifische Wachstumsrate μ** = Zunahme der Zellmasse pro Zeiteinheit
- **Teilungsrate v** = Anzahl der Verdoppelungen der Zell- bzw. Organismenzahl pro Zeiteinheit
- **Generationszeit g** = Zeit, die für die Verdoppelung der Zellen bzw. Organismen benötigt wird

68. 3 Methoden zur Sekundärstoffgewinnung:

Pilze, Elicitierung, Mikroorganismen

69. Wie viele Klassen von Restriktionsenzymen (Endonukleasen) gibt es und welcher Typ ist der wichtigste?

Typ I Spaltung erfolgt ca. 1000 Bp von Erkennungssequenz entfernt; Nuklease- und Methylaseaktivität; ATP, Mg und S-Adenosylmethionin als Kofaktoren benötigt

**Typ II Spaltung erfolgt an der Erkennungssequenz (Palindrom von 4-8 Bp Länge);
Bildung von stumpfen Enden oder klebrigen Enden möglich; keine Methylaseaktivität**

Typ III Komplexe Enzyme, die in fester Entfernung von der Erkennungssequenz schneiden (meist 25 Bp)

70. Was versteht man unter gentechnisch veränderte Organismen?

=sind Organismen, deren Erbanlagen mittel gentechnischer Methoden gezielt verändert worden sind