

**Prüfungsfragenkatalog für  
Pharmazeutische Analytik, Bio- und Umweltanalytik  
(Prof. Andreas Kungl)**

**Stand Jänner 2021**

---

Termin: 12.01.2021

1. Wie unterscheidet sich Affinität von Kompetitivität (Skizze)? Geben Sie für Bestimmung der beiden Interaktions-Modalitäten jeweils ein Beispiel und beschreiben Sie im Detail den experimentellen Aufbau der beiden Messungen. In welcher Maßeinheit wird üblicherweise die Affinität und in welcher die Kompetitivität angegeben?
2. Erklären/skizzieren Sie möglichst ausführlich das Trennprinzip, den Aufbau und die Durchführung der Umkehrphasen-Chromatographie. Zeichnen Sie ein typisches Chromatogramm und erläutern Sie die Vorgehensweise zur Verbesserung der Trennleistung. Wie bestimmt man die Konzentration eines Protein-Analyten mit dieser Methode?
3. Skizzieren und erklären Sie den Aufbau eines Fluorometers und geben Sie ein typisches Fluoreszenz-Exzitations-, sowie ein Emissions-Spektrum eines Proteins an. Wie können wir aus dem Fluoreszenz-Spektrum eines Bioanalyten etwas über dessen Faltungs-Zustand aussagen? Wie empfindlich ist diese Methode?
4. Beschreiben Sie die Vorgehensweise zur Einbringung eines Expressionsplasmids in ein Bakterium, sowie die nachfolgende Expressionsanalyse des zugehörigen rekombinanten Proteins. Wie wirkt sich das Einbringen eines Expressionsplasmids auf die Wachstumskurve der Bakterien aus (Skizze +/- Expressionsplasmid)?
5. Detaillieren Sie in Worten und mit Skizzen die unterschiedlichen Methoden zur Solubilisierung von Bioanalyten ausgehend von Zellen bzw. Geweben. Welche Pufferkonditionen gelten allgemein für Proteine und welche sind angebracht für schwer lösliche Proteine? Erklären Sie, warum welche Pufferkomponenten für welche Bioanalyten zum Einsatz kommen.

Termin: 14.12.2019

6. Erklären/skizzieren Sie den experimentellen Aufbau, die praktische Durchführung (stationäre / mobile Phase) und ein typisches Resultat einer rpHPLC (Detektion mittels Fluoreszenz). Wie ermittelt man mit dieser Methode die Konzentration eines Bioanalyten (Skizze und Erklärung). Wie kann man die Trennung dieser Methode verbessern? Was müsste man berücksichtigen, wenn man diese Technik präparativ anwenden möchte?
7. Wie transformieren Sie ein Expressionsplasmid in Bakterien – Skizze / Beschreibung der möglichen Methoden und Vorbehandlung von Plasmid bzw. Bakterien – und wie gehen Sie weiter vor zur rekombinanten Expression eines humanen Proteins? Wie kontrollieren Sie den Erfolg der Expression typischerweise (Erklärung/Skizze/Resultat)? Was sind die Faktoren die eine nachfolgende Prozessierung des Proteins erschweren und wie kann dem entgegengewirkt werden?
8. Detaillieren Sie in Worten und mit Skizzen Prinzip, Durchführung und Auswertung (semi-quantitative Konzentrations-Bestimmung) eines Western-Blots ausgehend von der gelösten Bioprobe. Beschreiben Sie auch kurz die Vor- und Nachteile dieser Methode.
9. Was versteht man unter einem Kompetitions-Assay (beschreiben Sie in Worten und mit Skizzen) und wie wird er eingesetzt zur Ermittlung des IC50-Wertes eines Kompetitors (K) bzgl. Des natürlichen Liganden (L) für seinen Rezeptor (R)? (Detektorn: Fluoreszenz). Skizzieren Sie typische Verdrängungskurven für eine hohe und eine niedrige Kompetitivität.
10. Beschreiben Sie in Worten und mit Skizzen den Aufbau, die Durchführung und die Auswertung einer DNA-Gelelektrophorese. Skizzieren Sie ein Gel, auf dem Sie eine unbehandelte Plasmid-DNA mit einer restriktionsenzym behandelten DNA vergleichen. Wovon hängt die Trennung großer und kleiner DNA-Fragmente ab, bzw. wie kann sie verbessert werden?

Termin: 08.02.2019

1. Erklären / skizzieren Sie den experimentellen Aufbau, die praktische Durchführung (stat./ mob. Phase) u ein typisches Resultat einer Größenausschluss-Chromatographie (Detektion per Absorption). Wie ermittelt man mit dieser Methode die Konzentration eines Bioanalyten (Skizze u Erklärung)? Was ist neben der Konzentration eines Bioanalyten der wesentliche read-out dieser Chromatographie (Erklärung u Skizze)
2. Detaillieren Sie die experimentelle Entfaltung eines Bioanalyten mittels Temperatur u Detektion mittels CD-Spektroskopie. Beschreiben / skizzieren Sie eine typische Entfaltungskurve u erklären Sie die beiden so

erhaltenen Kernparameter der Entfaltung. Wie würde ein nicht-reversibles Entfaltungsverhalten gegenüber einem reversiblen Entfaltungsverhalten aussehen? (Skizze u Erklärung)

3. Detaillieren Sie in Worten u Skizzen das Prinzip, Ziel, die Durchführung u Auswertung eines Sandwich ELISAs. Beschreiben Sie auch kurz die wesentlichen Vor- u Nachteile sowie typische Anwendungen dieser Methode.
4. Was versteht man unter Ligandenbindungsaffinität u welchen dafür charakteristischen Parameter (Formel) ermittelt man mit der isothermalen Fluoreszenz-Titration? Beschreiben Sie in Worten u mit Skizzen den typischen Aufbau eines solchen Experiments sowie dessen Resultat. Vergleichen Sie einen hochaffinen mit einem niedrig-affinen Liganden anhand deren Bindungsisothermen.
5. Beschreiben Sie in Worten u Skizzen das Prinzip, Ziel, die Durchführung u Auswertung einer SDS-PAGE. Skizzieren Sie ein typisches Gel, auf dem Sie mittels semi-quantitativ die Konzentration eines Bioanalyten in einer solubilisierten Biomatrix abschätzen. Was versteht man unter einem nicht-reduzierenden Gel u wofür wird es eingesetzt?

Termin: 13.12.2018

1. Erklären / skizzieren Sie den experimentellen Aufbau, die praktische Durchführung (stationäre / mobile Phase) u ein typisches Resultat einer rpHPLC (Detektion mittels Absorption). Wie ermittelt man mit dieser Methode die Konzentration eines Bioanalyten (Skizze u Erklärung). Wie kann man die Trennung dieser Methode verbessern? Was muss man berücksichtigen, wenn man diese Technik präparativ anwenden möchte?
2. Detaillieren Sie die experimentelle Entfaltung eines Bioanalyten mittels Harnstoff u Detektion mittels Fluoreszenz-Spektroskopie. Beschreiben / skizzieren Sie eine typische Entfaltungskurve u erklären Sie die beiden so erhaltenen Kernparameter der Entfaltung. Welche Voraussetzungen muss der Bioanalyt erfüllen, um dieser Methode unterzogen werden zu können u warum (Erklärung des Messprinzips)
3. Detaillieren Sie in Worten u Skizzen Prinzip, Durchführung u Auswertung (semi-quantitative Konzentrations-Bestimmung) eines Western-Blots ausgehend von der gelösten Bioprobe. Beschreiben Sie auch kurz die Vor- und Nachteile dieser Methode.
4. Was versteht man unter einem Kompetitions-Assay (beschreiben Sie in Worten u Skizzen) u wie wird er eingesetzt zur Ermittlung des IC50-Werts eines Kompetitors bzgl. des natürlichen Liganden für seinen Rezeptor? Skizzieren Sie typische Verdrängungskurven für eine hohe u eine niedrige Kompetitivität.
5. Beschreiben Sie in Worten u Skizzen Prinzip, Durchführung u Auswertung einer DNA-Gelelektrophorese. Skizzieren Sie ein Gel, auf dem Sie eine unbehandelte Plasmid-DNA mit einer restriktions-enzym behandelten DNA vergleichen. Wofür wird die Methode typischerweise noch eingesetzt u was sind ihre Limitationen?

Termin: 12.11.2018

1. Wie ermittelt man den Oligomerisations-Zustand eines Proteins mittels Size-Exclusion Chromatographie? Erklären Sie möglichst detailliert (in Wörtern und mit Skizzen) den experimentellen Aufbau, stationäre u mobile Phasen, ein typisches Chromatogramm sowie die Vorgehensweise zur Bestimmung des Oligomerisationszustandes.
2. Beschreiben Sie möglichst ausführlich (in Worten u Skizzen) die Identifikation eines unbekanntes Proteins mittels 2-D-Gelelektrophorese u Massenspektrometrie. Erläutern Sie in diesem Zusammenhang auch die Bedeutung von Datenbanken und dem Begriff der Sequenzabdeckung.
3. Detaillieren Sie in Worten u Skizzen Prinzip, Durchführung u Auswertung eines typischen Sandwich ELISAs zur Bestimmung der Konzentration eines Bioanalyten. Was bedeuten LDL u UDL u wovon hängen diese Parameter im Speziellen beim ELISA ab? Beschreiben Sie auch kurz die Vor- und Nachteile dieser Methode.
4. Was versteht man unter Oberflächenplasmon-Resonanz (beschreiben Sie in Worten u Skizzen) und wie wird sie eingesetzt zur Ermittlung der Affinität eines Liganden für seinen Rezeptor? Skizzieren Sie typische Bindungsschemen für eine hoch- u eine niedrig-affine Bindung.
5. Beschreiben Sie in Worten u Skizzen Prinzip, Durchführung u Auswertung der Real-Time PCR. Wofür wird die Methode eingesetzt u was sind ihre Limitationen?

Termin: 15.06.2018

1. Erklären Sie anhand der direkten Proteinkonzentrations-Bestimmung mittels Absorption die Begriffe Präzision, Signal-Rausch-Verhältnis & Reproduzierbarkeit einer Messung. Welchen Einfluss hat der Probenpuffer, die Temperatur und das Raumlicht auf derartige Messungen? (Skizzieren & erläutern Sie anhand eines typischen Resultats)
2. Beschreiben Sie möglichst ausführlich die SDS-PAGE von der Probenvorbereitung, über das Gießen der Gele, bis zum finalen Ergebnis (Skizzen). Welche Kontrollen müssen üblicherweise auf dem Gel

mitlaufen, um die Expression & die Reinheit eines Bioanalyten vor dem Hintergrund einer zellulären Biomatrix abzuschätzen? Wie unterscheidet sich die Nativ-Gelelektrophorese von der SDS-PAGE & wann kommt sie zum Einsatz?

3. Detaillieren Sie möglichst ausführlich die Herstellung eines bakteriellen Expressions-Stamms für die rekombinante Expression eines Proteins sowie den Ablauf der zugehörigen Expression bis hin zur Expressionsanalyse (alle Schritte anhand von Skizzen).
4. Beschreiben Sie ausführlich das Prinzip der Affinitätschromatographie sowie eine damit durchzuführende Konzentrationsbestimmung über die AUC, d.h. Skizze der stationären Phase, Ablauf der experimentellen Durchführung, Beispiel-Chromatogramm, etc. Wo sehen Sie potentielle Fehlerquellen/Probleme bei dieser Chromatographie?
5. Erklären Sie den Aufbau der Biomatrix: welche Komponenten sind darin typischerweise enthalten, welche davon stören die Quantifizierung eines Bioanalyten mittels Chromatographie bzw. die Direkt-Bestimmung mittels Absorption, welche Komponenten müssen für die beiden genannten Methoden vor der Konzentrations-Bestimmung abgetrennt werden? Wie geht man vor, wenn das Detektionslimit der Methode über der Konzentration des Bioanalyten liegt?

Termin: 17.04.2018

1. Beschreiben Sie möglichst ausführlich die Identifikation und (semi-)Quantifizierung unbekannter Proteine mittels 2-D-Gelelektrophorese und anschließendem Trypsin-Verdau sowie Peptid-Fingerprint mittels Massenspektrometrie. Was versteht man unter Sequenz-Abdeckung und wie sehr ist sie relevant für die endgültige Protein-Identifikation?
2. Mit welchen Methoden ermittelt man den Oligomerisations-Zustand von Proteinen? Beschreiben Sie eine der Methoden ausführlich und geben Sie deren Limitationen und mögliche Fehlerquellen an.
3. Detaillieren Sie möglichst ausführlich die Ermittlung des K<sub>d</sub>-Wertes mittels isothermaler Fluoreszenz-Titration. Welche Voraussetzungen muss der Bioanalyt bzw. der Ligand für diese Methode erfüllen? Wo liegen die Stärken und die Schwächen dieser Methode für die Ermittlung der Bindungsaffinität?
4. Beschreiben Sie möglichst genau das Trennprinzip und die Durchführung der Umkehrphasen-Chromatographie. Worauf – dh auf welchen molekularen Eigenschaften – beruht die Trennung der Komponenten in einer typischen Bioprobe? Welche Puffersysteme / mobile Phasen werden warum eingesetzt? Welche stationären Phasen kennen Sie und wann werden sie angewandt? Wie würden Sie das Trennsystem im Falle schlecht bis gar nicht aufgetrennter Peaks optimieren?
5. Erklären Sie die Funktionsweise eines genetischen Schalters anhand des lac-Operons in der Theorie und in der Praxis. Wie wirkt sich die entsprechende Genregulation auf das Wachstum des Wirtsstammes aus, in dem man ein rekombinantes Protein exprimieren möchte? Vergleichen Sie Bakterienwachstum und Protein-Expression anhand der entsprechenden beiden g / ml – Zeit Kurven.

Termin: 08.02.2018

1. Beschreiben Sie möglichst ausführlich die SDS-PAGE von der Probenvorbereitung bis zum finalen Ergebnis (Skizze). Welche Kontrollen müssen üblicherweise auf dem Gel mitlaufen, um die Expression und die Reinheit eines Bioanalyten vor dem Hintergrund einer zellulären Biomatrix abzuschätzen? Wie unterscheidet sich die Nativ-Gelelektrophorese von der SDS-PAGE und wann kommt sie zum Einsatz?
2. Beschreiben Sie möglichst genau die Konzentrationsbestimmung mittels Sandwich-ELISA anhand der durchzuführenden experimentellen Schritte und einer Skizze der molekularen Vorgänge in einem typischen Reaktionsgefäß. Erläutern Sie dann anhand einer resultierenden Eichgerade die sog. OLD und LDL.
3. Detaillieren Sie möglichst ausführlich die Konzentrationsbestimmung eines proteinösen Bioanalyten mittels Absorptions-Spektroskopie. Beschreiben Sie die dafür notwendige Instrumentation, die experimentelle Vorgehensweise, die notwendig statistische Auswertung der Datenpunkte sowie die Sensitivität dieser Methode. Wie könnte man vorgehen, wenn die Sensitivität der intrinsischen Absorption nicht ausreicht?
4. Beschreiben Sie möglichst genau das Trennprinzip (nicht die Durchführung!) der Ionenaustausch-Chromatographie Worauf - d.h. auf welchen molekularen Eigenschaften - beruht die Trennung der Komponenten in einer typischen Bioprobe? Welche Puffersysteme / mobilen Phasen werden warum eingesetzt? Welche stationären Phasen kennen Sie und wann werden sie angewandt? Wie würden Sie das Trennsystem im Falle schlecht bis gar nicht aufgetrennter Peaks optimieren?
5. Beschreiben Sie die üblicherweise angewandten Methoden zum Aufbrechen von Bakterienzellen und von (humanen) Geweben sowie die nachfolgenden Schritte, die notwendig sind, bevor die resultierende Biomatrix einer Analyse mittels Chromatographie unterzogen werden kann.

Termin: 07.12.2017

1. Erläutern Sie möglichst ausführlich das Trennprinzip der Größenausschlusschromatographie (Skizze der Trennmatrix sowie des instrumentellen Aufbaus für eine HPLC) sowie die methodische Quantifizierung eines proteinösen Bioanalyten mit dieser Methode (Detektion = Absorption bei 220 nm / 280 nm)
2. Vergleichen Sie die Genexpressions-Analysemethoden „Real Time PCR“ und „Western Blot“ möglichst ausführlich (Skizze typischer Ergebnisse) und diskutieren Sie die wesentlichen Unterschiede sowie Vor- und Nachteile anhand der relativen Bestimmung eines induzierten verglichen mit einem nicht-induzierten Genprodukt.
3. Beschreiben Sie die Durchführung eines typischen Protein-Entfaltungsexperiments mittels Temperatur (Detektion: Fluoreszenz) möglichst genau (Skizze des instrumentellen Aufbaus sowie eines typischen Resultats). Was kann man aus der Kooperativität der Entfaltung über den Bioanalyten lernen?
4. Stellen Sie möglichst ausführlich den Aufbau eines Kompetitions-Experiments anhand des Filterbindungs-Assays dar (Skizze des experimentellen Aufbaus sowie eines typischen Resultats). Welche Detektionsmethoden kenne Sie und welche ist die empfindlichste zur Ermittlung des IC50 Werts?
5. Beschreiben Sie möglichst ausführlich die Transformation und Wachstum eines Bakterienstamms, der einen rekombinanten Wirkstoff exprimiert. Vergleichen Sie die Wachstumskurven (Skizzen) von transformierten und nicht transformierten Bakterien und erläutern Sie den Mechanismus der Induktion mittels IPTG.

Termin: 31.10.2017

1. Erläutern Sie den molekularen Wirkmechanismus des Lac-Operons im Rahmen der bakteriellen Expression eines rekombinanten Proteins anhand einer entsprechenden Skizze. Detaillieren Sie möglichst ausführlich die experimentellen Parameter, von denen ganz allgemein eine effiziente rekombinante Proteinexpression in E.coli abhängt. Wie kann man die Ausbeute an rekombinanten Proteinen erhöhen?
2. Was versteht man unter der Kd-Wert einer Protein-Ligand Interaktion (Formel) und wie kann dieser gemessen werden? (eine Methode möglichst ausführlich anhand von Skizzen des experimentellen Aufbaus und eines typischen Resultats beschreiben). Welche experimentellen Parameter beeinflussen im Allgemeinen die Affinität einer Protein-Ligand-Interaktion, und wie werden diese daher in einem Experiment kontrolliert bzw. konstant gehalten?
3. Beschreiben Sie ausführlich das Prinzip der Affinitätschromatographie, sowie die damit durchzuführende Konzentrationsbestimmung, dh Skizze der stationären Phase, Ablauf der experimentellen Durchführung, Beispiel-Chromatogramm, etc. Wo sehen Sie potentielle Fehlerquellen/Probleme bei dieser Chromatographie?
4. Detaillieren Sie anhand von Skizzen die Probenvorbereitung sowie die Durchführung eines Western Blots, beginnend mit der typischen SDS-PAGE. Wofür setzt man die Methode ein und was sind ihre Limitationen?
5. Erklären Sie anhand von Skizzen die Begriffe Präzision, Signal-Rausch-Verhältnis und Reproduzierbarkeit einer Messung am Bsp der direkten Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Absorption. Welchen Einfluss hat der Probenpuffer auf derartige Messungen? (geben Sie ein typisches Bsp)

Termin: 11.09.2017

1. Wie ermittelt man experimentell ob bzw. wie gut ein Protein gefaltet ist? Detaillieren Sie möglichst ausführlich die Durchführung aber auch den theoretischen Hintergrund der beiden besprochenen Methoden – beachten Sie dabei dieselbe Detektion sowohl bei der qualitativen als auch bei der quantitativen Methode – und erläutern Sie bei letzterer die beiden Parameter der Faltungs-Charakteristik.
2. Beschreiben Sie möglichst genau die „Real Time PCR“ Methode zur Untersuchung der Genexpression. Wie gehen Sie vor, wenn Sie zB stimulierte und nicht stimulierte Zellen vergleichen möchten. Detaillieren Sie die Probenvorbereitung, die Durchführung des Experiments sowie das experimentelle Resultat unter der Annahme, dass das interessierende Gen in den stimulierten Zellen vermehrt exprimiert wird.
3. Detaillieren Sie möglichst ausführlich die Konzentrationsbestimmung eines proteinösen Bioanalyten mittels Absorptions-Spektroskopie. Beschreiben Sie die Probenvorbereitung, den zugehörigen Puffer, die genaue experimentelle Vorgehensweise, die notwendige statistische Auswertung der Datenpunkte sowie die Sensitivität dieser Methode. Was bedeutet es, wenn die Probe nicht direkt messbar ist und wie könnte dann eine mögliche Vorgehensweise aussehen?
4. Beschreiben Sie möglichst genau das Trennprinzip (nicht die Durchführung) der Umkehrphasen-Chromatographie. Worauf – dh auf welchen molekularen Eigenschaften – beruht die Trennung der Komponenten in einer Bioprobe? Welche Puffersysteme / mobile Phasen werden warum eingesetzt? Welche stationären Phasen kennen Sie und wann werden sie angewandt? Wie würden Sie das Trennsystem im Falle schlecht bis gar nicht aufgetrennter Peaks optimieren?

5. Beschreiben Sie das Wachstum eines mit einem Expressionsplasmid transformierten und eines nicht transformierten E. coli Stamms (Skizze beider Kurven). Zu welchem Zeitpunkt wird die Protein-Expression im Falle der transformierten Bakterien induziert und wie geht man bei der Expressionsanalyse vor (Resultat-Skizze).

Termin: 27.06.2017

1. Wie ermittelt man die Konzentration eines Proteins in einem Probengemisch mittels Ionenaustausch-Chromatographie (HPLC) bei Absorptions-Detektion? Beschreiben Sie möglichst ausführlich den experimentellen Aufbau einer HPLC und skizzieren Sie anhand der Chromatogramme von Probe (Zielprotein + 4 zusätzliche Peaks) und Referenz (min. 3 Konzentrationen), wie die Konzentration des Bioanalyten bestimmt wird.
2. Beschreiben Sie möglichst genau den Aufbau und die Durchführung eines Sandwich ELISA-Experiments zur Bestimmung der Konzentration eines proteinösen Biomarkers im Serum. Was versteht man unter UDL u LDL (Skizze) und wovon hängen sie konkret bei dieser Methode ab? Was bestimmt die Empfindlichkeit dieser Methode?
3. Erklären Sie das Prinzip sowie die experimentelle Durchführung eines Kompetitions-Experiments mittels Filterbindungs-Assays am Beispiel eines Wachstumsfaktors (= Rezeptor), eines Hormons (=Ligand) und eines Inhibitors. Skizzieren und erläutern Sie sowohl den experimentellen Aufbau als auch die entsprechende Verdrängungskurve. Wie unterscheidet sich ein guter u ein schlechter Kompetitor in diesem Experiment? (Skizze)
4. Erläutern Sie den Wirkmechanismus des Lac-Operons im Rahmen der bakteriellen Expression eines rekombinanten Proteins. Detaillieren Sie möglichst ausführlich die Parameter, von denen eine effiziente rekombinante Proteinexpression in E. coli abhängt und warum. Wie kann man die Ausbeute an rekombinanten Protein erhöhen?
5. Beschreiben Sie möglichst detailliert die Identifikation eines Proteins mittels 2-D-Gelelektrophorese und anschließender Massenspektrometrie. Was versteht man unter Sequenzabdeckung und wie kann man diese verbessern? Wodurch unterscheidet sich diese Methode von typischen Sequenzierungsmethoden?

Termin: 24.04.2017

1. Erläutern Sie möglichst ausführlich die in der Vorlesung besprochenen Aufschluss- / Solubilisierungsmethoden von Bioproben. Was versteht man unter Proben-Geschichte u unter unabhängigen Mess-Wiederholungen? Wie wirken sich diese beiden Parameter auf die Statistik einer bioanalytischen Untersuchung aus?
2. Beschreiben und vergleichen Sie die beiden Methoden zur Untersuchung der Genexpression „Real-Time PCR“ und „Western Blot“ möglichst ausführlich und diskutieren Sie die wesentlichen Unterschiede im Ergebnis, die experimentellen Vor- und Nachteile, sowie die Empfindlichkeiten der beiden Methoden.
3. Was versteht man unter dem Kd-Wert einer Protein-Ligand Interaktion (Formel), und wie wird dieser gemessen? (Eine Methode bitte möglichst ausführlich beschreiben) Welche experimentellen Parameter beeinflussen die Affinität der Protein-Ligand Interaktion, die Sie daher in einem Experiment kontrollieren bzw. konstant halten müssen?
4. Beschreiben Sie ausführlich die Affinitätschromatographie, dh Skizze der stationären Phase, Ablauf der experimentellen Durchführung und Beispiel-Chromatogramm. Wo sehen Sie potentielle Fehlerquellen / Probleme bei dieser Chromatographie?
5. Beschreiben Sie das bakterielle Wachstum eines transformierten und eines nicht transformierten E. coli Stamms (Skizze beider Kurven). Zu welchem Zeitpunkt wird die Protein-Expression induziert und wie geht man bei der Expressionsanalyse vor (Resultat-Skizze)

Termin: 10.03.2017

1. Beschreiben Sie möglichst ausführlich den Aufbau und die Durchführung eines Protein-Entfaltungsexperiments mittels eines Chaotrops. Die Detektion soll über intrinsische Fluoreszenz erfolgen. Skizzieren Sie das Resultat eines derartigen Experiments und erklären Sie die beiden wesentlichen Parameter der Protein Entfaltung und deren Bedeutung für die funktionelle Bioanalytik. Wie gehen Sie bei der Rückfaltung vor? Wie sieht das Diagramm [Signal] / [Chaotrop] für ein reversibel und für ein irreversibel entfaltetes Protein aus?
2. Skizzieren Sie möglichst genau den Aufbau und die Durchführung eines Fluoreszenz-Experiments zur Ermittlung der Ligand-Affinität. Skizzieren Sie typische Bindungs-Isothermen (in einer Abbildung) für

- niedrige, mittlere und hohe Bindungsaffinitäten: um welche Größenordnungen handelt es sich dabei in etwa? Welche Vor- und Nachteile hat diese Methode gegenüber der Oberflächenplasmon-Resonanz Methode?
3. Erklären Sie das Trennprinzip in der Umkehrphasen-Chromatographie. Skizzieren Sie eine typische Trennmatrix dafür sowie ein Beispiel-Chromatogramm für ein Probengemisch bestehend aus drei unterschiedlich geladenen Analyten. Wie kann man die Trennleistung in der Umkehrphasen-Chromatographie verbessern?
  4. Detaillieren Sie möglichst genau den Aufbau (Skizze) und die experimentelle Durchführung einer SDS-PAGE. Welche Methoden der Färbung kennen Sie? Beschreiben Sie die Durchführung sowie Vor- und Nachteile der Methoden. Wie kann man eine Protein-Probe elektrophoretisch hinsichtlich ihrer Aggregation bzw. Oligomerisation untersuchen?
  5. Skizzieren Sie ein typisches bakterielles Expressionsplasmid. Beschreiben Sie kurz die Transformation (eine Methode), Kolonie-Selektion und Expression. Wie erkennt man das Anfallen des Zielproteins in Inclusion Bodies und welche Nachteile birgt das? Auf welche Proteine sind prokaryotische Expressionssysteme üblicherweise beschränkt und warum?

Termin: 16.12.2016

6. Wie ermittelt man die Konzentration eines Bioanalyten in einem Probengemisch mittels Reversed-Phase HPLC unter Absorptions-Detektion? Beschreiben Sie auch möglichst ausführlich den experimentellen Aufbau einer HPLC, und skizzieren Sie anhand der Chromatogramme – fünf Komponenten in der Probenmischung, drei unterschiedliche Konzentrationen – wie die Konzentration des Bioanalyten bestimmt wird. Wo liegen potentielle Fehlerquellen?
7. Beschreiben Sie möglichst genau den Aufbau und die Durchführung eines ELISA-Experiments zur Bestimmung der Konzentration eines proteinösen Biomarkers im Serum. Was versteht man unter UDL und LDL (Skizze) und wovon hängen sie konkret bei dieser Methode ab? Wo liegen potentielle Fehlerquellen?
8. Erklären Sie das Prinzip sowie die experimentelle Durchführung einer Affinitätsmessung mittels isothermaler Fluoreszenz-Titration anhand des Beispiels Wachstumsfaktor (= Protein-Vorlage) und DAN (= Ligand). Skizzieren und erläutern Sie sowohl den experimentellen Aufbau sowie eine entsprechende Bindungs-Isotherme. Einen Kd-Wert in welcher Größenordnung erwarten Sie?
9. Beschreiben Sie den Aufbau eines typischen bakteriellen Expressionsplasmids (inkl. Skizze) und wie man ein solches in Bakterien einbringt, vermehrt, selektiert und dann damit ein rekombinantes Protein exprimiert. Detaillieren Sie die Parameter, von denen eine effiziente rekombinante Proteinexpression in E. coli abhängt.
10. Welche Komponenten findet man typischerweise in einer Biomatrix und welche stören besonders die Quantifizierung eines darin enthaltenen Bioanalyten mittels Absorption? Wie kann man diese Störkomponenten abreichern, bzw. hinsichtlich der Konzentrations-Bestimmung des Bioanalyten entschärfen? Was wird durch diese Störkomponenten mehr beeinflusst: die Reproduzierbarkeit oder die Sensitivität der Methode und warum?

Termin: 21.10.2016

1. Beschreiben Sie möglichst ausführlich den experimentellen Aufbau, die Durchführung und den Read-out eines SDS-PAGE mit nachfolgender Detektion mittels Western Blot (wenn möglich anhand von Skizzen). Was sind verbreitete Anwendungsgebiete (Begründung) und was die potentiellen Fehlerquellen dieser Methoden?
2. Detaillieren Sie die Durchführung eines Temperatur-induzierten Protein-Entfaltungs- und Rückfaltungsexperiments mit CD-Detektion. Skizzieren Sie die Fälle von reversibler und irreversibler Entfaltung und erklären Sie die Ergebnis-Parameter und deren Bedeutung für die funktionelle Analytik. Was wird mit der üblichen far-UV-CD Spektroskopie gemessen mit welcher Bedeutung für die funktionelle Analytik (erläutern Sie anhand eines Beispiel-Spektrums)?
3. Erklären Sie die Durchführung der Affinitätschromatographie eines Proteins (inkl. Beispiel-Chromatogramm). Worauf muss man besonders achten, was sind die Vor- bzw. Nachteile dieser Methode, und für welche Bioanalyten kann sie gut angewandt werden. Beschreiben Sie auch kurz diespezifische Anwendung dieser chromatographischen Methode für die effiziente Reinigung / Prozessierung rekombinanter Proteine.
4. Wie gehen Sie vor beim Aufbrechen bakterieller Zellpellets nach erfolgter Proteinexpression mittels Ultraschall? Beschreiben Sie die Methode ab Zentrifugation der Bakteriensuspension. Worauf muss experimentell besonders geachtet werden (Produkt- u Personenschutz)? Wie unterscheiden Sie zwischen löslichem und unlöslichem Protein-Produkt?
5. Was versteht man unter real-time PCR? Beschreiben Sie ein typisches Experiment sowie die Unterschiede zur konventionellen PCR anhand der gewonnenen Resultate. (Skizzen von typischen experimentellen

Ergebnissen). Zu welchem Zweck setzt man die real-time PCR und zu welchem Zweck die konventionelle PCR ein? Wo sehen Sie potentielle Fehlerquellen?

Termin: 16.09.2016

1. Vergleichen Sie die drei haupt-Methoden der chromatographischen Ermittlung der Konzentration eines Bioanalyten. Stellen Sie Trennprinzipien, Optimierungsoptionen, und potentielle Fehlerquellen gegenüber. Welche Methode würden Sie bevorzugt anwenden zur Konzentrationsbestimmung eines Cytokins ( $pI = 10$ ) und warum?
2. Erklären Sie möglichst genau den Aufbau eines Expressionsplasmids zur Herstellung eines rekombinanten Wirkstoffs. Welche Methoden stehen Ihnen zur strukturellen Analyse des Plasmids und zur Überprüfung des Gens zur Verfügung? Erläutern Sie die experimentelle Durchführung dieser Methoden.
3. Detaillieren Sie möglichst ausführlich, die Vorbereitung, Durchführung und Auswertung eines Kompetitions-Experiments mit einem fluoreszenzmarkierten Liganden, Was ist der Read-Out eines solchen Experiments, und in welchem Bereich liegt dieser Parameter für Protein-Nukleinsäure Interaktionen?
4. Was versteht man unter 2-D Gelelektrophorese von Proteinen? Erläutern Sie möglichst genau die Vorbereitung, Durchführung und Auswertung eines solchen Experiments. Was ist der Read-Out eines solchen Experiments, und was sind die hauptsächlichen Anwendungsgebiete?
5. Erklären Sie das Prinzip der Konzentrationsbestimmung mittels einer Eichgeraden am Beispiel des ELISAs (keine umfangreichen experimentellen Ausführungen; Fokus auf Konzentrationsbestimmung und potentiell auftretende Probleme; Stichworte LDL und UDL sowie Background)

Termin: 08.07.2016

1. Was versteht man unter "In-Process" Analytik bei der Herstellung eines proteinösen Wirkstoffs? Geben Sie einen Überblick über die wichtigsten Stationen, die wichtigsten Methoden und die wichtigsten Resultate. Wie kann Ihrer Meinung nach der Upstream-Part eines derartigen Prozesses- in welche Richtung- verbessert werden?
2. Erklären Sie möglichst genau die Versuchsanordnung, die Probenvorbereitung sowie die Durchführung der Konzentrationsbestimmung eines Proteins mittels Absorptionsspektroskopie. Woran kann man die Reproduzierbarkeit und die Präzision einer Einzelmessung erkennen?
3. Worauf beruht die Affinitätsmessung eines Protein-Ligand Paares mittels Fluoreszenz-Titration? Beschreiben Sie den Instrumenten-Aufbau und die experimentelle Durchführung möglichst genau. Skizzieren Sie Bindungs-Isothermen für einen hoch-affinen sowie für einen niedrig-affinen Liganden und geben Sie ungefähre Werte für deren Affinitäten an.
4. Beschreiben Sie möglichst ausführlich den Aufbau eines HPLC-Systems anhand einer Skizze. Worauf beruht das Trennprinzip in der Umkehrphasenchromatographie? Detaillieren Sie den experimentellen Aufbau eines solchen Versuchs und geben Sie Möglichkeiten an zur Verbesserung der Trennleistung bei überlappenden Peaks.
5. Erklären Sie möglichst genau das Prinzip der Gelelektrophorese sowie deren praktische Durchführung anhand von Agarose-gelen zur Analytik von DNA. Wo können Sie mögliche Fehlerquellen festmachen und wie könnten diese behoben werden. Was ist der Read-Out dieser Methode und was können Sie zu deren Trennschärfe sagen?

Termin: 22.04.2016

1. Erläutern Sie möglichst ausführlich das Trennprinzip der Umkehrphasen-(Reversed-Phase) Chromatographie sowie die Quantifizierung eines proteinösen Bioanalyten mit dieser Methode (Detektion = Absorption)
2. Vergleichen Sie die Genexpressionsmethoden „Real Time PCR“ und „Western Blot“ möglichst ausführlich und diskutieren Sie die wesentlichen Unterschiede sowie Vor- und Nachteile betreffend Geschwindigkeit der Durchführung, Reproduzierbarkeit und Sensitivität

3. Warum zählt die Untersuchung des Faltungszustandes eines Proteins zu den funktionellen bioanalytischen Methoden? Beschreiben Sie die Durchführung eines typischen Entfaltungsexperiments mittels Chaotrop (Detektion: Fluoreszenz) möglichst genau. Was kann man aus der Kooperativität der Entfaltung über den Bioanalyten lernen?
4. Stellen Sie möglichst ausführlich den Aufbau eines Kompletions-Experiments anhand des Filterbindungs-Assays dar. Wie muss die Probe vorbehandelt werden und was ist die empfindlichste Detektionsmethode zur Ermittlung des IC50 Werts?
5. Beschreiben Sie möglichst genau die Prozess-Analytik bei der Herstellung eines rekombinanten Wirkstoffs in *E. coli*. Was sind die wesentlichen Mess-Parameter für Ausbeute und Reinheit, wie werden Sie ermittelt und welche Größenordnungen erwarten Sie dafür in einem optimierten Prozess?

Termin: 09.02.2016

1. Detaillieren Sie die unterschiedlichen Bio- Matrices sowie deren möglichen Einfluss auf die Quantifizierung eines Bio- Analyten. Wie schließt man feste Bio- Matrices auf (Beschreibung der Methoden) und wie trennt man Bio- Analyten von Bio- Matrices ab?
2. Erklären Sie möglichst genau die Versuchsanordnung, die Probevorbereitung sowie die Durchführung der Konzentrationsbestimmung eines Proteins mittels Absorptions- Spektroskopie.
3. Wie wird in der funktionellen Analytik die Affinität eines Liganden bzgl. seines Rezeptors ermittelt? Eine Methode genau beschreiben zur Ermittlung der Affinität. Was versteht man unter hoher bzw. unter niedriger Affinität (Zahl plus Einheit) und was hat das für Folgen bzgl. Drug Developments?
4. Beschreiben Sie möglichst genau den Aufbau eines Expressions- Plasmids sowie die Durchführung einer Transformation mittels Ca- kompetenter Bakterien- Zellen. Wie wird die Effizienz der Transformation beurteilt und was versteht man unter einem Klon und warum ist es wichtig, nur einen Klon für eine nachfolgende Protein- Expression zu verwenden.
5. Was versteht man unter Sensitivität, Präzision und Reproduzierbarkeit einer analytischen Methode? Diskutieren Sie diese Parameter und deren Optimierung ausführlich anhand eines Chromatogramms mit vier, teilweise überlappenden Peaks!

Termin: 16.12.2015

1. Erklären Sie den allgemeinen Aufbau eines HPLC-Systems anhand einer entsprechenden Skizze. Worauf basiert die Trennung mittels Reversed Phase (ausführliche Erläuterung des Trennprinzips) und wie sieht ein typisches Chromatogramm aus. Wenn Sie bei einer charakteristischen Protein-Wellenlänge die Absorption detektieren?
2. Detaillieren Sie die Versuchsanordnung, die Probenvorbereitung sowie die Durchführung einer SDS- Gelelektrophorese (inkl. Skizze). Welche zwei unterschiedlichen Trennkonditionen können Sie unterscheiden und zu welchem Zweck wird jeweils eine bestimmte Methode eingesetzt? Wie unterscheidet sich SDS-PAGE von der Nativ-Gelelektrophorese? (kurze Gegenüberstellung in Stichworten)
3. Warum zählt die Untersuchung des Faltungszustandes eines Proteins zu den funktionellen bioanalytischen Methoden? Beschreiben Sie die Durchführung eines typischen Entfaltungsexperiments mittels Chaotrop (Detektion: Fluoreszenz) möglichst genau. Was kann man aus der Kooperativität der Entfaltung über den Bioanalyten lernen?
4. Stellen Sie möglichst ausführlich den Aufbau eines Kompletions-Experiments anhand der Filterbindungs-Assays dar. Welche Vorbehandlung ist notwendig und was ist die empfindlichste Detektionsmethode zur Ermittlung des IC50 Werts?
5. Beschreiben Sie möglichst ausführlich die Prozessierung eines rekombinanten Wirkstoffs in *E. coli* (anhand eines Fuß-Diagramms beginnend mit der Transformation). Was versteht man unter Upstream, und was unter Downstream Prozess-Analyse (in Stichworten)? Welche Faktoren bestimmen die Ausbeute des Produkts im Upstream-Prozess und wie könnte diese optimiert werden?

Termin: 09.09.2015

1. Erläutern Sie möglichst ausführlich die in der Vorlesung besprochenen Aufschlussmethoden von Bioproben. Was versteht man unter Proben-Geschichte und unter unabhängigen Mess-Wiederholungen? Warum ist beides

wichtig für die Statistik einer bioanalytischen Untersuchung und auf welche statistischen Parameter erwarten Sie den größten Einfluss?

2. Vergleichen Sie die Genexpressions-Methoden „Real Time PCR“ und „Western Blot“ möglichst ausführlich und diskutieren Sie die wesentlichen Unterschiede im Ergebnis, die experimentellen Vor- und Nachteile, sowie die Empfindlichkeiten der beiden Methoden.
3. Was versteht man unter dem  $K_d$ -Wert einer Protein-Ligand Interaktion (Formel) und wie wird dieser gemessen (eine Methode bitte möglichst ausführlich beschreiben)? Welche experimentellen Parameter beeinflussen die Protein-Ligand Interaktionen, die Sie daher kontrollieren bzw. konstant halten müssen?
4. Beschreiben sie ausführlich die Affinitätschromatographie (Ablauf), d.h. Skizze des experimentellen Aufbaus, Flow-Chart der experimentellen Durchführung und Beispiel-Chromatogramm. Wo sehen Sie die potentiellen Fehlerquellen bei dieser Chromatographie?
5. Beschreiben Sie ein typisches Expressions-Plasmid für die Herstellung eines rekombinanten Proteins, wie das Plasmid typischerweise in Bakterien eingebracht werden kann, und wie man es aus Bakterien isoliert. Welche analytischen Methoden wenden Sie an, um die Qualität des isolierten Plasmids zu überprüfen?

Termin: 01.07.2015

1. Erklären sie das Prinzip der HPLC. zeichnen Sie schematisch den Aufbau einer typischen HPLC - Apparatur mit Absorptions-Detektion, erläutern Sie die einzelnen Komponenten und deren Bedeutung für die Trennung und geben Sie anhand eines Size-exclusion Chromatogramms (Skizze) ein praktisches Fallbeispiel für die Konzentrationsbestimmung (AUC) eines Analyten in einem Probengemisch
2. Detaillieren Sie die Zusammensetzung von Nährmedien für bakterielle Zellen. Worauf muss im speziellen bei Nährmedien während des Expressions-Prozesses einer rekombinanten Protein-Expression in E. coli geachtet werden? Wie analysieren Sie den Verlauf des Bakterienwachstums (Skizze) und wie beurteilen Sie den Erfolg einer bakteriellen, rekombinanten Protein-Expression?
3. Erläutern Sie möglichst genau die Methode zur Entfaltung von Proteinen mittels Chaotrop und der Detektion mittels Fluoreszenz-Spektroskopie (inkl. Skizze). Welche Parameter werden für die Funktionsanalyse des Proteins herangezogen und wie werden sie ermittelt?
4. Was versteht man unter Biomatrix und wie sieht deren Zusammensetzung üblicherweise aus (unterscheiden Sie die drei besprochenen Fälle)? Welche Komponenten der Biomatrix stören die direkte Bestimmung eines Bioanalyten mittels Absorptionsspektroskopie und wie kann man in einem solchen Fall vorgehen?
5. Vergleichen Sie die elektrophoretischen Methoden SDS - PAGE und Nativ-Gele, indem Sie den experimentellen Ablauf genau erläutern, sowie den analytischen Read-out beider Methoden einander gegenüberstellen. Für welche Fragestellung eignet sich SDS - PAGE und für welche Nativ-Gele typischerweise besser?

Termin: 06.05.2015

1. Beschreiben Sie möglichst ausführlich die Trennprinzipien der Reversed Phase- und der Ionenaustausch-Chromatographie. Was versteht man unter „Auflösung“ in der Chromatographie und wie kann man diese bei den gefragten Methoden bei Bedarf – wann tritt dieser auf? – verbessern?
2. Detaillieren Sie ausführlich die 2 –D- Gelelektrophorese von Proteinen. Welche Färbemethoden können zur Protein-Detektion angewandt werden, und wie sensitiv sind diese? Was sind die typischen Ergebnisse, die mit dieser Methode erhalten werden können?
3. Beschreiben Sie möglichst genau die Methoden zum Aufschluss nicht-flüssiger Bioproben. Im Falle welcher anschließenden Quantifizierungs-Methoden (keine ausführliche Beschreibung!) müssen die löslichen Bestandteile der Biomatrix nicht abgetrennt werden und warum nicht?
4. Detaillieren Sie die Transformation von Bakterien mit einem Expressionsplasmid (Skizze). Wie kann man feststellen, dass das Plasmid eingeschleust wurde bzw. ob das transformierte Plasmid das gewünschte Insert trägt.
5. Wie ermittelt man das Verdrängungspotential einer Substanz bezüglich des natürlichen Liganden eines Proteins? Skizzieren Sie den experimentellen Aufbau und erläutern Sie den Ablauf des Experiments. Was sind die potentiellen Fehlerquellen?

Termin: 06.12.2014

1. In der funktionellen Bioanalytik geht man von der korrekten Faltung des Bioanalyten / Proteins aus. Wie konkret überprüft man die Faltung eines Proteins? Geben Sie die beiden wesentlichen Methoden zur Entfaltung eines Proteins an, und erläutern Sie zwei Messprinzipien zur Verfolgung der Entfaltung. Was sind die

charakteristischen Parameter, die man zur Beschreibung des Faltungszustandes heranzieht, und worauf weisen sie hin?

2. Wie lässt sich die Identität eines Bioanalyten im Rahmen einer chromatographischen Trennung feststellen? Welcher Parameter ist ein erstes Kriterium für die Identität, welcher ein zweiter und genauerer (Tipp: spezielle Art der Detektion), und welche Methode muss schließlich angewendet werden, um die Identität endgültig aufzuklären (gehen Sie hier wieder vorrangig auf proteinöse Bioanalyten ein)?
3. Beschreiben Sie möglichst genau den Ablauf und die einzelnen Reaktions-Schritte der realtime-PCR! Wie sieht typischerweise die Probe aus und wie muss diese vorbereitet werden, um die rtPCR durchzuführen. Zu welchem Zweck führt man diese Methode durch, und mit welchen anderen Methoden ist sie daher vergleichbar?
4. Die bakterielle Herstellung von rekombinanten Proteinen erfordert Methoden der sog. In-Process-Analytik. Was versteht man darunter im allgemeinen und welche Methode wird im speziellen angewandt, um die Verbesserung der Reinheit sowie die Ausbeute während der Prozessierung abzuschätzen.
5. Skizzieren Sie den Aufbau eines typischen Antikörpers der Klasse IgG und beschreiben Sie kurz (in Stichwörtern) dessen Einsatz in den beiden immunologischen Methoden zur Bioanalytik. Welche Domänen des Antikörpers sind für die beiden Methoden zu welchem Zweck wichtig, und wie unterscheiden sich diese beiden Methoden hinsichtlich der Antigen-Antikörper Erkennung?

Termin: 30. 10 2014

1. Erklären Sie möglichst ausführlich das Prinzip der HPLC, zeichnen Sie schematisch den Aufbau einer typischen HPLC-Apparatur, erläutern Sie die einzelnen Komponenten und deren Bedeutung bei der Trennung + geben Sie anhand des Reversed Phase Konzepts ein praktisches Fallbeispiel für die Konzentrationsbestimmung eines Analyten in einem komplexen Probengemisch.
2. Detaillieren Sie die Zusammensetzung von Nährmedien a, für bakterielle Zellen b, für Säugetierzellen. Worauf muss im Speziellen bei bakteriellen Nährmedien während des Prozesses einer rekombinanten Protein-Expression geachtet werden? Wie überprüfen Sie den Verlauf und den Erfolg einer bakteriellen, rekombinanten Protein-Expression?
3. Beschreiben Sie möglichst genau den Ablauf und die einzelnen Reaktionsschritte eines Western Blots, inklusive der vorangehenden elektrophoretischen Protein-Aufbereitung. Was versteht man unter Sensitivität bei diesem immunologischen Assay + wie kann sie erhöht werden?
4. Erklären Sie anhand der Ermittlung einer Eichgeraden (Skizze) für die Konzentrationsbestimmung einer Probe mittels Absorption die Begriffe Präzision + Reproduzierbarkeit. Geben Sie die wichtigsten experimentellen Schritte für Absorptions-Messungen an, was sind die größten Fehlerquellen?
5. Was versteht man unter dem KD-Wert einer Protein-Ligand-Interaktion, wie wird er ermittelt (welche Methoden + kurze Beschreibung einer Methode) und warum ist er im Speziellen für das Drug Development wichtig?

Termin: 10. September 2014

1. Erläutern sie möglichst ausführlich die Abreicherung von a) Serum und b) Gewebe hinsichtlich die quantitative Analyse mittels Chromatographie störender Faktoren. Um welche Störfaktoren handelt es sich bei diesen Biomatrices und warum beeinflussen sie das Resultat der chromatographischen Auftrennung negativ?
2. Vergleichen Sie Genexpressions-Methoden „Real Time PCR“ und „Western Blot“ möglichst ausführlich und diskutieren Sie die wesentlichen Unterschiede, die Vor- und Nachteile, sowie die Empfindlichkeiten der beiden Methoden.
3. Warum zählt die Untersuchung des Faltungszustandes eines Proteins zu den funktionellen bioanalytischen Methoden? Beschreiben Sie die Durchführung eines typischen Entfaltungsexperiments mittels chaotrop (Detektion: Fluoreszenz) möglichst genau. Was kann man aus der Kooperativität der Entfaltung über den Bioanalyten lernen?
4. Stellen Sie möglichst ausführlich den Aufbau eines Kompetitions-Experiments anhand des Filterbindungs-Assays dar. Wie muss die Probe vorbehandelt werden und was ist die empfindlichste Detektionsmethode zur Ermittlung des IC50 Werts?
5. Beschreiben Sie möglichst ausführlich die Prozessierung eines rekombinaten Wirkstoffs in E. coli. Was versteht man unter Upstream, und was unter Downstream-Prozess-Analyse? Wie kann die Ausbeute des Produkts im Upstream und wie im Downstream-Prozess optimiert werden? Welche Alternativen gibt es zur bakteriellen Expression und was sind deren Vor- bzw. Nachteile.

Termin: 12.06.2014

1. Vergleichen Sie möglichst detailliert die chromatographischen Trennprinzipien. 1) Size Exclusion u 2) Reversed Phase unter der Annahme eines typischen HPLC Set-ups für den Fall eines Protein-Biomarkers im Serum. Erklären Sie zusätzlich, wie die Probe vorbereitet werden muss und wie die Quantifizierung eines Biomarkers erfolgt.
2. Was versteht man unter funktioneller Bioanalytik? Beschreiben Sie möglichst ausführlich eine Methode zur Bestimmung des K<sub>d</sub>-Wertes einer Protein-Ligand Interaktion (inklusive Skizze einer Bindungs-Isotherme)
3. Mit welchen Methoden und unter Änderung welcher Bedingungen lässt sich die Entfaltung von Proteinen verfolgen? Beschreiben Sie eine Methode möglichst ausführlich (plus Skizze einer typischen De- und Renaturierungskurve)
4. Beschreiben Sie möglichst genau die Konzentrationsbestimmung mittels Absorptions-Spektroskopie unter besonderer Berücksichtigung des praktischen Proben-Handlings. Erklären Sie die Eichkurve (Skizze) und geben Sie an, bei welcher Wellenlänge Sie a) die höchste Sensitivität u b) die geringsten Störfaktoren für einen typischen Bioanalyten erwarten würden.
5. Beschreiben Sie möglichst genau den praktischen Ablauf einer rekombinanten Protein-Expression in E.coli beginnend mit der Transformation bis hin zur Expressionsanalyse (Skizzen, wo immer möglich). Welche Faktoren bestimmen die Protein-Ausbeute und welche analytischen Methoden werden eingesetzt, um diese zu ermitteln?

Termin: 06.09.2013

1. Welche Methoden der quantifizierenden Bioanalytik kennen Sie? Beschreiben Sie eine der Methoden möglichst genau, geben Sie Detektionslimita und praktische Probleme an (Bioanalyt, Protein)
2. Welcher Methodensatz wird zur Identifikation eines unbekanntes Bioanalyten herangezogen? Beschreiben Sie die einzelnen Methoden ausführlich und geben Sie potentielle Fehlerquellen an.
3. In der funktionellen Bioanalytik werden häufig Ligand-Bindungsstudien durchgeführt. Welche biophysikalischen Methoden werden üblicherweise dafür verwendet? Beschreiben Sie den Aufbau und die Daten-Analyse einer der Methoden so genau als möglich.
4. Was versteht man unter einem bakteriellen Expressionsplasmid (Skizze)? Wie werden rekombinant hergestellte Proteine aus Bakterien extrahiert, solubilisiert und mit welchen Methoden werden sie üblicherweise bzgl. ihres Expressionsgrades analysiert?
5. Beschreiben Sie möglichst ausführlich die Zusammensetzung biologischer Matrices – dh von Blut, Zellen und Geweben – und wie Sie bei der Abtrennung dieser Bestandteile zur Analyse von Biomarkern vorgehen.

Termin: 23.07.2013

1. Mit welchen chromatographischen Methoden lassen sich Bioanalyten von Verunreinigungen der Biomatrix abtrennen und quantifizieren? Vergleichen Sie die unterschiedlichen Trennprinzipien und erläutern Sie deren jeweiligen Vor- und Nachteile
2. Welche Techniken zur Analyse der Genexpression kennen Sie? Detaillieren Sie den experimentellen Aufbau und die Datenauswertung zweier Methoden möglichst genau.
3. Worauf muss man bei der zell-basierten Assays wie der Chemotaxis besonders achten? Erklären Sie so ausführlich wie möglich die Arbeit mit humanen Zellkulturen (z.B. Medien, Propagations-Bedingungen, Splitting, Conluency, Viability, etc.)
4. Erklären Sie anhand der Ermittlung einer Eichgeraden (Skizze) für die Konzentrationsbestimmung einer Probe mittels Absorption die Begriffe Präzision und Reproduzierbarkeit. Geben Sie die wichtigsten experimentellen Schritte für Absorptions-Messungen an, was sind die größten Fehlerquellen?
5. Wie ermittelt man das Entfaltungs- und Rückfaltungsverhalten von Proteinen? Skizzieren Sie eine typische Entfaltungskurve und erklären sie deren Verlauf.

Termin: 28.03.2013

1. Was versteht man unter einem Western Blot, wofür wird er eingesetzt und was sind die wesentlichen experimentellen Schritte dabei? Beschreiben Sie so ausführlich als möglich die Methode und potentielle Schwierigkeiten
2. Welche analytischen Methoden kennen Sie zur – Ermittlung der Identität (Western Blot ausgenommen) und zur Ermittlung der Quantität eines Bioanalyten. Geben Sie jeweils zwei Beispiele und eine kurze Erklärung der Methode.
3. Beschreiben Sie die unterschiedlichen Arten der Gelelektrophorese für Proteine (+/- Ligand) und DNAs/RNAs möglichst ausführlich, inklusive Skizze des apparativen Aufbaus

4. 4 Wie kann man Protein-Entfaltung und Rückfaltung im Labor beobachtet, charakterisieren und quantitativ auswerten (Read-Out) Beschreiben Sie eine Methode möglichst ausführlich inklusive einer Entfaltungskurve
5. 5 Wie wird die Expression eines Target Proteins in Bakterien reguliert? Beschreiben Sie möglichst ausführlich die experimentellen Konditionen für eine hohe Ausbeute an rekombinantem Target-Protein. Welche Parameter können von außen reguliert werden, um die Ausbeute zu erhöhen?

Termin: 21.01.2013

1. Welche chromatographischen Methoden zur quantitativen Ermittlung der Konzentration eines Bioanalyten kennen Sie? Beschreiben Sie den prinzipiellen Aufbau einer HPLC (inkl. Skizze)
2. Beschreiben Sie die SDS-PA Gelelektrophorese möglichst genau (inkl. Skizze).
3. Wofür dient diese analytische Methode im speziellen und wie lässt sich ein Bioanalyt – welche Klasse ist hier fast ausschließlich gemeint? – damit quantifizieren?
4. Mit welchen Methoden werden Biomarker von der sie umgebenden Matrix (welche kennen Sie?) befreit, um sie möglichst quantitativ (unabhängig von der Methode) nachweisen zu können?
5. beschreiben Sie das Prinzip der PCR im allgemeinen und im speziellen die Methode der real-time PCR. Was wird mit der rtPCR quantitativ ermittelt?
6. Geben Sie die prinzipielle Struktur eines IgG-Moleküls an und beschreiben Sie dessen Einsatz in einem typischen Sandwich-ELISA (Skizze plus Methode)

Termin: 09.11.2012

1. Definieren sie die Begriffe Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate möglichst genau und illustrieren sie diese anhand eines Beispiel-Chromatogramms mit 3 Peaks
2. Was versteht man unter einer Eichgeraden, wie wird sie erstellt und wie wird eine unbekannte Probe daran gemessen (Bsp: Absorption)
3. Mit welchen biophysikalischen Methoden und unter Zuhilfenahme welcher Konditionen lässt sich die Entfaltung von Proteinen verfolgen? Beschreiben Sie zumindest zwei Methoden möglichst ausführlich
4. Beschreiben sie den molekularen Hintergrund einer Biomatrix hinsichtlich der Bestimmung einer Protein-Biomarkers möglichst ausführlich. Wie können sie den Hintergrund im Falle von Serum reduzieren?
5. Beschreiben sie ganz allgemein die Schritte einer Proteinfermentation ausgehend von einem Expressionsplasmid bis hin zur Protein-Konzentrationsermittlung des gereinigten Produkts

Termin: 25.07.2012

1. Was versteht man unter einem Western Blot, wofür wird er eingesetzt und was sind die wesentlichen experimentellen Schritte dabei? Skizzieren Sie die Grundstruktur eines IgG-Antikörpers und erklären Sie dessen Aufbau!
2. Was bezeichnet man als Biomatrix? Welche Arten des Aufschlusses von Zellen und Geweben kennen Sie? Wie muss der Bioanalyt vorliegen, damit man ihn quantifizieren kann?
3. Mit welchen biophysikalischen Methoden lassen sich die Affinität ( $K_d$ -Wert) von Protein-Ligand Interaktionen ermitteln? Beschreiben Sie zumindest zwei Methoden möglichst ausführlich!
4. Was versteht man unter Protein-Entfaltung und Rückfaltung? Wie können diese Prozesse im Labor induziert und charakterisiert werden?
5. Beschreiben Sie eine Proteinfermentation in Shake Flask-Bakterienkulturen beginnend mit der Ausplattierung von transformierten Zellen bis zur Ermittlung der erhaltenen Biomasse!

Termin: Mitte Dezember 2011

1. Erklären Sie die Zusammensetzung und die Bedeutung von bakteriellen Nährmedien (flüssig + fest). Was versteht man unter einer Wachstumskurve und wie wird diese aufgezeichnet?
2. Nennen Sie die wichtigsten flüssig-chromatografischen Kenngrößen. Was bedeutet die Wiederfindungsrate für die Methodenentwicklung eines Analyten?
3. Erklären Sie mind. 2 Methoden zur Proteinanalytik. Warum sind Methoden zur Proteinanalytik in pharm. Sinne wichtig?
4. Erklären Sie das Prinzip und den Aufbau eines ELISA's
5. Beschreiben Sie die Konzentrationsbestimmung eines Analyten mittels Absorptions-Spektroskopie. Was bestimmt bei dieser Methode das obere und untere Detektionslimit?

Termin: 28.10.2011

1. Beschreiben sie Methoden zur Ermittlung der Entfaltung von Proteinen. Welche experimentellen Faktoren bestimmen die korrekte Faltung?
2. Wie beeinflussen bei HPLC's die Säulenlänge, der Säulendurchmesser, die Porengröße, Partikelgröße und der Gegendruck die Trennleistung?
3. Was sind Biomarker und wie würden Sie solche in einer Biomatrix experimentell bestimmen (2 Methoden)?
4. Mit welchen Methoden können sie Interaktion zwischen 2 Molekülen charakterisieren und quantifizieren?
5. Beschreiben sie die rekombinante Herstellung eines Protein-Targetmoleküls in typischen Zellkulturen.

Termin: 30.06.2011 Prof. Kungl

1. Wie ermittelt man die Aktivität von Enzymen und welche speziellen Vorkehrungen müssen getroffen werden für eine Aktivitätsbestimmung im Serum?
2. Was verstehen Sie unter Präzision, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit analytischer Methoden und wie würden Sie diese anhand von HPLC- Experimenten ermitteln?
3. Welche Methoden würden Sie zur Charakterisierung von Target-Ligand Wechselwirkungen heranziehen? Beschreiben Sie mindestens 2 Methoden und geben Sie den entsprechenden Read-Out an
4. Erläutern Sie den Unterschied zwischen in vitro und zellulären Essays anhand der Bioaktivitäts-Bestimmung von Ligand- bzw. Target-Molekülen und geben Sie jeweils ein Beispiel an.
5. Beschreiben Sie die rekombinante Herstellung eines Protein-Target Moleküls in typischen Bakterienmolekülen.

Fragensammlung Prof. Wintersteiger

Termin: 20.09..2010

1. Enzyme
  - a.) Einteilung
  - b.) Enzymkinetik: Parameter
  - c.) Gleichung nach Michaelis Menten + Lineweaver Burk Diagramm
  - d.) Enzymhemmung (Arten, Charakterisierung)
2. EIA (Enzym Immuno Assay)
  - a.) Prinzip, Vorgehensweise
  - b.) Verknüpfung von AST an Protein (Carbodiimid, ....)
  - c.) Rkt. von G-6-PDH
  - d.) Weitere Enzym zur Markierung
3. Metabolismus
  - a.) Metabolismus von Phenazon
  - b.) Konjugationsprozesse
4. Bioverfügbarkeit
  - a.) Definition + Arten
  - b.) Parameter
  - c.) Bestimmung
5. Proteine
  - a.) Funktion und Stickstoffbilanz (Bedarf, Folgen)
  - b.) Quantitative Bestimmungen

Termin: 25.06..2009

1.
  - a) Kompartimente des Körpers
  - b) Wege des AST bei peroraler Applikation
2.
  - a) Prinzip und Vorgehensweise FIA
  - b) Möglichkeiten einen AST an ein Protein zu binden
3.
  - a) Fluorimetrische Bestimmung von AS
  - b) Essentielle AS + Formel
4. Parameter in der Analytik
5. Pestizide: Einteilung nach Art der Schädlingsbekämpfung
6.
  - a) Oxidationen bei Metabolismus
  - b) Met. von Hexobarbital

Termin 15. Mai 2008

1. Proteine

- a) Edmann Abbau und quantitative Bestimmungsmöglichkeiten
- b) Funktionen von Proteinen und Stickstoffbilanz ( Definition, Folgen, Ursachen)
- 2. RIA**
  - a) Allgemeines + Durchführung
  - b) Verknüpfung eines Arzneistoffes mit einem Protein
- 3. TDM**
  - a) Bedeutung
  - b) Wann wird es eingesetzt
- 4. Metabolismus**
  - a) Oxidation
  - b) Met. von Hexobarbital
- 5. SPE**
  - a) Allgemein
  - b) Stationäre Phasen
- 6. Nucleinsäuren**
- 7. Radiometrische Analyse**
  - a) Szintillationszähler
  - b) Maßeinheiten

Termin 1. April 2008

- 1. Elektrophorese**
  - a) Prinzip
  - b) Disc-Elektrophorese, Isoelektrische Fokussierung
- 2. TDM (Therapeutic Drug Monitoring)**
  - a) Allgemein
  - b) Wofür verwendet
- 3. FIA**
  - a) Prinzip, Vorgehensweise
  - b) Möglichkeiten der Proteinbindungen (Carbodiimid, ... + chem. Abwandlung)
- 4. Biotransformation**
  - a) Oxidationen
  - b) Metabolismus von Phenazon
- 5. Aminosäuren**
  - a) Fluorimetrische Bestimmung
  - b) Essentielle AS (mit Formeln)
- 6. Parameter in der Analytik**
- 7. Proteine**
  - a) Eigenschaften
  - b) Qual. Bestimmung und Edmann-Abbau

Termin: 24. Mai 2007

- 1. Aminosäuren**
  - a) Fluorimetrische Bestimmungen
  - b) Essentielle Aminosäuren (Formel)
- 2. RIA**
  - a) Prinzip und Durchführung
  - b) Methoden der Proteinbindung (Carbodiimid...)
- 3. TDM**
  - a) Allgemein
  - b) Wann wird TDM gemacht
- 4. SPE**
  - a) Prinzip, Durchführung
  - b) Beispiele für stationäre Phasen
- 5. Biotransformation, Metabolismus**
  - a) Vorgehensweise bei der Bestimmung (Harn)
  - b) Biotransformation von Hexobarbital, inkl. Nachweis der Metabolite
- 6. a) Stationen bei peroralen Applikation**
  - a) Kompartimente des Körpers
  - b) PH-Werte GI-Trakt
- 1. EIA:**
  - a) EMIT: Prinzip und Vorgangsweise
  - b) Möglichkeiten einen Arzneistoff an ein Protein zu binden (Carbodiimid-Methode...)
- 2. Aminosäuren:**
  - a) essentielle AS mit Formeln
  - b) Fluorimetrische Bestimmung
  - c) Gewinnung und Reindarstellung (Razemat-Trennung)
- 3. Standard Parameter in der pharm. Analytik (Wiederfindungsrate...)**
- 4. Szintillatoren: Flüssig und Fest erklären Einheiten für radioaktive Strahlung**
- 5. Proteine:**
  - a) Edmann-Abbau

b) Quantitative Bestimmung  
6. Konjugationsreaktionen  
Biotransformation von Morphin