



Im Biochemischen Praktikum für Fortgeschrittene werden Versuche durchgeführt, die der Erarbeitung wissenschaftlicher Arbeitsmethoden, der analytischen und der präparativen Biochemie, sowie der Molekularbiologie dienen. Die bearbeitete Thematik erstreckt sich über die gesamte Biochemie und beinhaltet sowohl grundlegende biochemische Versuche als auch in Forschungslabors zur Zeit angewandte Techniken. Ein Themenkatalog beschreibt die von jedem Praktikanten durchzuführenden Versuche (Änderungen vorbehalten).

Ein Ziel des Praktikums ist es, die Studierenden zum selbständigen Arbeiten inklusive Zeit- und Versuchsplanung zu führen und ihnen die Auswertung von Daten anhand problemorientierten Versuchen zu vermitteln. Im zweiten Teil kommt dann vertiefend die Auseinandersetzung mit themenspezifischer Literatur hinzu.

Das Praktikum wird in den Kurslabors L15 und L16 des vorklinischen Lehrgebäudes der MHH (Gebäude I2) durchgeführt und findet grundsätzlich nur in der Vorlesungszeit statt. Die Anmeldung zum Praktikum erfolgt bei Dr. Meyer (Tel.: 532-3977, meyer.gustav@mh-hannover.de) in den Praktikumsräumen im Gebäude I2. Die Koordination und wissenschaftliche Betreuung in den Kurslabors obliegt Herrn Dr. Meyer, die technische und praktische Betreuung Frau Hakim (Tel.: 532-2980).

Durchführung der Versuche

In der Regel arbeiten zwei Studierende an einer Aufgabenstellung und fertigen ein gemeinsames Gruppenprotokoll an. Dazu händigt der wissenschaftliche Betreuer zunächst den Praktikanten Arbeitsunterlagen für den jeweiligen Versuch mit einem Literaturverzeichnis aus. Nach dem Studium der Vorschrift und der wichtigsten Literatur findet beim Betreuer eine **Vorbesprechung** zum Versuch statt. Sie dient zum einen der Beantwortung von Fragen seitens der Praktikanten, zum anderen soll festgestellt werden, ob die Praktikanten sich ausreichend auf den Versuch vorbereitet haben (Fließschema zum geplanten Arbeitsablauf muss vorliegen). Es folgt die praktische Vorbereitung und die **Durchführung des Versuchs**,

zu dem sorgfältiges Protokollieren erwartet wird. Für Fragen zur praktischen Versuchsdurchführung steht der technische Betreuer zur Verfügung, für wissenschaftliche Fragen muss entsprechend der wissenschaftliche Betreuer angesprochen werden.

Nach dem Vorlegen der Versuchsergebnisse entscheidet der wissenschaftliche Betreuer, ob der Versuch beendet werden kann. Wenn dies der Fall ist, kann das **Versuchsprotokoll** angefertigt werden.

Das zu jedem Versuch anzufertigende Protokoll soll enthalten:

- Name, Datum, Titel des Versuchs
- Problemstellung mit kurzer theoretischer Grundlage
- Versuchsergebnisse und Diskussion (Arbeitspläne zur Versuchsdurchführung, Fließschema, Messergebnisse tabellarisch und in graphischer Darstellung)
- Zusammenfassung
- Verzeichnis der verwendeten Literatur
- Anlage: Originalmessstreifen

Abschließend wird mit dem wissenschaftlichen Betreuer über die praktische Durchführung, die Ergebnisse und die theoretischen Grundlagen ein **Kolloquium** durchgeführt. Hierbei muss das Protokoll vollständig vorliegen und daher rechtzeitig vorher abgegeben worden sein. Der nächste Versuch kann in der Regel erst nach erfolgreich absolviertem Kolloquium des vorherigen Versuchs ausgegeben werden.

Themen der Versuche

Proteine / Enzyme

Eigenschaften und Behandlung von Enzymen und Coenzymen, Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration, Einfluss von Inhibitoren auf charakteristische Größen der Enzymkinetik, Arten der Enzymhemmung, Darstellung von enzymkinetischen Messungen, enzymatische Bestimmung von Substrat-konzentrationen, Methoden der Proteinbestimmung, fluorimetrische und photometrische Erfassung von Proteaseaktivität, Verwendung und Spezifität von Proteaseinhibitoren.

Enzymisolierung

Isolierung und partielle Charakterisierung eines aktiven Proteins aus biologischem Material, Aufschluss des tierischen oder pflanzlichen Materials, Anreicherung durch fraktionierte Ammoniumsulfat- und/oder Lösungsmittelfällung, Reinigung nach Entsalzung (Dialyse oder Membranfiltration) durch Ionenaustausch-, Gel- oder Affinitätschromatographie, SH-Gruppen-Bestimmung, Untersuchung auf Fremdaktivitäten, Erstellung von Übersichten über Anreicherung / Aufreinigung.

Proteinanalytik

Reinheitsprüfung durch Polyacrylamidgelelektrophorese, Proteinfärbungen (CBB, Silber), Western-Blotting mit unspezifischer Proteinfärbung und immunologischer Proteindetektion, chemischer und enzymatischer Proteinabbau, dünnschicht-chromatographische Erfassung von Aminosäuren und fluoreszenzmarkierter Aminosäuren, Erfassung N- terminaler Aminosäuren und der Spaltspezifität proteolytischer Enzyme, Markierung von Gesamtproteinen.

Blue-White Screening

Molekularbiologische Proteinanalytik, Kultur von Prokaryonten, Herstellung Ca- und elektrokompetenter Bakterien, Isolierung genomischer DNA aus Hefe (*Saccharo-myces cerevisiae*), Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA, Polymerase-kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primern, Vorbereitung Vektoren, Ligation, Transformation, Plasmidpräparation, Restriktionsendonukleaseverdau, Agarose-gelelektrophorese, Sequenzierung, angewandte Bioinformatik.

Zellfraktionierung

Gewebeaufschluss, Differential- und Dichtegradientenzentrifugation zur Darstellung und Anreicherung von Zellorganellen, Charakterisierung der subzellulären Fraktionen durch die Aktivität von Leitenzymen bzw. Vorkommen anderer Leitstoffe, subzelluläre Protein- und DNA-Verteilung, Extraktion von Neutral- und Phospholipiden, chromatographische Analyse der Lipidfraktionen.

Glykolyse im zellfreien Hefeextrakt

Herstellung eines partikelfreien Hefeextraktes, Messung des Glykolyseumsatzes durch Bestimmung stationärer Zwischenstoffkonzentrationen, Nachweis von Enzymaktivitäten bzw. des Vorhandenseins der genetischen Voraussetzungen zur Enzymexpression mittels PCR, DNA-Isolierung, Wirkung von Hemmstoffen der Glykolyse, Regulation biologischer Systeme.

Zellkultur

Anzucht (Auftauen, Passagieren, Einfrieren) von eukaryontischen Zellen, Zelldichte-Bestimmung, Viabilitätstest, Mycoplasmentests, ELISA, Untersuchungen zur Immunfluoreszenz. RNA-Isolierung aus eukaryontischen Zellen, denaturierende Agarose-gelelektrophorese, Northern Blotting, Hybridisierung, RT-PCR, qRT-PCR, Transfektion von Zellen, organellspezifische Proteinlokalisierung.