



RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

Fakultät für Chemie und Biochemie

Titel der Lehrinheit (LE) Modulpraktika Biochemie der Schwerpunkte

Bezeichnung der LE VV Nr. 185730/
185731 LE-Kreditpunkte 4

Fachsemester 7 Dauer

Semester	SWS
2 Wochen	5,25

Dozenten I. Dietzel-Meyer
Prüfer I. Dietzel-Meyer, N.N.

Studiengänge

Pflicht-LE für: M. Sc. in Biochemie
Freiwillige LE für:

Zielsetzungen
Absolventen dieses Praktikums sollen die Grundlagen der Herstellung und Pflege von primären Zellkulturen beherrschen. Ferner sollen sie in der Lage sein, kleine Mengen von $^3\text{[H]}$ -markierten Substanzen sicher zu handhaben sowie Scatchard-Plots durchzuführen und auszuwerten. Thematisch sollen sie den aktuellen Stand der Literatur zum Einfluss des Schilddrüsenhormons 3,3'-Triiodo-L-Thyronin (T3) auf die $^3\text{[H]}$ -Ouabain-Bindung im Gehirn erarbeitet haben.

Themenverzeichnis
Struktur, Funktion und Regulation der Na^+/K^+ -ATPase in Muskel- und Nervenzellen, Wirkungen des Schilddrüsenhormons T3, Quantifizierung von $^3\text{[H]}$ durch Szintillationsmessungen, Scatchard-Plot, Zellkulturen, immunzytochemische Markierung von Nerven- und Gliazellen und der Einfluss verschiedener Zellkulturmedien auf das Überleben unterschiedlicher Zellarten

Lehrmethoden:

Praktikum	2 Wochen ganztägig
Seminar	4 x 3 Stunden

Überprüfung des Lernfortschritts

Aktive Teilnahme am Seminar; Bearbeitung der Praktikumsaufgaben

Leistungskontrolle

Versuchsdurchführung und Protokoll zu den Versuchen (je 50%)

Zusammenfassung der Lehrgegenstände

Thematik/ Seminarthemen:

Der Einfluss des Schilddrüsenhormons 3, 3', 5- Triiod-L-thyronin (T3) auf die Expression von $^3\text{[H]}$ -Ouabain-Bindungsstellen als Marker für Na^+/K^+ -ATPasen in kultivierten Nervenzellen, die verschiedenen Untereinheiten der Na^+/K^+ -ATPase und ihre Affinität zu dem kardiotonischen Steroid Ouabain, Wirkungen des Schilddrüsenhormons 3, 3', 5 – Triiod-L-Thyronin auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems, Scatchard-Plot, Quantitativer Nachweis von $^3\text{[H]}$, spezifische und unspezifische Bindung, Szintillationsmessungen, dpm- Bestimmungen, Wischproben

Fragestellungen:

Expriemieren Nerven- oder Gliazellen mehr $^3\text{[H]}$ -Ouabainbindungsstellen?
Hat T3 einen Einfluss auf die Expression dieser Bindungsstellen?
Führt ein vergrößerter Na^+ -Einstrom zu einer Zunahme der $^3\text{[H]}$ -Ouabainbindungsstellen ?
Spielt das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Präparation bzw. die Länge der Kulturdauer eine Rolle?
Welche weiteren Substanzen regulieren $^3\text{[H]}$ -Ouabainbindungsstellen, bzw. Na^+/K^+ -ATPasen?

Methoden:

Herstellung von Zellkulturen aus den Gehirnen von 1-5 Tage alten postnatalen Ratten. Anreicherung von Neuronen oder Gliazellen durch verschiedene Beschichtungen (Poly-L-Lysin- oder mit Astrozyten- beschichteten Schalen) und Kulturmedien (z. B. mit und ohne foetalem Kälberserum)

Immunzytochemische Kontrolle der Zusammensetzung der Zellen in der Kultur mit spezifischen Antikörpern gegen $\beta 3$ (für Nervenzellen) und GFAP (für Astrozyten), sowie Quantifizierung aller Zellen über DAPI-Färbung.

Bestimmung der spezifisch gebundenen $^3\text{[H]}$ - Ouabain –Menge normiert auf die Proteinmenge (Lowry-Verfahren) bzw. die Zellzahl von den lysierten Kulturen. Untersuchung verschiedener Faktoren auf die Anzahl der $^3\text{[H]}$ -Ouabainbindungsstellen pro mg Protein bzw. pro Nerven- oder Gliazelle.

Bestimmung des Einflusses von T3 auf K_D und B_{max} mit Hilfe eines Scatchard Plots.