

# **Praktikumsbericht**

**08.09.2009 - 02.10.2009**

**Psychiatrische und Psychotherapeutische Klinik am  
Universitätsklinikum Erlangen  
AG Kornhuber – Molekulare Neurobiologie**

**Ilia Kats**

## Einleitung

Dieser Bericht soll meine Erfahrungen und Ergebnisse während meines Praktikums am Universitätsklinikum Erlangen wiedergeben.

Bis Sommer 2009 besuchte ich das Lessing-Gymnasium Karlsruhe, wo ich mein Abitur ablegte. Ich nahm 2007-2009 an der deutschen Auswahl zur Internationalen Biologieolympiade teil und erreichte 2009 international eine Silbermedaille.

Das Universitätsklinikum Erlangen unterhält derzeit 45 Abteilungen<sup>[1]</sup>. Mein Praktikum fand in der Psychiatrischen und Psychotherapeutischen Klinik statt. Die Arbeitsgruppe Kornhuber beschäftigt sich hauptsächlich mit der Rolle der sauren Sphingomyelinase bei der Entstehung und Behandlung der Depression<sup>[2]</sup>.

Der Teil des Projekts, an dem ich hauptsächlich mitgearbeitet habe, befasst sich mit der Optimierung der Reaktionsbedingungen der sauren sowie neutralen Sphingomyelinase und Ceramidase, um bei Untersuchungen der Enzymaktivität von Patienten und/oder Probanden optimale und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

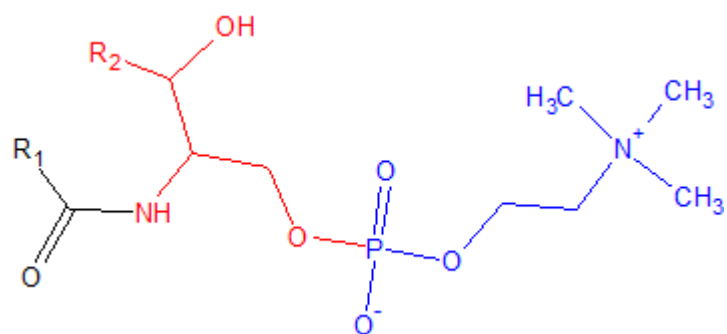
## Projektinformationen

Die Untersuchung der Sphingomyelinase ist der Zellbiologie zuzuordnen, da diese eine wichtige Rolle in den Stoffwechselwegen der Zelle spielt.

Die Zellmembran einer Zelle besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht. Phospholipide sind amphipatisch, d.h. sie sind sowohl hydrophil (der „Kopf“ mit einem durch eine Esterbindung gebundenem Phosphat) als auch hydrophob (der Schwanz aus Fettsäuren)<sup>[3]</sup>. Solche Moleküle ordnen sich in einem wässrigen Milieu immer so an, dass ihr hydrophober Teil nicht mit dem Wasser in Berührung kommt. Daher ist die Oberfläche der Zellmembran hydrophil, während das innere hydrophob ist. Die Synthese der Phospholipide geschieht in zwei Schritten. Zunächst werden die Fettsäuren im Cytoplasma synthetisiert, indem die Fettsäuresynthase an Acetyl-CoA Malonyl-CoA anhängt, welches von der Acetyl-CoA-Carboxylase gebildet wird<sup>[4]</sup>. Die Fettsäuren werden dann an der Außenmembran des Endoplasmatischen Reticulums durch das membrangebundene Enzym Acyltransferase mit Glycerin-3-phosphat verknüpft, sodass ein Phospholipid entsteht.

Sphingomyeline sind die häufigsten Vertreter der Klasse der Sphingolipide und machen einen großen Teil der Zellmembran aus<sup>[5]</sup>. Sphingomyelin wird von der Sphingomyelinase abgebaut, wobei

Ceramid sowie Phosphocholin frei werden<sup>[6]</sup>. Die Familie der Sphingomyelinase wird nach ihrem pH-Optimum, Kationenabhängigkeit und Vorkommen in der Zelle in 5 Gruppen gegliedert. Ceramid ist ein wichtiges Signalmolekül, welches an der Proliferation, Stressreaktion und Apoptose beteiligt



**Abb.1)** Sphingomyelin. rot: Sphingosin; schwarz: Fettsäure; blau: Phosphocholin.

ist<sup>[7]</sup>. Es wird seinerseits von der Ceramidase zu Sphingosin und der jeweiligen Fettsäure abgebaut. Auch die Ceramidase-Familie wird je nach pH-Optimum in drei Gruppen unterteilt<sup>[8]</sup>. Eine stark erhöhte saure-Sphingomyelinase-Aktivität wurde in Blutzellen von Depressiven festgestellt<sup>[9]</sup>. Sie ging nach Zugabe von Antidepressiva zurück. Ebenso stimuliert Ethanol in Astrozyten die Sphingomyelinase-Aktivität, was zu einer Ansammlung von Ceramid und daraus folgendem Zelltod führt<sup>[10]</sup>. Die hier beschriebenen Untersuchungen befassen sich mit der sauren Sphingomyelinase (pH-Optimum 5,5; Abk. aSMase), welche in Lysosomen ihren Dienst verrichtet, sowie der sauren (pH-Optimum 5,5; Abk. aCDase) und neutralen (pH-Optimum 7,0; Abk. nCDase) Ceramidase.

## **Material und Methoden**

Die verwendeten Methoden umfassen das Erstellen eines Enzymaktivitätstests, welcher die Aufreinigung von Lipiden und deren Trennung mittels Dünnschichtchromatographie (TLC - engl. Thin Layer Chromatography) beinhaltet sowie das Passagieren von Zellen und deren Transfektion mit Hilfe von  $\text{CaCl}_2$ . Auf die PCR-Experimente mit anschließender RFLP-Analyse sowie Western Blots wird im Folgenden nicht näher eingegangen, da die entsprechenden Versuche zu anderen Projekten gehören, an denen ich mich beteiligen durfte.

### ***Bestimmung der Enzymaktivität***

Um die Enzymaktivität zu bestimmen, wird eine *in-vitro*-Reaktion angesetzt. Dabei wird die Probe, in meinem Fall Zelllysat, die das gewünschte Enzym enthält, in Puffer mit dem jeweiligen pH-Wert gegeben, wobei die genaue Zusammensetzung variiert, um die besten Reaktionsbedingungen herauszufinden. Der Standardpuffer, von dem aus die Variationen ausgehen, setzt sich für die Ceramidase aus 0,2M Natriumacetat (pH 5,5 für die saure und 7,0 für die neutrale); 0,1M NaCl und 0,1% NP40 zusammen. Es wird mit dest. Wasser aufgefüllt. Der Standardpuffer für die sezernierte saure Sphingomyelinase enthält 0,2M Natriumacetat mit pH 5,0; 0,5M NaCl; 0,2% NP40 sowie 500 $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ . Wieder wird mit dest. Wasser aufgefüllt. Der Standard, sofern nicht variiert, sieht eine Zugabe von 3 $\mu\text{l}$  Probe (Zelllysat) und 5 $\mu\text{l}$  auf 1:50 verdünntes Substrat auf 100 $\mu\text{l}$  Puffer vor. Als Substrat wird NBD-markiertes Ceramid für die Ceramidase bzw. BODIPY-markiertes Sphingomyelin für die Sphingomyelinase verwendet. NBD und BODIPY sind Fluoreszenzfarbstoffe, die bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 488nm ein Lichtsignal abgeben. Der Farbstoff wird im Laufe der Reaktion nicht abgespalten, sondern verbleibt mit bei der Hydrolyse des Sphingomyelins an dem entstehenden Ceramid, bei der Spaltung des Ceramids mit der Fettsäure verbunden, wodurch eine Quantifizierung der Reaktionsprodukte möglich ist.

Die Reaktionsansätze werden nach kurzem Vortexen mit darauf folgendem Zentrifugieren und nochmaligem vorsichtigen Vortexen, um die Chemikalien von den Wänden des Reaktionsgefäßes am Boden zu sammeln und zu durchmischen, in einen Brutschrank gestellt, wo sie einige Stunden verbleiben. Um die Lipide, die uns interessieren, von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen und eine Erschwerung der Auswertung zu verhindern, wird die Reaktion nach der Inkubation aufgereinigt, indem 250 $\mu\text{l}$  Chloroform-Methanol 1:2 hinzugegeben werden und das Reaktionsgefäß ge-

vortex und zentrifugiert wird. In der unteren, lipophilen Phase befinden sich die interessierenden Lipide. Die obere Phase wird verworfen, die untere in ein Eppendorf-Gefäß mit Löchern im Deckel gefüllt und in der RVC 2-18-Zentrifuge mit angeschlossener Vakuumpumpe und Christ Loc-1m alpha 1-4 (dieser Aufbau wird im Folgenden als SpeedVac bezeichnet) bei 42°C einrotiert, um das Lösungsmittel zu entfernen und die Lipide zukonzentrieren. Das Pellet wird in 2µl Chloroform-Methanol 1:2 gelöst und auf eine TLC-Platte aufgetragen. Bei allen Versuchen wurden Kieselgelplatten mit einer Schichtdicke von 0,2 mm verwendet. Das Laufmittel war Chloroform:Methanol;25%-Ammoniumhydroxidlösung 90:20:0,5 für die Trennung von Ceramid und Fettsäure bzw. Chloroform-Methanol (80:20) für die Trennung von Sphingomyelin und Ceramid.

Die TLCs werden mit dem GE Healthcare Typhoon Trio eingescannt und mit der Software Quantity One quantifiziert. Von den Werten wird das Hintergrundrauschen abgezogen, welches in Quantity One aus einem leeren TLC-Bereich gewonnen wird. Aus dem Verhältnis von Edukt zu Produkt lässt sich die Umsatzrate berechnen.

### ***Bestimmung der Proteinkonzentration***

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wird der Nachweis mittels Bicinchoninsäure durchgeführt. Für die Enzymreaktion wird hierbei ein Puffer mit 0,2M Natriumacetat pH 5,5, 0,1M NaCl und 0,05% Triton X-100 verwendet. Nach Zugabe von Desoxycholat wurde mit H<sub>2</sub>O auf 100µl aufgefüllt. 5µl 1:50 verdünntes Substrat sowie 12µl 1:4 verdünnter Zellysat-Mix werden hinzugegeben, danach wird das Reaktionsgefäß gevortex und 4 Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. In diesem Test wird der Überstand verworfen, das Pellet mit dem entstandenen Niederschlag in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst und die Proteinkonzentration bestimmt. Dafür wird das Sigma BCA1 AND B 9643 Kit verwendet. Die Probe (12,5µl) wird mit 100µl „Working Reagent“ (Mischung der Reagenzien A:B 50:1) versetzt. Als Standard wird Sigma BSA 1mg/ml verwendet, hierbei wird die gewünschte Menge in das Reaktionsgefäß gegeben, mit H<sub>2</sub>O bis 12,5µl aufgefüllt und mit 100µl Working Reagent versetzt. Die Reaktion wird 45 Minuten bei 37°C inkubiert und mit dem BioRad microplate reader benchmark photometrisch bei 550nm Wellenlänge ausgewertet.

### ***Versuche zur sezernierten aSMase im Blutplasma***

Da die AG Kornhuber bei der Aktivitätsuntersuchung von sezernierter aSMase im Blutplasma einen Aktivitätsabfall ab 4µl Plasma bzw. Serum pro 100µl Reaktion festgestellt hat<sup>[unveröffentlichte Daten]</sup>, wird eine inhibitorische Substanz im Plasma vermutet. Um festzustellen, ob es sich dabei um ein Protein oder ein kleines, wasserlösliches Molekül handelt, führte ich eine Versuchsreihe durch. Hierbei wird die Menge des Plasmas variiert, dieses im denaturierten (5 Minuten bei 99°C) und nativen Zustand zusätzlich zum Zellysat (Abk.: cl) ins Reaktionsgefäß gegeben sowie dialysiert und das dialysierte Plasma zusätzlich zum Zellysat hinzugegeben. Die Dialyse findet mit einer Membran mit 12-16 kDa Ausschlussgröße gegen phosphatgepufferte Salzlösung statt, wobei der Puffer drei Mal gewechselt wird. Alle Versuche wurden mit Serum wiederholt, als Kontrolle dienen eine Standardlösung mit 2µl Zellysat ohne Plasma

und Serum, eine Standardlösung mit Zellysat ohne Plasma, Serum und Substrat sowie eine Standardlösung mit Substrat ohne Zellysat, Plasma und Serum. Aufgereinigt wird nach dem selben Protokoll wie oben.

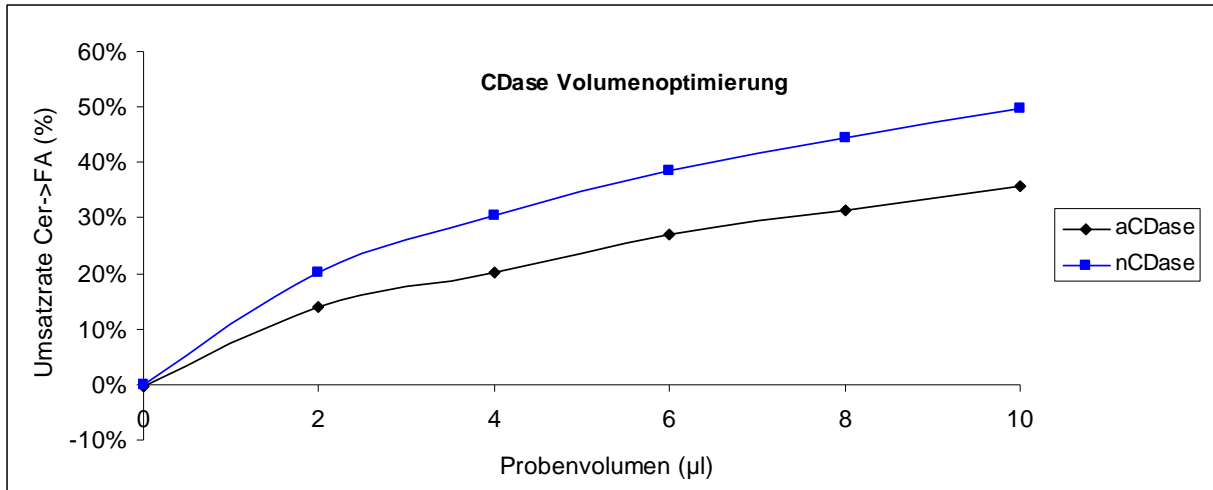
### **Zellversuche**

Um die Expression und Aktivität von rekombinant hergestellten aSMase-Mutanten zu untersuchen, werden Zellen transfiziert, wobei die Transfektionsbedingungen im Hinblick auf pH, Medium etc. optimiert werden müssen. Hierbei werden beim Passagieren von HeLa-Zellen  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well einer 24-Well-Platte zusammen mit 1ml Standardmedium (DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) mit 10% FCS (fötale Kälberserum) und 4mM Glutamin) gegeben und bei 37°C und 8,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am folgenden Tag wird das Medium gewechselt und die Zellen transfiziert. Die Standardparameter für die Transfektion sind 1,0µg DNA, 1,0µl 2,5M CaCl<sub>2</sub>, 8,0µl H<sub>2</sub>O sowie 10,0µl Puffer, für 0,5µg DNA jeweils die Hälfte. DNA, CaCl<sub>2</sub> und Wasser werden in ein Reaktionsgefäß gegeben und gevortext, danach wird die Lösung während des Vortexens tröpfchenweise auf den Puffer gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Lösung wird dann in das Medium, in welchem die Zellen wachsen, gegeben und die Platte in den Brutschrank gestellt. Der Puffer setzt sich zusammen aus 50mM BES, 280mM NaCl, 1,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> sowie H<sub>2</sub>O, der pH wird mit NaOH eingestellt. Für 6-Well-Platten werden 4-8µg DNA pro Well verwendet. Nach einigen Stunden (zelltypabhängig) werden die Zellen mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugegeben. Für die Transfektion wird das GFP-maxi-Plasmid verwendet. Die Zellkulturplatten werden mit dem GE Healthcare Typhoon Trio bei 488nm Wellenlänge eingescannt und mit Quantity One ausgewertet, wobei ein leerer Bereich der Platte als Hintergrund verwendet wird.

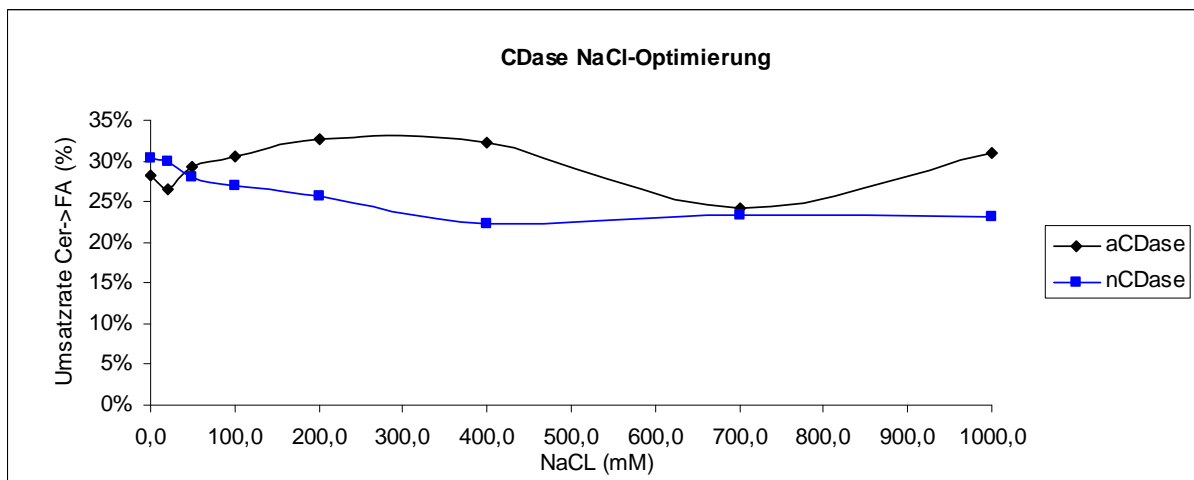
## **Ergebnisse**

### ***CDase-Optimierung***

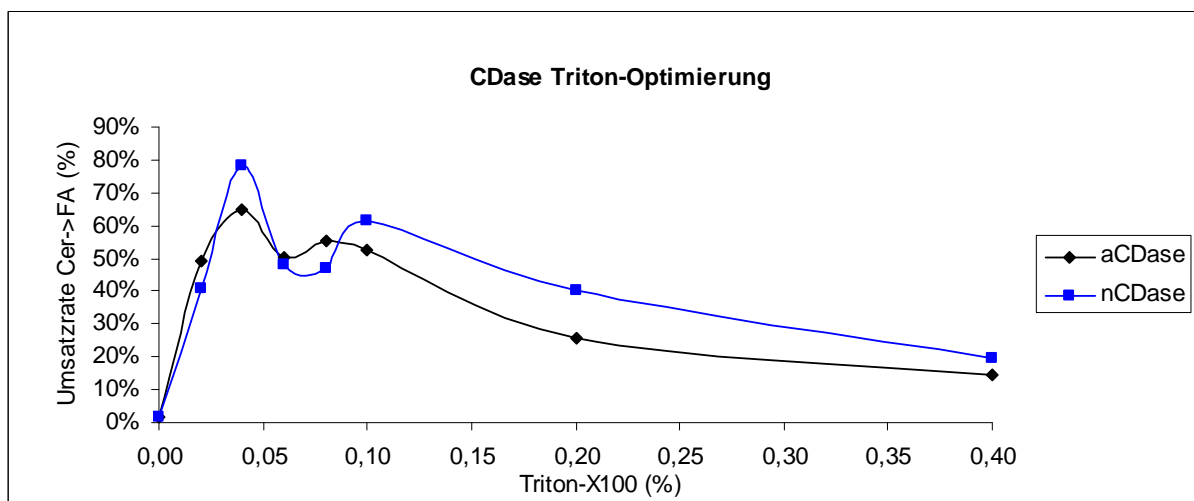
Für die Optimierung der sauren und neutralen Ceramidase wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt, um die optimale NaCl- und Detergentskonzentration zu bestimmen, wobei auch Kombinationen von Detergentien betrachtet wurden, sowie die Abhängigkeit des Umsatzes von der Dauer der Reaktion und der eingesetzten Enzymmenge. Die entsprechenden Versuche wurden, mit wenigen Ausnahmen, zwei Mal, für die saure und die neutrale Ceramidase angesetzt. Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils die Ergebnisse der Optimierungsversuche.



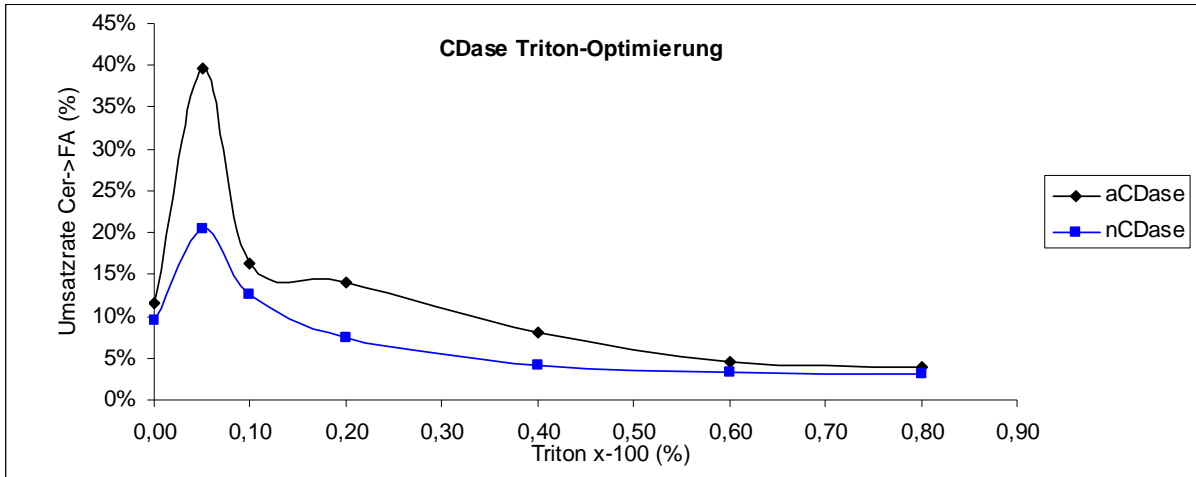
**Abb. 2)** Abhängigkeit des Umsatzes (Enzymaktivität) vom Zellysativolumen (Inkubationszeit: 9,5h; eingesetztes Lysat: AC52 4xkonz.)



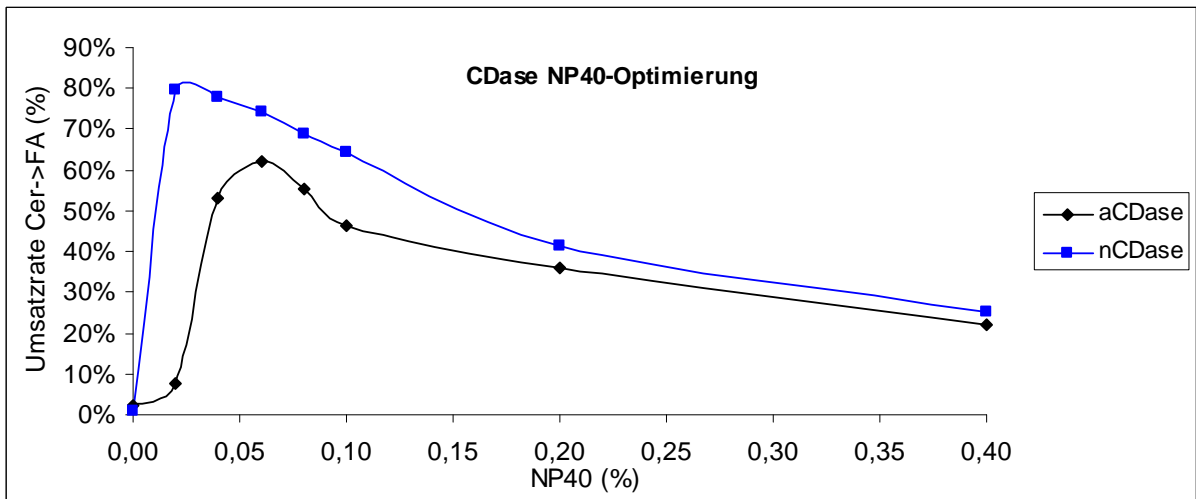
**Abb. 3)** Abhängigkeit des Umsatzes (Enzymaktivität) von der NaCl-Konz. (Inkubationszeit: 9,5h; eingesetztes Lysat: AC52 4xkonz.)



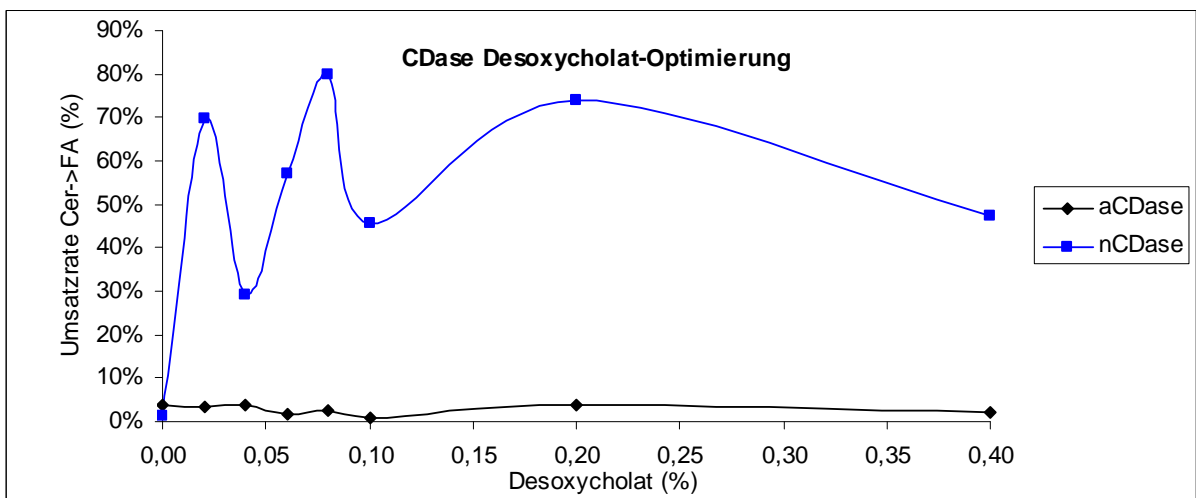
**Abb. 4)** Abhängigkeit des Umsatzes (Enzymaktivität) von der Triton x-100-Konz. (Inkubationszeit: 11,75h; eingesetztes Lysat: AC52 4xkonz.)



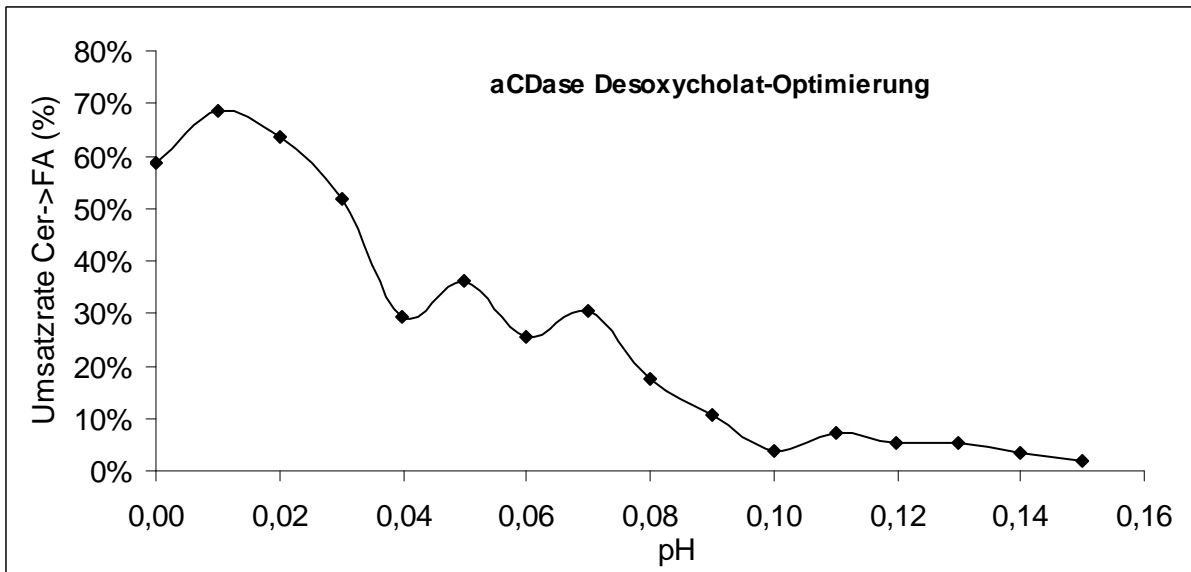
**Abb. 5)** Abhängigkeit des Umsatzes (Enzymaktivität) von der Triton x-100-Konz. (Inkubationszeit: 9,5h; eingesetztes Lysat: AC52 4xkonz.)



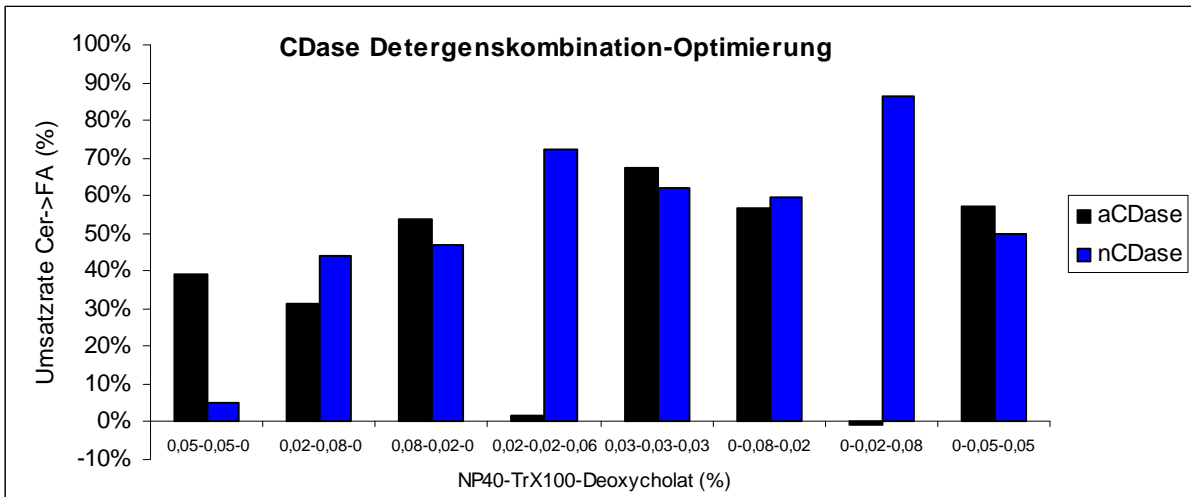
**Abb. 6)** Abhängigkeit des Umsatzes (Enzymaktivität) von der NP40-Konz. (Inkubationszeit: 11,75h; eingesetztes Lysat: AC52 4xkonz.)



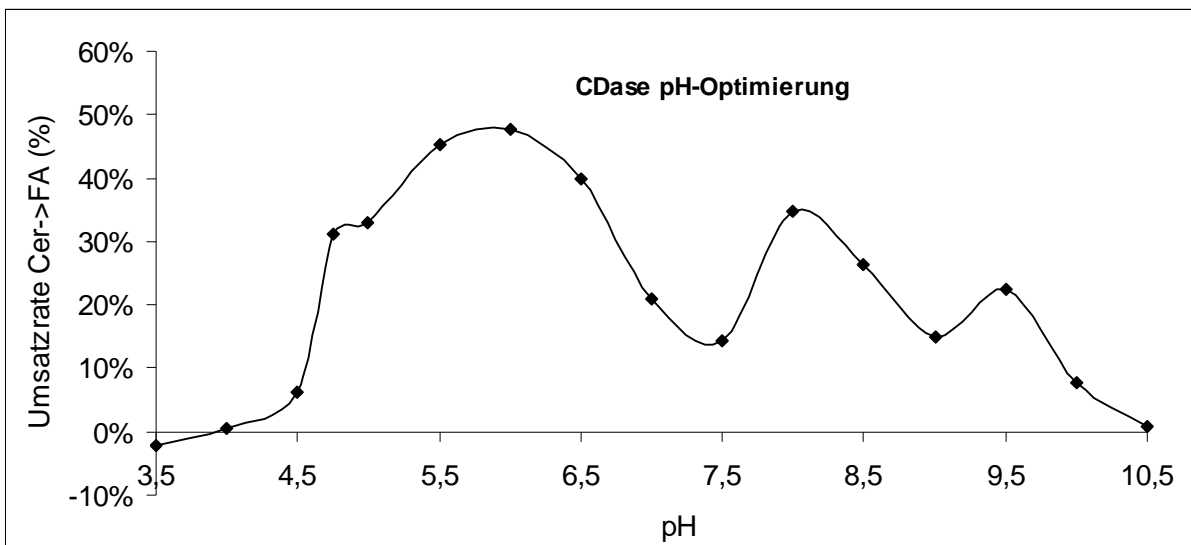
**Abb. 7)** Abhängigkeit des Umsatzes (Enzymaktivität) von der Desoxychololat-Konz. (Inkubationszeit: 11,75h; eingesetztes Lysat: AC52 4xkonz.)



**Abb. 8)** Abhängigkeit des Umsatzes (Enzymaktivität) von der Desoxychololat-Konz. (Inkubationszeit: 22h; eingesetztes Lysat: Mix)

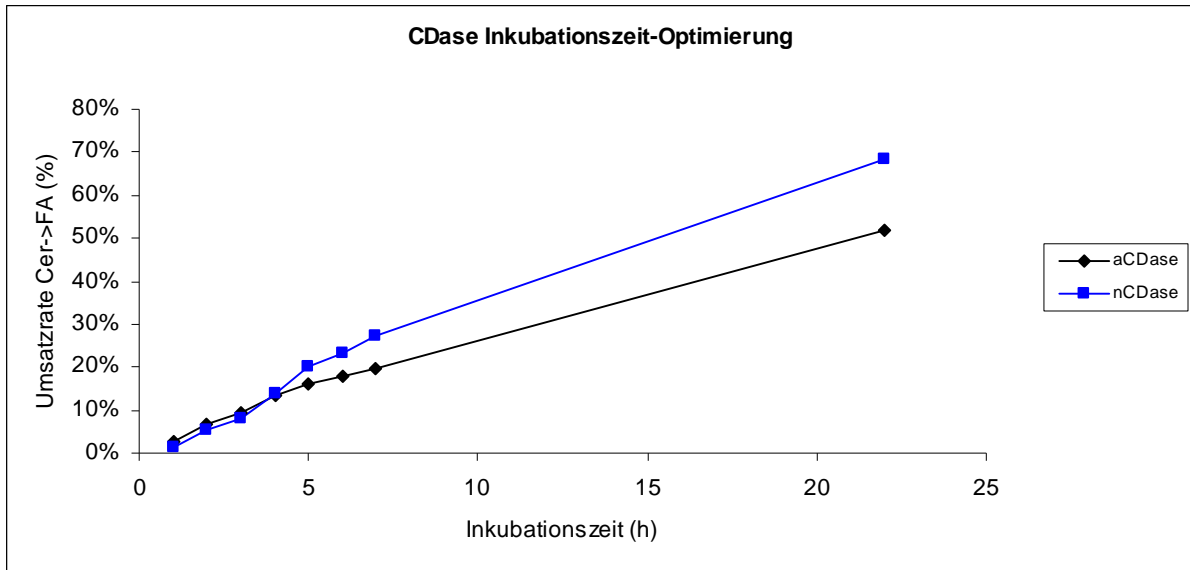


**Abb. 9)** Abhängigkeit des Umsatzes (Enzymaktivität) von der Kombination von Detergenzien (Inkubationszeit: 16h; eingesetztes Lysat: AC52 4x)



**Abb. 10)** Abhängigkeit des Umsatzes (Enzymaktivität) von dem pH. Linkes Optimum: saure CDase, mittleres Optimum: neutrale CDase, rechtes Optimum: alkalische CDase (Inkubationszeit: 9,5h; eingesetztes Lysat: AC52 4xkonz.)





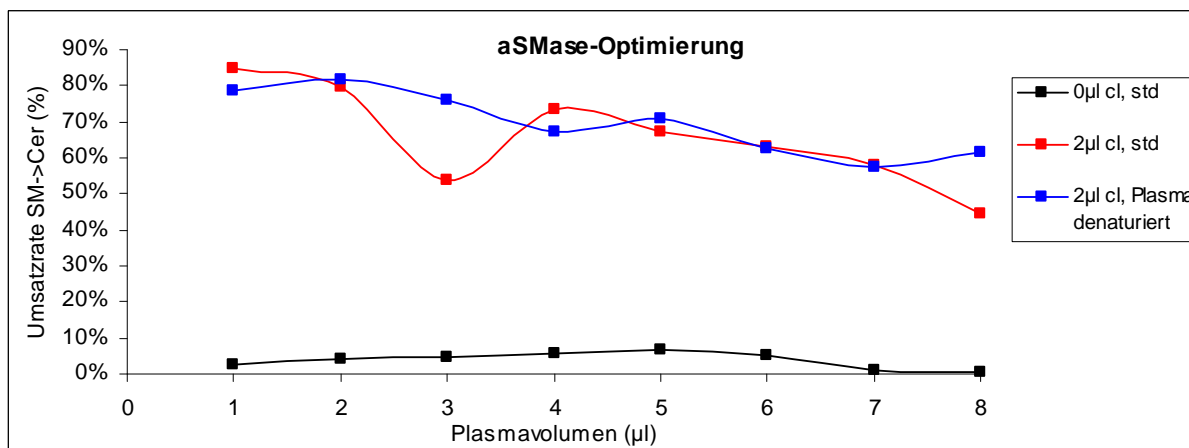
**Abb. 11)** Abhängigkeit des Umsatzes von der Inkubationszeit (eingesetztes Lysat: mix)

Bei Versuchen mit Desoxycholat beobachtete ich einen weißen Niederschlag im Reaktionsgefäß, dessen Menge mit der Desoxycholat-Konzentration zu korrelieren schien. Eine Bestimmung der Proteinkonzentration brachte folgendes Ergebnis.

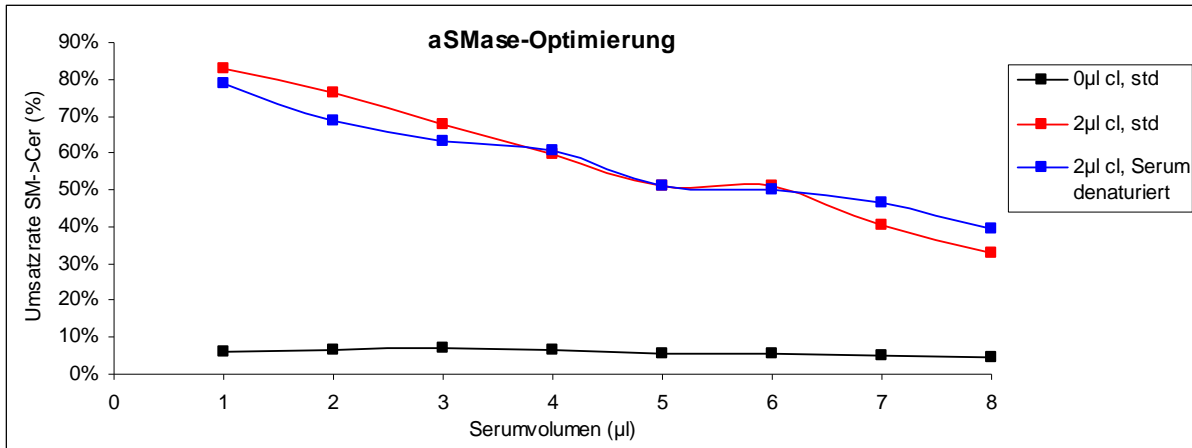
b024	V(μl)	Reaktions- V(μl)	OD			Konz.			xm	cv	Gesamt- Konz. (μg/μl)	sd
			OD1	OD2	OD3	1	2	3				
1 (std)	12,5	12,5	0,081	0,077	0,093	0,036	0,029	0,054	0,040	32,2%	<b>0,040</b>	0,01
2 (std+0,01% Deoxycho- lat)	12,5	12,5	0,158	0,096	0,094	0,154	0,059	0,055	0,089	62,5%	<b>0,089</b>	0,06
3 (std+0,05% Deoxycho- lat)	12,5	12,5	0,189	0,151	0,201	0,201	0,143	0,220	0,188	21,3%	<b>0,188</b>	0,04
4 (std+0,1% Deoxycholat)	12,5	12,5	0,281	0,257	0,286	0,342	0,305	0,350	0,332	7,1%	<b>0,332</b>	0,02

### aSMase-Inhibierung

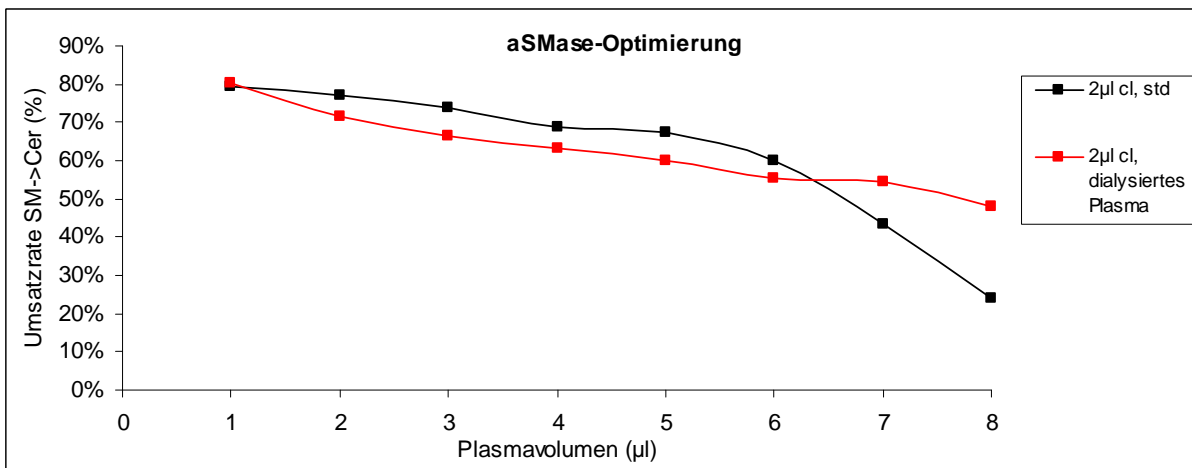
Hier wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, zum Einen um die aSMase-inhibitorische Wirkung eines im Blut enthaltenen Stoffes zu belegen und auf die Beschaffenheit des inhibitorischen Moleküls schließen zu können, zum Anderen um die Größe dieses Moleküls näher einzugrenzen. Beide Versuchsreihen wurden sowohl mit Blutplasma als auch mit Blutserum durchgeführt.



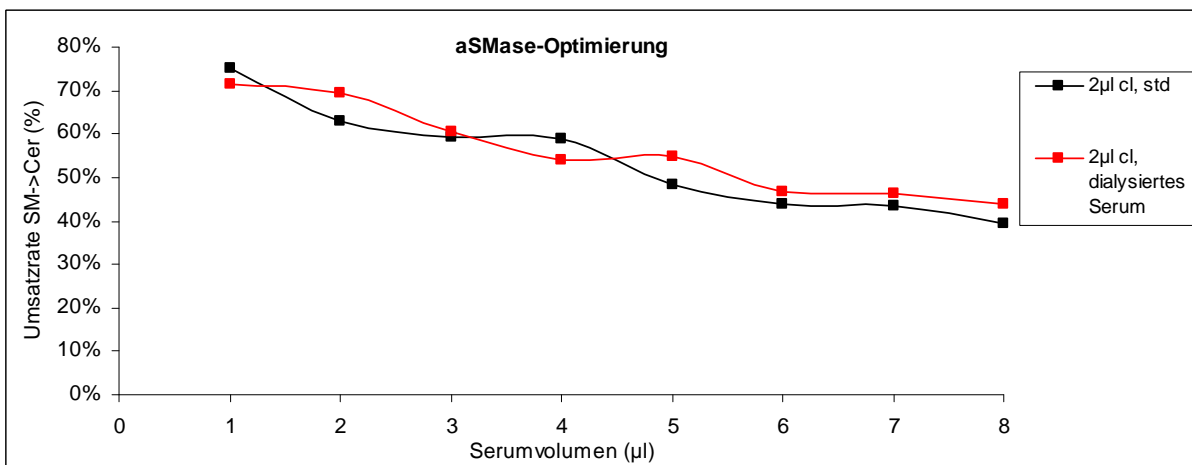
**Abb 12)** Abhängigkeit des Umsatzes (Enzymaktivität) vom Plasmavolumen (Inkubationszeit: 5h; eingesetztes Lysat: mix)



**Abb. 13** Abhängigkeit des Umsatzes (Enzymaktivität) vom Serumvolumen (Inkubationszeit: 5h; eingesetztes Lysat: mix)



**Abb 14** Abhängigkeit des Umsatzes (Enzymaktivität) vom Plasmavolumen (Inkubationszeit: 20h45min; eingesetztes Lysat: mix 1:4)

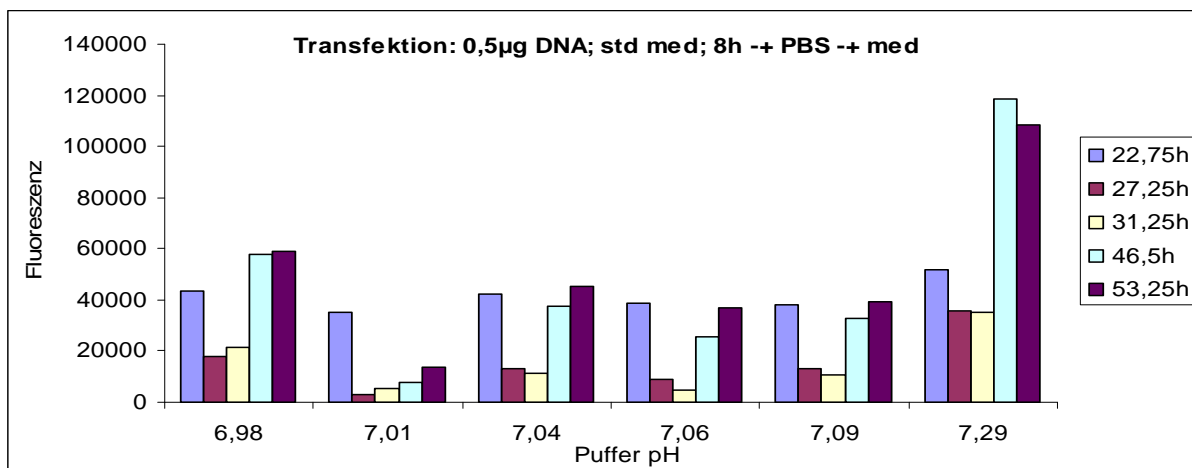


**Abb. 15** Abhängigkeit des Umsatzes (Enzymaktivität) vom Serumvolumen (Inkubationszeit: 20h45min; eingesetztes Lysat: mix 1:4)

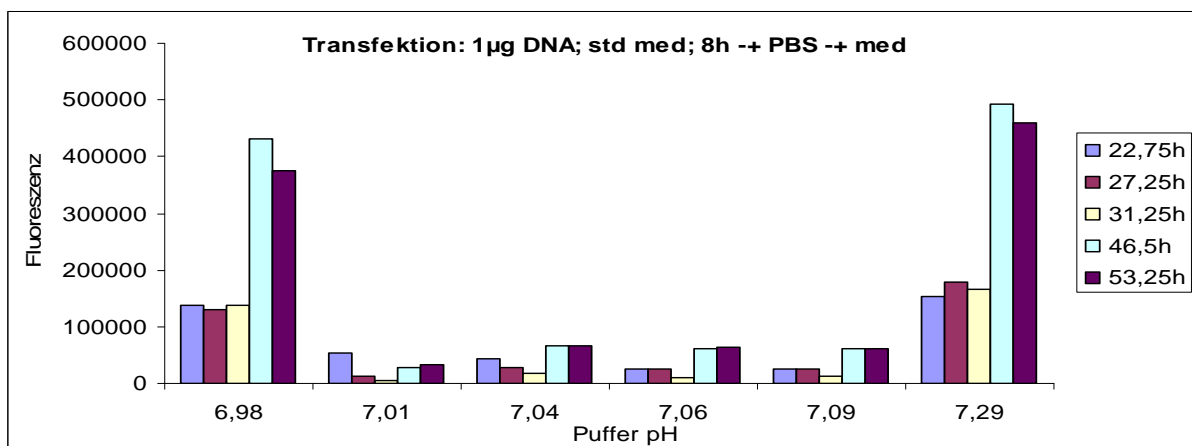
### Transfektionsoptimierung

Hier wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, die erste um den Einfluss des pH-Wertes des verwendeten Puffers auf die Transfektion sowie den optimalen pH-Wert festzustellen, die zweite sollte die Ergebnisse der ersten verifizieren und Aufschluss

über den Einfluss des CO<sub>2</sub>-Gehaltes der die Kulturplatten umgebenden Luft auf den Erfolg der Transfektion geben. Aufgrund nicht verwertbarer Ergebnisse ist die zweite Versuchsreihe im Folgenden nicht dargestellt. Anstatt des aSMase-Gens wird hier GFP verwendet, da dessen Nachweis und Quantifizierung über Fluoreszenz wesentlich leichter zu bewerkstelligen ist als die Extraktion und Aktivitätsmessung der aSMase. Ein weiterer Vorteil ist die Quantifizierung in lebenden Zellen, was Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermöglicht.



**Abb. 16)** Abhängigkeit der Fluoreszenz (Menge an produziertem GFP) vom pH des Puffers und der Zeit, welche seit der Transfektion vergangen ist.



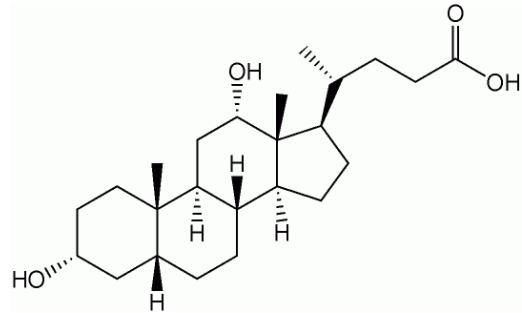
**Abb. 17)** Abhängigkeit der Fluoreszenz vom pH des Puffers und der Zeit, welche seit der Transfektion vergangen ist.

## Diskussion

### CDase-Optimierung

Aus den angeführten Ergebnissen geht hervor, dass der Umsatz direkt mit der Menge an Zelllysat (und damit Enzym) und der Zeit, welche für die Reaktion zur Verfügung steht, korreliert, was auch mit der Theorie übereinstimmt. Somit kann man davon ausgehen, dass es bei den gewählten Reaktionsbedingungen keine weiteren Faktoren, beispielsweise Instabilität und Zerfall des Produkts gibt, welche auf die Versuchsergebnisse Einfluss nehmen. Die NaCl-Konzentration scheint auf die untersuchten Enzyme keinen Einfluss zu haben, während Detergenzien in sehr geringen Konzentrationen die Reaktion verbessern, in höheren Konzentrationen inhibitorisch wirken. Be-

sonders interessant ist in diesem Zusammenhang Desoxycholat, dessen optimale Konzentration für die nCDase bei 0,2% liegt, welches auf die aCDase jedoch ab einer Konzentration von 0,01% inhibitorisch wirkt, was auch durch das nahezu völlige Fehlen eines Reaktionsproduktes bei Kombinationen von Detergenzien mit höheren Desoxycholatkonzentrationen bestätigt wird. Bei allen Versuchen mit aCDase, in welchen Desoxycholat eingesetzt wurde, wurde ein weißer Niederschlag beobachtet, dessen Menge mit der Desoxycholatkonzentration korrelierte. Eine Analyse dieses Niederschlags brachte zu Tage, dass es Proteine sind. Desoxycholat vermindert in saurer Umgebung (pH 5,5) also die Wasserlöslichkeit von aCDase, wenn nicht auch anderen Proteinen. Denkbar wäre z.B. ein dem SDS ähnlicher Mechanismus, bei dem das Desoxycholat die van-der-Waals-Bindungen zwischen unpolaren Aminosäuren löst und so die räumliche Struktur des Proteins beeinflusst. Dies bedarf weiterer Klärung.



**Abb. 18** Desoxycholsäure (Bildquelle: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9f/Deoxycholic\\_acid.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9f/Deoxycholic_acid.png) 02.10.2009)

Zusammenfassend kann man sagen, dass die aCDase ihre höchste Aktivität bei etwa 200 mM NaCl und 0,05% Triton X-100 erzielt, während die nCDase bei 0 mM NaCl und entweder 0,05% Triton X-100, 0,1% NP40 oder 0,2% Desoxycholat am aktivsten ist.

### ***aSMase-Inhibierung***

Die angeführten Ergebnisse bestätigen das Vorhandensein eines inhibitorischen Stoffes im Blutplasma und im Serum und weisen darauf hin, dass dies ein relativ großes (über 16 kDa), durch Hitze nicht bzw. reversibel beeinflusstes Molekül ist. Dies müsste durch weitere Versuche, bei denen Dialysemembranen mit einer größeren Porengröße verwendet oder Plasmaproben auf andere Weise fraktioniert werden, bestätigt werden.

### ***Transfektionsoptimierung***

Die Optimierung des pH-Wertes lieferte widersprüchliche Ergebnisse. Die erste Versuchsreihe weist auf zwei pH-Optima hin, während die zweite, zur Kontrolle dieses Ergebnisses angesetzte Versuchsreihe nur ein pH-Optimum aufweist (hier nicht gezeigt). Eine mögliche Ursache wäre die unterschiedliche Herkunft der verwendeten Puffer, die zwar nach dem selben Protokoll, aber von unterschiedlichen Personen zu unterschiedlichen Zeiten angesetzt wurden. Eine dritte Versuchsreihe zur Verifizierung dieser Hypothese konnte bis Praktikumsende leider nicht ausgewertet werden.

Aus den Ergebnissen geht klar hervor, dass die verwendeten HeLa-Zellen einen CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5,0% bevorzugen. Interessant ist auch das unterschiedliche Optimum an eingesetzter DNA bei 8,5% und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Zellen sich bei 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt schneller teilen und auch das CaCl<sub>2</sub> schneller aufnehmen, welches cytotoxisch wirkt. Da bei der Transfektion mit 1µg DNA die doppelte Menge an CaCl<sub>2</sub> zum Einsatz kommt, tritt hier bereits die Cytotoxizität in Erscheinung.

## **Fazit**

Das Praktikum hat mir einen guten Einblick in die tägliche Arbeit eines Wissenschaftlers gegeben. Insbesondere die Menge an unterschiedlichen Methoden war sehr hilfreich, um einen Überblick über viele der bei der Proteinanalyse benötigten Arbeitsweisen zu erhalten. Es war auch sehr interessant, bei unterschiedlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe unterschiedliche Herangehensweisen an ihre Aufgaben und somit eine extrem unterschiedliche Arbeitsbelastung und Gestresstheit zu beobachten. Das Arbeitsklima war sehr angenehm, Fragen wurden mir von allen Mitarbeitern stets ausführlich beantwortet. Während es anfangs teilweise sehr anstrengend war, die einzelnen Versuche anzusetzen, die benötigten Materialien herauszusuchen und die Ergebnisse auszuwerten, fand ich mich nach einiger Zeit relativ gut im Labor zurecht und konnte die Versuche weitgehend selbstständig planen und durchführen. Insgesamt hat mich das Praktikum in meinem Entschluss, Biologie zu studieren, bestärkt.

Ich möchte abschließend allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die bereitwillig meine Fragen beantworteten und mich über ihre Schulter blicken ließen, sowie dem IBO-Verein, der das Praktikum ermöglicht hat, danken. Besonderer Dank geht an Christiane Mühle, die trotz der zahlreichen Vorträge und Seminare, an denen sie teilnehmen bzw. vorbereiten musste immer die Zeit fand, mit mir die anstehenden Versuche durchzusprechen und auf meine Vorschläge einzugehen.

## **Literatur**

- [1] [http://www.klinikum.uni-erlangen.de/e1768/e1771/index\\_ger.html](http://www.klinikum.uni-erlangen.de/e1768/e1771/index_ger.html) (13.09.2009)
- [2] [http://www.psychiatrie.uk-erlangen.de/forschung/arbeitsgruppen/index\\_ger.html](http://www.psychiatrie.uk-erlangen.de/forschung/arbeitsgruppen/index_ger.html) (13.09.2009)
- [3] Campbell N. & Reece J., Biologie (Pearson Studium Verlag, 6. Auflage 2006)
- [4] Koolman J. & Röhm KH., Taschenatlas der Biochemie (Georg Thieme Verlag, 3. Auflage 2003)
- [5] <http://www.lipidomicnet.org/index.php/Sphingomyelin> (20.09.2009)
- [6] Hannun YA & Obeid LM, The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem.* 277(29),25847-25850 (2002)
- [7] Spiegel S. & Milstien S., Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem.* 277(29):25851-25854 (2002)
- [8] <http://www.lipidomicnet.org/index.php/Ceramide> (20.09.2009)
- [9] Kornhuber J. et al., High activity of acid sphingomyelinase in major depression. *J Neural Transm.* 112, 1583-1590 (2002)
- [10] Pascual M. et al., Ceramide pathways modulate ethanol-induced cell death in astrocytes. *J Neurochem.* 87, 1535-1545 (2003)