# Grundpraktikum *Biophysik* im Studiengang *Biologie* mit Schwerpunkt *Human- und Molekularbiologie*



Universität des Saarlandes, Homburg, Bereich Theoretische Medizin, Fachrichtung Biophysik

# Inhalt

1	Wirkung ionisierender Strahlung auf DNA	6
1.1	Grundlagen zur Röntgenstrahlung	6
1.2	Wechselwirkung der Photonenstrahlung mit Materie	7
1.3	Dosimetrie zur quantitativen Erfassung der Wirkung ionisierender Strahlung	7
1.4	Biologische Wirkung ionisierender Strahlung	8
1.5	Einfluß von Röntgenstrahlen auf die DNA	8
1.6 1.6.1 1.6.2 1.6.2.1 1.6.2.2 1.6.2.2.1 1.6.2.2.2 1.6.2.2.3 1.6.2.3	Elektrophorese Grundlagen der Trennmethode Elektrophorese in der Matrix Agarose-Gele Elektrophoretische Trennmethoden für Nukleinsäuren <i>Submarine</i> -Technik <i>Pulsed-Field</i> Agarose-Gel-Elektrophorese Hochauflösendes denaturierendes Polyacrylamid-Gel Puffersysteme	9 9 10 10 10 11 11 12 12
1.7	Nukleinsäuren	12
1.8 1.8.1 1.8.2 1.8.3 1.9	Experimenteller Teil Bestimmung der Dosisleistung Einfluß von Röntgenstrahlen auf Plasmid-DNA Schutz vor ionisierender Strahlung durch <i>Strahlenschutzstoffe</i> Literatur	13 13 14 15
2.	Fluoreszenzspektroskopie und Auflichtfluoreszenz	15
2.1	Allgemeines zur Fluoreszenz	15
2.2	Fluoreszenzmikroskopie	16
2.3	Durchlichtmikroskopie	18
2.4	Prinzip einer CCD-Kamera	19
2.5	Fluoreszenzspektroskopie	20
2.6 2.6.1 2.6.2	Experimenteller Teil Autofluoreszenz Methanogener Bakterien <i>In vivo</i> Fluoreszenz-Mikroskopie mittels <i>Grün-fluoreszierendem</i> <i>Protein</i> (GFP) und <i>DAPI</i>	21 21 22

2.6.3	Spetroskopische Eigenschaften von GFP und YFP	23
2.7	Literatur	23
3	Sauerstoffbindung an Hämoglobin	23
3.1	Aufbau und Eigenschaften von Myoglobin und Hämoglobin	23
3.2	Der Bohr-Effekt	26
3.3	Diphosphoglycerat als allosterischer Effektor	26
3.4 3.4.1	Spektroskopische Messungen Absorptionsspektroskopie (UV-vis)	27 27
3.5 3.5.1 3.5.2	Experimenteller Teil Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration Sauerstoffbindung von gereinigtem Hämoglobin	28 28 29
3.6	Literatur	31
4	Strukturelle Übergänge der DNA	31
4.1	Aufbau und Eigenschaften der DNA	31
4.2	Schmelzpunkt der DNA	33
4.3 4.3.1 4.3.2	Experimenteller Teil Bestimmung der Hyperchromizität Bestimmung der Schmelztemperatur ( <i>T<sub>m</sub></i> -Werte)	34 34 34
4.4	Literatur	35
5	Statistik	35
5.1	Literatur	37

# Testatblatt

Name:	
Vorname:	
Gruppe:	

Versuch	Datum	Antestat	Abtestat
1			
2			
3			
4			
Klausur			

Trennen Sie das Testatblatt bitte heraus und kleben es in Ihr Protokollheft. Das Blatt ist Ihr Beleg für die regelmäßige und erfolgreiche Teilnahme. Legen Sie es daher bei jedem Versuch und auch bei der Klausur dem Betreuer zur Abzeichnung bei.

# Praktikumsordnung

**a.) Einteilung des Praktikums:** Das Praktikum besteht aus vier Versuchen und einer Klausur. Die Versuche werden in den Praktikumsräumen der Biophysik, Bau 76 durchgeführt. Das Praktikum des SS 2003 beginnt Montag, den 14.07.03 und endet mit der Klausur am 25.07.03.

Die Teilnehmer werden in einer Vorbesprechung (s. Aushang) in die jeweiligen Gruppen eingeteilt. Einteilung und Terminplan für die einzelnen Versuche werden danach durch Anschlag an den Praktikumsräumen bekanntgegeben.

- **b.)** Versuchsdurchführung: Jeder Versuch, der in mehrere Aufgaben unterteilt ist, sollte zu Hause an Hand des Skriptums vorbereitet werden. Der Versuch beginnt mit einer etwa halbstündigen Einführung durch den Betreuer. Hier ist die Gelegenheit gegeben, Schwierigkeiten, die bei der Vorbereitung auftraten und nicht anhand der Anleitung, eines Lehrbuchs oder durch Zusammenarbeit mit anderen Praktikumsteilnehmern gelöst wurden, mit dem Betreuer zu besprechen. Über den Versuch ist ein ausführliches Protokoll anzufertigen.
  - Ein Versuch wird testiert, wenn der Praktikant
    - an der praktischen Durchführung der Aufgaben, sowie an der Anfertigung des Protokolls aktiv teilgenommen hat
    - die zum Versuch gehörigen Grundlagen der Anleitung wiedergeben kann.
- **c.)** Klausur: Zur Klausur wird zugelassen, wer ein Testatblatt mit vier testierten Versuchen vorweisen kann. Die Klausur ist bestanden, wenn 50 % der Fragen richtig beantwortet wurden.
- **d.)** Scheinvergabe: Die Bescheinigung über die erfolgreiche und regelmäßige Teilnahme am Praktikum wird ausgestellt, wenn alle vier Versuche testiert sind und die Klausur bestanden wurde.

## 1. Wirkung ionisierender Strahlung auf die DNA

#### 1.1 Grundlagen zur Röntgenstrahlung

Zu den ionisierenden Strahlen rechnet man sowohl die durch spontanen Zerfall von Radionukliden emittierten elektrisch geladenen ( $\alpha$ -,  $\beta$ -Teilchen) und ungeladenen Teilchen auch elektromagnetische Wellenstrahlen mit hinreichend großer (Neutrinos) als Quantenenergie, wie (sehr kurzwellige) UV-Strahlung sowie Gamma- und Röntgenstrahlen. Teilchen- und elektromagnetische Strahlung können Materie durch Herausschlagen von Elektronen aus der Atomhülle ionisieren. Aufgrund ihrer physikalischen Natur und ihrer Eigenschaften, sich in vielen Erscheinungen wie Teilchenstrahlung zu verhalten, werden Gamma- und Röntgenstrahlen auch unter dem Begriff Photonenstrahlung geführt. Elektrisch erzeugte Röntgenstrahlung entsteht in der Röntgenröhre. Eine Röntgenröhre besteht aus einem evakuierten Glaskolben (s. Abb. 1), in dem mit Hilfe einer Glühkathode freie Elektronen erzeugt werden, die durch die zwischen Anode und Kathode angelegte Hochspannung zur Anode hin beschleunigt werden. In der Anode werden die auftreffenden Elektronen abgebremst, wobei ein Teil ihrer kinetischen Energie in elektromagnetische Strahlung verwandelt wird. Abbildung 2 zeigt ein entsprechendes Wellenlängenspektrum dieser Strahlung, welche aus einer kontinuierlichen und einer diskreten Komponente besteht. Die kontinuierliche, sogenannte Bremsstrahlung entsteht beim Abbremsen der ankommenden Elektronen im Coulombfeld der Elektronen der Anodenatome (häufig Wolfram). Nach der Maxwell'schen Theorie führt jede (auch negativ) beschleunigte Bewegung (d.h. Abbremsung) geladener Teilchen zur Emission elektromagnetischer Strahlung. Eine einfache Betrachtung erlaubt, die maximale Energie der so emittierten Photonen anzugeben. Falls die gesamte kinetische Energie  $E = e \cdot U$  eines ankommenden Elektrons in einem einzigen Bremsakt in die Energie eines Photons umgesetzt wird, so gilt:

$$(h \cdot v)_{max} = e \cdot U.$$



Abb. 1 und 2: Prinzip und Wellenlängenspektrum einer Röntgenröhre

Entsprechend der Formel  $c = \lambda \cdot v$  ergibt sich daraus die "kurzwellige Grenze" des Bremsspektrums bei  $\lambda_{\min}$ . Bei einer Röhrenspannung von  $10^5$  V beträgt die maximale Photonenenergie somit  $10^5$  eV. Der größte Teil der kinetischen Energie der auf die Anode auftreffenden Elektronen wird in Wärme umgesetzt und nur etwa 1% der an die Anode abgegebene Energie wird in Röntgenstrahlen umgewandelt. Die Anode muß daher gekühlt werden. Dem kontinuierlichen Bremsspektrum sind die diskreten Linien der sogenannten *charakteristischen Strahlung* überlagert. Diese Bezeichnung soll ausdrücken, dass die Linien für das jeweilige Anodenmaterial charakteristisch sind. Sie rühren von Elektronenübergängen in der Hülle der Anodenatome her. Die Röntgenstrahlen werden von der Anode nach allen Seiten emittiert. In der Regel wird jedoch nur ein kleiner Bereich aus einer Abschirmung ausgeblendet.

# 1.2 Wechselwirkung von Photonenstrahlung mit Materie

Photonenstrahlung kann über verschiedene Wechselwirkungsprozesse zur Ionisation von Materie führen.

- Der *photoelektrische Effekt* Ein Photonenquant mit weniger als 0,5 MeV Energie wird von einem Orbitalelektron vollkommen gestoppt, wobei das Elektron unter Übertragung der gesamten kinetischen Energie aus der Atomhülle herausgeschleudert wird.
- Der *Compton-Effekt (bei Photonenenergien von 0,5-1 MeV)* Auch hier kollidiert ein Photonenquant mit einem Orbitalelektron. Ein Teil der einfallenden Photonenenergie wird zur Abstoßung eines Hüllelektrons benutzt. Die nicht verbrauchte Restenergie wird als elektromagnetische Strahlung in einem bestimmten Streuwinkel emittiert. Das Photonenquant wird also nicht wie beim Photoeffekt völlig absorbiert, sondern mit verminderter Energie unter gleichzeitiger Freisetzung eines Orbitalelektrons gestreut. Der Compton-Effekt tritt häufig bei Elementen mit niedriger und mittlerer Ordnungszahl auf.
- Der *Paarbildungseffekt* Dieser Effekt, der bei einer Photonenenergie von > 1 MeV auftritt, resultiert in der Emission eines Positrons und eines Elektrons.

# 1.3 Dosimetrie zur quantitativen Erfassung der Wirkung ionisierender Strahlung

Das Ziel der Dosimetrie ist die quantitative Erfassung von ionisierender Strahlung und deren biologischer Wirkung. Hierzu sollen folgende dosimetrische Termini erklärt werden:

• Unter Aktivität *A* einer radioaktiven Strahlungsquelle versteht man die Anzahl der radioaktiven Zerfallsereignisse pro Zerfallsintervall in der Substanz der Quelle.

$$A = \frac{dN}{dt}$$

A – Aktivität N – Anzahl der umwandelbaren Atomkerne

Maßeinheit ist ein Becquerel (Bq) 1 Bq = 1 s<sup>-1</sup> [1 Ci = 1 Curie = 3,7 10<sup>10</sup> Bq]

- Die *Energiedosis (D)* ist ein Maß für die *absorbierte* Strahlungsenergie in Joule (J) pro Kilogramm bestrahlter Masse. Maßeinheit ist das *Gray (Gy)*.
   1 Gy = 1 Joule/kg
- Die (biologische) *Äquivalentsdosis (H)* ist das Produkt der Energiedosis (D) und eines dimensions-losen Bewertungsfaktors (q).

$$H = D \cdot q$$

Maßeinheit ist das *Sievert (Sv)*. 1 Sv = 1 J/kg= 1 Gy, wenn q = 1 Der Bewertungsfaktor q dient zur Beurteilung der unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit verschiedener Strahlung bei gleicher Energiedosis. Beispiele hierzu seien

- Röntgenstrahlung q = 1
- Alphastrahlung q = 20
- Thermische Neutronen q = 2-3

# 1.4 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung

Die Grundlage der schädigenden Wirkung von ionisierender Strahlung ist ihr Ionisationsvermögen von Molekülen oder Atomen in der Zelle. Man unterscheidet die direkte und die indirekte Wirkung.

- *Direkte Wirkung* Durch primäre Interaktion mit der Strahlung wird das biologische Molekül direkt modifiziert.
- Indirekte Wirkung Unter Einwirkung von Strahlung kommt es zunächst zu einer Radiolyse des Wassers:

 $H_2O \rightarrow H_2O^+ + e_{aqu}$ .

Diese Primärionisation ergibt, neben dem solvatisierten Elektron,  $e_{aqu}$ , ein Kation  $H_2O^+$ , das durch Deprotonierung zum OH<sup>•</sup> Radikal wird. Rekombination der primären Produkte zu  $H_2O^*$  kann über homolytische Dissoziation des angeregten  $H_2O$  zu Wasserstoffatomen H<sup>•</sup> und weiteren OH<sup>•</sup> Radikalen führen. Über Folgereaktionen, z.B.  $e_{aqu} + H_3O^+ \rightarrow H^{-} + H_2O$ 

$$H' + O_2 \rightarrow HO_2'$$
  $2HO_2' + O_2 \rightarrow H_2O_2 + O_2$ 

 $RH + OH \dot{\to} R \dot{} + H_2O$ 

 $RH + HO_2 \rightarrow R + H_2O_2$ 

können, neben dem OH Radikal, weitere starke Oxidantien oder organische Molekülradikale gebildet werden, die letztendlich eine chemische Modifikation wichtiger Biomoleküle verursachen wie z. B. Degradation von ungesättigten Fettsäuren, Aufbrechung von Disulfidbrücken oder Strangbruchbildung an der DNA.

# 1.5 Einfluß von Röntgenstrahlen auf die DNA

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA; s. Kapitel 1.7) als Träger der genetischen Information bildet einen wesentlichen Angriffspunkt für die zelluläre Strahlenschädigung. Hierbei können folgende Veränderungen entstehen:

- *Einzelstrangbrüche (ESB)*: Hierbei tritt eine Unterbrechung im Zucker-Phosphat-Rückgrat *eines* DNA-Stranges auf, was eine Änderung der räumlichen Konformation zur Folge hat.
- Doppelstrangbrüche (DSB): Sie können entweder aufgrund einer einzigen Wechselwirkung oder aber auch durch die räumliche Nähe zweier individuell induzierter Einzelstrangbrüche entstehen. Beide Formen unterscheiden sich in der Dosisabhängigkeit, so sollte diese im ersten Fall linear und im zweiten Fall quadratisch sein.
- Basenveränderungen und Basenverluste: Durch Bestrahlung der DNA mit ionisierender Strahlung tritt eine dosisabhängige Veränderung der Absorption bei 265 nm ein. Ausgehend von doppelsträngiger DNA zeigt sich zunächst ein Anstieg der Absorption, der auf strahleninduzierte Denaturierung zurückzuführen ist. Bei höheren Dosen nimmt die Absorption progressiv ab, was auf Basenschädigung beruht, da nur sie bei dieser Wellenlänge absorbieren. Produkte, denen möglicherweise biologische

Bedeutung zukommt, sind 5,6-dihydroxy-dihydroperoxythymin und ein Radikal, das durch H-Abstraktion von der Methyl-Gruppe des Thymins entsteht. Ein Verlust kompletter Basen tritt u. a. als Begleiteffekt bei der Bildung von Strangbrüchen auf.

- *Denaturierte Zonen*: Die bisher beschriebenen Veränderungen führen zu Veränderung der DNA-Struktur und damit auch zur Reduktion der die Doppelhelix stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen, was sich in einer lokalen Denaturierung äußert und die man u. a. durch Änderungen der *Schmelzkurve* nachweisen kann (s. Kapitel 3).
- intramolekulare Vernetzungen
- DNA-Protein-Vernetzungen

## 1.6 Elektrophorese

#### 1.6.1 Grundlagen der Trennmethode

Die meisten Biopolymere wie Proteine als Polyampholyte und Nukleinsäuren als (Poly)Säuren sind geladen und wandern daher in einem elektrischen Feld. Bei einer Elektrophorese werden geladene Moleküle unter dem Einfluß eines elektrischen Potentialgradienten transportiert. Infolge der an den geladenen Teilchen oder Molekülen angreifenden elektrischen Kraft  $\vec{F}$ 

$$\vec{F} = z e \vec{E}$$
  
z, Zahl der Einheitsladungen e und  $\vec{E}$ , elektrische Feldstärke

erfährt das Teilchen eine beschleunigte Bewegung. Die Teilchen-Geschwindigkeit steigt so lange, bis die dadurch ebenfalls größer werdende Reibungskraft des Teilchens genauso groß geworden ist, wie die antreibende elektrische Kraft F. Diese Reibungskraft wird für kugelförmige Teilchen durch das *Stokes'sche Gesetz* beschrieben:

$$\vec{F} = ze\vec{E} = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v$$
  

$$\eta = \text{dynamische Viskosität des Lösungsmittels}$$
  

$$r = \text{wirksamer Radius inkl. Hydrathülle}$$
  

$$v = \text{Geschwindigkeit}$$

Im Gleichgewicht der Kräfte bewegt sich das Teilchen mit gleichbleibender Geschwindigkeit *v* weiter.

$$v = \frac{z e \vec{E}}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

Die Geschwindigkeit v ist proportional der angelegten Spannung U, alle anderen Größen sind dagegen Materialkonstanten des interessierenden Teilchens bzw. Moleküls. Deshalb gibt man als charakteristische Größe für das Teilchen oder Molekül die auf die elektrische Feldstärke,  $\vec{E}$ , bezogene Geschwindigkeit an. Dies ist die Beweglichkeit u:

$$u = \frac{v}{\vec{E}}$$

Diese Gleichung trägt einer Reihe von Umständen, die unter *realen* Bedingungen auftreten, keine Rechnung. Es sind dies die *Gegenionenwolke*, die das Molekül umgibt, sowie deren Verzerrung durch das elektrische Feld (elektrophoretische Relaxation) und durch die Drift im zähen Medium (elektrophoretische Retardierung), und die (fest haftende) Hydrathülle, die die effektive Ladung des Moleküls vermindert, sein effektives Volumen jedoch vergrößert. Daher liefert eine Elektrophorese selbst bei verschwindend kleinen Feldstärken nur unscharfe Strukturaussagen, aber eine hervorragende Auflösung komplexer Gemische in ihre Komponenten.

# 1.6.2 Elektrophorese in der Matrix

Die Wahl eines Trennmediums richtet sich nach der Art der zu untersuchenden Substanz. Die Medien müssen chemisch inert sein, ihre Struktur sollte weitgehend homogen und hitzestabil sein und ihr Vernetzungsgrad muß reproduzierbar eingestellt werden können. Die in der Biologie am häufigsten verwendeten polymeren Trägermaterialien sind das Polyacrylamid und die Agarose.

1.6.2.1 Agarose-Gele

Agarose ist ein Polysaccharid (s. Abb. 3), das aus roten Meeresalgen gewonnen wird. Es wird in Elektrophoresepuffer aufgenommen und dann durch Erhitzen in Lösung gebracht.



Abb. 3: Agarose

Die vielen Hydroxy-Gruppen (R-OH) ermöglichen die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen, wodurch die großporige Gelmatrix ihre Festigkeit erhält (s. Abb. 4).

1.6.2.2 Elektrophoretische Trennmethoden für Nukleinsäuren

Die Methode für die Nukleinsäureauftrennung richtet sich nach der Größe der Moleküle und dem angestrebten Auflösungsvermögen. Die am häufigsten verwendeten drei Methoden sind:

- das Agarose-Gel mit der Submarine-Technik
- das Agarose-Gel im Pulsed Field-Verfahren
- das hochauflösende Polyacrylamid-Gel



Abb. 4: Ausbildung eines Agarose-Gels.

#### 1.6.2.2.1 Submarine-Technik

Diese Methode ist die Standardmethode zur Trennung, Reinigung und Identifizierung von Nukleinsäuren. Bei der *Submarine*-Technik befindet sich das Agarose-Gel in horizontaler Lage und ist völlig mit dem Elektrophoresepuffer bedeckt (s. Abb. 5). Dadurch wird das Gel vor dem Austrocknen geschützt. Die Sichtbarmachung der Nukleinsäuren erfolgt über die Anfärbung mit Ethidiumbromid. Dieses planare Molekül schiebt sich zwischen zwei Basen und verstärkt damit sein Fluoreszenzverhalten unter UV-Anregung, so dass die angefärbten Molekülbanden erkennbar werden.



Abb. 5: Elektrophoresekammer für eine horizontale Elektrophorese

#### 1.6.2.2.2 Pulsed-Field Agarose-Gel-Elektrophorese

Diese modifizierte *Submarine*-Technik wird zur Trennung von sehr großen Nukleinsäuremolekülen (meist Chromosomen) eingesetzt. Nukleinsäuremoleküle mit einer Größe von über 20 kb richten sich in der herkömmlichen Agaroseelektrophorese der Länge nach aus und wandern im elektrischen Feld mit gleichen Geschwindigkeiten. In der *Pulsed-Field* Gel-Elektrophorese (PFG) ändert sich nun die Richtung des elektrischen Gleichstromfeldes periodisch. Dadurch sind die Moleküle gezwungen, ihre Ausrichtung ständig zu ändern. Kürzere Nukleinsäurestränge vollziehen diesen Prozeß schneller, weshalb sie dann auch eine höhere Beweglichkeit besitzen.

# 1.6.2.2.3 Hochauflösendes denaturierendes Polyacrylamid-Gel

Im Gegensatz zur PFG ist diese Methode besonders zur Auflösung von sehr kleinen Unterschieden in der Größe der Moleküle geeignet. Das restriktive Polyacrylamid-Gel ist vertikal angeordnet und enthält zudem noch hohe Harnstoffkonzentrationen. In Verbindung mit einer zusätzlichen externen Erwärmung, bewirkt das eine Denaturierung der Doppelstränge. Das hohe Auflösungsvermögen von Polyacrylamid-Gelen ermöglicht dann eine Auftrennung von Molekülen, deren Längenunterschied nur eine Base beträgt. Deshalb wird diese Technik meistens zur Sequenzierung oder zur Identifikation von Punktmutationen eingesetzt.

# 1.6.2.3 Puffersysteme

Der pH-Wert sollte während der Elektrophorese stabil bleiben und den pH-Wert der Proben überdecken. Da die Pufferionen im elektrischen Feld ebenfalls mitwandern, müssen ausreichend große Puffervorräte vorhanden sein. Grundlage für die Auswahl einer Puffersubstanz ist die Theorie des Säure-Base-Gleichgewichts. Eine Säure AH (bzw. AH<sup>+</sup>) kann unter Freisetzung eines Protons H<sup>+</sup> in wässriger Lösung zu A<sup>-</sup> (bzw. A) dissoziieren.

$$AH \Leftrightarrow A^- + H^+$$

Die Gleichgewichtskonstante K<sub>s</sub> wird definiert als

$$K_s = [A^-] [H^+] / [AH].$$

# 1.7 Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind fadenförmige Polymere, die aus einem Zucker-Phosphat-Rückgrat und daran gebundenen Stickstoffbasen bestehen (s. Abb. 6). Ein Monomer, bestehend aus einem Zucker, einem Phosphorsäurerest und einer Stickstoffbase wird als *Nukleotid* bezeichnet. In der DNA kommen jeweils zwei *Purin*-Basen, *Adenin* und *Guanin*, und zwei *Pyrimidin*-Basen, *Thymin* und *Cytosin* vor.

Liegen die Nukleinsäuren als Doppelhelix vor, so ergeben zwei gegenüberliegende Monomere ein Basenpaar (bp). Ein DNA-Molekül mit einer Länge von 1000 Basen ist dann eine Kilobase (kb) Nukleinsäuren. DNA und RNA sind unter physiologischen Bedingungen immer negativ geladen. Extrem hohe pH-Werte spalten das Rückgrat der Nukleinsäuren. Ihre Ladung wird durch die Phosphorsäurereste des Rückgrats geprägt, wobei jeder Rest eine negative Ladung trägt. Zu niedrige pH-Werte führen zu einer Absättigung der negativen Phosphatgruppen. Die Folge ist die Unbeweglichkeit und Ausfällung der Nukleinsäuren in einem Elektrolyten.



Abb. 6: Eine Kette bestehend aus den vier Desoxyribonukleotiden Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin

Die effektive Größe der Nukleinsäuremoleküle hängt nicht nur von ihrer absoluten Masse, sondern auch von ihrer Form ab. Die DNA kann in superhelikaler-, offener-, doppelsträngiglinearer- oder einzelsträngiger Form auftreten. In der Regel wandert die superhelikale Form der DNA - aufgrund der kompakteren Form - schneller im Gel als die lineare. Relaxierte (offene) DNA Moleküle wandern im Gel wesentlich langsamer als superhelikale oder lineare DNA. Die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Formen wird durch die Laufbedingungen, Agarosekonzentrationen, angelegte Spannung und Wahl des Puffers beeinflusst. Die DNA wird auf das Agarosegel mit Hilfe von sogenannten Auftragspuffern aufgetragen. Diese dienen in erster Linie dazu, die Dichte der DNA-Lösung zu erhöhen (mit Hilfe von z. B. Glyzerin), so dass die Lösung beim Auftragen in die Taschen des Geles absinkt und nicht in den Laufpuffer diffundiert. Die Auftragspuffer enthalten zusätzlich Farbstoffe, die während der Elektrophorese mit der DNA in Richtung Anode wandern und so einen Anhaltspunkt für die Wanderung der DNA bieten. Die gebräuchtlichsten Farbstoffe sind Bromphenolblau und Xylencyanol.

# **1.8** Experimenteller Teil

# 1.8.1 Bestimmung der Dosisleistung

- (a) Bestimmen Sie die Dosisleistung der vorliegenden Röntgenröhre bei einer Spannung von 60 kV unter folgenden Bedingungen:
- variabler Detektorabstand zur Röntgenquelle [cm] (10,5 cm, 12,0 cm, 13,5 cm, 15,0 cm, 16,5 cm, 18,0 cm, 19,5 cm) bei konstanter Stromstärke von 16 mA

- variable Stromstärke (4 mA, 8 mA, 12 mA, 16 mA) bei konstantem Detektorabstand von 10,5 cm zur Röntgenquelle.

Zur Messung der Dosisleistung verwenden Sie das Dosis- und Dosisleistungs-Meßgerät (TOL/F LB 132), das die Photonen-Äquivalentdosis mißt. Die Dosisleistung wird in der Einheit  $\mu$ Sv/h bzw. mSv/h (beachten Sie den q-Wert (1) für Röntgenstrahlen; s. Kapitel 1.3) angezeigt. Das Gerät besteht aus einem Grundgerät mit Meß- und Steuerelektronik inklusive der Software, einem Kalibrierschacht mit Kalibrierstrahler, Anzeige- und Bedienungselement und der Ionisationskammer-Sonde. Im Niederdosisleistungsbereich (0,1  $\mu$ Sv/h – 10 mSv/h) arbeitet die Sonde als Proportionalitätszählrohr, wobei Sie im Hochdosisleistungsbereich (10 mSv/h – 100 Sv/h) als Ionisationskammer mit konstanter Hochspannung von 180 Volt fungiert

- Erstellen Sie mittels Software-Programm Excel die entsprechenden Diagramme, in dem Sie

a) die Dosisleistung [Gy/s] gegen den variablen Abstand zur Röntgenquelle [cm]
b) die Dosisleistung [Gy/s] gegen die variable Stromstärke [mA] auftragen. Erläutern Sie dabei die Graphiken.

(b) Ein chemischer Ansatz zur Dosimetrie stellt die sogenannte *Fricke-Dosimetrie* dar, die zur Ermittlung der Dosisleistung des verwendeten experimentellen Aufbaus verwandt wird. Das *Fricke*-Dosimeter beruht auf der Radiolyse des Wassers und den oxidierten Eigenschaften der gebildeten Radiolyseprodukte (Fe<sup>3+</sup>), deren Auftreten photometrisch detektiert werden kann. Der anwendbare Doisbereich liegt zwischen 40 und 400 Gy. Bestrahlen Sie 100 µl einer *Fricke*-Lösung (1 mM NaCl, 1 mM FeSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O bzw. Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0,8 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) bei einem Röhren-zu-Proben-Abstand von 15 cm für 200 Sekunden. Zur Bestimmung der Fe<sup>3+</sup>-Ionen Konzentration, messen Sie dann in einem Photometer die optische Dichte ( $OD = \varepsilon \cdot c \cdot d$ ; s. Kapitel 3.4.1) bei einer Wellenlänge von 304 nm. Die Anzahl der gebildeten Fe<sup>3+</sup>-Ionen wird ermittelt durch die Gleichung:

$$N_{Fe3+} = \frac{\Delta OD_{304} \bullet N_A}{\varepsilon}$$

N<sub>A</sub>: Avogadrokonstante  $(6,02214 \cdot 10^{23})$ 

#### 1.8.2 Einfluß von Röntgenstrahlen auf Plasmid-DNA

pUC19 ist ein 2686 bp großes und zu mehr als 90 % superhelikales Plasmid aus *Escherichia coli*. In diesem Versuch soll diese Plasmid-DNA bei einem Abstand zur Röntgenquelle von 10,5 cm und 16 mA Stromstäke mit 500 Gy bestrahlt werden. Hierzu mischen Sie 95  $\mu$ l des 1xTris-Borat-(TBE)Puffers (pH 7,0) mit 5  $\mu$ l der pUC19-Stammlösung (DNA-Konzentration beträgt 0,05 mg/ml) und geben das Reaktionsgefäß in die Probenhalterung zur anschließenden Bestrahlung. Entnehmen Sie zu den entsprechenden Zeitpunkten (0, 10, 50, 100, 200, 400, 600 und 1000 Sekunden.) jeweils 10  $\mu$ l ihres Reaktionsansatzes. Die Proben werden mit 2  $\mu$ l Auftragspuffer (s. Kapitel 1.7) gemischt und anschließend auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen. Beachten Sie hierbei, dass Sie vor der Bestrahlung bereits 10  $\mu$ l aus dem Ansatz als unbestrahlte Probe (Kontrolle) entnehmen.

Zur Herstellung des Gels wiegen Sie 0,8 g Agarose ein und mischen dies mit 1xTBE-Puffer zu einem Endvolumen von 100 ml. Diese Lösung wird in einem Mikrowellengerät zum Kochen gebracht. Die Auftrennung der Produkte erfolgt in einem 1xTBE-Puffer bei einer Spannung von 240 mA. Zur Markierung der DNA wird das Gel für ca. 20 min in ein Ethidiumbromidbad (1:10 000) gegeben (*hierbei bitte Handschuhe tragen!*) und anschliessend für 30 min in Wasser entfärbt. Die Banden werden durch einen UV-Tisch sichtbar gemacht und mittels Digital-Kamera aufgenommen. Für die quantitative Auswertung der entstandenen Einzel- und Doppelstrangbrüche setzen Sie das vorliegende Software-Programm *AIDA* ein. Die Einführung hierzu erfolgt durch die betreuende Person. Um nun eine Dosis-Wirkung-Beziehung erstellen zu können, tragen Sie in dem Programm *Excel* die zuvor quantitativ ermittelten Werte entstandener Einzel- und Doppelstrangbrüche gegen die Dosis auf und Bestimmen Sie so die Induktionsrate der Doppelstrangbürüche.

# 1.8.3 Schutz vor ionisierender Strahlung durch *Strahlenschutzstoffe*

Die Strahlenempfindlichkeit zellulärer Systeme hängt von dem sie umgebenden Medium ab, in welchem sie exponiert werden. Eine erste Möglichkeit für chemische Strahlenschutzstoffe bietet sich unmittelbar an, wenn man davon ausgeht, das in zellulären Systemen die Bildung von Radikalen (z. B. OH -Radikale; s. Kapitel 1.4) eine Rolle spielt. Beispiele solcher Schutzsubstanzen sind Dimethylsulfoxid (DMSO) sowie Alkohole, von denen vor allem Glyzerin wegen seiner geringen Toxizität bedeutsam ist.

In dem nun folgenden Ansatz sollen sie den Schutzeffekt von DMSO und Glyzerin untersuchen. Mischen Sie hierzu in drei Ansätzen jeweils 400 ng Plasmid-DNA mit einer DMSO- bzw. Glyzerinstammlösung und TBE-Puffer zu einem Endvolumen von 100  $\mu$ l. Die Endkonzentrationen der DMSO- wie auch der Glyzerinreihe sollen jeweils 0, 5, 10, 15 % (w/v) betragen. Ein vierter Ansatz ohne DMSO bzw. Glyzerin dient als Kontrolle. Bestrahlen Sie diese Proben jeweils bei einer Dosis von 500 Gy und tragen Sie anschließend die Proben - wie in 1.8.2 beschrieben – auf ein 0,8 %-iges Agarosegel auf. Detektion und Auswertung erfolgt wie oben beschrieben. Bestimmen Sie mit Hilfe den Anteil der nicht beschädigten superhelicalen DNA-Plasmide in Abhängigkeit der jeweiligen Schutzkonzentrationen.

# 1.9 Literatur

Adam, G., Läuger, P. und Stark, G.: *Physikalische Chemie und Biophysik*, Springer-Verlag, 1977

Kiefer, J.: Biologische Strahlenwirkung, 2. Auflage, Birkhäuser, 1989

Lottspeicher, F. und Zorbas, H.: Bioanalytik, Spektrum, Akademischer Verlag, 1998

Petzhold, W. und Krieger, K.: *Strahlenphysik, Dosimetrie und Strahlenschutz*, Band 1 Grundlagen, B. G. Teubner Stuttgart, 1988

#### 2. Fluoreszenzspektroskopie und Auflichtfluoreszenz

#### 2.1 Allgemeines zur Fluoreszenz

Fluoreszenz ist das durch Strahlung angeregte Leuchten eines Stoffes. Das ausgestrahlte Fluoreszenzlicht hat dabei in der Regel eine größere Wellenlänge als das eingestrahlte Licht ("Rot-Verschiebung"; Stokes'sche Regel). Man schickt also in eine Substanz eine relativ energiereiche Strahlung hinein, von deren Energie ein gewisser (kleiner) Teil in der Substanz selbst absorbiert bzw. umgewandelt wird (z.B. Wärme). Die nicht absorbierte Strahlungs-



Abb. 7: Jablonski-Diagramm

energie (welche den weitaus größeren Teil ausmacht) wird ungenutzt von der Substanz wieder abgestrahlt oder emittiert. Man sagt zu diesem Vorgang: die Substanz fluoresziert. Die Prozesse, die von der Absorption von Anregungslicht zur Emission von Fluoreszenzlicht führen, werden oft mit Hilfe von Energiediagrammen dargestellt, die nach dem polnischen Physiker Alexander Jablonski benannt sind, dem Begründer der modernen Fluoreszenzspektroskopie. Ein Jablonski-Diagramm zeigt die Energien der Elektronenübergänge, die bei Absorption und Emission von Photonen auftreten. Neben dem chemischen Grundzustand  $(S_0)$ und den elektronisch angeregten Zuständen  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $T_1$  sind ebenfalls die Schwingungszustände des Moleküls in den jeweiligen elektronischen Zuständen aufgeführt. Viele Fluorochrome haben aromatische Ringstrukturen und besitzen delokalisierte Elektronen in sogenannten bindenden  $\pi$ -Orbitalen. Die Elektronen dieser Orbitale treten leicht in Wechselwirkung mit der Umgebung und gehen bei Absorption eines Anregungsphotons in ein höheres Orbital ( $\pi^*$ ) über. In bindenden Orbitalen liegen die Elektronenpaare normalerweise mit antiparallelem Spin vor - eine Anordnung, die die sogenannten Singulett-Zustände charakterisiert ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ). Die Absorption eines Anregungsphotons  $(hv_A)$  hebt ein Elektron aus dem Grundzustand  $(S_0)$ in einen der angeregten Zustände  $S_1$  oder  $S_2$ . Dieser Vorgang ist extrem schnell, er vollzieht sich innerhalb etwa  $10^{-15}$  s. Aus dem oberen angeregten Zustand ist ein Übergang nach S<sub>1</sub> möglich, ohne das eine Photon emittiert wird ("innere Umwandlung"), jedoch beim Übergang in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie als Fluoreszenzphoton (hv<sub>F</sub>) emittiert. Die Energie des emittierten Photons ist in der Regel immer geringer als die des absorbierten Photons - damit ist die Wellenlänge des Fluoreszenzlichts größer als die des Anregungslichts (Stokes'sche Regel). Die mittlere Verweilzeit im angeregten Zustand (Fluoreszenz-Lebenszeit) ist bei vielen Fluorochromen im Bereich von 10 ns. Bei manchen Verbindungen kann es zu einem Übergang aus einem angeregten Singulettzustand in einen Triplett-Zustand (T1) kommen. Bei diesem Vorgang ("Interkombination") kommt es zu einer Spinumkehr des angeregten Elektrons, und auch der Sprung in den Grundzustand erfordert eine erneute Spinumkehr. Solche Vorgänge sind jedoch sehr unwahrscheinlich, und die Emissionsraten sind sehr gering (1-1000 pro s). Diese geringe Übergangsrate ist der Grund für das langsame Abklingen der Phosphoreszenz bei Leuchtziffern und Spielzeug, das im Dunkeln leuchtet.

## 2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Voraussetzung für die Fluoreszenzmikroskopie ist das Vorhandensein einer Substanz, die sich zur Fluoreszenz anregen läßt. Es gibt Substanzen (z.B. Chlorophyll in Blättern, F420 in methanogenen Bakterien aber auch einige Öle, Wachse u.a.m.) die natürlicherweise fluoreszieren, sie zeigen "Primärfluoreszenz". Leider besitzen aber gerade diejenigen Objekte, die in der Mikroskopie untersucht werden (Zellen, Gewebe, Zellkulturen usw.) außer einem allgemeinen weiß-blauen Leuchten des ganzen Präparates (unspezifische Eigen- oder Autofluoreszenz, die besonders bei UV- und Violettanregung auftritt und, da unspezifisch, eher stört als nützt), keine "typische" natürliche Fluoreszenz. Will man bestimmte Objektstrukturen hervorheben, muß man eine spezifische Fluoreszenz induzieren, welche an die Teile gekoppelt ist, die man analysieren möchte. Dies geschieht mittels der sogenannten Fluorochrome (chroma = Farbe). Diese Farbstoffe werden genauso appliziert wie dies für histologische Färbeverfahren üblich ist. Sie lagern sich dabei entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften und ihrer färberischen Charakteristik in ganz bestimmten Obiektbereichen ein und lassen andere ungefärbt. Der ganze Vorgang wird "Fluorochromieren" genannt; die so erhaltene Fluoreszenz nennt man "Sekundärfluoreszenz". Fluorochrome sind bereits in ganz geringen Konzentrationen wirksam; in der normalen Durchlicht-Mikroskopie erscheinen deshalb fluorochromierte Präparate praktisch farblos. Trotzdem leuchten diese Präparate hell auf, wenn sie mit dem Licht einer geeigneten Wellenlänge angeregt werden. Während man früher nur ganz wenige Fluorochrome benutzte (Acridinorange), gibt es inzwischen eine reiche Auswahl mit verbesserten oder ganz neuen Spezifitäten (wobei man inzwischen festgestellt hat, daß einige in der Histologie längst bekannte Farbstoffe gleichzeitig sehr brauchbare Fluorochrome sein können, wenn sie mit dem Licht geeigneter Wellenlängen angeregt werden).

Die apparativen Voraussetzungen eines Fluoreszenzmikroskops sind:

# Lichtquelle:

Die Lichtquelle muß genügend Strahlung derjenigen Wellenlängen liefern, welche die gewünschte Fluoreszenz anregen. In der Regel wird dies eine Quecksilber-Höchstdrucklampe sein, aber auch Halogenlampen und Laser werden dafür eingesetzt.

# Anregungsfilter:

Der Anregungsfilter, auch Erreger- oder Excitationsfilter genannt, darf nur die Strahlung durchlassen, die für das verwendete Verfahren brauchbar bzw. notwendig ist und muß die Wellenlängen der von der Lichtquelle ausgehenden Strahlung zurückhalten, die nicht zur Anregung beitragen (sollen). Gewöhnliche Anregungsfilter sind:

- UV- oder U-Filter, die im UV-Bereich Fluorophore wie das DAPI (4,6-Diamidino-2phenylindole) und Hoechst 33342 anregen
- B-Filter, für Anregung im blauen Bereich für Fluorophore wie z. B. FITC (Fluorescein Isothiocyanat)
- G-Filter, Anregung im grünen Bereich wie im Falle von TRITC (Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat) oder *Texas Red*

# Sperrfilter:

Da überschüssiges, im Objekt nicht absorbiertes Erregerlicht die Fluoreszenz-Beobachtung stören würde, muß es mit einem Sperrfilter am Eintritt in die Okulare gehindert werden. Sperrfilter werden in der modernen Fluoreszenzmikroskopie auch benutzt, um bestimmte Spektralbereiche aus der Fluoreszenz-Emission herauszufiltern.

# Präparat:

Das Präparat muß in der Regel fluorochromiert worden sein.



Abb. 8: Prinzip eines Auflicht-Fluoreszenzmikroskops (nach Eckert und Hülser)

Prinzipiell unterscheidet man drei Fluoreszenz-Techniken:

- 1. Durchlicht-Hellfelderregung
- 2. Durchlicht-Dunkelfelderregung
- 3. Auflicht-Hellfelderregung

Bei der Auflichterregung (s. Abb. 7) wird das Erregerlicht durch das Mikroskopobjektiv auf das Präparat geschickt. Das Objektiv dient somit gleichzeitig als Kondensor. Dabei wird das Licht mit Hilfe eines dichromatischen Teilerspiegels (auch Farbteiler genannt) in den Strahlengang gelenkt. Dieser Teilerspiegel sorgt für eine saubere Trennung zwischen Anregungs- und Fluoreszenzstrahlung: die Anregungsstrahlung wird ungeschwächt in das Präparat gelenkt, die nach der Stokes'schen Regel längerwellige Fluoreszenzstrahlung des Präparats geht durch den Strahlenteiler durch. Bei der Auflichtfluoreszenz trifft die Erregungsstrahlung auf die Präparatoberseite. Hier entsteht also auch die stärkste Fluoreszenz. Dies ist besonders bei dickeren Objekten von Vorteil. Durch die hohe Intensität der Erregungsstrahlung kommt es aber oft zum schnellen "Verblassen" der Fluoreszenz.

#### 2.3 Durchlichtmikroskopie

Ein Mikroskop kann man als Kombination eines Diaprojektors mit einer Lupe beschreiben. Der Diaprojektor entwirft von einem Diapositiv auf eine transparente Projektionswand ein vergrößertes, umgekehrtes und seitenverkehrtes Bild. Dieser Teil der Abbildung entspricht der ersten Vergrößerungsstufe im Mikroskop mit dem Projektionsschirm als Zwischenbildebene und dem Diapositiv als Präparat. Dieses Bild auf der Projektionswand kann seinerseits noch vergrößert werden, wenn man das durchscheinende Bild hinter der Projektionswand mit einer Lupe betrachtet. Diese nochmalige Vergrößerung bezeichnet man als zweite Vergrößerungsstufe im Mikroskop. Die Aufgabe der Lupe übernimmt im Mikroskop das Okular. Das Auge entwirft schließlich auf der Netzhaut das endgültige Bild.



Abb. 9: Aufbau eines Durchlichtmikroskops (nach Eckert und Hülser)

#### 2.4 Prinzip einer CCD-Kamera

Bildverarbeitende Systeme sind charakterisiert durch die Größe der lichtempfindlichen Fläche, der Anzahl an Bildelementen (Pixel) und dem Bereich des Lichtniveaus indem der Detektor arbeiten kann. Die Lichtempfindlichkeit häuslicher Kameras ist definiert durch die Einheit *lux* (s. Abb. rechts).

Die CCD-Kameras (*charged coupled device*) enthalten als wesentliches Element Silicium, das Photonen absorbiert, welche direkt in eine Ladung umgewandelt (ein Elektron per absorbiertem Photon) werden. In kristalliner Form ist jedes Siliziumatom kovalent mit seinem Nachbaratom verbunden. Einfallende elektromagnetische Strahlung mit einer



Wellenlänge kleiner als 1  $\mu$ m besitzt genügend Energie, um eine Bindung aufzubrechen (s. Abb 11). Die Wellenlänge des einfallenden Lichts und der Photonabsorptionstiefe innerhalb des Siliciums korrelieren direkt. Je kürzer die Wellenlänge, desto geringer ist die Eindringtiefe in das Silicium. Bei einer Wellenlänge von ca. 1100 nm ist Silicium lichtdurchlässig und wird undurchlässig bei Wellenlängen unterhalb 400 nm.



Abb. 11: Siliciumgitter in verschiedenen Zuständen der Anregung

Wird ein Photon nun vom Silicium absorbiert, erfolgt die Freisetzung eines Elektons, das sich anschliessend frei im Siliciumgitter bewegen könnte. CCD's sind jedoch so aufgebaut, das das erzeugte Elektron gespeichert wird und daher ein solches Wandern im Kristall nicht auftritt. Daher entsteht im CCD ein Muster von Elektronen, das direkt dem Muster der einfallenden Photonen entspricht. Das nun entstandene Ladungsmuster kann mittels analoger Elektronik ausgelesen und digitalisiert werden, um eine genaue digitale Wiedergabe des auf die CCD-Kamera einfallenden Lichtbildes wiederzugeben.

Genauer betrachtet, besteht ein einzelner CCD-Chip aus einer dünnen Schicht aus Siliciumsubstraten bedeckt von zweidimensional angeordneten Poly-Siliciumelektroden, die von der Siliciumschicht durch eine Oxid-Isolierschicht getrennt werden (S. Abb. 12). Die Elektroden werden bei unterschiedlichen Potentialen gehalten, so das im Falle der belichteten CCD-Kamera die einfallenden Photonen durch die Elektroden wandern und die Erzeugung von Elektronen im *depletion layer* des Silicium Substrates verursachen. Die erzeugten Elektronen werden durch die angelegte Spannung an den Elektroden in Position gehalten und in den sogenanten *potential wells* gespeichert.



Abb. 12: Querschnitt eines CCD's

#### 2.5 Fluoreszenzspektroskopie

Für den Gebrauch von Fluoreszenzfarbstoffen im Experiment ist es wichtig zu wissen, bei welchem Spektralbereich ein Fluorochrom Anregungsphotonen absorbiert. Diese Information erhält man aus dem Absorptionsspektrum. Die Absorptionsmaxima der in der Biologie verwendeten Fluorochrome liegen im Bereich von UV- oder blauem Licht (300-500 nm). Die maximale Emission von Fluoreszenzlicht ist gegenüber dem jeweiligen Anregungsspektrum nach rot hin verschoben (Stokes'sche Regel). Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Wellenlänge wird durch das Emissionsspektrum beschrieben. Beide Spektren zeigen große Unterschiede zwischen verschiedenen Fluorochromen, und oft wird die Lage der Maxima durch das Lösungsmittel beeinflusst. Als Beispiel seien die spektroskopischen Eigenschaften des im Folgenden zu untersuchenden Grün-fluoreszierenden Protein (GFP, s. Abb. 13) beschrieben. Es ist mit 238 Aminosäuren ein kleines Protein, das natürlicher-weise in der Hochseequalle Aequorea victoria vorkommt. Diesem Organismus ermöglicht das GFP Biolumineszenz mit hoher Energieausbeute, indem es Anregungsenergie aus der Chemilumineszenz-Reaktion des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten Phosphoproteins Aequorin absorbiert und abstrahlt. Das GFP besteht aus einem von elf ß-Faltblättern geformten Fass, das von einer zentralen  $\alpha$ -Helix (s. Abb. 13 in rot) durchzogen wird. Die fluorophore Gruppe unterbricht die  $\alpha$ -Helixstruktur, so dass sie sich im Zentrum des Proteins befindet. GFP zeigt neben seinem für Proteine charakteristischem Absorptionsmaximum bei 280 nm, zwei weitere Maxima bei 397 nm und 447 nm, die die Eigenschaften des zentralen Chromophors wiedergeben. Die maximale Emission des Fluoreszenzlichtes von GFP nach Anregung des Proteins bei 397 nm und 447 nm liegt bei 506 nm und somit zu langwelligen Bereich verschoben.



Abb. 13: Dreidimensionale Struktur des GFP's



**Fluorophore Gruppe** 



Eine Flüssigkeit, in der eine fluoreszierende Substanz (ein Fluorochrom) gelöst ist, zeigt Fluoreszenz, wenn sie mit Licht bestrahlt wird, das geeignet ist, die Fluorochrom-Moleküle anzuregen. Fluoreszenz kann am besten in einem 90°-Winkel zur Achse des Anregungslichtes beobachtet werden, weil so eine Überlagerung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht vermieden wird. In Fluoreszenzphotometern ist aus diesem Grund der Lichtdetektor rechtwinklig zum Anregungslicht angeordnet. Um Anregungslicht aus dem weißen Licht einer Lampe herauszufiltern, werden meistens Interferenzfilter eingesetzt. Diese Filter werden so gewählt, dass sie eine hohe Transmission im Bereich des Absorptions-maximum des Fluorochroms zeigen, außerhalb dieses Wellenlängenbereiches aber keine Transmission haben.



Abb. 14: Aufbau des im Praktikums verwendeten Fluoreszenzphotometers

# 2.6 Experimenteller Teil

#### 2.6.1 Autofluoreszenz Methanogener Bakterien

Eines der typischen Eigenschaften methanogener Bakterien ist ihre Ausstattung mit spezifischen Co-Enzymen. Ein Beispiel stellt das Co-Enzym  $F_{420}$  dar, das unter Verwendung spezifischer Filter den Bakterien eine grüne *Autofluoreszenz* verleiht.  $F_{420}$  ist ein Deazoflavin-Derivat mit einer niedrigen Potentialdifferenz (Redoxpotential),  $E_0$ , von -0,34 V und fungiert als primärer Elektronenakzeptor für Hydrogenasen und Format-Dehydrogenasen.

Im folgenden Versuch soll die Eigenfluoreszenz des Bakteriums *Methanosarcina barkeri* unter Verwendung verschiedener Filter betrachtet werden. Hierzu geben Sie bitte zunächst einen Tropfen Ethanol auf den Gummistopfen des Kulturröhrchens und durchtrennen den Stopfen mit der Kanüle ihrer Spritze. Beachten Sie dabei, dass das in den Röhrchen gebildete Gas der Bakterien den Spritzenstempel nach oben drückt. Entnehmen Sie dann langsam ca. 100 µl der Bakterienkultur und tragen diesen auf einen Objektträger auf. Legen Sie nun ein Deckgläschen auf die Probe und betrachten den Ansatz im Fluoreszenzmikroskop bei Anregung im grünen Bereich. Betrachten Sie die Bilder mit dem Software Programm *Capture* bei Integrationszeiten von 1-10 sek. Zur Bearbeitung können Sie die Bilder als TIFF-Dateien speichern und in *Adobe Photoshop 6.0* exportieren.

# 2.6.2*In vivo* Fluoreszenz-Mikroskopie mittels *Grün-fluoreszierendem Protein* (GFP) und *DAPI*

a.) Es wurden verschiedene GFP-Varianten entwickelt, um die Eigenschaften des Wildtyp-GFPs zu verbessern, und es damit geeigneter für die *in vivo*-Lokalisation von Proteinen zu machen. In den folgenden Versuchen wird die Variante S65T/V163A verwendet. Die S65T-Mutation bedingt eine rot-verschobene Anregung und damit eine bis zu 10-fach höhere Fluoreszenz. Die zweite Mutation (V163A) erhöht die Stabilität des Proteins.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe soll die Lokalisierung des Yrb1p-, Gsp1p- und Nup2p Proteins der Hefe dokumentiert werden. Die Proteine wurden zuvor mit dem GFP fusioniert. DasYrb1p ist ein zytoplasmatisches Protein, das um die Zellkernhülle konzentriert vorkommt. Gsp1p ist essentiell für das Wachstum und im Zellkern lokalisiert. Das Nup2p liegt als Kernporenprotein in der Kernhülle vor. Das Signal des GFPs kann direkt im Mikroskop visualisiert werden. Dazu werden 6  $\mu$ l Zellsuspension auf einen Objektträger pipettiert, mit einem 24 x 60 mm großen Deckglas abgedeckt und im Mikroskop unter Anregung mit Blaulicht betrachtet. Aufnahme und Bearbeitung der Bilder erfolgt wie in 2.4.1 beschrieben.

b.) Zur Färbung von DNA in Zellen wird der Farbstoff 2',6-Diamidinophenylindol (DAPI) verwendet. In diesem Versuch soll die DNA von Hefezellen betrachtet werden. Hierzu wurde den Zellen mit dem Nup2p fusionierten GFP in der logarithmischen Wachstumsphase DAPI (Endkonzentration 2,5  $\mu$ g/ml) zugegeben. Tragen Sie bitte wie oben beschrieben, 6  $\mu$ l der mit DAPI versetzten Suspension auf einen Objekträger, legen ein Deckgläschen auf die Probe und bringen den Reflektorschieber in die Position DAPI, d. h. Sie regen mit UV-Licht an. Aufnahme und Bearbeitung der Bilder erfolgt wie in 2.4.1 beschrieben.

## 2.6.3 Spetroskopische Eigenschaften von GFP und YFP

- a) Fluoreszierende Moleküle besitzten ihre größte Fluoreszenzintensität, wenn sie bei ihrem Absorptionsmaximum angeregt werden. Messen Sie die Absorptionsmaxima und bestimmen Sie die Maxima des Wildtyp GFPs und seiner Mutante und ferner des *yellow-fluorescent proteins* (YFP). Letzteres stellt eine Variante des GFP's dar (Austausch der Aminosäure Threonin zu Tyrosin in Position 203). Das jeweilige Protein wird dabei in einem Puffer bestehend aus 20 mM Tris/pH 8,1 und 150 mM NaCl auf eine Endkonzentration von 1 μM verdünnt.
- b) Messen Sie nun unter Verwendung des gleichen Puffers die Fluoreszenzspektren der drei Proteine bei der ermittelten Anregungswellenlänge und bestimmen Sie die Fluoreszenz-maxima
- c) Die Lage und Intensität der Absorptions- und Emissionsmaxima ist abhängig von dem Lösungsmittel. Messen Sie jeweils die Absorptions- und Fluoreszenzspektren des YFPs in folgenden Puffern:
  - 75 mM Phosphat und 140 mM NaCl, pH 6,0
  - 75 mM Phosphat und 140 mM NaCl, pH 7,0
  - 75 mM Phosphat und 140 mM NaCl, pH 8,0
  - 75 mM Acetat und 140 mM NaCl, pH 6,0
  - 75 mM Acetat und 140 mM NaCl, pH 7,0
  - 75 mM Acetat und 140 mM NaCl, pH 8,0

# 2.7 Literatur

Atkins, P. W.: Physikalische Chemie, 2. Auflage, VGH, 1996

Cantor, C. R. und Schimmel, P. R.: *Biophysical Chemistry; Part III*, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1980

Eckert, R. und Hülser, D. F.: Skriptum "Physikalisch-Technische Methoden in der Biologie", Universität Stuttgart

Göke, G.: *Moderne Methoden in der Lichtmikroskopie*, Kosmos-Verlag-Wissenschaft, Frank'sche Verlagsbuchhandlung Stuttgart, 1988

Horaoka, Y., Sedat, J. W. und Agard, D. A. Science 238, 36-41, 1987

Keltins, J. T. Jantonie van Leeuwenhoek 50, 383-396, 1984

Reichmann, J.: Handbook of Optical Filters for Fluorecence Microscopy, Chroma Technology Corp, 2000

Robenek, H.: Mikroskopie in Forschung und Praxis. GIT Verlag, 1995

#### 3. Sauerstoffbindung an Hämoglobin

## 3.1 Aufbau und Eigenschaften von Myoglobin und Hämoglobin

Der O<sub>2</sub>-Transport bei Wirbeltieren erfolgt durch Bindung an *Hämoglobin* (s. Abb. 15a). Das im Muskel enthaltene Myoglobin fungiert als Sauerstoffspeicher und es erleichtert die O2-Nutzung im Muskel. Das in den Erythrocyten lokalisierte Hämoglobin dient als Sauerstoffüberträger im Blut und spielt ebenso eine wichtige Rolle beim Kohlendioxid- und Protonentransport. Die kernlosen Erythrocyten besitzen die Form einer von zwei Seiten zu einer flachen Scheibe eingedrückten Kugel, was kleine Wegstrecken für Diffusionsprozesse zur Folge hat (die Diffusionszeit ist vom Quadrat der Wegstrecke abhängig!). Die Fähigkeit beider Proteine Sauerstoff zu binden beruht auf der Anwesenheit des Häms (prosthetische Gruppe), das aus einem organischen Teil, dem ProtoporphyrinIX und einem Eisenatom besteht. Das ProtoporphyrinIX (s. Abb. 15b) besteht aus vier Pyrrolringen, die durch Methinbrücken zu einem Tetrapyrrolsystem verknüpft sind. Vier Methyl-, zwei Vinyl- und zwei Propionatseitenketten hängen an diesem System. Das zweiwertige Eisenatom ist zentral mit zwei Haupt- und zwei Nebenvalenzen an die Stickstoffatome des Rings gebunden. Die beiden restlichen, senkrecht zur Hämebene angeordneten Nebenvalenzen, werden zur Bindung eines Histidinrestes des Globins und zur Bindung der entsprechenden Liganden (O<sub>2</sub>, aber auch H<sub>2</sub>O, CO, CN<sup>-</sup>, etc.) verwendet. Räumlich kann das Häm als ein Oktaeder beschrieben werden, bei dem das Eisenatom nicht ganz in der Ebene der vier Stickstoffatome liegt (s. Abb. 15b); der Abstand zum Histidin ist geringer als zu den oben genannten Liganden, was deren relativ leichte Austauschbarkeit erklärt. Der Austausch der Liganden ändert die Resonanzverhältnisse im Molekül. Dies kann man sich bei der Charakterisierung verschiedenen Hämoglobinderivate zunutze machen, da diese verschiedene der Absorptionsspektren besitzen (s. Tab. 1).

**(a)** 





Abb. 15a und b: Quartärstruktur des Hämoglobins mit gebundenem 2,3-Diphosphoglycerat (a) und die Struktur des Häms (b).

Das Hämoglobin erwachsener Menschen (HbA) besteht aus je zwei identischen  $\alpha$ - (141 Amiosäurereste) und  $\beta$ - (146 Reste) Polypeptidketten, die durch nichtkovalente Kräfte zusammengehalten werden. Jede besitzt eine Hämgruppe und somit eine Sauerstoffbindungsstelle. Die Bindung eines O<sub>2</sub>-Moleküls an eine der vier Ketten beeinflusst die Affinität des Proteins für weitere Bindungen von Sauerstoff positiv; die Bindung eines zweiten O<sub>2</sub> erhöht die Affinität noch mehr, etc. Wegen dieser sogenannten *kooperativen*  *Wechselwirkung* zwischen den Ketten kann das Hämoglobinmolekül die O<sub>2</sub>-Moleküle innerhalb eines wesentlich engeren Sauerstoff-Partialdruckbereiches aufnehmen oder abgeben, als es ohne diese Wechselwirkung möglich wäre. Dadurch wird Hämoglobin beim Sauerstoffpartialdruck in den Lungen (ca. 100 mbar) fast vollständig mit Sauerstoff beladen (*oxigeniert*) und beim Sauerstoffpartialdruck in den kleinen Blutgefäßen (ca. 26 mbar) weitgehend entladen (*desoxigeniert*).

Derivat	Wertigkeit des	Ligand	Absorptionsmaxima (nm)			Farbe	
	Eisenions						
Hämoglobin	3	$H_2O$	4	28		555	purpur
Oxy-Hämoglobin	2	$O_2$	414		540	576	hellrot
CO-Hämoglobin	2	CO	419		539	568	kirschrot
Hämiglobin	3	OH	404	500	540	576	braun
Hämiglobincyanid	3	CN	418		546		braunrot

Tab. 1: Charakterisierung der verschiedenen Hämoglobinderivate.

Im Gegensatz dazu besitzt das Myoglobin, das aus nur einer Polypeptikette besteht, eine größere Affinität zum Sauerstoff als Hämoglobin (s. Abb. 13a). Daher wird bei dem Sauerstoffpartialdruck, der in den kleinen Blutgefäßen vorliegt, Sauerstoff vom Hämoglobin abgelöst. Er diffundiert anschließend in die Muskelzellen und kann dort durch Myoglobin gebunden werden. Die Sauerstoffbindungskurve von Myoglobin entspricht einer einfachen Gleichgewichtsreaktion

$$MbO_2 \Leftrightarrow Mb + O_2$$
 (1)

Die Gleichgewichtskonstante K für die Dissoziation von Oxymyoglobin ist definiert als

$$K = \frac{[Mb][O_2]}{[MbO_2]},\tag{2}$$

wobei  $[MbO_2]$  die Konzentration von Oxymyoglobin, [Mb] die von (Desoxy)Myoglobin und  $[O_2]$  diejenige von ungebundenem Sauerstoff angibt. Der Grad der Sättigung *Y* von Molekülen Mb mit O<sub>2</sub> ist dann

$$Y = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2] + [Mb]}$$
(3)

Beim Einsetzen von K in Gl. 3 erhält man

$$Y = \frac{[O_2]}{[O_2] + K}.$$
 (4)

Da Sauerstoff ein Gas ist, wird seine Konzentration in  $pO_2$ , dem Sauerstoffpartialdruck angegeben; es ergibt sich:

$$Y = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}}.$$
 (5)

 $P_{50}$  ist definiert als der Sauerstoffpartialdruck bei dem 50 % der sauerstoffbindenden Zentren belegt sind. Gleichung 5 ergibt graphisch eine *Hyperbel (Michaelis-Menten Kurve*; s. Abb. 13a), die mit der experimentellen Bindungskurve des Myglobins übereinstimmt.

Die Bindung des Sauerstoffs an Hämoglobin läßt sich nicht mit Hilfe der *Michaelis-Menten-Kinetik* beschreiben. Dieser Bindungsverlauf ist aufgrund der kooperativen Wechselwirkung der vier Untereinheiten *sigmoid* (s. Abb. 13a). Ihre Sättigung ist ferner von den Faktoren der Temperatur und des pH-Wertes der Lösung abhängig. Der sigmoide Verlauf läßt sich durch folgendes Gleichgewicht ableiten:

$$Hb(O_2)n \Leftrightarrow Hb + nO_2$$

Hierfür ergibt sich

$$Y = \frac{(pO_2)^n}{(pO_2)^n + (P_{50})^n}$$

Durch Umformung erhält man daraus

$$\frac{Y}{1-Y} = (\frac{pO_2}{P_{50}})^n.$$

Diese Gleichung besagt, dass das Verhältnis von Oxyhäm (Y) zu Desoxyhäm (1-Y) der n-ten Potenz des Verhältnisses von  $pO_2$  zu  $P_{50}$  entspricht. Nimmt man von beiden Seiten der Gleichung den Logarithmus, so ergibt sich

$$\log \frac{Y}{1-Y} = n \log pO_2 - n \log P_{50}$$

Trägt man in einem sog. *Hill-Diagramm* [Y/(1-Y)] gegen log  $pO_2$  auf, so erhält man eine Gerade, deren Steigung, *n* (*Hill-Koeffizient*; s. Abb. 13b) das Ausmaß der Kooperativität angibt; der größtmögliche Wert für *n* ist gleich der Anzahl der Bindungsstellen.

#### **3.2 Der Bohr-Effekt**

Im Gegensatz zum Myoglobin zeigt das Hämoglobin eine starke pH-Abhängigkeit. Im physiologischen Bereich verschiebt eine Erniedrigung des pH die Sauerstoffdissoziationskurve nach rechts, so dass die Sauerstoffaffinität vermindert wird. Chemisch betrachtet ist Hb eine schwächere Säure als HbO<sub>2</sub>. Wird im peripheren Gewebe O<sub>2</sub> abgegeben, dann nimmt das Hb als schwächere Säure gleichzeitig Protonen auf. Pro mol O<sub>2</sub>, das abgegeben wird, können etwa 0,35 mol H<sup>+</sup> aufgenommen werden (*Bohr-Effekt*). Dies hat zur Folge, dass die Kohlensäure vermehrt in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> übergeht. Wird in der Lunge das Hb wieder mit Sauerstoff beladen, dann liegt wieder die stärkere Säure vor, H<sup>+</sup> wird abgegeben und reagiert mit HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O. Damit leistet der Bohr-Effekt einen wesentlichen Beitrag zum CO<sub>2</sub>- Transport und zur CO<sub>2</sub>-Ausatmung.



Abb. 16a und b: Sauerstoffbindungskurve des Myo- und Hämoglobins (a) und ein *Hill-Diagramm* für die Sauerstoffbindung beider Proteine.

Einen wesentlichen Beitrag zum Bohr-Effekt leisten das Histidin 146 und das Aspartat 46 der beiden  $\beta$ -Ketten. Die His-Seitenkette gelangt nach Abgabe des Sauerstoffs in die Nähe der Asp-24-Carboxy-Gruppe, wodurch die Protonierung begünstigt wird; folglich wird ein H<sup>+</sup> aufgenommen.

# 3.3 Diphosphoglycerat als allosterischer Effektor

2,3-Diphosphoglycerat (*DPG*) liegt im Erythrozyten in einer Konzentration von 4-5 mmol/l vor. Das tetramere Desoxyhämoglobin vermag ein Molekül DPG in seinen zentralen Höhle zu binden (s. Abb. 12a), von wo aus es alle vier Ketten beeinflussen kann. Die negativ geladenen Phosphat-Gruppen treten mit positiv geladenen Lys- und His-Resten in Wechselwirkung, wodurch die Sauerstoffaffinität stark sinkt. Bei der Sauerstoffbeladung wird das DPG wieder abgegeben. Die Reduktion der Sauerstoffaffinität ist entscheidend dafür, dass das Hämoglobin in den Gewebskapillaren Sauerstoff wieder abgeben kann.

# 3.4 Spektroskopische Messungen

3.4.1 Absorptionsspektroskopie

Die Wechselwirkung zwischen Strahlung und Materie wird von der Energie der Strahlung und der Art der Materie (Atome oder Moleküle) bestimmt. Für spektrometrische Methoden werden elektromagnetische Wellen verwendet, die auch das sichtbare Licht einschließlich der ultravioletten und der infraroten Nachbarbereiche umfassen. Für alle elektromagnetische Wellen gilt:

 $c=\lambda\cdot v$ 

Licht kann auf verschiedene Weise mit Materie in Wechselwirkung treten. Einige solcher Vorgänge sind die Reflexion, Brechung, Streuung und die Absorption.

v = Frequenz, c = Lichtgeschwindigkeit (3.10<sup>8</sup> m/s)

Unter Absorption von Licht versteht man die Eigenschaft einer Substanz, bei einer bestimmten Wellenlänge Lichtquanten aufzunehmen (absorbieren). Typischerweise wird die Absorption einer in Flüssigkeit gelösten Substanz in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke gemessen. Ein Absorptionsspektrometer ist in der Lage, bei verschiedenen Wellenlängen Unterschiede zwischen den Intensitäten des auf die Küvette einfallenden ( $I_0$ ) und des aus der Küvette austretenden Lichts (I) zu messen. Die vom Spektrometer angezeigte, dimensionslose Größe Absorption (A) ist als Logarithmus des Verhältnisses der Intensitäten von einfallendem und austretendem Licht definiert:

$$A = \log \frac{I_o}{I}.$$

Das *Lambert-Beer'sche Gesetz* beschreibt die Tatsache, dass die Absorption (*A*) einer Probe linear von der Konzentration der gelösten Substanz (*c*) und von der Schichtdicke der Küvette (*d*) abhängt.

$$A \sim c \text{ und } A \sim d$$
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Die Proportionalitätskonstante  $\varepsilon$  wird als *molarer Extinktionskoeffizient* einer Substanz bezeichnet. Er hat als Einheit M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> und gibt den Absorptionswert an, den eine 1 molare Lösung der Substanz bei 1 cm Schichtdicke hätte. Der molare Extinktionskoeffizient bezieht sich immer auf eine bestimmte Wellenlänge des Lichts und ist für jede Substanz und jede Wellenlänge eine charakteristische Größe. Absorptionsmessungen erlauben also bei bekanntem molarem Extinktionskoeffizienten die Bestimmung der Konzentration und der zeitlichen Konzentrationsänderung der Substanz.

Es ist sehr wichtig, dass man sich darüber klar ist, dass die Absorption bezüglich der Intensität der aus der Küvette austretenden Strahlung eine logarithmische Größe ist. Ein Absorptionswert von eins bedeutet, dass nur noch 10 % der einfallenden Strahlung wieder aus der Küvette austreten. Bei einer Absorption von drei sind es nur noch 0,1 % der einfallenden Strahlung. Dies bedeutet, dass bei hohen Absorptionswerten die Intensität der austretenden Strahlung extrem klein wird, so dass Absorptionsänderungen nicht mehr zuverlässig gemessen werden können. Aus diesem Grund sind Absorptionswerte über zwei prinzipiell unzuverlässig. Als Faustregel sollten Sie beherzigen, dass die Absorption der Probe nicht über 1,5 ansteigt. Sollte dies auftreten, so müssen Sie die Probe entweder verdünnen oder eine Küvette mit geringerer Schichtdicke verwenden. In diesem Zusammenhang sei auch die erhöhte Absorption durch Glas bei Wellenlängen < 340 nm verwiesen. Daher wird bei  $\lambda \leq 340$  nm Quarzglas oder Flussspat verwendet, welche erst unterhalb 200 nm merklich Licht absorbieren. Bei der Messung in Quarzküvetten (UV-VIS) oder Küvetten aus optischem Spezialglas (VIS) geht aber ein Teil des Lichts durch Reflexionen an den Küvettenoberflächen verloren. Um diesen Fehler zu eliminieren, führt man stets eine Vergleichsmessung gegen eine Küvette gleicher Schichtdicke durch, die die zu messende Substanz nicht enthält. Da bei der UV-VIS Spektroskopie meist in Lösung gearbeitet wird, enthält die Vergleichsküvette das reine Lösungsmittel (das in dem in Frage kommenden Spektralbereich selbst nicht absorbieren darf).

# 3.5 Experimenteller Teil

# 3.5.1 Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration

Die Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration erfolgt nach der Hämoglobincyanid-Methode. Hierbei oxidiert Kaliumhexacyanoferrat alles Hämoglobin zu Hämiglobin ( $Fe^{2+} \Rightarrow Fe^{3+}$ ). Dieses wird mit Kaliumcyanid in Hämiglobincyanid überführt (s. Tab. 1 in Kapitel 3.1). Die Hämiglobincyanid-Methode findet wegen folgender Vorteile auch im klinischen Bereich Anwendung:

- Das Absorptionsmaximum bei 546 nm ist flach, d. h. auch mit einfachen Photometern können reproduzierbare Resultate erzielt werden.
- Alle Hämoglobinderivate werden in Hämiglobincyanid überführt und damit erfaßt.

Für den folgenden Versuch erhalten Sie gereinigtes Hämoglobin, das in einer Konzentration von ca. 10 % (100 g Hämoglobin/l) vorliegt. Füllen Sie zwei Plastik-Küvetten mit je 3 ml *Drabkinlösung* (50 mg KCN, 200 mg Kaliumhexcyanoferrat (III), 1 g NaHCO<sub>3</sub>, aufgefüllt mit Aqua dest. auf 1 Liter; *giftig, daher Handschuhe tragen!*). Geben Sie mit einer Kolbenhubpipette 20  $\mu$ l Hämoglobin in eine Küvette und mischen Sie die Lösungen. Nehmen Sie ein Spektrum dieser Lösung im Bereich von 400 – 600 nm auf und notieren Sie sich die Extinktionswerte der Maxima. Stellen Sie im Photometer die Extinktion für den Leerwert (*Drabkinlösung* in der zweiten Plastik-Küvette) bei 546 nm auf Null. Messen Sie dreimal nach fünf Minuten die Extinktion der Hämiglobincyanidlösung. Übernehmen Sie die Werte der Nachbargruppen und bestimmen Sie das arithmetische Mittel und die Standardabweichung (s. Kapitel 3.4).



Berechnen Sie die Hämoglobinkonzentration (in %) unter Verwendung eines millimolaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  [mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>] für Hämiglobincyanid bei 546 nm von 44 und einer Molekularmasse des Hämoglobins von 64.500 g/mol.

# 3.5.2 Sauerstoffbindung von gereinigtem Hämoglobin

In diesem Versuch wird eine gereinigte Hämoglobin-Lösung, die als Oxyhämoglobin vorliegt, bei unterschiedlichen Luftdrücken inkubiert. In Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck sowie vom pH und der Temperatur stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Oxyhämoglobin (HbO<sub>2</sub>) und Hämoglobin (Hb) ein. Die Sauerstoffbindung wird photometrisch durch die Messung der Extinktion des jeweiligen Hb/HbO<sub>2</sub>-Gemisches bei 580 nm erfaßt.

(a) Hierzu stellen Sie durch Verdünnen mit Phosphatpuffer (pH 7,4 bzw. 6,8) jeweils 9,3 ml einer 0,072 %-igen HbO<sub>2</sub>-Lösung her. Überprüfen Sie die Richtigkeit der Verdünnung photometrisch mit Hilfe des Hämiglobincyanid-Nachweises (s. 3.6.1). Messen Sie auch hierbei zunächst ein Spektrum im Wellenlängenbereich von 400 – 600 nm.

(b) Deoxygenieren Sie nun die HbO<sub>2</sub>-Lösungen, indem Sie sie bei unterschiedlichen Temperaturen ( $25^{\circ}$ C,  $35^{\circ}$ C) unterschiedlichen Luftdrücken (150 mbar, 50 mbar) aussetzen und die Extinktionen solange in Abständen kontrollieren, bis sich ein stabiles Gleichgewicht zwischen HbO<sub>2</sub> und Hb ausgebildet hat.

- Stellen Sie hierzu zunächst die Extinktion des Puffers bei 580 nm auf Null. Messen Sie  $\Delta E_{HbO2}$ , deoxygenieren Sie die Lösung dann mit einer Spatelspitze Dithionit (Farbänderung beobachten) und messen Sie danach  $\Delta E_{Hb}$ .

 $\Delta E_{HbO2}$ :

 Pipettieren Sie nun 2,5 ml HbO<sub>2</sub>-Lösung in eine Plastik-Spezialküvette und verbinden Sie die Küvette (vergl. Abb. 16, Hahn geschlossen) mit dem Schlauch der Vakuumapparatur.

 $\Delta E_{Hb}$ :

- Stellen Sie den Luftdruck auf 50 oder 150 mbar und öffnen Sie danach den Hahn. Damit stellt sich auch in der Küvette ein Luftdruck von 50 bzw. 150 mbar ein.
- Verschließen Sie den Hahn der Küvette, nehmen Sie die verschlossene Küvette vom Schlauch ab und inkubieren Sie die Lösung im Wasserbad bei 25°C bzw. 35°C unter leichtem Schütteln. Indem Sie die Küvette schräg halten, erreichen Sie eine größtmögliche Oberfläche der Lösung.
- Messen Sie die Extinktion nach fünf Minuten.
- Schließen Sie nach der Messung die Küvette wieder an die Vakuumapparatur an und kontrollieren Sie durch Öffnen des Hahns, ob der Luftdruck stabil geblieben ist. Stellen Sie ihn notfalls wieder auf den gewünschten Wert ein und verschließen Sie den Hahn.
- Inkubieren Sie weiter, wie oben beschrieben, und messen Sie solange in Abständen von fünf Minuten  $\Delta E$ , bis sich der Wert um weniger als 5 % gegenüber der vorigen Messung ändert (Entspricht dem Gleichgewicht zwischen HbO<sub>2</sub> und Hb).

$\Delta E$ , Bedingung 1	$\Delta E$ , Bedingung 2
	ΔE, Bedingung 1

Für jede Gruppe werden die beiden Bedingungen (z.B. pH 7,4/150 mbar/25°C und pH 7,4/50 mbar/25°C) festgelegt. Tauschen Sie bitte anschließend die Daten untereinander aus.



Abb. 17: Aufbau des Experiments zur Sauerstoffbindung von gereinigtem Hämoglobin

Berechnen Sie für die Gleichgewichtsbedingungen (jeweils letzte Werte) die relativen Sauerstoffsättigungen des Hämoglobins. Ist die Konzentration des Gesamthämoglobins = 1, der Anteil an HbO<sub>2</sub> = x und demnach der von Hb = (1 - x), so setzt sich die Extinktion eines Gemisches anteilig aus den Teilextinktionen der Komponenten zusammen als

 $E_{\text{Gemisch}} = \mathbf{x} \cdot E_{\text{HbO2}} + (1 - \mathbf{x}) \cdot E_{\text{Hb}}.$ 

Die relative Sauerstoffsättigung berechnet sich somit als

$$\mathbf{x} = (\mathbf{E}_{Hb} - \mathbf{E}_{Gemisch}) / (\mathbf{E}_{Hb} - \mathbf{E}_{HbO2}).$$

Für die verschiedenen Bedingungen werden aus den so bestimmten relativen Sauerstoffsättigungen (x) die Werte für x/(1-x) und  $\log[x/(1-x)]$  in eine Tabelle eingetragen und in einem Diagramm ausgewertet.

Vergleichen Sie die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins bei

- 50 und 150 mbar Luftdruck (wie groß sind die Sauerstoffpartialdrucke, wenn Sie den Wasserdampfdruck unberücksichtigt lassen?),
- den beiden pH-Werten
- den beiden Temperaturen
- leiten Sie aus dem Ergebnis der Sauerstoffsättigung die Anzahl der Bindungsstellen (s. Seite 24) ab.

Diskutieren Sie die Ergebnisse im Hinblick auf die physiologische Bedeutung (Sauerstoffpartialdruck in den kleinen Blutgefäßen von ca. 30 mbar und in den Lungenalveolen von ca. 100 mbar; s. Kapitel. 3.6.3).

#### 3.6 Literatur

Atkins, P. W.: Physikalische Chemie, 2. Auflage, VGH, 1996

Cantor, C. R. und Schimmel, P. R.: *Biophysical Chemistry; Part III*, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1980

Darnell, J., Lodish, H. and Baltimore, D.: Molekulare Zellbiologie, Walter de Gruyter, 1994

# 4. Strukturelle Übergänge der DNA 4.1 Aufbau und Eigenschaften der DNA

Das Strukturmodell der DNA zeigt eine Doppelspirale aus zwei Bändern bestehend, die ähnlich einer Wendeltreppe durch Stufen miteinander verbunden sind. Die Bänder werden von den Zucker-Fünfringen und den Phospho-Diester-Brücken (s. Abb. 6) gebildet. Die basischen Ringe sind nach innen gerichtet, vergleichbar den Stufen einer Wendeltreppe, dadurch können ihre  $\pi$ -Elektronen in Wechselwirkung treten. Diese Stapelung der Basen (englisch: *base stacking*) trägt wesentlich zur Stabilität der Konformation bei. Die gegenüberliegende Basen sind gleichzeitig durch Wasserstoff-Brückenbindungen miteinander verbunden. Ein Purin-Ring (s. Abb. 6) bildet immer mit einem Pyrimidin-Ring ein Basenpaar, d. h. spezifische Wasserstoff-Brücken halten das Adenin an ein Thymin und das Guanin an ein Cytosin gebunden. Zwei gegenüberliegende Purin-Basen würden in der Doppelhelix zuviel Platz beanspruchen, während zwei gepaarte Pyrimidin-Ringe den Raum nicht ausfüllen würden. Die beiden Bänder haben entgegengesetzte *Polarität*, d.h. sie verlaufen *antiparallel*.

Wie das Strukturmodell in Abb. 17 zeigt, stehen die Zuckerreste der beiden Bänder nicht diametral gegenüber. Dies führt dazu, dass die Windungen der beiden Helices z. T. weiter entfernt sind, z. T. näher beieinanderliegen. Es gibt deshalb eine *große* (breite) *Furche* und eine *kleine* oder schmale *Furche* auf der Oberfläche der DNA-Doppelhelix.

Je nach Wasser- und Salzgehalt kann die DNA eine unterschiedliche Geometrie einnehmen. Der weitaus größte Teil der zellulären DNA liegt in der sogenannten *B-DNA* (Abb. 17a) vor, welche bei abnehmendem Wassergehalt in eine parakristalline *A-DNA* (Abb. 17b) übergeht, bei der die Basen gegenüber dem Zucker-Phosphat-Gerüst geneigt erscheinen und eine vollständige Windung 11 Basenpaare umfasst. Die strukturelle Ursache für das Vorkommen verschiedener DNA-Formen ist die Flexibilität chemischer Bindungen im Nukleotid. Diese Flexibilität betrifft alle Bindungen im Desoxyribose-Molekül und die Phosphatester-Bindungen, während die Pyrimidin- und Purin-Bindungen als flache Scheibe betrachtet werden können. Für den Übergang der B-Form in die A-Form der DNA ist der Verlust einer



Abb. 18: Strukturmodelle der B- (a), A- (b) und Z-DNA (c).

(a)

Schicht von Wassermolekülen entscheidend. Wenn diese Hydratationsschicht aufgelöst wird, ändert sich die Konfiguration der Desoxyribose. Dies wird deutlich, wenn Sie in der Desoxyribose die Folge  $C_1'-O_4'-C_4'$  als Bezugsebene betrachten. In der A-Form liegt dabei das  $C_3'$ -Atom, in der B-Form das  $C_2'$ -Atom oberhalb dieser Ebene; man spricht von der  $C_3'$ *endo-* bzw.  $C_2'$ -*endo-Konformation.* Sie können sich dies, wie auch die gesamten DNA-Strukturen, wie sie auch in der Abbildung 17a-c dargestellt sind, in dem Programm *Rasmol* anschauen. Die entsprechenden Dateien sind nach den DNA-Formen benannt. Indem Sie unter *Display* die Funktionen *Wireframe* und *Sticks* anklicken, haben Sie die Möglichkeit die strukturellen Details zu betrachten und unter der Funktion *Backbone* das Prinzip der Windung der beiden Bänder hervorzuheben. Zur Orientierung können Sie unter *Options* mit der Funktion *Labels* die entsprechenden Basen markieren.

	A-Form	B-Form
Basenpaare/Helixwindung	ca. 11	10,4 - 10,5
Abstand der Basenpaare	0,26 nm	0,34 nm
Winkel zwischen zwei Basen	33,1°	35,9°
Winkel zwischen Helixachse und Basenpaaren	71° - 77°	ca. 90°
Konformation des Zuckers	C <sub>3</sub> '-endo	C <sub>2</sub> '-endo

Tab. 2: Strukturmerkmale rechtsläufiger DNA-Formen

Neben den rechtsläufigen DNA-Helices ist auch eine linksläufige DNA-Form bei hohen Salzkonzentrationen und GC-reichen Abschnitten möglich. Sie wird als Z-Konformation bezeichnet, weil hier das Zucker-Phosphat-Gerüst zick-zack-förmig vorliegt (Abb.17c). Unter den Bedingungen hoher Salzkonzentration liegt der Desoxycytidin-Baustein in der *anti*-Konformation vor während der Desoxyguanosin-Baustein in *syn*-Konformation vorkommt. Diese Konformationen unterscheiden sich durch den Winkel, den die flache Scheibe des Pyrimidins bzw. Purins mit dem Zuckerrest eingeht: Zwischen 0 und 90° in der *anti*- und zwischen 90 und 270° in der *syn*-Konformation. Deswegen ist in der Z-DNA ein Dinukleotid, CpGp, die eigentliche Struktureinheit, wodurch der Zick-Zack-Weg der Helix verständlich wird. Schauen Sie sich auch diese Struktur im Programm *Rasmol* an.

# 4.2 Schmelzpunkt der DNA

Die Stränge der Doppelhelix trennen sich, wenn die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Nukleotidpaaren gelöst und die Basen-Stapelwechselwirkung aufgehoben werden. Diesen Vorgang erreicht man in vitro durch alkalische Umgebung oder Erhitzen. Erwärmt man die DNA, so bricht sie auf und der Anteil an einzelsträngiger DNA nimmt zu, wobei sich die physikalischen Eigenschaften wie die Viskosität, die Lichtabsorption und die optische Drehung ändern. Den Verlauf dieser "Schmelzkurve" kann man u.a. durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm detektieren. Einzelsträngige DNA absorbiert das Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm 1,4-mal mehr als doppelsträngige DNA (Hyperchromizität). Deswegen ist die Zunahme der Absorption ein Maß für den Anteil der Einzelsträngigkeit der untersuchten DNA-Probe. Das Profil der UV-Absorption als Funktion der Temperatur wird als Schmelzkurve bezeichnet. Diese Schmelzkurve zeigt einen mehr oder weniger stark ausgeprägten sigmoidalen Kurvenverlauf, womit gefolgert werden kann, dass der Denaturierungs- bzw. Renaturierungsprozess ein kooperativer ist. Als Schmelzpunkt wird diejenige Temperatur definiert, bei welcher 50% der Gesamtänderung der Absorption erzielt werden, d.h. bei der die Hälfte der untersuchten DNA einzelsträngig vorliegt. Der Schmelzpunkt ist bei definierten Versuchsbedingungen charakteristisch für die jeweilige Nukleinsäureprobe. Die Lage der Schmelzkurven (genauer des Schmelzpunktes) hängt vom Lösungsmittel ab: bei niedrigeren Salzkonzentrationen, erhöhtem pH-Wert der Lösung und in Anwesenheit einiger organischer Lösungsmittel verschieben sich die Kurven nach links. Ferner hängt das Schmelzverhalten und somit die Stabilität der DNA bei identischen Lösungsmittel-Bedingungen von der Art der untersuchten DNA ab. Ihre Stabilität ist eine direkte Folge des prozentualen Anteils von GC-Paaren, die über drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Je größer der molare Anteil an GC-Paaren in der DNA, desto höher liegt der Schmelzpunkt  $T_m$ . Der Schmelzpunkt ist die Temperatur, bei der die Hälfte der untersuchten DNA einzelsträngig vorliegt. Komplementäre DNA-Einzelstränge finden nach Erniedrigung der Temperatur wieder zum Doppelstrang zusammen. Die Geschwindigkeit der *Renaturierung* ist umso größer, je mehr gleichartige Sequenzen in dem Nukleotidgemisch vorhanden sind. Die Geschwindigkeit der Renaturierung wird ausgedrückt durch das Produkt aus DNA-Konzentration und Renaturierungszeit, den sogenannten  $C_ot$ -Wert. Die  $c_ot$ -Kurven haben eine große Rolle bei der Analyse der DNA auf repetitive Sequenzen gespielt.

Für die phänomenologische Beschreibung der Bildung einer Doppelhelix aus einzelsträngigen Nukleinsäuren werden verschiedene Modelle herangezogen. Die wesentlichen Schritte sind die "Keimbildung" (Nukleation) und die "Kettenfortpflanzung". Die verschiedenen Modelle unterscheiden sich im wesentlichen durch den Ort der Nukleation (z.B. nur am Kettenanfang, an beliebiger Stelle bzw. gleichzeitig an mehreren Stellen) und die Längen der sich ausbildenden Zwischenzustände. Für die Ableitung der thermodynamischen Daten verwenden wir das "Alles-oder-Nichts' Modell, welches aus nur zwei Zuständen besteht: Doppelhelix oder Einzelstrang und keine Zwischenzustände mit partieller Helixausbildung. Dieses Modell ist eine gute Näherung für kurze (<12bp) DNA-Doppelhelices. Je länger die DNA-Moleküle werden, umso häufiger kommt es jedoch vor, dass ein Teil schon getrennt, der andere aber noch gepaart ist. Die Prinzipien der Denaturierung-Renaturierung durch Zufuhr thermischer Energie gelten ebenso für RNA, DNA-RNA Hybriden und PNAs.

# 4.3 Experimenteller Teil

# 4.3.1 Bestimmung der Hyperchromizität

Im folgenden Versuch sollen Sie das Aufwinden (*Schmelzen*; s. Kapitel 4.1) der gereinigten DNA aus Lachs-Samen (*salmon sperm*) und dem Plasmid *pUC19* photometrisch betrachten. Geben Sie hierzu jeweils 1  $\mu$ l der DNA-Stammlösung zu 119  $\mu$ l eines Saline-Puffers (1,5 mM NaCitrat, 15 mM NaCl) und füllen diesen Ansatz in eine Quarzküvette. Zur Vermeidung von Verdunstung verwenden Sie bitte die entsprechende Schutzkappe der Küvette. Nehmen Sie dann jeweils ein Spektrum im Bereich 220-320 nm auf bei Temperaturen von 37°C und 100°C auf. Kühlen Sie anschließend die Probe wieder auf 37°C ab und nehmen ein erneutes Spektrum auf, um den Umfang der Renaturierung zu erfassen.

Behandeln Sie die Küvetten bitte mit der notwendigen Sorgfalt!

# 4.3.2 Bestimmung der Schmelztemperatur (*T<sub>m</sub>*-Wertes)

Die DNA aus *Chlostridium perfringens* und *Microccocus luteus* besitzen einen unterschiedlichen GC-Gehalt. Die Aufgaben im folgenden Versuch bestehen darin, sowohl die Schmelztemperaturen beider DNA-Moleküle in Abhängigkeit von der Salzkonzentration

als auch den GC-Gehalt beider DNA's zu bestimmen. Geben Sie auch hierbei 1  $\mu$ l der jeweiligen DNA-Stammlösung zum einen in 119  $\mu$ l eines konzentrierten Saline-Citrat-Puffers (0,15 M NaCitrat, 1 M NaCl) und zum anderen in 119  $\mu$ l eines verdünnten Saline-Citrat-Puffers (1,5 mM NaCitrat, 15 mM NaCl). Registrieren Sie die Extinktionszunahme dieser vier Ansätze bei 255 nm in Abhängigkeit von der Temperatur (50°C - 100°C). Für die Aufnahme sehr genauer Schmelzkurven muss die Temperaturänderung sehr langsam erfolgen (in der Regel über mehrere Stunden), damit bei jedem gemessenen Temperaturpunkt das Gleichgewicht zwischen Helix und Einzelstrang vollständig eingestellt ist. Für den Praktikumsversuch wählen Sie eine Temperaturerhöhung von maximal 2°C/min. Die Extinktionszunahme pro Temperaturzunahme können Sie in den Programm *SWIFT II* darstellen lassen.

Der GC-Gehalt wird aus der Schmelzkurve bei Anwendung folgender Gleichung ermittelt:

 $T_m = 176 - (2,6 - GC) \cdot (36 - 7,041 \cdot log[Na^+]);$  T in °C, [Na<sup>+</sup>] in Mol/l).

Gehen Sie im Protokoll bitte auf folgende Diskussionspunkte ein:

- Was versteht man unter kooperativen Übergang?
- Wie hilft der Begriff der "Kooperativität", die Kurvenform zu erklären?
- Welche Kräfte stabilisieren die Ausbildung der DNA-Doppelhelix?
- Was haben diese Kräfte mit der Kooperativität zu tun?

#### 4.4 Literatur

Atkins, P. W.: Physikalische Chemie, 2. Auflage, VGH, 1996

Cantor, C. R. und Schimmel, P. R.: *Biophysical Chemistry; Part III*, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1980

#### 5 Statistik

Bei Ihrer Auswertung sollen Sie eine Grundgesamtheit oder eine Stichprobe durch Maßzahlen charakterisieren. Die beiden in der Praxis wichtigsten Maßzahlen sind der *Mittelwert*, der die durchschnittliche Größe der Grundgesamtheit N oder der Stichprobe n kennzeichnet, und eine Angabe über die Streuung der Werte angibt. Im weiteren wird die Annahme gemacht, daß die Meßwerte eine Normalverteilung nach *Gauß* ergeben (s.u.). Eine genügend große Stichprobe wird vorausgesetzt. Der *arithmetische Mittelwert* ist definiert als:

$$\overline{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \text{ und somit als } \overline{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

$$(\mu = Mittelwert \ der \ Grundgesamtheit, \ \overline{x} = Mittelwert \ der \ Stichprobe)$$

Dieser allein reicht jedoch nicht aus, um z.B. eine Stichprobe zu beschreiben, wie folgendes Beispiel zeigt Stichprobe1: 1245 $\Rightarrow \overline{x}_1 = 3$ Stichprobe 2: 2,73,03,13,2 $\Rightarrow \overline{x}_2 = 3$ 

Beide Stichproben haben den Mittelwert  $\bar{x} = 3$ . Sie unterscheiden sich aber trotzdem wesentlich voneinander, denn die Werte der ersten Stichprobe liegen viel weiter auseinander (und auch weiter vom Mittelwert entfernt) als die Werte der zweiten Stichprobe. Um diesen Unterschied zu erfassen, braucht man noch eine weitere Maßzahl. Geeignet ist hierzu offenbar eine Zahl, die die Abweichung der Stichprobenwerte vom Mittelwert mißt. Man könnte die Spannweite der Stichprobe, d.h. die Differenz zwischen dem größten (Maximum) und kleinsten (Minimum) Stichprobenwert ermitteln. Es wird jedoch gefordert, daß ähnlich wie beim Mittelwert jeder Einzelwert in gewisser Weise mitberücksichtigt wird. Aus mathematischen Ableitungen hat sich die Bildung der Quadrate der Einzelabweichungen als günstig erwiesen. Diese werden auch als die kleinsten *Gauß'schen Fehlerquadrate* bezeichnet. Die Maßzahl, die man auf diesem Weg erhält, heißt *Varianz* oder *Streuung*. Sie berechnet sich für die Grundgesamtheit nach

$$\sigma^{2} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^{N} (x_{1} - \mu)^{2}$$

 $(\sigma^2 = Varianz \, der \, Grundgesamtheit)$ 

und für die Stichprobe nach

$$s^{2} = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^{n} (x_{i} - \overline{x})^{2} .$$

$$(s^{2} = Varianz \ der \ Stichprobe)$$

Aus der Wahrscheinlichkeitstheorie läßt sich die unterschiedliche Berechnung der Varianz für Grundgesamtheit und Stichprobe ableiten. Man muß im allgemeinen bei der Berechnung nur wissen, ob es sich um eine Grundgesamtheit oder eine Stichprobe handelt. (n - 1) bezeichnet man als die Anzahl der *Freiheitsgrade*, sie ergeben sich aus der Anzahl unabhängiger Einzelwerte. Die nichtnegative Quadratwurzel der Varianz heißt *Standardabweichung*.

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \mu)^2}{N}}$$

 $(\sigma = Standardabweichung der Grundgesamtheit)$ 

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \overline{x})^2}{n - 1}}$$

(s = Standardabweichung der Stichprobe)

Bei Taschenrechnern mit statistischen Programmen muß der Unterschied bei der Standardabweichung zwischen Grundgesamtheit und Stichprobe durch Auswahl der entsprechenden Funktionstaste beachtet werden. Die Größen-Varianz und Standardabweichung sind mit demselben Formelbuchstaben belegt, da beide in der Praxis gleichwertig verwendet werden. Für die obigen Beispiele ergeben sich somit:

Stichprobe 1:  $\bar{x} = 3$   $s^2 = 3,3$  s = 1,8Stichprobe 2:  $\bar{x} = 3$   $s^2 = 0,05$  s = 0,22

Die Streuung der zweiten Stichprobe ist also wesentlich kleiner. Durch Angabe von Mittelwert und Varianz bzw. Standardabweichung sind Stichproben meist ausreichend beschrieben.

Die Berechnung der Standardabweichung (bzw. Varianz) nach den Definitionsformeln ist ungünstig. Durch die Differenzbildung  $(x_i - x)$  von den relativ großen Zahlen entstehen sehr kleine Differenzen, die dann auch noch quadriert werden müssen. Durch Rundungsfehler entstehen Genauigkeitsverluste. Es gibt deshalb Berechnungsformeln für die Praxis. Bei ihnen werden die Differenzbildungen vermieden. Für die Standardabweichung einer Stichprobe ergibt sich somit

$$s = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - n \cdot \overline{x}^2}{n - 1}} \,.$$

Bei der Bestimmung von Stichproben möchte man gerne wissen, mit welcher Wahrscheinlichkeit sich die bei einer Stichprobe gefundene Größen auf die Grundgesamtheit ausweiten lassen. Die für eine Stichprobe ermittelten Werte (*Mittelwert, Varianz, Standardabweichung*) sind also nur Schätzwerte für die Grundgesamtheit. Man möchte z.B. wissen, wie weit der *Stichprobenmittelwert*  $\bar{x}$  vom *Mittelwert der Grundgesamtheit*  $\mu$ abweicht. Diese Abweichung bezeichnet man als *Standardfehler* (= Fehler des Mittelwertes = Standardabweichung des Mittelwertes). Wenn keine extremen Abweichungen der Stichprobenwerte  $x_i$  von der Normalverteilung um den Stichprobenmittelwert vorliegen, darf man annehmen, dass sich auch die Mittelwerte annähernd gleich großer Stichproben gleichmäßig um den Grundgesamtheitsmittelwert  $\mu$  verteilen. Die unbekannte wirkliche *Abweichung*  $\sigma \bar{x}$  kann durch den *Standardfehler*  $s \bar{x}$  abgeschätzt werden. Er berechnet sich aus der *Standardabweichung* s.

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{s^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}{n \cdot (n-1)}}$$

Das zusätzliche *n* in der Formel für den *Standardfehler s* (im Gegensatz zu Varianz und Standardabweichung) liefert eine Angabe über die Größe der Stichprobe. Je größer eine Stichprobe ist, desto genauer wird die Schätzung für die Grundgesamtheit. Der Standardfehler verkleinert sich dabei (*n* steht im Nenner), geht somit gegen  $\mu$ . (Die Genauigkeit ist dem Geduldsfaden des Experimentators direkt proportional). Der *Standardfehler* wird oft zusammen mit dem *Stichprobenmittelwert* zur Charakterisierung einer Stichprobe bezüglich der Grundgesamtheit angegeben:

$$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$$
 (z.B. 5 g ± 0,6 g).

#### 5.1 Literatur

Eckert, R. und Hülser, D. F.: Skriptum "Physikalisch-Technische Methoden in der Biologie", Universität Stuttgart