

Wenn die Chemie stimmt

Untersuchung der Reaktion zwischen Biotin und Streptavidin

Kurzfassung:

Kann man die chemische Reaktion von Biotin mit Streptavidin untersuchen? Die Reaktion zwischen Biotin und Streptavidin ist in wässriger Lösung mit bloßem Auge nicht wahrzunehmen. Um sie zu untersuchen, sind Hilfsmittel wie z.B. Fluoreszenzspektroskopie nötig. Dazu wird Biotin mit einem Fluoreszenzrest gelabelt. Ich habe einen Fluometer gebaut, der mithilfe zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie die Reaktion von gelabeltem Biotin mit Streptavidin sichtbar macht. Nun möchte ich herausfinden, ob ich die chemische Reaktion genauer charakterisieren kann.

Name und Anschrift des Teilnehmers, Betreuungslehrers und Schule

Teilnehmer	Vorname, Nachname	Kersten Schlosser
	Straße	Zum Mühlengrund 1
	PLZ, Ort	34560 Fritzlar-Züschen
Betreuer	Vorname, Nachname	Dr. Martin Holfeld
	Straße	Konrad-Muth-Str. 8
	PLZ, Ort	34576 Homberg
Schule	Schulname	Physikclub
	Straße	Kölnische Str. 89
	PLZ, Ort	34119 Kassel

Die Arbeit wurde erstellt von März 2008 bis März 2010



Inhaltsverzeichnis

1. Grundlagen zur chemischen Reaktion zwischen Biotin und Streptavidin.....	1
I. Ist eine Charakterisierung möglich?.....	1
II. Biotin, was ist das?	1
III. Streptavidin.....	1
IV. Wie reagieren die beiden Proteine miteinander?	2
V. Molekülmassen im Verhältnis	2
2. Wie messe ich die Reaktion?	3
I. Biotin mit Fluoreszenzrest	3
II. Was ist Fluoreszenz?	3
III. Versuchsaufbau	4
3. Überprüfung des Versuchsaufbaus mithilfe eines Farbstoffes	5
4. Messung zur Untersuchung des Fluoreszenzabfalls bei Zugabe von Streptavidin.....	5
5. Ungenauigkeiten in der Messreihe.....	6
I. Intensitätsvariation der Fluoreszenz nicht berücksichtigt	6
II. Lösung	6
6. Messungen zur Intensitätsvariation und Verdünnung durch dest. Wasser	6
7. Messreihe zur Temperaturabhängigkeit des Komplexes	8
I. Darstellung der Fluoreszenzintensität nach der Reaktion bei versch. Temperaturen	8
II. Schlussfolgerung	8
8. Messreihe zur Konzentrationsabhängigkeit des Komplexes	9
I. Halbe und doppelte Konzentration an Streptavidin	9
II. Problem.....	10
III. Weitere Konzentrationen	10
IV. Interpretation der Messreihen	10
9. Spektrometeraufnahmen bei verschiedenen Konzentrationen.....	11
10. Abschätzen systematischer Fehler	12
11. Fazit und Ausblick	12
12. Übertragung auf Forschung im Organismus	12
13. Danksagung	III
14. Quellen	IV
15. Literaturverzeichnis.....	IV
16. Anhang	V
I. Funktion zur Berechnung der Anzahl an freien Biotinmolekülen	V

II.	Temperaturabhängige Messungen im Einzelnen:.....	VI
III.	Konzentrationsabhängige Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen:.....	VIII

1. Grundlagen zur chemischen Reaktion zwischen Biotin und Streptavidin

I. Ist eine Charakterisierung möglich?

Kann die chemische Reaktion zwischen Biotin und Streptavidin charakterisiert werden?

Da die Reaktion zwischen dem Vitamin und dem Protein mit dem bloßen Auge nicht wahrzunehmen ist, sind Hilfsmittel wie z.B. die Markierung einer der Reaktionspartner nötig. Doch wie genau kann man damit auf entscheidende Eigenschaften schließen? Ich möchte in dieser Jugend-Forscht-Arbeit eine Möglichkeit zur Charakterisierung einer Komplexbindung darstellen, mit deren Hilfe es vielleicht möglich sein wird, die Forschung an markierten Substanzen im Organismus zu unterstützen.

II. Biotin, was ist das?

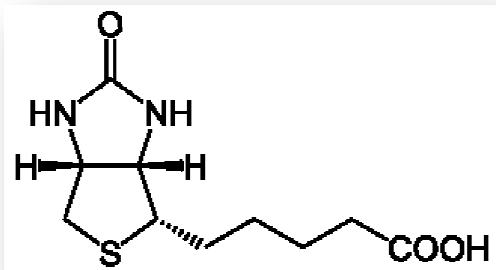


Abbildung 1: Strukturformel von Biotin

Biotin, in veralteter Form auch Vitamin H genannt, gehört zu der Gruppe der B-Vitamine. Die Funktion im Körper besteht im Übertragen von Carboxylresten und es nimmt an wichtigen Stoffwechselprozessen teil. Die Molmasse von Biotin liegt bei 244,31 g/mol (Q1).

Leidet man an einem Biotinmangel, so können Symptome wie z.B. Anorexie, Müdigkeit und Depressionen auftreten. Außerdem wird er auch mit dem plötzlichen Kindstod in Verbindung gebracht.

Daher ist es wichtig, Biotin über die Nahrung aufzunehmen. Der tägliche Bedarf liegt bei Erwachsenen zwischen 30-60 µg.

Wichtigste Biotinlieferanten (Anteil des Biotins pro 100 g):

- Trockenhefe (200 µg)
- Eigelb (50 µg)
- Sojabohnen (30 µg)
- Haferflocken (20 µg)

III. Streptavidin

Streptavidin, von Bakterien namens *Streptomyces avidinii* synthetisiert, ist ein Protein, das dem Avidin (Hühnereiweiß) sehr ähnlich ist. Eine Funktion im Körper nimmt dieses jedoch nicht ein. Streptavidin ist im Vergleich zu Avidin kein Glykoprotein und kann daher seltener unspezifische Bindungen eingehen. Außerdem besteht es aus vier identischen Untereinheiten, wobei jede dieser Untereinheiten aus 159 Aminosäuren besteht und ein Biotinmolekül binden kann.

Die Literaturangaben für die Molmasse von Streptavidin liegen zwischen $60000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ (Q2) und $67228 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ (Q3).

IV. Wie reagieren die beiden Proteine miteinander?

Biotin kann mit Streptavidin einen Komplex eingehen. Da Streptavidin aus 4 Untereinheiten besteht, kann ein Streptavidinmolekül mit vier Biotinmolekülen eine Komplexbindung bilden. Dabei ist Biotin das Zentralkomplex und wird von einer Untereinheit Streptavidin umschlossen. Weiterhin ist der Streptavidin-Biotin-Komplex die stärkste nichtkovalente biologische Bindung mit einer Dissoziationskonstante von $K_d = 10^{-15} \text{ M}$ (Q4).

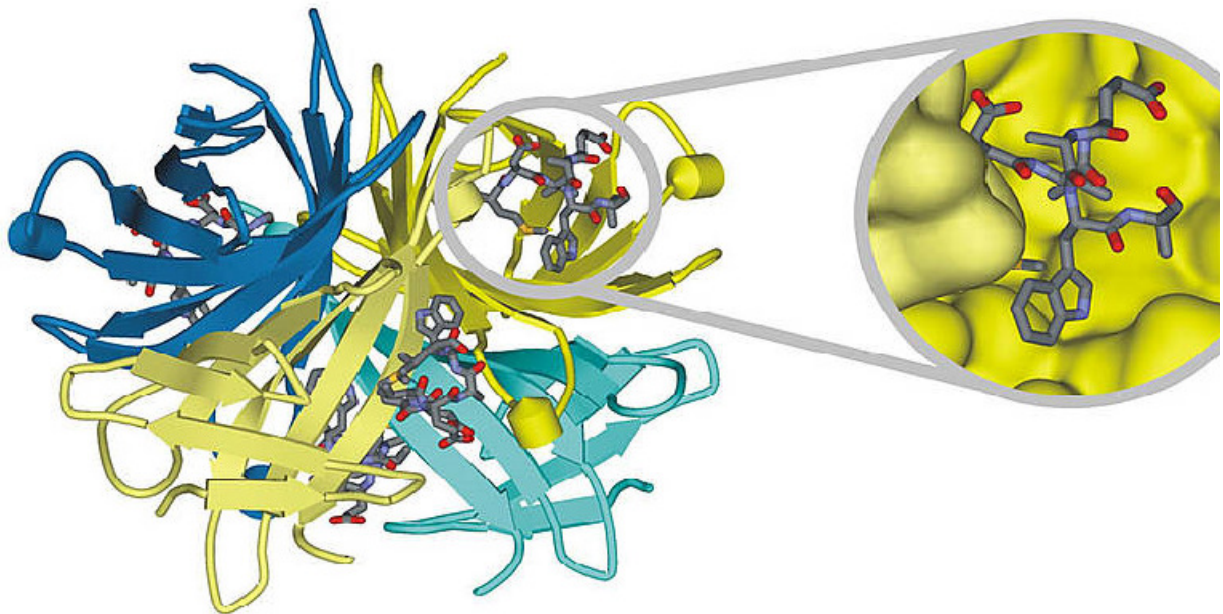


Abbildung 2: Komplexbindung zwischen vier Biotinmolekülen (grau) und einem Streptavidinmolekül

V. Molekülmassen im Verhältnis

Für Streptavidin gilt (Q 5):

$15 \text{ U} = 1 \text{ mg}$ ($1 \text{ U} = \frac{1}{15} \text{ mg}$) und 1 Unit (U) Streptavidin bindet $1 \mu\text{g}$ Biotin.

Diese Angaben überprüfe ich, indem ich den Quotienten der Stoffmengen (n) betrachte.

$$M_{\text{Strep.}} = 67228 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$M_{\text{Biotin}} = 244,31 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$m_{\text{Strep.}} = m_{\text{Biotin}} \Rightarrow \frac{1}{15} \text{ mg} = 1 \mu\text{g}$$

$$n_{\text{Strep.}} = \frac{m_{\text{Strep.}}}{M_{\text{Strep.}}} = \frac{\frac{1}{15} \cdot 10^{-3}}{67228} \frac{\text{g}}{\frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 992 \text{ pmol}$$

$$n_{\text{Biotin}} = \frac{m_{\text{Biotin}}}{M_{\text{Biotin}}} = \frac{10^{-6}}{244,31} \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 4,09 \text{ nmol}$$

$$\Rightarrow \frac{n_{\text{Strep.}}}{n_{\text{Biotin}}} = \frac{992 \cdot 10^{-12}}{4,09 \cdot 10^{-9}} \text{ mol} \approx \frac{1}{4}$$

Da ein Streptavidinmolekül vier Biotinmoleküle binden kann, ist die Stoffmenge von Streptavidin $\frac{1}{4}$ so groß wie die Stoffmenge von Biotin. Es zeigt sich, dass die Angaben (15 U = 1 mg (1 U = $\frac{1}{15}$ mg) und 1 Unit (U) Streptavidin bindet 1 µg Biotin) stimmen.

Für meine Messungen habe ich $\frac{1}{2}$, 1 und 2 mg Streptavidin in jeweils 10 ml dest. Wasser gelöst.

Dadurch lassen sich die Konzentrationen der drei Stammlösungen berechnen:

$$c = \frac{n}{V}; V = 0,75 \text{ cm}^3$$

$$c_{\text{Strep.0,5}} = \frac{n_{\text{Strep.0,5}}}{V} = \frac{7,44 \cdot 10^{-9} \text{ mol}}{10 \text{ cm}^3} = 744 \frac{\text{pmol}}{\text{cm}^3}$$

$$c_{\text{Strep.1}} = \frac{n_{\text{Strep.1}}}{V} = \frac{1,49 \cdot 10^{-8} \text{ mol}}{10 \text{ cm}^3} = 1490 \frac{\text{pmol}}{\text{cm}^3}$$

$$c_{\text{Strep.2}} = \frac{n_{\text{Strep.2}}}{V} = \frac{2,97 \cdot 10^{-8} \text{ mol}}{10 \text{ cm}^3} = 2970 \frac{\text{pmol}}{\text{cm}^3}$$

Weiterhin habe ich 1 mg Biotin in 1 l dest. Wasser gelöst. Da nun aber zu berücksichtigen ist, dass das Biotin mit einem fluoreszierenden Rest markiert ist, erhöht sich die Molmasse auf $M_{\text{Biotin}'} = 962 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ (Q4).

$$c_{\text{Biotin}'} = \frac{n_{\text{Biotin}'}}{V} = \frac{1093 \cdot 10^{-9} \text{ mol}}{1 \text{ dm}^3} = 1093 \frac{\text{nmol}}{\text{dm}^3}$$

Aufgrund der Größe der Küvette entnehme ich den Lösungen 2,5 ml Biotin und 0,75 ml Streptavidin:

$$c_{\text{Biotin}'} \cdot 0,0025 \text{ dm}^3 = 2,6 \text{ nmol}$$

$$c_{\text{Strep.1}} \cdot 0,75 \text{ cm}^3 = 1117,5 \text{ pmol}$$

$$\frac{2,6 \text{ nmol}}{1117,5 \cdot 10^{-3} \text{ nmol}} = 2,33$$

Es zeigt sich, dass eine Konzentration von $c_{\text{Biotin}'}$ bei erwähnter Entnahme der Lösung, das 2,33-fache der Konzentration von $c_{\text{Strep.1}}$ ist. Bedenkt man nun, dass ein Streptavidinmolekül vier Biotinmoleküle binden kann, müssten bei diesem Konzentrationsverhältnis alle Biotinmoleküle gebunden sein.

2. Wie messe ich die Reaktion?

I. Biotin mit Fluoreszenzrest

Biotin kann lokalisiert werden, indem es gelabelt wird. In diesem Fall ist es mit einem Fluoreszenzrest markiert. Kommt es nun zu einer Bindung des gelabelten Biotins an das Streptavidin, so geht ein Großteil der Fluoreszenz verloren, da der Fluoreszenzrest die Oberfläche des Streptavidins berührt (Q6). Aus diesem Grund kann die Fluoreszenzintensität als Maß an freien Biotinmolekülen gemessen werden, denn gebundenes Biotin fluoresziert kaum.

II. Was ist Fluoreszenz?

Unter Fluoreszenz versteht man eine besondere Art der spontanen Emission von Photonen.

Elektronen absorbieren die Energie des Lichts und wandern auf ein höheres Energieniveau, wenn die Energie einen bestimmten Wert hat (abhängig vom Molekül). In diesem Zustand

verweilen die Elektronen bis sie die Energie wieder abgeben. Dafür gibt es mehrere Möglichkeiten:

1. Am häufigsten wird die Energie in Form von Wärme abgegeben.
2. Durch Spinumkehr gelangen die Elektronen in einen energieärmeren Triplettzustand T, von dem aus sie durch erneute Spinumkehr in den Grundzustand S_0 gelangen und dabei Photonen emittieren, welches man als Phosphoreszenz bezeichnet.
3. Die Elektronen geben die Energie direkt in Form von Photonen ab und gelangen dadurch in den Grundzustand, was man als Fluoreszenz bezeichnet.

Allgemein wird das Verhalten von Elektronen bei Absorption von Energie mithilfe des Jablonski-Termschemas beschrieben.

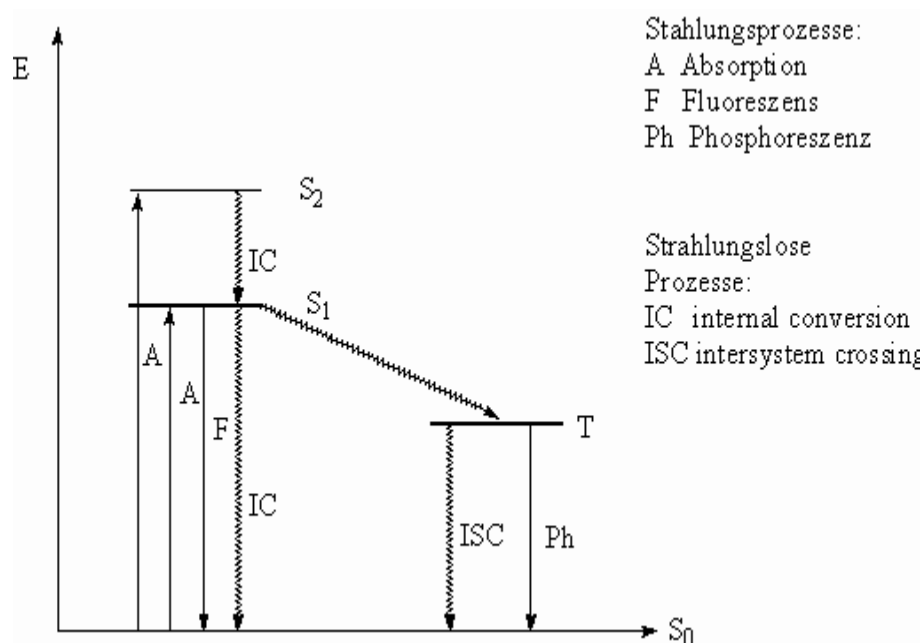


Abbildung 3: Jablonski-Termschema

Nach der Stokesschen Regel besitzen emittierte Photonen eine größere Wellenlänge als die absorbierten Photonen, da ein Teil der Energie für die strahlungslosen Übergänge (siehe oben) verbraucht wird und daher die Emission energieärmer ist.

III. Versuchsaufbau

Um die Fluoreszenzintensität von markiertem Biotin zu messen, habe ich einen „Fluometer“ gebaut.

In diesem Fluometer ist ein Laser (638 nm) auf eine Küvette gerichtet. Diese Küvette wird mit den entsprechenden Lösungen gefüllt. Die emittierenden Photonen treffen hinter der Küvette auf zwei Longpass-Filter (Q8), die mit einer Transmission von 80 % - 90 % nur Photonen über 650 nm durchlassen. Außerdem sorgt ein Rotfilter für das Absorbieren von Photonen außerhalb des rot-welligen Bereiches. Nach Passieren der Filter treffen

ankommende Photonen auf eine Fotodiode, die ein Photon in ein elektrisches Signal umwandelt, dass der PC in einen Datenpunkt überträgt.

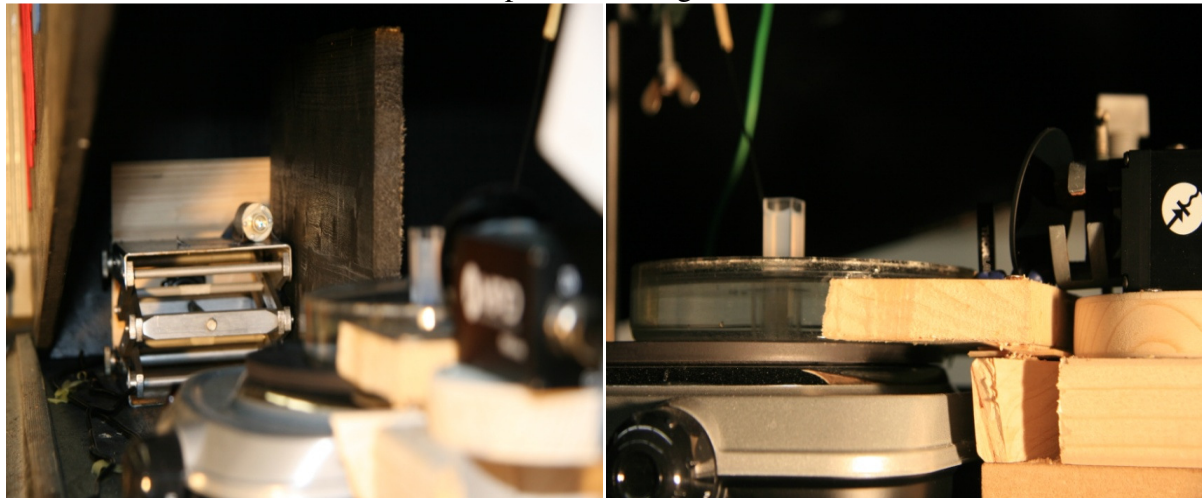


Abbildung 4: Laser (linkes Bild) schießt auf Küvette (rechtes Bild) und trifft nach Passieren von Filtern auf Fotodiode (r.)

3. Überprüfung des Versuchsaufbaus mithilfe eines Farbstoffes

Um die Filter auf Eigenfluoreszenz zu überprüfen und Fehler im Versuchsaufbau auszuschließen, habe ich in eine Küvette einen Farbstoff gegeben, von dem die Halbwertszeit der Fluoreszenz bekannt ist (Q9). Eine Messung der Fluoreszenz hat gezeigt, dass keine Eigenfluoreszenz der Filter vorhanden sind, da die gemessene mit der vorgegeben Halbwertszeit übereinstimmt.

4. Messung zur Untersuchung des Fluoreszenzabfalls bei Zugabe von Streptavidin

Zu Beginn der Messreihe habe ich die Gesamtintensität des Laserpulses mithilfe einer trüben Flüssigkeit gemessen. Da die trübe Flüssigkeit ähnlich verdünnt ist wie die Lösung mit fluoreszierendem Biotin, kann ich anhand der trüben Flüssigkeit den Laserpuls auf Fehler überprüfen. Ist der Laserpuls breiter als 70 ps, so muss der Aufbau überprüft werden. Danach zeichnete ich die Fluoreszenzintensität von Biotin vor und nach der Reaktion mit Streptavidin auf (in Abhängigkeit von der Zeit). Dabei sind die Konzentrationen, wie in Kapitel 1.5 berechnet, gewählt. Zur Auswertung habe ich das Integral jeder Fluoreszenzkurve berechnet, indem ich die Summe aller Produkte aus Breite und Höhe jedes Photonensignals in der Kurve berechnet habe.

Die Berechnung der Integrale ergibt die Einheit Photonenzahl, da es das Produkt aus $\frac{\text{Photonenzahl}}{\text{Zeit}} * \text{Zeit}$ ist. Ich setzte die Integrale, somit die Photonenzahl nach Zugabe von Streptavidin, in Verhältnis zu der Fluoreszenzintensität vor der Reaktion (100%). Diese werde ich im Folgenden nur noch als relative Photonenzahl bezeichnen.

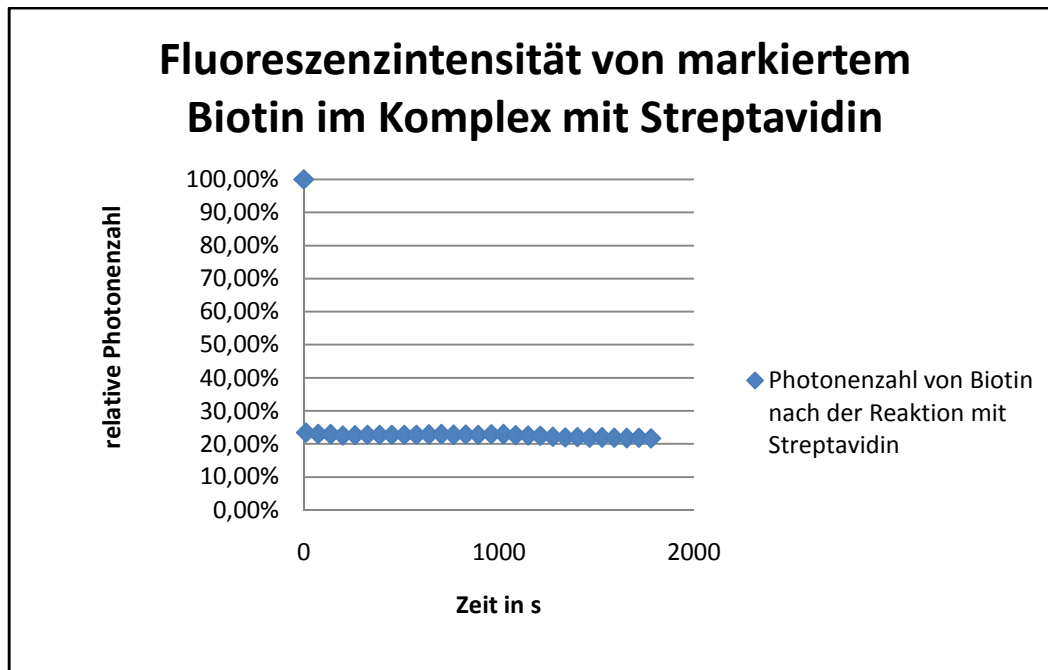


Abbildung 5: Fluoreszenzintensität vor und nach der Reaktion von Biotin mit Streptavidin

5. Ungenauigkeiten in der Messreihe

I. Intensitätsvariation der Fluoreszenz nicht berücksichtigt

Wie das Datenblatt von ATTO 633 zeigt (Q10), nimmt die Quantenausbeute des Farbstoffrestes mit der Zeit ab. Daher kann ein Fluoreszenzabfall auch auf das Sinken der Quantenausbeute zurückzuführen sein. Außerdem wird Streptavidin in dest. Wasser hinzu gegeben, wodurch die Fluoreszenzintensität womöglich durch die Verdünnung sinkt. Weiterhin ist der Einfluss der Temperatur nicht berücksichtigt.

II. Lösung

Das Fluoreszenzverhalten von reinem Biotin muss mithilfe einer Messung über denselben Zeitraum beobachtet werden wie die Fluoreszenz nach der Reaktion, um eventuelle Veränderungen zuordnen zu können.

Um den Einfluss von destilliertem Wasser und Temperatur auf die Fluoreszenz zu untersuchen, muss ebenfalls eine geeignete Messreihe durchgeführt werden.

6. Messungen zur Intensitätsvariation und Verdünnung durch dest. Wasser

Diese Messung untersucht das in 4.1 angesprochene Problem, dass die Fluoreszenzstärke der Lösung variieren kann. Dazu habe ich eine halbe Stunde lang die Fluoreszenzstärke von Biotin ohne Zugabe anderer Moleküle beobachtet. Das Verhalten wird in folgender Abbildung beschrieben:

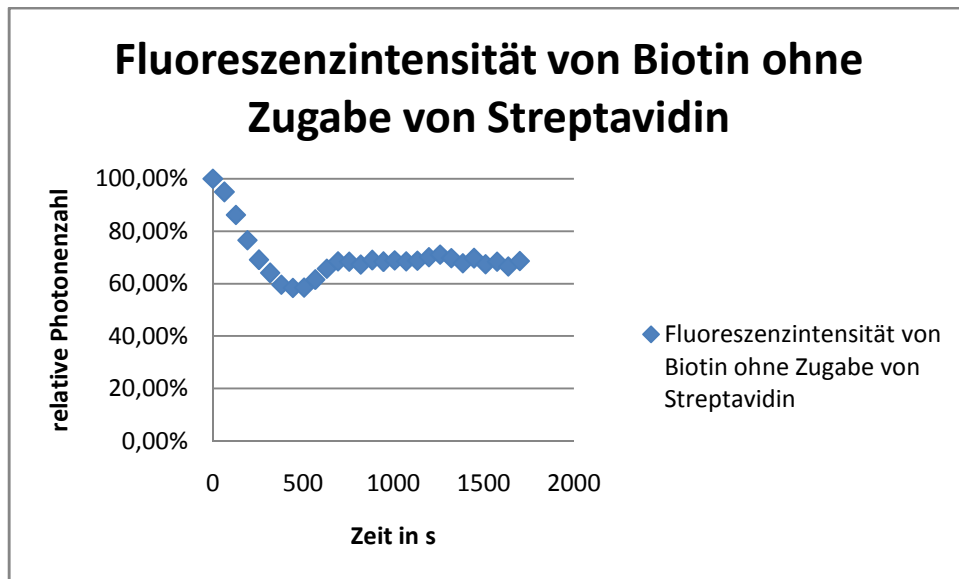


Abbildung 6: Fluoreszenzintensität von Biotin ohne Zugabe von Streptavidin

Die Abbildung zeigt, dass zu Beginn wesentlich mehr Biotin fluoresziert. Nach einer gewissen Zeit stabilisiert sich dies jedoch. Dies lässt sich vermutlich auf die Energieübertragung von angeregten Biotinmolekülen auf nicht-angeregte Moleküle zurückführen. Dabei stoßen besagte Moleküle aufeinander, wobei die Energie übertragen wird. Es erklärt den Abfall der Fluoreszenzintensität bis 500 s. Nach dieser Zeit gleichen sich Emission angeregter Moleküle und Energieübertragung auf andere Moleküle aus, was den weiteren Verlauf der Kurve erklärt.

Daher sollte mit dem Beginnen von Messreihen ca. 10-15 Minuten gewartet werden (in der Zeit wird das Biotin schon auf den Laser gerichtet), um eine stabile Fluoreszenzintensität des Biotins vorauszusetzen.

Danach folgte eine Messung, bei der ich 0,75 ml dest. Wasser in die Biotinlösung gegeben habe:

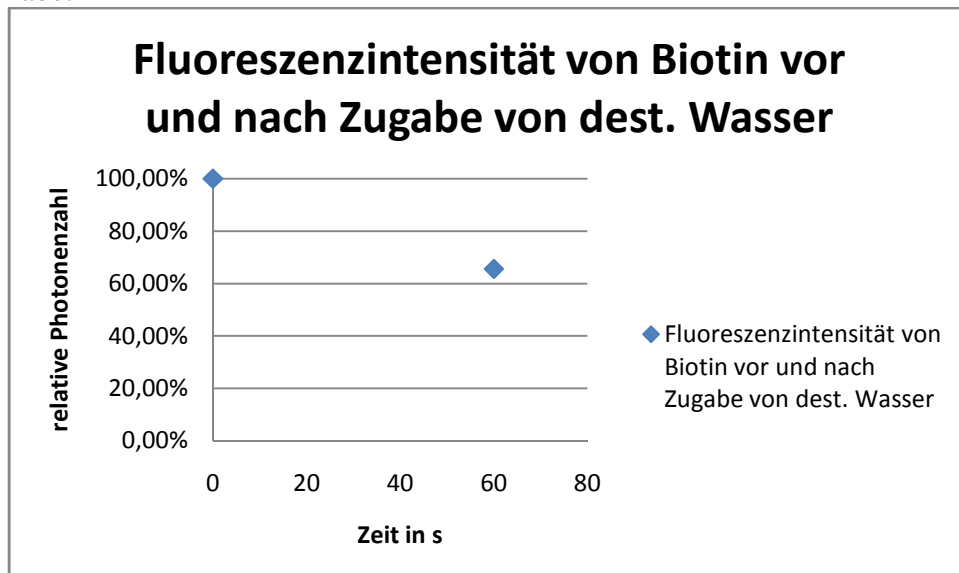


Abbildung 7: Fluoreszenzintensität von Biotin bei Zugabe von dest. Wasser

Die Abbildung zeigt (mit einem Fehler von $\pm 5\%$), dass durch die Zugabe von dest. Wasser die Fluoreszenzintensität um 30 % - 40 % abnimmt.

7. Messreihe zur Temperaturabhängigkeit des Komplexes

I. Darstellung der Fluoreszenzintensität nach der Reaktion bei versch. Temperaturen

In der folgenden Messreihe mit Streptavidin habe ich die Temperatur variiert. Die vorherige Messreihe wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nun messe ich von 30 °C-50 °C in 5-Grad-Schritten bei gleichbleibenden Konzentrationen die Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Streptavidin.

Bei der Auswertung habe ich die Fluoreszenzintensität nach der Reaktion nun in Verhältnis zur Fluoreszenzintensität von gelabeltem Biotin mit 0,75ml dest. Wasser gesetzt, da dies berücksichtigt werden muss.

Im Folgenden die Auswertung bei versch. Temperaturen:

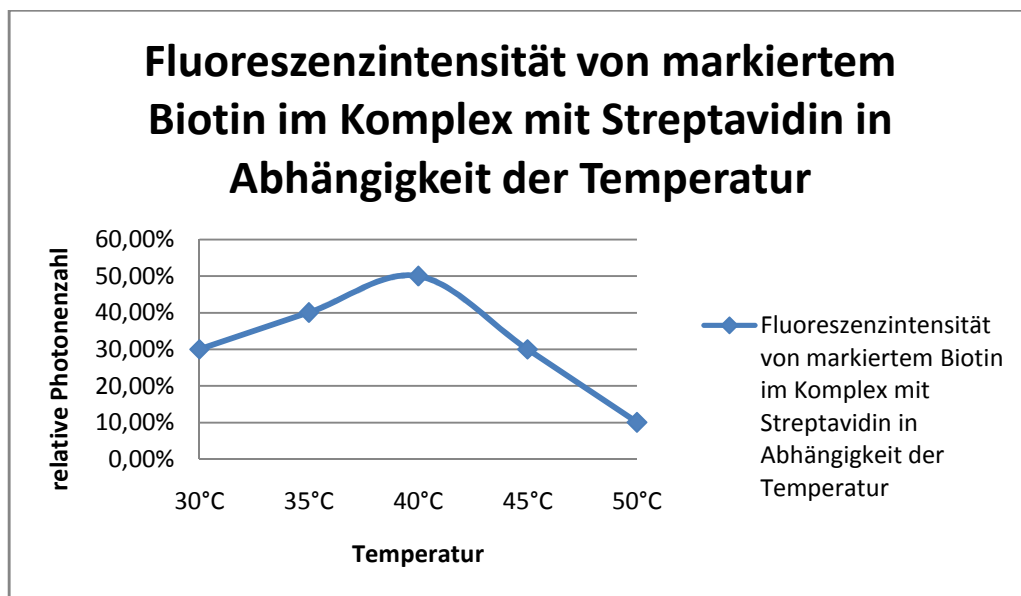


Abbildung 8: Fluoreszenzintensität von Biotin im Komplex bei versch. Temperaturen

II. Schlussfolgerung

Die Abbildung zeigt, dass eine einheitliche Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichen Temperaturen, trotz gleich bleibender Konzentration, nicht gegeben ist. Außerdem ist bei 40 °C die höchste Fluoreszenzintensität, danach nimmt sie wieder stark ab.

Da die Fluoreszenzintensität für die Anzahl ungebundener Biotinmoleküle steht, lassen sich aus den Ergebnissen folgende Hypothesen formulieren:

- Streptavidin denaturiert, was den Anstieg des Graphen bis 40 °C erklärt, da ein kontinuierlicher Anstieg freien Biotins mit der Temperatur folgt
- ab einer Temperatur von 40 °C tritt eine relevante Denaturierung des Biotins ein
- aufgrund der Hitzeempfindlichkeit werden zwischen 40 °C-50 °C mehr Moleküle zerstört als frei werden,
- eine erhöhte Dissoziation ist bei den Temperaturen aufgrund der extrem kleinen Dissoziationskonstante auszuschließen.

8. Messreihe zur Konzentrationsabhängigkeit des Komplexes

I. Halbe und doppelte Konzentration an Streptavidin

Nun verändere ich die Konzentration an Streptavidin bei gleichbleibender Temperatur von 20 °C. Ich nehme dazu die halbe ($c_{\text{Strep},0,5}$) und die doppelte ($c_{\text{Strep},2}$) Konzentration. Dazu habe ich eine Funktion definiert, die mir die Anzahl an freien Biotinmolekülen ($f(x)$) in Abhängigkeit der Konzentration an Streptavidin in $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ (x) berechnet (siehe Anhang 16. I). Es zeigt sich, dass bei halber Konzentration an Streptavidin ein geringer Teil der Biotinmoleküle frei sein müsste, bei doppelter Konzentration liegt nur ein noch größerer Überschuss an Streptavidin vor. Daher müsste die Fluoreszenz bei halber Konzentration zunehmen, da freie Biotinmoleküle vorhanden sind und bei doppelter Konzentration unverändert bleiben.

Dies ist das Ergebnis:

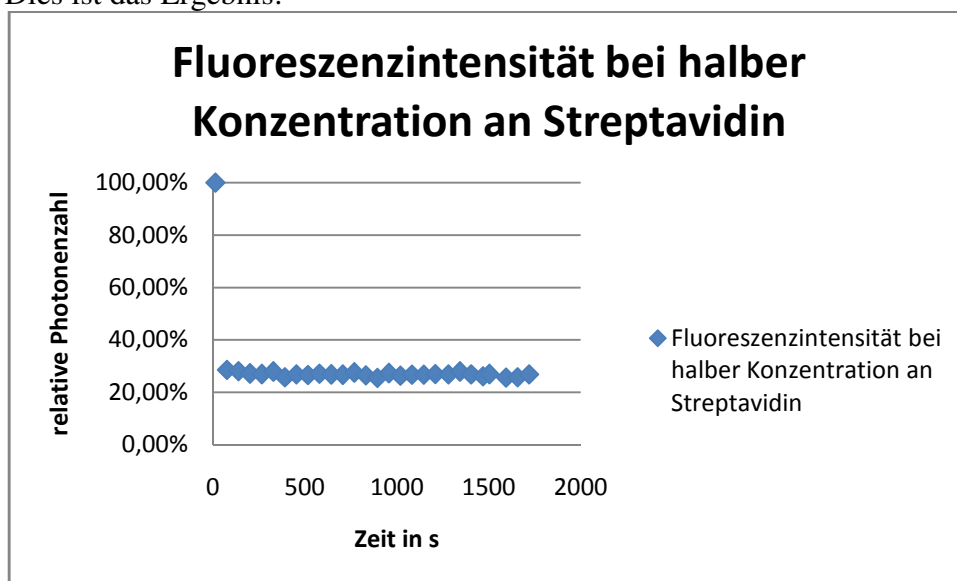


Abbildung 9: Fluoreszenzintensität bei halber Konzentration an Streptavidin

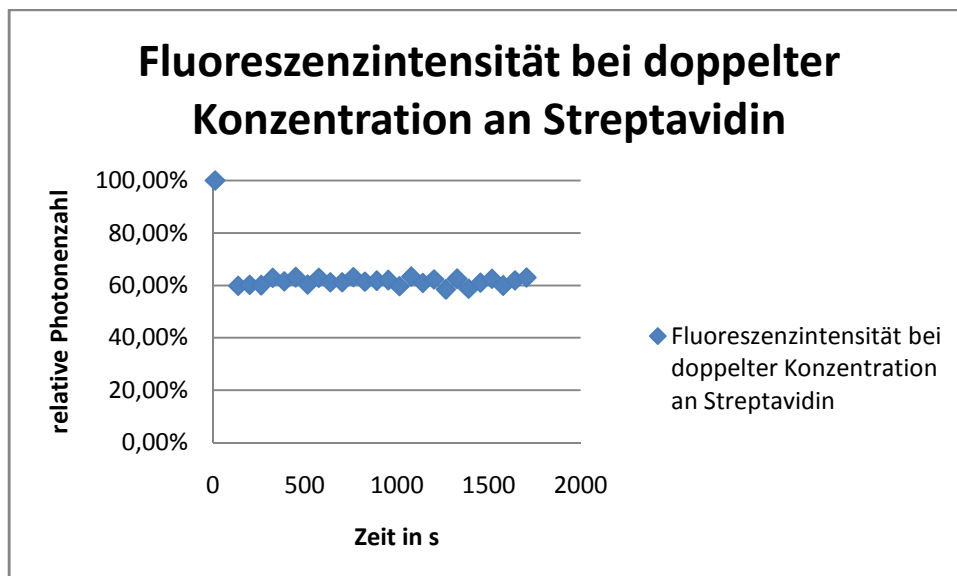


Abbildung 10: Fluoreszenzintensität bei doppelter Konzentration von Streptavidin

II. Problem

Die Messergebnisse erfüllen nicht die Erwartungen, dass bei halber Konzentration die Fluoreszenzintensität zunimmt, da ein Teil der Biotinmoleküle ungebunden ist, und bei doppelter Konzentration an Streptavidin gleichbleibt, weil alle Biotinmoleküle gebunden sind. Es zeigt sich, dass bei halber Konzentration an Streptavidin die Fluoreszenzintensität sinkt (Abb. 9) und bei doppelter Konzentration steigt (Abb. 10).

III. Weitere Konzentrationen

Da dieses Ergebnis nicht zu erwarten war, messe ich nun bei anderen Konzentrationen an Streptavidin die Fluoreszenzintensität von Biotin. Weiterhin habe ich mithilfe der Funktion f die Konzentrationen in die Anzahl an freien Biotinmolekülen umgerechnet (x -Achse). Für $0 < x < 1$ gilt, dass theoretisch alle Biotinmoleküle gebunden sein müssen. Je näher x gegen 0 strebt, desto größer ist der Überschuss an Streptavidin.

Hier das Ergebnis:

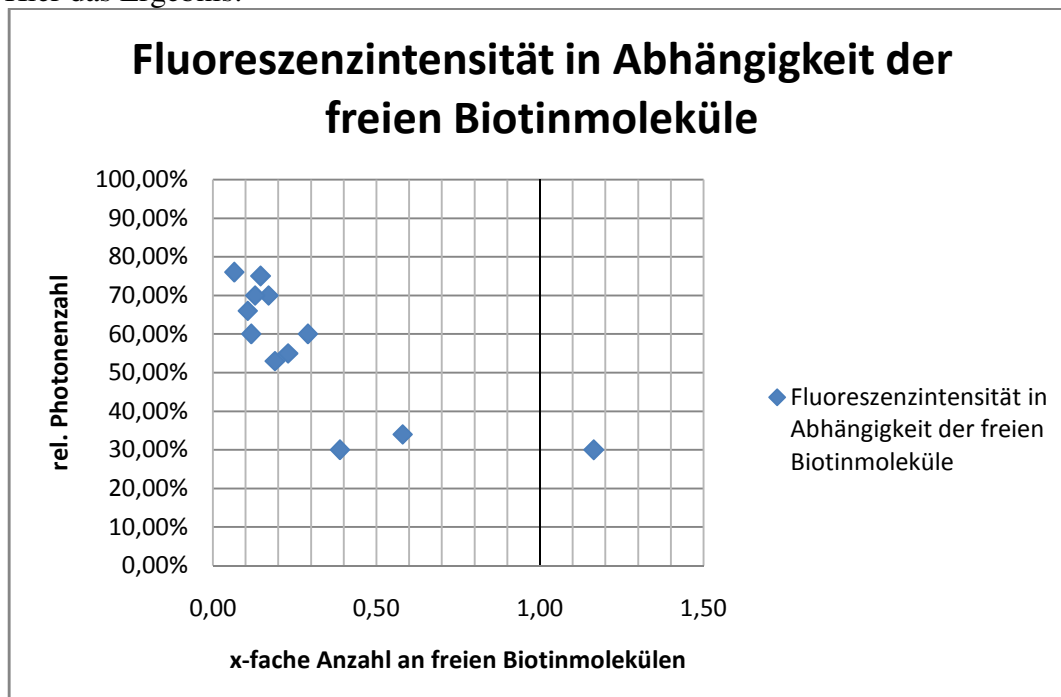


Abbildung 11: Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichen Konzentrationen an Streptavidin, für $0 < x < 1$ sind theoretisch alle Biotinmoleküle gebunden

IV. Interpretation der Messreihen

Leider ist mir zu dem Zeitpunkt der Messreihe ein Fehler beim Berechnen der Konzentrationen unterlaufen, da ich mit der Molekülmasse von Biotin ohne fluoreszierendem Rest gerechnet habe. Daher fehlen für $x > 1$ Messungen. Dennoch zeigt sich, dass die Fluoreszenzintensität tatsächlich mit steigender Anzahl an Streptavidinmolekülen zunimmt, obwohl theoretisch alle Biotinmoleküle gebunden sind. Das Ergebnis erscheint nicht sinnvoll, denn bis auf die Tatsache, dass die Moleküle weniger Raum haben, kann keine Veränderung in der Lösung stattfinden. Außerdem müsste eine steigende Anzahl an Molekülen im Raum eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zur Folge haben, da eine Kollision zweier Moleküle mit steigender Konzentration an Streptavidin immer wahrscheinlicher wird.

Dennoch lässt sich das Verhalten mit folgenden Hypothesen erklären:

- Nicht alle Biotinmoleküle gehen eine Komplexbindung ein.

- Die Fluoreszenzintensität von markiertem Biotin geht im Komplex mit Streptavidin nicht verloren.
- Über die Anzahl an freien Biotinmolekülen kann keine absolute Aussage gemacht werden.
- Streptavidinmoleküle unterstützen die Anregung des fluoreszierenden Restes des Biotins, da mit steigender Anzahl an Streptavidinmolekülen auch die Fluoreszenzintensität zunimmt.

9. Spektrometernaufnahmen bei verschiedenen Konzentrationen

Da ich bei meinem Versuchsaufbau Longpassfilter verwende, kann eine langwellige Verschiebung des Spektrums in Abhängigkeit der Konzentration an Streptavidin ein Grund für die Intensitätszunahme sein. Je größer der Anteil des Spektrums vom Biotin-Streptavidin-Komplex über 650 nm, desto größer ist die Fluoreszenzintensität, da mehr Photonen die Filter passieren. Daher habe ich mit einem Spektrometer das Spektrum von markiertem Biotin ohne Streptavidin und mit verschiedenen Konzentrationen an Streptavidin aufgezeichnet. Dazu wurde Licht mit einer Wellenlänge von 638 nm auf die Küvette gerichtet und mit einem Gitter die Emission spektral aufgelöst. Eine Photomultiplier tube registrierte ankommende Photonen (Q11). Bei Biotin ohne Zugabe von Streptavidin wurde das Signal 3-fach verstärkt und nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Streptavidin wurde das Signal jeweils 10-fach verstärkt, damit vergleichbare Werte messbar waren. Dies sind die Spektren:

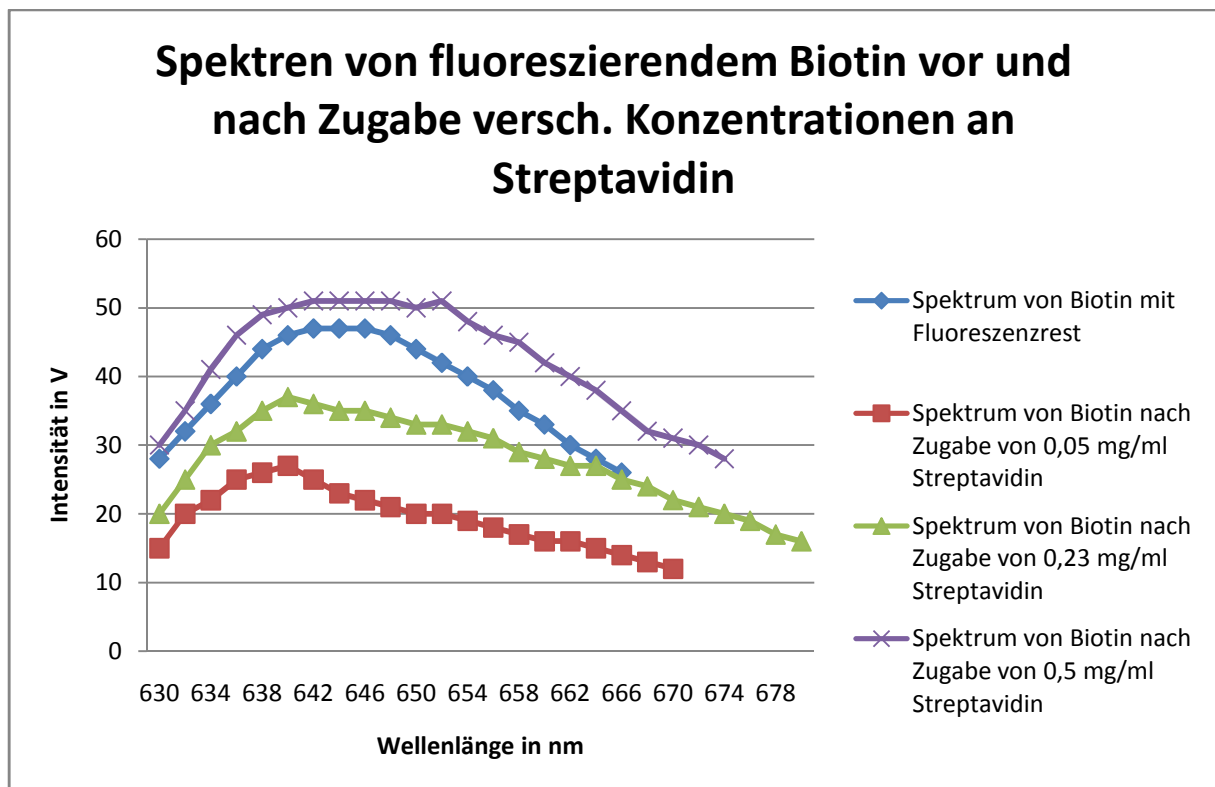


Abbildung 12: Spektren von Biotin ohne Streptavidin und nach Zugabe verschiedener Konzentrationen an Streptavidin

Die Spektren zeigen, dass mit steigender Konzentration die Fluoreszenzintensität zunimmt. Eine relevante langwellige Verschiebung des Spektrums ist jedoch nicht festzustellen. Damit lässt sich festhalten, dass die steigende Anzahl an Streptavidinmolekülen einzig eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bewirkt.

10. Abschätzen systematischer Fehler

Um den systematischen Fehler abschätzen zu können werden alle Komponenten, die Einfluss auf den Versuch nehmen können, auf ein Photonensignal überprüft:

- Nullrauschen der APD
- Küvette ohne Inhalt
- Küvette mit dest. Wasser
- Küvette nur mit Streptavidin

Es zeigt sich, dass das Nullrauschen der APD bei 16 Photonen pro Minute liegt und sowohl eine leere Küvette, als auch eine Küvette mit dest. Wasser und reinem Streptavidin gefüllt keine Fluoreszenz zeigt. Daher scheiden die 4 oben genannten Möglichkeiten als systematische Fehler aus.

11. Fazit und Ausblick

Einige Charaktereigenschaften konnten weitgehend eingeschränkt werden. So konnte ich feststellen, dass Streptavidin schon bei relativ niedriger Temperatur mit 30 °C-40 °C anfängt zu denaturieren. Weiterhin spielen höhere Temperaturen eine entscheidende Rolle, da mit steigender Temperatur die Wahrscheinlichkeit stetig sinkt, einen Biotin-Streptavidin-Komplex vorzufinden. Der Einfluss der Konzentration an Streptavidin ist noch nicht eindeutig feststellbar. Fakt ist, dass eine Veränderung dieser Konzentration einen Einfluss nimmt, entweder auf die Anzahl gebundener Biotinmoleküle oder auf die Fluoreszenz selbst. Das Verhalten für eine stetig sinkende Konzentration an Streptavidin muss weiter untersucht werden. Dort ist zu erwarten, dass mit sinkender Anzahl an Streptavidinmolekülen die Fluoreszenzintensität zunimmt, da die Anzahl an freien Biotinmolekülen steigt. Geht man jedoch von dem derzeitigen Stand der Messungen aus, so müsste die Fluoreszenzintensität weiter sinken, wenn Streptavidin fluoreszenzfördernd wirkt. Weiterhin möchte ich nun auch eine Messreihe mit Avidin machen, obwohl es zu Nebenreaktionen neigt, da es ein Glykoprotein ist. Dennoch werde ich damit das biophysikalische Praktikum der Uni Linz (Q6) simulieren (bis auf das Verfolgen der Reaktion „in real time“). Falls dies andere Ergebnisse ergibt, so zeigt sich ein Unterschied zwischen Avidin und Streptavidin bezüglich der Reaktion mit Biotin.

12. Übertragung auf Forschung im Organismus

Die Immunhistochemie behandelt die Verteilung von Antigenen mithilfe der Spezifität von Antikörpern. Diese Antikörper müssen jedoch ihrerseits lokalisiert werden. Dabei ist die Avidin-Biotin-Methode eine bevorzugte Variante, um Antigene zu lokalisieren. Dazu wird der primäre Antikörper mit einem sekundären Antikörper gekoppelt. Damit der sekundäre Antikörper keine unspezifischen Bindungen eingeht, „blockt“ man diesen, indem er mit Biotin markiert wird. Biotin wiederum geht einen Komplex mit Streptavidin ein, dass an einer zweiten Untereinheit ein Markermolekül, z.B. Meerrettichperoxidase (HRP), besitzt.

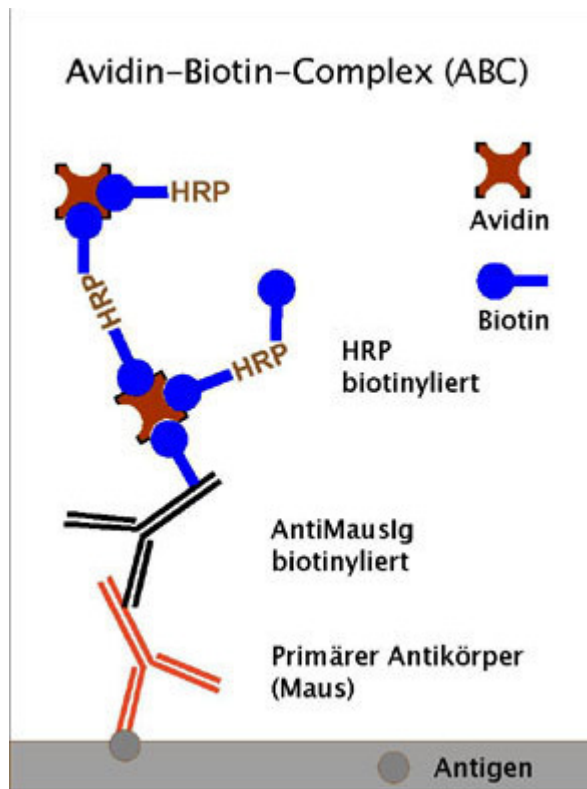


Abbildung 13: Grafik zur Darstellung der Avidin-Biotin-Methode in der Immunhistochemie (Q12)

Im Vergleich zu meinem Projekt ist der primäre Antikörper das Biotin mit Fluoreszenzrest, welches lokalisiert werden soll. Der Komplex wird ersetzt durch die Kopplung des Antikörpers an ein Antigen.

Mit dieser Methode könnten Krebszellen besser charakterisiert werden, wenn es der Forschung gelingt, spezielle Tumorantikörper auf die Krebszellen zu richten.

Die entdeckte Unstimmigkeit der Anzahl freier Biotinmoleküle in Abhängigkeit der Streptavidinkonzentration sollte im Hinblick auf diese Forschung näher betrachtet werden.

13. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich beim kompletten Physikclub für die jahrelange Unterstützung bedanken. Es ist jeden Freitag eine Freude den Physikclub zu betreten und eine Schar forschungslustiger Menschen anzutreffen, was ungemein motivierend wirkt. Besonders gilt mein Dank natürlich KP für seinen hohen Zeitaufwand. Außerdem danke ich sehr dem Julius, Henning, Lukas, Mechthild und vor allem Martin, der immer an meiner Seite stand.

Weiterhin einen riesen Dank an meine Eltern und meine über alles geliebte Anne, die immer für mich da sind, mich unterstützen wo sie nur können und für ihren seelischen Beistand. Danke!

14. Quellen

- (Q1) <http://de.wikipedia.org/wiki/Biotin>
<http://flexikon.doccheck.com/Biotin>
- (Q2) <http://www.weltbild.de/3/15456391-1/buch/avidin-biotin-interactions.html>
- (Q3) <http://de.wikipedia.org/wiki/Streptavidin>
- (Q4) <http://www.biologie.uni-erlangen.de/bc/jhofmann/BCF1script.pdf> (S. 50)
- (Q5) http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/streptavidin/EMD_BIO-189730/p_1bib.s1L780AAAEWdWEfVhTm
- (Q6) <http://www.bphys.uni-linz.ac.at/bioph/teach/prbioph/rlbind.htm>
- (Q7) http://www.atto-tec.com/fileadmin/user_upload/Katalog_Flyer_Support/ATTO633_biotin.pdf
- (Q8) <http://www.thorlabs.de/thorProduct.cfm?partNumber=FEL0650>
- (Q9) <http://de.wikipedia.org/wiki/Oxazine>
- (Q10) http://www.atto-tec.com/fileadmin/user_upload/Katalog_Flyer_Support/ATTO%20633.pdf
- (Q11) <http://psi.physik.kit.edu/english/103.php?PHPSESSID=c1784a27e40eb988c12aebdfb21fa4da>
- (Q12) <http://www.biologie.uni-regensburg.de/Zoologie/Schneuwly/Hofbauer/DROSI/strentw42.htm>
<http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?Type=Page&ID=DDDF4C6A-DF1E-40D5-A01D-870EA98CBF19>
<http://www.biophys.uni-frankfurt.de/~hauser/prakt/Fluoreszenzspektroskopie.pdf>
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1STP&bionumber=1>

15. Literaturverzeichnis

Principles of Fluorescence Spectroscopy von Joseph R. Lakowicz (3rd Edition)
Natura Genetik und Immunbiologie von Roland Frank, Ulrich Sommermann, Gerhard Ströhla

16. Anhang

I. Funktion zur Berechnung der Anzahl an freien Biotinmolekülen

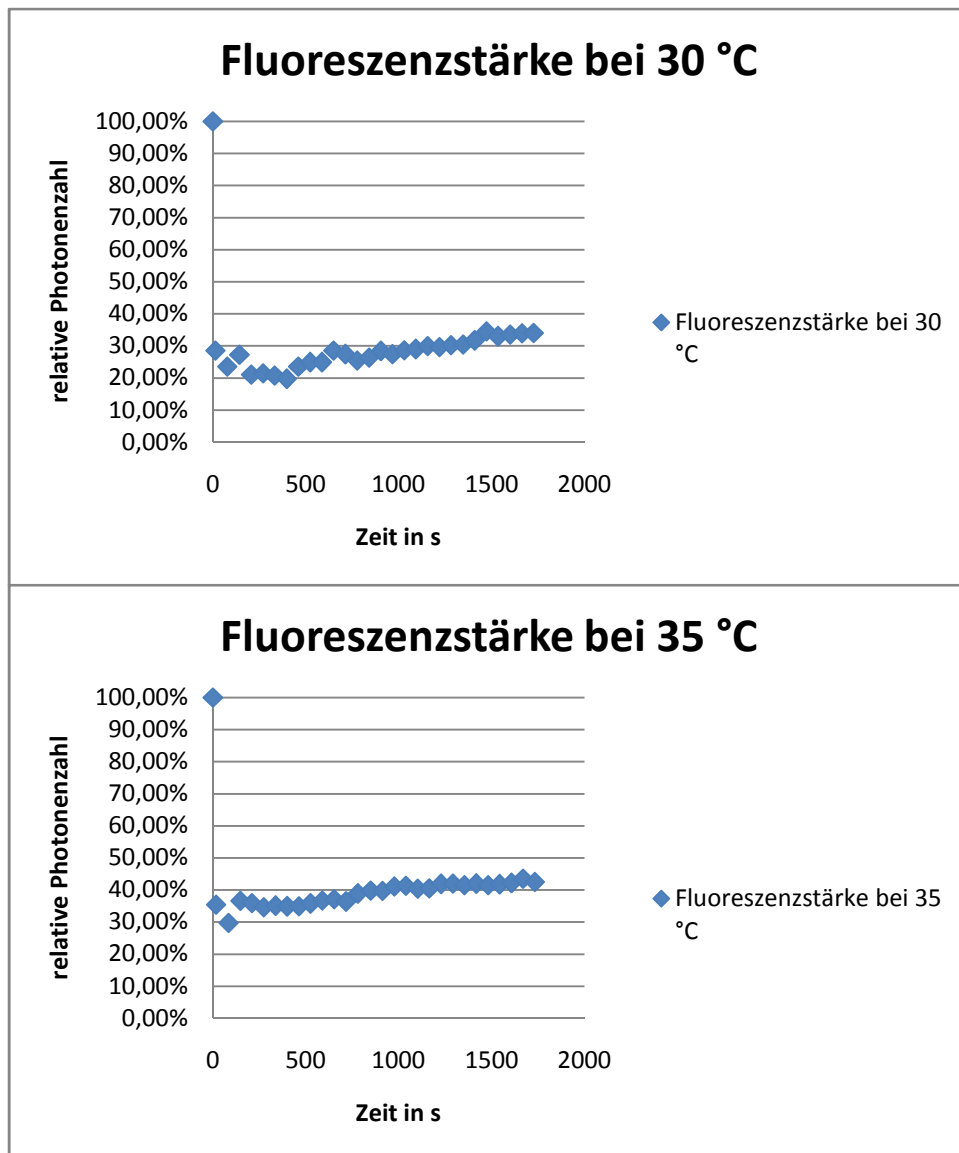
$$f(x) = \frac{\frac{c_{\text{Biotin}} * 0,0025 \text{ dm}^3}{c_{\text{Strep.}x} * 0,75 \text{ cm}^3}}{4} = \frac{\frac{2,6 * 10^{-9}}{x * \frac{10^{-3}}{67228} * 0,75}}{4} = \frac{218491}{3750000 * x}$$

x: Konzentration an Streptavidin in $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$

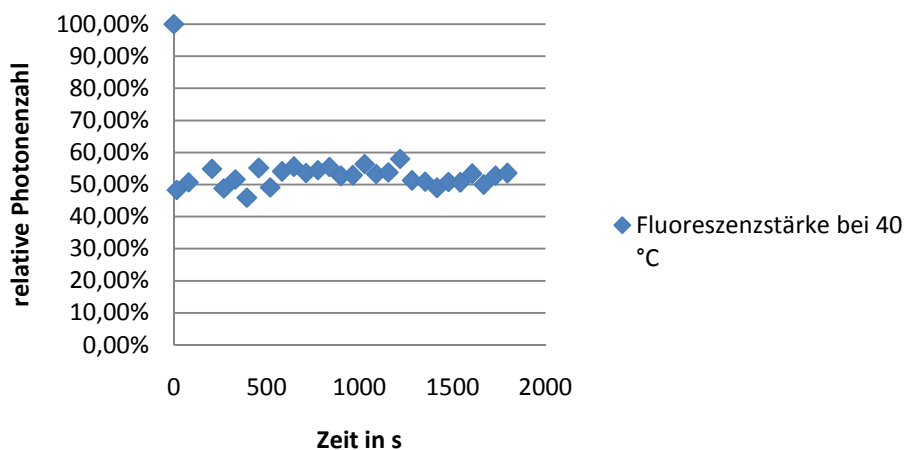
f(x): f(x)-fache Anzahl an freien Biotinmolekülen

Für $0 < x < 1$ sind alle Biotinmoleküle gebunden, für $x > 1$ sind freie Biotinmoleküle um den Faktor f(x) vorhanden.

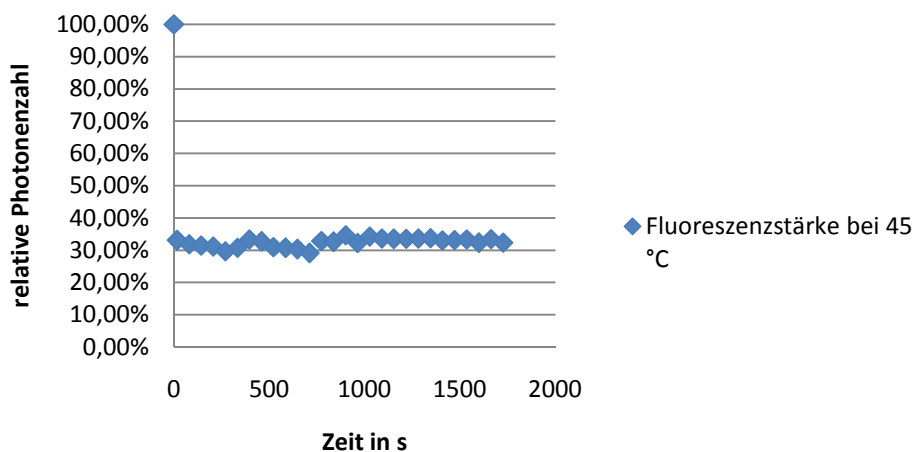
II. Temperaturabhängige Messungen im Einzelnen:



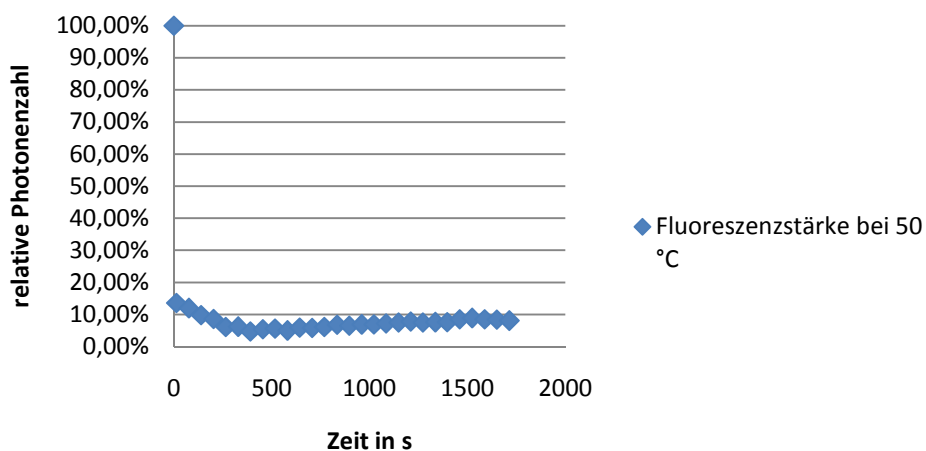
Fluoreszenzstärke bei 40 °C



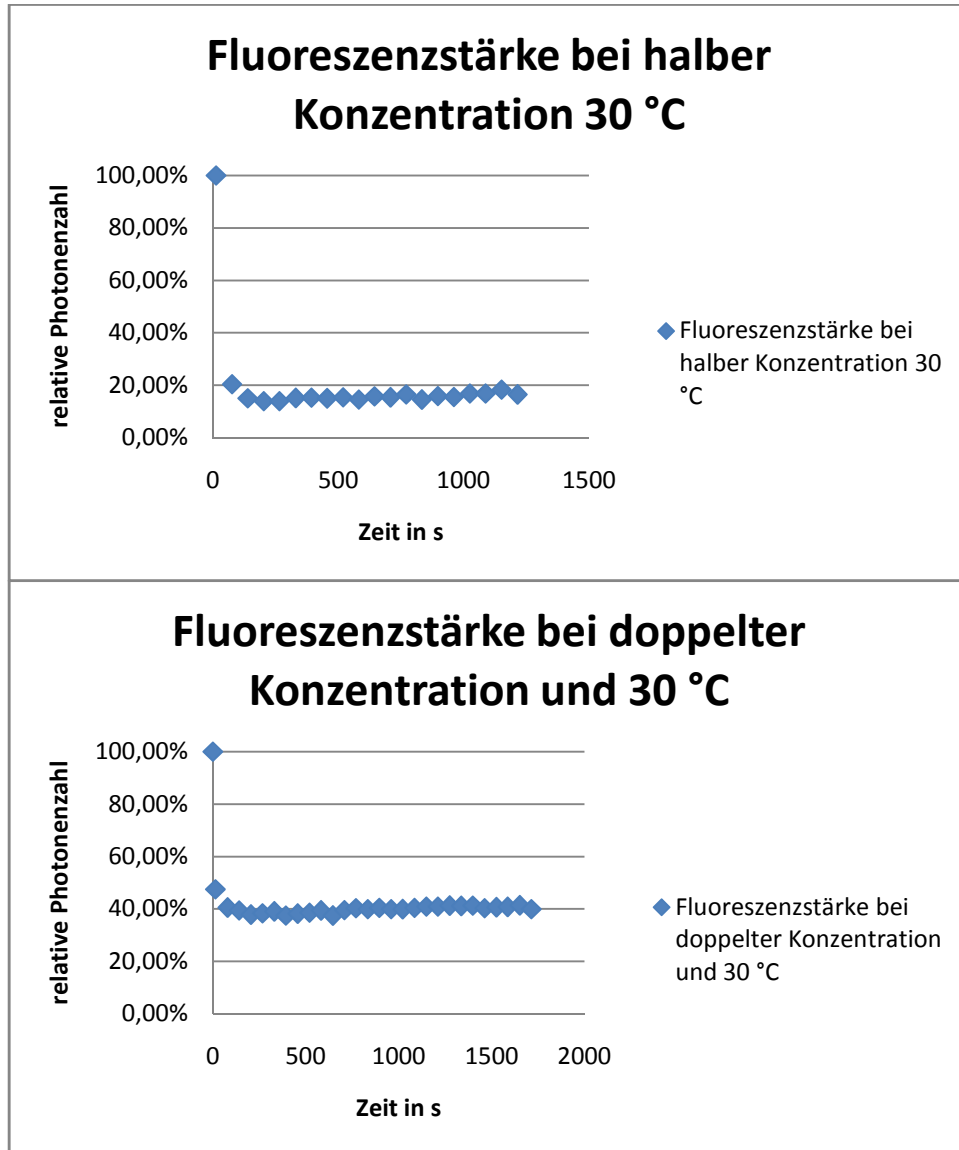
Fluoreszenzstärke bei 45 °C



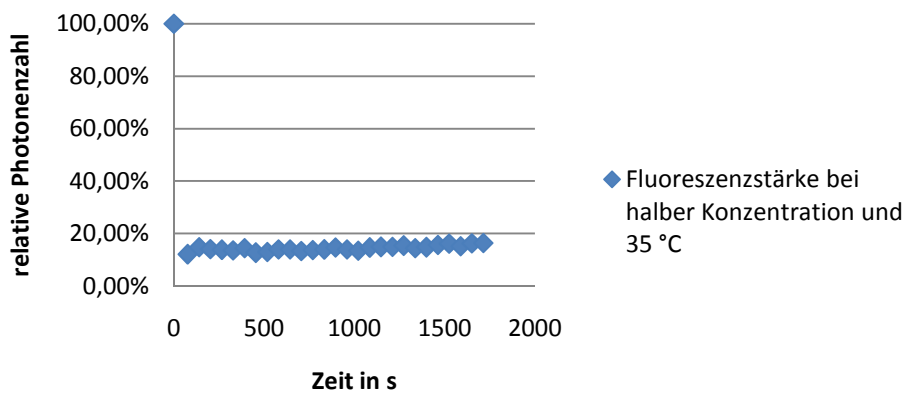
Fluoreszenzstärke bei 50 °C



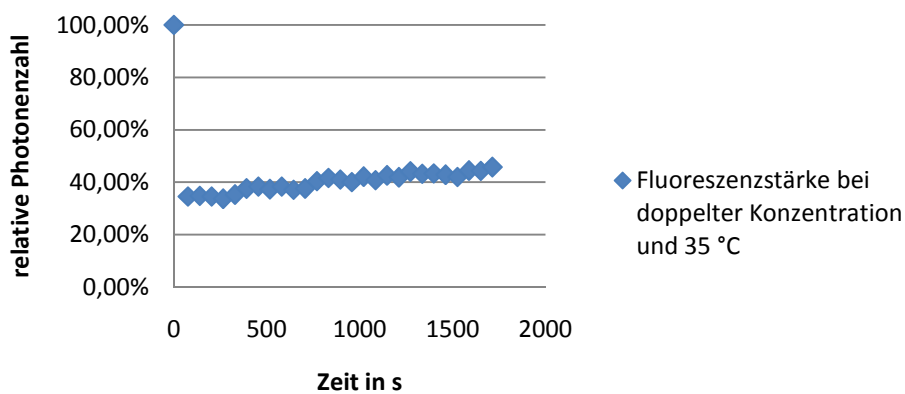
III. Konzentrationsabhängige Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen:



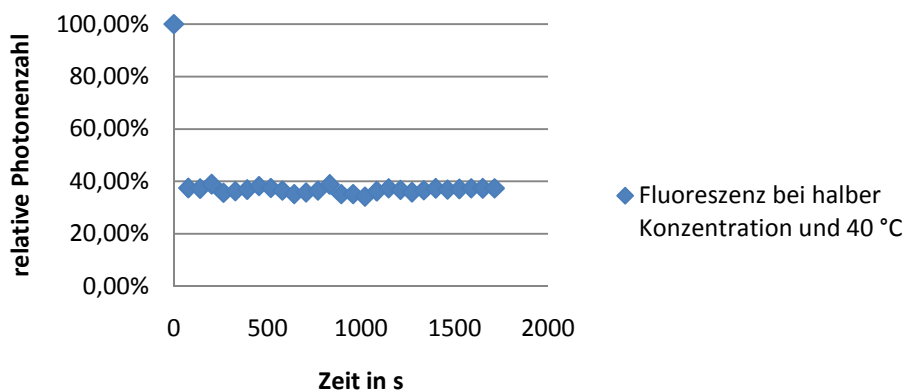
Fluoreszenzstärke bei halber Konzentration und 35 °C



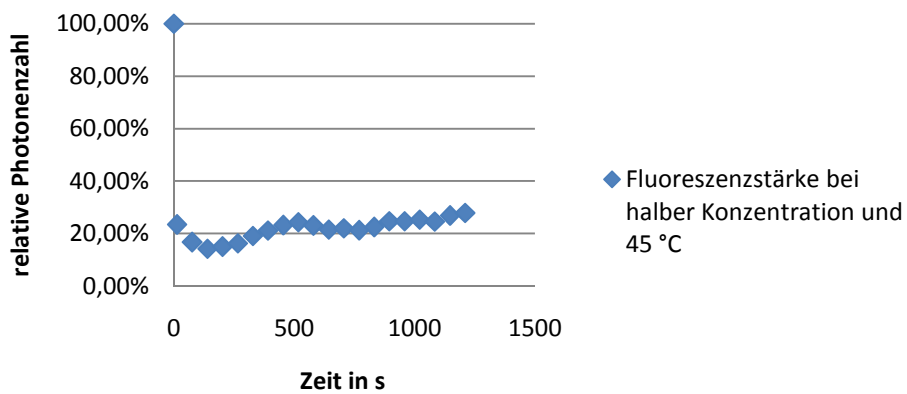
Fluoreszenzstärke bei doppelter Konzentration und 35 °C



Fluoreszenz bei halber Konzentration und 40 °C



Fluoreszenzstärke bei halber Konzentration und 45 °C



Fluoreszenz bei doppelter Konzentration und 45 °C

