

# Biotin und Avidin: Eine starke Schlüssel-Schloss-Interaktion

C3BL

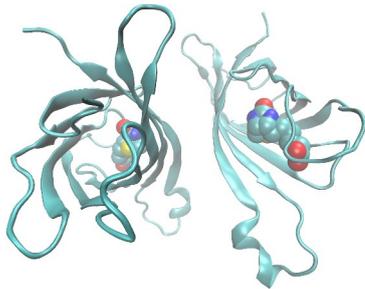


<https://youtu.be/iCD-yuITvY0>

## 1. Avidin und Streptavidin

Es gibt ein Lernvideo, das Sie durch das Arbeitsblatt begleitet, eine schriftliche Zusammenfassung liefert und die Musterlösungen zu den Aufgaben präsentiert:

**Avidin** ist ein **Glykoprotein** im Eiklar von Vogeleiern. Ein einzelner isolierter Strang kann ein **Biotinmolekül (Vitamin B<sub>7</sub>)** spezifisch und sehr stark binden. Avidin ist allerdings **homotetramer** aufgebaut. Vier *gleiche* Einzelstränge lagern sich zu einer stabilen **Quartärstruktur** zusammen. So kann ein Avidinmolekül also **vier** Biotinmoleküle binden.



**Abb. 1.1:** Bändermodell eines Avidin-Dimers, mit gebundenem Biotin als Kalotten. Q: wikicommons. A: Ayacop (via PDB)

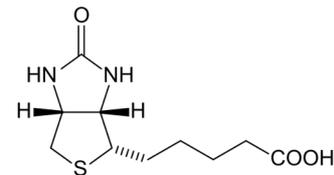
Im Hühnerei macht Avidin immerhin etwa 0,05 Prozent des Eiklar-Proteins aus. Es wird vermutet, dass es eine Abwehrfunktion gegenüber Bakterien besitzt, denn es hemmt deren Wachstum.

Die Fähigkeit *Biotin* spezifisch und so stark zu binden, führt unter anderem auch dazu, dass dieses Vitamin im Gastrointestinaltrakt nicht aufgenommen werden kann, wenn man viel rohes Ei isst.

**Streptavidin** ist ein bakterielles Avidin-Analog aus der Gattung *Streptomyces*, welches ebenfalls Biotin bindet. Auch Streptavidin liegt in einer tetrameren Quartärstruktur vor und kann damit ebenfalls vier Biotinmoleküle binden. Zusammenfassend betrachtet bindet *Streptavidin* das Biotin etwas spezifischer und dabei etwas schwächer als Avidin. Das ist beides günstig für das Biolabor: Ungewollte Fehlbindungen werden zurückgedrängt und die Bindung kann leichter, also mit weniger drastischen Reagenzien, wieder gelöst werden.

**Auch wenn im Folgenden immer nur von Avidin die Rede ist, so ist immer auch Streptavidin und auch andere Avidin-Derivate damit gemeint!**

**Biotin (= Vitamin B<sub>7</sub>)** ist ein kleines wasserlösliches Vitamin.



**Abb. 1.2:** Skelettförmel von Biotin.

Biotin spielt als *prosthetische Gruppe* von bestimmten Enzymen eine wichtige Rolle. Es wird über die Nahrung aufgenommen und auch von der Darmflora produziert.

## 2. Biotinylierung und Konjugation mit Avidin

Für die **Biotinylierung** als auch für die Konjugation von Avidin gibt es käufliche Synthesebestecke (**Kits**). Es existiert eine große Auswahl bereits biotinylierter Stoffe **UND** eine kleinere Auswahl Avidin-Konjugate zu kaufen. Beispiele:

- biotinylierte Nucleinsäuren und Oligonucleotide
- biotinylierte Antikörper: z.B. biotinylierte anti-IgG Antikörper
- biotinylierte Reporterenzyme: Meerrettichperoxidase (HRP<sup>biot</sup>) und alkalische Phosphatase (AP<sup>biot</sup>)
- biotinylierte Fluoreszenzfarbstoffe: z.B. Fluorescein<sup>biot</sup>
- biotinylierte Spezialreagenzien: ProteinG<sup>biot</sup>

- avidingekoppelte Reporterenzyme: (HRP<sup>avi</sup>) und alkalische Phosphatase (AP<sup>avi</sup>)
- avidingekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe
- biotin- oder avidingekoppelte Gelbildner, beispielsweise Sepharose. Wichtig für die Affinitätschromatographie (*siehe Abschnitt 3.2*)

Die Biotin-Bindungsstelle von Avidin versteckt sich in einer Tasche der proteinären Tertiärstruktur. Bindet man das Biotin direkt an manche größere Biomoleküle, so kann das Biotin nicht mehr in die Tasche gelangen und dort spezifisch gebunden werden – es wird sterisch daran gehindert. In solchen Fällen wird das Biotin nicht direkt an das Zielmolekül gebunden, sondern über ein längeres Brückenmolekül (Linker, Crosslinker, Spacer).

### Beispiel: Chemische Biotinylierung

Mit bestimmten Biotin-Derivaten können freie Aminoenden, beispielsweise NH<sub>2</sub>-Gruppen von AS-Resten oder der N-Terminus des Peptids biotinyliert werden. Andere Biotin-Derivate können am C-Terminus, an der SH-Gruppe von Cystein, an Carboxylgruppen, an Aldehydgruppen oder an Kohlenhydratresten gebunden werden. Gerade die

Kohlenhydratseitenketten von Antikörpern sind ideale Orte für eine Markierung mit Biotin, weil sie die Bindungseigenschaften des AK nicht verändern. Es existieren Dutzende (!) Biotin-Derivate die zur chemischen Biotinylierung aller möglichen Biomolekül-Arten erfolgreich eingesetzt werden können.

2.1 Welche chemische Biotinylierung ist in folgender Reaktionsgleichung gezeigt? Markieren Sie im Produkt den Biotinanteil.

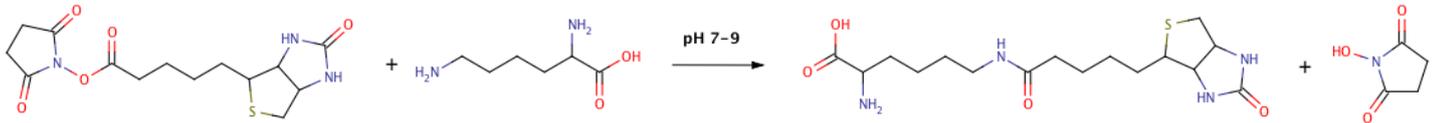


Abb. 2.1: Biotinylierung mit dem Biotin-Derivat NHS-Biotin.

.....  
.....

2.2 Wozu wird folgendes Biotin-Derivat genutzt? Tipp: Text oben genau studieren!®

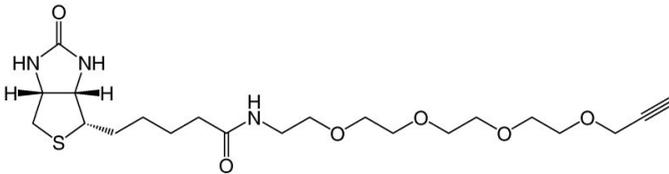


Abb. 2.2: Biotin-PEG4-Alkin

.....  
.....  
.....  
.....

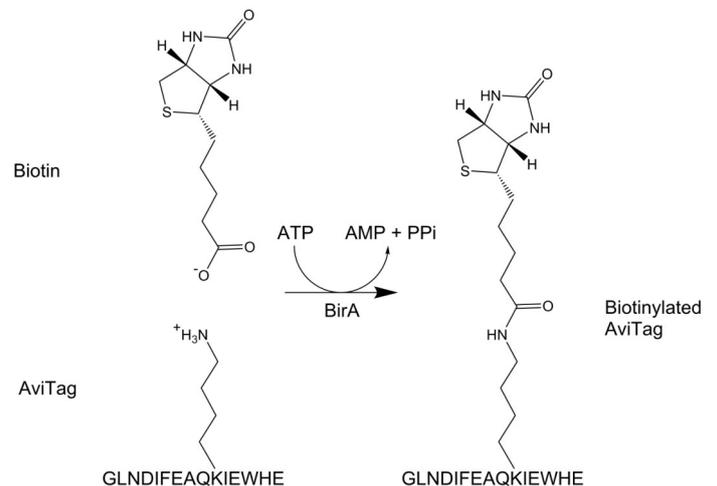
### Beispiel: Photoinduzierte Biotinylierung

Bei dieser Methode werden reaktive Biotin-Derivate eingesetzt, die bei Bestrahlung mit UV-Wellen mit C-H und N-H-Bindungen von organischen Molekülen reagieren. Die sind praktisch überall enthalten. Deshalb wird diese photoinduzierte Biotinylierung auch als **nicht-spezifische Biotinylierung** bezeichnet. Diese Methode bringt allerdings auch große Vorteile mit sich. Man kann nämlich

selbst entscheiden, wann genau die Biotinylierung erfolgen soll. So können die Ausgangsstoffe, beispielsweise in der lebenden Zelle oder im Gewebeflüssigkeit, schon gemischt vorliegen und anderweitige Vorgänge gerade ablaufen. Durch Bestrahlung mit UV kann man dann zum genau passenden Zeitpunkt die Biotinylierung einleiten.

### Beispiel: Enzymatische Biotinylierung

Im Gegensatz zu den beiden vorangegangenen Varianten ist die *enzymatische Biotinylierung* weitaus spezifischer. Zuerst bindet man an das Zielmolekül ein 15-AS-Peptid mit charakteristischer Sequenz (**Avi-Tag, Akzeptorpeptid**, engl. tag für ‚Markierung‘) oder bindet die codogene Sequenz hierfür direkt an die Gen-DNA, die für die Zielstruktur codiert. Diese AS-Sequenz ist das Substrat der **Biotin-Ligase (BirA)**, die nun unter ATP-Verbrauch in vitro oder auch in vivo (!) dort spezifisch Biotin anbindet.



### 3. Verwendung des Avidin-Biotin-Systems

Biotin ist so klein, dass seine Anhängung die Biofunktion und die Bindungscharakteristika häufig nicht stört. So setzt selbst eine Mehrfachbiotinylierung die Enzymaktivität von Reporterenzymen nicht herab!

Die Bindung des Biotins an Avidin ist dabei eine der stärksten bekannten nicht-kovalenten Bindungen in biologischen Systemen. Sie ist außerordentlich stabil gegen Erwärmen, pH-Wert-Änderung oder Lösungsmittel. Das ist

#### 3.1: Immunassays

- An den Marker, beispielsweise Reporterenzyme oder (Fluoreszenz)-Farbstoffe lässt sich Avidin kovalent binden. Je nach Sichtweise kann man den Vorgang auch anders herum sehen: Avidin lässt sich leicht mit Reporterenzymen markieren (z.B. „*Peroxidase conjugated streptavidine*“ = „*streptavidin-HRP conjugate*“).
- Auf der Gegenseite, kann auch der Antikörper biotinyliert werden (AK-B), statt ihn direkt mit einem Enzym zu markieren.

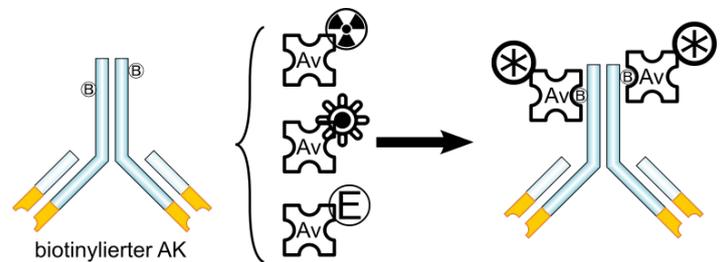
Beim Immunassay gibt man zum fertig aufgebauten Nachweiskomplex das markierte Avidin (**Marker-Avidin-Konjugat, Symbol: Av-\***). Neben den vorangegangenen AK-Ag-Bindungen gibt es also eine weitere Schlüssel-Schloss-Interaktion.

**Einfache Signalverstärkung.** Jeder AK kann mit vielen Biotinmolekülen ausgestattet sein, so dass letzten Endes auch viele enzymmarkierte Avidinmoleküle an einen AK angebracht werden können. Es kommt also zu einer Signalverstärkung und kleine Analytmassen lassen sich nachweisen.

**3.1 Fertigen Sie eine Schema-Zeichnung eines Sandwich-ELISAs (direkte Variante) unter Verwendung biotinylierter Antikörper (AK-B) und HRP-konjugiertem Avidin (Av-HRP) an, aus der diese Signalverstärkung hervorgeht:**

einerseits ein Vorteil, weil man bei Aufreinigungsschritten nicht fürchten muss, versehentlich die Bindung vorzeitig zu lösen. Andererseits werden für das anschließende Lösen der Bindungen so extreme Bedingungen benötigt, dass empfindliche Biomoleküle, an die das Biotin gebunden ist, in Mitleidenschaft gezogen werden. Gerade deshalb wurden chemisch modifizierte Formen von Biotin und Avidin entwickelt, die sich mit besonderen Reagenzien leichter spalten lassen.

Die Entkopplung von Marker und AK bringt mehr Flexibilität: Mit demselben biotinylierte AK lassen sich viele verschiedene Nachweismethoden durchführen:



**Abb. 3.1:** Entkoppelung und Signalverstärkung. Quelle: e.W.

**Komplexere Variante - Mehr Signalverstärkung:** Auch hier liegen biotinylierte Nachweisantikörper vor, beispielsweise im fertig aufgebauten Immunkomplex.

Gibt man in ein anderes Reaktionsgefäß zu ebenfalls biotinylierten (!) Markern (z.B. biotinylierte Reporterenzyme, B-E) freies Avidin, formen sich in dieser Lösung große Avidin-Biotin-Komplexe (avidin-biotin-complexes, ABC-Methode) mit noch freien Bindungsstellen am Av. Gibt man beispielsweise die dreifache Stoffmenge an B-E zu Av, kommt es zu folgender Reaktion:



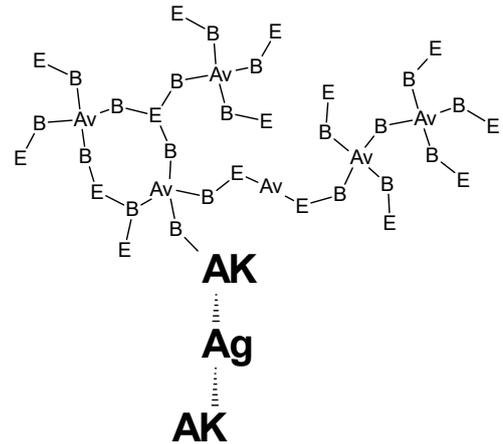
Am Av ist im Mittelwert noch 1 Bindungsstelle frei!

Diese ABC-haltige Lösung gibt man dann zu den biotinylierten Antikörpern der Kavität. Hier binden die freien Av-Bindungsstellen an das Biotin des AK. Pro Biotin-Gruppe am Antikörper, werden so also maximal 3 Markermoleküle (E) gebunden, was zu einer weiteren Signalverstärkung führt (zusätzlich zum Vorteil 1, also der Tatsache, dass auch jedes AK schon mehrfach Biotin trägt).

**3.2** Zeichnen Sie ein Schema des Nachweiskomplex eines Sandwich-ELISAs, das die wesentlichen Unterschiede zu 3.1 darstellt.

**Noch mehr Signalverstärkung:** Eine noch weiter gehende Signalverstärkung ist gegeben, wenn das Markermolekül (z.B. E) mehrere B-Gruppen trägt: z.B. ....B-E-B..... Dann kann es nämlich zur Bildung von größeren Netzwerken kommen (vgl. entsprechende Stelle in Abb. 3.2). Jedes Analytmolekül führt letztendlich zur Fixierung zahlreiche Markermoleküle!

**3.3** Finden und beschreiben Sie zwei eindeutige Fehler, die sich in die Abb. 3.2 eingeschlichen haben.



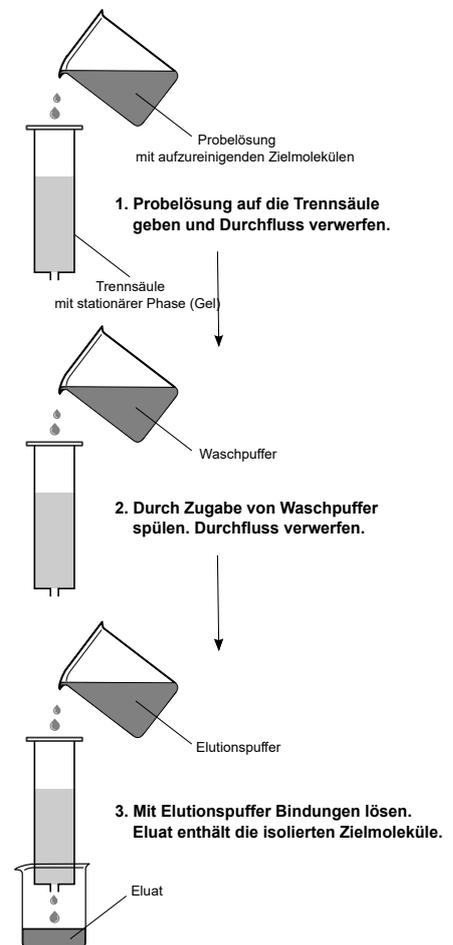
**Abb. 3.2:** Hochamplifikation durch ABC-Nachweiskomplexe eines Sandwich-ELISAs.

**3.2: Affinitätschromatographie**

[Säulenchromatographische Variante]: Man kann Avidin an Perlen (beads) binden und das Material in eine Säule geben. Gibt man nun eine Lösung mit den biotinylierten Zielmolekülen auf die Säule, so bleiben an den Perlen nur diese Moleküle hängen, während die restlichen Bestandteile der Lösung nicht gebunden werden und durchfließen. Nach Waschsritten wird Elutionspuffer auf die Säule gegeben. Die drastische pH-Wert-Änderung bewirkt das Lösen der Avidin-Biotin-Bindung. Die Zielmoleküle werden im Eluat aufgefangen.

Bei der Affinitätschromatographie werden viele Interaktionen ausgenutzt. Einige Beispiele:

Ligand (gebunden an Gelmatrix)	Typ des Zielmoleküls
Avidin	Biotinylierte Biomoleküle
Substrat	Enzym
Protein A und G	Antikörper
Antigen	Antikörper
Antikörper	Antigen



**Abb. 3.3:** Affinitätschromatographie. Quelle: e.W.