

Ortsgerichtete Spin-Markierung für die Bestimmung von amyloiden und nicht-amyloiden Aggregationsmechanismen von β -Lactoglobulin unter Verwendung von Elektronenparamagnetischen Resonanzspektroskopie und Massenspektrometrie

Um einen tieferen Einblick in den Mechanismus der amyloiden Aggregation von natürlichem β -Lactoglobulin (β -Ig) zu erhalten, wurde die Methode der ortsspezifischen Spinmarkierung (SDSL) in Kombination mit der paramagnetischen Elektronenspektroskopie (EPR) etabliert. Die Bildung von funktionellen amyloiden Aggregaten ist hauptsächlich von dem pH-Wert, der Temperatur und Scherung abhängig. Diese Faktoren bestimmen die Bausteine, die Morphologie und die Menge der gebildeten amyloiden und amyloid-ähnlichen Aggregate. Bei pH 2 stellen Peptide die Bausteine da, während bei pH 3,5 das gesamte Protein als Baustein fungiert. Amyloide Aggregat-Systeme wurden mittels Ultrafiltration in die amyloide und nicht-amyloide Fraktion getrennt.

Für SDSL wurden zwei Spin-Labels (MTSSL und IPSL) verwendet und Bindungsbedingungen dahingehend angepasst, dass eine möglichst hohe Bindungsrate und eine geringe Biradikalbildung erreicht wurden. Dazu wurden der pH-Wert und das Spin-Label/ β -Ig-Verhältnis variiert. Alkalische pH-Werte begünstigten nicht nur die Bindung, sondern auch die Dimerisierung zweier MTSSL-Moleküle, während IPSL keine Dimere bildete. Diese MTSSL-Biradikale reduzierten die Bindungseffizienz und hatten einen störenden Effekt auf die Spektralanalyse.

Sowohl MTSSL als auch IPSL waren an allen fünf in β -Ig vorhandenen Cysteinresten gebunden, welches durch Massenspektroskopie nach tryptischen Verdau nachgewiesen wurde. Diese fünf Bindungsstellen konnten zwei Spektralkomponenten zugeordnet werden, die sich im EPR-Spektrum überlagerten. Eine Spektraldomäne befand sich zwischen den β -Faltblättern und der α -Helix. Die andere Domäne befand sich in der Nähe des C-Terminus auf der Oberfläche des Proteins. Während MTSSL zu ~80 % im Inneren des Proteins gebunden war und nur zu ~20 % an der Oberfläche, war IPSL zu 40 % an der Oberfläche gebunden und nur zu 60 % im Inneren des Proteins.

Da weder die Sekundärstruktur von β -Ig noch die amyloide Aggregation durch die Spinmarkierung im Vergleich zu unmarkiertem β -Ig verändert wurden, konnte dieser Ansatz zur Charakterisierung des Mechanismus der amyloiden Aggregation bei pH 2 und pH 3,5 verwendet werden. Bei pH 2 wurden die Spin-Label jedoch nicht in die amyloiden Aggregate eingebaut, jedoch konnte mit diesem Ansatz nachgewiesen werden, dass sich sowohl in der amyloiden als auch in der nicht-amyloiden Fraktion kleine (<300 kDa) hydrophobe Aggregate befanden. Bei pH 3,5 wurden die Spin-Label in die amyloid-ähnlichen Aggregate eingebaut. Dieses erlaubte die Charakterisierung des Aggregationsmechanismus. Es wurde vermutet, dass die β -Faltblätter durch die Akkumulation von intermolekularen β -Faltblättern dicht gepackt waren und die α -Helix durch die Neuausrichtung der Tertiärstruktur des Proteins nach außen ragte. Die Simulation der EPR-Spektren und die Übereinstimmung mit den Ergebnissen der gepulsten EPR-Messungen bestätigten die Annahme, dass monomeres β -Ig teilweise entfaltet und wie Perlen auf einer Schnur bei pH 3,5 angeordnet waren, während die anderen Teile des Proteins aus den Aggregaten herausragten, was an die Form eines Tausendfüßlers erinnerte.

Das amyloide Aggregat-System aus Molkenproteinisolat bei pH 2 bestand zu ~18 % aus amyloiden Aggregaten und ~82 % aus kleineren Aggregaten, Peptiden und überwiegend entfaltenen Proteinen von monomerer Größe. Das Verschäumen wurde als exemplarisches Verfahren der Lebensmittelproduktion verwendet. Aufgrund des hohen Anteils der n-AF war es von großem Interesse, den Einfluss der n-AF auf die Oberflächenaktivität des amyloiden Aggregat-Systems und die Interaktion der beiden Fraktionen zu bestimmen. Die Fraktionen hatten einen synergistischen Effekt auf die Stabilisierung von Grenzflächen, da WPI-Fibrillen wahrscheinlich eine nematische und elastische Domäne an der Wasser-Luft-Grenzfläche bildeten, in der das vorhandene kleine und nicht-amyloide Material eingebettet wurde. Je geringer jedoch die Menge an amyloiden Aggregaten im amyloiden Aggregat-System war, desto höher waren die Verschäumbarkeit und die Schaumstabilität des in einer Schaumkolonne erzeugten Schaums.

Der Ansatz von SDSL wurde erfolgreich für natürliches β -Ig etabliert. Es wurde verifiziert, dass mit SDSL die Struktur und Dynamik verschiedener amyloider und nicht-amyloider Materialien aufgeklärt werden kann. Darüber hinaus konnte der Beitrag der verschiedenen Proteinmaterialien während des Verschäumens als exemplarischer Prozess der Lebensmittelproduktion und die Oberflächenaktivität an der Luft-Wasser-Grenzfläche exemplarisch für amyloide Aggregate bei pH 2 bestimmt werden.

Der Ansatz von SDSL kann für Lebensmittelproteine angewendet werden, die von Natur aus Cysteinreste enthalten, an die sich Spin-Label binden können. Die Simulation der spektralen Komponenten kann zur Beschreibung des Mechanismus von Strukturänderungen und der Aggregation von Proteine in Lebensmittelprozessen verwendet werden.