

β -Lactoglobulin als Nanotransporter für hydrophobe Verbindungen

M.Sc. Julia Katharina Keppler

1. Berichterstatterin: Professorin Dr. K. Schwarz

Zusammenfassung

Die Interaktionen von Proteinen und bioaktiven niedermolekularen Liganden kann dazu genutzt werden, um Nano-Transportsysteme für Lebensmittel zu kreieren. Eine negative Folge von Protein-Ligand-Interaktionen ist jedoch z.B. der Verlust an Proteinverdaulichkeit.

In der vorliegenden Dissertation wurden mehrere equilibriumbasierte Methoden (ED, FQ, HWE, UF) zur Bestimmung der Bindungskinetik von kovalent und nicht-kovalent bindenden Liganden (darunter Allylthiocyanat (AITC), Epigallocatechingallat (EGCG) und Retinol) mit β -Lactoglobulin (β -LG) durchgeführt und ergaben übereinstimmende Ergebnisse.

Für das kovalent bindende AITC wurde die seltene Form einer positiv-kooperativen Bindung festgestellt und mittels LC-ESI MS/MS anhand eines tryptischen Verdaus bestätigt.

Verschiedene Berechnungsmodelle (Stern-Volmer, Cogan, Scatchard) zur Bestimmung der Anzahl von Bindungsstellen (n) und Bindungsaffinität ($K'a$) von nicht-kovalent bindenden Substanzen wurden miteinander verglichen und zeigten vor allem in Hinsicht der Bindungsaffinität signifikante Abweichungen.

Zur Identifizierung von Bindungsstellen für die nicht-kovalent bindenden Liganden EGCG und Retinol an β -LG wurden 1D- und 2D-¹H-NMR Spektroskopie, sowie Fluoreszenzlöschungsversuche an verschiedenen genetischen Varianten (A, B und C) von β -LG durchgeführt. Die beobachtete Anzahl an Bindungsstellen nahm mit der Reihenfolge A zu B zu C ab und die Bindungsaffinität nahm ab. Dies ließ Rückschlüsse darauf zu, dass die Proteinpunktmutation des β -LG C an Position 59 und die dadurch bedingten Konformationsänderungen an den aromatischen Aminosäureresten Tyrosin²⁰ und Phenylalanin¹⁵¹ Bindungsstellen blockieren.

Die verschiedenen funktionellen Gruppen des Liganden EGCG, die mit β -LG interagieren wurden mittels STD-NMR Spektroskopie identifiziert. Es handelte sich vorwiegend um den phenolischen A Ring sowie den Gallussäurerest. Messungen der antioxidativen Kapazität der Komplexe mittels DPPH-, und TEAC-Test zeigten, dass durch die Bindung keine signifikante Blockierung der antioxidativen Kapazität der Liganden zu beobachten ist. Die Oxidation einzelner bindungsrelevanter Aminosäurereste wie Tyrosin konnte durch eine beobachtete ansteigende Bindungsaffinität bei hitzedenaturiertem β -LG reduziert werden.