

1 Einleitung und Zielsetzung

Das zunehmende Interesse an nachhaltigen tierischen Proteinquellen veranlasst zur Suche nach alternativen Produktionsmethoden zur konventionellen Viehzucht, die Tier- und Umweltbelastungen minimieren, aber gleichzeitig Funktionalität, Qualität und Verfügbarkeit der Proteine gewährleisten können. In diesem Kontext hat die rekombinante Produktion tierischer Proteine mittels Mikroorganismen, auch als Präzisionsfermentation bekannt, an Bedeutung gewonnen. Besonders die rekombinante Produktion von Milchproteinen steht dabei im Fokus. Das bedeutendste Molkenprotein der Milch vieler Säugetiere ist β -Lactoglobulin (BLG), das aufgrund seiner einzigartigen funktionellen Eigenschaften ein wesentlicher Bestandteil vieler Nahrungsmittel ist. BLG ist ein globuläres, β -faltblattreiches Transportprotein, das zwei konservierte Disulfidbrücken und eine freie Thiol-Gruppe besitzt. Seine funktionellen Eigenschaften, wie die Emulgierfähigkeit und die Fähigkeit zur Gel- und Schaumbildung, machen BLG zu einem wichtigen Modell-Protein in der Lebensmitteltechnologie und basieren auf der Fähigkeit von BLG unter bestimmten Bedingungen amyloide Aggregate zu bilden. Die rekombinante Produktion von BLG in Mikroorganismen ermöglicht nicht nur eine nachhaltigere Produktion, sondern auch Modifikationen der Struktur, sodass Varianten dieses Proteins generiert werden können, die wertvolle Einblicke in fundamentale Mechanismen der Proteinbiochemie, wie Struktur-Funktions-Beziehungen bringen können. Diese Erkenntnisse können auch das Verständnis von amyloiden Aggregationsmechanismen verbessern, die mit amyloiden Erkrankungen, wie beispielsweise Alzheimer assoziiert sind. Durch die gezielte Modifikation des *blg*-Gens ist es außerdem möglich, Varianten des Proteins herzustellen, die in ihrer Struktur und Funktion optimiert sind, um spezifische Anforderungen der Lebensmitteltechnologie zu erfüllen.

Diese Dissertation präsentiert Ergebnisse des „Zentralen Projekts“ innerhalb des DFG-geförderten Schwerpunktprogramms (SPP) 1934 „Dispersitäts-, Struktur- und Phasenänderungen von Proteinen und biologischen Agglomeraten in biotechnologischen Prozessen (DISPBioTech)“, das sich mit der Untersuchung von Proteinen und Bioagglomeraten, insbesondere im Kontext ihrer Wechselwirkungen mit verfahrenstechnischen Prozessumgebungen entlang der Prozesskette, beschäftigt. Dieses Teilprojekt förderte den interdisziplinären Austausch innerhalb des SPPs und beschäftigte sich u. a. mit der Produktion, Reinigung und Verteilung von rekombinantem BLG und BLG-Varianten, um verschiedene Fragestellungen zu adressieren.

Die primäre Fragestellung zielte darauf ab, rekombinantes BLG mit unterschiedlichen Cystein-Modifikationen zu produzieren und zu reinigen, um den Einfluss der Disulfidbrücken und der freien Thiol-Gruppe auf die Struktur sowie auf die funktionellen Eigenschaften des Proteins zu analysieren. Als Produktionsstamm wurde zunächst der Gram-negative Modellorganismus *Escherichia coli* verwendet. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *E. coli* Origami B unter Co-Produktion der Disulfidbindungsisomerase C (DsbC) in der Lage ist, rekombinantes BLG zu produzieren, dessen Struktur und physikochemische Eigenschaften nahezu identisch mit denen des nativen, bovinen BLG sind (Loch et al. 2016; Keppler et al. 2021). Für die Erstellung der BLG-Varianten sollten mittels positionsgerichteter Mutagenese gezielt die kodierenden Sequenzen der Cysteine gegen die von Alaninen im *blg*-Gen ausgetauscht werden. Nach Produktion der rekombinanten BLG Cystein-Varianten sollten geeignete Reinigungsprozesse etabliert und die rekombinanten Varianten mit nativem bovinen BLG als auch mit bovinen BLG, dessen Disulfidbrücken erst nach Faltung des Proteins chemisch reduziert und gespalten wurden, verglichen werden. Im Zentrum dieser Untersuchung stand die Arbeitshypothese, dass Disulfidbrücken, die entscheidend für die Protein-

Stabilität sind, signifikant die Struktur von BLG beeinflussen und dadurch dessen funktionalen Eigenschaften, insbesondere die Fähigkeit zur Bildung amyloider Aggregate, maßgeblich bestimmen.

Die zweite Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine effektive Methode zu entwickeln, um den amyloidogenen N-terminalen Teil von BLG separat rekombinant zu produzieren, um diesen für genauere Analysen und mögliche Anwendungen in größerem Maßstab zur Verfügung zu stellen. Bei hohen Temperaturen und niedrigem pH-Wert kann BLG amyloide Nanofibrillen bilden, die sowohl als funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe, als auch für die Entwicklung neuartiger Biomaterialien von Interesse sind. Unter diesen Bedingungen erfolgt eine saure Hydrolyse des Proteins, wobei N-terminale Peptide (Aminosäuren 1–53) freigesetzt werden, die eine hohe Tendenz zur Bildung von amyloiden Strukturen aufweisen und die Grundbausteine für die Bildung der Nanofibrillen darstellen. Da die Ausbeute rekombinanter Peptide oftmals durch einen beschleunigten proteolytischen Abbau limitiert ist, sollten in dieser Arbeit Protein-Tags untersucht werden, die das Peptid nach Translation in der Zelle vor proteolytischem Abbau schützen können. Zusätzlich sollte die rekombinante Peptid-Produktion über eine Hochzelldichte-Kultivierung im Bioreaktor realisiert werden, bei der unterschiedliche Feeding-Strategien hinsichtlich Protein-Ausbeute und Prozessführung untersucht und diskutiert werden sollten.

Das dritte Ziel dieser Arbeit bestand darin, die rekombinante Produktion und Sekretion von rBLG mit *Bacillus subtilis*, einem als „*Generally Recognized As Safe*“ (GRAS) klassifizierten Gram-positiven Bakteriums, zu realisieren. Ein weiterer Grund für die Nutzung von *B. subtilis* als geeigneten Wirt für die rBLG-Produktion und -Sekretion war seine seit langem etablierte Nutzung in der biotechnologischen Produktion und der Sekretion von Proteinen in das Kulturmedium, was den Downstream-Prozess deutlich vereinfacht. Es sollten neben einem Protease-defizienten Produktionsstamm, der aufgrund seiner reduzierten extrazellulären proteolytischen Aktivität ein geeigneter Stamm für die Sekretion rekombinanter Proteine darstellt, auch genomreduzierte Stämme als potentielle Produktionsstämme für rBLG untersucht werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Proteinproduktion mittels Präzisionsfermentation

Lebensmittel tierischen Ursprungs nehmen in der globalen Nahrungskette eine signifikante Position ein, indem sie durchschnittlich 17 % der Energie- und 35 % der Proteinversorgung beisteuern (Animal agriculture and global human food supply 1999). Angesichts einer rasant ansteigenden Weltbevölkerung und der proportionalen Zunahme des Bedarfs an tierischen Proteinen gewinnt vor allem die Suche nach nachhaltigen Proteinquellen als Alternative zur klassischen Viehzucht zunehmend an Bedeutung.

Da pflanzliche Proteine in vielerlei Hinsicht nicht die spezifischen Anforderungen der Konsument:innen, wie Geschmack oder Konsistenz, erfüllen, existieren einige andere innovative Methoden, Proteine nachhaltig zu produzieren (**Abbildung 1**). In diesem Zusammenhang gewinnen zelluläre Ansätze wie *in-vitro*-Fleisch aus Zellkulturansätzen oder die fermentative Herstellung proteinreicher Biomasse wie Pilze und Hefen an Bedeutung. Auch die Verarbeitung von Insekten oder Mikro- und Makroalgen als Proteinquelle besitzt ein großes Potential (Quintieri et al. 2023). Darüber hinaus erlebt der Markt für die Nutzung mikrobieller Systeme zur rekombinanten Produktion tierischen Proteins ein bedeutendes Wachstum. Ein Begriff, der in diesem Kontext immer häufiger Verwendung findet, ist die „Präzisionsfermentation“ (engl.: *Precision fermentation*). Sie beschreibt die gezielte (rekombinante) Produktion funktioneller Lebensmittelinhaltsstoffe wie tierischer Proteine mittels Mikroorganismen (Augustin et al. 2023).



Abbildung 1: Übersicht alternativer Proteinquellen zur konventionellen Viehwirtschaft.

Der generelle Prozess der Präzisionsfermentation kann dabei in fünf Schritte unterteilt werden: (1) Identifizierung und Optimierung des Gens, das das tierische Protein kodiert, (2) das Einfügen des Genabschnittes in das Genom oder in einen Expressionsvektor, (3) die Transformation des Produktionswirts mit dem erstellten Vektor, (4) die gezielte Induktion der Expression des Zielgens in den rekombinanten Zellen und (5) die Produktion/Sekretion und Reinigung des produzierten rekombinanten Zielproteins (Dupuis et al. 2023). Historisch gesehen begann die Revolution der Produktion rekombinanter Proteine in den 1980er Jahren mit der Produktion von humanem Insulin

durch das Bakterium *Escherichia coli* (Goeddel et al. 1979). Heute ist die rekombinante Proteinproduktion nicht nur auf die Produktion therapeutischer Proteine beschränkt, sondern spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Herstellung von Proteinen tierischen Ursprungs im Lebensmittelsektor.

Für pharmazeutisch genutzte Proteine ist *E. coli* aufgrund einer hohen Ausbeute an rekombinantem Zielprotein oft die erste Wahl (Ferrer-Miralles et al. 2009). Im Lebensmittelbereich hingegen ist es essenziell, Mikroorganismen mit dem sogenannten GRAS- (*generally recognized as safe*-) Status zu nutzen. Dieser Status wird von der FDA (US Food and Drug Administration) für Lebensmittelzusatzstoffe vergeben, die als unbedenklich eingestuft werden. In diesem Kontext rücken eukaryotische Mikroorganismen, also Hefen und filamentöse Pilze, in den Vordergrund, da sie post-translationale Modifikationen ermöglichen, die für die korrekte Struktur und Funktionalität mancher Proteine unabdingbar sind. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Patente im Bereich der Präzisionsfermentation von Lebensmittelproteinen, meistens mit dem Ziel, rekombinante Ei-, Milch- oder Fleischproteine zu produzieren (Dupuis et al. 2023). Ein Protein, das rekombinant mit *Komatagella phaffi* produziert wird und bereits Anwendung findet, ist Soja-Leghämoglobin, das als Farbstoff und Geschmacksträger in pflanzlichen Burgern oder Fleischersatzprodukten zum Einsatz kommt und vom Unternehmen *Impossible Foods* produziert wird (Fraser et al. 2018). Das Unternehmen *The EVERY Company* stellt rekombinantes Eiweiß her, das als Ei-Substituent in Backwaren und Getränken Verwendung findet. Dieses Eiweiß besteht aus einer Kombination verschiedener rekombinanter Ei-Proteine, insbesondere Ovalbumin, das für die charakteristische Funktionalität von Ei, wie die Emulgierfähigkeit und Schaumbildung, verantwortlich ist (Anchel 2019). Auch rekombinante Milchproteine, einschließlich Casein, α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin, rücken zunehmend in den Mittelpunkt wissenschaftlicher Forschung. Dabei leisten Start-ups wie *Perfect Day*, *New Culture*, *Formo* und *Those Vegan Cowboys* wesentliche Beiträge zur Entwicklung neuer Technologien und Produkte. *Perfect Day* hat bisher als einziges Unternehmen eine regulatorische Zulassung für sein rekombinantes β -Lactoglobulin aus *Trichoderma reesei* in Asien und Nordamerika erhalten und bereits damit mehrere Produkte wie Proteinpulver, Frischkäse und Eiscreme erfolgreich auf dem Markt etabliert (Geistlinger et al. 2019). Auch Strukturproteine wie Kollagen und Elastin werden von *Gelator Inc.* für potentielle Anwendungen in der Kosmetik oder im Lebensmittelsektor rekombinant produziert (Dupuis et al. 2023). Die rekombinante Proteinproduktion ermöglicht dabei Protein-Modifikationen zur Änderung spezifischer physikochemischer Eigenschaften, wie beispielsweise einer Erhöhung der Thermostabilität. Durch gezieltes Protein-Engineering besteht zudem das Potenzial, unerwünschte Merkmale, einschließlich potenzieller Allergenität, gezielt zu eliminieren (Augustin et al. 2023).

Es gibt noch einige offene Fragen und Herausforderungen im Hinblick auf die Produktion tierischer Proteine mittels Präzisionsfermentation, wie beispielsweise die Frage nach der Wirtschaftlichkeit und Nachhaltigkeit im Vergleich zur konventionellen Landwirtschaft, aber auch die Herausforderung breite Akzeptanz in der Gesellschaft zu erreichen. Angesichts abnehmender Produktionskosten und fortschreitender technologischer Entwicklungen wird prognostiziert, dass die großindustrielle Herstellung zentraler Nahrungsproteine, insbesondere von Milchproteinen, in greifbare Nähe rücken kann. Die gegenwärtigen Marktpreise für Casein tierischen Ursprungs bewegen sich im Bereich von etwa 10 € pro Kilogramm Produkt. Dies ist vergleichbar mit den Kosten für rekombinante Proteine aus industriellen Prozessen, wie beispielsweise Cellulasen, die mithilfe von *Trichoderma*-Stämmen produziert werden (Hettinga und Bijl 2022). Im Vergleich zur konventionellen landwirtschaftlichen Proteinproduktion können sich rekombinante Proteine durch eine deutlich bessere Ökobilanz

auszeichnen. *Perfect Day* hat mögliche potenzielle Einsparungen für die eigene Produktion von BLG mit dem tierischen Äquivalent verglichen. Gemäß diesen Schätzungen könnte die industrielle, auf Präzisionsfermentation basierende Milchproduktion den Wasserverbrauch um 98 %, den Landbedarf um 77 bis 91 %, den Energieverbrauch um 24 bis 48 % sowie die Treibhausgasemissionen um 35 bis 65 % verringern (Mendly-Zambo et al. 2021). Große Herausforderungen stellen aktuell noch die Verbraucherakzeptanz und die erschwerten Zulassungsbedingungen dar. Ein Vorteil der Präzisionsfermentation gegenüber der zellulären Landwirtschaft zur Produktion kultivierten Fleisches besteht auch darin, dass rekombinante Proteine in Form von Enzymen seit vielen Jahren für die Verwendung in Lebensmitteln zugelassen sind, einschließlich Lipasen, Proteasen (z. B. Chymosin) und Amylasen (Trono 2019). Die Zulassungsverfahren und regulatorischen Anforderungen für Produkte der Präzisionsfermentation variieren jedoch erheblich zwischen den Regulierungsbehörden, wie durch das in Hefe rekombinant produzierte Soja-Leghämoglobin von *Impossible Foods* veranschaulicht werden kann. Das rekombinant hergestellte Protein erhielt in den USA von der FDA die GRAS-Zulassung und kann in der Zutatenliste erwähnt werden, ohne dass auf die genetische Modifikation hingewiesen werden muss. In der Europäischen Union und im Vereinigten Königreich hingegen wurde die Zulassung bislang nicht erteilt und das Protein durchläuft dort weiterhin eine Risikobewertung durch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) (Dupuis et al. 2023).

2.2 Bovines β -Lactoglobulin als Hauptmolkenprotein der Kuhmilch

Kuhmilch ist ein komplexes und nährstoffreiches Lebensmittel, das aus 87 % Wasser, 4,7 % Kohlenhydraten, 3,8 % Fetten und 3,3 % Proteinen besteht. Die in der Milch enthaltenen Proteine sind hauptsächlich in zwei Kategorien unterteilt: Caseine und Molkenproteine. Während Caseine etwa 80 % der Milchproteine ausmachen und für die Textur von Käse eine Schlüsselrolle spielen, stellen die Molkenproteine die verbleibenden 20 % dar (Haug et al. 2009). Diese Molkenprotein-Fraktion besteht aus β -Lactoglobulin (BLG), α -Lactalbumin, Rinderserumalbumin (BSA) und Immunglobulinen, die jeweils einzigartige funktionelle und ernährungsphysiologische Eigenschaften aufweisen. Das Molkenprotein BLG macht dabei etwa 50 bis 55 % ($3,2 \text{ g L}^{-1}$) der Molkenproteine aus (de Wit 1998). Als Mitglied der Lipocalin-Familie kann BLG hydrophobe Liganden wie Fettsäuren oder Retinol binden und weist so eine hohe biologische Wertigkeit auf, was es für den Einsatz in Säuglingsnahrung und Proteinpulvern prädestiniert. Die Fähigkeit von BLG, bei Hitzeeinwirkung zu denaturieren und zu aggregieren, macht es zudem als Geliermittel nützlich (Sawyer 2013; Deeth et al. 2018). BLG wird in den Epithelzellen der Milchdrüsen von Wiederkäuern und monogastrischen Säugetieren, wie Schweinen, Hunden oder Beuteltieren, als Präprotein produziert. Das BLG-Präprotein, das am Ribosom des rauen endoplasmatischen Retikulums translatiert wird, besitzt ein N-terminales Signalpeptid aus 16 Aminosäuren, das den Transport und die Sekretion des Proteins ermöglicht. Nach Transport des Proteins zum Golgi-Apparat wird das Signalpeptid abgespalten und das Protein über sekretorische Vesikel in die Milch sezerniert (Larson 1979; Sawyer 2013).

Die genaue biologische Funktion von BLG ist trotz intensiver Forschung seit seiner Entdeckung durch Palmer im Jahr 1934 noch immer nicht vollständig geklärt (Palmer 1934). Insbesondere die Tatsache, dass das Protein bei einigen Säugetieren wie Hasenartigen, Nagetieren und dem Menschen nicht vorkommt, wirft Fragen nach der essenziellen Notwendigkeit von BLG in der Milch auf. Glycodelin, ein beim Menschen vorkommendes Lipocalin, das eng mit BLG verwandt ist, spielt beispielsweise eine

wichtige Rolle bei der Immunsuppression, der Angiogenese und Apoptose während des ersten Trimesters der Schwangerschaft. Beide Proteine teilen eine ähnliche Sequenz und dreidimensionale Struktur und sind aus homologen Genen hervorgegangen (Sawyer 2021). Die spezifischen Bindungs- und Transportfähigkeiten von BLG legen jedoch eher eine Funktion als Transportprotein nahe, wobei seine Resistenz gegen Säure und Pepsin die sichere Beförderung von Liganden durch den Magen ermöglicht. Dies deutet darauf hin, dass BLG potenziell essenzielle Entwicklungsstoffe zum Nachwuchs transportieren könnte. Weiterhin könnte BLG auch aufgrund seiner antibakteriellen und antioxidativen Wirkung eine Schutzfunktion der Zellen erfüllen (Liu et al. 2007; Chaneton et al. 2011).

2.2.1 Struktur und Denaturierungsverhalten von bovinem BLG

Natives bovines BLG (bBLG) besteht nach der Prozessierung aus 162 Aminosäuren mit einer relativen molekularen Masse von etwa 18.300 Da (Dalton) und existiert in mindestens 11 Varianten, die sich nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden. Isoform A (bBLG A) und B (bBLG B) kommen am häufigsten vor und unterscheiden sich in lediglich zwei Aminosäuren an Aminosäureposition 118 und 64 (A: D64, V118; B: G64, A118) (**Abbildung 2A**) (Sawyer 2013). Die **Sekundärstruktur** von bBLG wird durch β -Faltblätter dominiert, die ca. 45 % der Gesamtstruktur ausmachen. Daneben besteht es aus 8 % α -Helices und 47 % ungeordneten Strukturen bzw. β -Schleifen. Die neun antiparallelen β -Faltblättern (A–I, **Abbildung 2**) bilden eine kelchförmige Struktur, die als Bindungstasche für hydrophobe Liganden fungiert (Kontopidis et al. 2002). Die **Tertiärstruktur** von bBLG wird durch intramolekulare, konservierte Disulfidbrücken stabilisiert, wobei Cystein-Reste an den Positionen 66 und 160 sowie 106 und 119 Disulfidbrücken formen, während Cystein 121 als freie Thiol-Gruppe vorliegt (**Abbildung 2B**). Während sich die Disulfidbrücke C66–C160 (*äußere* Disulfidbrücke) an der Oberfläche des Proteins befindet, ist die Disulfidbrücke C106–C119 (*innere* Disulfidbrücke) im Inneren des Proteins lokalisiert (Sawyer 2013). In Bezug auf die **Quartärstruktur** bildet BLG unter physiologischen Bedingungen Homodimere, deren Stabilität stark vom pH-Wert abhängig ist. Bei neutralem pH-Wert ist das Dimer die prävalente Form, während bei extremeren pH-Werten Monomere ($\text{pH} < 3,5$, $\text{pH} > 7,5$) oder Oktamere ($\text{pH} \sim 4,6$) entstehen können (Deeth et al. 2018). Die Dimerisierung erfolgt über spezifische elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen, insbesondere zwischen dem β -Faltblatt I und den AB-Schleifen (Sawyer 2013) (**Abbildung 2**).

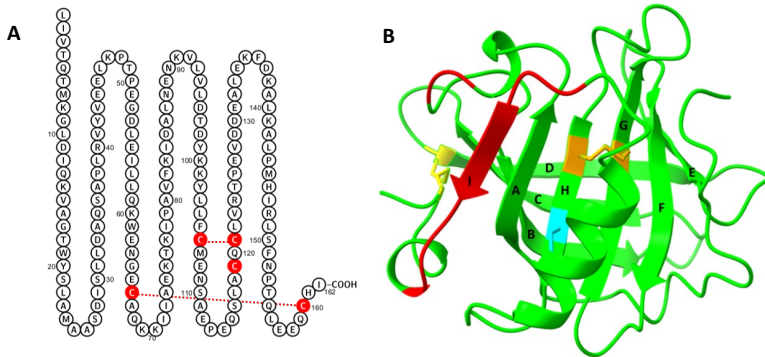


Abbildung 2: **A)** Aminosäuresequenz von bovinem BLG B. In Rot gekennzeichnet sind Cysteine mit zugehörigen Disulfidbrücken. Erstellt mit Protter (Omasits et al. 2014). **B)** Tertiärstruktur eines Monomers des nativen bovines BLG B (PDB-ID: 1BSO). Das freie Thiol (C121) ist in blau gekennzeichnet, die innere Disulfidbrücke (C106–C119) in Orange und die äußere Disulfidbrücke (C66–C160) in Gelb. Die Dimerisierungsmotive sind in Rot hervorgehoben. Die Buchstaben A–H kennzeichnen die β-Faltblätter, die den antiparallelen β-Faltblatt-Kelch bilden. Die 3D-Struktur wurde mit ChimeraX erstellt (Pettersen et al. 2021).

Bei der hitzeinduzierten Denaturierung von BLG unter neutralem pH-Wert dissoziieren die BLG-Dimere zunächst ab Temperaturen von 55 °C zu Monomeren. Mit weiter steigender Temperatur erreicht BLG zwischen 60 und 70 °C den *molten globule*-Zustand – eine intermediäre Form zwischen Denaturierung und nativer Struktur, die nicht mehr reversibel ist. In diesem Zustand tritt die zuvor verborgene Thiol-Gruppe C121 an die Oberfläche, was unter oxidativen Bedingungen zur Bildung von neuen intermolekularen Disulfidbrücken und in diesem Zug zur Bildung von kleineren Oligomeren führt. Oberhalb von 75 °C entstehen größere Aggregate. Trotz der Hitzeeinwirkung bleiben etwa 25 % der Sekundärstruktur von BLG selbst bei über 80 °C erhalten. Eine komplette Denaturierung, einhergehend mit der Spaltung von Disulfidbrücken, findet erst bei Temperaturen oberhalb von 125 °C statt (de Wit 2009).

Auf dieser Quartärstruktur-Dynamik beruhen die funktionellen Eigenschaften, die BLG für den Einsatz in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie interessant machen. So kann BLG durch Denaturierung als Emulgator oder Schaum- und Gelbildner fungieren (Nicolai et al. 2011), während es in seiner nativen Form zur Bindung und zum Transport von hydrophoben Molekülen eingesetzt werden kann (Kontopidis et al. 2002).

2.2.2 Amyloides Aggregationsverhalten

Amyloide Aggregationen von Proteinen können durch die intermolekulare Überlagerung von β-Strängen entstehen und sind überwiegend mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson assoziiert (Sipe und Cohen 2000; Chiti und Dobson 2006; Eisenberg und Jucker 2012). Neben den Proteinen, die pathogene Aggregationen bilden, finden sich in der Natur auch andere Proteine, die in der Lage sind amyloide Strukturen auszubilden. So gibt es funktionelle Amyloide beispielsweise in diversen Organismen, die dort spezifische Aufgaben wie die Anhaftung von Muscheln

und Tintenfischen an Oberflächen oder die Stabilisierung von Insektenpanzern und Fischeiern haben. Zudem bieten sie in Pflanzensamen Schutz gegen verschiedene Umwelteinflüsse (Fowler et al. 2007; Priemel et al. 2017; Deepankumar et al. 2020; Hoppenreijts et al. 2022). Auch in der Lebensmitteltechnologie bieten Amyloidstrukturen von Proteinen interessante Anwendungen. Das globuläre Molkenprotein BLG ist in der Lage Amyloidaggregate mit unterschiedlichen Funktionalitäten zu bilden, die vielversprechende Anwendungen als Gelbildner, Emulgator oder Trägerstoff für bestimmte Moleküle liefern (Cao und Mezzenga 2019). Die Proteinaggregation erfolgt durch Denaturierung und Destabilisierung des Proteins. Dies führt zur Exposition sonst innenliegender Aminosäure-Seitenketten, wodurch Interaktionen zwischen den Proteinen ermöglicht werden, die zur Amyloidbildung beitragen. Dies ermöglicht es den β -Faltblättern, vermehrt miteinander zu interagieren und Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden (Loveday et al. 2017). Außerdem werden durch diesen Prozess die Thiol-Gruppen der in BLG enthaltenen Cysteine zugänglich, was zu Disulfid-Umlagerungen führen kann (Hoppenreijts et al. 2022).

Der Aggregationsmechanismus von amyloiden und amyloidartigen Strukturen kann generell in drei Phasen unterteilt werden: Bei BLG ist die initiale **Lag-Phase** durch den Beginn der Nukleation gekennzeichnet. In diesem Schritt verbinden sich die denaturierten Proteinmoleküle zunächst reversibel und später irreversibel zu den primären Fibrillenbausteinen, den sogenannten Nuclei. Dabei beeinflusst eine höhere Temperatur die Nukleationsgeschwindigkeit positiv und kann somit die Lag-Phase verkürzen. Eine beschleunigte Lag-Phase führt zu locker strukturierten Nuclei und resultierenden viskoserem Aggregaten, da die dreidimensionale Proteinstruktur in dieser kurzen Zeit nicht vollständig entfaltet werden konnte. Während der folgenden **Wachstumsphase** reihen sich die zuvor generierten Protein-Grundeinheiten linear aneinander und formen eng gekoppelte Strukturen. Die resultierenden Amyloide und Fibrillen unterscheiden sich von den ursprünglichen Bausteinen dahingehend, dass sie nachträglich durch verschiedene Faktoren modifiziert und aufgelöst werden können. Schließlich tritt die stationäre oder **Terminations-Phase** ein, in der das Wachstum der Fibrillen aufgrund des Mangels an verfügbaren Bausteinen stagniert. Dies resultiert in einem insgesamt sigmoidalen Wachstumsverlauf der BLG-Aggregate (Loveday et al. 2017; Hoppenreijts et al. 2022).

Zur Bildung amyloider Fibrillen aus BLG werden üblicherweise ein niedriger pH-Wert ($< 3,5$) sowie hohe Temperaturen ($> 70^\circ\text{C}$) benötigt. Unter diesen Bedingungen kann eine saure Hydrolyse der Proteine stattfinden, wodurch Peptide mit erhöhter Tendenz zur Fibrillenbildung freigesetzt werden (Akkermans et al. 2008a). Am häufigsten werden dabei die Peptidbindungen zwischen Asparaginsäure und anderen Aminosäuren hydrolysiert. Die dadurch entstehenden Peptide bestehen hauptsächlich aus den N-terminalen Aminosäuren 1–33 oder 1–53 von BLG und zeichnen sich durch eine hohe Hydrophobizität, niedrige Oberflächenladung und starke Neigung zur Bildung von β -Faltblättern aus (Akkermans et al. 2008a). Bestimmte Aminosäuren können dabei die intermolekularen Wechselwirkungen verstärken. So können beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen zwischen amidhaltigen Aminosäureresten (Asparagin, Glutamin) ausgebildet werden oder π - π Wechselwirkungen zwischen aromatischen Aminosäureresten (Tryptophan, Phenylalanin) auftreten (Porat et al. 2006; Heyn et al. 2020). Durch Zusammenlagerung dieser N-terminalen Peptide entstehen dünne (2,6 nm), lange (0,2–5 μm) sowie gerade und gut geordnete Amyloidaggregate, die als „semiflexibel“ eingestuft werden (**Abbildung 3**) (van den Akker et al. 2011). Akkermans et al. (2008b) konnten auch bei niedrigen Temperaturen fibrilläre Strukturen erzielen, indem sie BLG bei 37°C und

pH 8,0 einer enzymatischen Hydrolyse mit der AspN Endoproteinase unterzogen und anschließend den pH-Wert auf 2,0 reduzierten.

Neben den durch saure Hydrolyse gebildeten „semi-flexiblen“ Amyloidaggregaten ist BLG in der Lage, weitere Aggregatformen unter höheren pH-Werten zu bilden. Zwischen einem pH-Wert von 3,0 und 3,5 und Temperaturen von über 70 °C kann teilweise entfaltetes BLG zu zufällig angeordneten, Amyloid-ähnlichen Aggregaten assoziieren, die dünn (1–3 nm), kurz (50–200 nm) und flexibler als die gebildeten Fibrillen bei pH 2,0 sind (Jung et al. 2008; Heyn et al. 2019). Diese Aggregatform wird in der Literatur als „wurmähnlich“ betitelt (**Abbildung 3**). Die Struktur der wurmartigen Aggregate ist weniger kompakt. Es wird davon ausgegangen, dass die Amyloide zu einem größeren Anteil aus den C-terminalen Peptiden (AS 138 – 162) von BLG bestehen (Ye et al. 2018). Bei pH-Werten in der Nähe des isoelektrischen Punkts von 5,2 verschiebt sich die Morphologie amyloider Strukturen hin zu monodispersen, kompakten und zufällig angeordneten sphärischen Aggregaten (~150 nm). Bei neutralem pH-Wert, der etwas höher als der isoelektrische Punkt liegt, ermöglicht die elektrostatische Abstoßung die Aggregation von BLG in unverzweigte, kurze (< 100 nm) und wurmähnliche Aggregate mit einem Durchmesser von 6 ± 1 nm. Außer durch den pH-Wert kann die Morphologie der gebildeten BLG-Aggregate aber auch über die Ionenstärke, die Temperatur und die Proteinkonzentration beeinflusst werden (Hoppenreijts et al. 2022).

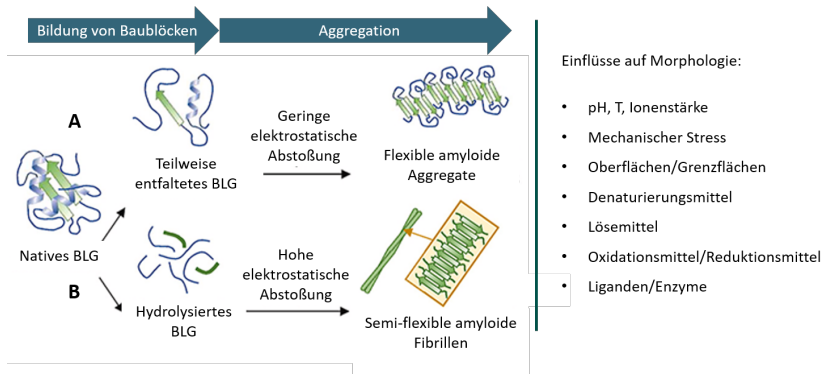


Abbildung 3: Schematische Übersicht der Bildung amyloider und Amyloid-artiger Strukturen aus destabilisiertem BLG und Faktoren, die Einfluss auf die Morphologie der Aggregate haben. **A:** Bildung flexibler amyloider Aggregate aus teilweise entfaltetem BLG, gebildet bei einem pH-Wert von > 3,5 **B:** Bildung semi-flexibler amyloider Fibrillen aus hydrolysiertem BLG, gebildet bei pH-Werten von < 3,5. Modifiziert nach Hoppenreijts et al. (2022).

2.2.3 Ligandenbindung von bovinem BLG

β-Lactoglobulin (BLG) ist Mitglied der Lipocalin-Familie, die sich durch eine konservierte β-Faltblatt-Struktur in Form eines Fasses auszeichnet. Dieser Familie ist die Fähigkeit, kleine, primär hydrophobe Liganden zu binden, gemein (Flower et al. 2000). Die primäre Bindungsstelle von BLG befindet sich innerhalb der proteininternen, kelchförmigen Struktur (**Abbildung 4**) (Kontopidis et al. 2002).



Abbildung 4: Modell von bovinem BLG (PDB-ID: 1GX8) aus unterschiedlichen Blickwinkeln mit gebundenem Retinol-Molekül (rot) in der primären, kelchförmigen Bindungstasche (Kontopidis et al. 2002). Die 3D-Struktur wurde mit ChimeraX erstellt (Pettersen et al. 2021).

Ergänzend wurde eine sekundäre, äußere Bindungsstelle in der Nähe des C-Terminus identifiziert, die von der α -Helix und dem β -Faltblatt I geformt wird (Chen et al. 2009). Zusätzliche Anhaltspunkte deuten darauf hin, dass durch die Dimerisierung des Proteins eine weitere Bindungsstelle entstehen könnte (Wang et al. 1998). An der kelchförmigen Hauptbindungsstelle von BLG werden bevorzugt lineare Moleküle mit langen hydrophoben Ketten gebunden. Dies ermöglicht die Bindung einer Vielfalt an Liganden, wobei unter natürlichen Bedingungen in der Milch insbesondere Palmitin- und Ölsäure sowie Retinol, ein Vitamin A-Derivat, gebunden werden (Sawyer 2013). Die Bindungsaffinität dieser Liganden steigt mit der Länge ihrer Kohlenstoffketten bis zu einer optimalen Kettenlänge von 16 Kohlenstoffatomen wie bei Palmitinsäure. Die Fähigkeit, Liganden zu binden, ist innerhalb der hydrophoben Fass-Struktur stark pH-abhängig (Sawyer 2013). Die Bindungskraft erhöht sich bei steigendem pH-Wert. Dies liegt an einem beweglichen Loop zwischen den β -Strängen E und F, der bei saurem pH-Wert den Bindungsbereich verschließt und sich bei einem höheren pH-Wert öffnet, was die Bindungstasche für Liganden zugänglich macht. Diese Veränderung, bekannt als "Tanford Transition", wird durch das hochkonservierte Glutamin 89 im Loop ausgelöst (Tanford et al. 1959).

Die Bindungseigenschaften von BLG werden somit maßgeblich von den umgebenden Bedingungen beeinflusst, was den Zustand des Proteins und seine Fähigkeit, Liganden zu binden, verändert. Diese dynamische Bindungsflexibilität ist besonders relevant für die pharmazeutische Forschung, insbesondere bei der Entwicklung von Transportsystemen für oral verabreichte Wirkstoffe wie Chemotherapeutika. Aufgrund seiner Säureresistenz bleibt BLG im sauren Milieu des Magens stabil, wodurch es sich für den Transport von Wirkstoffen eignet, die im Magen-Darm-Trakt freigesetzt werden sollen. Im alkalischen Milieu wird BLG hingegen abgebaut, was die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen ermöglicht. Diese Eigenschaften machen BLG zu einem vielversprechenden Kandidaten für ein biologisch abbaubares und bioverträgliches Verabreichungssystem (Ghalandari et al. 2015; Shafaei et al. 2017).

2.2.4 Rekombinante Produktion von bovinem BLG

Bovines BLG hat sich aufgrund seiner gut verstandenen Faltungsmechanismen und vielfältigen Eigenschaften als bedeutendes Modellprotein in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie etabliert. Die Isolierung von BLG aus Milch ist dank effizienter, schneller und kostengünstiger Methoden, die vorwiegend auf Fällungs- und Chromatographieverfahren basieren, relativ einfach. Dies macht BLG zu