

Berichte aus der Chemie

Claudia Dauvermann-Gotsche

**Charakterisierung 18-Methyleicosansäurehaltiger
Proteolipide der Wolle**

D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Shaker Verlag
Aachen 1999

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Dauvermann-Gotsche, Claudia:

Charakterisierung 18-Methyleicosensäurehaltiger Proteolipide der Wolle/
Claudia Dauvermann-Gotsche. - Als Ms. gedr. - Aachen : Shaker, 1999
(Berichte aus der Chemie)

Zugl.: Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 1999

ISBN 3-8265-6424-3

Copyright Shaker Verlag 1999

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
odervollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Als Manuskript gedruckt. Printed in Germany.

ISBN 3-8265-6424-3

ISSN 0945-070X

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung der Struktur der Wolloberfläche. Spezielles Interesse galt dabei der kovalent an die Faseroberfläche gebundenen 18-Methyleicosansäure (18-MEA). Nach reduktivem enzymatischem Abbau der Faser mit Papain/Dithioerythrol wurden Proteolipide, die 18-MEA kovalent gebunden enthalten, isoliert und hinsichtlich ihres Anteils an kovalent gebundenen Fettsäuren, ihrer Aminosäurezusammensetzung sowie ihres Molekulargewichtes charakterisiert. Zudem wurde die Art der Bindung zwischen 18-MEA und den Proteinen der Wollcuticula untersucht.

Das Lösungsmittel Chloroform erwies sich als geeignet, den Großteil der internen Lipide der Wolle - freie Fettsäuren, polare Lipide, Sterine und Cholesterinester - zu entfernen. Durch die Vermeidung primärer Alkohole im Lösungsmittel ließ sich die Abspaltung kovalent gebundener Fettsäuren durch Alkohololyse verhindern. Mit Chloroform wurden ca. 27 Gew.% (84 µg/g) der in unbehandelter Wolle vorhandenen 18-MEA extrahiert; dieser Anteil muß folglich in nicht-kovalent gebundener Form vorliegen. Der Gehalt an 18-MEA, der in der Wolle nach Extraktion mit Chloroform und alkalisch-methanolischer Totalhydrolyse bestimmt wurde, betrug ca. 230 µg/g.

Die nach reduktivem enzymatischen Abbau der Wolle erhaltene Zellmembrankomplexfraktion (ZMK) enthielt noch freie Fettsäuren, Sterine und polare Lipide wie Sphingolipide und Cholesterinsulfat. Diese wurden durch Extraktion des ZMK mit Chloroform entfernt. In der chloroformlöslichen Fraktion des ZMK wurde freie 18-MEA nachgewiesen, deren Anteil ca. 12 Gew.% der in chloroformextrahierter Wolle enthaltenen 18-MEA beträgt. Dieser Anteil wurde folglich durch den enzymatischen Abbau freigesetzt. Die Hauptmenge der 18-MEA lag jedoch kovalent gebunden am proteinischen Material des ZMK vor.

Ca. 80 Gew.% des ZMK ließen sich mit einem 2-Phasen-Lösungsmittelsystem, bestehend aus Chloroform, Ameisensäure, Essigsäure und Wasser, solubilisieren. Sowohl aus der wäßrigen als auch aus der organischen Phase wurden Proteine isoliert, so daß durch die Extraktion eine Auftrennung des ZMK in drei Fraktionen erreicht wurde: Proteine aus der wäßrigen Phase, Proteolipide aus der organischen Phase und ein Extraktionsrückstand.

Die Proteolipide und der Extraktionsrückstand aus der 2-Phasen-Extraktion des ZMK weisen einen hohen Gehalt an kovalent gebundenen Fettsäuren auf, der jeweils 1,2 bzw. 1,3 Gew.% am Gesamtmaterial ausmacht. Im Vergleich dazu beträgt der Gehalt an 18-MEA in der Gesamtfaser nur 0,02 Gew.%. 18-MEA bildet mit ca. 80 Gew.% den überwiegenden Anteil der kovalent gebundenen Fettsäuren, die übrigen 20 Gew.% bestehen zu etwa gleichen Anteilen aus Palmitin- und Stearinsäure. Der Anteil an kovalent gebundenen Fettsäuren beträgt nur 0,06 Gew.% der aus der wäßrigen Phase gewonnenen Proteine. Die Fettsäuren setzen sich ausschließlich aus Palmitin- und Stearinsäure zusammen.

Der überwiegende Teil der kovalent gebundenen Fettsäuren im Extraktionsrückstand, nämlich 98 % der Gesamtfettsäuremenge, ließ sich durch milde alkalisch-methanolische Hydrolyse freisetzen. Dies zeigt, daß die kovalente Bindung zwischen Fettsäuren und Proteinen des Extraktionsrückstandes eine Ester- oder Thioesterbindung sein muß.

Durch IR-Spektroskopie wurden keine Hinweise auf die Bindungsart der Fettsäuren an die Proteine erhalten, da die intensive Amid I Schwingungsbande Carbonylschwingungen von Estern und Thioestern überdeckt. Die IR Spektren zeigen jedoch in anschaulicher Weise den unterschiedlich hohen Gehalt an kovalent gebundenen Fettsäuren in den drei Fraktionen. Die Intensität der Alkylschwingungsbanden ist in den Spektren der Proteolipide und des Extraktionsrückstandes erheblich größer als im Spektrum der Proteine aus der wäßrigen Phase.

Die Aminosäurezusammensetzung der löslichen Proteine und des Extraktionsrückstandes aus der 2-Phasen-Extraktion des ZMK wurden nach saurer Totalhydrolyse bestimmt. Alle drei Fraktionen zeichnen sich gegenüber der Aminosäurezusammensetzung intakter Wolle durch einen hohen Anteil unpolarer und helixbildender Aminosäurereste aus.

Charakteristisches Merkmal der Proteolipide ist ein auffällig hoher Gehalt an der helixstabilisierenden Aminosäure Leucin von 15,5 mol% gegenüber nur 8,0 mol% in der eingesetzten Wolle. Mit einem Gehalt an $\frac{1}{2}$ -Cystin von 3,5 mol% sind die Proteine aus der wäßrigen Phase im Vergleich zur eingesetzten Wolle (11,6 mol% $\frac{1}{2}(\text{Cys})_2$) extrem schwefelarm. Eine weitere Besonderheit der Proteine aus der

wäßrigen Phase ist ihr im Vergleich zur eingesetzten Wolle deutlich erhöhter Tryptophangehalt von 55,6 $\mu\text{mol/g}$.

Zum Vergleich der ZMK-Fractionen mit morphologischen Komponenten der Wolle anhand ihrer Aminosäurezusammensetzungen wurde die statistische Methode der Clusteranalyse angewendet. Die Proteine aus der wäßrigen Phase wurden den resistenten Membranen der Wolle zugeordnet. Überraschenderweise ist der Extraktionsrückstand in seiner Aminosäurezusammensetzung den Intermediärfilamentproteinen der Wolle am ähnlichsten, was vermutlich auf etwa gleich hohen Gehalt an $\frac{1}{2}$ -Cystin (8 bzw. 6 mol%) und helixbildenden Aminosäuren (ca. 38 bzw. 49 mol%) beruht. Die Proteolipide aus der organischen Phase zeigen große Übereinstimmung mit Proteinen, die aus intakter Wolle, aus Cuticula und aus ZMK durch Ameisensäure extrahiert werden und in der Regel der δ -Layer des ZMK zugeordnet werden.

Mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ließen sich die Proteolipide aus der organischen Phase in vier Proteinbanden mit ausschließlich niedrigen Molekulargewichten von ca. 3500 bis 11000 trennen. Die Proteine aus der wäßrigen Phase zeigen nach elektrophoretischer Trennung eine dominierende Bande mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 27000; zudem treten zwei intensitätsschwache Banden im höhermolekularen Bereich und sieben weitere Banden in einem relativen Molekulargewichtsbereich von ca. 4000 - 23000 auf. Nur ein Teil des Extraktionsrückstandes wurde mit dem Elektrophoresepuffer gelöst. Im Elektropherogramm dieses im Puffer löslichen Anteils sind ausschließlich Proteine der Proteolipide wie auch Proteine aus der wäßrigen Phase zu verzeichnen.

Untersuchungen der Proteolipide und der Proteine aus der wäßrigen Phase mit Hilfe der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Massenspektrometrie bestätigen die SDS-PAGE-Ergebnisse; die gefundenen Molekulargewichte haben die gleiche Größenordnung, sind jedoch etwas kleiner. Für die Proteolipide werden drei Maxima im Massenbereich von $2600 < m/z < 3670$ nachgewiesen (PAGE: ca. 3500 - 11000). Das Massenspektrum der Proteine aus der wäßrigen Phase zeigt ein Signal bei $m/z = 23412$ (PAGE: ca. 27000) und drei weitere bei kleineren Massen von $2787 < m/z < 3536$ (PAGE: > 4000).

Für die chromatographische Auftrennung der Proteine aus der wäßrigen Phase und der Proteolipide aus der organischen Phase wurde ein spezielles Flüssig/Flüssig-

Extraktionsverfahren, die Gegenstromverteilung, angewendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Trennung der Analyten zwischen zwei flüssigen nicht miteinander mischbaren Lösungsmittelphasen, wobei die eine als stationäre und die andere als mobile Phase dient. Mit einem 2-Phasen-Lösungsmittelsystem aus Chloroform, Ethanol, Ameisensäure, Essigsäure und Wasser wurde die präparative Fraktionierung sowohl der Proteine aus der wäßrigen Phase als auch der Proteolipide erreicht.

Die Proteine aus der wäßrigen Phase wurden entsprechend ihrer Affinität zur mobilen organischen Lösungsmittelphase in zwei Fraktionen unterschiedlicher Polarität getrennt. Beide Fraktionen weisen im Elektropherogramm eine Proteinbande mit relativem Molekulargewicht von ca. 26000 auf; sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Aminosäurezusammensetzung und zwar am deutlichsten durch den Anteil unpolarer Aminosäurereste (54,0 mol% bzw. 47,9 mol%).

Die Proteolipide wurden durch die Gegenstromverteilung ebenfalls in zwei Fraktionen unterschiedlicher Affinität zur mobilen wäßrigen Lösungsmittelphase aufgetrennt. Nach elektrophoretischer Trennung der Fraktionen werden in der hydrophileren Fraktion hauptsächlich drei Proteinbanden mit relativen Molekulargewichten von ca. 6200, 8200 und 10600 nachgewiesen. Die hydrophobere Fraktion besteht hauptsächlich aus einem Protein mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 3900. Trotz seines hydrophoben Charakters besitzt das Protein keinen erhöhten Anteil unpolarer Aminosäurereste. Der unpolare Charakter muß folglich auf einen hohen Anteil kovalent gebundener Fettsäuren zurückzuführen sein.

Die Lokalisierung der Proteolipide in der Faser wurde elektronenmikroskopisch untersucht. Dazu wurde 18-MEA mit dem für Thioester spezifischen Reagenz Hydroxylamin von der Wollfaser abgespalten, und die durch Freisetzung der 18-MEA auf der Faseroberfläche entstandenen freien SH-Gruppen wurden mit dem für Thiolgruppen selektiven Monomaleimidonanogold™ markiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Faserquerschnitte zeigen eine deutliche Markierung mit Gold an der Faseroberfläche und zwar in den obersten ca. 30 nm der Cuticula.

Mittels Gaschromatographie wurde bestimmt, daß Hydroxylamin ca. 60 % der kovalent gebundenen 18-MEA von der Faser abspaltet. Unter Berücksichtigung aller Er-

gebnisse läßt sich schließen, daß mindestens 60 % der 18-MEA im Bereich der Faseroberfläche in einer Thioesterbindung vorliegen.

SUMMARY

The fundamental aim of the present work was to contribute to the knowledge of the wool surface structure. Special interest was paid to 18-methylicosanoic (18-MIA) acid which is covalently attached to the fiber surface. After reductive enzymatic treatment of the fiber with papain/dithioerythritol, proteolipids containing 18-MIA were isolated from the cell membrane complex fraction (CMC) and their amino acid composition and molecular weights were characterized. Furthermore, the character of the linkage between 18-MIA and wool cuticle proteins was investigated.

Chloroform proved to be a suitable solvent for the extraction of the main portion of internal lipids of wool, predominantly free fatty acids, polar lipids, sterols and cholesterol esters. By avoiding the use of primary alcohols in the solvent, the release of bound fatty acids by alcoholysis was prevented. Gas-liquid chromatography (GLC) revealed that the extraction with chloroform removed approx. 27 wt.% of 18-MIA (84 µg/g of wool); obviously, this portion is not covalently bound. The 18-MIA content in chloroform extracted wool amounts to 230 µg/g.

In the CMC fraction some solvent extractable lipids were still present; these lipids, associated with the proteinaceous CMC material, were removed by extraction of the CMC with chloroform. The chloroform extract was shown to contain considerable amounts of free 18-MIA. The amount was determined by means of GLC to 12 wt.% of the covalently bound portion of 18-MIA. While this portion must have been released by the enzymatic reductive treatment, the major part of 18-MIA remains covalently attached to proteinaceous CMC material.

Approximately 80 % of the CMC were solubilised applying a biphasic solvent system consisting of chloroform, formic acid, acetic acid, and water. Proteins were isolated both from the aqueous and the organic phase of the solvent system. Thus, the extraction of the CMC produces three fractions: proteolipids from the organic phase, proteins from the aqueous phase and extraction residue.

Proteolipids and residue from the biphasic CMC extraction are characterized by a high content of covalently bound fatty acids (1,3 wt.% resp. 1,2 wt.% of the proteinaceous material). In comparison to this the amount of 18-MIA in the intact fiber is only 0,02 wt.%. 18-MIA is the major component (approx. 80 wt.%); about

20 wt.% of palmitic and stearic acid are also present in this fraction. Proteins from the aqueous phase contain a significantly smaller amount of covalently attached fatty acids (0,06 wt.%). They consist exclusively of palmitic and stearic acid.

The main part of the bound fatty acids, namely 98 wt.% of total fatty acids, was readily cleaved by mild alkaline methanolic hydrolysis which supports the presence of an ester- or thioester linkage.

IR spectroscopy did not give informations on the type of bond between 18-MIA and proteins, since the absorption bands of carbonyl groups of esters and thioesters are hidden by the intensive amide I band. However, the spectra clearly display the differences in the content of covalently bound fatty acids in the fractions. The alkyl absorbance band is much more intense in the spectra of proteolipids and extraction residue than in the spectrum of proteins from the aqueous phase.

The amino acid composition of the soluble proteins and the residue of the CMC extraction were determined after total acidic hydrolysis. All three fractions differ from wool in their high content of non polar amino acid residues.

Distinguishing mark of the proteolipids is a strikingly high amount of leucin (15,5 mol%) compared to wool with 8,0 mol %. The proteins of the aqueous phase show an extremely low half-cystine content of 3,5 mol% and a high tryptophan content of 55,6 $\mu\text{mol/g}$.

To compare the amino acid compositions of the CMC fractions to that of the different morphological components of wool, the statistical method of cluster analysis was applied. The proteins of the aqueous phase form a group with the resistant membranes of wool. Surprisingly enough, the residue is most similar to the intermediate filament proteins of wool, which is probably a consequence of the low amount of half-cystine (8 and 6 mol%, respectively) and helix supporting amino acids (38 and 49 mol%, respectively). The amino acid composition of the proteolipids shows the best correspondance with the formic acid soluble proteins from intact wool, isolated cuticle, and isolated CMC which are thought to originate from the δ -layer.

The proteolipids were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) into four protein bands in the molecular weight range from approx. 11000 to

3500. For the proteins of the aqueous phase one dominating protein band with a relative molecular weight of approx. 27000 is observed. In addition to that, two weak bands with higher relative molecular weights and further seven bands in a molecular weight range from 23000 to 4000 are present. Only a portion of the insoluble CMC residue was dissolved in the denaturing sample buffer. In the electropherogram of the dissolved portion only proteins from the proteolipid fraction and from the aqueous phase were observed.

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization mass spectrometry of the proteolipids and proteins from the aqueous phase confirms the SDS-PAGE results, though the molecular weights determined with this method are slightly lower. For the proteolipids, three maxima were determined to be in the mass range from $2600 < m/z < 3670$. The mass spectrum of the proteins from the aqueous phase shows one signal at $m/z = 23412$ and three further signals with lower masses in the range $2787 < m/z < 3536$.

Counter current chromatography was used for a further chromatographic separation of the proteins from the aqueous phase and the proteolipids from the organic phase. The principle of this method is based on the separation of the analytes between two non-miscible liquid phases serving as stationary and mobile phase. Applying a biphasic solvent system consisting of chloroform, ethanol, formic acid, acetic acid, and water, the separation and isolation of the proteins of the aqueous phase and the proteolipids was achieved.

According to their affinity towards the organic mobile phase, the proteins from the aqueous phase were separated into two fractions of different polarity. Each of them contains one protein band with a relative molecular weight of approximately 26000 which, however, differ from each other in their amino acid composition and portion of non-polar amino acid residues (54 mol% and 47 mol%, respectively).

Applying counter current chromatography the proteolipids were also separated into two fractions with different affinity toward the aqueous mobile phase. The electrophoretic separation of the polar fraction shows that three dominant protein bands with relative molecular weights of 10600, 8200 and 6200 are present. The more hydrophobic fraction mainly consists of one protein with a relative molecular weight of 3900. In spite of its hydrophobic character the protein does not contain an

increased amount of non-polar amino acid residues; the non-polar character is probably a consequence of covalently attached fatty acids.

The localization of the proteolipids in the fiber was studied by transmission electron microscopy. For this purpose, 18-MIA was cleaved from the fiber with the thiol-specific reagent hydroxylamine. The released thiol groups generated by cleavage of 18-MIA were selectively labelled with monomaleimidonanogold™. The micrographs demonstrate the presence of gold labelled thiol groups within the outermost 30 nm of the cuticle.

Applying GLC it was shown that hydroxylamine cleaves approximately 60 wt.% of the covalently bound 18-MIA from the fiber. As a consequence of all results, it is concluded that at least 60 wt.% of 18-MIA are present in form of a thiol ester.