

**Chemoenzymatische Herstellung von Peptiden und Acylpeptiden,
spektralphotometrische, chromatografische und MALDI-ToF/MS
Analysen der Produkte sowie Charakterisierung der tensidischen
Eigenschaften**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION

von

Dipl.-Biol. Markus Andre
aus
Schwalbach

Karlsruhe, den 19. Oktober 2012

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Stefan Bräse

Co-Referent: Prof. Dr. Christoph Syldatk

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Textpassagen wurden als solche kenntlich gemacht sowie die Satzung des Karlsruher Instiut für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung beachtet.

Karlsruhe, den 05. September 2012

Markus Andre

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. Sylatk für die Überlassung des spannenden und vielfältigen Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie für die fachlichen Tipps und Ratschläge.
- Herrn Prof. Dr. Stefan Bräse für die freundliche Übernahme des Referates.
- Herrn Dr. Jens Rudat für seine phänomenale und kompetente Betreuung der Doktorarbeit, die fachlichen Diskussionen und seine Bemühungen um das Gelingen dieser Arbeit sowie für Gespräche auch abseits des wissenschaftlichen Tellerrandes.
- Meinen Studien-, Diplom- und Masterarbeitern und Praktikanten Johannes Heiduk, Kristianto Aditama, Diana Cavero, Christin Slomka und Sarah Dold, die wichtige Erkenntnisse für weitere Arbeiten lieferten.
- Meinen Arbeitskollegen der Technischen Biologie für die tolle Arbeitsatmosphäre, den fachlichen Input und die schönen außerdienstlichen Veranstaltungen.
- Ein besonderer Dank gilt unserer Laborfee Sandra Baumann, die mir bei allen Problemen und methodischen Fragestellungen mit Rat und Tat zur Seite stand.
- Herrn Boris Kühl für die Unterstützung bei den MALDI/ToF-Analysen.
- Der FAK-Gruppe für die packenden Duelle und der DOx-Gruppe für tolle Abende.
- Julia Hesidenz und Dr. Dennis Mernke für das intensive Korrekturlesen einer fachfremden Arbeit.
- Meiner Familie und besonders meinen Eltern, die mich während meines Studiums und der Dissertation in allen Bereichen unterstützt und motiviert haben.

Vielen herzlichen Dank!

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die chemoenzymatische Herstellung von Acylpeptiden und somit einer Klasse neuartiger Biotenside, deren Eigenschaften für unterschiedliche Industriezweige wie z. B. Biomedizin, Kosmetik- und Waschmittelindustrie, etc. von Interesse sind. Hierzu sollten durch eine Enzym-katalysierte Synthese Homo- und Heterooligopeptide hergestellt werden, die in einer anschließenden *N*-Acylierung mit einer Fettsäure zum Acylpeptid verknüpft werden.

In einer Papain-katalysierten und kinetisch kontrollierten Oligomerisierungsreaktion, in der Ethylester der hydrophoben Aminosäuren Methionin, Leucin, Tyrosin und an beiden Carboxylgruppen ethyliertes und somit hydrophobes Glutamat (Glu-di-OEt) eingesetzt wurden, sollten Peptide in der Größenordnung von 1 kDa hergestellt werden. Mit fortschreitender Länge der Peptidkette stieg die Hydrophobizität der Produkte, was zu deren Präzipitation führte. Abhängig von der verwendeten Aminosäure wurden Masseausbeuten zwischen 23 und 91 % (w/w) erhalten. Die präzipitierten Oligoglutamat- ϵ -ethylester konnten nach Abtrennung aus dem Reaktionsansatz durch alkalische Hydrolyse der veresterten Seitenketten wasserlöslich gemacht werden. Mittels Gelpermeationschromatografie (GPC) wurden Kettenlängen zwischen 17 und 20 Aminosäuren bestimmt werden (> 2 kDa).

Für die Synthese kurzkettiger Oligoglutamat- ϵ -ethylester in der o.g. Größenordnung sollte durch Modifikation verschiedener Versuchsparameter (Reaktionszeit, -temperatur und Enzymmenge) sowie Verwendung zweier weiterer Cysteinproteasen (Bromelain und Ficin) die Präzipitatzmenge verringert und letztlich kurzkettige, lösliche Oligopeptide synthetisiert werden. Spektralphotometrische sowie GPC-Analysen der Versuchsansätze bestätigten das Vorhandensein kurzkettiger Oligopeptide mit Massen zwischen 900 und 1.400 Da. Was durch massenspektrometrische Matrix assisted laser desorption/ionization – Time of flight (MALDI-ToF/MS-) Analysen bestätigt werden konnte.

In Heterooligomerisierungen mit Glutamatdiethylester als einem der beiden Substrate wurden lösliche (nach alkalischer Hydrolyse), anionische Mischpeptide hergestellt. Durch MALDI-ToF/MS-Analysen konnte gezeigt werden, dass sich die Heterooligopeptide Oligoglutamat/Leucin (OligoGlu/Leu) und Oligoglutamat/Methionin (OligoGlu/Met) aus Peptiden mit Polymerisierungsgraden zwischen 6 und 10 bzw. 7 und 10 Aminosäuren zusammensetzten.

Erstmalig wurde in dieser Arbeit eine Enzym-katalysierte Synthese von kationischen Heterooligopeptiden erfolgreich durchgeführt. Die durch MALDI-ToF/MS bestätigte Heterooligomerisierung führte, ausgehend von Lysin- und Methioninethylestern, zu Präzipitaten

kationischer Mischpeptide, die ohne weitere Behandlung in saurem Medium löslich waren und Kettenlängen von 6 bis 13 Aminosäuren aufwiesen.

Nach den erfolgreichen Peptidsynthesen sollten die Oligopeptide entweder über einen enzymatischen oder einen chemischen Ansatz mit einer Fettsäure acyliert werden. Für letzteren wurde, wegen der im Vergleich zu anderen chemischen Methoden milden Reaktionsbedingungen, die Schotten-Baumann-Reaktion zur *N*-Acylierung der Oligopeptide verwendet. Für Oligolutamat konnte kein Acylierungsprodukt mittels MALDI-ToF/MS nachgewiesen und auch kein Einfluss auf die Oberflächenspannung festgestellt werden. Bei OligoGlu/Leu wies die tensiometrische Bestimmung der Oberflächenspannung (47 mN/m) auf eine Acylierung hin, was allerdings durch MALDI-ToF/MS nicht eindeutig bestätigt werden konnte.

Hingegen konnte für das Heterooligopeptid OligoGlu/Met eine erfolgreiche *N*-Acylierung bestätigt werden. Die tensiometrische Bestimmung der Oberflächenspannung ergab für das entstandene Tensid eine Absenkung von 70 mN/m auf 55 mN/m im Vergleich zur reinen Peptidlösung. Somit wurde erstmals ein schwefelhaltiges, anionisches Acylpeptid über einen chemoenzymatischen Syntheseweg hergestellt und nachgewiesen.

Summary

Aim of the presented thesis was the chemoenzymatic synthesis of acylpeptides, which represent a group of novel biosurfactants with interesting properties for different industries, such as biomedical, laundry or cosmetic. This should be achieved through the coupling of an enzyme-catalyzed peptide oligomerization and a following *N*-acylation of the products towards acylpeptides.

First, a papain-catalyzed and kinetically controlled oligomerization with the hydrophobic amino acid ethylesters of leucine, methionine, tyrosine and glutamate (side chain also esterified) should lead to homooligopeptides with masses around 1 kDa. Through the proceeding growth of the peptide chain during the oligomerization the hydrophobicity of the product increased, leading to product precipitation. Depending on the used amino acid substrate, the mass yields of the precipitates were between 23 and 91 % (w/w). In case of the oligomerization of glutamic acid diethylester (GludiOEt), the resulting precipitate could be resolved by alkaline hydrolysis of the esterified side chains. The solved oligoglutamate (OligoGlu) could be analyzed by size exclusion chromatography (SEC), which revealed peptide chain lengths between 17 and 20 amino acids (> 2 kDa).

For the oligomerization of GludiOEt, modifications of the reaction parameters as well as the use of two further cysteine proteases (bromelain and ficain) should lead to a decrease in the precipitation amount and at least to short chained, soluble oligopeptides with masses around 1 kDa. The existence of the desired peptides was proved by spectrophotometric analyses and SEC, which resulted in masses for the soluble peptides between 900 und 1400 Da. Mass spectrometric Matrix assisted laser desorption/ionization – Time of flight (MALDI-ToF) analyses of the precipitates revealed peptides within the same range.

Besides homooligopeptides, heterooligopeptides with glutamic acid as one the substrates should be synthesized, as the resulting peptides can also be resolved via alkaline hydrolysis. The heterooligopeptides Oligoglutamic acid/methionine (OligoGlu/Met) and oligoglutamic acid/leucine (OligoGlu/Leu) were synthesized and MADLI-ToF/MS analyses showed peptides with a degree of polymerization between 7 and 10 respectively 6 and 10 amino acids.

For the first time, a successful enzymatic oligomerization of cationic heterooligopeptides, containing lysine and methionine moieties, was performed in this thesis. The precipitates of the resulting peptides were soluble in acidic aqueous solutions and possessed chain lengths between 6 and 13 amino acids, which was proved by MALDI-ToF/MS.

After the successful synthesis of homo- and heteroligopeptides, a *N*-terminal acylation via the Schotten-Baumann reaction should be performed. The acylation success was investigated with MALDI-ToF/MS and the surface tension measured to determine the surfactant properties of the acylpeptides. No acylation of OligGlu was assumed, because MALDI-ToF/MS analyses and the determination of the surface tension showed no differences towards the non-acylated oligopeptide. Different results were obtained for the acylation of OligoGlu/Leu, as MALDI-ToF did not reveal a mass increase by the mass of the fatty acid for the acylated peptides, but the surface tension was decreased in comparison to OligoGlu/Leu.

A successful acylation of OligoGlu/Met was proven by both methods, the MALDI-ToF/MS analyses and the determination of the surface tension, which decreased from 70 mN/m to 55 mN/m. Thus, with the enzymatic synthesis of OligoGlu/Met and the following successful acylation, an acylpeptide synthesis by a chemoenzymatic approach was performed for the first time.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	III
ZUSAMMENFASSUNG	IV
SUMMARY	VI
INHALTSVERZEICHNIS	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XII
TABELLENVERZEICHNIS	XV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XVII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Acylpeptide als neuartige Biotenside	1
1.2. Peptidsynthese	3
1.2.1. Chemische Peptidsynthese	3
1.2.2. Enzymatische Peptidsynthese	5
1.2.2.1. Thermodynamisch kontrollierte Peptidsynthese	5
1.2.2.2 Kinetisch kontrollierte Peptidsynthese	6
1.2.2.3. Synthese von Oligopeptiden	8
1.2.3. Enzyme in der enzymatischen Peptidsynthese	10
1.3. Acylierung von Aminosäuren und Peptiden	11
1.3.1. Chemische Acylierung von Aminosäuren und Peptiden	11
1.3.2. Enzymatische Acylierung	13
1.4. Zielsetzung der Arbeit	14
2. MATERIAL & METHODEN	16
2.1. Verwendete Puffer und Lösungen	16

2.2. Verwendete Geräte & Chemikalien	17
2.3. Synthese von Oligopeptiden.....	21
2.3.1. Enzymatische Synthese unlöslicher Homo- und Heterooligopeptide	21
2.3.1.1. Alkalische Hydrolyse.....	22
2.3.1.2. Modifikation der Reaktionsparameter Temperatur, Zeit, Enzymmenge	23
2.3.2. Enzymatische Synthese löslicher Oligopeptide	24
2.3.3. Analytik	24
2.3.3.1. Bestimmung der Präzipitattmenge.....	25
2.3.3.2. BCA-Assay zur Bestimmung des Proteingehaltes.....	25
2.3.3.3. Photometrischer Aminosäurenachweis mittels OPA-N-Derivatisierung.....	26
2.3.3.4. Gelpermeationschromatografie (GPC).....	27
2.3.3.5. Matrix assisted laser desorption/ionization - Time of Flight (MALDI-ToF).....	28
2.4. Chemische Acylierung von Aminosäuren und Peptiden.....	29
2.4.1. Schotten-Baumann-Acylierung von Aminosäuren und Peptiden	29
2.4.1.1. Acylierung von Aminosäuren	29
2.4.1.2. Acylierung von Peptiden.....	30
2.4.2. Analytik	30
2.4.2.1. High performance liquid chromatography (HPLC)	30
2.4.3. Charakterisierung der Tensideigenschaften	32
2.4.3.1. Bestimmung der Oberflächenspannung nach der Ringmethode von du Noüy.....	32
2.4.3.2. Visuelle Überprüfung der Tensidentstehung durch Änderung des Lichtbrechungswinkels	33
2.5. Enzymatische Acylierung	34
2.5.1. Analytik	34
2.5.1.1. Gaschromatografie (GC).....	34
2.5.1.2. HPLC	35
2.5.2. Durchführung.....	36
3. ERGEBNISSE	37
3.1. Enzymatische Synthese von Homooligopeptiden	37
3.1.1. Bromelain und Ficin-katalysierte Synthesen von OligoGluOEt.....	42
3.1.1.1. Einfluss der Reaktionszeit.....	42
3.1.1.2. Einfluss der Reaktionstemperatur	45
3.1.1.3. Einfluss der Enzymmenge.....	48
3.2. Enzymatische Synthese von Heterooligopeptiden	52
3.2.1. Synthese anionischer Heterooligopeptide	52

3.2.2. Synthese kationischer Oligopeptide	57
3.3. Chemische Acylierung von Aminosäuren	62
3.3.1. Schotten-Baumann-Acylierung von Aminosäureestern	62
3.4. Chemische Acylierung von Oligopeptiden	70
3.4.1. Visuelle Analyse der acylierten Oligopeptide mittels Mikrotiterplatten	70
3.4.2. Tensiometrische Bestimmung der Oberflächenspannung	71
3.4.3. MALDI-ToF-Analyse der acylierten Oligopeptide.....	73
3.4.4. Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit der chemisch acylierten Oligopeptide.....	78
3.5. Untersuchungen zur enzymatischen Acylierung von Aminosäuren.....	79
3.5.1. Entwicklung chromatografischer Nachweismethoden.....	79
3.5.2. Subtilisin-katalysierte <i>N</i> -Acylierung von Glutamatdiethylester mit Ethylhexanoat	81
4. DISKUSSION	86
4.1. Enzym-katalysierte Peptidsynthese	86
4.1.1. Enzymatische Synthesen von Homooligopeptiden.....	86
4.1.2. Bromelain und Ficin-katalysierte OligoGluOEt-Synthese unter modifizierten Reaktionsparametern..	89
4.1.2.1. Einfluss der Reaktionszeit auf Bromelain-katalysierte Peptidsynthesen	89
4.1.2.2. Einfluss der Reaktionstemperatur auf Bromelain-katalysierte Peptidsynthesen.....	90
4.1.2.3. Einfluss der Enzymmenge auf Bromelain-katalysierte Peptidsynthesen	90
4.1.2.4. Einfluss der Reaktionszeit auf Ficin-katalysierte Peptidsynthesen.....	91
4.1.2.5. Einfluss der Reaktionstemperatur auf Ficin-katalysierte Peptidsynthesen	91
4.1.2.6. Einfluss der Enzymmenge auf Ficin-katalysierte Peptidsynthesen.....	92
4.2. Enzymatische Synthese von Heterooligopeptiden	94
4.2.1. Anionische Heterooligopeptide	94
4.2.2. Kationische Heterooligopeptide	97
4.3. Chemische Acylierung von Aminosäuren und Oligopeptiden.....	102
4.3.1. Herstellung und Analyse von Acylaminosäuren	102
4.3.2. HPLC-Analyse von Acylalanin und <i>N</i> -Lauroyl-L-Alanin	106
4.4. Chemische Acylierung von Oligopeptiden	107
4.4.1. Effekte der Acylierungsprodukte auf die Oberflächenspannung.....	107
4.4.2. MALDI-ToF-Analyse.....	109
4.4.3. Untersuchung der antimikrobiellen Eigenschaften	110
4.5. Enzymatische Acylierung von Glutamatdiethylester.....	112

4.5.1. Etablierung einer GC und HPLC-Analytik	112
4.5.2 Enzymatische Acylierung von Glutamatdiethylester mit Ethylhexanoat.....	113
4.6. Ausblick	115
5. LITERATURVERZEICHNIS	117
6. ANHANG	129
6.1. Beruflicher und wissenschaftlicher Lebenslauf	129
6.2. Publikationen und Präsentationen	130

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Tensids.....	1
Abbildung 2: Schema der Festphasensynthese nach Merrifield.	4
Abbildung 3: Thermodynamisch kontrollierte Peptidsynthese.....	6
Abbildung 4: Verlauf einer thermodynamisch kontrollierten Peptidsynthese.....	6
Abbildung 5: Kinetisch kontrollierte Peptidsynthese.	7
Abbildung 6: Verlauf einer kinetisch kontrollierten Peptidsynthese.....	8
Abbildung 7: Ablauf einer Oligomerisierungsreaktion.	9
Abbildung 8: Ablauf der Schotten-Baumann-Acylierung von Aminosäuren mit einem Fettsäurechlorid.	12
Abbildung 9: Einhorn-Acylierung von Aminosäuremethylester und Fettsäurechlorid.....	12
Abbildung 10: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit durchgeführten Acylpeptidsynthese. .	15
Abbildung 11: Strukturformeln, Bezeichnungen und Molekulargewichte der in den Oligomerisierungsversuchen verwendeten Aminosäureethylester.	22
Abbildung 12: Reaktionsschema der primären AS mit OPA in Gegenwart von MPA als Thiolverbindung.	26
Abbildung 13: Glutamat, das sich durch Anhydridbildung zum Ring geschlossen hat und somit nicht acyliert werden kann.....	29
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Ringmethode zur Bestimmung der Oberflächenspannung.....	32
Abbildung 15: Chromatogramm der GPC-Analyse von a) OligoLeu, b) -Tyr und c) -Met nach alkalischer Hydrolyse.....	39
Abbildung 16: Chromatogramm der GPC-Analyse von Oligoglutamat.....	40
Abbildung 17: MALDI-ToF/MS-Analyse des präzipitierten Oligoglutamats nach alkalischer Hydrolyse.	41
Abbildung 18: Prozentuale Verteilung der GludiOEt-Monomere auf unverbrauchtes Substrat, Präzipitat und lösliches Peptid in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei Ficain-katalysierten Synthesen.....	44
Abbildung 19: Prozentuale Verteilung der GludiOEt-Monomere auf unverbrauchtes Substrat, Präzipitat und lösliches Peptid in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei Bromelain-katalysierten Synthesen.....	45
Abbildung 20: Prozentuale Verteilung der GludiOEt-Monomere auf unverbrauchtes Substrat, Präzipitat und lösliches Peptid in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur bei Bromelain-katalysierten Synthesen.	47

Abbildung 21: Prozentuale Verteilung der GludiOEt-Monomere auf unverbrauchtes Substrat, Präzipitat und lösliches Peptid in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur bei Ficain-katalysierten Synthesen.	48
Abbildung 22: Prozentuale Verteilung der GludiOEt-Monomere auf unverbrauchtes Substrat, Präzipitat und lösliches Peptid in Abhängigkeit der eingesetzten Bromelainkonzentration.	50
Abbildung 23: Prozentuale Verteilung der GludiOEt-Monomere auf unverbrauchtes Substrat, Präzipitat und lösliches Peptid in Abhängigkeit der eingesetzten Ficainkonzentration.	51
Abbildung 24: GPC-Analyse des Heterooligopeptids OligoGlu/Leu.....	53
Abbildung 25: MALDI-ToF/MS-Analyse von OligoGlu/Leu.	54
Abbildung 26: GPC –Analyse des Heterooligopeptids OligoGlu/Met.....	55
Abbildung 27: MALDI-ToF/MS-Analyse von OligoGlu/Met.	56
Abbildung 28: Hydrolyse von 5 mM Lys- <i>p</i> -NA mit Ficain und Papain.....	58
Abbildung 29: MALDI-ToF/MS der Ficain-katalysierten Heterooligomerisierung von LysOEt und MetOEt.	59
Abbildung 30: MALDI-ToF/MS der Papain-katalysierten Heterooligomerisierung von LysOEt und MetOEt.	61
Abbildung 31: Einfluss von in Wasser gelösten Acylaminosäuren auf dessen Oberflächenspannung im Vergleich zu reinen Aminosäurelösungen und Wasser.....	66
Abbildung 32: Abnahme der Aminosäurekonzentration durch <i>N</i> -Acylierung mit Laurinsäurechlorid. 67	
Abbildung 33: Nachweis der erfolgreichen Acylierung von Alanin mit Laurinsäurechlorid mittels HPLC bei 206 nm.....	68
Abbildung 34: HPLC-Chromatogramme der OPA-Derivatisierungen von Alanin, Acylalanin (aus dieser Arbeit) und <i>N</i> -Lauroyl-L-Alanin bei 340 nm.....	69
Abbildung 35: Visueller Nachweis der Acylierung der Oligopeptide mittels einer auf einem Karofeld platzierten Mikrotiterplatte.	71
Abbildung 36: Einfluss von in Wasser gelösten Acylpeptiden auf dessen Oberflächenspannung im Vergleich zu Oligopeptidlösungen und Wasser.....	72
Abbildung 37: MALDI-ToF Chromatogramm des a) nichtacylierten OligoGlu und des b) Acylierungsversuches von OligoGlu	74
Abbildung 38: MALDI-ToF Chromatogramm des a) nichtacylierten OligoGlu/Leu und des b) acylierten OligoGlu/Leu.....	75
Abbildung 39: MALDI-ToF Chromatogramm des a) nichtacylierten OligoGlu/Leu und des b) acylierten OligoGlu/Met.....	77
Abbildung 40: Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit gegenüber <i>E. coli</i>	78
Abbildung 41: Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit gegenüber <i>B. subtilis</i>	78

Abbildung 42: Auftrennung des FAME-Mixes in der Gaschromatografie (GC)	80
Abbildung 43: Analyse der aus Plantapon freigesetzten Fettsäuren über GC.....	80
Abbildung 44: HPLC-Analyse von Plantapon.....	81
Abbildung 45: Ethylhexanoat-Konzentrationen der enzymatischen Acylierungen nach 0, 22 und 46 h in 100 % Aceton.....	82
Abbildung 46: Glutamatdiethylester-Konzentrationen der enzymatischen Acylierungen nach 0, 22 und 46 h in 100 % Aceton.....	83
Abbildung 47: Ethylhexanoat-Konzentrationen der enzymatischen Acylierungen nach 0, 22 und 46 h in 80 % Aceton.....	84
Abbildung 48: Glutamatdiethylester-Konzentrationen der enzymatischen Acylierungen nach 0, 22 und 46 h in 80 % Aceton.....	85
Abbildung 49: Schematische Darstellung der alkalischen Hydrolyse von OligoGluOEt und dem daraus folgenden Polyanion OligoGlu (n = 5 – 8 Glutamatreste).	88
Abbildung 50: Änderung der Molekülmasse durch Kupplung von Glutamat und Leucin.	96
Abbildung 51: Änderung der Molekülmasse durch Kupplung von Glutamat und Methionin.....	96
Abbildung 52: Auftretende Peaks in MALDI/ToF Analysen der Heterooligomerisierung von LysOEt und MetOEt.	100
Abbildung 53: Struktur eines Glykolipids bestehend aus zwei Rhamnoseeinheiten als hydrophile Kopfgruppe.....	102
Abbildung 54: Zwischenmolekulare Wechselwirkungen in einem Wasser/Dioxan-Gemisch.	104
Abbildung 55: Kontaktwinkel von Wasser auf verschiedenen festen Oberflächen.	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen	16
Tabelle 2: Verwendete Geräte.....	17
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	18
Tabelle 4: Zusammenfassung der durchgeführten Syntheseansätze.....	21
Tabelle 5: Dauer der alkalischen Hydrolyse für die Oligopeptide OligoGluOEt, OligoGluOEt/Met und OligoGluOEt/Leu.....	23
Tabelle 6: Modifikationen für die Bromelain-katalysierte Homooligomerisierung von GludiOEt.....	23
Tabelle 7: Modifikationen für die Ficin-katalysierte Homooligomerisierung von GludiOEt.....	24
Tabelle 8: Bedingungen der GPC-Analytik zur Untersuchung der Überstände aus den modifizierten Oligomerisierungen mit Bromelain und Ficin.....	27
Tabelle 9: Bedingungen der HPLC-Analytik für acylierte Aminosäuren und <i>N</i> -Lauroyl-L-Alanin.....	31
Tabelle 10: Bedingungen der OPA-Derivatisierung von Aminosäuren mit der HPLC.....	31
Tabelle 11: Bedingungen der GC-Analytik des FAME-Mixes sowie der derivatisierten Fettsäuren.....	34
Tabelle 12: Bedingungen der HPLC-Analytik von Plantapon.....	35
Tabelle 13: Übersicht über die mittels Papain durchgeführten Oligopeptidsynthesen bei 40 °C.....	37
Tabelle 14: Retentionszeiten der GPC-Analyse für Oligoglutamat (durchgeführt bei Cognis GmbH)..	40
Tabelle 15: Bestimmung des Proteingehaltes der verwendeten Enzympräparationen über einen BSA-Assay.....	42
Tabelle 16: Bromelain und Ficin-katalysierte Oligomerisierungen von GludiOEt bei unterschiedlichen Reaktionszeiten.....	43
Tabelle 17: Bromelain und Ficin-katalysierte Oligomerisierungen von GludiOEt bei unterschiedlichen Temperaturen.....	46
Tabelle 18: Bromelain und Ficin-katalysierte Oligomerisierungen von GludiOEt bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen.....	49
Tabelle 19: Papain-katalysierte Heterooligomerisierungen von GludiOEt mit LeuOEt und MetOEt bei 40 °C.....	52
Tabelle 20: Retentionszeiten der GPC-Analyse für OligoGlu/Leu (durchgeführt bei Cognis GmbH)....	53
Tabelle 21: Retentionszeiten der GPC-Analyse für OligoGlu/Met (durchgeführt bei Cognis GmbH)...	55
Tabelle 22: Photometrische Bestimmung der Konzentration an Lysin oder Lysinethylester.....	57
Tabelle 23: Ausbeuten der Heterooligomerisierungen von LysOEt und MetOEt mit Papain und Ficin.....	58

Tabelle 24: Aminosäurekonzentration, pH-Wert und Oberflächenspannung der Schotten-Baumann-Acylierung von L-Alanin (n=3).	63
Tabelle 25: Aminosäurekonzentration, pH-Wert und Oberflächenspannung der Schotten-Baumann-Acylierung von L-Lysin (n=2).....	64
Tabelle 26: Aminosäurekonzentration, pH-Wert und Oberflächenspannung der Schotten-Baumann-Acylierung von L-Leucin (n=2).	64
Tabelle 27: Aminosäurekonzentration, pH-Wert und Oberflächenspannung der Schotten-Baumann-Acylierung von L-Methionin (n=3).....	65
Tabelle 28: Oberflächenspannungswerte der Acylpeptide und dazugehörigen Oligopeptide.....	72
Tabelle 29: Übersicht und Literaturvergleich der in dieser Arbeit hergestellten Homooligopeptide..	87

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACN	Acetonitril
AspOEt	Aspartatethylester
AU	Absorptionunits (= Absorptionseinheiten)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Cbz	Benzyl
CMC	Critical micellar concentration (Kritische Mizellbildungskonzentration)
Da	Dalton
DAD	Diodenarray- Detektor
FID	Flammenionisations-Detektor
FLD	Fluoreszenz-Detektor
Fmoc	Fluorenylmethylenoxycarbonyl
FS	Fettsäure
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatografie
GludiOEt	L-Glutamatdiethylester
h	Stunden
HPLC	High performance liquid chromatography (=Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
KPP	Kaliumphosphatpuffer

LeuOEt	L-Leucinethylester
logP	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LU	Lumineszenzunits
LysOEt	L-Lysinethylester
M	molar
MALDI-ToF	Matrix assisted laser desorption/ionization – Time of Flight
MetOEt	L-Methioninethylester
min	Minuten
MPA	Mercaptopropionsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molecular weight (Molekulargewicht)
NaPP	Natriumphosphatpuffer
OligoGlu	Oligoglutamat
OligoGluOEt	Oligoglutamat- γ -ethylester
OligoGlu/Leu	Oligoglutamat/Leucin
OligoGlu/Met	Oligoglutamat/Methionin
OPA	<i>ortho</i> -Phtaldialdehyd
OSabs	absolute Oberflächenspannung
OSruk	Unkorrigierte Werte der Oberflächenspannung
PEG	Polyethylenglykol
pK_s	Säurekonstante
RID	Refractive Index (=Brechungsindex) Detektor

RP	Reverse phase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TFA	Trifluoressigsäure

1. Einleitung

1.1. Acylpeptide als neuartige Biotenside

Acylpeptide, die aus einer hydrophilen peptidbasierten Kopfgruppe und einer daran veresterten hydrophoben Fettsäure bestehen, sind aufgrund der vielfältigen Komposition ihrer Kopfgruppe eine neuartige interessante Gruppe von Biotensiden, die für unterschiedlichste Anwendungen von Nutzen sein können. Die größte Gruppe unter den derzeit in Anwendung befindlichen Biotensiden stellen die Glykolipide dar, von denen besonders die Rhamnolipide in verschiedenen Industriezweigen wie z. B. der biologischen Sanierung, Biomedizin, Futtermittelindustrie und Kosmetik- und Reinigungsmittelindustrie zur Anwendung kommen [1-4]. Ebenso zählen zu den Biotensiden die Phospholipide, Lipopolysaccharide (LPS), Lipoproteine, Mono- und Diglyceride und Fettsäuren. Allen genannten Tensiden gemein ist eine amphiphile Struktur (siehe Abbildung 1) bestehend aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einer hydrophoben Alkankette, durch die sie in der Lage sind sich je nach Lösungsmittel unterschiedlich auszurichten und Aggregate zu bilden [5]. Während die meisten der genannten Biotenside ein bestimmtes Kopfgruppenmotiv besitzen, wie z. B. eine Zuckermotiv bei den Glykolipiden oder einen Phosphatrest bei den Phospholipiden, sind Acylpeptide in ihrer Kopfgruppe hoch variabel. So kann diese aus kationischen, anionischen, nicht-ionischen sowie aromatischen oder auch schwefelhaltigen Aminosäuren aufgebaut sein.

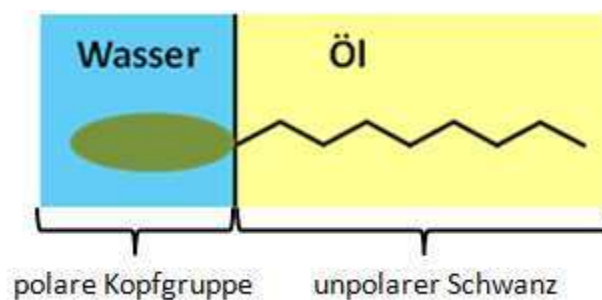


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Tensids.

Die wasserlösliche, polare Kopfgruppe von Tensiden besteht meist aus Zuckern, Phosphatresten, Carbon- oder Aminosäuren oder Peptiden, während der hydrophobe, unpolare Schwanz meist aus den Alkanketten gesättigter, ungesättigter oder hydroxylierter Fettsäuren besteht.

Diese unterschiedlichen Eigenschaften der Aminosäuren machen diese für eine Acylierung mit Fettsäuren interessant. So wird mit Kokosöl acyliertes Glutamat (Cocoylglutamat) als mildes Tensid mit guter Hautverträglichkeit (pH 5-6) bereits in vielen Cremes und Lotionen eingesetzt [6], ebenso wie mit Fettsäuren acyliertes Lysin [7]. Andere Acylaminosäuren werden als Korrosionsschutz

verwendet oder haben antimikrobielle Eigenschaften [8, 9]. Ein weiterer großer Vorteil von Acylaminosäuren und analog dazu auch von Acylpeptiden ist die biologische Abbaubarkeit. So zeigten Imabayashi *et al.* dass *N*-Lauroyl-Glutamat schneller abgebaut wird, als lineares Alkylbenzen Sulfonat (LAS), das gewöhnlich in vielen Waschmitteln vorkommt [10].

Die Herstellung von Acylpeptiden kann auf unterschiedliche Art erfolgen, abhängig davon ob der Peptidteil gezielt aufgebaut werden muss oder nicht und ob zur Acylierung ein Fettsäuregemisch oder eine bestimmte Fettsäure verwendet wird. So ist ein gezielter Aufbau des Peptidkopfes dann von Nöten wenn eine spezielle Ausrichtung oder Zusammensetzung der Peptidkette wie z. B. für pharmazeutische Anwendungen gefordert ist [11]. Zur Verwendung in Reinigungs- oder Pflegemitteln werden häufig Proteinhydrolysate und deren Derivate eingesetzt, die keinen definierten Aufbau besitzen [12]. Wird kein Proteinhydrolysat verwendet, muss der Peptidteil über chemische (siehe 1.2.1.) oder enzymatische Synthesewege (siehe 1.2.2.) aufgebaut werden. Die Acylierung erfolgt meist über klassische chemische Ansätze wie die Schotten-Baumann-Reaktion (siehe 1.3.1.), ist aber auch über einen enzymatischen Weg denkbar (siehe 1.3.2.).

1.2. Peptidsynthese

Peptide erlangen eine immer größer werdende Bedeutung für industrielle Anwendungen in unterschiedlichsten Bereichen. Daraus resultierend, sind kostengünstige Alternativen zur klassischen Herstellung über die Festphasenpeptidsynthese von wachsendem Interesse [13]. Besonders die enzymatische Herstellung von Peptiden stellt hierbei eine interessante Möglichkeit dar, da sie zum einen unter sehr milden Reaktionsbedingungen abläuft und zum anderen auf toxische Lösungsmittel verzichtet, weshalb sie von vielen Forschungsgruppen intensiv untersucht wird.

1.2.1. Chemische Peptidsynthese

Die 1963 von Merrifield *et al.* publizierte Festphasensynthese zählt auch heute noch zu den am häufigsten verwendeten Methoden zur Herstellung von Peptiden [13]. Abbildung 2 zeigt schematisch den Ablauf der Merrifield-Synthese. Nach Kopplung einer ersten am *N*-Terminus geschützten Aminosäure an ein Polymerharz werden in zeitaufwändigen Reaktionsschritten die nachfolgenden Aminosäurebausteine jeweils am *N*-Terminus und an funktionellen Seitenketten mit Schutzgruppen, meist Boc, Fmoc oder Cbz, versehen [14-16]. Vor jeder Kupplung muss wieder entschützt werden bevor die nächste Aminosäure angehängt werden kann. Neben dem bereits erwähnten Zeitaufwand kommen hierbei auch toxische Substanzen zum Einsatz, die entsprechend entsorgt oder neutralisiert werden müssen. Außerdem treten bei der Verwendung racemischer Ausgangsverbindungen racemische Endprodukte auf. Gegenüber enzymatischen Synthesen ist dieses Verfahren jedoch universell für jede Aminosäure anwendbar.

In der chemischen Flüssigphasensynthese werden neben den, auch in der Festphasensynthese geschützten, Seitenketten und Aminogruppen auch die Carboxylgruppen geschützt. Hierfür werden meist Ester primärer, sekundärer oder tertiärer Alkohole verwendet [17]. Die Knüpfung der Peptidbindung erfolgt durch einen nukleophilen Angriff einer Aminokomponente an die Carboxylgruppe. Um diesen Angriff zu ermöglichen muss durch Einführung eines elektroaffinen Substituenten die Elektronendichte am Carbonyl-C-Atom verringert werden [18]. Durch Variation des Substituenten eröffnet sich ein breites Spektrum an Möglichkeiten und Methoden, wie z. B. die Verwendung von Aziden, Anhydriden und Carbodiimiden [19-21].

Eine weitere Möglichkeit zur Peptidsynthese bietet die Gentechnik. Das erste über DNA-Rekombination und Expression in *Escherichia coli* hergestellte Peptid war Somatostatin [22]. Heute existiert eine Vielzahl fermentativ hergestellter Peptide oder Peptidhormone, von denen das wohl bekannteste Insulin sein dürfte [23]. Wurde einmal ein geeignetes, stabiles Expressionssystem gefunden, stellt diese Variante eine kostengünstige Möglichkeit zur Herstellung großer Mengen des

gewünschten Peptids dar. Im Vorfeld ist allerdings eine langwierige und teure Entwicklung notwendig. Außerdem kann dieser Syntheseweg nicht zur Herstellung kurzkettiger Peptide verwendet werden [24]. Hierfür stellt die enzymatische Peptidsynthese einen vielversprechenden Ansatz dar.

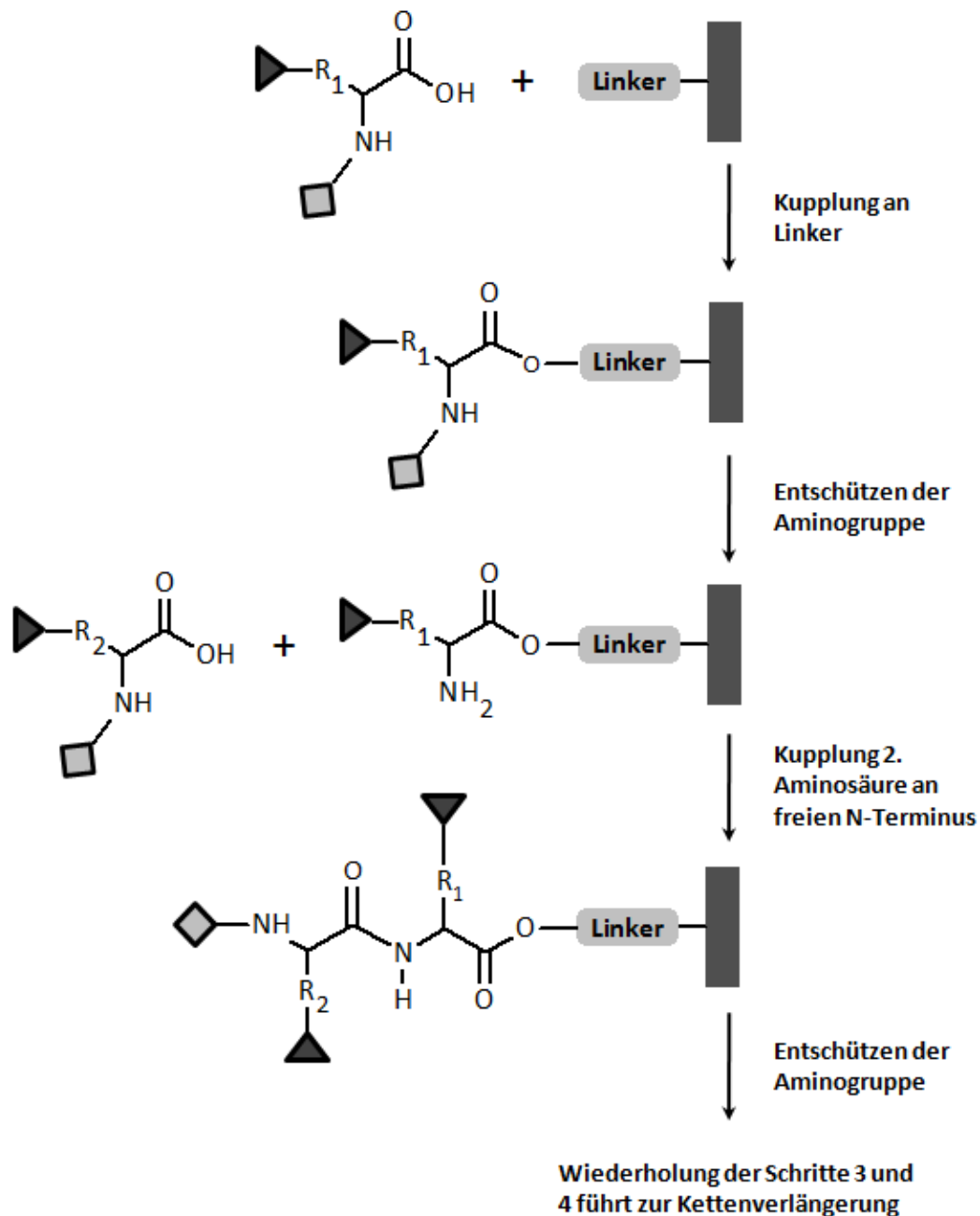


Abbildung 2: Schema der Festphasensynthese nach Merrifield [13].

Die Reste R_1 und R_2 stehen für die Seitenketten zweier unterschiedlicher Aminosäuren. Die Drei- bzw. Vierecke stehen für verschiedene Schutzgruppen, die in der chemischen Peptidsynthese für Seitenkette und Aminogruppe verwendet werden. Letztere muss vor jeder Kupplung entschützt werden.

1.2.2. Enzymatische Peptidsynthese

Da Biokatalysen häufig unter milden Reaktionsbedingungen enantioselektiv ablaufen und die Akkumulation großer Mengen toxischer Abfälle vermieden wird, besteht ein großes Interesse seitens Forschung und Industrie an enzymkatalysierten Prozessen.

Neben den klassischen chemischen Methoden kommt daher der Enzym-katalysierten Peptidsynthese eine immer größere Bedeutung zu und wird für einige Anwendungen bereits im technischen Maßstab verwendet. Beispiele hierfür sind die Thermolysin-katalysierte Herstellung einer Vorstufe des künstlichen Süßstoffes Aspartam® [25], sowie die Herstellung einiger β -Lactam Antibiotika mit Hilfe von Acylasen [26]. Gegenüber chemischen Methoden ist die Zahl der Enzym-katalysierten Anwendungen jedoch vergleichsweise gering, was u.a. auf die Substratspezifität, die teils schlechte Verfügbarkeit und die mangelnde Stabilität der Biokatalysatoren zurückzuführen ist [27].

Bei der enzymatischen Synthese von Peptiden werden meist Proteasen entgegen ihrer natürlichen Funktion, nämlich der Spaltung von Peptiden und Proteinen, in einer Kondensation verwendet. Diese Reaktionsumkehr kann entweder durch eine Verschiebung des thermodynamischen Gleichgewichtes in Richtung Synthese oder über einen kinetisch kontrollierten Ansatz erfolgen [28].

1.2.2.1. Thermodynamisch kontrollierte Peptidsynthese

Grundlage der thermodynamisch- oder gleichgewichtskontrollierten Peptidsynthese ist die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes, das im physiologischen Zustand stark auf Seiten der Hydrolyse liegt, hin zur Peptidsynthese. Hierfür muss die Energie, die für den Protonentransfer von der Aminogruppe des Acylakzeptors zur Carboxylgruppe des Acyldonors benötigt wird, aufgebracht werden, was entweder durch Erhöhung des Ionisierungsgleichgewichtes (K_{ion}) oder durch Entfernung bzw. Präzipitation des Syntheseproduktes aus der Reaktion geschehen kann (Abbildung 3). Bei ersterem kann bspw. durch die Zugabe organischer Lösungsmittel die Dielektrizitätskonstante des Mediums erhöht und somit die Acidität der Carboxylfunktion des Acyldonors gesenkt werden [29]. Eine Produktpräzipitation kann durch Modifikation bestimmter Reaktionsparameter, z. B. pH-Wert oder Verwendung von Zweiphasensystemen begünstigt werden.

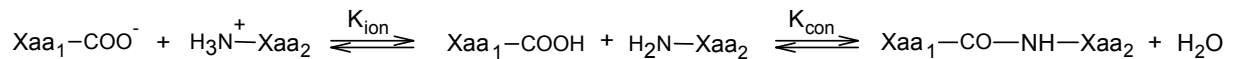


Abbildung 3: Thermodynamisch kontrollierte Peptidsynthese.

Um eine enzymatische Peptidsynthese zu ermöglichen muss das Ionisierungsgleichgewicht durch Erhöhung der Ionisierungskonstante (K_{ion}) auf Seite der nicht ionisierten Form der Aminosäuren (Xaa) verschoben werden. Die zweite Gleichgewichtskonstante (K_{con}) kann durch Abtrennung des Produktes in Richtung Synthese verschoben werden.

Vorteile dieses Syntheseweges sind die Möglichkeit freie Carboxylgruppen sowie nahezu jede Protease unabhängig ihres sonstigen Reaktionsmechanismus zu verwenden. Dadurch kann jede Aminosäure zur Synthese genutzt werden Auswahl, wenn der entsprechende Katalysator vorhanden ist. Dem stehen allerdings der hohe Enzymbedarf, niedrige Umsatzraten (Abbildung 4) sowie ein großer Bedarf an organischen Lösungsmitteln gegenüber.

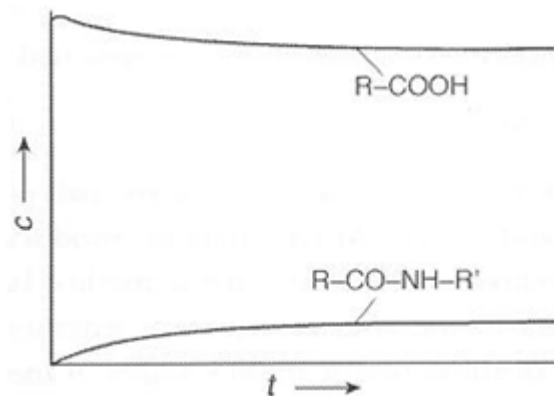


Abbildung 4: Verlauf einer thermodynamisch kontrollierten Peptidsynthese (nach Schellenberger, [30]).

Die Produktkonzentration (c) (untere Kurve) steigt selbst über einen langen Reaktionszeitraum (t) nur sehr schwach an, da durch das sich immer wieder einstellende Gleichgewicht die Eduktkonzentration kaum abnimmt.

1.2.2.2 Kinetisch kontrollierte Peptidsynthese

Im Gegensatz zum thermodynamischen Ansatz kommt es bei der kinetisch kontrollierten Peptidsynthese bereits bei geringen Enzymmengen zu hohen Produktkonzentrationen nach kurzer Reaktionszeit. Allerdings ist diese Art der Peptidsynthese auf Serin- oder Cysteinproteasen beschränkt. Der Grund hierfür liegt im Aufbau der katalytischen Triade dieser Enzyme, die aus einem Aspartat-, einem Histidin- und einem Serin- bzw. Cysteinrest besteht. Die beiden letztgenannten

Reste geben den Enzymen dieser Gruppen ihren Namen und übertragen bei Vorhandensein eines Substrates ein Proton ihrer funktionellen Seitenkette auf den Imidazol-Rest des Histidins. Anschließend kommt es zur Bildung eines tetraedrischen Übergangszustandes und letztlich zur Bildung eines Acyl-Enzym-Intermediates [29]. Dieses wird kompetitiv durch Wasser oder ein Nucleophil deacyliert, wobei aus ersterem die Hydrolyse des Eduktes resultiert, während bei der Deacylierung durch ein Nucleophil eine Peptidbindung geknüpft wird, vorausgesetzt es handelt sich um eine Aminosäure (Abbildung 5)[31].

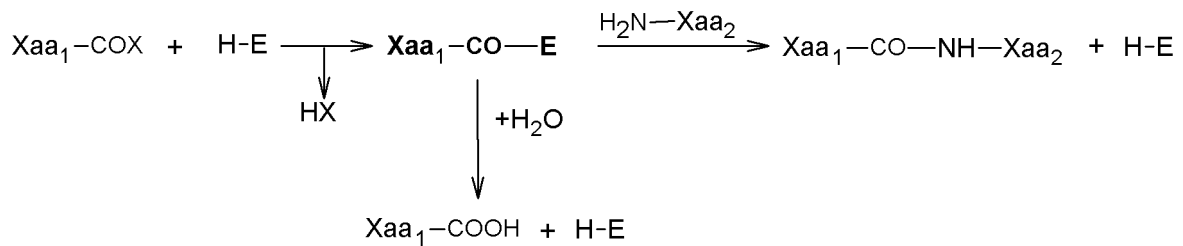


Abbildung 5: Kinetisch kontrollierte Peptidsynthese.

Eine aktivierte Carboxylgruppe (-COX) in Form eines Esters oder Amids bildet mit Serin- oder Cysteinproteasen ein Acylenzym-Intermediat (-CO-E), das durch einen nucleophilen Angriff deacyliert wird. Als Nucleophile können dabei entweder Wasser oder eine Aminosäure fungieren, was im ersten Fall zur Hydrolyse und im zweiten zur Ausbildung einer Peptidbindung (Aminolyse) führt.

Wie in den meisten Peptidsynthesen, die dem kinetisch kontrollierten Ansatz folgen, werden auch in dieser Arbeit Aminosäurealkylester als aktivierte Ausgangssubstrate verwendet. Aminosäuren mit freien Carboxylgruppen zeigen in der Regel keine Interaktion mit dem Enzym [29]. Des Weiteren ist die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung des Acyl-Enzym-Intermediates bei Aminosäurealkylester größer als die der gebildeten Peptide, wodurch es erst zu einer Produktakkumulation kommt, ehe die sekundäre Hydrolyse der Peptide einsetzt, sofern die Reaktion nicht gestoppt wird (Abbildung 6) [30, 32].

Da man bei Verwendung des kinetisch kontrollierten Ansatzes auf Serin- oder Cysteinproteasen angewiesen ist und somit deren Substratspezifität unterliegt, können nicht alle Aminosäuren zur Synthese verwendet werden und es tritt eine Substratlimitierung auf [33].

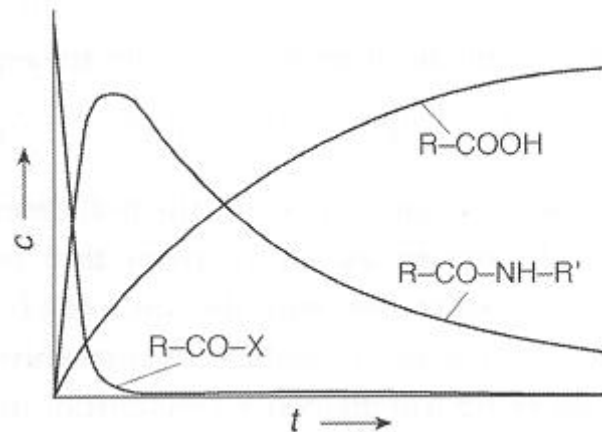


Abbildung 6: Verlauf einer kinetisch kontrollierten Peptidsynthese (nach Schellenberger, [30]).

In der kinetisch kontrollierten Synthese kommt es bereits nach kurzer Reaktionszeit (t) zu einer maximalen Produktkonzentration (c) ($R-CO-NH-R'$), während das Edukt ($R-CO-X$) gleichzeitig nahezu vollständig verbraucht ist. Wird die Reaktion an diesem Punkt nicht gestoppt, kommt es zur sekundären Produkthydrolyse, was durch den Anstieg der Aminosäurekonzentration ($R-COOH$) erkennbar wird.

1.2.2.3. Synthese von Oligopeptiden

Die enzymatische Herstellung von Peptiden durch Oligomerisierungsreaktionen wird bereits seit mehreren Jahrzehnten untersucht [34]. Basierend auf der kinetisch kontrollierten Peptidsynthese werden in den Oligopeptidsynthesen Aminosäurealkylester sowohl als Acyldonoren als auch -akzeptoren verwendet, woraus nach jeder Synthesereaktion wieder ein Ester resultiert, der erneut als Substrat dienen kann. Wird nur ein Aminosäurealkylester in die Reaktion eingesetzt erhält man sogenannte Homooligopeptide, bei zwei oder mehreren Heterooligopeptide. Katalysiert werden diese Reaktionen von Serin- oder Cysteinproteasen unter denen die Cysteinprotease Papain wohl das am häufigsten verwendete Enzym ist [34].

Abbildung 7 zeigt den Ablauf einer Oligomerisierung. Bei Kondensation zweier Aminosäurealkylester kann das entstandene Peptid aufgrund der C-terminalen Estergruppe wieder als Acyldonor fungieren und so eine Verlängerung der Peptidkette erfolgen. Kommt es stattdessen zu einer Ester-Hydrolyse kann die Aminosäure oder das Peptid nicht mehr als Acyldonor, jedoch weiterhin als Acylakzeptor dienen. Besteht die wachsende Peptidkette aus überwiegend hydrophoben Aminosäureresten, kommt es bei einer bestimmten Kettenlänge zur Präzipitation des Produktes, was die Vorteile mit sich bringt, dass das Produkt vor einer sekundären Hydrolyse geschützt ist und gleichzeitig das thermodynamische Gleichgewicht in Richtung Produktbildung verschoben wird. Somit stellt die Oligomerisierung eine Kombination beider enzymatischer Synthesewege dar [35].

Bereits 1950 veröffentlichte Brenner *et al.* über eine Chymotrypsin-katalysierte Oligomerisierung von Methioninisopropylester zum Di- bzw. Tripeptid [36]. Nachfolgende Arbeiten publizierten Oligomerisierungen weiterer hydrophober Aminosäuren wie Leucin [37], Phenylalanin, Tyrosin [38] mit Hilfe der Cysteinprotease Papain, sowie von Threonin [39].

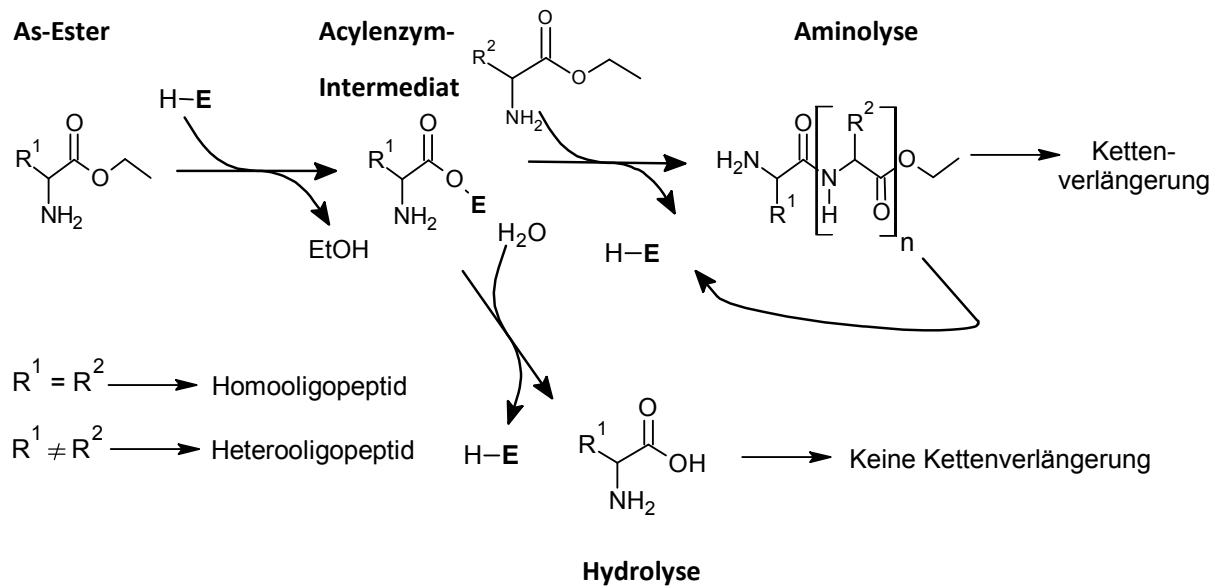


Abbildung 7: Ablauf einer Oligomerisierungsreaktion.

Die Oligomerisierungsreaktion basiert auf einem kinetisch kontrollierten Syntheseansatz, der Serin- bzw. Cysteinproteasen ($H-E$) sowie Substrate mit aktivierten Carboxylgruppen benötigt. Die Besonderheit dieses Ansatzes besteht darin, dass das Substrat gleichzeitig als Acyldonor zur Bildung des Acylenzym-Intermediates als auch als Acylakzeptor, der das Intermediat deacyliert, fungiert. Dadurch entsteht ein Peptid mit einer endständigen, aktivierten Carboxylgruppe, welches wieder als Substrat verwendet werden kann. Dieser Vorgang wiederholt sich solange bis das Oligopeptid entweder präzipitiert (bei Verwendung hydrophober Aminosäuren) oder die als Nebenreaktion ablaufende Hydrolyse das Acylenzym-Intermediat hydrolysiert. Werden in der Oligomerisierung zwei oder mehr unterschiedliche Aminosäureester als Substrate verwendet erhält man ein Heterooligopeptid, im anderen Fall ein Homooligopeptid.

Da viele Oligomerisierungsreaktionen unter ähnlichen Reaktionsbedingungen ablaufen und die Katalysatoren ein relativ breites Substratspektrum aufweisen, wurden Oligomerisierungen mit zwei oder mehr Substraten durchgeführt um Mischpeptide zu erhalten, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Seitenketten verschiedene Eigenschaften besitzen. Geladene Seitenketten können als Carrier für Biomoleküle in biomedizinischen Anwendungen dienen [40]. Andere Peptide neigen zur Bildung von Nanostrukturen oder haben im Falle von amphiphilen Peptiden, also solchen mit hydrophilen und hydrophoben Seitenketten, Eigenschaften ähnlich zu biologischen Tensiden [41, 42].

1.2.3. Enzyme in der enzymatischen Peptidsynthese

In der enzymatischen Peptidsynthese werden meist Proteasen oder Peptidasen (EC 3.1.4.) verwendet. Wählt man den thermodynamischen Syntheseansatz kann prinzipiell jede Protease zur Synthese verwendet, da lediglich das Reaktionsgleichgewicht verschoben werden muss. Hier kamen bereits Aminopeptidasen (EC 3.4.11.) [43] oder Metalloproteasen (EC 3.4.24.) wie z. B. Thermolysin zur Aspartam®-Synthese zum Einsatz [25].

Hingegen ist die kinetisch kontrollierte Peptidsynthese auf die Verwendung von Serin- oder Cysteinproteasen limitiert. Letztere wurden in dieser Arbeit verwendet und im Folgenden näher betrachtet.

Während das aktive Zentrum bei Serinproteasen aus einer katalytischen Triade der Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure und Serin besteht, besitzen Cysteinproteasen, die auch häufig als Thiolproteasen bezeichnet werden, eine katalytische Diade aus einem Cystein- und einen Histidinrest im aktiven Zentrum. Bei Proteolysen wird die Thiolgruppe des Cysteins durch das benachbarte Histidin deprotoniert und kann in dieser Form das Carbonyl-Kohlenstoffatom eines Peptids nukleophil angreifen. Das nunmehr protonierte Histidin gibt sein Proton an den Stickstoff der Peptidbindung ab, was zu deren Auflösung führt. Aufgrund der Limitierung dieses Syntheseweges auf Serin- und Cysteinproteasen ist die Auswahl der verwendbaren Aminosäuredukte auf deren Substratspektrum beschränkt. Die Proteasen der Peptidase Familie C1, die auch Papain-Familie genannt wird, zu der auch Cathepsin und die in dieser Arbeit verwendeten Proteasen gehören, besitzen eine breite Substratspezifität [44]. Des Weiteren zeichnen sich Peptide dieser Familie durch Aktivität über einen weiten pH Bereich von 5 bis 10 aus, was für Peptidsynthesen in denen meist ein leicht alkalischer pH-Wert verwendet wird von Vorteil ist. Ebenso sind sie innerhalb eines großen Temperaturbereichs von 20 bis 90 °C aktiv [45]. Außerdem kann durch Kombination verschiedener Serin- und Cysteinproteasen in einer schrittweisen Synthese die z.T. auftretenden Substratlimitierungen aufgehoben werden [46].

1.3. Acylierung von Aminosäuren und Peptiden

Viele Aminosäuren und Peptide sind bereits ohne weitere Bearbeitung als Nahrungsergänzungsmittel, Peptidhormone oder als Peptidantibiotika von Bedeutung [43, 47, 48]. Da durch Acylierung amphiphile Molekülstrukturen mit tensidischem Charakter entstehen, eröffnet sich eine Vielzahl neuer Anwendungsmöglichkeiten. Durch die Funktionalisierung zum Tensid können die acylierten Aminosäuren oder Peptide bspw. als Shuttle für pharmazeutische Wirkstoffe dienen, indem sie diese einkapseln und dafür sorgen, dass keine Zersetzung durch die Magensäure erfolgt [49].

Die Acylierung kann entweder chemisch oder enzymatisch erfolgen und wird nachfolgend genauer betrachtet.

1.3.1. Chemische Acylierung von Aminosäuren und Peptiden

Der Nutzen der Acylierung von Aminosäuren ist in der Literatur mehrfach beschrieben und bereits oben sowie in 1.1. erläutert worden. Abseits der erwähnten Anwendungsmöglichkeiten verfügen Acylaminosäuren und -peptide im Vergleich zu industriell gefertigten Tensiden in der Regel über eine deutlich bessere biologische Abbaubarkeit und sind somit weniger schädlich für die Umwelt. Sie werden entweder durch Proteasen oder Acylasen, wenn durch Acylierung am *N*-Terminus eine Amidbindung entstanden ist oder durch Esterasen bzw. Lipasen [50], wenn am *C*-Terminus durch Knüpfung einer Esterbindung acyliert wurde, gespalten und abgebaut [51]. Betrachtet man die Acylaminosäuren rein nach ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften, so sind längere Ketten erstrebenswert. Ihre Eigenschaften wie CMC und Oberflächenspannung sind vergleichbar mit denen von kommerziellen erdölbasierten Tensiden [52].

Für die Herstellung von Acylaminosäuren wird meist die Acylierung über die Schotten-Baumann-Reaktion verwendet [53, 54], deren Schema in Abbildung 8 gezeigt ist. Ein Fettsäurechlorid wird unter alkalischen Bedingungen mit einem primären Amin zum Fettsäureamid umgesetzt. Ist das primäre Amin Bestandteil einer Aminosäure entsteht die entsprechende Acylaminosäure. Die während der Reaktion freiwerdende Salzsäure muss durch Verwendung eines Puffers oder Gegentitration abgefangen werden. Die Vorteile dieser Acylierungsreaktion liegen in der leichten Durchführbarkeit, da nur ein Reaktionsschritt zur Acylierung nötig ist und dem Verzicht auf toxische Chemikalien. Als Nebenreaktion treten aufgrund der Hydrolyse des eingesetzten Fettsäurechlorids auch immer die entsprechenden Fettsäuren bzw. deren Salze auf [55].

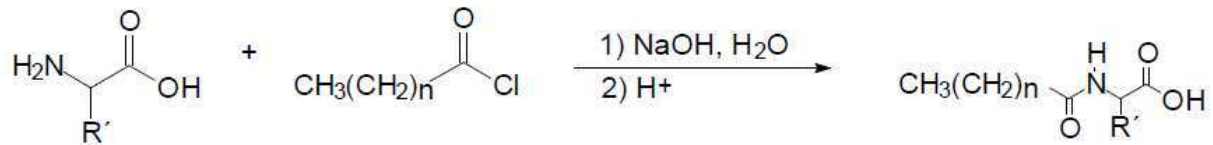


Abbildung 8: Ablauf der Schotten-Baumann-Acylierung von Aminosäuren mit einem Fettsäurechlorid (schematisch, nach Aha [55]).

Unter alkalischen Bedingungen kann ein nukleophiler Angriff auf das C-Atom der Carbonylgruppe des Fettsäurechlorids erfolgen, wodurch unter Abspaltung des Chlorids eine Amidbindung entsteht; R' = beliebige As-Seitenkette.

Über die Schotten-Baumann-Reaktion lassen sich alle Aminosäuren mit aliphatischer Seitenkette acylieren. Glutamin und Asparagin weisen schlechte Reaktionsausbeuten auf, während sich Glutamin- und Asparaginsäure wegen der Entstehung von Anhydriden nicht acylieren lassen. Selbiges gilt für Cystein und Cystin, da diese sich unter den alkalischen Reaktionsbedingungen zersetzen [55].

Eine Alternative zur Schotten-Baumann-Reaktion stellt die Acylierung nach Einhorn dar. Sie hat den Vorteil, dass durch wasserfreies Arbeiten die Hydrolyse des Fettsäurechlorids ausgeschlossen wird und man so zu sehr reinen Produkten gelangt. Allerdings schließt die wasserfreie Durchführung gleichzeitig die Verwendung von toxischen organischen Lösungsmitteln, wie z. B. Pyridin oder Dichlormethan ein.

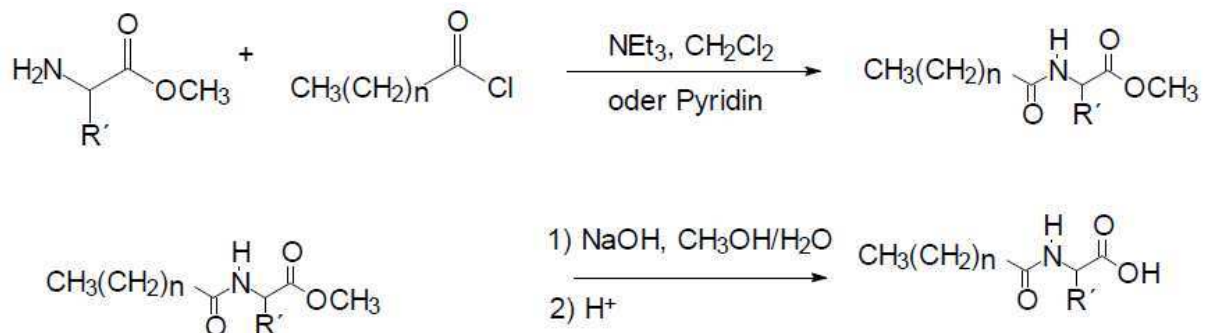


Abbildung 9: Einhorn-Acylierung von Aminosäuremethylester und Fettsäurechlorid (schematisch, nach Aha [55]).

Im ersten Schritt wird eine Amidbindung zwischen Aminosäuremethylester und Fettsäurechlorid geknüpft. Anschließend kann der resultierende *N*-Acylaminosäuremethylester durch alkalische Hydrolyse in die jeweilige *N*-Acylaminosäure umgewandelt werden; R' = beliebige Aminosäureseitenkette.

Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, wird im ersten Reaktionsschritt im wasserfreien Reaktionssystem ein Aminosäuremethylester mit einem Fettsäurechlorid verknüpft. Der resultierende *N*-Acyl-aminosäuremethylester kann leicht durch alkalische Hydrolyse in die entsprechende *N*-Acylaminosäure überführt werden.

Beide Varianten, die Schotten-Baumann und die Einhorn-Acylierung sollten sich ebenfalls mit Oligopeptiden durchführen lassen, da auch diese über freie *N*-Termini verfügen und würden so zu Tensiden mit unterschiedlichsten Eigenschaften führen. Für acylierte Lysinoligomere ist beispielsweise eine gute antimikrobielle Wirkung beschrieben [56].

1.3.2. Enzymatische Acylierung

Neben der chemischen Acylierung besteht auch die Möglichkeit der enzymatischen Acylierung. Für Aminosäuren und deren Derivate sind bereits mehrfach enzymatische Acylierungen beschrieben worden [57]. Montet *et al.* veröffentlichten bereits 1990 eine Lipozym-katalysierte *N*-Acylierung von Lysinseitenketten [58]. Für die enzymatische Acylierung von Aminosäuren oder Peptiden kommen, abhängig davon welche funktionelle Gruppe acyliert werden soll, verschiedene Enzyme in Frage. Im Falle einer *N*-Acylierung entsteht eine Amidbindung, die von ihren Eigenschaften wie Bindungslänge, Hybridisierungszustand, etc. einer Peptidbindung ähnelt [59] und entsprechend durch Proteasen in einer reversen Hydrolyse geknüpft werden könnte. Ebenfalls zur Synthese durch Reaktionsumkehr können Acylasen verwendet werden, wie es für die Herstellung von Ampicilin beschrieben wurde [60].

Für den Fall einer Acylierung am *C*-Terminus würde eine Esterbindung entstehen, die mittels Lipasen oder Esterasen gespalten werden könnte. Verschiedene Lipasen sind auch für die *N*-terminale Acylierung von Aminen beschrieben [61, 62]. Da Hydrolysen in einem thermodynamischen Gleichgewicht zur Synthesereaktion (siehe 1.2.2.1.) vorliegen, das stark auf Hydrolysesseite liegt, ist durch Modifikation der Reaktionsbedingungen, wie z. B. wasserfreie Reaktionsmedien, eine Reaktionsumkehr möglich.

Wird zur Vermeidung der als Nebenreaktion ablaufenden Hydrolyse unter wasserfreien Bedingungen gearbeitet, führt dies oftmals zur Inaktivität und Instabilität des verwendeten Katalysators. Durch Modifikation des Reaktionsmediums oder des Katalysators selbst können diese Einschränkungen gemindert oder aufgehoben werden. So kann bspw. durch Zusatz wasserähnlicher Moleküle, wie Glycerol, die Enzymaktivität wieder hergestellt werden [63]. Der Katalysator selbst kann durch chemische Modifikationen wie z. B. Acetylierung freier Aminogruppen oder physikalische Methoden wie Immobilisierung stabilisiert werden und seine Aktivität erhalten bleiben [64, 65]. Des Weiteren kann die Löslichkeit der Substrate oder Produkte problematisch werden.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, über eine von Proteasen katalysierte Synthese kurzkettige Peptide herzustellen, die in einem zweiten Schritt entweder ebenfalls enzymatisch oder chemisch mit einer Fettsäure zum Acylpeptid verknüpft werden sollten.

Zur enzymatischen Peptidsynthese sollte entweder ein kinetisch oder thermodynamisch kontrollierter Reaktionsweg beschritten werden. In Absprache mit dem beteiligten Projektpartner (BASF Personal Care and Nutrition GmbH, früher Cognis GmbH) sollten Oligopeptide mit einem Molekulargewicht von ca. 1 kDa synthetisiert werden. Die Oligomerisierungsreaktion sollte anhand bereits beschriebener Reaktionen etabliert werden. Hierzu wurden mit Papain, Bromelain und Ficin Cysteinproteasen verwendet, die zumindest für Hydrolysen ein relativ breites Substratspektrum besitzen. Zur Analyse der Syntheseprodukte sollte eine geeignete Analytik auf Basis chromatografischer und spektralphotometrischer Methoden entwickelt werden.

Nach erfolgreicher Etablierung der Peptidoligomerisierung zu Homo- oder Heterooligopeptiden, sollte durch die Synthese kationischer Heterooligopeptide eine neue Klasse enzymatisch hergestellter Oligopeptide untersucht werden. Diese würden aufgrund verschiedener Eigenschaften, wie z. B. der guten Löslichkeit in wässrigen Medien und den positiv geladenen Seitenketten, vielfältige industrielle Einsatzmöglichkeiten bieten.

Nach erfolgreicher Synthese verschiedener Oligopeptide sollte eine Acylierung der Peptide entweder durch chemische Methoden oder ebenfalls durch einen Enzym-katalysierten Ansatz erfolgen.

Die erfolgreiche Acylierung der synthetisierten Peptide würde neuartige Biotenside hervorbringen, die einen hydrophilen, ggf. geladenen Peptidkopf und einen hydrophoben Fettsäureschwanz besitzen, deren tensidische Eigenschaften mit verschiedenen Methoden näher charakterisiert werden sollten. Abbildung 10 fasst die Ziele dieser Arbeit schematisch zusammen.

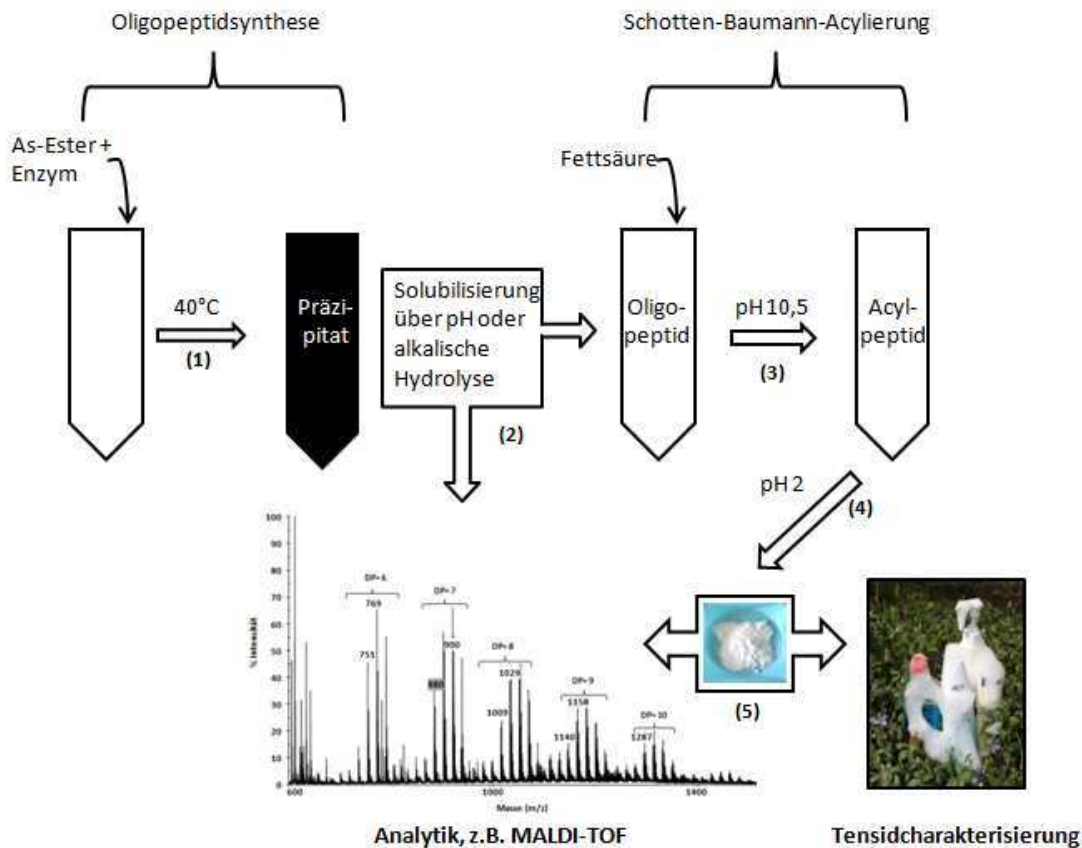


Abbildung 10: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit durchgeführten Acylpeptidsynthese.

In einer enzymatischen Peptidsynthese wird ausgehend von Aminosäureestern (As-Ester), die sowohl als Acyldonor als auch –akzeptor dienen, bei 40 °C eine Oligomerisierung durchgeführt, die bei Verwendung hydrophober Aminosäuren zur Präzipitatbildung führt (1). Die Präzipitate sind nicht länger wasserlöslich. Wird Glutamatdiethylester (GludiOEt) zur Synthese verwendet, können die veresterten Seitenketten des entstehenden Oligoglutamat- γ -ethylesters alkalisch hydrolysiert werden und die nun wasserlöslichen Oligopeptide entweder analysiert oder zur Acylierung verwendet werden. Bei Verwendung kationischer Aminosäuren kann eine Solubilisierung über den pH-Wert erfolgen (2). Zur Acylierung wird die Schotten-Baumann-Reaktion verwendet, die bei pH 10,5 eine N-Acylierung mit einer Fettsäure bewirkt (3). Im Anschluss kann das Acylpeptid durch saure Präzipitation ausgefällt (4) und analysiert, sowie seine Tensideigenschaften charakterisiert werden (5).

2. Material & Methoden

2.1. Verwendete Puffer und Lösungen

Sowohl die enzymatischen Synthesen als auch die chemischen Acylierungen wurden mit unterschiedlichen Puffern und Lösungen durchgeführt. Die Zusammensetzungen der jeweiligen Puffer gehen aus der nachfolgenden Tabelle hervor.

Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen

Die zur Herstellung verwendeten Feststoffe wurden immer, sofern nicht anders angegeben, in MilliQ-H₂O gelöst.

Name	Zusammensetzung	Herstellung	Anwendung
Kaliumphosphatpuffer 0,9 M pH 7,8	0,9 M KH ₂ PO ₄ 0,9 M K ₂ HPO ₄	Mischung unter pH-Kontrolle	Oligopeptid- Synthese
Kaliumphosphatpuffer 1 M pH 8,5	1 M K ₂ HPO ₄ 1 M KH ₂ PO ₄	Mischung unter pH-Kontrolle	Oligopeptid- Synthese
Citratpuffer 1 M pH 5,5	1 M Citronensäure	Korrektur mit 1M NaOH	Oligopeptid- Synthese
Natriumphosphatpuffer 0,5 M pH 7,5	0,5 M Na ₂ HPO ₄ 0,5 M NaH ₂ PO ₄	Mischung unter pH-Kontrolle	Oligopeptid- Synthese
Natriumcarbonatpuffer 0,2 M pH 10,5	0,2 M Na ₂ CO ₃ 0,2 M NaHCO ₃	Mischung unter pH-Kontrolle	Chemische Acylierung
Natriumphosphatpuffer 0,5 M pH 7,5	0,5 M Na ₂ HPO ₄ 0,5 M NaH ₂ PO ₄	Mischung unter pH-Kontrolle	Enzymatische Acylierung
Natriumphosphatpuffer 20 mM pH 6,35	20 mM Na ₂ HPO ₄ 20 mM NaH ₂ PO ₄	Mischung unter pH-Kontrolle	HPLC-Laufmittel
Natriumcarbonatpuffer 0,1 M pH 9,3	0,1 M Na ₂ CO ₃ 0,1 M NaHCO ₃	Mischung unter pH-Kontrolle	OPA-Derivatisierung Photometer
OPA-Lösung	40 mg/ml MeOH	Vor Verwendung mit MPA-Lösung mischen!	OPA-Derivatisierung Photometer
MPA-Lösung	100 mg/50 ml Na-carbonatpuffer		OPA-Derivatisierung Photometer
Boratpuffer 166 mM pH 10,4	166 mM H ₃ BO ₃	Korrektur mit 1 M NaOH	OPA-Derivatisierung HPLC
OPA-Lösung	5 mg/ml in Boratpuffer		OPA-Derivatisierung HPLC
MPA-Lösung	110 µl in 9890 µl Boratpuffer		OPA-Derivatisierung HPLC

2.2. Verwendete Geräte & Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Geräte.

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Autoklaven	V-150	Systec (Wettenberg)
	HX-430	
Brutschrank	BBD 6220	Thermo Fischer Scientific (Waltham, US)
Feinwaage	BP 61 S	Sartorius (Göttingen)
Gefriertrockner	Beta 1-8	Christ (Osterode)
HPLC-Anlage	1100/1200 Series	Agilent Technologies (Santa Clara, US)
HPLC-Säule	Hyperclone 5u C18 120A Jupiter® Proteo 4 µm 90 Å	Phenomenex (Torrance, California)
HPLC-Säule	HSPGel AQ 2.5	Waters (Milford Massachusetts)
Magnetrührer	D-6010	neoLab® (Heidelberg)
MALDI-ToF	4800 Plus MALDI-ToF/ToF	AB Sciex (Framingham, Massachusetts)
Membranfilter (10 kDa Ausschlußmembran)	Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units	Merck Millipore (Darmstadt)
Mikrotiterplattenschüttler	BioShake IQ	Analytik Jena (Jena)
pH-Meter	InoLab pH Level 1	WTW (Weilheim)
Pipetten	Research	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Plattformschüttler	Polymax 1040	Heidolph (Schwabach)
Reinstwasseranlage	Purelab Plus	USF Seral (Ransbach-Baumbach)
Spektralphotometer (Küvette)	Ultrospec 1100 Pro UV/Vis	GE Healthcare (Chalfont St. Giles ,UK)
Spektralphotometer (Mikrotiterplatte)	µQuant™ Epoch	BioTek® Instruments (Winooski, US)

Tensiometer	TD 1	Lauda (Lauda-Königshofen)
Thermoschüttler	Thermomixer Comfort Thermomixer Compact	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Trockenschrank	ED-2040	Binder (Tuttlingen)
Überkopfschüttler	Reax 2	Heidolph (Schwabach)
Ultraschallbad	Sonorex Super RX 100	Bandelin Electronic (Berlin)
Vakuumpumpe	MZ2C	Vaccubrand (Wertheim)
Vortexer	REAX top	Heidolph (Schwabach)
Waage	BP 3100 S BP 61 S	Sartorius (Göttingen)
Zentrifuge	Multifuge X3 FR	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Chemiekalie	Formel	Molekulargewicht [g/mol]	Hersteller
Alanin	C ₃ H ₇ NO ₂	89,1	Fluka
Acetonitril	C ₂ H ₃ N	41,01	Roth
Borsäure	H ₃ BO ₃	61,83	Roth
Bromelain			Enzybel
Bromelain			Sigma-Aldrich
Citronensäure	C ₆ H ₈ O ₇	192,13	Roth
α-Cyanohydroxymizsäure	C ₁₀ H ₇ O ₃ N	189	Sigma-Aldrich
Dioxan	C ₄ H ₈ O ₂	88,11	Fluka
Ethylhexanoat	C ₈ H ₁₆ O ₂	144,22 P = 0,87 g/cm ³	Sigma-Aldrich
Fettsäuremethylester –Mix (FAME-Mix)			Sigma-Aldrich
Ficain			Enzybel

Ficain			Sigma-Aldrich
Glutamatdiethylester Hydrochlorid	$C_9H_{17}NO_4 \cdot HCl$	239,7	Sigma-Aldrich
N-Lauroyl-L-Alanin	$C_{15}H_{29}NO_3$	271,4	Sigma-Aldrich
Laurinsäurechlorid	$C_{12}H_{23}ClO$	218,76	Fluka
Leucinethylester Hydrochlorid	$C_8H_{17}NO_2 \cdot HCl$	195,69	Sigma-Aldrich
L-Lysin Monohydrat	$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot H_2O$	164,21	Roth
Lysinethylester Hydrochlorid	$C_8H_{18}N_2O_2 \cdot 2HCl$	247,16	Sigma-Aldrich
Mercaptopropionsäure (MPA)	$C_3H_6O_2S$	106,14	Fluka
Methanol	CH_4O	32,04	Roth
L-Methionin	$C_5H_{11}NO_2S$	149,2	Fluka
Methioninethylester Hydrochlorid	$C_6H_{12}NO_2S \cdot HCl$	213,79	Sigma-Aldrich
Dinatriumcarbonat	Na_2CO_3	105,99	Roth
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	84,01	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	177,99	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	NaH_2PO_4	156,01	Roth
Natriumhydroxid	$NaOH$	40,01	Roth
Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)	$(CH_3)_3S(OH)$	94,18	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure	CF_3COOH	114,02	Uvasol
Tyrosinethylester	$C_{11}H_{15}NO_3 \cdot HCl$	245,7	Sigma-Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	174,18	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	136,09	Roth
Oligoglutamat			diese Arbeit
Oligoglutamat/Leucin			diese Arbeit
Oligoglutamat/Methionin			diese Arbeit
Oligoglutamat-γ-ethylester			diese Arbeit
Oligolysin/Methionin			diese Arbeit
ortho-Phthaldialdehyd (OPA)	$C_8H_6O_2$	134,13	Sigma-Aldrich
P125 (Syn.: Alcalase)			ChiralVision
P126 (Syn.: Savinase)			ChiralVision

P127 (Syn.: Everlase)			ChiralVision
P128 (Syn.: Esperase)			ChiralVision
Papain			Enzybel
Papain			Sigma-Aldrich
Plantapon ACG HC (enthält 5 % Cocoylglutamat)			BASF
Polyethylenglykol 600 (PEG)	$(C_2H_4O)_nH_2O$	~ 600	Fluka
Polyethylenglykol 1000 (PEG)	$(C_2H_4O)_nH_2O$	~ 1000	Fluka
Polyethylenglykol 1500 (PEG)	$(C_2H_4O)_nH_2O$	~ 1500	Fluka
Polyethylenglykol 2000 (PEG)	$(C_2H_4O)_nH_2O$	~ 2000	Fluka
Salzsäure	HCl	36,46	Roth

2.3. Synthese von Oligopeptiden

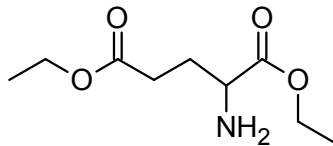
2.3.1. Enzymatische Synthese unlöslicher Homo- und Heterooligopeptide

Enzym-katalysierte Oligopeptidsynthesen wurden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll orientierte sich an den Arbeiten von Li *et al.* und Jost *et al.* und wurde bei Bedarf angepasst [35, 66].

In dieser Arbeit wurden Oligomerisierungsversuche ausgehend von den in Abbildung 11 gezeigten Aminosäureethylestern als Substrate durchgeführt. Die Substratkonzentration betrug in allen Versuchen 500 mM. Nach Einwaage wurde das Substrat im jeweiligen Reaktionspuffer gelöst. Anschließend erfolgte die Enzymzugabe in Pulverform. Hierbei wurde auf eine möglichst exakte Einwaage der Enzymmenge geachtet, da keine Korrektur durch das Volumen des Reaktionspuffers mehr erfolgen konnte. Sofern nicht anders angegeben wurde der Reaktionsansatz bei 40 °C in einem Thermomixer inkubiert. Die Reaktionszeit variierte je nach verwendetem Substrat oder Enzym. Bei Endpunktreaktionen wurde das entstandene Präzipitat zweimal mit MilliQ-H₂O gewaschen und zentrifugiert (je nach Ansatzgröße in der Tischzentrifuge bei 3,75 x g oder in der Heraeus Multifuge bei 4700 x g). Das Pellet wurde im Lyophilisator bei -30 °C (0,370 mbar) getrocknet.

Tabelle 4: Zusammenfassung der durchgeführten Syntheseansätze.

Oligopeptid	Enzym	Enzymmenge [mg/ml]	Puffer	Reaktionszeit [min]
Oligoglutamat- γ - ethylester	Papain	20	0,9 M K-PO ₄ pH 7,8	20
	Bromelain	20		
	Ficain	10		
Oligotyrosin	Papain	20	0,9 M KPO ₄ pH 7,8	40
Oligoleucin	Papain	20	1 M KPO ₄ pH 8,5	120
Oligomethionin	Papain	20	0,9 M KPO ₄ pH 7,8	20
			Na-Carbonat pH 5,5	

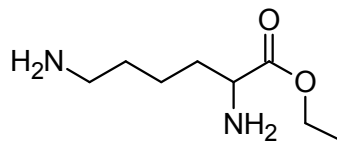


Glutamatdiethylester
(Glu diOEt)

MW: 203,23 g/mol

MW in Peptidkette: 157 g/mol

Peptidname: OligoGluEt *

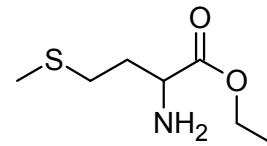


Lysinethylester
(LysOEt)

MW: 174,24 g/mol

MW in Peptidkette: 128 g/mol

Peptidname: OligoLys

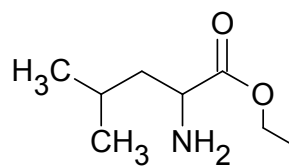


Methioninethylester
(MetOEt)

MW: 177,26 g/mol

MW in Peptidkette: 131 g/mol

Peptidname: OligoMet

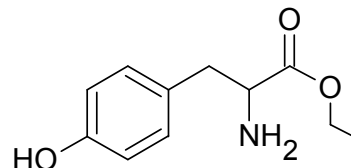


Leucinethylester
(LeuOEt)

MW: 159,22 g/mol

MW in Peptidkette: 113 g/mol

Peptidname: OligoLeu



Tyrosinethylester
(TyrOEt)

MW: 209,24 g/mol

MW in Peptidkette: 163 g/mol

Peptidname: OligoTyr

Abbildung 11: Strukturformeln, Bezeichnungen und Molekulargewichte der in den Oligomerisierungsversuchen verwendeten Aminosäureethylester.

Bei Bildung einer Peptidbindung wird die Estergruppe am α -C-Atom entfernt, so dass die eingebauten Aminosäuren 46 g/mol leichter sind. * = Oligoglutamat- γ -ethylester. Nach alkalischer Lyse der Seitenkette als **OligoGlu** bezeichnet, mit einem Molekulargewicht von 129 g/mol pro Glutamatrest.

2.3.1.1. Alkalische Hydrolyse

Bei Oligopeptidsynthesen in denen Glutamatdiethylester als Substrat verwendet wurde, konnten durch alkalische Hydrolyse die Estergruppen der Glutamatseitenkette entfernt und so ein wasserlösliches anionisches Produkt erhalten werden. Hierzu wurden 5 mg/ml der Lyophilisate mit 1 M NaOH versetzt und solange bei 40 °C inkubiert, bis diese vollständig gelöst waren. Die Hydrolysezeiten unterschieden sich je nach eingesetztem Oligopeptid und sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Dauer der alkalischen Hydrolyse für die Oligopeptide OligoGluOEt, OligoGluOEt/Met und OligoGluOEt/Leu.

Oligopeptid	Hydrolysezeit [min]
OligoGluOEt	20
OligoGluOEt/Met	90
OliGluOEt/Leu	150

2.3.1.2. Modifikation der Reaktionsparameter Temperatur, Zeit, Enzymmenge

Bei der Homooligomerisierung von GludiOEt wurden Peptide > 2 kDa erhalten, die allerdings für die vom Projektpartner angestrebten Anwendungen zu groß waren. In Absprache mit dem Projektpartner wurde als Zielgröße der Peptide ca. 1 kDa angestrebt. Um die Peptidgröße zu verringern, wurden verschiedene Modifikationen der Versuchsparameter vorgenommen, sowie die Cysteinproteasen Bromelain und Ficin anstelle von Papain verwendet. Modifikationen wurden bei den Reaktionsparametern Temperatur, Reaktionszeit und Enzymkonzentration durchgeführt. Alle Modifikationen wurden auf eine Verringerung der Präzipitatmenge hin untersucht.

Bis auf die veränderten Parameter wurden die Reaktionen analog zur oben beschriebenen Oligopeptidsynthese (2.2.1) durchgeführt. Eine Zusammenstellung der jeweiligen Versuchsansätze sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 zu finden. Da die kurzkettigeren Oligopeptide sich noch in Lösung befinden sollten, musste eine thermische Inaktivierung des sich ebenfalls in Lösung befindlichen Enzyms erfolgen. Dies geschah durch Inkubation für 5 min im auf 90 °C vorgeheizten Thermomixer. Im Anschluss erfolgte eine 3 minütige Zentrifugation (3,75 x g) nach der das Pellet verworfen und der Überstand in ein leeres Behältnis überführt wurde.

Tabelle 6: Modifikationen für die Bromelain-katalysierte Homooligomerisierung von GludiOEt.

Alle Synthesen wurde mit einer Substratkonzentration von 0,5 M durchgeführt und zur Aktivierung von Bromelain 2 mM Cysteinlösung hinzugegeben.

Modifikation	Enzymmenge [mg/ml]	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Zeitversuch	20	40	5, 10, 20, 30
Temperaturversuch	20	4, 10, 20, 30, 40	30
Enzymmenge	20, 30, 50	30	30

Tabelle 7: Modifikationen für die Ficin-katalysierte Homooligomerisierung von GludiOEt.
Die Substratkonzentration betrug in allen Versuchen 0,5 M.

Modifikation	Enzymmenge [mg/ml]	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Zeitversuch	20	40	5, 10, 20, 30
Temperaturversuch	5*	4, 10, 20, 30, 40	5*, 30
Enzymmenge	2, 5, 10, 20	4**	5

* Da die Ficin-katalysierte Reaktion im Zeitversuch schon nach 5 min ca. 70 % des Substrates umgesetzt hatte, wurde bereits im Temperaturversuch eine geringere Enzymkonzentration sowie geringere Reaktionszeit eingesetzt.

** Da Ficin eine starke Syntheseaktivität besaß, wie die Zeit- und Temperaturversuche zeigten, wurde bei Untersuchung des Einflusses der Enzymmenge die Reaktionstemperatur auf 4 °C gesenkt.

2.3.2. Enzymatische Synthese löslicher Oligopeptide

Anders als bei den oben beschriebenen Synthesen resultiert die Herstellung löslicher Oligopeptide nicht in der Bildung eines Präzipitates, weshalb das Enzym nach der Reaktion durch Zentrifugation (40 min bei 4600 x g) über eine 10 kDa Größenausschlussmembran aus dem Reaktionsansatz entfernt werden musste. Diese Methode wurde nur für die Herstellung von Oligolysin (OligoLys) verwendet.

Die Reaktionen wurden in 0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5 mit einer Substratkonzentration von 0,5 M und 10 mg/ml Enzym durchgeführt. Vor Enzymzugabe wurden die Substrate in der benötigten Konzentration im Reaktionspuffer gelöst und so Wiegeungenauigkeiten ausgeglichen. Dies machte allerdings ein genaues Abwiegen der benötigten Enzymmengen notwendig und es wurden in den Reaktionsansätzen ausschließlich Enzymmengen verwendet, die um maximal 1 % von der benötigten Menge abwichen. Nach Enzymzugabe wurde der gesamte Reaktionsansatz für 90 min bei 40 °C im Thermomixer inkubiert. Nach Reaktionsende wurde der gesamte Syntheseansatz über eine 10 kDa Ausschlussmembran zentrifugiert (40 min, 4600 x g) und der Durchfluss bei -30 °C eingefroren und gelagert.

2.3.3. Analytik

Zur Analytik wurden mit der HPLC und GPC zunächst zwei chromatografische Verfahren gewählt, um die Oligopeptide grob zu charakterisieren. Außerdem wurde das Gewicht der Präzipitate bestimmt.

Massenspektrometrische MALDI-ToF Analysen wurden nur für lösliche Homo- oder Heterooligopeptide verwendet.

2.3.3.1. Bestimmung der Präzipitatzmenge

Um die Reaktionsausbeute der durchgeführten Oligomerisierungen zu bestimmen, wurde das Präzipitat am Ende der Reaktion abzentrifugiert, zweimal mit MilliQ-H₂O gewaschen, erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und über Nacht im Lyophilisator bei 0,370 mbar (-30 °C) getrocknet. Je nach Ansatzgröße fanden die Zentrifugationsschritte entweder bei 3,75 x g (in der Tischzentrifuge) oder 4600 x g statt. Die Ausbeute wurde über folgende Formel berechnet.

Formel 1: Berechnung der Reaktionsausbeute nach Homooligomerisierungen.

$$\text{Ausbeute} = \frac{m(\text{Präzipitat}) * 100}{m(\text{Substrat})}$$

Wurde eine Heterooligomerisierung durchgeführt, also zwei unterschiedliche Substrate verwendet, musste die Formel leicht modifiziert werden.

Formel 2: Berechnung der Reaktionsausbeute nach Heterooligomerisierungen.

$$\text{Ausbeute} = \frac{m(\text{Präzipitat}) * 100}{m(\text{Substrat 1}) + m(\text{Substrat 2})}$$

2.3.3.2. BCA-Assay zur Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinkonzentration der Enzympräparate wurde nach der Bichinonsäure-Methode von Smith *et al.* quantifiziert [67]. Der Assay wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatte durchgeführt und direkt in dieser zusammenpipettiert und vermessen. Hierzu wurden zu 25 µl Probelösung 200 µl BCA-Assay Reagenz gegeben und auf einem Mikrotiter-Thermoschüttler bei 37 °C für 30 min geschüttelt. Nach Abkühlen der Reaktion auf Raumtemperatur wurde bei 562 nm die Absorption gemessen. Anhand einer zuvor hergestellten Standardkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen von 0,2 mg/ml bis 1 mg/ml konnte die Konzentration der Probe bestimmt werden. Die Standardgerade wurde erst ab einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 \geq 0,99$ zur Berechnung verwendet.

2.3.3.3. Photometrischer Aminosäurenachweis mittels OPA-N-Derivatisierung

Zur photometrischen, quantitativen Analyse von Aminosäureestern wurde die OPA-N-Methode eingesetzt. Hierbei kommt es zu der Bildung eines Farbkomplexes aus *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA), der Stickstoffkomponente (Aminosäureester) und der Thiolverbindung 3-Mercaptopropionsäure (MPA) bei einem pH-Wert von 9,3. Bei der Reaktion wird der Aminostickstoff in einen Pyrrolring umgewandelt, sodass ein fluoreszierendes Isoindolringsystem entsteht. Die Transformation des Stickstoffs zum Pyrrolring kann nur bei primären Aminen stattfinden. So können z. B. sekundäre Amine, welche in einer Peptidbindung verknüpft sind, nicht detektiert werden [68]. Mit dieser Methode wurden also sowohl freie Aminosäuren, als auch am C-Terminus veresterte Aminosäuren quantifiziert. Das Reaktionsschema der Derivatisierung ist in Abbildung 12 dargestellt.

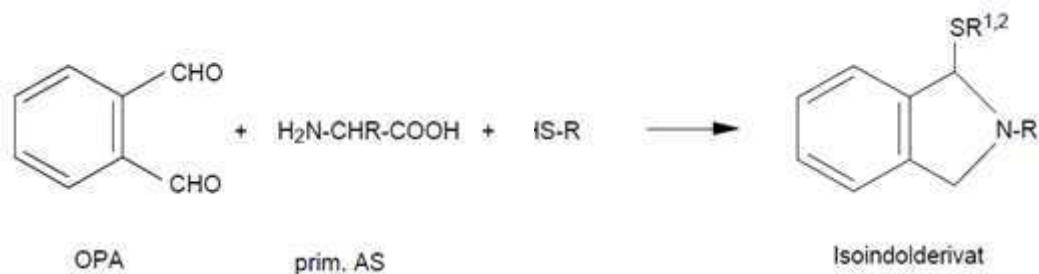


Abbildung 12: Reaktionsschema der primären AS mit OPA in Gegenwart von MPA als Thiolverbindung (modifiziert nach Baek [69]); S-R = 3-Mercaptopropionsäure.

Die gesamte Reaktion und Messung wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatte durchgeführt. Die, bei den Synthesen erhaltenen Überstände oder gelösten Präzipitate wurden je nach Konzentration so verdünnt, dass die Werte der Konzentrationen im Kalibrationsbereich lagen (siehe Tab.2). Zur Messung im Photometer wurden jeweils 5 μl der verdünnten Probe und 125 μl des OPA-Reagenz (Zusammensetzung siehe Tabelle 1) auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach 1 minütigem Schütteln wurde die Extinktion bei 340 nm gemessen.

Als Kalibrierung wurden jeweils sechs Proben des in der Oligomerisierung verwendeten Aminosäureesters in NaPP gelöst. Folgende Konzentrationen wurden hergestellt, ebenfalls auf die Mikrotiterplatte gebracht und mit dem OPA-Reagenz derivatisiert: 0, 0,5, 1, 2, 3 und 4 mM. Vor dem Messen wurde die Platte für eine Minute geschüttelt. Die Kalibration wurde nur ab einem Bestimmtheitsmaß $R^2 \geq 0,99$ zur Berechnung herangezogen.

2.3.3.4. Gelpermeationschromatografie (GPC)

Mittels Gelpermeationschromatografie wurden die Proben aus den Versuchen mit modifizierten Versuchparametern auf ihre Größe untersucht. Vor der Probeninjektion wurden sowohl der RI-Detektor als auch der Säulenofen auf 50 °C erhitzt und anschließend 10 µl der Proben injiziert. Als Laufmittel diente MilliQ-H₂O, das mit einer Flussrate von 0,3 ml/min durch die Säule (HSPGel AQ 2.5, Waters) gespült wurde. Detektiert wurde über einen Brechungsindexdetektor (RI-Detektor). Eine Übersicht der Laufbedingungen während einer Analyse sind in Tabelle 8 angegeben.

Vor jeder Probenmessung wurde mit 10 mM PEG-Standards (PEG 600, PEG 1000, PEG 1500 und PEG 2000) kalibriert. Da der letzte Standard bei der Ausschlussgrenze der Säule liegt, wurde dieser Wert bei einem Bestimmtheitsmaß $R^2 \leq 0,98$ geklammert.

Tabelle 8: Bedingungen der GPC-Analytik zur Untersuchung der Überstände aus den modifizierten Oligomerisierungen mit Bromelain und Ficain.

Säule	HSPGel AQ 2.5
Säulentemperatur	50 °C
Detektor	RI
Detektortemperatur	50 °C
Laufmittel	MilliQ-H ₂ O
Flussrate	0,3 ml/min

2.3.3.5. Matrix assisted laser desorption/ionization - Time of Flight (MALDI-ToF)

Mittels MALDI-ToF/MS wurde für die Oligopeptide OligoGlu, OligoGlu/Met, OligoGlu/Leu und OligoLys/Met die Größenverteilung der Peptidkette bestimmt.

Dafür wurden 0,5 µl jeder Probe mit 0,5 µl einer Matrixlösung (10 mg/ml α -Cyanohydroxymizsäure in 50 % Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure) gemischt, als zwei 0,5 µl Fraktionen auf einen QCM-D Chip aufgetragen und an der Luft trocknen gelassen. Die Analysen wurden mit einem 4800 Plus MALDI-ToF/ToF Massenspektrometer im positiven Ionisierungsmodus durchgeführt. Die erhaltenen Massenspektren wurden aus 1000 Laserbeschüssen der Probe mit einem Nd:YAG Laser (Wellenlänge 355 nm, Puls < 500 ps, Wiederholungsrate 200 Hz) gemittelt. Als Analysesoftware wurde 4000 Series Explorer (V 3.5.3) sowie Data Explorer (V 4.9) verwendet.

Um eine hohe Messgenauigkeit zu erzielen, wurde mit einem Kalibrations-Kit (des-Arg-Bradykinin $m/z = 904.47$ Da, Angiotensin I $m/z = 1296.69$ Da, Glu-Fibrinopeptide B $m/z = 1570.68$ Da, ACTH clip 1-17 $m/z = 2093.09$ Da, ACTH clip 18-39 $m/z = 2465.20$ Da) kalibriert.

2.4. Chemische Acylierung von Aminosäuren und Peptiden

2.4.1. Schotten-Baumann-Acylierung von Aminosäuren und Peptiden

2.4.1.1. Acylierung von Aminosäuren

Für die chemische Acylierung von Aminosäuren über die Schotten-Baumann-Reaktion, die bereits von Sander *et al.* und Ronwin *et al.* beschrieben wurde, wurden vier Aminosäuren eingesetzt, die z. T. auch in den Oligopeptidsynthesen verwendet wurden und mit Dodecanoylchlorid (Laurinsäurechlorid) gleicher Molarität acyliert [70, 71]. Eine Ausnahme hiervon stellte Glutamat dar, das unter den Reaktionsbedingungen zur Anhydridbildung neigt (siehe Abbildung 13).

50 mM der zu acylierenden Aminosäure wurden in 0,2 M Na-Carbonat-Puffer mit pH 10,5 gelöst und in ein Eisbad gestellt. Das Fettsäurechlorid wurde äquimolar in Dioxan gelöst und mit einer Bürette unter ständigem Rühren langsam zugetropft (Flussrate 1,5 ml/min). Nachdem der komplette Büretteninhalt zugetropft war, wurde das Aminosäure/Fettsäuregemisch aus dem Eisbad genommen und für vier Stunden auf dem Magnetrührer weitergerührt. Es wurde jeweils eine Probe vor und nach dem Zutropfen des Fettsäurechlorids, sowie nach 4 h genommen und der pH-Wert gemessen. Nach den vier Stunden wurde der Reaktionsansatz mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von ca. 2 angesäuert, woraus ein Niederschlag resultierte, der abzentrifugiert (20 min, 4600 x g), mit Wasser gewaschen, nochmals zentrifugiert und das Pellet anschließend im Gefriertrockner bei -30 °C (0,370 mbar) getrocknet wurde. Der im Überstand verbliebene Rest wurde mit Ethylacetat extrahiert und mit MilliQ-Wasser gewaschen. Anschließend wurde Ethylacetat mit dem Rotationsverdampfer abrotiert (240mbar, 40°C) und der verbleibende Rest an Lösungsmittel im Lyophilisator bei -30 °C (0,370 mbar) entfernt.

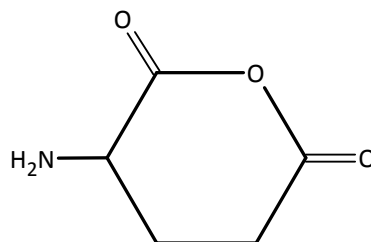


Abbildung 13: Glutamat, das sich durch Anhydridbildung zum Ring geschlossen hat und somit nicht acyliert werden kann.

2.4.1.2. Acylierung von Peptiden

Für die chemische Acylierung von Peptiden wurden drei verschiedene Peptide, OligoGlu/Met, OligoGlu/Leu und OligoGlu eingesetzt. Aufgrund der veresterten Carboxylgruppen der Glutamatseitenketten musste vor der Acylierung noch eine alkalische Hydrolyse durchgeführt werden. Es wurde 1 ml 1 M NaOH zu 50 mg des Peptids gegeben und bei 60 °C geschüttelt (Dauer der alkalischen Hydrolyse in Tabelle 5). Da sich trotz langer alkalischer Hydrolyse OligoGluOEt/Met und OligoGluOEt/Leu nicht komplett in NaOH gelöst hatten, wurde die Suspension zentrifugiert (5 min bei 3,75 x g). Der Überstand, der die löslichen Oligopeptide enthält, wurde über Nacht bei -30 °C (0,370 mbar) lyophilisiert. Das getrocknete Produkt wurde anschließend in 0,2 M Na-Carbonat-Puffer mit pH 10,5 gelöst. Die anschließende Acylierung wurde wie für die Aminosäuren beschrieben durchgeführt. Von den Oligopeptiden und dem Laurinsäurechlorid wurden jeweils 5 mm eingesetzt.

Eine Acylierung des kationischen Heterooligopeptids OligoLys/Met über die Schotten-Baumann-Reaktion konnte nicht durchgeführt werden, da dieses Peptid nur in ACN: H₂O (1:1) + 0,1 % TFA und somit bei einem sehr niedrigen pH-Wert von ca. 2 löslich war, für die Acylierung aber ein pH-Wert von 10,5 benötigt wird.

2.4.2. Analytik

Zur Analytik der chemisch acylierten Aminosäuren wurde über den in 2.3.3.3. beschriebenen photometrischen Assay durch OPA-Derivatisierung die Abnahme der freien Aminosäure gemessen. Außerdem wurde die pH-Änderung während der Acylierung verfolgt, eine HPLC-Analytik mit *N*-Acylalanin durchgeführt und die Oberflächenspannung der gelösten Acylaminosäure bestimmt. Für die Acylogoligopeptide wurde neben der Messung der Oberflächenspannung eine massenspektrometrische Bestimmung über MALDI-ToF (2.3.3.5.) durchgeführt.

2.4.2.1. High performance liquid chromatography (HPLC)

Da bei der *N*-Acylierung von Aminosäuren eine Amidbindung entsteht und diese genau wie eine Peptidbindung bei 206 nm nachgewiesen werden kann, sollte die HPLC-Analytik neben den o.g. Analytikmethoden zum Nachweis eingesetzt werden. Dabei wurde als Laufmittel ein Gemisch aus Methanol und 20 mM NaPP-Puffer mit pH 6,35 verwendet. Alle HPLC-Laufmittel wurden vor Verwendung mittels einer Vakuumpumpe durch eine 0,2 µm Membran filtriert und anschließend zur Entgasung für mindestens 15 min in ein Ultraschallbad gelegt. Die Methode lief isokratisch und wurde mit Konzentrationen von 80% - 10% Methanol zur Auftrennung verwendet. Neben der im

Versuch acylierten Aminosäure wurde noch kommerziell erhältliches *N*-Lauroyl-L-Alanin (Fa. Sigma) als Standard getestet. Tabelle 9 zeigt die Laufbedingungen während einer Analyse.

Zur Überprüfung der Reinheit des acylierten Alanins wurde dies sowie der Standard und eine Probe von L-Alanin mit OPA derivatisiert in der HPLC durchgeführt. Die Funktionsweise dieser Derivatisierung wurde bereits in 2.3.3.3. ausführlich beschrieben.

Wie im Photometer erfolgte die Detektion bei einer Wellenlänge von 340 nm mittels FLD-Detektor. In der HPLC- Methode werden jeweils 1 ml 166 mM Boratpuffer pH, MPA und OPA gelöst in Boratpuffer verwendet. Die Derivatisierung wurde durch eine „Online-Derivatisierung durchgeführt, wobei das Programm „8 µl Boratpuffer + 4 µl OPA + 4 µl 3-MPA + 1 µl Probe“ eingesetzt wurde. Die Laufbedingungen in der HPLC sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Bedingungen der HPLC-Analytik für acylierte Aminosäuren und *N*-Lauroyl-L-Alanin.

Säule	Hyperclone C18, RP
Wellenlänge	206 nm
Detektor	DAD
Laufmittel	Methanol, 20 mM NaPP-Puffer pH 6,35
Konzentrationen	80 % Methanol-10 % Methanol (isokratisch)
Temperatur	25 °C
Flussrate	0,5 ml/min

Tabelle 10: Bedingungen der OPA-Derivatisierung von Aminosäuren mit der HPLC.

Säule	Hyperclone C18, RP
Wellenlänge	340 nm
Detektor	FLD
Laufmittel	Methanol, 20 mM NaPP-Puffer pH 6,35
Konzentrationen	60 % Methanol
Temperatur	25 °C
Flussrate	0,5 ml/min

2.4.3. Charakterisierung der Tenseigenschaften

Zur Überprüfung der Acylierung von Aminosäuren und Peptide wurden neben den in 2.4.2. erwähnten Analytikmethoden auch Methoden zur Charakterisierung der Tenseigenschaften eingesetzt.

2.4.3.1. Bestimmung der Oberflächenspannung nach der Ringmethode von du Noüy

Die Ringmethode nach du Noüy wurde verwendet (Abbildung 14) um mit einem Tensiometer die Veränderung der Oberflächenspannung durch grenzflächenaktive Substanzen wie Acylaminosäuren oder -peptide zu untersuchen [72]. Hierzu wurden ca. 7 ml der gelösten Acylaminosäure oder des gelösten Acylpeptids in ein Glasgefäß gefüllt und der Ring des Tensiometers darin eingetaucht. Mit dem Rädchen an der Seite wird der Ring aus der Flüssigkeit gezogen und der höchste Wert (OSruk) auf der Anzeige notiert.

Alle Werte wurden über eine Dreifachbestimmung ermittelt. Um den absoluten Oberflächenspannungswert zu erhalten muss noch ein Korrekturfaktor ermittelt werden, der mit OSruk verrechnet wird (siehe Formel 3 und 4).

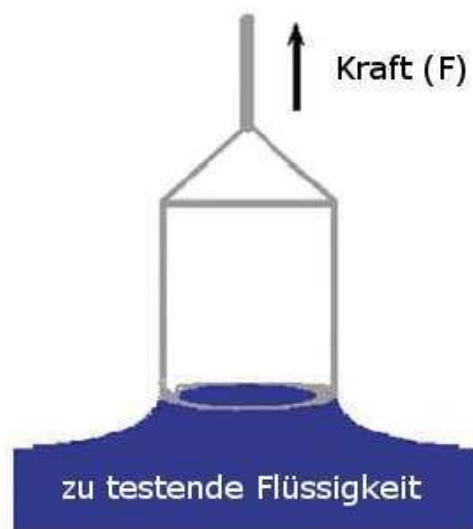


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Ringmethode zur Bestimmung der Oberflächenspannung nach du Noüy [72].

Die Oberflächenspannung wird durch die Kraft ermittelt, die aufgebracht werden muss, um den Ring aus der Flüssigkeit zu ziehen.

Formel 3: Korrekturfaktor der Oberflächenspannung

$$f = 0,8759 + (0,0009188 * OS_{\text{rük}})/D \text{ [mN/m]}$$

Formel 4: Errechnung der absoluten Oberflächenspannung

$$OS_{\text{abs}} = f * OS_{\text{rük}} \text{ [mN/m]}$$

2.4.3.2. Visuelle Überprüfung der Tensidentstehung durch Änderung des Lichtbrechungswinkels

Durch die Änderung der Oberflächenspannung von Wasser durch darin gelöste Tenside verändert sich auch der Brechungswinkel des Lichtes. Dies wurde sich zu Nutze gemacht, indem ein Karomuster durch eine mit Acylpeptiden gefüllte 96-Well-Platte betrachtet wurde. Je nach Lichtbrechungswinkel erschienen die Karos kleiner oder größer. Dazu wurden 100µl der in Wasser oder Puffer gelösten acylierten Aminosäuren und Peptide in die Wells gefüllt, die Platte auf eine 1 cm Erhöhung über ein kariertes Blatt gestellt und fotografiert. Zur Kontrolle wurden das jeweilige Lösungsmittel sowie Blindproben des Laurinsäurechlorids aufgetragen.

2.5. Enzymatische Acylierung

Da die Schotten-Baumann-Acylierung nicht für alle Aminosäuren anwendbar war und auch die hergestellten kationischen Oligopeptide damit nicht acyliert werden konnten, wurde versucht über eine enzymatisch katalysierte Reaktion eine *N*-Acylierung zu erreichen. Des Weiteren stand kommerziell erhältliches Cocoylglutamat zur Verfügung, anhand dessen eine Etablierung der gaschromatografischen Analytik erfolgen sollte.

2.5.1. Analytik

Zur Analytik der enzymatischen Acylierung sollte eine Gaschromatografie sowie eine darauf aufbauende HPLC-Analytik etabliert werden.

2.5.1.1. Gaschromatografie (GC)

Für die gaschromatografische Analytik wurde ein Fettsäuremethylester-Standard (FAME-Mix) injiziert und mit C₆ bis C₁₆-Fettsäureestern verglichen. Nachdem die Retentionszeiten der Fettsäureester mit denen des Standards übereinstimmten, wurden in den späteren Acylierungsversuchen nur noch die Ester der verwendeten Fettsäuren als Standard und zur Kalibrierung eingesetzt. Die Bedingungen dieser Gaschromatografie sind in Tabelle 11 gezeigt.

Tabelle 11: Bedingungen der GC-Analytik des FAME-Mixes sowie der derivatisierten Fettsäuren.

Säule	DB Wax
Säulenlänge	30 m
Detektor	FID
Trägergas	Stickstoff
Starttemperatur	100 °C
Temperaturerhöhung	25 °C/min
Endtemperatur	250 °C

Um Cocoylglutamat (Plantapon) mittels GC analysieren zu können, musste dieses zuerst alkalisch hydrolysiert (siehe 2.3.1.1., zusätzlich wurde auf 90 °C erhitzt) und anschließend die Carboxylgruppen der Fettsäuren mit TMSH derivatisiert werden. Hierzu wurden 100 µl des Hydrolysats mit 50 µl TMSH gemischt und in ein HPLC-Vial gefüllt. Um eine Aussage über die aus Cocoylglutamat freigesetzten Fettsäuren treffen zu können, wurden, zur Analyse des FAME-Mixes identische Analysebedingungen verwendet und die erhaltenen Peaks mit den bereits identifizierten Peaks des FAME-Mixes verglichen (Tabelle 11).

2.5.1.2. HPLC

Die HPLC besaß den Vorteil, dass zur Analyse des Cocoylglutamats keine vorherige Behandlung wie z. B. eine alkalische Lyse nötig war, da die Amidbindungen der *N*-acylierten Aminosäuren bei 206 nm detektiert werden konnten. Da sowohl die Retardierung der in dieser Arbeit verwendeten GC- als auch HPLC-Säule auf hydrophoben Wechselwirkungen des Analyten mit der stationären Phase beruhen, sollte auch das Retentionsverhalten bzw. die Retentionsreihenfolge mit den Ergebnissen der GC übereinstimmen. Für die HPLC-Analytik wurde ein Laufmittelgradient eingestellt, dessen Verlauf in Tabelle 12 angegeben ist.

Tabelle 12: Bedingungen der HPLC-Analytik von Plantapon.

Säule	Hyperclone C18, RP
Wellenlänge	206 nm
Detektor	DAD
Laufmittel	ACN, 20 mM NaPP-Puffer pH 6,5 10 - 50 % ACN in 0,5 %/min
Gradient	10 min halten 50 – 10 % in 2 %/min
Temperatur	25 °C
Flussrate	0,5 ml/min

2.5.2. Durchführung

In den enzymatischen Acylierungen lag der Acyldonor (Ethylhexanoat, C₆OEt) in 3-fachem Überschuss zum Acylakzeptor (GludiOEt) vor. Folglich wurden in den Umsetzungen in 100 % Aceton mit einem Gesamtvolumen von 2 ml 160 mg GludiOEt (= 330 mM) in 1670 µl Aceton gelöst und 330 µl C₆OEt (= 1M) zugegeben. In den Umsetzungen mit 80 % Aceton wurden 330 µl C₆OEt mit 1270 µl Aceton gemischt und 400 µl einer 1,5 M GludiOEt-Stammlösung in 0,1 M NaPP pH 7,5 zugegeben. Den Ansätzen wurden 10 mg von einer der immobilisierten Proteasen P125 - P128 zugegeben und das Ganze bei 50 °C inkubiert. Die Probennahme von 100 µl erfolgte nach 0, 22, 46 und 92 h. Bei der letzten Probennahme war jedoch bereits einiges an Aceton verdampft, so dass die erhaltenen Werte aus der GC zu falschen Konzentrationsangaben führten, weshalb nur die ersten drei Probennahmen zur Auswertung herangezogen wurden. Bei der Analyse über GC konnte lediglich eine Abnahme der Edukte nachgewiesen werden und somit nur eine indirekte Aussage über die Acylierung erfolgen.

Um die Abnahme des Fettsäureesters quantifizieren zu können, wurde mit C₆OEt von 0 bis 16 mM kalibriert. Die Quantifizierung der GludiOEt-Abnahme erfolgte durch Kalibrierung mit GludiOEt von 1 bis 5 mM. Beide Kalibrationen wurden nur dann zur Berechnung herangezogen, wenn ihr Bestimmtheitsmaß $R^2 \geq 0,99$ betrug. Um im Kalibrationsbereich zu landen wurden die Proben jeweils 1:100 und 1:200 verdünnt.

3. Ergebnisse

Die chemoenzymatische Synthese von Acylpeptiden gliederte sich in zwei Abschnitte. Zunächst wurden in einer enzymatisch katalysierten Reaktion Oligopeptide mit einer Kettenlänge von ca. 1 kDa synthetisiert. In einem zweiten Schritt wurde versucht diese chemisch oder enzymatisch mit einer Fettsäure zu acylieren und so das Zielmolekül zu erhalten.

3.1. Enzymatische Synthese von Homooligopeptiden

Die bei kinetisch kontrollierten Synthesen stattfindende sekundäre Hydrolyse der Syntheseprodukte wird bei der Oligopeptidsynthese durch Verwendung hydrophober Aminosäureester und der daraus resultierenden Präzipitation der immer hydrophober werdenden Peptidkette verhindert.

Zur Etablierung der enzymatischen Oligopeptidsynthese wurden zuerst bereits beschriebene Oligomerisierungen durchgeführt. Begonnen wurde mit den Synthesen von Oligoglutamat- γ -ethylester (OligoGluOEt) nach Li *et al.* [66] sowie Oligomethionin (OligoMet) nach Anderson *et al.* [38]. Beide Synthesen wurden in 0,9 M KPP bei pH 7,8 durchgeführt und Ausbeuten zwischen 50 und 58 % (w/w) für OligoGluOEt und 67,9 % (w/w) für OligoMet erzielt. Für letztere wurden allerdings deutlich höhere Ausbeuten von bis zu 91 % (w/w) bei Verwendung von 1 M Natriumcitrat pH 5,5 als Reaktionspuffer erzielt (Tabelle 13).

Basierend auf den Ergebnissen für OligoGlu und OligoMet wurden unter nahezu identischen Bedingungen Oligopeptide aus den Ethylestern der Aminosäuren Leucin und Tyrosin mit Ausbeuten von 23,3 % und 28,3 % synthetisiert (Tabelle 13). Lediglich zur Synthese von Oligoleucin (OligoLeu) wurde ein leicht erhöhter pH-Wert von 8,5 verwendet, da in vorrausgegangen Arbeiten das Optimum für diese Synthese zwischen pH 8 und 9 lag [73].

Tabelle 13: Übersicht über die mittels Papain durchgeführten Oligopeptidsynthesen bei 40 °C.

Aminosäureester	Homooligopeptide			
	Glu	Met	Leu	Tyr
Puffer	Kaliumphosphat pH 7,8	Kaliumphosphat pH 7,8 (Natriumcitrat pH 5,5)	Kaliumphosphat pH 8,5	Kaliumphosphat pH 7,8
Reaktionszeit [min]	20	20	120	40
Ausbeute [%]	58	67,9 (91)	23,3	28,3

Zur Analyse der Oligopeptide und für die später entweder chemisch oder enzymatisch erfolgende Acylierung wurde zunächst nach einer Möglichkeit zur Solubilisierung der Präzipitate in wässrigen Medien gesucht. Mehrfach wird in der Literatur über die Möglichkeit einer alkalischen Hydrolyse der Seitenkette von OligoGluOEt mit 1 M NaOH berichtet, bei der die Peptidstruktur erhalten bleibt, die Estergruppen jedoch entfernt werden [74, 75]. Das dadurch erhaltene Polyanion ist wieder sehr gut löslich. Auch für das in dieser Arbeit hergestellte OligoGluOEt konnte über dieses Verfahren eine Löslichkeit im wässrigen Milieu erzielt werden. Die Oligopeptide OligoMet, OligoLeu und OligoTyr konnten über diese Methode nicht löslich gemacht werden, da diese keine ionisierbaren Seitenketten besitzen. Aufgrund der nahezu identischen Reaktionsbedingungen für die Synthesen der Homooligopeptide, könnte eine Cooligomerisierung der hydrophoben Aminosäureester mit Glutamatdiethylester (GludiOEt) zu löslichen Heterooligopeptiden führen. Für das Heterooligopeptid OligoGlu/Leu wurde dieses Vorgehen von Li *et al.* bereits beschrieben [73]. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Cooligomerisierungen werden in 3.2. vorgestellt.

Mit allen synthetisierten Oligopeptiden wurde beim Projektpartner (BASF Personal Care and Nutrition, ehemals Cognis GmbH) eine Gelpermeationschromatografie (GPC) durchgeführt, die allerdings bis auf OligoGlu keine Ergebnisse (Abbildung 15) lieferte, da die Oligopeptide nicht in Lösung gebracht werden konnten. Somit konnte für die übrigen Homooligopeptide nur eine quantitative Bestimmung der Reaktionsausbeuten erfolgen. Für OligoGlu konnte über die GPC auch eine erste qualitative Charakterisierung erfolgen. Die Massenverteilung des OligoGlu lag zwischen 2.151 und 2.626 g/mol, was umgerechnet auf die Masse eines Glutamatrestes (129,13 g/mol) einer Kettenlänge zwischen 17 und 20 Aminosäuren entsprach (siehe Abbildung 16 und Tabelle 14). Der erste Peak nach 12.03 min lag außerhalb des Kalibrationsbereiches.

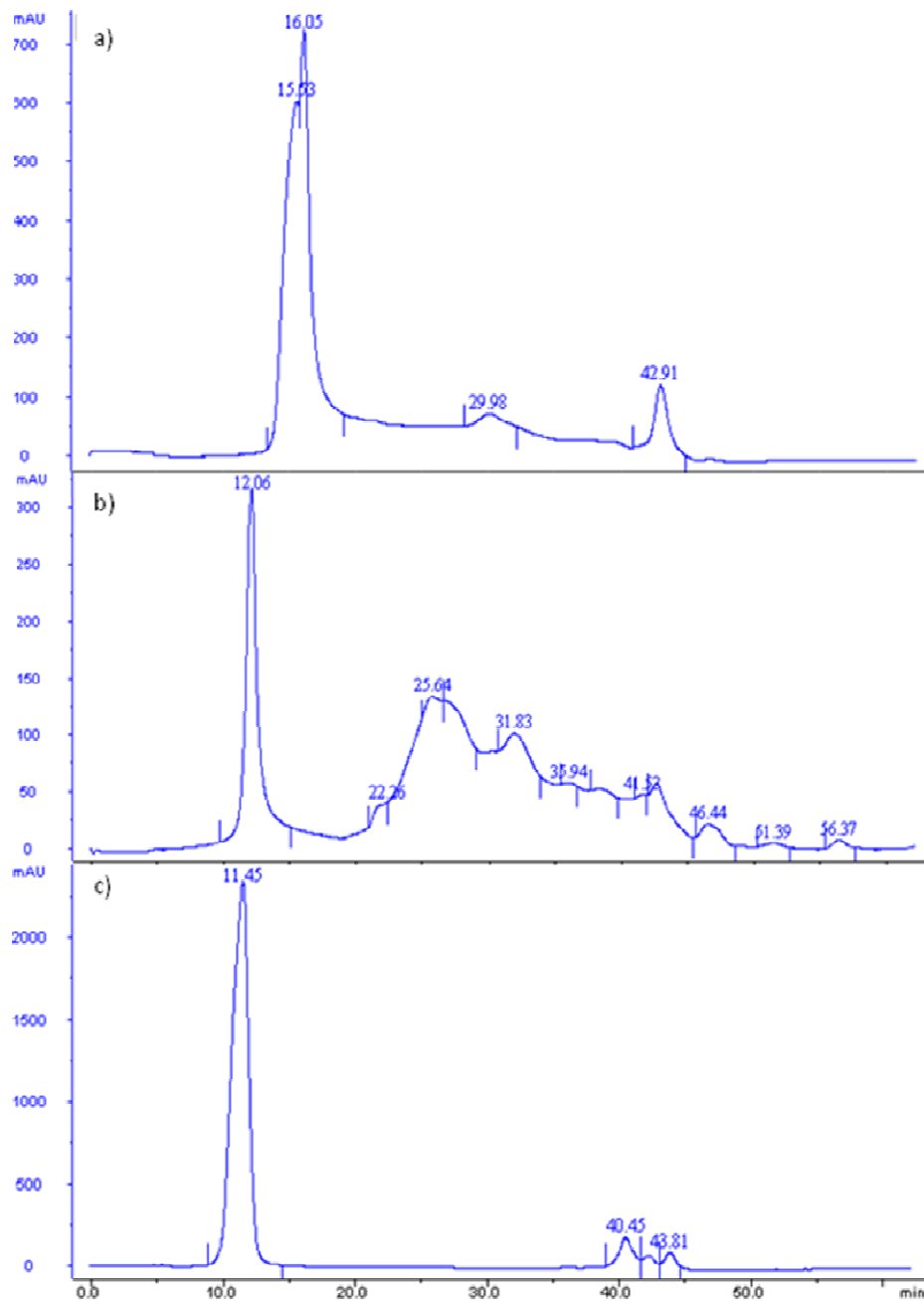


Abbildung 15: Chromatogramm der GPC-Analyse von a) OligoLeu, b) -Tyr und c) -Met nach alkalischer Hydrolyse (durchgeführt bei Cognis GmbH).

In allen drei Chromatogrammen tauchen frühe Peaks bei 16,05, 12,06 und 11,45 min auf, die alle außerhalb des Kalibrationsbereiches lagen. Auch die Peaks nach ca. 40 min repräsentieren keine Peptide. Oligotyrosin besitzt zwar Peaks zu Zeiten die innerhalb des Kalibrationsbereiches liegen, sich jedoch nicht distinkt von der Basislinie erheben.

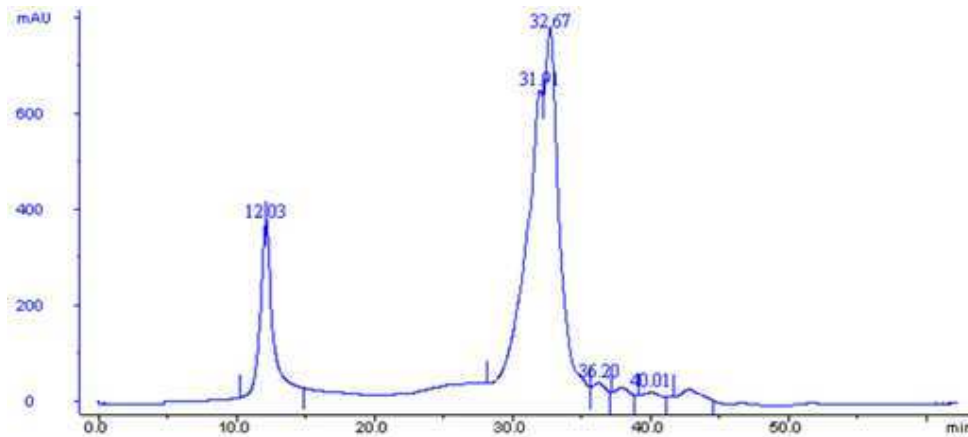


Abbildung 16: Chromatogramm der GPC-Analyse von Oligoglutamat (durchgeführt bei Cognis GmbH)

Nach alkalischer Hydrolyse zeigen sich für das lösliche Oligopeptid zwei Peaks bei 31,91 und 32,67 min, die laut Kalibration eine mittlere Masse von 2.151 und 2.626 Da besitzen, was umgerechnet auf die Masse eines Glutamatrestes, einer Kettenlänge von 17 bis 20 Aminosäuren entspricht. Der frühe Peak nach 12.03 min liegt außerhalb des Kalibrationsbereiches.

Tabelle 14: Retentionszeiten der GPC-Analyse für Oligoglutamat (durchgeführt bei Cognis GmbH).

Die blau eingefärbten Messergebnisse lagen außerhalb des Kalibrationsbereiches.

Peak	RT / min	M / g·mol ⁻¹
1	12,03	484.819
2	12,09	477.243
3	31,91	2.626
4	32,67	2.151
5	36,2	852
6	37,87	549
7	40,01	313
8	42,77	152

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte die Oligomerisierungsreaktion hin zu kürzeren Oligopeptiden mit einer Masse von ca. 1 kDa modifiziert werden. Als Ansatzpunkte möglicher Modifikationen kamen die Reaktionsparameter sowie die verwendeten Katalysatoren in Frage. Unter 3.1.1. werden die Ergebnisse von Ficin und Bromelain-katalysierten Oligomerisierungen von GludiOEt unter verschiedenen Reaktionsbedingungen gezeigt.

Um das synthetisierte Oligoglutamat genauer charakterisieren zu können, wurden mittels massenspektroskopischer MALDI-ToF Analysen die auftretenden Kettenlängen im Präzipitat bestimmt. Abbildung 17 zeigt das erhaltene Spektrogramm, anhand dessen sich Kettenlängen der synthetisierten Oligopeptide zwischen 5 und 10 Glutamatresten identifizieren ließen. Die

Unterschiede zwischen den Peaks unterschiedlicher Kettenlänge betrug entweder 129 oder 157 Da, je nachdem ob die Estergruppe am Glutamatrest abgespalten wurde oder nicht. Innerhalb einer Kettenlänge oder eines Polymerisierungsgrades (DP) tauchten mehrere Peaks auf, bei denen es sich entweder um Peptide mit $[M+H]^+$ oder ohne Estergruppe $[M+H]^+$ sowie um Natriumaddukte der Peptide $[MOEt+Na]^+$ handelte. Allerdings stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu den GPC-Analysen, die eine fast doppelt so hohe Molekülmasse angaben.

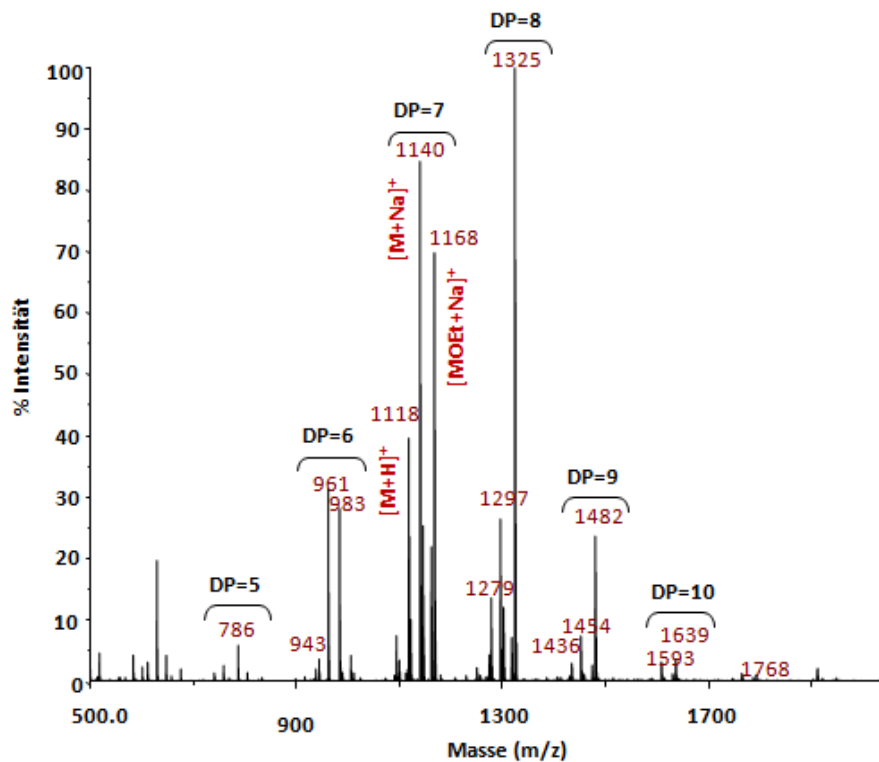


Abbildung 17: MALDI-ToF/MS-Analyse des präzipitierten OligoGluOEt nach alkalischer Hydrolyse.

Die erhaltenen Peptide weisen Polymerisierungsgrade (DP) von 5 bis 10 Glutamatresten auf. Jeder Polymerisierungsgrad kann wie im Falle von DP = 7 aus drei unterschiedlichen Peaks bestehen (Klammer), die einfach protonierte Moleküle ($[M+H]^+$), Natriumaddukte ($[M+Na]^+$) oder Na-Addukte mit endständiger Estergruppe ($[MOEt+Na]^+$) repräsentieren. Zwischen zwei Polymerisierungsgraden ist der Unterschied bei Peaks der gleichen Kategorie 157 Da, was genau der Masse eines Glutamatrestes mit Ethylestergruppe entspricht.

3.1.1. Bromelain und Ficin-katalysierte Synthesen von OligoGluOEt

3.1.1.1 Einfluss der Reaktionszeit

Ein Ziel dieser Arbeit war die Herstellung kurzkettiger Peptide mit einem Molekulargewicht von ca. 1 kDa. Da das Molekulargewicht der präzipitierten and alkalisch hydrolysierten Homooligopeptide von OligoGlu zwischen 2.151 und 2.626 g/mol lag und somit deutlich zu hoch war, wurde durch Änderung der Reaktionsparameter Zeit, Temperatur und Enzymmenge sowie durch Verwendung der Cysteinproteasen Bromelain und Ficin anstelle von Papain, versucht die Präzipitatzmenge zu verringern. Im Anschluss an die modifizierten Synthesen wurde die Masse des Präzipitats, die Konzentration an unverbrauchtem Substrat im Überstand durch einen photometrischen Assay nach OPA-N-Derivatisierung sowie die Größe der im Überstand befindlichen Peptide über GPC bestimmt. In allen Versuchen betrug die eingesetzte Substratkonzentration an GluDiOEt 500 mM. Als Ausgangs- bzw. Kontrollreaktion für die Modifikationen diente immer die Papain-katalysierte Reaktion bei pH 7,8, 40 °C und 30 min Reaktionszeit sowie 20 mg/ml Enzym. In den nun folgenden Bromelain bzw. Ficin-katalysierten Synthesen wurde ausgehend von diesen Parametern jeweils einer variiert, während die beiden anderen konstant gehalten wurden.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Enzyme untereinander wurde über einen BSA-Assay der Proteingehalt bestimmt, der in Tabelle 15 zu finden ist. Dabei waren die Enzympräparate von Papain und Bromelain mit 41 und 43,9 % annähernd gleich, während die Enzympräparation von Ficin nur ca. die Hälfte, nämlich 24,9 % Protein enthielt.

Tabelle 15: Bestimmung des Proteingehaltes der verwendeten Enzympräparationen über einen BSA-Assay.

Enzympräparat	Proteingehalt [%]
Bromelain	43,9
Ficin	24,9
Papain	41

Die erste Modifikation, die durchgeführt wurde, war die Änderung der Reaktionszeit. Basierend auf den Papain-katalysierten Reaktionen wurde die Reaktionszeit von 30 min schrittweise auf 5 min abgesenkt, während die Temperatur und die Enzymmenge in allen Versuchen (40 °C und je 20 mg/ml) identisch waren. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 16 gezeigt, während für die Ficin-katalysierte Reaktion Abbildung 18 und für die Bromelain-katalysierte Reaktion Abbildung

19 die Summe aus Präzipitatkonzentration und der Konzentration an unverbrauchtem GludiOEt grafisch darstellt. Der Fehlbetrag zur Ausgangskonzentration gibt an welche Konzentration des Monomers GludiOEt zu löslichem Peptid umgesetzt wurde.

Tabelle 16: Bromelain und Ficain-katalysierte Oligomerisierungen von GludiOEt bei unterschiedlichen Reaktionszeiten.

In allen Versuchen (n = 2) wurde eine Temperatur von 40 °C und eine Enzymkonzentration von 20 mg/ml verwendet; c(GludiOEt) = 500 mM.

Zeit [min]	Bromelain				Ficain			
	Präzipitat [%]	GludiOEt [%]	Lösl.Peptid [%]	GPC [Da]	Präzipitat [%]	GludiOEt [%]	Lösl.Peptid [%]	GPC [Da]
5	2,0	59,4	38,6	1162	78,0	9,1	12,8	927
10	2,7	50,8	46,4	1139	77,9	8,2	13,9	995
20	7,8	55,3	36,9	1171	75,3	7,7	16,9	1002
30	11,5	47,4	41,1	1129	75,7	11,3	13,0	1045

In den Ficain-katalysierten Synthesen (Abbildung 18) präzipitierten unabhängig von der Reaktionszeit zwischen 75 und 78 % des eingesetzten Substrates (GludiOEt). Nach Bestimmung der Konzentration an unverbrauchtem Substrat im Überstand, ergab sich aus der Summe der nachgewiesenen Stoffe eine Differenz zur eingesetzten Substratmenge, was auf das Vorhandensein löslicher Peptide schließen ließ. Die nachfolgenden GPC-Analysen der Überstände zeigten Peptide von zwischen 927 und 1.045 Da, was der Zielmolekülgröße entsprach. Allerdings lagen diese Peptide aufgrund der großen Präzipitatmenge nur in sehr geringen Konzentrationen zwischen 12,8 und 16,9 % vor, was eine weitere Modifikation der Reaktion notwendig machte.

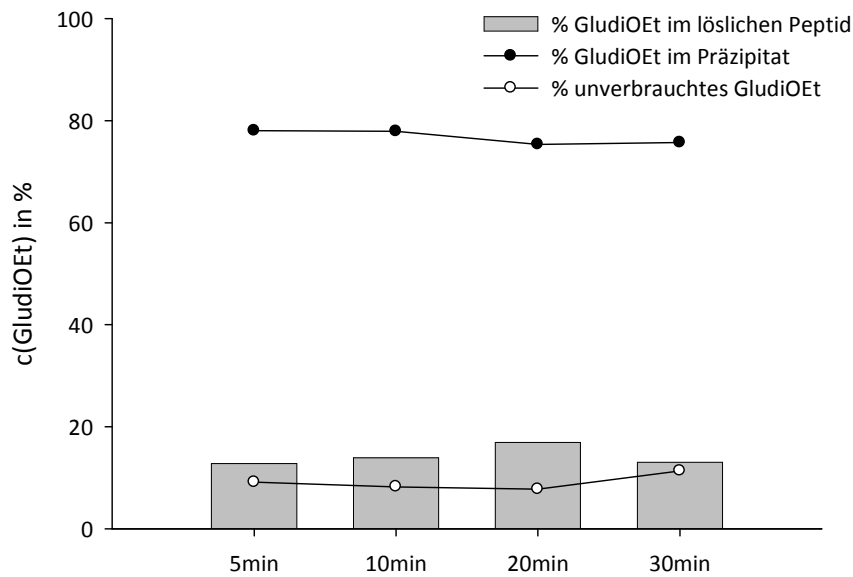


Abbildung 18: Prozentuale Verteilung der GludiOEt-Monomere auf unverbrauchtes Substrat, Präzipitat und lösliches Peptid in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei Ficain-katalysierten Synthesen.

Unabhängig von der untersuchten Reaktionszeit ergeben sich für die Präzipitattmenge (schwarze Punkte) konstant hohe Werte von ca. 80 %, woraus eine niedrige Menge an unverbrauchtem GludiOEt (weiße Punkte) von ca. 10 % resultiert. Durch die hohe Präzipitattmenge bleibt auch nur noch wenig Substrat zur Bildung löslicher Peptide (graue Balken) übrig, dessen Menge bei ca. 13 % liegt (Tabelle 16).

Für die Bromelain-katalysierten Synthesen (Abbildung 19) zeigte sich ein starker Einfluss der Reaktionszeit auf die Präzipitattbildung. Schon die Ausgangsreaktion bei 20 min zeigte für Bromelain im Vergleich zu den beiden bisher verwendeten Cysteinproteasen (Papain, Ficain) eine eher schwache Präzipitattbildung von 13,4 %. Mit Absenkung der Reaktionszeit bis auf 5 min wurde die Präzipitattmenge immer geringer und sank letztlich auf 2,3 %. Da die Reaktion mit Bromelain vergleichsweise langsamer verlief, war auch die Konzentration an unverbrauchtem GludiOEt sehr hoch (47,4 – 59,4 %). Nach Subtraktion der Präzipitattkonzentration und des unverbrauchten GludiOEt von der Ausgangskonzentration an GludiOEt ergaben sich Differenzen zwischen 36,9 und 46,4 %, die auf die Bildung löslicher Peptide schließen ließen. Auch hier bestätigten die GPC-Analysen der Überstände die Bildung kurzketziger Peptide mit einem Molekulargewicht von ca. 1.100 Da. Die höchste Konzentration an löslichem Peptid ergab sich für eine Reaktionszeit von 10 min.

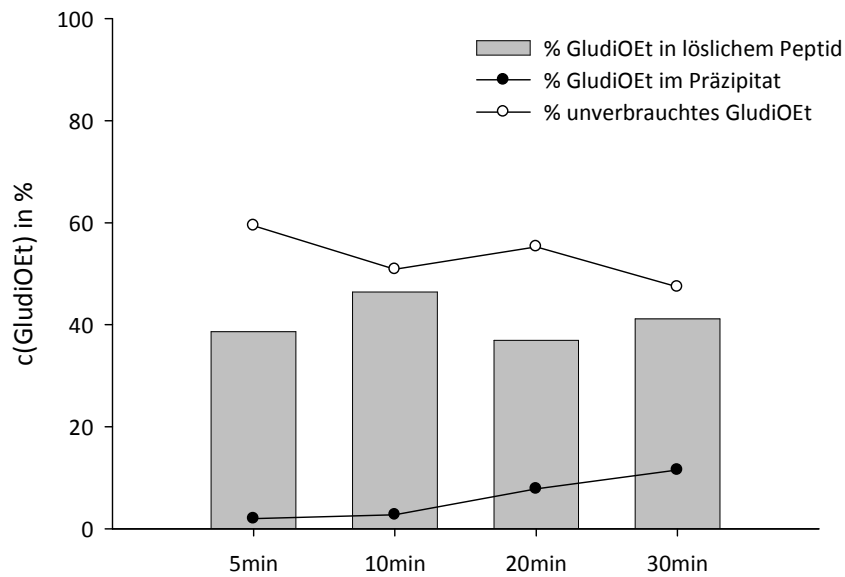


Abbildung 19: Prozentuale Verteilung der GludiOEt-Monomere auf unverbrauchtes Substrat, Präzipitat und lösliches Peptid in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei Bromelain-katalysierten Synthesen.

Mit ansteigender Reaktionszeit nimmt die Präzipitatzmenge (schwarze Punkte) kontinuierlich zu. Die Menge an unverbrauchtem Substrat (weiße Punkte) zeigt, mit Ausnahme des 20 min-Wertes, einen Abfall in zur Präzipitatzunahme vergleichbarem Maße (vgl. Tabelle 16). Die Peptide in Lösung (graue Balken) weisen keine klare Tendenz auf und schwanken im Bereich von 37 und 46 %.

3.1.1.2 Einfluss der Reaktionstemperatur

Als nächstes wurde der Temperatureinfluss untersucht. Für die Bromelain-katalysierten Synthesen wurde aufgrund der geringen Präzipitatzmengen eine konstante Reaktionszeit von 30 min gewählt. Die Enzymkonzentration betrug immer 20 mg/ml. Die Ergebnisse der Versuche befinden sich in Tabelle 17.

Tabelle 17: Bromelain und Ficain-katalysierte Oligomerisierungen von GludiOEt bei unterschiedlichen Temperaturen.

In den Versuchen (n = 4) mit Bromelain wurden eine Reaktionszeit von 30 min und eine Enzymkonzentration von 20 mg/ml verwendet. Aufgrund der starken Präzipitatbildung im Zeitversuch wurde für die Ficain-katalysierten Synthesen die Enzymkonzentration auf 5 mg/ml reduziert. Des Weiteren wurden als Reaktionszeiten 5 (*Werte kursiv*) bzw. 30 min verwendet. Eingeklammerte Werte lagen außerhalb des Kalibrationsbereiches.

Temperatur [°C]	Bromelain				Ficain			
	Präzipitat [%]	GludiOEt [%]	Lösl. Peptid [%]	GPC [Da]	Präzipitat [%]	GludiOEt [%]	Lösl. Peptid [%]	GPC [Da]
40	11,5	52,6	35,9	980	74,5	10,7	14,7	1412
					<i>74,8</i>	<i>10,7</i>	<i>14,4</i>	<i>1416</i>
30	7,0	59,3	33,7	1116	77,4	9,1	13,5	1379
					<i>73,3</i>	<i>16,3</i>	<i>10,4</i>	<i>1414</i>
20	3,3	65,4	31,3	1219	72,7	12,9	14,5	1314
					<i>66,9</i>	<i>22,7</i>	<i>10,4</i>	<i>1412</i>
10	2,8	66,6	30,6	1326	68,1	19,6	12,3	1236
					<i>73,0</i>	<i>19,5</i>	<i>7,5</i>	<i>1416</i>
4	2,4	54,1	43,5	1400	67,6	16,6	15,8	(2301)
					<i>71,0</i>	<i>17,2</i>	<i>11,8</i>	<i>1190</i>

In den Untersuchungen des Temperatureinflusses auf die Bromelain-katalysierten Synthesen (Abbildung 20) wurde als Ausgangsreaktion und zur Kontrolle eine Synthese bei 40 °C durchgeführt. Die Präzipitatausbeute war mit 11,5 % vergleichbar mit der Startreaktion in den Zeitversuchen. Mit dem Absinken der Reaktionstemperatur ging auch eine konstante Verringerung der Präzipitatemenge auf letztlich 2,4 % bei 4 °C einher. Die Konzentration an unverbrauchtem GludiOEt lag zwischen 52,6 und 66,6 %. Bildet man die Differenz der beiden nachgewiesenen Reaktionen von der Ausgangskonzentration (500 mM = 100%) erhält man die Konzentration an löslichem Peptid, die zwischen 30,6 und 43,5 % lag. Allerdings konnte keine Relation zwischen Reaktionstemperatur und Konzentration an löslichem Peptid hergestellt werden. Anders verhielt es sich bei der Molekülgröße. Hier war eine konstante Zunahme von 980 bis 1.400 Da bei sinkender Reaktionstemperatur zu beobachten. Ein eindeutiger Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Quantität der löslichen Peptide konnte nicht festgestellt, jedoch ein qualitativer Unterschied hinsichtlich der Molekülgröße beobachtet werden.

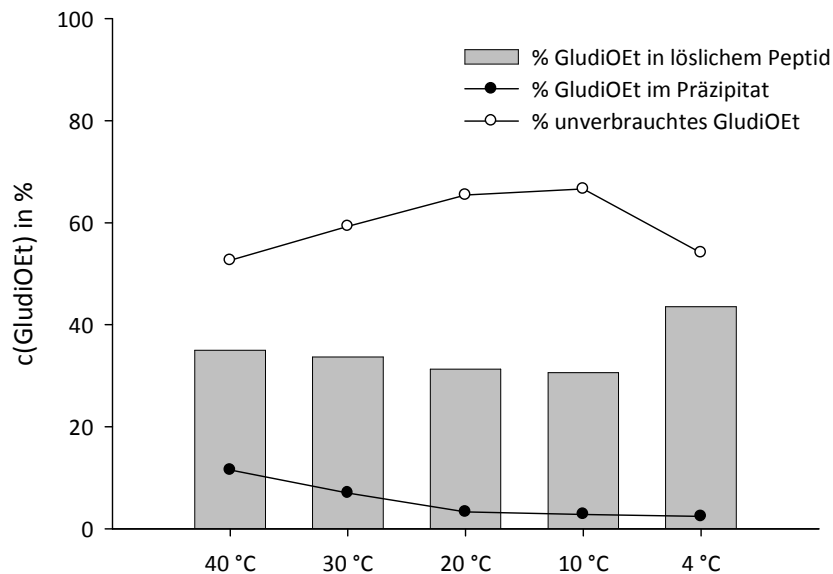


Abbildung 20: Prozentuale Verteilung der GludiOEt-Monomere auf unverbrauchtes Substrat, Präzipitat und lösliches Peptid in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur bei Bromelain-katalysierten Synthesen.

Mit fallender Reaktionstemperatur sinkt auch die Menge des Präzipitats (schwarze Punkte) bis auf ca. 3%. Parallel dazu steigt die Menge an unreaktiertem Substrat (weiße Punkte) an, während die Menge an gelöstem Peptid (graue Balken) mit fallender Temperatur ebenfalls leicht abnimmt. Bei 4 °C ist allerdings ein sprunghafter Anstieg der Menge an gelöstem Peptid bei gleichzeitiger Abnahme des unreaktierten Substrats zu beobachten. Die Präzipitatsmenge bleibt dagegen auf einem Wert unter 3% (Tabelle 17).

Bei den Ficin-katalysierten Synthesen (Abbildung 21) von OligoGluOEt wurden die Reaktionen aufgrund der hohen Umsatzrate jeweils für eine Reaktionsdauer von 5 min (kursive Werte, Tabelle 17) und 30 min durchgeführt. Außerdem wurde bereits in diesem Versuchsteil die Enzymkonzentration auf 5 mg/ml gesenkt. Wie man in Abbildung 21 sehen kann, brachten diese Änderungen keine nennenswerten Unterschiede (30 min hellgrau, 5 min dunkelgrau). Alle Reaktionen brachten Präzipitatausbeuten zwischen 66,9 und 77,4 %, so dass die Konzentrationen an löslichem Peptid lediglich zwischen 7,5 und 15,8 % lagen.

Im Gegensatz zur Bromelain-katalysierten Synthese konnten hier keine temperaturabhängigen Größenänderungen der löslichen Peptide festgestellt werden, die alle im Bereich zwischen 1200 und 1400 Da und somit bei Kettenlängen von 9 bis 11 Glutamatresten lagen.

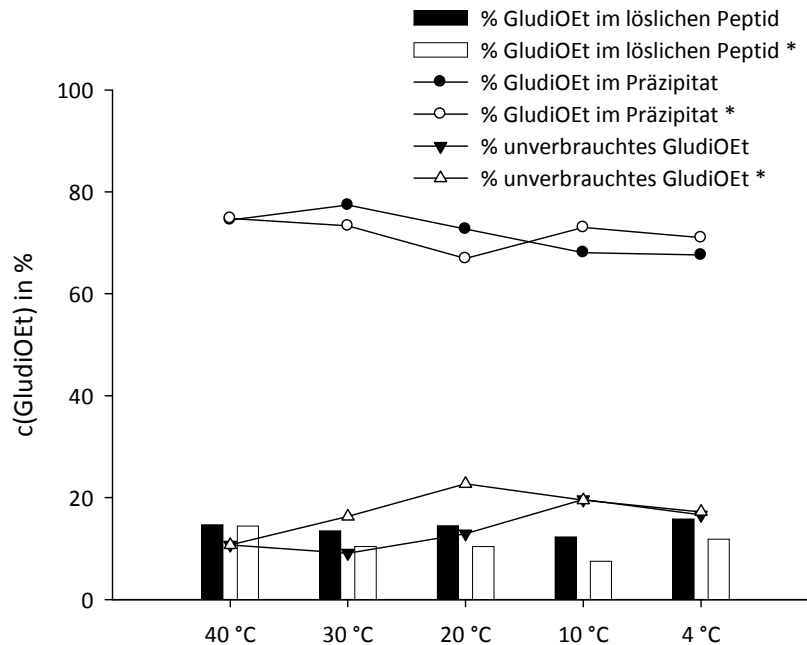


Abbildung 21: Prozentuale Verteilung der GludiOEt-Monomere auf unverbrauchtes Substrat, Präzipitat und lösliches Peptid in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur bei Ficain-katalysierten Synthesen.

Der Temperaturversuch wurde mit zwei unterschiedlichen Reaktionszeiten, für 5 (*, weiße Symbole) und 30 min (schwarze Symbole) durchgeführt. Sowohl die Kurven für die Präzipitate (Punkte) als auch die Menge des unverbrauchten Substrates (Dreiecke) unterscheiden sich trotz der unterschiedlichen Reaktionszeit kaum und bleiben unabhängig von der Reaktionstemperatur weitestgehend konstant. Auch die Menge an gelöstem Peptid bleibt für die Reaktionszeit von 30 min (schwarze Balken) bei allen untersuchten Temperaturen nahezu identisch. Bei der Reaktionszeit von 5 min ist mit sinkender Temperatur auch ein leichter Abfall der Menge an gelöstem Peptid (weiße Balken) zu erkennen, der allerdings bei 4 °C sprunghaft wieder ansteigt.

3.1.1.3 Einfluss der Enzymmenge

Ein weiterer Parameter der neben der Reaktionszeit und –temperatur untersucht wurde, war die eingesetzte Enzymmenge. Hierbei wurde für jedes Enzym individuell verfahren, da sich in den beiden Versuchsreihen zuvor starke Unterschiede zeigten. Ausgehend von 20 mg/ml wurde für die Bromelain-katalysierten Synthesen die Enzymkonzentration bis auf 50 mg/ml erhöht, während sie für die Ficain-katalysierten Synthesen von 20 mg/ml schrittweise auf bis zu 2 mg/ml abgesenkt wurde. Die Resultate sind in Tabelle 18 aufgeführt. Eine grafische Darstellung der Summe aus Präzipitat- und verbleibender Substratkonzentration ist in Abbildung 23 gezeigt.

Tabelle 18: Bromelain und Ficain-katalysierte Oligomerisierungen von GludiOEt bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen.

In den Versuchen mit Bromelain wurde eine Reaktionszeit von 30 min sowie eine Temperatur von 30 °C verwendet. Aufgrund der starken Präzipitatbildung im Zeit- und Temperaturversuch wurde für die Ficain-katalysierten Synthesen die Temperatur auf 4°C und Reaktionszeit auf 5 min reduziert, (n=2).

Enzym [mg/ml]	Bromelain				Ficain			
	Präzipitat [%]	Substrat [%]	Lösl.Peptid [%]	GPC [Da]	Präzipitat [%]	Substrat [%]	Lösl.Peptid [%]	GPC [Da]
2	-	-	-	-	2,5	59,8	37,7	1173
5	-	-	-	-	9,8	43,4	46,8	1143
10	-	-	-	-	46,6	15,6	37,8	1160
20	6,1	52,9	41,0	1125	70,4	-0,6	30,2	1161
30	16,2	37,4	46,4	1168	-	-	-	-
50	43,7	24,6	31,7	1123	-	-	-	-

Die Erhöhung der Enzymkonzentration in den Bromelain-katalysierten Synthesen (Abbildung 22) führte zu einem Anstieg der Präzipitatzmenge von 6,1 % bei 20 mg/ml auf 43,7 % bei 50 mg/ml, während gleichzeitig die Menge an unverbrauchtem Substrat von 52,9 % auf 24,6 % abfiel. Bei einer Katalysatorkonzentration von 30 mg/ml erhöhte sich die Präzipitatzmenge von 6,1 auf 16,2 %. Gleichzeitig kam es aber zu einer wesentlich stärkeren Abnahme an unverbrauchtem Substrat von 52,9 % auf 37,4 % und zu einem Anstieg der Konzentration löslicher Oligopeptide. Für die Präzipitatzmenge und für das unverbrauchte Substrat setzte sich dieser Trend bei einer weiteren Erhöhung der Enzymkonzentration auf 50 mg/ml fort, die Menge an löslichem Peptid sank jedoch auf 31,7 % und damit sogar unter den Ausgangswert bei 20 mg/ml (41 %).

Die GPC-Analysen zeigten unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration eine Molekülgröße von ca. 1120 Da, was umgerechnet auf einen Glutamatrest (129 Da) einer Kettenlänge von ca. 8 Aminosäuren entsprach.

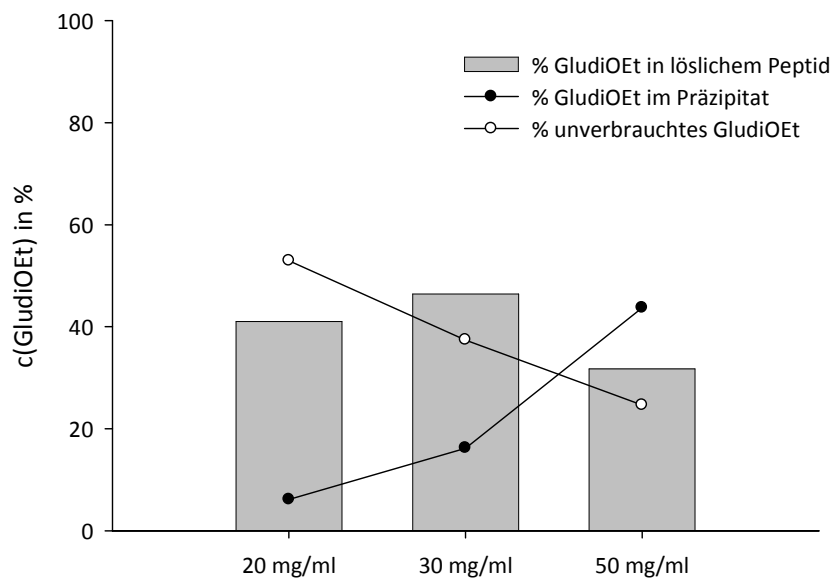


Abbildung 22: Prozentuale Verteilung der GludiOEt-Monomere auf unverbrauchtes Substrat, Präzipitat und lösliches Peptid in Abhängigkeit der eingesetzten Bromelainkonzentration.

Mit Erhöhung der Enzymkonzentration zeigen die Kurven von Präzipitatzmenge (schwarze Punkte) und unverbrauchtem Substrat (weiße Punkte) einen gegensätzlichen Verlauf. Erstere steigt kontinuierlich an während letztere bis auf ca. 25 % absinkt. Die Menge an löslichen Peptiden (graue Balken) zeigt zunächst einen leichten Anstieg, fällt dann aber wieder ab und bewegt sich letztlich zwischen 31,7 % und 46,4 % (Tabelle 18).

Da die Synthesen mit Ficin bislang immer zu hohen Ausbeuten an präzipitierten Oligopeptiden führte, wurde die eingesetzte Enzymkonzentration ausgehend von 20 mg/ml auf bis zu 2 mg/ml abgesenkt und die Versuche außerdem bei einer Reaktionstemperatur von 4 °C durchgeführt (Abbildung 23). Einhergehend mit der fallenden Enzymkonzentration nahm die Menge des Präzipitats von 70,4 auf 2,5 % immer weiter ab und gleichzeitig die an unverbrauchtem GludiOEt von -0,6 auf 59,8 % zu, während die Konzentration an löslichem Peptid unabhängig von der Enzymkonzentration zwischen 30,2 und 46,8 % lag und diesbezüglich keine Temperaturabhängigkeit festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zu den Vorversuchen, in denen auch bei 4 °C und einer Enzymkonzentration von 5 mg/ml die Präzipitatzmenge bei über 60 % lag, zeigte sich hier eine eindeutige Abnahme an ausgefallenem Oligopeptid. Ebenso waren die Konzentrationen an löslichem Peptid von bis zu 46,8 % wesentlich höher als in den beiden übrigen Versuchen (max. 16,9 %).

Die Gelpermeationschromatografie ergab unabhängig von der eingesetzten Enzymmenge Peptidgrößen für lösliche Peptide von ca. 1140 Da.

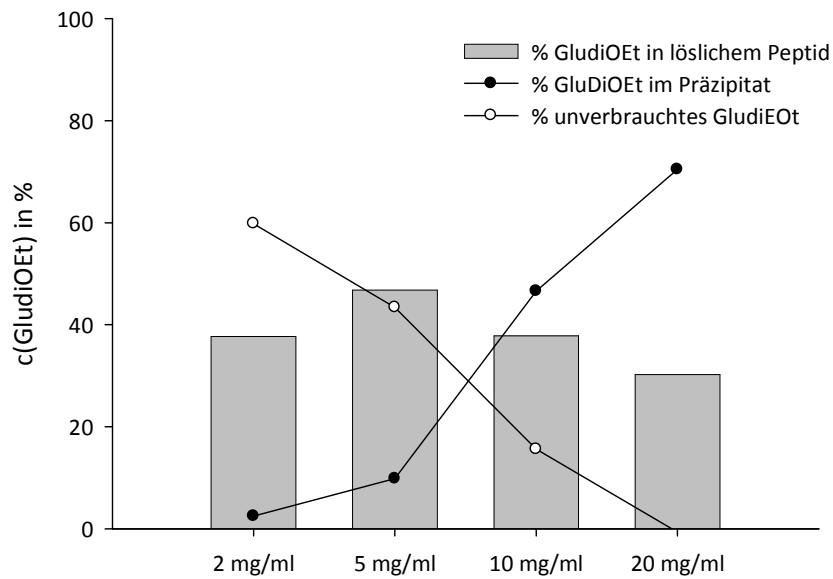


Abbildung 23: Prozentuale Verteilung der GluDiOEt-Monomere auf unverbrauchtes Substrat, Präzipitat und lösliches Peptid in Abhängigkeit der eingesetzten Ficainkonzentration.

Mit Erhöhung der Enzymkonzentration zeigen die Kurven von Präzipitatzmenge (schwarze Punkte) und unverbrauchtem Substrat (weiße Punkte) einen gegensätzlichen Verlauf. Erstere steigt kontinuierlich an während letztere bis auf 0 % absinkt. Die Menge an löslichen Peptiden (graue Balken) zeigt dagegen keine klare Tendenz. Sie steigt zunächst an, fällt dann aber wieder ab und bewegt sich zwischen 30,2 % und 46,8 % (Tabelle 18).

3.2. Enzymatische Synthese von Heterooligopeptiden

3.2.1. Synthese anionischer Heterooligopeptide

Wie bereits unter 3.1. erwähnt, wurden Cooligomerisierungen der hydrophoben Aminosäureester von Leu und Met mit Glutamatdiethylester (GludiOEt) durchgeführt, da das resultierende Oligopeptid durch alkalische Hydrolyse wieder in Lösung gebracht werden kann. In Tabelle 19 sind die Versuchsparameter und die Ausbeuten aufgeführt. Da die Reaktionsparameter in den Homooligomerisierungen von GludiOEt und MetOEt identisch waren (Kaliumphosphatpuffer pH 7,8) und in beiden Fällen Ausbeuten von ca. 60 % (w/w) erreicht wurden, wurden diese auch zur Synthese des Heterooligopeptids OligoGluOEt/Met verwendet. Die Ausbeute an Präzipitat betrug 62 % (w/w). In Citratpuffer stieg die Ausbeute sogar auf beinahe 70 % (69,9 % (w/w)) an.

Die Heterooligomerisierung von GludiOEt und LeuOEt wurde bei einem pH-Wert von 8,5 durchgeführt und ergab, trotz der 6-fachen Reaktionszeit im Vergleich zu OligoGluOEt/Met nur eine Ausbeute von 14,2 % (w/w). Die Homooligomerisierung von LeuOEt bzw. GludiOEt wurde bei pH 7,8 bzw. pH 8,5 durchgeführt und erzielten Ausbeuten von 23,3 % und 58 % (w/w) (siehe Tabelle 13).

Tabelle 19: Papain-katalysierte Heterooligomerisierungen von GludiOEt mit LeuOEt und MetOEt bei 40 °C.

Aminosäureester	Heterooligopeptide	
	Glu/Leu	Glu/Met
Puffer	Kaliumphosphat pH 8,5	Kaliumphosphat pH 7,8 (Natriumcitrat pH 5,5)
Reaktionszeit [min]	120	20
Ausbeute [%]	14,2	62 (69,9)

Das gewonnene Pellet beider Heterooligomerisierungen konnte durch alkalische Hydrolyse wieder in Lösung gebracht werden und somit eine qualitative Analyse bzgl. der Kettenlänge erfolgen. Abbildung 24 und Abbildung 26 sowie Tabelle 20 und Tabelle 21 zeigen die Ergebnisse der durchgeführten GPC-Analysen nach alkalischer Hydrolyse.

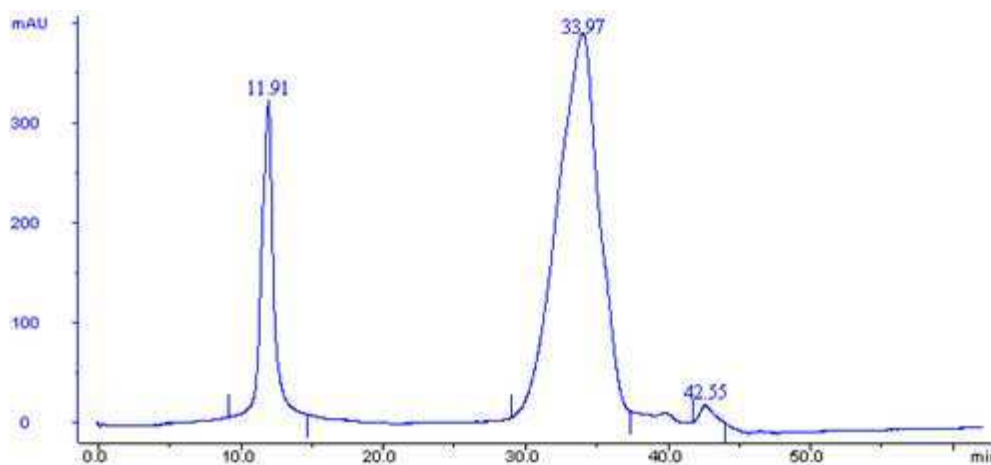


Abbildung 24: GPC-Analyse des Heterooligopeptids OligoGlu/Leu.

Der frühe Peak nach 11,91 min liegt deutlich außerhalb des Kalibrationsbereiches. Ein weiterer deutlicher Peak wird bei 33,97 min sichtbar und entspricht einem mittleren Molekulargewicht von 1.529 Da.

Tabelle 20: Retentionszeiten der GPC-Analyse für OligoGlu/Leu (durchgeführt bei Cognis GmbH).

Die blau eingefärbten Messergebnisse lagen außerhalb des Kalibrationsbereiches.

Peak	RT / min	M / g·mol ⁻¹
1	11,91	500.334
2	33,97	1.529
3	42,55	161

Für OligoGlu/Leu (Tabelle 20) ergab sich ein Molekulargewicht mit der mittleren Masse von 1.529 g/mol. Die mittlere Masse beider Aminosäurenreste (Glu: 129 Da, Leu: 113 Da) liegt bei 121 Da/Aminosäurerest, vorausgesetzt beide Aminosäuren wurden in gleichem Maße eingebaut, was zu einer durchschnittlichen Kettenlänge von ca. 13 Aminosäuren führen würde. Da der Peak allerdings ein sehr starkes Fronting sowie Tailing (Abbildung 24) besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass auch deutlich kürzere bzw. längere Peptidketten im Pellet vorhanden sind. Die Abnahme des Molekulargewichtes im Vergleich zur Homooligomerisierung von GludiOEt zusammen mit der Löslichkeit des Präzipitates nach alkalischer Hydrolyse waren deutliche Hinweise auf eine erfolgreiche Heterooligomerisierung von GludiOEt und LeuOEt.

Zur Bestätigung wurde nach alkalischer Hydrolyse eine massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-ToF durchgeführt. Wie Abbildung 25 zeigt, ergaben sich für die hydrolysierten Präzipitate Kettenlängen zwischen 6 und 10 Aminosäuren, ausgehend davon, dass beide Substrate gleichmäßig eingebaut wurden. Die am häufigsten auftretende Peptidkette enthielt 7 Aminosäuren, was einem

Molekulargewicht von ca. 850 Da entspricht und somit stark von den GPC-Resultaten abweicht. Bereits die Polymerisierungsgrade 9 und 10 fallen in ihrer Signalintensität stark ab. Der Unterschied der Peptide zwischen zwei Polymerisierungsgraden (DP) betrug abhängig davon, ob Leucin oder Glutamat eingebaut wurde entweder 113 Da oder 129 Da (siehe Abbildung 25). Innerhalb eines Polymerisierungsgrades unterscheiden sich die Peaks jeweils um eine Masse $m/z = 16$, was genau dem Unterschied zwischen einem Leucin- und einem Glutamatrest entspricht. So bestand z. B. der Peak mit der Masse $m/z = 1.025$ bei der Kettenlänge DP = 8 aus zwei Glutamatresten mehr als der Peak bei $m/z = 993$ bei gleicher Kettenlänge.

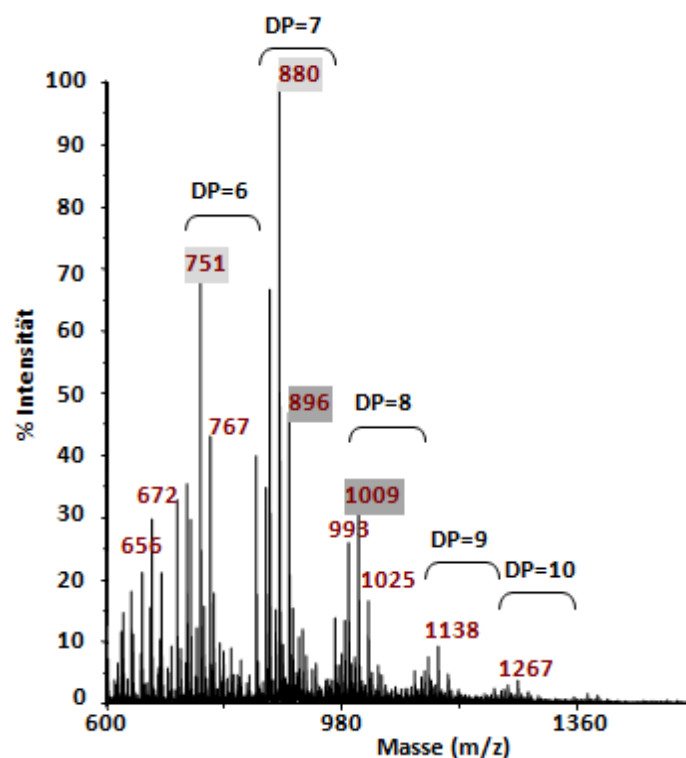


Abbildung 25: MALDI-ToF/MS-Analyse von OligoGlu/Leu.

Die Kettenlänge der Präzipitate war aufgrund des hydrophoben Anteils von LeuOEt deutlich verkürzt im Vergleich zur Homooligomerisierung von GluIOEt. Die Massendifferenzen zwischen Peaks zweier Kettenlängen betragen entweder 129 Da wenn Glutamat und 113 Da wenn Methionin in die Kette eingebaut wurde.

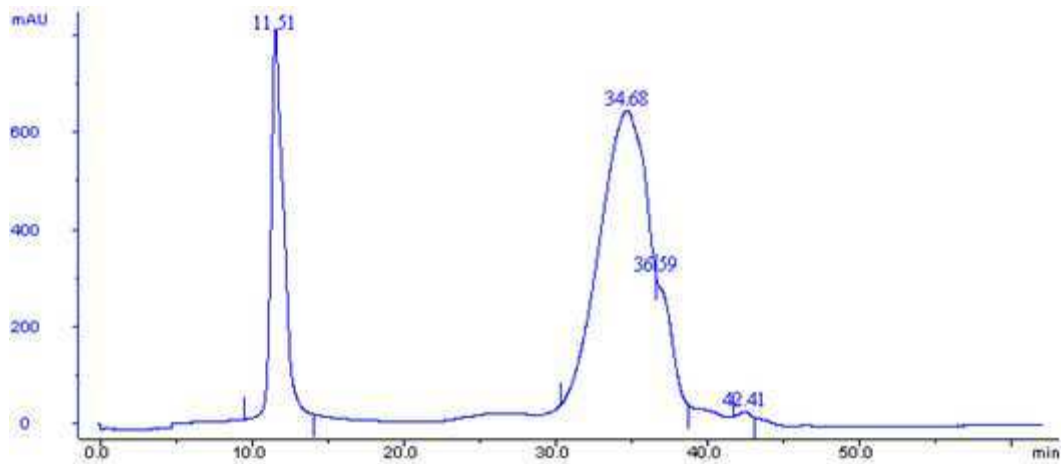


Abbildung 26: GPC –Analyse des Heterooligopeptids OligoGlu/Met (durchgeführt bei Cognis GmbH).

Der frühe Peak nach 11,51 min liegt deutlich außerhalb des Kalibrationsbereiches. Ein weiterer deutlicher Peak wird bei 34,68 min sichtbar und entspricht einem mittleren Molekulargewicht von 1.269 Da. Die Schulter nach 36,59 min zeigt an, dass auch deutlich kürzere Peptide von ca. 769 Da entstanden sind.

Tabelle 21: Retentionszeiten der GPC-Analyse für OligoGlu/Met (durchgeführt bei Cognis GmbH).

Die blau eingefärbten Zeiten lagen außerhalb des Kalibrationsbereiches.

Peak	RT / min	M / g·mol ⁻¹
1	11,51	555.725
2	34,68	1.269
3	36,59	769
4	42,41	167

Die GPC-Analyse des Heterooligopeptids OligoGlu/Met ergab zwei deutlich Peaks, von denen der erste nach 11,51 min erschien und weit außerhalb des Kalibrationsbereiches lag. Die Spitze des zweiten Peaks nach 34,68 min entsprach einer molaren Masse von 1.269 g/mol, was bei einer mittleren Masse der Aminosäurereste (Glu: 129 Da, Met: 131 Da) einer Kettenlänge von ca. 10 Aminosäuren entspricht. Wie schon bei OligoGlu/Leu war auch hier ein starkes Fronting zu beobachten. Ebenfalls trat ein starkes Tailing mit einer Schulter nach 36,59 min auf, die einem Molekulargewicht von 769 g/mol und somit einer Kettenlänge von 6 Aminosäuren entspricht.

Auffällig waren die deutlich geringeren Molekulargewichte beider Heterooligopeptide von 1.529 g/mol für OligoGlu/Leu und 1.269 g/mol für OligoGlu/Met, im Vergleich zur Homooligomerisierung von GludiOEt mit Molekulargewichten zwischen 2.151 und 2.626 g/mol.

Sowohl die Löslichkeit der Präzipitate, als auch die verkürzten Kettenlängen waren deutliche Nachweise für erfolgreiche Cooligomerisierungen der hydrophoben Aminosäureester LeuOEt und MetOEt mit GludiOEt. Im Gegensatz zu den Produkten der Homooligomerisierungen von LeuOEt und MetOEt waren die Heterooligopeptide nach alkalischer Hydrolyse löslich. Die erhöhte Löslichkeit zusammen mit den GPC-Daten gab Hinweise auf die Entstehung eines Heterooligopeptides. Zur Untermauerung der Ergebnisse wurde das Lyophilisat von OligoGluOEt/Met alkalisch hydrolysiert und eine MALDI-ToF/MS Analyse durchgeführt, die in Abbildung 27 gezeigt ist.

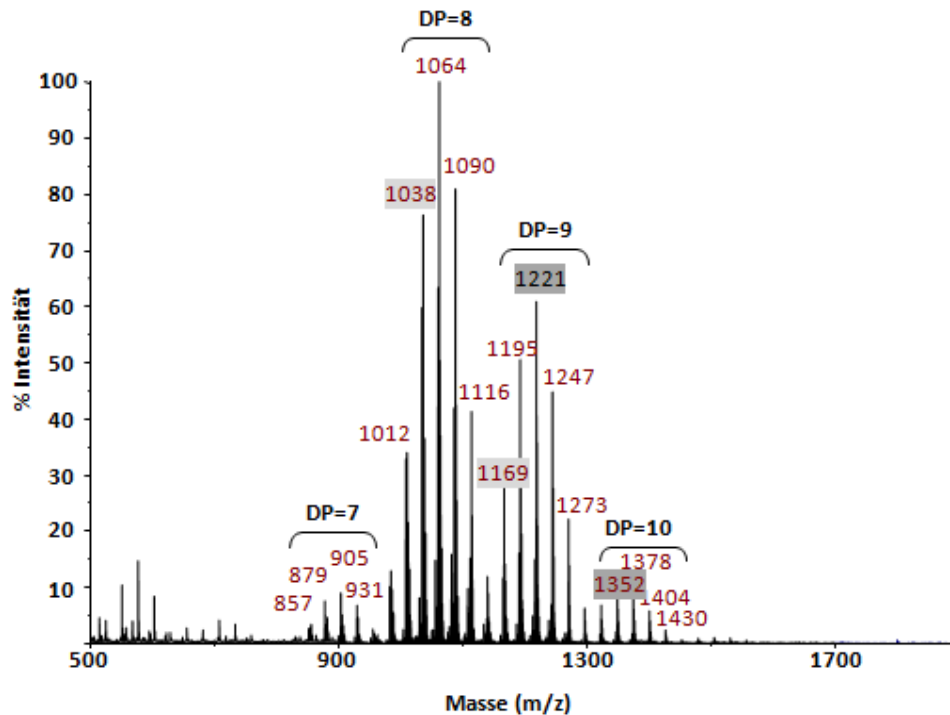


Abbildung 27: MALDI-ToF/MS-Analyse von OligoGlu/Met.

Die Kettenlänge der Präzipitate war aufgrund des hydrophoben Anteils von MetOEt deutlich verkürzt im Vergleich zur Homooligomerisierung von GludiOEt. Die Massendifferenzen zwischen Peaks zweier Kettenlängen betragen entweder **129 Da** wenn Glutamat und **131 Da** wenn Methionin in die Kette eingebaut wurde.

In Abbildung 27 ist deutlich zu erkennen, dass eine Größenverteilung der Peptide zwischen 7 und 10 Aminosäuren vorlag. Bei den auseinander resultierenden Peptidketten betrug der Unterschied zum nächst höheren Polymerisationsgrad (DP) abhängig davon ob Methionin oder Glutamat eingebaut wurde entweder 131 Da oder 157 Da (siehe Abbildung 27). Innerhalb eines Polymerisationsgrades unterscheiden sich die Peaks jeweils um eine Masse $m/z = 26$, was genau dem Unterschied zwischen einem Methionin- und einem Glutamatrest entspricht, wenn letzterer eine Seitenkette mit Ethylester (siehe Abbildung 11) trägt. So bestand z. B. der Peak mit der Masse $m/z = 1.012$ bei der Kettenlänge 8 aus vier Methioninresten mehr als der Peak bei $m/z = 1.116$ bei gleicher Kettenlänge. Peptide mit einem $DP < 7$ waren nicht zu finden. Die Heterooligomerisierungen von GludiOEt und MetOEt

zeigten, dass neben den in 3.1.1. durchgeführten Modifikationen der Homooligomerisierung von GludiOEt, auch die Kombination mit hydrophoben Aminosäuren zu einer Verringerung des Molekulargewichtes zwischen 900 und 1.400 Da führen kann. Im Falle der Heterooligomerisierungen erhält man allerdings ein Präzipitat und muss nicht erst noch das Enzym inaktivieren.

3.2.2. Synthese kationischer Oligopeptide

Bei Verwendung von GludiOEt als hydrophilen Teil der Peptidkette gelangt man zu anionischen Oligopeptiden. Mit der Synthese kationischer Heterooligopeptide sollte eine neue Produktklasse geschaffen werden.

Die Schwierigkeit bei der Synthese kationischer Oligopeptide liegt in der guten Wasserlöslichkeit der entstehenden Peptidkette aufgrund der positiv geladenen Seitenketten im pH-Bereich von 2 bis 10. Anders als bei den hydrophoben Aminosäuren findet hier keine Präzipitation statt, was gleichzeitig bedeutet, dass das Produkt weiterhin für das Enzym zur Verfügung steht und eine sekundäre Hydrolyse ablaufen kann.

Qin *et al.* gelang es über eine Größenausschlussmembran die Enzyme abzutrennen und erhielt stabile Oligopeptide zwischen 3 und 10 Lysinresten [76]. Gemäß diesem Ansatz sollte auch in dieser Arbeit die Synthese kationischer Peptide etabliert werden. Allerdings scheiterte die Etablierung einer RP-HPLC-Analytik als auch der Nachweis über GPC und eine photometrische Konzentrationsbestimmung. Wie in Tabelle 22 zu erkennen ist, war für zwei der drei verwendeten Katalysatoren keine Abnahme der Substratkonzentration nach der Reaktion im Vergleich zum Reaktionsbeginn erfolgt. Lediglich bei Bromelain war eine leichte Konzentrationsabnahme nach Reaktionsende zu beobachten.

Tabelle 22: Photometrische Bestimmung der Konzentration an Lysin oder Lysinethylester.

Die Ausgangskonzentration an Lysinethylester betrug jeweils 500 mM.

c in mM		
Enzym	Vor Reaktionsbeginn	Nach Reaktionsende
Bromelain	482,9	433,7
Ficain	379,2	478,4
Papain	466,1	493,3

Da eine Homooligomerisierung kationischer Oligopeptide nicht möglich war, wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit einer Cooligomerisierung von LysOEt mit dem stark hydrophoben Aminosäureester MetOEt untersucht. Dabei war es Ziel ein Präzipitat des Heterooligopeptids zu erhalten, das bei saurem pH aufgrund seiner dann protonierten Seitenketten wieder löslich sein sollte. Als Katalysatoren dienten wie schon bei anderen Oligomerisierungen dieser Arbeit die Cysteinproteasen Papain und Ficain. Zwar wird in der Arbeit von Qin *et al.* Bromelain als geeignetster Katalysator für die Synthese lysinhaltiger Peptide beschrieben [76], jedoch zeigte das von uns verwendete Bromelain nur eine sehr geringe Aktivität in den Homooligomerisierungen von OligoGluOEt (3.1.) und wurde deshalb nicht verwendet.

Beide Enzyme wurden im Vorfeld der Oligomerisierungen auf ihre Hydrolyseaktivität gegenüber Lysin-*p*-nitroanilin getestet. Abbildung 28 zeigt, dass Papain erst bei einer 2,5-fach höheren Einwaage im Vergleich zu Ficain eine vergleichbare Hydrolyseaktivität besaß.

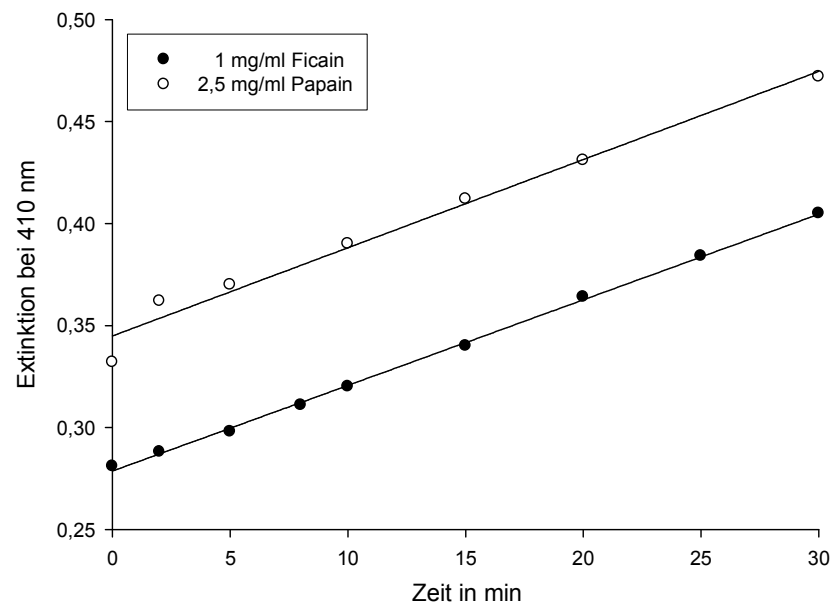


Abbildung 28: Hydrolyse von 5 mM Lys-*p*-NA mit Ficain und Papain.

Bei der Hydrolyse des Substrates Lys-*p*-NA entsteht *p*-Nitroanilin, das bei einer Wellenlänge von 405 nm absorbiert. Die Regressionsgeraden beider Enzyme verlaufen zwar parallel, was für eine identische Hydrolyserate des Substrates über die Zeit spricht, allerdings wurde von Papain eine 2,5-fach höhere Einwaage verwendet.

Tabelle 23: Ausbeuten der Heterooligomerisierungen von LysOEt und MetOEt mit Papain und Ficain.

	Ausbeute in % (w/w)	
	m(Papain) = 2,5*m(Ficain)	m(Papain) = m(Ficain)
Ficain	26,6	16,9
Papain	32,1	25,4

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in den Heterooligomerisierungen die 2,5 fachen Mengen an Papain gegenüber Ficain eingesetzt. In beiden Oligomerisierungen kam es zu Präzipitatbildungen von 26,6 % (w/w) für Ficain und 32,1 % (w/w) für die Papain-katalysierten Synthesen. Weitere Versuche in denen die gleiche Menge an Enzym verwendet wurde zeigten ebenfalls eine höhere Ausbeute für die Papain-katalysierten Oligomerisierungen (25,4 %) im Vergleich zu Ficain (16,9 %).

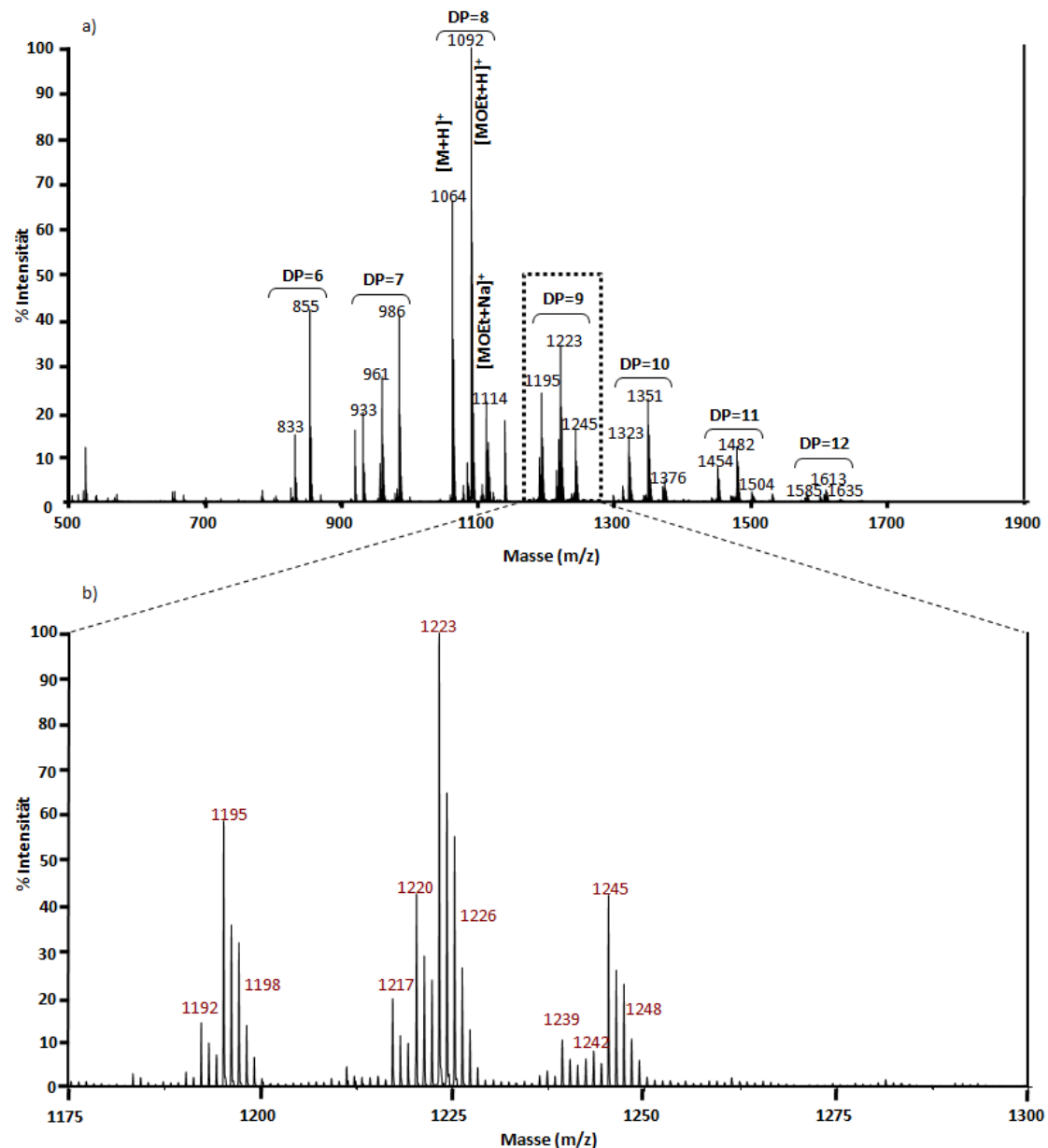


Abbildung 29: MALDI-ToF/MS der Ficain-katalysierten Heterooligomerisierung von LysOEt und MetOEt.

Das gelöste Präzipitat **(a)** enthielt Peptidketten, die sich aus 6-12 Aminosäuren zusammensetzten. **(b)** Die Vergrößerung der Peptidkette von DP=9 zeigt, dass bei jeder Kettenlänge Peptide mit unterschiedlicher Aminosäurekomposition auftreten.

Alle erhaltenen Präzipitate konnten in wässriger Lösung mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) wieder gelöst werden. Die gelösten Präzipitate wurden mittels MALDI-ToF/MS auf ihre

Kettenlängenverteilung sowie deren Zusammensetzung hin untersucht. Abbildung 29 zeigt das Resultat für die Ficain-katalysierte Heterooligomerisierung.

Das in Abbildung 30 gezeigte MALDI-ToF Massenspektrogramm für die Papain-katalysierte Heterooligomerisierung zeigt bis auf das Vorhandensein des Polymerisierungsgrades 13 keine Abweichung gegenüber dem in Abbildung 29 gezeigten Chromatogramm für die Ficain-katalysierte Synthese.

Sowohl die gelösten Präzipitate der Ficain- als auch der Papain-katalysierten Oligomerisierungen zeigten ein identisches Massenspektrum mit Molekülmassen von $m/z = 830$ bis ca. $m/z = 1.600$ bzw. 1.700 bei Papain. Die Masse einer Aminosäureeinheit betrug, einen gleichmäßigen Einbau vorausgesetzt, $129,5$ Da, was Kettenlängen zwischen 6 und 12 (Abbildung 29) bzw. 13 Aminosäuren (Abbildung 30) ergab. Jede Kettenlänge wurde jeweils von drei Peakgruppen repräsentiert, anhand deren Massendifferenz zueinander eine eindeutige Zuordnung getroffen werden konnte. Die erste Gruppe unterschied sich um 28 Da von der zweiten und entspricht den einfach protonierten Peptiden ohne Estergruppe, während die zweite den einfach protonierten Molekülen mit endständiger Estergruppe entspricht. Die dritte Gruppe ist wiederum 22 Da schwerer als die zweite und ist Natriumaddukten der Peptide zuzuordnen, die aus Resten des Synthesepuffers stammen. In den Abbildung 29b und Abbildung 30b ist jeweils die Vergrößerung eines Polymerisierungsgrades gezeigt. Dabei wurde deutlich, dass alle drei Peptidgruppen aus mehreren einzelnen Peptiden bestehen, die sich untereinander nur in der Masse von 3 Da unterschieden, was genau der Massendifferenz eines Lysinrestes zu einem Methioninrest entsprach. Peptide mit geringeren Molekülmassen besitzen vermutlich einen erhöhten Anteil an Lysinresten.

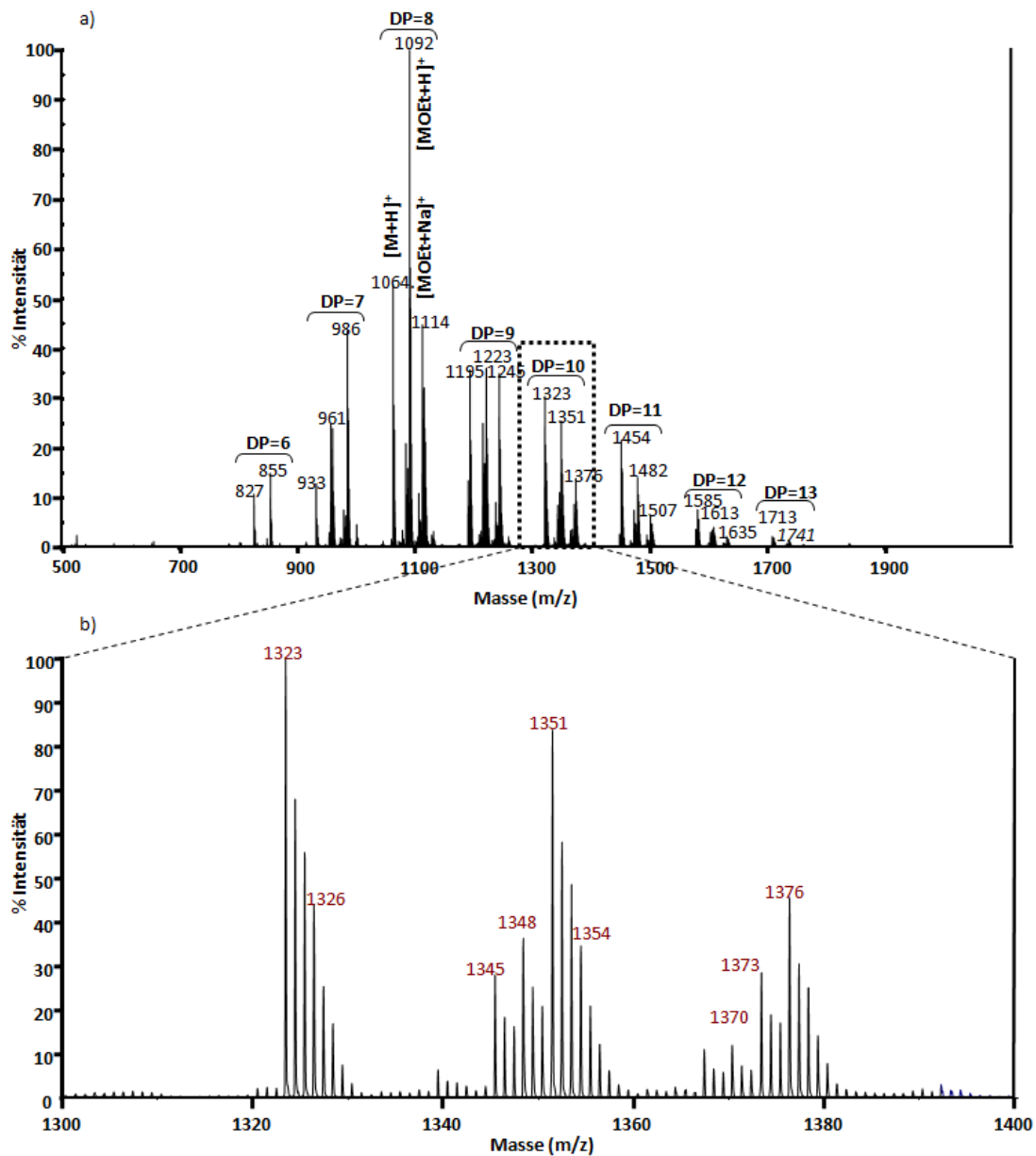


Abbildung 30: MALDI-ToF/MS der Papain-katalysierten Heterooligomerisierung von LysOEt und MetOEt.

Das gelöste Präzipitat **(a)** enthielt Peptidketten, die sich aus 6-13 Aminosäuren zusammensetzten. **(b)** Die Vergrößerung der Peptidkette von DP = 10 zeigt, dass bei jeder Kettenlänge Peptide mit unterschiedlicher Aminosäurekomposition auftreten.

3.3. Chemische Acylierung von Aminosäuren

Die chemische Acylierung der Peptide mit einer Fettsäure sollte mit Hilfe der Schotten-Baumann-Reaktion durchgeführt werden, die bereits zur *N*-Acylierung von Aminosäuren beschrieben ist [77]. Zur Etablierung der Methode wurden L-Aminosäuren acyliert und durch Bestimmung der tensidischen Eigenschaften über tensiometrische Messung der Oberflächenspannung sowie HPLC qualitativ analysiert. Durch eine spektralphotometrische Bestimmung der Aminosäurekonzentration konnte auch indirekt eine quantitative Analyse durchgeführt werden.

3.3.1. Schotten-Baumann-Acylierung von Aminosäureestern

Zur *N*-Acylierung wurden L-Aminosäuren ausgewählt, die, mit Ausnahme von Alanin, auch Bestandteile der in 3.1. und 3.2. synthetisierten Peptide gewesen sind, als Acyldonor diente Laurinsäurechlorid. Glutamat konnte allerdings nicht über die Schotten-Baumann-Reaktion acyliert werden, da es unter den verwendeten Bedingungen zur Anhydridbildung kommt (siehe Abbildung 13) [78]. Während der Versuchsdurchführung wurde der pH-Wert kontrolliert und sowohl vor Beginn als auch nach Acylierung sowie nach weiteren 4 h Rühren bei Raumtemperatur eine Probe zur Bestimmung der Aminosäurekonzentration über einen photometrischen Nachweis mittels OPA-Derivatisierung genommen. Danach wurden die entstandenen Acylpeptide durch Zugabe von Säure bei einem pH von ca. 2 sauer präzipitiert. Die Anfangskonzentration der Aminosäuren lag vor der Acylierung bei 50 mM. Selbst wenn keine Acylierung erfolgte, musste aufgrund der Volumenvergrößerung durch Zugabe des Fettsäurechlorids, eine Abnahme der Aminosäurekonzentration auf 33 mM stattgefunden haben. Neben der Kontrolle des pH-Wertes und der Bestimmung der Aminosäurekonzentration, war ein weiterer Nachweis die Bestimmung der Oberflächenspannung. Diese wurde für die Überstände der Acylierung als auch für die in Wasser wiedergelösten Acylaminosäuren nach saurer Präzipitation durchgeführt. In Tabelle 24 und Tabelle 27 sind die Ergebnisse der Acylierungen zusammengefasst. Sie zeigen die Konzentrationen der Aminosäuren, den pH-Wert und die Oberflächenspannung der Acylierungsüberstände und Präzipitate zu den drei o.g. Probezeitpunkten. Als Kontrolle dienten Aminosäuren die in Reaktionsansätzen ohne Laurinsäurechlorid bzw. für die Präzipitate, Aminosäuren die in Wasser gelöst waren. Erstere besaßen allesamt nur noch eine Oberflächenspannung von ca. 40 mN/m, während letztere nahezu der reinen Wassers (ca. 70 mN/m) entsprachen. Die Acylierungsversuche wurden für die Aminosäuren Alanin und Methionin je dreimal und für Lysin und Leucin je zweimal durchgeführt.

Die erste Aminosäure die über die Schotten-Baumann Reaktion acyliert wurde, war Alanin (Tabelle 24). Vor Beginn der Acylierung konnte die komplette Menge der eingesetzten Aminosäure (50 mM) über den photometrischen Assay nachgewiesen werden, während danach nur noch 29,52 mM von maximal 33 mM (aufgrund der Volumenänderung) detektiert werden konnten. Nach weiteren 4 h Rühren stieg die Konzentration sogar über die maximal möglichen 33 mM auf 35,54 an. Der pH-Wert lag zu Beginn der Reaktion bei 10,24 und sank letztlich leicht auf 10,09 aufgrund der entstehenden Salzsäure ab. Die Oberflächenspannung des Ansatzes war bereits vor der Acylierung sehr niedrig (43,62 mN/m) und sank auch nach der Acylierung nur noch geringfügig auf 37,08 mN/m ab. Das Präzipitat zeigte gegenüber einer reinen Alaninlösung allerdings einen Abfall von 30 mN/m.

Tabelle 24: Aminosäurekonzentration, pH-Wert und Oberflächenspannung der Schotten-Baumann-Acylierung von L-Alanin (n=3).

Aufgrund der Volumenänderung durch Zutropfen des Fettsäurechlorids beträgt die maximale Aminosäurekonzentration nur noch 33 mM. Die betroffenen Werte sind kursiv dargestellt.

	Konzentration in mM				pH-Wert	Oberflächenspannung in mN/m	
	V1	V2	V3	Mittelwert		Überstand	Präzipitat
vor Acylierung	52,35	48,47	50,76	50,41	10,24	43,62	69,45
nach Acylierung	<i>25,69</i>	<i>33,35</i>	<i>25,13</i>	<i>29,52</i>	10,49	37,08	39,54
nach Rühren (4h)	<i>35,08</i>	36	-	<i>35,54</i>	10,09	-	-

Lysin ließ sich im Gegensatz zu Alanin mit einer höheren Effizienz acylieren, was durch die stark verringerte Konzentration der nachweisbaren Aminosäure (20,84 mM) deutlich wurde (Tabelle 25). Trotz eines leichten Anstiegs nach 4 h Rühren war immer noch eine gute Acylierungsausbeute vorhanden. Der pH-Wert sank auch hier aufgrund der entstehenden Salzsäure auf 10,22 leicht ab. Die Oberflächenspannung des Acylierungsansatzes lag bereits bei der Kontrolle unter 40 mN/m und veränderte sich nach der Acylierung kaum. Hingegen zeigte das Präzipitat der sauren Präzipitation nach Lösen in Wasser wie schon zuvor Alanin einen starken Effekt auf die Oberflächenspannung im Vergleich zur Kontrolle und führte zu einer Erniedrigung von 69,0 auf 36,57 mN/m.

Tabelle 25: Aminosäurekonzentration, pH-Wert und Oberflächenspannung der Schotten-Baumann-Acylierung von L-Lysin (n=2).

Aufgrund der Volumenänderung durch Zutropfen des Fettsäurechlorids beträgt die maximale Aminosäurekonzentration nur noch 33 mM. Die betroffenen Werte sind kursiv dargestellt.

	Konzentration in mM			pH-Wert	Oberflächenspannung in mN/m	
	V1	V2	Mittelwert		Überstand	Präzipitat
vor Acylierung	54,63	51,64	53,14	10,40	38,34	69,0
nach Acylierung	<i>19,87</i>	<i>21,81</i>	<i>20,84</i>	10,58	34,47	36,57
nach Rühren (4h)	<i>22,34</i>	<i>23,7</i>	<i>23,02</i>	10,22	-	-

In Tabelle 26 sind die Ergebnisse der Acylierung von Leucin gezeigt, die sich laut nachweisbarer Aminosäurekonzentration am besten acylieren ließ, da lediglich noch 18,53 mM nachgewiesen werden konnten, was sich auch nach 4 h Rühren nicht wesentlich änderte. Einhergehend mit diesem Ergebnis war auch die Tatsache, dass der pH-Wert deutlich von 10 auf 9,24 gesunken ist. Die Oberflächenspannung des Reaktionsansatzes nach der Acylierung betrug 38,67 mN/m, was dem Wert der Kontrolle entsprach. Die wässrige Lösung der präzipitierten Acylaminosäure besaß eine Oberflächenspannung von 44,88 mN/m, was gegenüber der Kontrolle eine deutliche Abnahme war.

Tabelle 26: Aminosäurekonzentration, pH-Wert und Oberflächenspannung der Schotten-Baumann-Acylierung von L-Leucin (n=2).

Aufgrund der Volumenänderung durch Zutropfen des Fettsäurechlorids beträgt die maximale Aminosäurekonzentration nur noch 33 mM. Die betroffenen Werte sind kursiv dargestellt. Geklammerte Werte wurden bei Berechnung des Mittelwertes nicht berücksichtigt.

	Konzentration in mM			pH- Wert	Oberflächenspannung in mN/m	
	V1	V2	Mittelwert		Überstand	Präzipitat
vor Acylierung	(144,34)	52,5	52,5	10	39,3	67,8
nach Acylierung	<i>19,96</i>	<i>17,9</i>	<i>18,93</i>	10,2	38,67	44,88
nach Rühren (4h)	<i>17,65</i>	<i>17,4</i>	<i>17,535</i>	9,24	-	-

Nachdem mit Lysin und Leucin bereits zwei Aminosäuren, die auch in der enzymatischen Peptidsynthese (siehe 3.1.) zum Einsatz kamen, erfolgreich acyliert wurden, sollte mit Methionin eine weitere Aminosäure die in den Oligomerisierungen verwendet wurde, getestet werden. Hierfür konnte, wie aus Tabelle 27 ersichtlich wird, im photometrischen Assay vor der Acylierung die Ausgangskonzentration von 50 mM nicht ganz erreicht werden. Nach der Acylierung betrug die nachgewiesene Konzentration 26,91 mM, was auf einer geringen Acylierungsausbeute entsprach. Dieser Wert änderte sich auch nach 4 h Rühren nicht mehr wesentlich. Der pH-Wert zu Beginn war 10,06, stieg danach zunächst leicht an, sank aber letztlich, trotz der schwachen Acylierungsausbeute auf 9,62 ab. In diesen Versuchen war der Oberflächenspannungswert des Acylierungsansatzes nicht wie in den Versuchen zuvor mit der Kontrolllösung nahezu identisch, sondern sank auf 30 mN/m ab. Dagegen zeigte das Präzipitat kaum einen Einfluss auf die Oberflächenspannung (60,27 mN/m) im Vergleich zur Kontrolllösung der freien Aminosäure in Wasser (69,8 mN/m).

Tabelle 27: Aminosäurekonzentration, pH-Wert und Oberflächenspannung der Schotten-Baumann-Acylierung von L-Methionin (n=3).

Aufgrund der Volumenänderung durch Zutropfen des Fettsäurechlorids beträgt die maximale Aminosäurekonzentration nur noch 33 mM. Die betroffenen Werte sind kursiv dargestellt.

	Konzentration in mM				pH-Wert	Oberflächenspannung in mN/m	
	V1	V2	V3	Mittelwert		Überstand	Präzipitat
vor Acylierung	46,67	45,24	50,44	47,45	10,06	44,58	69,8
nach Acylierung	<i>30,97</i>	<i>22,84</i>	<i>27,12</i>	<i>26,91</i>	10,35	30,03	60,27
nach Rühren (4h)	<i>31,05</i>	<i>20,26</i>	<i>25,75</i>	<i>25,66</i>	9,62	-	-

Abbildung 31 und Abbildung 32 stellen die wesentlichen Ergebnisse aus Tabelle 24 - Tabelle 27 grafisch zusammen. Die in Wasser gelösten Präzipitate aller acylierten Aminosäuren (Abbildung 31) bewirkten eine Senkung der Oberflächenspannung ihrer Lösung. Die Acylierungen der hydrophoben

Aminosäuren Leucin und Methionin bewirkten dabei einen weniger starken Effekt als die der hydrophilen Aminosäuren Alanin und Lysin.

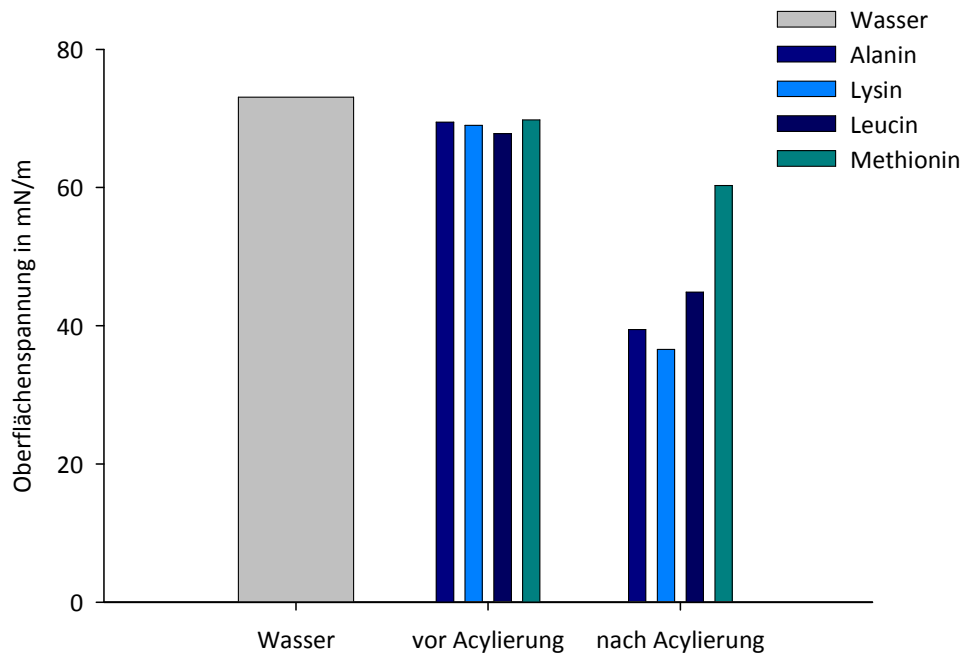


Abbildung 31: Einfluss von in Wasser gelösten Acylaminosäuren auf dessen Oberflächenspannung im Vergleich zu reinen Aminosäurelösungen und Wasser.

Alle Aminosäurelösungen in Wasser besaßen einen zu diesem (breiter, grauer Balken) ähnlichen Oberflächenspannungswert. Nach der Acylierung zeigten beiden hydrophilen Aminosäuren Alanin und Lysin den deutlichsten Effekt auf die Oberflächenspannung. Auch die hydrophobe Aminosäure zeigte eine deutliche Abnahme, während acyliertes Methionin kaum Einfluss auf die Oberflächenspannung hat.

Als endgültiger Beweis einer erfolgreichen Acylierung wurde eine HPLC-Analyse des acylierten Alanins mit der des kommerziell erworbenen Standards *N*-Lauroyl-L-Alanin verglichen (Abbildung 33). Bei einer erfolgreichen *N*-Acylierung, bei der sich zwischen Aminogruppe der Aminosäure und der Carbonylgruppe des Laurinsäurechlorids eine Amidbindung ausbildet, sollte eine Detektion dieser Bindung bei 206 nm möglich sein. Zur besseren Identifikation des Acylalanins im Falle mehrerer auftretender Peaks wurde der Standard in doppelter Konzentration angesetzt. Gleichzeitig sollte über eine OPA-Derivatisierung des Acylalanins (gelöstes Präzipitat) und des *N*-Lauroyl-L-Alanin die Reinheit beider Substanzen überprüft werden (Abbildung 34). Da nach *N*-Acylierung der Aminosäure kein primäres Amin am *N*-Terminus mehr vorliegt, sollte auch keine Detektion bei 340 nm mit dem FLD-Detektor möglich sein bzw. nur nicht-acyliertes Alanin ein Signal ergeben. Zur Identifikation des Alaninpeaks wurde als Kontrolle Alanin derivatisiert. Alle in die Derivatisierung eingesetzten Lösungen waren 1 mM konzentriert.

Abbildung 33 zeigt den Vergleich des acylierten Alanins mit dem Standard *N*-Lauroyl-L-Alanin. In beiden Chromatogrammen tauchen zur selben Zeit (nach ca. 3,76 min) deutliche Signale auf, von denen das des zweifach konzentrierten Standards sowohl in der Peakhöhe als auch –fläche um einen Faktor 2 größer war, als die einfach konzentrierte Acylierungsprobe.

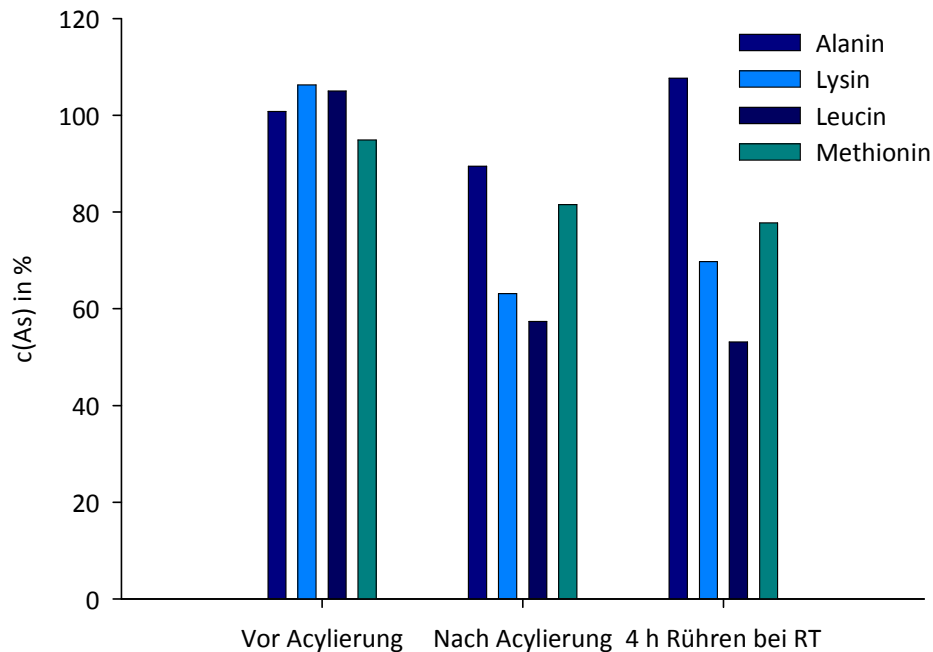


Abbildung 32: Abnahme der Aminosäurekonzentration durch *N*-Acylierung mit Laurinsäurechlorid.

Für alle Aminosäuren wurde annähernd die eingesetzte Ausgangskonzentration von 50 mM (= 100 %) nachgewiesen. Lediglich Methionin liegt etwas unter 100 %. Nach Acylierung konnte bei allen Aminosäuren eine Konzentrationsabnahme festgestellt werden, die im Falle von Alanin und Methionin eher gering war, während sie bei Lysin und Leucin mit ca. 40 % sehr deutlich ausfiel. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur (RT) veränderte sich die Konzentration bei allen Aminosäuren nicht mehr nennenswert oder stieg nur leicht an.

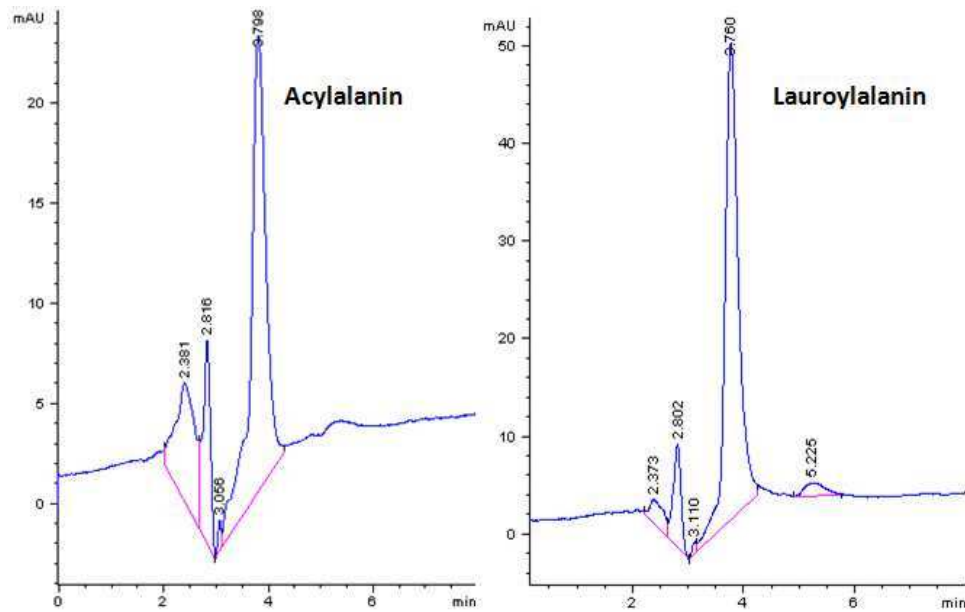


Abbildung 33: Nachweis der erfolgreichen Acylierung von Alanin mit Laurinsäurechlorid mittels HPLC bei 206 nm.

Das linke Chromatogramm zeigt das in dieser Arbeit acylierte Alanin in einer Konzentration von 1 mM. Rechts ist der Standard *N*-Lauroyl-L-Alanin mit 2 mM gezeigt. In beiden Chromatogrammen erscheint nach 2,84 min ein Peak, der beim 2-fach konzentrierten Standard in etwa die 2-fache Peakfläche besaß.

In Abbildung 34 sind die Chromatogramme der OPA-Derivatisierungen von Alanin (oben), Acylalanin (Mitte, hergestellt in dieser Arbeit) und dem Standard *N*-Lauroyl-L-Alanin (unten) gezeigt. Während bei Alanin ein deutliches Signal nach 3,095 min auftrat, fanden sich nach gleicher Retentionszeit bei den beiden Acylaminosäuren 40- bzw. 160-fach schwächere Peaks.

Beide HPLC-Nachweise belegen die erfolgreiche Acylierung von Alanin und bestätigen somit die erfolgreiche Etablierung der Schotten-Baumann-Reaktion zur chemischen Acylierung von Aminosäuren am *N*-Terminus. Auf dieser Basis sollte nun versucht werden, die in 3.1. und 3.2. hergestellten Oligopeptide zu acylieren.

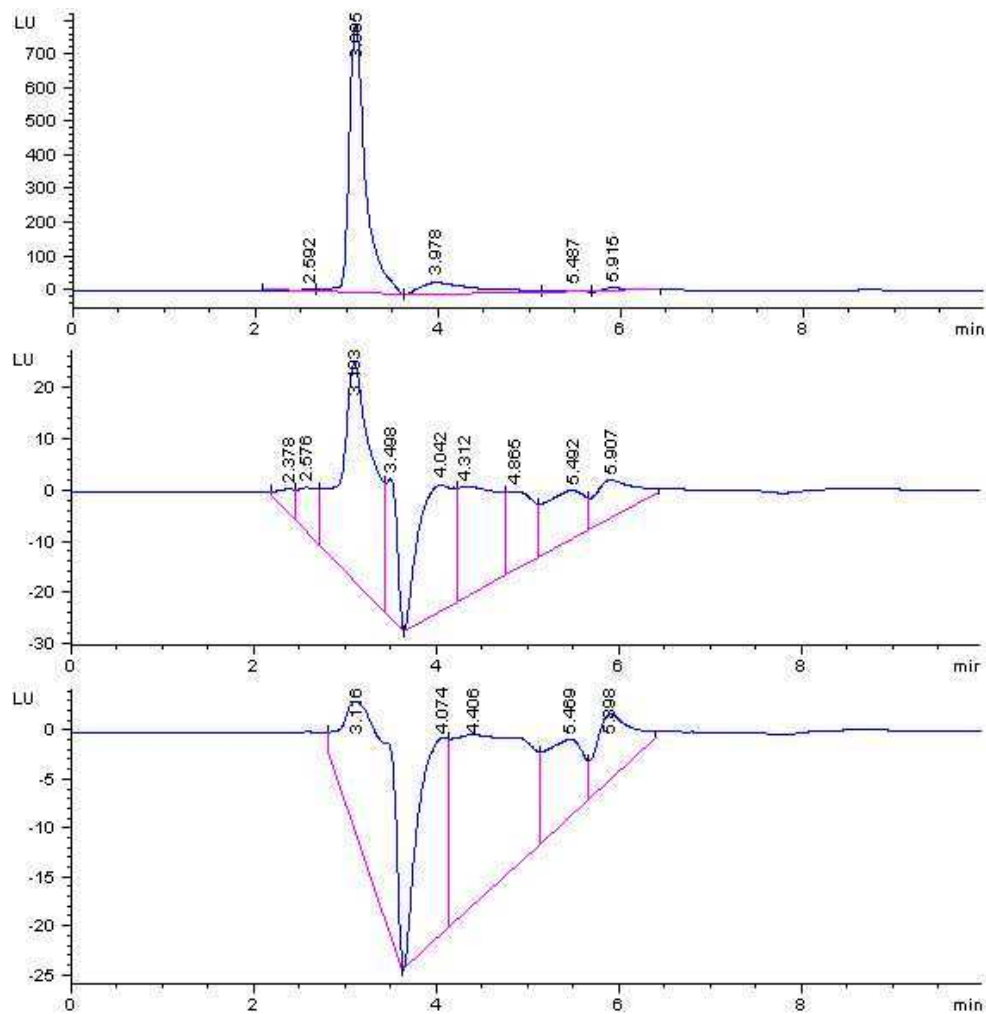


Abbildung 34: HPLC-Chromatogramme der OPA-Derivatisierungen von Alanin, Acylalanin (aus dieser Arbeit) und *N*-Lauroyl-L-Alanin bei 340 nm.

Alle Substanzen wurden als 1 mM Lösungen hergestellt und derivatisiert. Während Alanin erwartungsgemäß einen deutlichen Peak (oben) zeigte, nahm die Intensität des Alaninpeaks beim selbst hergestellten Acylalanin (Mitte) auf das fast 30-fache ab. Beim Standard *N*-Lauroyl-L-Alanin war so gut wie kein Alanin nachweisbar.

3.4. Chemische Acylierung von Oligopeptiden

Nachdem zuvor die Schotten-Baumann-Acylierung erfolgreich an verschiedenen Aminosäuren etabliert wurde (vgl. 3.3.), sollten nun die in dieser Arbeit synthetisierten Oligopeptide über diese Reaktion acyliert werden. Allerdings kamen dafür nur Oligopeptide in Frage, deren Präzipitate wieder gelöst werden konnten oder im alkalischen Bereich löslich sind. Aufgrund dessen konnte von den Oligopeptiden nur das Homooligopeptid OligoGlu und die Heterooligopeptide OligoGlu/Met und OligoGlu/Leu in den Acylierungsversuchen verwendet werden. Somit konnten OligoTyr, OligoMet, OligoLeu und OligoLys/Met nicht acyliert werden.

Eine erfolgreiche Acylierung der Oligopeptide wurde durch einen tensiometrischen sowie optischen Nachweis geprüft und sollte mittels massenspektrometrischer MALDI-ToF Analysen gesichert werden.

3.4.1. Visuelle Analyse der acylierten Oligopeptide mittels Mikrotiterplatten

Nach der Schotten-Baumann-Acylierung und der sauren Präzipitation (siehe 2.4.1.) wird eine erste, visuelle Analyse der acylierten Oligopeptide in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Dieser in Abbildung 35 gezeigte Schnelltest beruht auf der veränderten Oberflächenspannung von Acylpeptiden im Vergleich zu den Oligopeptiden und der daraus resultierenden anderen Lichtbrechung, die die Karos der Unterlage entweder grob- oder engmaschiger werden ließ. Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz in den zwar Fettsäurechlorid zugetropft wurde, der aber kein Peptid enthielt. Außerdem wurde noch der Puffer in dem die präzipitierten Acylpeptide gelöst wurden mit in die Platte gegeben.

Alle Acylpeptide zeigen im Vergleich zu den Oligopeptiden ein stark verengtes Karomuster. Die in Puffer gelösten Oligopeptide haben keinen Einfluss auf die Oberflächenspannung, da ihre Karomuster mit denen des reinen Puffers übereinstimmen. Ob der Effekt bei den Acylpeptiden von einer erfolgreichen Acylierung stammt, kann aufgrund der Ähnlichkeit zur Kontrolle mit dieser Methode nicht geklärt werden.

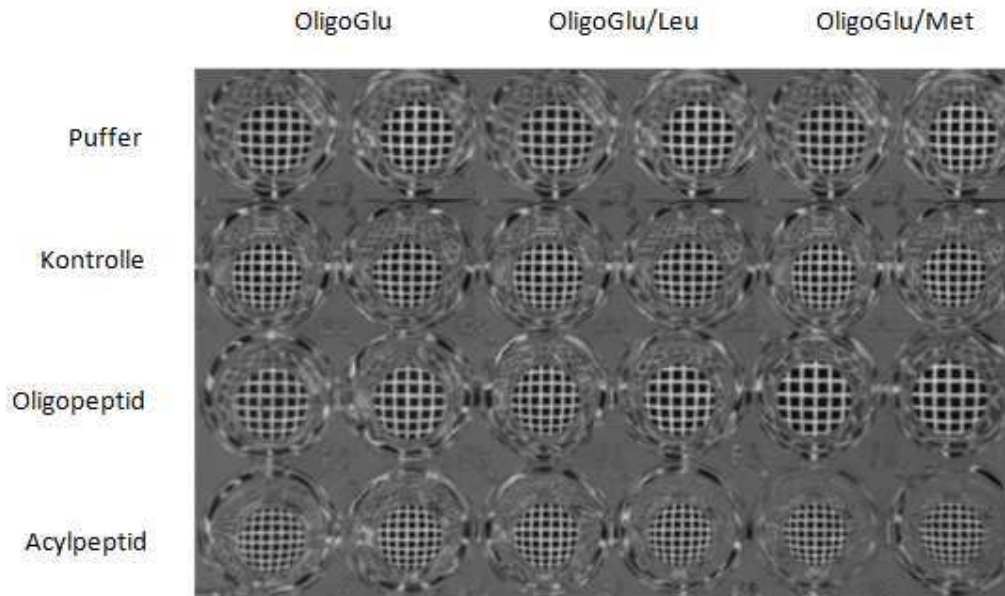


Abbildung 35: Visueller Nachweis der Acylierung der Oligopeptide mittels einer auf einem Karofeld platzierten Mikrotiterplatte.

Alle Oligo- und Acylpeptide wurden jeweils in zwei benachbarte Wells pipettiert. Puffer und Oligopeptide zeigen genau wie Kontrolle und Acylpeptid keine Unterschiede zueinander, wobei letztere ein wesentlich engmaschigeres Karofeld als erstere zeigen.

Zu einer genaueren Überprüfung wurde mit den Präzipitaten eine tensiometrische Bestimmung der Oberflächenspannung durchgeführt.

3.4.2. Tensiometrische Bestimmung der Oberflächenspannung

Zur Bestimmung der Oberflächenspannung wurde die in 2.6.1 beschriebene Ringmethode nach du Noüy verwendet [72]. Hierfür wurden die Oligopeptide als auch die Präzipitate der Acylierungsversuche in Wasser gelöst und vermessen. Die Oligopeptide wurden vor dem Lösen in Wasser alkalisch hydrolysiert und abermals lyophilisiert.

Die Tensiometermessungen belegen die Beobachtung des Mikrotiterplattentests, dass die Oligopeptide keine Auswirkung auf die Oberflächenspannung haben, da sich alle im Bereich um die 70 mN/m bewegen, was dem Wert des reinen Wassers entspricht (70,69 mN/m, Literaturwert: 72,75 mN/m [79]). Die gemessenen Werte für die Oberflächenspannung der Oligopeptidlösungen sowie die gelösten Präzipitate der Acylierungsversuche sind in Tabelle 28 zusammengetragen, während Abbildung 36 die Ergebnisse grafisch darstellt.

Tabelle 28: Oberflächenspannungswerte der Acylpeptide und dazugehörigen Oligopeptide.

Substanz	Oberflächenspannung in mN/m
Wasser	70,69
OligoGlu	70,03
AcyloligoGlu	70,33
OligoGlu/Leu	66,72
AcyloligoGlu/Leu	47,25
OligoGlu/Met	69,94
AcyloligoGlu/Met	54,81

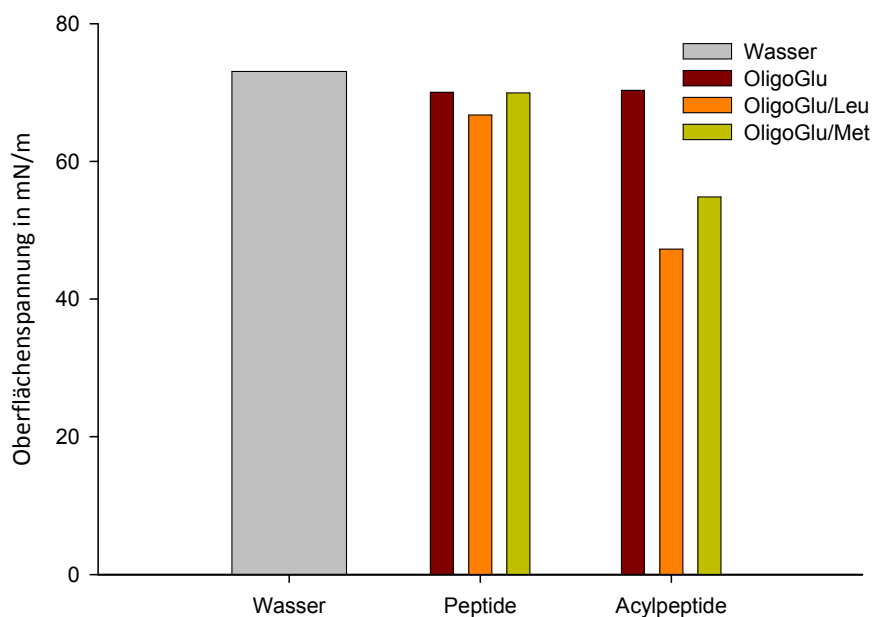


Abbildung 36: Einfluss von in Wasser gelösten Acylpeptiden auf dessen Oberflächenspannung im Vergleich zu Oligopeptidlösungen und Wasser.

Alle in Wasser gelösten Oligopeptide besaßen eine zum Wasser ähnliche Oberflächenspannung. Nach den Acylierungsreaktionen zeigen einzig die Mischpeptide eine verringerte Oberflächenspannung.

Für die Acylpeptide von OligoGlu/Leu und OligoGlu/Met bestätigte sich die Vermutung einer kleiner gewordenen Oberflächenspannung, da diese im Vergleich zu den Oligopeptiden deutlich auf 47,25 bzw. 54,81 mN/m gesunken war. Lediglich bei Acyloligoglutamat konnte keine Änderung der

Oberflächenspannung im Vergleich zum nichtacylierten Oligopeptid festgestellt werden, was der Beobachtung aus dem Mikrotiterplattentest widerspricht.

Um zu beweisen, dass es sich bei den Präzipitaten nach der Acylierung tatsächlich um Acylpeptide handelte, wurde eine massenspektrometrische MALDI-ToF Analyse durchgeführt.

3.4.3. MALDI-ToF-Analyse der acylierten Oligopeptide

Die Präzipitate der Acylierungsversuche der drei untersuchten Oligopeptide wurden zur Analyse mittels MALDI-ToF in einem Gemisch aus Acetonitril/H₂O (1:1 v/v) mit 0,1 % TFA gelöst.

In Abbildung 37 ist in a) das Ergebnis für Oligoglutamats und in b) das Ergebnis für die acylierte Form des Oligoglutamats gezeigt. Die Peaks im Diagramm stellen verschiedene Peptidkettenlänge dar, die sich um 129 Da unterschieden, was genau der Masse einer Glutamateinheit nach alkalischer Hydrolyse entspricht. Im Falle einer erfolgreichen Acylierung würden sich die einzelnen Kettenlängen zwar nach wie vor um 129 Da unterscheiden, allerdings wäre die gesamte Masse um die der gekoppelten Laurinsäure (181 Da) angestiegen. Da die Peakmassen des vermeintlich acylierten Oligopeptids und des nicht-acylierten Oligopeptids identisch sind, bestätigte sich die Vermutung aus den Tensiometerwerten (3.4.2.), dass keine Acylierung des Oligoglutamats stattfand.

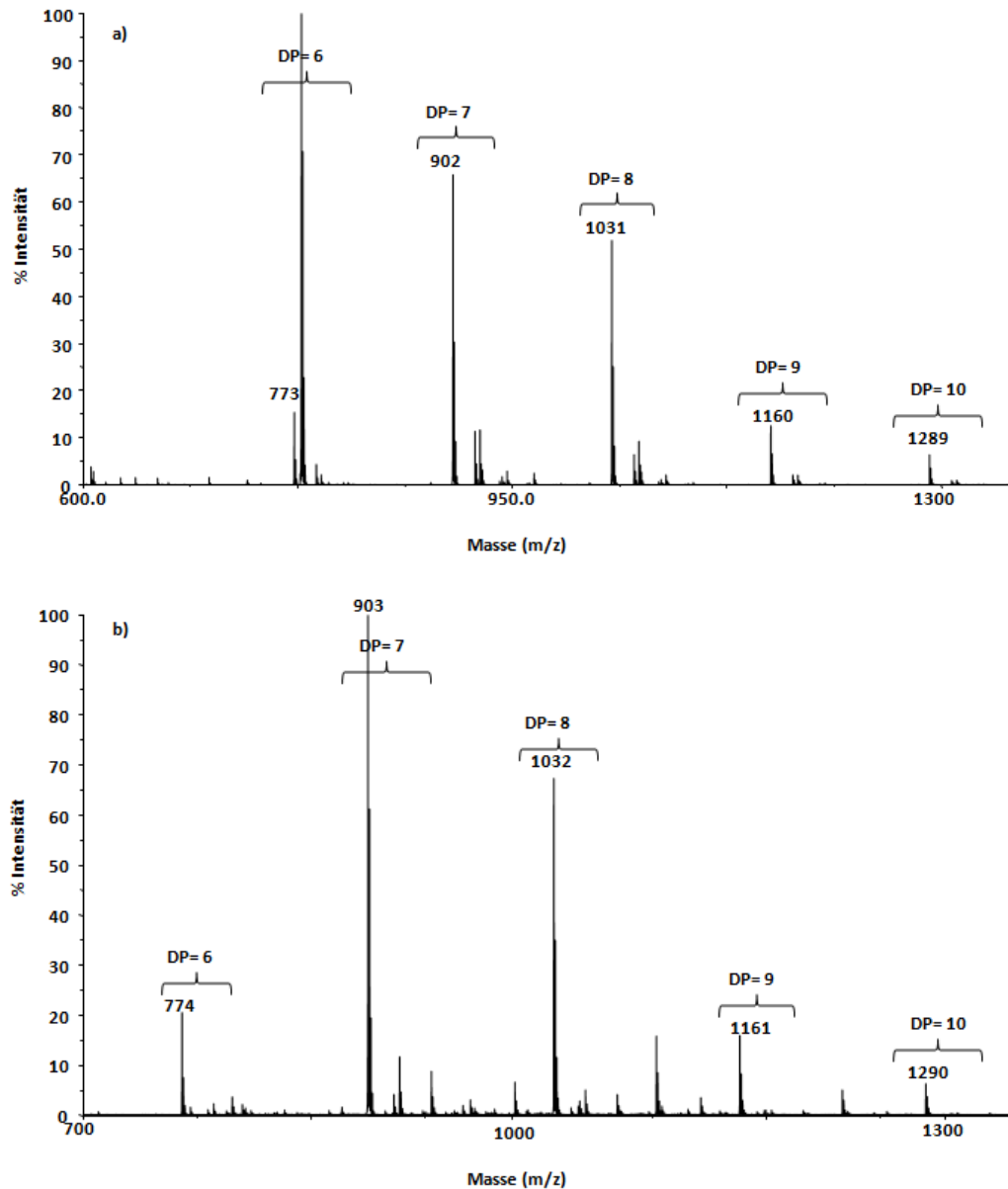


Abbildung 37: MALDI-ToF Chromatogramm des a) nichtacylierten OligoGlu und des b) Acylierungsversuches von OligoGlu

In a) sind die verschiedenen Polymerisierungsgrade (DP) von 6 bis 10 Aminosäuren zu sehen. Der Größenunterschied zwischen den Peaks beträgt immer $m/z = 129$, der Masse von Glutamat. In b) ist das Massenspektrum aus dem Acylierungsversuch von OligoGlu gezeigt, dass zum nicht acylierten OligoGlu identische Massen aufweist.

Die Acylierung von OligoGlu/Leu erbrachte kein klares Ergebnis in den MALDI-ToF Analysen in Abbildung 38. Zwar werden sowohl im Diagramm des Oligopeptid (Abbildung 38 a) als auch des vermeintlich acylierten Peptids (Abbildung 38 b) verschiedene Kettenlänge von 7 bis 10 Aminosäuren Länge detektiert, die sich untereinander entweder um die Masse eines Leucin- oder Glutamatrestes (113 bzw. 129 Da, vgl. Abbildung 11) unterschieden, jedoch müssten bei erfolgreicher Acylierung die gesamten Molekülmassen um 181 Da zugenommen haben. Es konnten jedoch keine eindeutigen

Molekülmassen gefunden werden, die eine Acylierung eindeutig bestätigt hätten, was den Ergebnissen des visuellen Plattentest als der tensiometrischen Analyse widersprach.

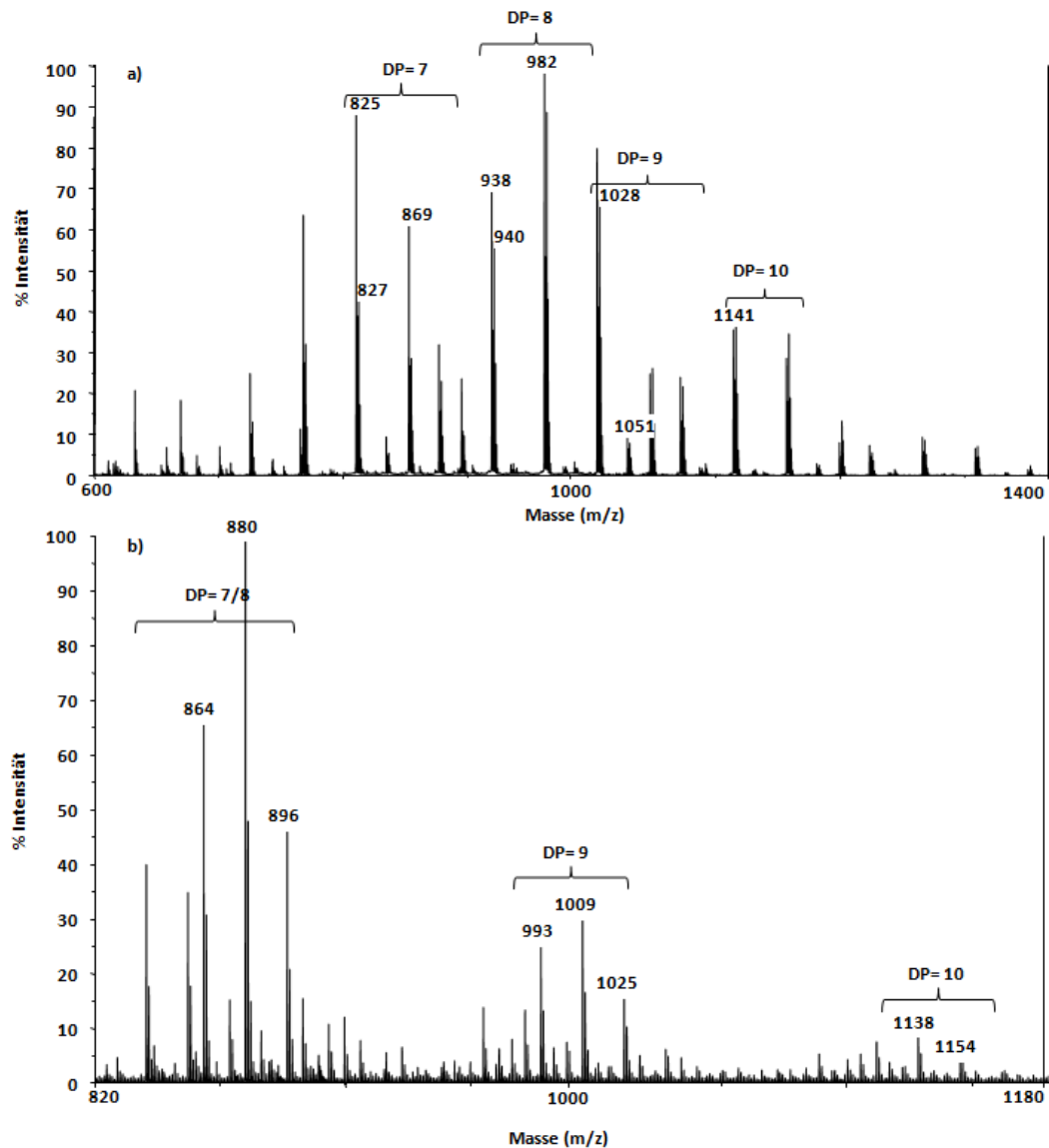


Abbildung 38: MALDI-ToF Chromatogramm des a) nichtacylierten OligoGlu/Leu und des b) acylierten OligoGlu/Leu.

Das Oligopeptid (a) besaß Peptidketten der Polymerisierungsgrade (DP) von 7 bis 10. Zwischen den Polymerisierungsgraden bestand Massendifferenz von entweder 113 oder 129 Da, entsprechend der Massen von Leucin oder Glutamat. Der Acylierungsversuch (b) wies ebenfalls Peptide mit DP = 7- 10 auf. Zwar war eine Peakverschiebung erkennbar, allerdings nicht um die Masse der Fettsäure.

Ein anderes Bild zeigte sich für die Acylierung von OligoGlu/Met über die Schotten-Baumann-Reaktion, deren Ergebnis in Abbildung 39 gezeigt ist. Für das Oligopeptid (a) wurden Peptidketten von 6 bis 10 Aminosäuren Länge gefunden, die sich entweder um 131 oder 129 Da vom benachbarten Polymerisierungsgrad (DP) unterschieden, je nachdem ob Glutamat oder Methionin während der Peptidsynthese angelagert wurde. Eine identische Kettenlängenverteilung fand sich auch in b) für das Oligopeptid nach Acylierung. Auch hier unterschieden sich die Polymerisierungsgrade um die Masse eines Glutamat- oder Methioninrestes, allerdings waren alle Peaks um 181 Da schwerer als in a). Da dies genau der Masse der Laurinsäure entspricht, konnte von einer erfolgreichen Acylierung ausgegangen werden, was bereits durch die Tensiometerwerte (3.4.2.) und den visuellen Plattentest (3.4.1) vermutet wurde.

Die MALDI-ToF Analysen konnten eindeutig die Acylierung von OligoGlu/Met bestätigen was im Einklang mit den übrigen Ergebnissen für dieses Acylpeptid steht. Für die Acylierung von OligoGlu ließ sich bereits bei den Tensiometerwerten vermuten, dass keine Acylierung stattfand, was letztlich durch MALDI-ToF bestätigt wurde. Nicht eindeutig waren die Ergebnisse für die Acylierung von OligoGlu/Leu, dessen Tensiometerwerte für eine Acylierung sprechen, was aber durch MALDI-ToF nicht eindeutig belegt werden konnte.

Für eine erste anwendungstechnische Charakterisierung und da für viele Peptidderivate eine antimikrobielle Wirkung beschrieben ist [80], wurde diese Wirksamkeit auch für die Präzipitate aus den Acylierungen getestet.

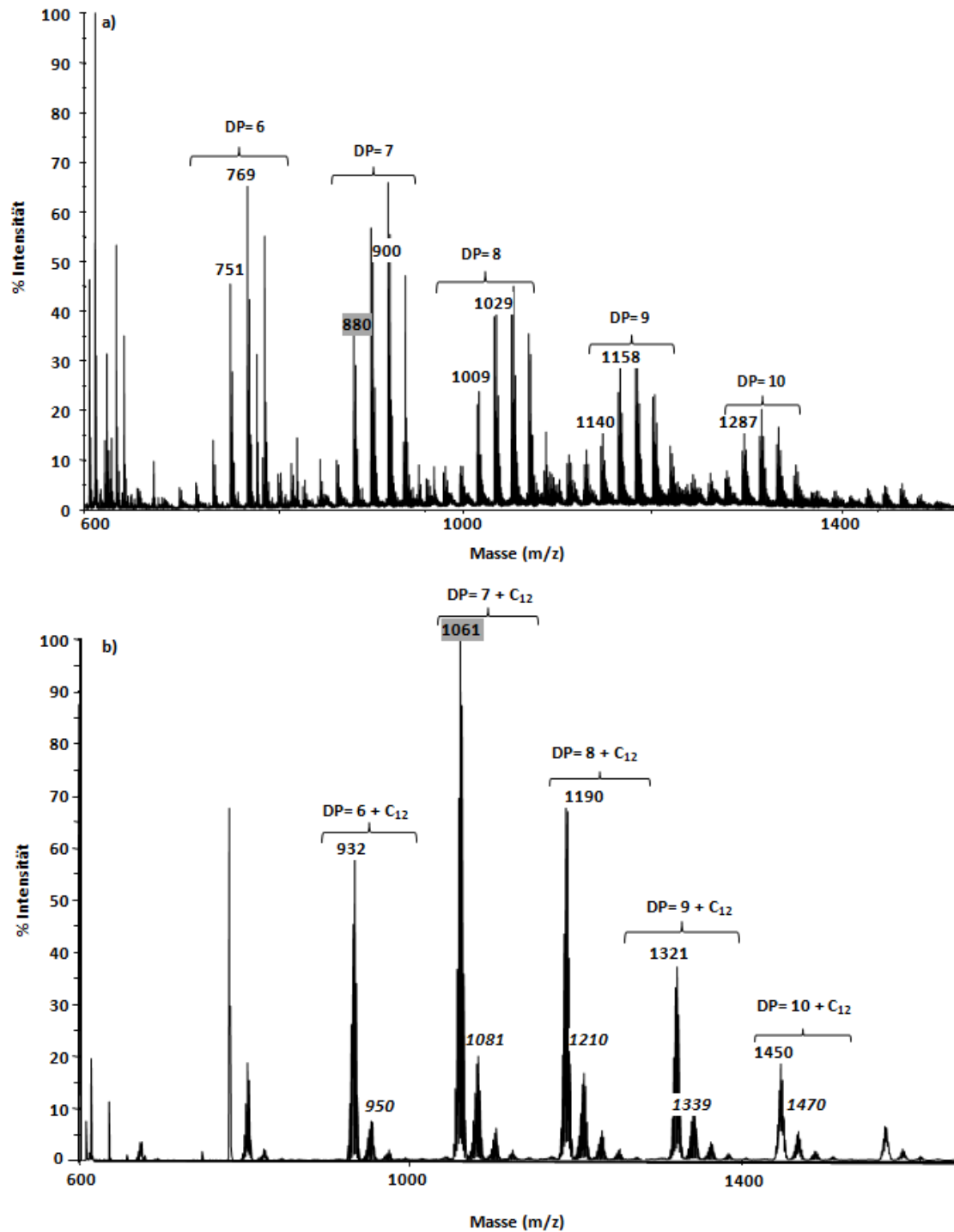


Abbildung 39: MALDI-ToF Chromatogramm des a) nichtacylierten OligoGlu/Leu und des b) acylierten OligoGlu/Leu.

Sowohl in a) als auch in b) werden Peptidketten der Polymerisierungsgrade (DP) 6 – 10 detektiert, die sich entweder um 131 Da (Met) oder 129 Da (Glu) unterschieden. Die grau hinterlegte Molekülmasse in b) gehört zur selben Kettenlänge wie die grau hinterlegte in a), ist allerdings um 181 Da schwerer, was der molaren Masse der Laurinsäure entspricht.

3.4.4. Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit der chemisch acylierten Oligopeptide

Die antimikrobielle Wirksamkeit der acylierten Oligopeptide wurde sowohl gegenüber grampositiven (*Bacillus subtilis*) als auch gramnegativen Bakterien (*Escherichia coli*) getestet. Die Präzipitate der Acylierungen von OligoGlu, OligoGlu/Met und OligoGlu/Leu wurden in Wasser gelöst und in jeweils vier verschiedenen Konzentrationen (50, 25, 10 und 5mg/ml) aufgetragen. Abbildung 40 und Abbildung 41 zeigen die Ergebnisse bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 50 mg/ml. In Abbildung 40 ist der Einfluss der gelösten Präzipitate auf das Wachstum von *E. coli* zu sehen. Die Platten zeigten unabhängig von der Konzentration keinerlei Hemmhöfe die auf ein vermindertes oder unterbundenenes Wachstum schließen ließen, während rund um die Positivkontrolle Kanamycin kein Wachstum stattfand. Die Agarplatten mit *B. subtilis* zeigten selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 50 mg/ml (Abbildung 41) für die Acylpeptide keinerlei Hemmhöfe, während bei den Positivkontrollen schwache Hemmhöfe erkennbar waren. Die Agarplatten der übrigen Konzentrationen verhielten sich identisch.



Abbildung 40: Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit gegenüber *E. coli*.

Auf Filterpapier sind die acylierten Oligopeptide OligoGlu, OligoGlu/Leu und OligoGlu/Met (im Uhrzeigersinn) in einer Konzentration von 50 mg/ml aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde Kanamycin, als Negativkontrolle Wasser verwendet.

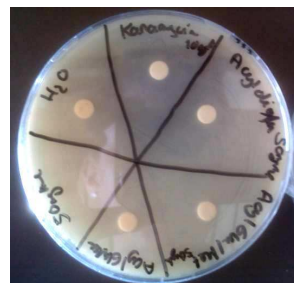


Abbildung 41: Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit gegenüber *B. subtilis*.

Auf Filterpapier sind die acylierten Oligopeptide OligoGlu/Met, OligoGlu/Leu und OligoGlu (im Uhrzeigersinn) in einer Konzentration von 50 mg/ml aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde Kanamycin, als Negativkontrolle Wasser verwendet.

3.5. Untersuchungen zur enzymatischen Acylierung von Aminosäuren

Da für einige Peptide und Aminosäuren eine chemische Acylierung nicht möglich war, wurde versucht auch den Acylierungsschritt Enzym-katalysiert durchzuführen, was außerdem eine umweltverträgliche Alternative darstellen würde. Als Katalysatoren wurden immobilisierte Proteasen eingesetzt, die im Falle einer *N*-Acylierung die Bildung einer Amidbindung katalysieren würden. Eine Analyse sollte über chromatografische Methoden (GC, HPLC) erfolgen.

3.5.1. Entwicklung chromatografischer Nachweismethoden

Anhand eines kommerziell erhältlichen Gemisches verschiedener Fettsäuremethylester (FAME-Mix) sollte eine geeignete Methode zur Auftrennung von Plantapon, einem Mix aus verschiedenen mit Glutamat verknüpften Fettsäuren mit Kettenlängen von 6 bis 16 Kohlenstoffatomen, über die Gaschromatografie gefunden werden. In Abbildung 42 ist die Auftrennung des FAME-Mixes gezeigt, in der eine klare Grundlinientrennung der einzelnen Fettsäuren erkennbar ist, so dass die Zuordnung der unterschiedlichen Kettenlängen von C₆ – C₁₆ problemlos möglich war.

Anhand dieser Ergebnisse konnten auch die durch alkalische Lyse aus Plantapon freigesetzten Fettsäuren nach Methylierung mit TMSH über GC analysiert und zugeordnet werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 43 gezeigt.

Nach alkalischer Lyse von Plantapon konnte, bei Verwendung der zum FAME-Mix identischen Analysebedingungen, für die Fettsäuren C₆ – C₁₆ eine klare Zuordnung getroffen werden.

Da die zur Gaschromatografie verwendete Säule nach steigender Hydrophobizität auftrennt, sollte sich die Reihenfolge der eluierten Peaks in der HPLC bei Verwendung einer Reversed Phase-Säule nicht ändern. Der Vorteil der HPLC liegt darin, dass das mit unterschiedlichen Fettsäuren acylierte Glutamat direkt über die Amidbindung bei 206 nm detektiert werden kann, ohne vorher lysiert oder derivatisiert werden zu müssen. Das Ergebnis der HPLC-Auftrennung ist in Abbildung 44 gezeigt.

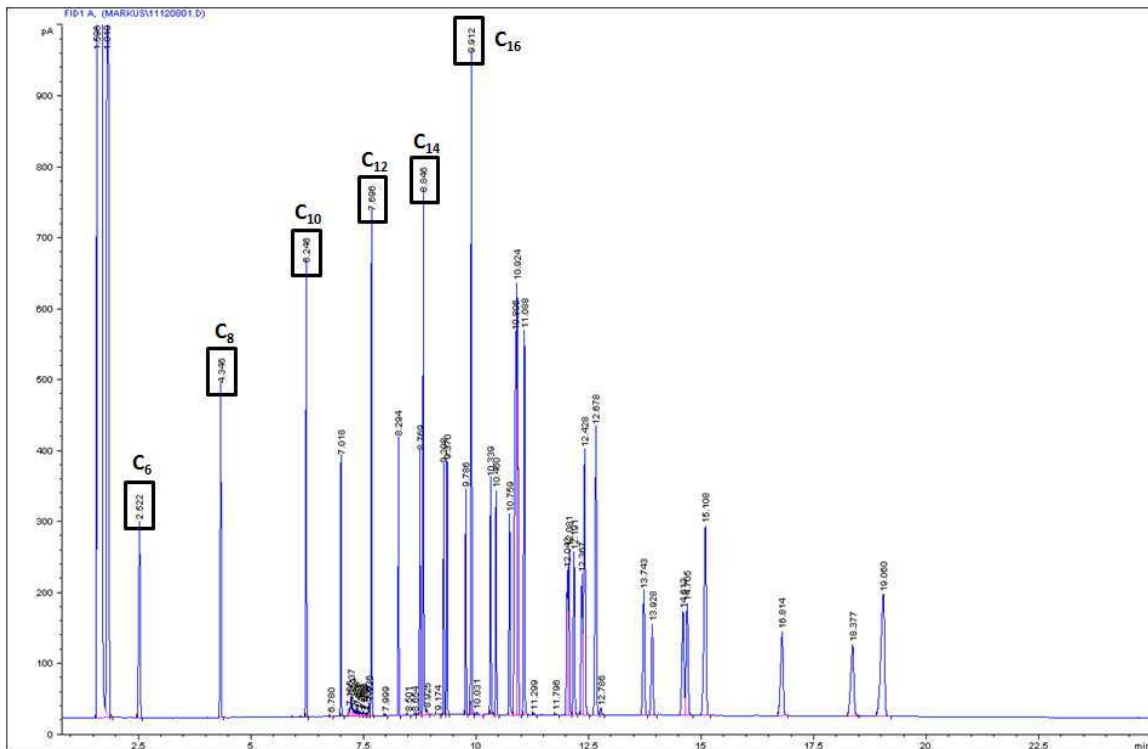


Abbildung 42: Auftrennung des FAME-Mixes in der Gaschromatografie (GC)

Obwohl weitere Fettsäuren auftraten, wurde nur die für diese Arbeit relevanten Fettsäuren markiert.

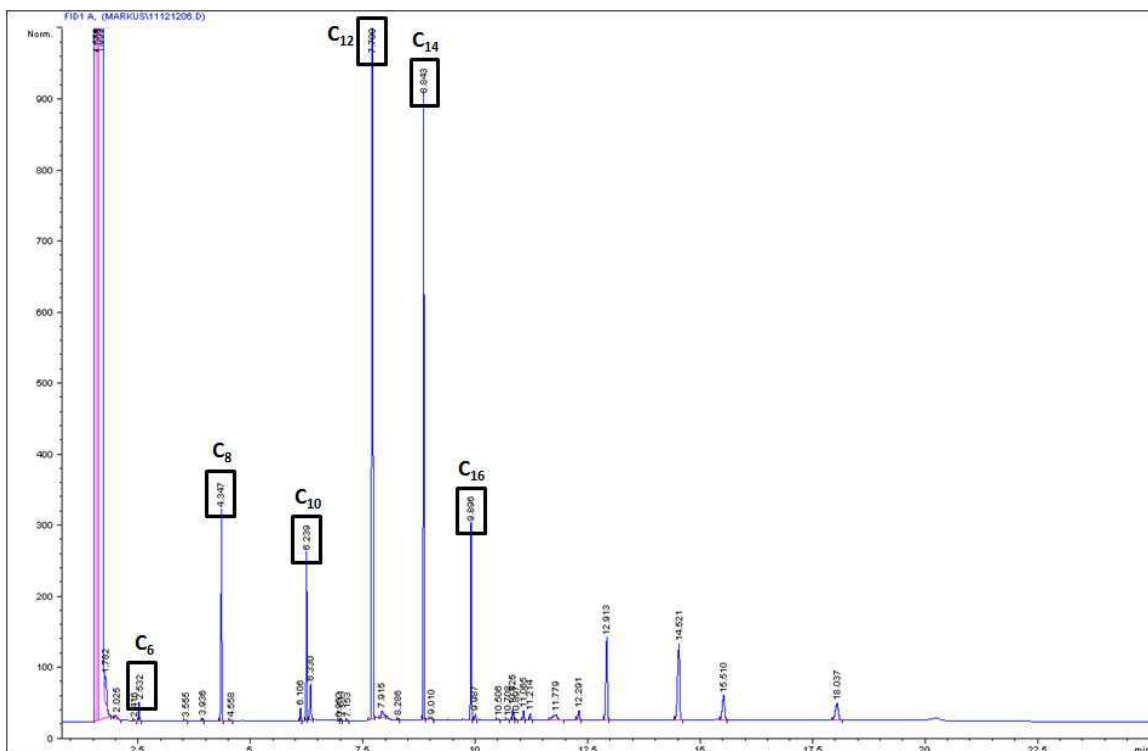


Abbildung 43: Analyse der aus Plantapon freigesetzten Fettsäuren über GC.

Die Retentionszeiten der Fettsäuremethylester stimmen mit denen des FAME-Mixes überein. Markiert wurde nur der für diese Arbeit relevante Bereich.

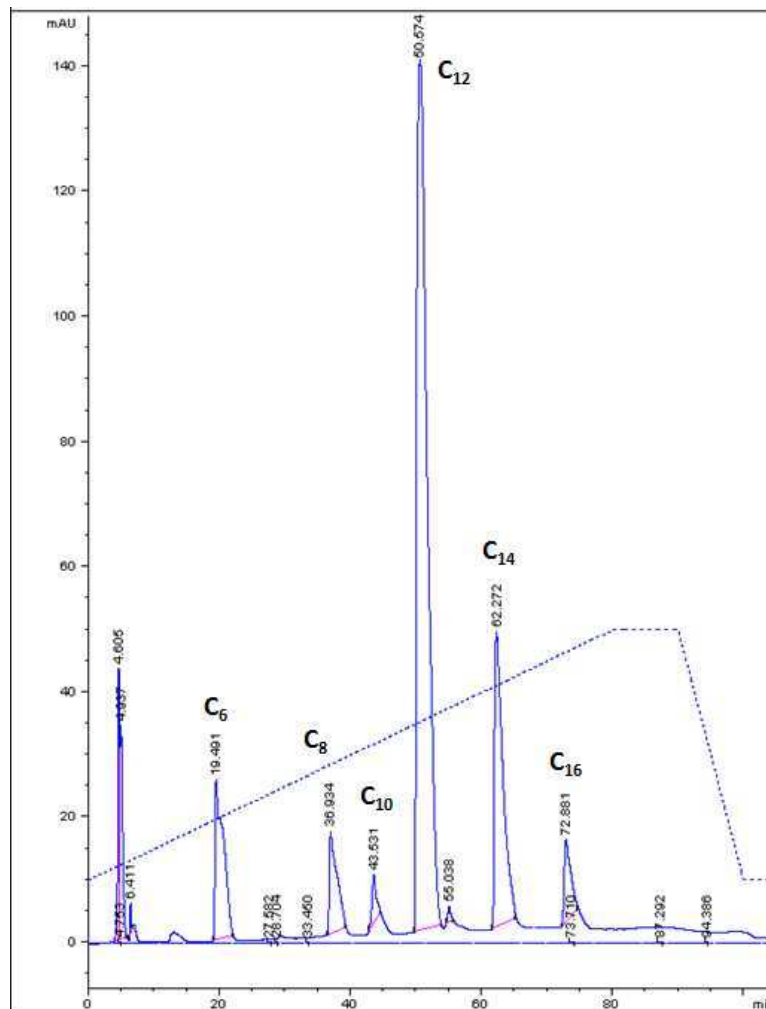


Abbildung 44: HPLC-Analyse von Plantapon.

Die gestrichelte Linie stellt den Gradienten der verwendeten Methode dar. Die Auftrennung der einzelnen Fettsäuren erfolgte erwartungsgemäß nach steigender Länge der Kohlenstoffkette.

Das Elutionsprofil der HPLC entsprach erwartungsgemäß dem der gaschromatografischen Analysen und konnte für die Fettsäuren C₆ – C₁₆ zuverlässig erfolgen.

3.5.2. Subtilisin-katalysierte *N*-Acylierung von Glutamatdiethylester mit Ethylhexanoat

Nachdem die Analytik erfolgreich etabliert war, wurde mit den Acylierungsversuchen begonnen. Da Glutamat die einzige der in den Peptidsynthesen eingesetzten Aminosäuren war, die nicht über die Schotten-Baumann-Reaktion acyliert werden konnte, wurde in den enzymatischen Acylierungen mit Glutamatdiethylester als Acylakzeptor begonnen. Die Acylierung wurden zwar zum Teil über einen

längeren Zeitraum als 46 h durchgeführt, allerdings lassen spätere Analysen aufgrund der Volumenabnahme keine gezielten Aussagen mehr zu. Deshalb sind in den nachfolgenden Diagrammen nur die Zeitpunkte $t = 0, 22$ und 46 h aufgeführt.

Abbildung 45 und Abbildung 46 zeigen die Entwicklung der Substratkonzentration während der 46 h Versuchslaufzeit bei den Acylierungen mit den Subtilisinen P125 bis P128 (siehe Tabelle 3) als Katalysator. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Enzym mitinkubiert.

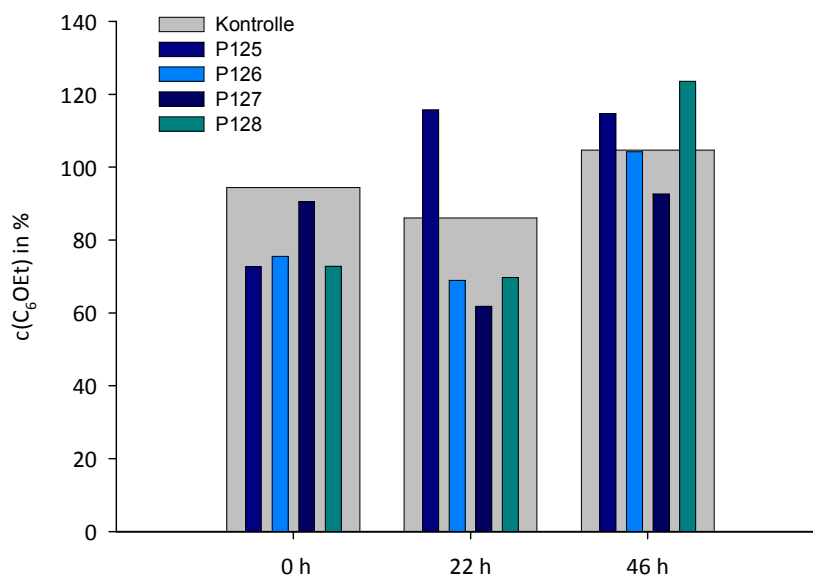


Abbildung 45: Ethylhexanoat-Konzentrationen der enzymatischen Acylierungen nach 0, 22 und 46 h in 100 % Aceton.

Mit Ausnahme des Ansatzes mit P127 und der Kontrolle konnte die Ausgangskonzentration an Ethylhexanoat nicht vollständig nachgewiesen werden und lag nur bei ca. 75 %. Nach 22 h war für P125 ein deutlicher Anstieg um fast 50 % im Vergleich zur Ausgangskonzentration zu beobachten, während bei P127 ein deutlicher Konzentrationsabfall auftrat. Die beiden übrigen bleiben nahezu auf dem ursprünglichen Niveau. Die Kontrolle sank ebenfalls leicht ab. Nach 46 h erhöhte sich in allen Ansätzen die Konzentration im Vergleich zur vorherigen Probe und lag mit Ausnahme von P127 über 100 %.

Mit Ausnahme vom Ansatz mit P127, der über 100 % lag, konnte für alle die Ausgangskonzentration an GludiOEt bei der 0 h Probe (Abbildung 46) nachgewiesen werden. Auch bei Bestimmung der Ausgangskonzentration von Ethylhexanoat (Abbildung 45) zeigte der Ansatz mit P127 ein anderes Bild als die übrigen. Diesmal konnten für den P127-Ansatz als einzigen annähernd 100 % erreicht werden, während die anderen Ansätze alle deutlich darunter lagen (ca. 75 %). Nach 22h blieb die Ethylhexanoatkonzentration für P126 und P128 auf dem Ausgangsniveau. Die Konzentration an GludiOEt zeigte für diese beiden Ansätze kaum eine Veränderung. Der P125 Ansatz besaß nach 22 h

eine erhöhte Ethylhexanoat- und eine leicht erniedrigte GludiOEt-Konzentration. Bei P127 nahm sowohl die Fettsäureesterkonzentration als auch die GludiOEt-Konzentration im Vergleich zur 0 h Probe deutlich ab. Nach 46 h lagen alle Ansätze sowie die Kontrolle in ihrer GludiOEt-Konzentration weit über 100 %. Ähnliches galt auch für die Ethylhexanoatkonzentrationen die bis auf den Ansatz mit P127 alle bei 100 % oder höher lagen.

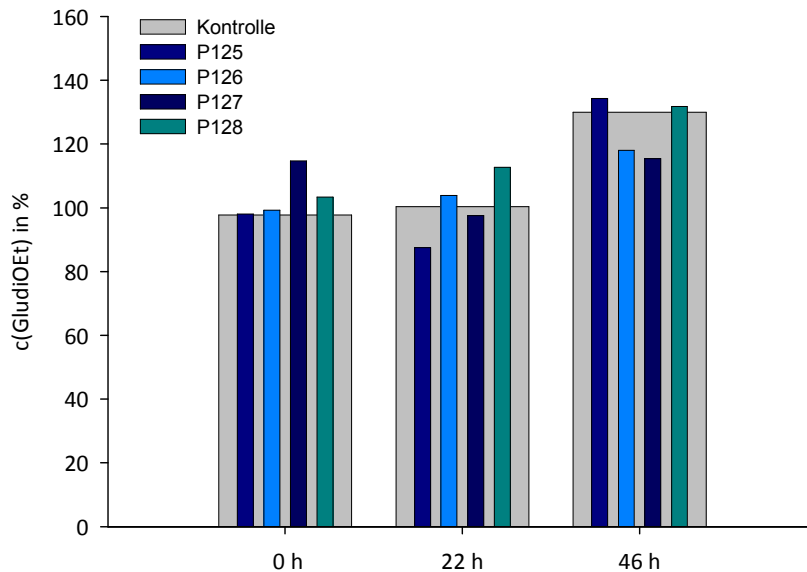


Abbildung 46: Glutamatdiethylester-Konzentrationen der enzymatischen Acylierungen nach 0, 22 und 46 h in 100 % Aceton.

Die Konzentration an GludiOEt wurde zu Reaktionsbeginn in allen Ansätzen, mit Ausnahme von P127 (ca. 120 %) sowie der Kontrolle vollständig nachgewiesen. Nach 22 h nahmen lediglich die Konzentrationen in P125 und P127 ab, während die Kontrolle und die übrigen Ansätze unverändert im Vergleich zur 0 h Probe vorlagen. Nach 46 h lagen die Konzentrationen aller Ansätze sowie der Kontrolle über 100 %.

Bei den Ansätzen in denen die Acetonkonzentration nur 80 % betrug, zeigte sich ein verändertes Bild im Vergleich zu den Ansätzen in reinem Aceton. Für die 0 h Probe konnte für die Ansätze mit Enzym (P125 – P128) als auch die Kontrolle nahezu das komplette eingesetzte Ethylhexanoat (Abbildung 47) nachgewiesen werden. Bei der GludiOEt-Konzentration (Abbildung 48) wurde zwar für alle Ansätze die gleiche Konzentration wie für die Kontrolle erreicht, allerdings lag deren Wert nur bei ca. 75 %. Nach 22 h nahmen die Ethylhexanoat Konzentrationen aller Ansätze inklusive Kontrolle leicht ab, lagen aber alle auf einem ähnlichen Niveau. Mit Ausnahme des Ansatzes mit P125 war für die Konzentration von GludiOEt keine große Veränderung im Vergleich zur 0 h Probe auszumachen. Die Konzentration in der Kontrolle sank hingegen leicht ab auf ca. 70 %. Im erwähnten Ansatz mit P125

sank die Konzentration um ca. 20 % von knapp unter 80 auf 60 % ab. Nach 46 h stiegen die Konzentrationen in den Kontrollen bei Ethylhexanoat und GludiOEt wieder auf den Wert der 0 h Probe an. Für Letzteres galt dies auch für die Ansätze P126 – P128. Lediglich der Ansatz mit P125 sank weiter ab und lag nur noch bei knapp 45 %. Auch die Konzentration an Ethylhexanoat sank für diesen Ansatz weiter ab, während die übrigen Ansätze wieder auf das Ausgangsniveau bei 0 h stiegen (P127) oder im Vergleich zur 22 h Probe keine Veränderungen aufzeigten (P126 und P128).

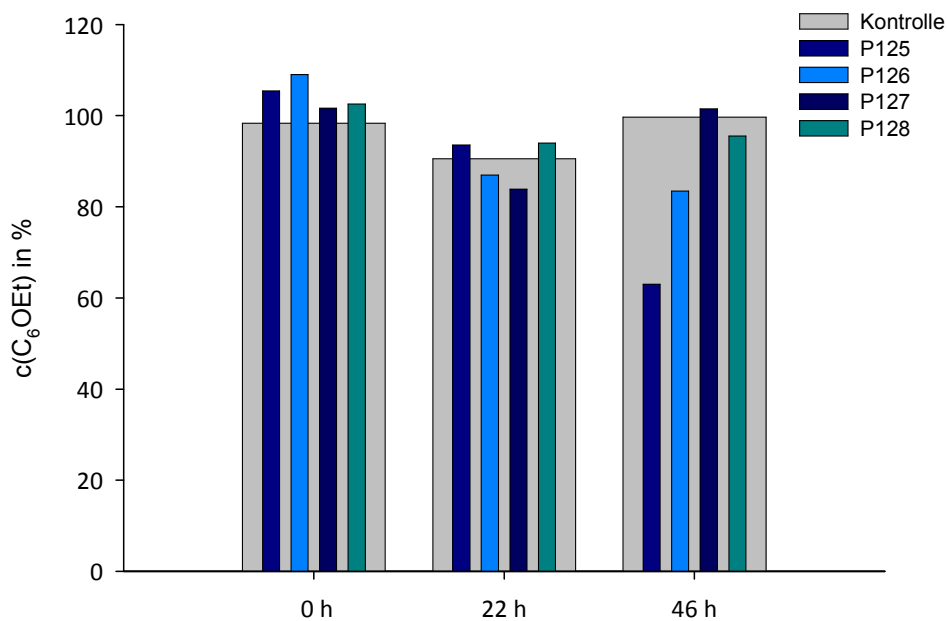


Abbildung 47: Ethylhexanoat-Konzentrationen der enzymatischen Acylierungen nach 0, 22 und 46 h in 80 % Aceton.

Bei 0 h Probe wurde für alle Ansätze und die Kontrolle die Ausgangskonzentration von Ethylhexanoat oder leicht erhöhte Konzentrationen nachgewiesen. Nach 22 h nahm die Konzentration aller Proben und der Kontrolle leicht ab, blieben aber auf nahezu einem Niveau. Bei der letzten Probe nach 46 h stiegen die Konzentrationen der Kontrolle und des Ansatzes mit P127 wieder auf die Konzentration zu Reaktionsbeginn an. Bei den Ansätzen mit P126 und P128 blieben die Konzentrationen auf dem Niveau der 22 h Probe. Einzig im P125-Ansatz sank die Ethylhexanoatkonzentration weiter ab.

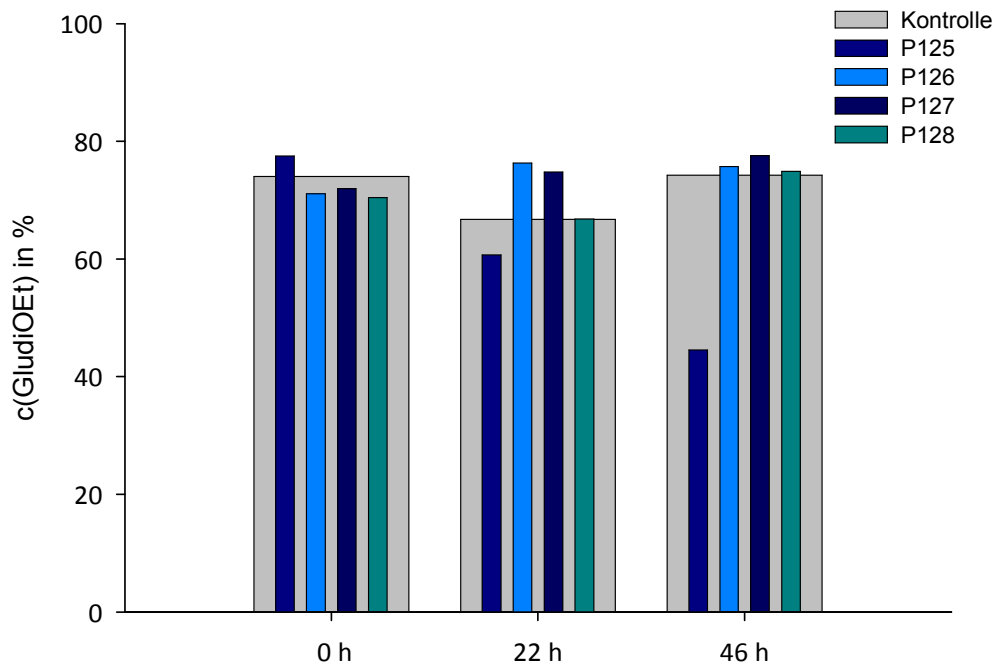


Abbildung 48: Glutamatdiethylester-Konzentrationen der enzymatischen Acylierungen nach 0, 22 und 46 h in 80 % Aceton.

Für alle Ansätze sowie die Kontrolle wurden nahezu die identischen Konzentrationen zu Reaktionsbeginn (0 h) nachgewiesen, die allerdings nur bei ca. 75 % der eingesetzten Ausgangskonzentration lagen. Während für die Ansätze P126 – P128 nur leichte Konzentrationszu- bzw. -abnahmen auftraten, zeigte sich bei P125 eine deutliche Abnahme. Dies setzte sich für P 125 auch nach 46 h fort, während die übrigen Ansätze inklusive der Kontrolle auf den Konzentrationsbereich zu Reaktionsbeginn anstiegen.

4. Diskussion

4.1. Enzym-katalysierte Peptidsynthese

4.1.1. Enzymatische Synthesen von Homooligopeptiden

Bereits in den frühen 50er Jahren wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen über enzymkatalysierte Synthesen polymerer Peptide berichtet. Unter Verwendung von α -Chymotrypsin gelangten Brenner *et al.* ausgehend von Esterderivaten der Aminosäuren Tyrosin, Methionin und Threonin zu den entsprechenden Di- und Tripeptiden [36, 81, 82]. Dannenberg *et al.* verwendeten Proteinase I aus der Rinderlunge zur Polymerisierung von Leucin- und Phenylalaninestern oder -amiden [83]. Ebenso sind Oligomerisierungen von Glutamatdiethylester mehrfach in der Literatur zu finden [66, 84]. Als Katalysatoren wurden Enzyme aus der Klasse der Serin- (Chymotrypsin) oder Cysteinproteasen (Papain, Bromelain, Ficin, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden) verwendet, die zusammen mit aktivierten Carboxylkomponenten (Aminosäureester, -amide) eine kinetisch kontrollierte Peptidsynthese bzw. Oligomerisierung durchführen können. Da die eingesetzten Aminosäureester sowohl als Acyldonor zur Bildung des Acyl-Enzym-Intermediates als auch als Acylakzeptor, der das Intermediat deacyliert, fungieren können und daraus ein Peptid mit aktivierter Carboxylfunktion resultiert, kann eine fortschreitende Oligomerisierung stattfinden (siehe Abbildung 7) [66]. Werden dabei Ester hydrophober Aminosäuren oder hydrophobe Aminosäurederivate verwendet, präzipitiert das entstehende Oligopeptid aufgrund der ansteigenden Hydrophobizität [85]. Dies macht eine genauere qualitative Analyse über flüssigkeitschromatografische Methoden wie GPC oder HPLC unmöglich.

In dieser Arbeit wurden Homooligopeptide der Ethylester von Leucin, Tyrosin, Methionin und Glutamat hergestellt, wobei letztere neben der veresterten α -Carboxylgruppe zusätzlich eine veresterte Seitenkette trug, welche die eigentlich hydrophile Seitenkette hydrophob werden ließ. Da zu Beginn dieser Arbeit die enzymatische Oligomerisierung von Aminosäureestern zu Oligopeptiden erst etabliert werden musste und Papain bereits mehrfach als Katalysator für Homooligomerisierungen beschrieben ist, wurde es auch in den vorliegenden Experimenten verwendet. Die in Tabelle 29 aufgeführten prozentualen Ausbeuten an präzipitierten Oligopeptiden bezogen sich auf das eingesetzte Monomergewicht der Aminosäureester. In der Homooligomerisierung von Oligoleucin betrug die Ausbeute 28,3 % (w/w) (Oligomerisierungsausbeuten werden in 4.1.1. immer als Massenprozent angegeben), was im

Vergleich mit anderen Veröffentlichungen trotz vergleichbarer Bedingungen weniger als der Hälfte entsprach [34]. Bei Oligotyrosin lag die Ausbeute mit 28,3 % annähernd bei dem in der Literatur angegebenen Wert von 30 % [86]. Die beschriebenen Ausbeuten von Oligomethionin liegen je nach verwendetem Puffer zwischen 16 und 96 % [35, 38]. In dieser Arbeit wurden bei pH 7,8 Ausbeuten von 67,9 % erzielt, was in der Größenordnung der von Jost *et al.* veröffentlichten Ausbeute von 61 % bei pH 7 lag. Über die Oligomerisierung von Methionin bei pH 5,5 wurden von Jost *et al.* sowie Anderson *et al.* unterschiedliche Ausbeuten von 50 bzw. 96 % berichtet [35, 38], wobei letztere zu den in dieser Arbeit erreichten 91 % kongruent ist. Für Oligoglutamat werden von Aso *et al.* und Uemura *et al.* übereinstimmend Präzipitatusbeuten von 42 % berichtet [75, 84], während Li *et al.* sowie Uyama *et al.* Ausbeuten von ≥ 60 % bei einem pH-Wert zwischen 5,5 und 8,5 beschreiben [66, 87]. Letztere Ausbeuten decken sich mit den in dieser Arbeit erreichten 58 % Präzipitat.

Tabelle 29: Übersicht und Literaturvergleich der in dieser Arbeit hergestellten Homooligopeptide.

Oligopeptid	Ausbeute [%]	Ausbeute [%]	Quelle
		Literatur	
OligoGluOEt	58	42; ≥ 60	[75, 84]; [66, 87]
OligoMet	67,9; 91	16 – 96 %	[35, 38]
OligoLeu	23,3	55	[34]
OligoTyr	28,3	30	[86]

Um eine genauere qualitative Aussage über die entstanden Oligopeptide, wie z. B. Kettenlänge, machen zu können, mussten die Oligopeptide wieder löslich gemacht werden. Im Falle von OligoGluOEt ist eine alkalische Hydrolyse der Estergruppen mit 1 M NaOH als Möglichkeit zur Solubilisierung der Oligopeptide mehrfach publiziert [74, 86] (Abbildung 49). Folglich sollte dieses wieder löslich und über Gelpermeationschromatografie analysierbar sein, während Oligoleucin und Oligomethionin dadurch nicht löslich gemacht werden können. Vor der Injektion wurden die Proben durch eine 0,2 μm Membran filtriert, wodurch noch vorhandenes Präzipitat zurückgehalten wurde. Die beim Projektpartner (BASF Personal Care und Nutrition, ehemals Cognis GmbH) durchgeführten GPC-Analysen (Abbildung 15) zeigten erwartungsgemäß für Oligoleucin und Oligomethionin keine Peaks, die als Peptide hätten identifiziert werden können (Abbildung 15 a und c). Für Oligotyrosin führt eine Alkalisierung mit 1 M NaOH zur Deprotonierung der Carboxylgruppe und der Carbonylgruppen an den Phenylringen ($\text{pK}_{\text{Ph-OH}}$: 10,07, [88]) und somit zu einem Polyanion, das

letztlich wasserlöslich ist. Die GPC von Oligotyrosin (Abbildung 15 b) brachte allerdings trotz Alkalisierung keine auswertbaren Ergebnisse hervor, die auf eine erfolgreiche Oligomerisierung schließen ließen, geschweige denn eine qualitative Aussage ermöglichen. Ursachen hierfür könnten in der Versuchsdurchführung liegen, da die GPC-Analysen in rein wässrigem Laufmittel durchgeführt wurden und somit ein pH-Wert von 7 vorlag. Bei diesem pH waren die Carbonylgruppen an den Seitenketten wieder protoniert und Oligotyrosin besaß nur noch eine freie, endständige Carboxylgruppe, die höchstwahrscheinlich nicht zur Solubilisierung ausreichte, so dass Oligotyrosin wieder präzipitierte und nicht analysiert werden konnte.

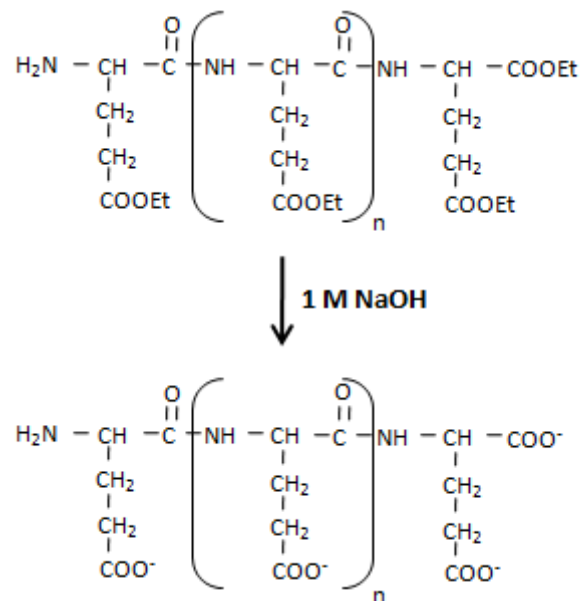


Abbildung 49: Schematische Darstellung der alkalischen Hydrolyse von OligoGluOEt und dem daraus folgenden Poly-anion OligoGlu (n = 5 – 8 Glutamatreste).

Bei dem in Abbildung 16 gezeigten Chromatogramm von OligoGlu trat zwischen 30 und 35 min Retentionszeit ein deutlicher Peak auf, der bei 31,91 min eine Schulter besaß, die laut Kalibrierung (Cognis GmbH) einer molaren Masse von 2.626 g/mol zuzuordnen ist. Die Peakspitze nach 32,67 min entspricht einer Masse von 2.151 g/mol. Die Molekulargewichte zu den angegebenen Retentionszeiten stellen allerdings nur einen Mittelwert der tatsächlich vorhandenen Moleküle dar [89] und es kann davon ausgegangen werden, dass eine wesentlich größere Verteilung vorlag, die aber nicht genau bestimmt werden konnte. Basierend auf diesen beiden Molekulargewichten konnten für Oligoglutarat Kettenlängen zwischen mindestens 17 und 20 Aminosäureeinheiten nachgewiesen werden.

4.1.2. Bromelain und Ficin-katalysierte OligoGluOEt-Synthese unter modifizierten Reaktionsparametern

Da in Absprache mit dem Projektpartner Peptide mit einem Molekulargewicht von ca. 1 kDa hergestellt werden sollten, war diese Art der Oligomerisierung aufgrund des hohen Molekulargewichts nicht zielführend.

Für die Synthese von OligoGluOEt sollte durch Modifikationen der Versuchsparameter Reaktionszeit, -temperatur und Katalysatorkonzentration, sowie durch Verwendung der Proteasen Bromelain und Ficin, Einfluss auf die entstehenden Peptidketten genommen werden. Dabei sollte zunächst die Präzipitatusbeute verringert werden, da darin die langkettigen Peptide enthalten sind, während der Reaktionsüberstand die löslichen kürzeren Oligopeptide enthält. Beide verwendeten Enzyme gehören wie Papain zur Peptidase Familie C1 [90] und katalysieren somit Reaktionen ähnlich zu Papain. Für Bromelain wurden bereits erfolgreiche Oligomerisierungen von GluDiOEt publiziert [73] und auch Ficin wurde schon erfolgreich, wenn auch nicht in Oligomerisierungsreaktionen, zur Synthese von Dipeptiden verwendet [91]. Als Ausgangspunkt für die Modifikationen dienten die Bedingungen der Papain-katalysierten Synthese mit 40 °C Reaktionstemperatur, 20 mg/ml Katalysator und einer leicht erhöhten Reaktionszeit von 30 min.

4.1.2.1. Einfluss der Reaktionszeit auf Bromelain-katalysierte Peptidsynthesen

In den Bromelain-katalysierten Reaktionen fiel auf, dass unter den Ausgangsbedingungen (40 °C, 30 min) im Vergleich zu Papain (58 %) viel weniger Präzipitat (8,5 %; Mittelwert aus den drei Ausgangsreaktionen bei den Reaktionsparametern Zeit, Temperatur, Enzymmenge) gebildet wurde, gleichzeitig aber auch sehr viel unverbrauchtes Substrat (53,6 %) vorlag. Da für Bromelain eine Temperatur- sowie pH-Stabilität unter den verwendeten Bedingungen beschrieben ist [92], kann der Unterschied nur auf einen unterschiedlichen Reinheitsgrad der Fermente oder auf eine unterschiedliche spezifische Aktivität gegenüber GluDiOEt herrühren. Sowohl die Enzympräparation von Papain als auch von Bromelain besaßen mit 41 bzw. 43,9 % einen vergleichbaren Proteinanteil. Nach Li *et al.* liegt die Ausbeute für die Bromelain-katalysierte Synthese von Oligoglutamat bei pH 8 bei ca. 80 % [73]. Allerdings wurde für diesen Versuch eine vierstündige Reaktionszeit angegeben, während für die ebenfalls von Li *et al.* veröffentlichte Oligoglutamatsynthese mit Papain bei identischer Substratmenge eine Ausbeute von 60 % nach bereits 20 min erreicht wurde [66]. Somit kann Bromelain die Reaktion zwar katalysieren, jedoch mit einer wesentlich geringeren Aktivität. Die immer geringer werdende Präzipitatumenge bei sinkender Reaktionszeit und der gleichzeitige Anstieg der Menge an unverbrauchtem Substrat (GluDiOEt) auf bis zu 68 % untermauern diese Annahme (Tabelle 16). Dennoch wurden zwischen 36,9 und 46,4 % des Substrates zu löslichen Peptiden umgesetzt, die laut GPC-Analyse unabhängig von der Reaktionszeit alle eine molare Masse um die

1.140 g/mol besaßen. Umgerechnet auf die Masse eines Glutamatrestes (157 g/mol) in der Peptidkette kommt man auf eine Kettenlänge von 7 Aminosäuren, die jeweils eine veresterte Seitenkette trugen. Übereinstimmend wird sowohl von der Gruppe von Uyama *et al.* als auch von Li *et al.* eine Kettenlängenverteilung von 7 bis 11 Aminosäuren für die hydrolysierten Präzipitate von Oligoglutamat angegeben [66, 87]. Da es sich bei den Molmassen der GPC-Daten um Zahlenmittel der tatsächlich vorhandenen Molmassen handelt [89], konnte von einer größeren Peptidverteilung ausgegangen werden.

4.1.2.2. Einfluss der Reaktionstemperatur auf Bromelain-katalysierte Peptidsynthesen

In den Versuchen bei unterschiedlichen Temperaturen zeigte sich ebenfalls ein Abfall der Präzipitatenmenge bei sinkender Reaktionstemperatur (Tabelle 17), jedoch keine wesentliche Erhöhung des Anteils an unverbrauchtem Substrat, der in allen Versuchen zwischen 52,6 und 66,6 % lag. Zunächst sank mit der Temperatur auch die Menge an löslichem Peptid (30,6 % bei 10 °C), ehe sie bei 4 °C stark anstieg (43,5 %). Da Bromelain sein Temperaturoptimum bei 60 °C besitzt [93], wirkt sich eine Temperaturerniedrigung drastisch auf die Reaktivität des Enzyms aus. Dennoch kommen enzymatische Reaktionen selbst bei sehr niedrigen Temperaturen oder gar in gefrorenen Medien nicht gänzlich zum Erliegen [94] und sind gerade bei Verwendung des kinetisch kontrollierten Syntheseansatzes für die Peptide beschrieben [95, 96]. Durch das Gefrieren wird dem Reaktionsansatz Wasser ($C_{\text{End}} \leq 0,1 \%$) entzogen und Substrat und Enzym werden in sehr kleinen Reaktionsräumen aufkonzentriert [97]. Zwar lag bei 4 °C kein gefrorener Zustand vor, dennoch wurde die Lösung aufgrund der ansteigenden Viskosität von Flüssigkeiten bei fallender Temperatur immer starrer [98]. Beispielsweise besitzt Wasser bei 25 °C eine Viskosität η von 0,891 mPa*s und bei 5 °C von 1,52 mPa*s [99]. Durch die erhöhte Viskosität nahm die Durchmischung des Ansatzes ab. Da sich die entstandenen Peptide und das Enzym aufgrund ihrer Größe bei diesen Bedingungen träger verhalten als die GludiOEt-Monomere, verblieben sie länger in räumlicher Nähe und konnten öfter miteinander reagieren. Damit lässt sich auch erklären, warum trotz sinkender Aktivität bei fallender Temperatur die Masse der löslichen Peptide von 980 auf 1.400 Da und folglich eine Zunahme der Kettenlängen von 6 auf 9 Glutamatreste zu beobachten war.

4.1.2.3. Einfluss der Enzymmenge auf Bromelain-katalysierte Peptidsynthesen

Bei Erhöhung der eingesetzten Katalysatormenge von 20 auf 50 mg/ml stieg erwartungsgemäß der Anteil an präzipitiertem Oligopeptid, während gleichzeitig die Konzentration an unverbrauchtem GludiOEt kontinuierlich abnahm (Tabelle 18). Die Konzentration an löslichem Oligopeptid verhielt sich jedoch nicht linear und stieg zunächst auf 46,4 % des eingesetzten GludiOEt bei 30 mg/ml Bromelain an, ehe ein deutlicher Abfall auf 31,7 % bei 50 mg/ml Bromelain folgte. Dies spricht dafür,

dass bei 50 mg/ml eine Inhibierung der Protease durch die hohe Präzipitatkonzentration vorliegt (Produkthemmung) [100] und dadurch weniger lösliches Peptid gebildet wird. Wie schon im Zeitversuch hatte die Enzymmenge keinen Einfluss auf die Größe der löslichen Oligopeptide, die alle wieder eine molare Masse um die 1.140 Da besaßen.

4.1.2.4. Einfluss der Reaktionszeit auf Ficin-katalysierte Peptidsynthesen

Auch in der Ficin-katalysierten Reaktion zeigten sich bei den Ausgangsbedingungen (40 °C, 30 min, 20 mg/ml Enzym) sowohl zur Papain als auch zur Bromelain-katalysierten Reaktion deutliche Unterschiede. Im Mittel der drei Reaktionsreihen wurden bei den Ausgangsbedingungen ca. dreiviertel des Substrates (75,7 %) zu unlöslichen Oligopeptiden umgewandelt, so dass bei vollem Substratumsatz maximal 25 % an löslichem Peptid entstehen konnten. Die Reaktionen wurden bei einem pH-Wert von 7 durchgeführt, bei dem auch eine maximale Hydrolyseaktivität beschrieben ist [101]. Auch Peptidsynthesen mit Ficin bei pH 7,8 sind bekannt [102]. Da der Proteingehalt des Enzympräparates mit 24,9 % deutlich geringer war als bei Papain (41 %) und Bromelain (43,9 %), kann der erhöhte Umsatz nur aus der erhöhten Aktivität von Ficin gegenüber GludiOEt resultieren. Eine schrittweise Absenkung der Reaktionszeit auf 5 min hatte keinen Einfluss auf die Präzipitattmenge (Tabelle 16), so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Reaktion bereits nach 5 min in eine Sättigung übergeht und die Reaktion zum Erliegen kommt. In Homooligomerisierungen von GludiOEt mit Papain wurde eine solche Sättigung bereits beschrieben [66]. Während des Zeitversuchs wurden Ausbeuten an löslichem Peptid zwischen 12,8 und maximal 16,9 % erreicht, was deutlich weniger als in Bromelain-katalysierten Zeitversuchen, aber aufgrund der starken Präzipitattbildung nicht überraschend war. Die molaren Massen der löslichen Peptide lagen jeweils bei ca. 1.000 Da und somit im anvisierten Größenbereich.

4.1.2.5. Einfluss der Reaktionstemperatur auf Ficin-katalysierte Peptidsynthesen

Aufgrund der starken Umsatzrate von GludiOEt zu unlöslichem Oligopeptid unabhängig von der Reaktionszeit wurde bereits bei den Untersuchungen des Temperatureinflusses die Enzymkonzentration auf 5 mg/ml gesenkt. Außerdem wurden als Reaktionszeiten 5 min und 30 min verwendet. Die Ergebnisse der beiden Zeiten bei identischen Temperaturen sind nahezu deckungsgleich (Tabelle 17), was bestätigt, dass die Ficin-katalysierte Reaktion bereits nach 5 min in die Plateauphase überging. Bei Temperaturen ≤ 10 °C war für die 30 minütigen Reaktionen eine leichte Verringerung der Präzipitattmenge auf knapp unter 70 % zu beobachten. Das Temperaturoptimum von Ficin liegt für die Hydrolyse von Casein bei 60 °C [103]. Anders als im Temperaturversuch der Bromelain-katalysierten Synthesen gab es hier keine Änderungen bei der

Konzentration an löslichem Peptid oder der Kettenlänge. Unabhängig von der Temperatur lagen die Peptide bei Molekülmassen zwischen 1.300 und 1.400 Da.

4.1.2.6. Einfluss der Enzymmenge auf Ficain-katalysierte Peptidsynthesen

In der Versuchsreihe zur Untersuchung des Einflusses der Enzymkonzentration (Tabelle 18) wurde aufgrund der hohen Präzipitatmenge die Reaktionszeit auf 5 min und die –temperatur auf 4 °C gesenkt. Folglich sollten bei 5 mg/ml Ficain identische Bedingungen zum Temperaturversuch bei 4 °C herrschen, also auch die verschiedenen Konzentrationen vergleichbar sein. Die erhaltene Präzipitatmenge war mit 9,8 % allerdings mehr als siebenmal geringer als im Temperaturversuch (ca. 70 %), während die Mengen an unverbrauchtem GludiOEt (43,4 %) mehr als doppelt (16,6 %), die an löslichem Peptid (46,8 %) gar mehr als dreimal so hoch waren (15,8 %). Es fiel weiterhin auf, dass in der Ausgangsreaktion mit 20 mg/ml Ficain, die gebildete Präzipitatmenge wie auch bisher bei ca. 70 % lag, aber kein unverbrauchtes Substrat nachgewiesen werden konnte. Mit sinkender Enzymkonzentration kam es zu einem deutlichen Abfall der Präzipitatmenge und einem starken Anstieg in der GludiOEt-Konzentration (Abbildung 23). Gleichzeitig waren die Konzentrationen an löslichem Peptid mit 30,2 - 46,8 % deutlich höher als in den Versuchen zuvor, eine Tendenz jedoch nicht erkennbar. Die Molekulargewichte lagen wieder bei ca. 1.140 Da. Möglicherweise sind bei dieser Versuchsreihe Fehler bei der Herstellung der Enzymstammlösung durch bspw. falsche Einwaage oder Verdünnung aufgetreten. Untermuert wird diese Vermutung durch den Versuch mit 5 mg/ml Ficain, der vergleichbare Resultate zum Temperaturversuch bei 4 °C liefern sollte, bei dem aber nur 9,8 % Präzipitat entstanden. Durch die daraus resultierende sehr geringe Enzymkonzentration könnte es aufgrund der hohen GludiOEt-Konzentration zu Reaktionsbeginn (500 mM) zur Substratinhibierung gekommen sein [104].

Die durchgeführten Modifikationen führten unabhängig vom verwendeten Katalysator zu löslichen Peptiden mit einer Kettenlängen zwischen 1.000 und 1.400 Da. Ficain zeigte eine sehr starke Syntheseaktivität, was sich in einer starken Präzipitatbildung niederschlug. Bromelain synthetisierte wesentlich langsamer und die Reaktion ließ sich über die Modifikationen gut steuern. Die Präzipitatbildung lag in keinem Versuch über 20 % (Ausnahme: Enzymkonzentration 50 mg/ml), was Bromelain zu einem guten Katalysator zur Synthese kurzkettiger Peptide machte. Allerdings zeigten MALDI-ToF/MS-Analysen der Präzipitate Papain-katalysierter Synthesen, die zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit durchgeführt wurden, eine völlig andere Massenverteilung als die GPC-Analysen.

Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, lag die tatsächliche Kettenlängenverteilung zwischen 5 und 10 Glutamatresten (MW = 129 Da) bei einer molaren Masse zwischen 780 und 1600 Da. Diese

Verteilung deckte sich mit den Werten aus der Literatur, die übereinstimmend Polymerisierungsgrade (DP) zwischen 7 und 11 Glutamatresten beschreiben [66, 87]. Die Peaks innerhalb eines DP konnten den C-terminal veresterten und den freien Peptiden, sowie Natriumaddukten zugeordnet werden, was für andere Peptide bereits veröffentlicht ist [105]. Die jeweiligen Peaks lagen jeweils um 129 Da von Peaks gleicher Gattung des benachbarten Polymerisierungsgrades entfernt, was genau einem Glutamatrest entspricht. Da die Präzipitate tatsächlich kleiner waren als ursprünglich angenommen, brauchten keine Synthesen unter modifizierten Bedingungen durchgeführt zu werden. In Synthesen zur Herstellung von Homooligoglutamat wurde aufgrund der hohen Syntheseaktivität künftig allerdings Ficain anstelle von Papain verwendet.

4.2. Enzymatische Synthese von Heterooligopeptiden

4.2.1. Anionische Heterooligopeptide

Neben den bereits beschriebenen Modifikationen zur Synthese kurzkettiger Homooligopeptide mit einem Molekulargewicht ≤ 1 kDa, war ein weiterer Ansatzpunkt zur Reduzierung der Kettenlänge die Cooligomerisierung mit einer zweiten hydrophoben Aminosäure. Dies sollte in den sogenannten Heterooligomerisierungen aufgrund der höheren Hydrophobizität zu einer früheren Präzipitation und somit zu kürzeren Peptidketten führen. Da die Präzipitate der Homooligopeptide von OligoMet und OligoLeu extrem hydrophob waren und auch durch alkalische Hydrolyse nicht wieder wasserlöslich gemacht werden konnten, ergab sich durch eine Cooligomerisierung mit GludiOEt Peptide mit Leucin- und Methioninresten in Lösung zu bringen und analysierbar zu machen. Eine solche Strategie wurde bereits von Daabees *et al.* verwendet um die Löslichkeit von Tyrosin zu erhöhen [106]. Da die durchgeführten Homooligomerisierungen bei nahezu identischen Reaktionsbedingungen abliefen (Tabelle 13) sollte auch eine Heterooligomerisierung unter diesen Bedingungen durchführbar sein. In der Literatur wurden bereits verschiedene Heterooligopeptide erfolgreich mit Papain als Katalysator synthetisiert. So publizierten Li *et al.* über die erfolgreiche Heterooligomerisierung von GludiOEt mit LeuOEt bei pH 8 mit Ausbeuten zwischen 36 und 83 % in Abhängigkeit des Monomerverhältnisses [73]. Uyama *et al.* untersuchten die Heterooligosynthesen von GludiOEt und MetOEt und gelangten ebenfalls in Abhängigkeit des eingesetzten Monomerverhältnisses zu Ausbeuten zwischen 61 und 84 % [87]. Erst kürzlich veröffentlichten Schwab *et al.* über Heterooligomerisierungen mit den hydrophoben Aminosäuren Tyrosin, Leucin, Phenylalanin und Tryptophan [34].

In dieser Arbeit wurden Heterooligopeptide von GludiOEt mit LeuOEt und MetOEt synthetisiert, bei denen die Monomere in gleicher Konzentration eingesetzt wurden. Die Ausbeuten lagen mit 14,2 % (w/w) (Tabelle 19) für OligoGlu/Leu deutlich unter den o. g. Werten aus der Literatur (68 %, [73]). Zwar war dort die Reaktionszeit mit 240 Minuten doppelt so lange, dennoch war ein Anstieg auf die dort erzielte Produktausbeute selbst bei Verlängerung der Reaktionszeit sehr unwahrscheinlich. Bereits in den Homooligomerisierungen wurden im Falle von OligoLeu nicht die Ausbeuten aus der Literatur erreicht, während die Synthese von Oligoglutamat vergleichbare Ausbeuten erzielte (vgl. 4.1). In den Heterooligomerisierungen wurde allerdings der gleiche pH-Wert wie in den Synthesen von OligoLeu verwendet (8,5). Die Erhöhung des pH-Wertes könnte sich nachteilig auf die Reaktivität von GludiOEt ausgewirkt haben, wengleich beschrieben ist, dass sich ein alkalischer pH-

Wert positiv auf die Reaktion auswirkt, da in dem Falle die meisten α -Aminogruppen ungeladen vorliegen und so ein nukleophiler Angriff an die Carbonylgruppe vereinfacht wird [107, 108].

Die Heterooligomerisierungen von GluIOEt und MetOEt ergaben Ausbeuten von 62 % (w/w) bei Verwendung eines Phosphatpuffers mit pH 7,8 und 69,9 % (w/w) für Oligomerisierungen in einem Citratpuffer pH 5,5. Bei gleichem Monomerverhältnis werden in der Literatur Ausbeuten von 76 % nach 30 min und 78 % nach 180 min Reaktionszeit bei einem pH-Wert von 7 erzielt. Der Unterschied in der Reaktionszeit und im pH-Wert könnte bereits ausreichend sein um die Abweichung in der Reaktionsausbeute zu erklären [35]. Der Anstieg in der Ausbeute durch Verwendung eines Citratpuffer mit pH 5,5 ist, wie schon in den Homooligomerisierungen, wahrscheinlich auf die erhöhte Reaktivität des Methionins unter diesen Bedingungen zurückzuführen [109].

Die Löslichkeit beider Präzipitate nach alkalischer Hydrolyse mit 1 M NaOH gab einen ersten Hinweis darauf, dass Glutamatreste Bestandteil der präzipitierten Peptide waren. Die erhöhten Hydrolysezeiten (Tabelle 5) im Vergleich zu OligoGluOEt deuteten auf die erfolgreiche Synthese von Mischpeptiden hin. Mit den löslichen Oligopeptiden wurden beim Projektpartner GPC-Analysen durchgeführt (Abbildung 24 und Abbildung 26), die mittlere Molekulargewichte von 1.529 Da für OligoGlu/Leu und 1.269 Da für OligoGlu/Met angaben. Ausgehend von einem gleichmäßigen Einbau beider Monomere wäre die mittlere molare Masse eines Aminosäurerestes bei OligoGlu/Leu 121 Da (Leu: 113 Da; Glu: 129 Da) und bei OligoGlu/Met 130 Da (Met: 131 Da; Glu: 129 Da), was einer Kettenlänge von ca. 13 bzw. ca. 10 Aminosäuren entsprechen würde. Die von Li *et al.* mit Papain durchgeführten Heterooligomerisierungen ergaben lediglich eine Kettenlängenverteilung von 6 bis 9 Aminosäuren [73]. Übereinstimmend mit der Literatur war die Kettenlänge für OligoGlu/Met von 10 Aminosäuren [87]. Um neben den GPC-Daten eine genauere qualitative Aussage über die synthetisierten Oligopeptide hinsichtlich Kettenlängenverteilung und -häufigkeit treffen zu können, wurden MALDI-ToF/MS-Analysen durchgeführt. Diese belegten, dass es sich bei den hergestellten Oligopeptiden eindeutig um Mischpeptide aus beiden Aminosäuren handelte.

Bei OligoGlu/Leu wurden Peptide mit einem Polymerisierungsgrad zwischen 6 und 10 detektiert, wobei die Kettenlängen 9 und 10 kaum präsent sind. Die Massendifferenzen von entweder $m/z = 113$ oder 129 Da zwischen Peaks zweier Polymerisierungsgrade bewiesen, dass sowohl Leucin- als auch Glutamatreste in den Peptiden enthalten waren (Abbildung 25). Abbildung 50 zeigt die Änderung der molaren Masse der wachsenden Peptidkette in Abhängigkeit von der hinzukommenden Aminosäure. Übereinstimmend mit Li *et al.* traten die Polymerisierungsgrade 7 und 8 am häufigsten auf [73]. Widersprüchlich sind diese Kettenlängen zu den GPC-Analysen, die im Mittel eine Kettenlänge von 13 Aminosäuren angaben, jedoch gab es hier bereits für OligoGlu (siehe 4.1.1.) unterschiedliche Resultate, die so nicht erklärbar waren.

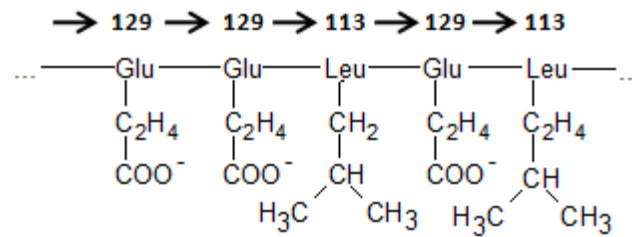


Abbildung 50: Änderung der Molekülmasse durch Kupplung von Glutamat und Leucin.

Nur die Seitenketten der Aminosäuren sind als Strukturformel angegeben, der restliche Teil der Aminosäure über den Drei-Buchstaben-Code abgekürzt. Die Zahlen über den Abkürzungen geben den Anstieg der molaren Masse in Dalton, durch Knüpfung der Peptidbindung mit entsprechender Aminosäure an.

Im Falle von OligoGlu/Met (Abbildung 27) wurde eine Kettenlänge zwischen 7 und 10 Aminosäuren detektiert. Die Peakpaare (grau hinterlegt in Abbildung 27) zweier Kettenlängen liegen entweder um 131 Da auseinander wenn Methionin in die Kette eingebaut wurde oder um 129 Da wenn Glutamat eingebaut wurde. Abbildung 51 verdeutlicht die Änderung der molaren Masse in Abhängigkeit des hinzukommenden Aminosäurerestes.

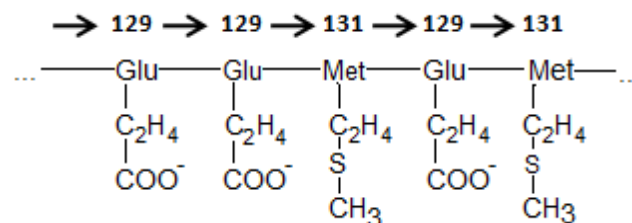


Abbildung 51: Änderung der Molekülmasse durch Kupplung von Glutamat und Methionin.

Nur die Seitenketten der Aminosäuren sind als Strukturformel angegeben, der restliche Teil der Aminosäure über den Drei-Buchstaben-Code abgekürzt. Die Zahlen über den Abkürzungen geben den Anstieg der molaren Masse in Dalton, durch Knüpfung der Peptidbindung mit entsprechender Aminosäure an.

Da die hydrolysierten Präzipitate analysiert wurden, waren kürzere Kettenlängen als 7 nicht zu finden, weil diese noch löslich blieben und nicht im Präzipitat enthalten waren. Die am häufigsten auftretenden Peptidketten besaßen einen Polymerisierungsgrad (DP) von 8 bzw. 9, was einem Molekulargewicht zwischen 1.000 und 1.200 Da entspricht und dem in der Literatur angegebenen

Wert von DP = 10 nahe kommt [87]. Anders als im Falle von OligoGlu/Leu stimmten die Ergebnisse von GPC und MALDI-TOF-Analysen gut überein.

Mit der erfolgreichen Synthese des OligoGlu/Met Mischpeptids wurden beide oben genannten Ziele erreicht, nämlich lösliche methioninhaltige Peptide und Moleküle mit einer Masse um die 1.000 Da zu synthetisieren. Während letzteres bereits durch Modifikation der Reaktionsparameter unter Verwendung der Cysteinprotease Bromelain gut funktionierte (siehe 4.1.), konnten methioninhaltige Peptide nur über eine Heterooligomerisierung mit hydrolysierbaren Aminosäurederivaten wie Glutaminsäure- oder Asparaginsäureethylestern synthetisiert werden. Die so hergestellten Peptide besitzen eine amphiphile Struktur und stellen eine interessante Produktklasse für viele verschiedene Applikationen, so z. B. als Futtermittelzusätze zur Versorgung mit essentiellen Aminosäuren [110] oder in medizinischen Anwendungen dar [111]. So besitzen Polypeptide, die aus Methioninresten bestehen, neben einer hohen Biokompatibilität eine hohe Sauerstoffpermeabilität und eignen sich somit bspw. für Wundauflagen [112, 113]. Für kurzkettige, amphiphile Peptide unter 10 Aminosäuren wurde bereits eine Neigung zur Selbstausrichtung und Bildung von Nanostrukturen nachgewiesen [42, 114]. In Hydrogelen könnte die negativ geladene Seitenkette der Glutamatreste als Shuttle für kationische Biomoleküle wie z. B. pharmazeutische Wirkstoffe dienen [115]. Anhand der genannten Anwendungsmöglichkeiten und Eigenschaften ist erkennbar, dass amphiphile Heterooligopeptide von großer Bedeutung für eine Vielzahl industrieller Anwendungen sind. Unter Verwendung von GludiOEt oder AspdiOEt als hydrophilen Anteil gelangt man allerdings immer zu anionischen Oligopeptiden.

4.2.2. Kationische Heterooligopeptide

Kationische Oligopeptide stellen eine neue Produktklasse dar und erweitern das Anwendungsspektrum, da sie bspw. anionische Liganden wie pharmazeutische Wirkstoffe binden können [115].

Die Oligomerisierung von kationischen Aminosäuren wie z. B. Lysin wurde zwar bereits erfolgreich durchgeführt, allerdings erheblich aufwendiger in der Durchführung als Oligomerisierungen hydrophober Aminosäuren [76, 116]. Den großen Vorteil der Oligomerisierungen hydrophober oder anionischer Aminosäuren, dass die gebildeten Oligopeptide mit steigender Kettenlänge und damit verbundener Hydrophobizität präzipitieren, kann man sich hier nicht zu Nutze machen. Kationische Oligopeptide bleiben selbst bei längerer Reaktionsdauer und großen Kettenlängen aufgrund ihrer positiv geladenen Seitenketten in Lösung und sind somit einer sekundären Hydrolyse durch das Enzym ausgesetzt. Da es sich um eine kinetisch kontrollierte Synthese handelt, bei der sich zunächst eine hohe Produktkonzentration bildet (siehe Abbildung 6), ehe die sekundäre Hydrolyse einsetzt, muss die Oligomerisierung kationischer Aminosäuren genau zum Zeitpunkt der höchsten

Produktakkumulation gestoppt werden, da es anders als bei Oligomerisierungen hydrophober oder anionischer Peptide, nicht zu einer Sättigung in der Produktbildung kommt und somit bei längeren Reaktionszeiten die sekundäre Produkthydrolyse einsetzt [66]. In den Arbeiten von Qin *et al.* wurde die Synthese von Oligolysin beendet, indem das Enzym durch Zentrifugation des Ansatzes mit einer Ausschlussmembran abgetrennt wurde. Die entstandenen Homooligopeptide wurden über HPLC unter Verwendung des Ionenpaarungsreagenz Heptafluorobuttersäure (HFBA) aufgetrennt und Peptidketten aus 3 bis 10 Lysinresten nachgewiesen [76]. Auch in dieser Arbeit wurde versucht durch eine Homooligomerisierung von Lysin kationische Peptide zu erhalten, allerdings scheiterte sowohl die Etablierung einer HPLC Analytik mit Ionenpaarungsreagenzien als auch der Nachweis von Peptiden über GPC und Photometer. Die Verwendung von anionischen Ionenpaarungsreagenzien zur Analysen kationischer Peptide über RP-HPLC wurde bereits mehrfach beschrieben und ist abhängig von der Art, der Hydrophobizität und der Konzentration des Reagenz [117-119]. Trotzdem konnte der zur Etablierung der Methode verwendete Polylysinstandard nicht ausreichend aufgetrennt werden, um eine Analyse zu ermöglichen. Photometermessungen vor und nach der Synthese (Tabelle 22) sowie die GPC-Daten belegen, dass entweder keine Synthese stattfand oder dass bereits die sekundäre Hydrolyse abgelaufen ist.

Zur Lösung dieses Problems sollte, ähnlich wie zur Solubilisierung der wasserunlöslichen Homooligopeptide (vgl. 4.1.), eine Heterooligomerisierung mit einer zweiten, hydrophoberen Aminosäure beitragen, die bei leicht alkalischem pH-Wert (7,8) zu einer Präzipitatbildung führt. In die Heterooligomerisierungen wurden Methionin- (MetOEt) und Lysinethylester im gleichen molaren Verhältnis eingesetzt und die Reaktion durch Zugabe von Papain oder Ficin gestartet. Dabei wurde zunächst Papain in einer 2,5-fach höheren Konzentration als Ficin eingesetzt, da letzteres in vorausgegangenen Hydrolyseexperimente von Lysin-*p*-nitroanilin eine um diesen Faktor höhere Aktivität zeigte (siehe Abbildung 28). Die Oligomerisierungen ergaben deutlich höhere Ausbeuten von 32,1 % (w/w) für die Papain-katalysierte als für die Ficin-katalysierte Reaktion (26,6 % (w/w)). Auch in Synthesen, in denen identische Mengen an Enzym eingesetzt wurden, erwies sich Papain als der bessere Katalysator für die Oligomerisierung und erzielte Ausbeuten von 25,4 % (w/w), wohingegen Ficin nur 16,9 % (w/w) des Substrates zu Oligopeptid umwandelte. Während Ficin die höhere Aktivität für Hydrolysen besaß, schien Papain ungeachtet der schwächeren Hydrolyseaktivität besser für die Synthese geeignet zu sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass mit steigendem pH-Wert die Peptidaseaktivität sinkt, die Esteraseaktivität aber ansteigt [91]. Das Ausmaß dieser Änderungen kann von Protease zu Protease verschieden sein. Des Weiteren berichten Schwab *et al.* von einem starken Einfluss der Enzymspezifität und der Reaktivität der verwendeten Aminosäuren [34].

Dass die Präzipitate beider Oligomerisierungen in wässriger Lösung mit saurem pH (0,1 % Trifluoressigsäure) aufgrund der dann positiv geladenen Lysinseitenketten gelöst werden konnten,

sprach bereits für eine erfolgreiche Heterooligomerisierung. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden MALDI-ToF/MS-Analysen durchgeführt, die in den Abbildung 29a und Abbildung 30a gezeigt sind.

Sowohl die gelösten Präzipitate der Ficain- als auch der Papain-katalysierten Oligomerisierungen zeigten ein identisches Massenspektrum mit Molekülmassen von $m/z = 830$ bis ca. $m/z = 1600$ bzw. 1700 bei Papain. Die Masse einer Aminosäureeinheit betrug, einen gleichmäßigen Einbau vorausgesetzt, $129,5$ Da (Lys: 128 Da; Met: 131 Da, vgl. Abbildung 52), was Kettenlängen zwischen 6 und 12 (Abbildung 29a) bzw. 13 Aminosäuren (Abbildung 30a) ergab. Eine Kettenlänge wurde jeweils von drei Peakgruppen repräsentiert, die einfach positiv geladenen Peptiden mit und ohne endständige Estergruppe sowie Natriumaddukten entsprachen, was auch in der Literatur beschrieben ist [105]. In den Abbildung 29b und Abbildung 30b ist jeweils die Vergrößerung eines Polymerisierungsgrades gezeigt. Dabei wurde deutlich, dass alle drei Peptidgruppen aus mehreren einzelnen Peptiden bestehen, die sich untereinander nur in der Masse von 3 Da unterschieden, was genau der Massendifferenz eines Lysin- zu einem Methioninrest entspricht. Begleitet wurden diese Peaks von zwei nachfolgenden Peaks die um 1 Da größer jedoch in der Intensität immer schwächer wurden, ehe nach 3 Da wieder ein stärkerer Peak auftauchte. Hierbei handelte es sich um die Isotope von Stickstoff, Sauerstoff und Kohlenstoff. Die Genauigkeit der Methode, Isotope sehen zu können, wurde auch von Mandell *et al.* festgestellt [120]. Auffällig war, dass wie in allen übrigen Oligomerisierungen kein Polymerisierungsgrad unter 6 in den Präzipitaten auftrat, was dafür spricht, dass die Oligopeptide unabhängig ihrer Aminosäurezusammensetzung bei einer Kettenlänge unter 6 Aminosäuren in Lösung blieben. Dass auch kürzere Peptide gebildet werden zeigte die Analyse einer Homooligomerisierung von LysOEt, die von Qin *et al.* durchgeführt wurde, bei der Kettenlängen von 3 bis 10 Lysinresten auftraten, allerdings im wässrigen Überstand [76].

Obwohl beschrieben ist, dass unter gezieltem Einsatz bestimmter Proteasen gesteuert werden kann, ob ein Substrat als Acyldonor oder -akzeptor verwendet wird, konnte hier keine Präferenz für eines der beiden Substrate festgestellt werden [46]. Für Papain sind sowohl Synthesen mit LysOEt als auch mit MetOEt als Substrat publiziert [35, 76], während Ficain vor allem für seine Ähnlichkeit zu Papain bekannt ist und zum Teil dieselben Hydrolysen und Synthesen durchführen kann. Für die beiden hier verwendeten Substrate wurden aber bislang keine Synthesen mit Ficain beschrieben [102].

Die Tatsache, dass die Peptidketten mit einer maximalen Länge von 12 bzw. 13 Aminosäureeinheiten deutlich länger sind als in den bisher durchgeführten Oligomerisierungsreaktionen oder der Literatur, kann auf die spezielle Kombination zurückgeführt werden. Homooligomerisierungen von LysOEt ergaben eine maximale Kettenlänge von 10 Lysinresten, was auf die stattfindende sekundäre Hydrolyse zurückgeführt werden kann, die bei einer kinetisch kontrollierten Reaktion ebenfalls auftritt wenn das Produkt nicht von der Reaktionsseite entfernt wird [76].

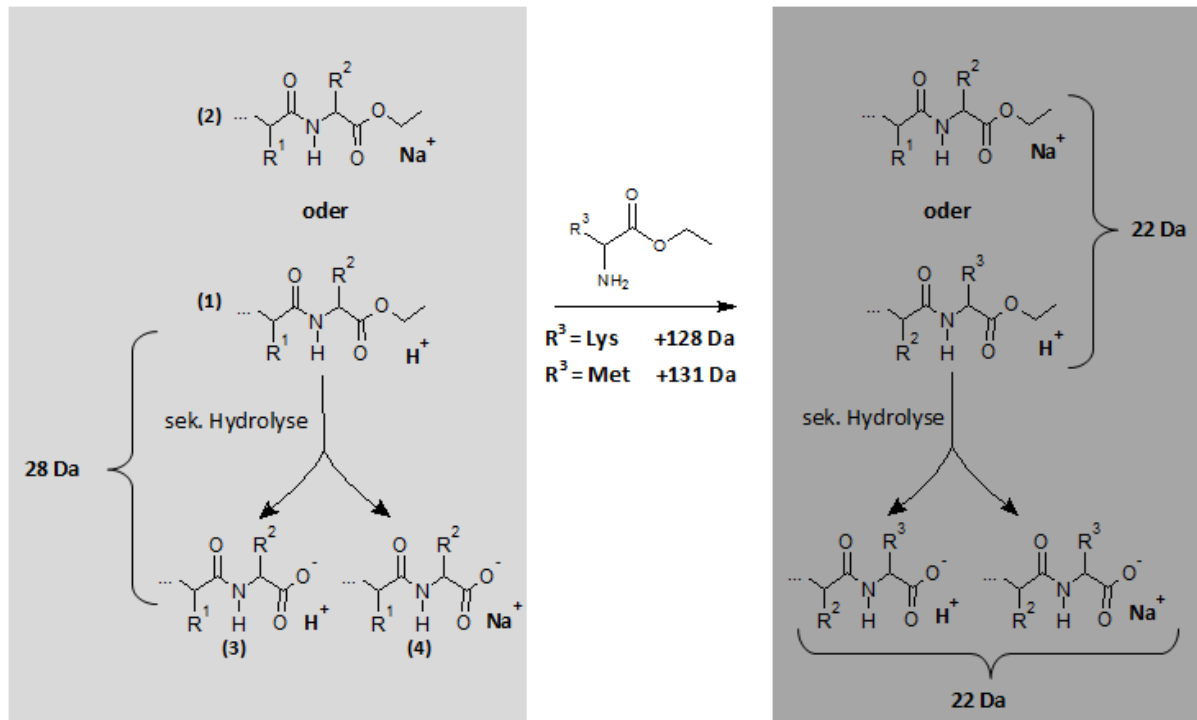


Abbildung 52: Auftretende Peaks in MALDI/ToF Analysen der Heterooligomerisierung von LysOEt und MetOEt.

Da die MALDI/ToF-Analysate in einem Wasser/Acetonitril-Gemisch (1:1) mit 0,1 % TFA gelöst waren, traten als Peaks meistens die einfach protonierten Peptide mit endständiger Estergruppe (1) oder deren um 22 Da schwereren Natriumaddukte auf (2). In Folge einer Kupplung mit einem weiteren Aminosäureester erhöhte sich die Masse entweder um 128 Da wenn Lysin oder um 131 Da wenn Methionin eingebaut wurde. Die Strukturen (3) und (4) repräsentierten die einfach protonierten Peptide ohne endständige Estergruppe bzw. deren Natriumaddukte, die dann entstehen, wenn es anstelle einer Kondensation zu einer Hydrolyse der Estergruppe kam. Der Unterschied zwischen endständig verestertem und freiem Peptid beträgt 28 Da. Eine Kettenlänge (graue Kästen) besaß also mindestens vier verschiedene Peaks, deren Massen klar zugeordnet werden konnten.

Die durchgeführten Heterooligomerisierungen zu anionischen Peptiden ergaben Kettenlängen zwischen 7 und 10 Aminosäuren, was mit der Literatur übereinstimmte [87]. Allerdings war in diesen Synthesen die hydrophile Seitenkette während der Reaktion verestert, also hydrophob, was zu einer schnell ansteigenden Hydrophobizität der Peptidkette und zur Präzipitation führte. Im Falle der kationischen Heterooligopeptide lagen die hydrophilen Lysinseitenketten protoniert vor ($pI_{(Lys)}$: 9,82 [121]), was den Peptiden trotz der ebenfalls eingebauten hydrophoben Methioninreste eine längere Löslichkeit gewährleistete und diese erst bei weiterer Erhöhung des hydrophoben Anteils präzipitierten. Unterstützt wird diese Annahme von Li *et al.*, die von längeren Peptidketten bei Verwendung einer zweiten hydrophileren Aminosäure berichteten. Im Vergleich zur Heterooligomerisierung von GludiOEt mit LeuOEt, die einen DP von durchschnittlich 8 besaß, wurden in Synthesen mit Alaninethylester und GludiOEt Kettenlängen bis zu 15 Aminosäuren erhalten [73].

Die Löslichkeitsgrenze für die Heterooligopeptide lag bei einer Kettenlänge von 6 Aminosäuren, woraus letztlich auch die maximale erzielbare Kettenlänge von 12 bzw. 13 Aminosäuren resultiert, die genau dann auftritt wenn zwei Hexamere, die durch ihren hohen Lysinanteil gerade noch löslich waren, kondensieren. Ein solch hoher Lysinanteil tritt bei einer Random-Peptidsynthese aber sehr selten auf, was durch die geringen Konzentrationen der Kettenlängen von 6 und 12 bzw. 13 Aminosäuren belegt wird.

4.3. Chemische Acylierung von Aminosäuren und Oligopeptiden

Nachdem die enzymatische Peptidsynthese zu mehreren Homo- und Heterooligopeptiden führte, sollten diese über die Schotten-Baumann-Acylierung mit einer Fettsäure zum Acylpeptid verknüpft werden und so eine neue Klasse von Biotensiden geschaffen werden, die aufgrund der Variabilität in der hydrophilen Kopfgruppe (Peptidteil) vielfältige Einsatzmöglichkeiten bieten würden. Während bei den herkömmlichen Biotensiden die Art der Kopfgruppe meist vorgegeben ist, wie z. B. das nichtionische Zuckermotiv bei Glykolipiden (siehe Abbildung 53) oder die Phosphatgruppe bei Phospholipiden, ist die Kopfgruppe bei Acylpeptiden hoch variabel. Sie kann (nicht-)ionischer, aromatischer oder schwefelhaltiger Natur sein oder besitzt im Falle von Mischpeptiden gar eine Kombination aus mehreren Eigenschaften. Bevor jedoch mit den Untersuchungen zur chemischen *N*-Acylierung der Oligopeptide begonnen werden konnte, musste die Methode anhand der Acylierung von Aminosäuren etabliert werden.

Acylaminosäuren, die aufgrund ihres amphiphilen Aufbaus ebenfalls Tenside darstellen, werden aufgrund ihrer guten Biokompatibilität, bereits seit längerem intensiv untersucht. Neben der bereits erwähnten Hautverträglichkeit und guten biologischen Abbaubarkeit [6, 10] finden sie außerdem in der Pharmaindustrie Verwendung, da sie die Aufnahme von Medikamenten durch den Magen-Darm-Trakt erleichtern [122].

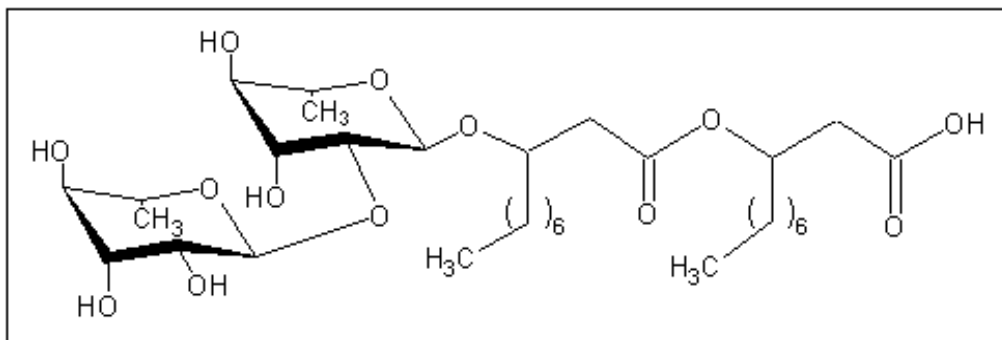


Abbildung 53: Struktur eines Glykolipids bestehend aus zwei nicht-ionischen Rhamnoseeinheiten als hydrophile Kopfgruppe (nach Sylđatk *et al.* [123]).

4.3.1. Herstellung und Analyse von Acylaminosäuren

In dieser Arbeit sollte die Schotten-Baumann-Acylierung durch *N*-Acylierung von Aminosäuren, die mit Ausnahme von Alanin auch in den Oligopeptidynthesen verwendet wurden, mit Laurinsäurechlorid etabliert werden. Neben Alanin wurden noch Methionin, Leucin und Lysin acyliert

und mittels photometrischer und chromatografischer Verfahren analysiert sowie die Oberflächenspannung bestimmt. Die Acylierung von Glutamat kann mit der Schotten-Baumann nicht durchgeführt werden, da sich während der Reaktion Anhydride bilden [71, 78].

Durch OPA-Derivatisierung der freien Aminosäuren vor und nach der Acylierung sollten die photometrischen Messungen die Abnahme des Acylakzeptors während der Acylierung detektieren und somit indirekt eine Acylierung nachweisen. Nach erfolgreicher Acylierung wurde eine deutliche Abnahme der Aminosäurekonzentration erwartet, da diese nach Acylierung keine freie Aminogruppe mehr besitzt, die derivatisiert werden kann [124].

Alle eingesetzten Aminosäuren (Lysin, Alanin, Methionin und Leucin) konnten zu Reaktionsbeginn nahezu vollständig in ihrer Ausgangskonzentration von 50mM (= 100 %) nachgewiesen werden (Abbildung 32). Durch Zutropfen von Laurinsäurechlorid verdünnt sich die Aminosäurekonzentration auf 33 mM, was bei der Erstellung des Graphen berücksichtigt und im Falle einer nicht ablaufenden Reaktion 100 % entspräche. Allerdings konnte bei allen Aminosäuren ein deutlicher Abfall der Konzentrationen unter 33 mM festgestellt werden. Die Abnahme der Aminosäurekonzentration lag zwischen 10,54% (Alanin) und 46,89% (Leucin) nachdem das Laurinsäurechlorid zugetropft wurde und veränderte sich mit Ausnahme von Alanin auch nach 4 h Rühren kaum. Für Alanin lag der Wert nach 4h Rühren über 100%, was bedeuten würde, dass keine Reaktion stattgefunden hatte, was aber im Widerspruch zu den Werten direkt nach der Acylierung stand. Eine Ursache hierfür konnte nicht gefunden werden, da der Fehler reproduziert wurde und sowohl das Rühren wie auch die nachfolgende Derivatisierung nicht bei erhöhten Temperaturen abliefen, die zur Verflüchtigung des Dioxans, in dem das Fettsäurechlorid gelöst war, und somit zur Aufkonzentrierung des Reaktionsansatzes hätten führen können.

Die pH-Werte der Reaktionsansätze stiegen in allen Reaktionsansätzen (siehe Tabelle 24 -Tabelle 27) leicht an, ehe sie nach 4 h Rühren knapp unter die Ausgangswerte fielen. Da als Nebenprodukt der Schotten-Baumann-Acylierung Salzsäure entsteht, wurde erwartet, dass der pH-Wert sinkt [71, 77]. Der Anstieg des pH-Wertes direkt nach Zugabe der Laurinsäurechloridlösung könnte durch das Lösungsmittel hervorgerufen werden, da Dioxan mit den Protonen des Wassers wechselwirkt und so die physikalischen Eigenschaften wie Viskosität, Dielektrizitätseigenschaften, Oberflächenspannung, etc. ändert [125].

Da bei erfolgreicher Acylierung der Aminosäuren, die entstandene Acylaminosäure durch ihren Tensidcharakter die Oberflächenspannung ihres Lösungsmittels heruntersetzen würde, konnte mit Hilfe des Tensiometers eine Aussage über den Acylierungserfolg gemacht werden.

Die Oberflächenspannungen der Reaktionsansätze wurden vor und nach der Acylierung gemessen. Da sich nach Zutropfen des in Dioxan gelösten Laurinsäurechlorids die Oberflächenspannung des

Puffer/Dioxan-Gemisches auf 44,61 mN/m absinkt, konnten anhand der Reaktionsansätze keine klaren Aussagen über den Acylierungserfolg gemacht werden. Laut Mazurkiewicz *et al.* besitzt 1,4-Dioxan die Fähigkeit die Struktur von Wasser aufzubrechen, indem es Dimere, Trimere und andere Strukturen bildet. Dazu benötigt 1,4-Dioxan nur das eine Sauerstoffatom, das andere steht somit zur Wasserstoffbrückenbindung mit dem Wassermolekül zur Verfügung [126], was zur Senkung der Oberflächenspannung führt (Abbildung 54). Dass Mischungen organischer und wässriger Lösungsmittel Einfluss auf die Eigenschaften auf die darin gelösten Tenside haben, wurde u.a. auch von Bakshi *et al.* publiziert, die einen Anstieg der CMC in solchen Gemischen beobachteten [127]. So vermochte Ethylenglykol genau wie Dioxan die Struktur von Wasser aufzubrechen, wodurch sich die Oberfläche vergrößert und die Tenside sich nicht gleich an der Oberfläche anlagern, sondern mit dem Lösungsmittel aufgrund ihres Aufbaus interagieren. Da 1,4-Dioxan, sowie Ethylenglykol mit Wasser mischbar sind, dessen Struktur zerstören und ähnliche logP- Werte besitzen, lässt sich für Dioxan ein ähnlicher Effekt vermuten.

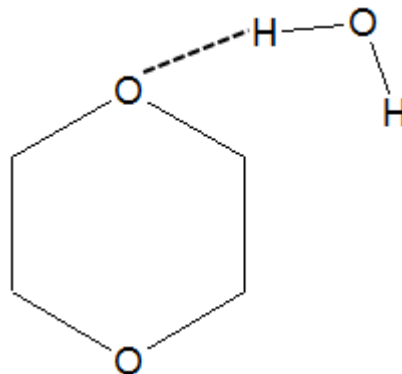


Abbildung 54: Zwischenmolekulare Wechselwirkungen in einem Wasser/Dioxan-Gemisch.

Das Wasserstoffatom des Wassermoleküls kann mit dem Elektronenpaar des Sauerstoffs des Dioxans eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen (gestrichelte Linie), wodurch die Struktur des Wassers aufgelöst und dessen physikochemische Eigenschaften verändert wird.

Um die Werte vor und nach der Acylierung besser vergleichen zu können, wurden die Werte vor Acylierung mit Aminosäurelösungen in einem Dioxan/Puffer Gemisch, das der Zusammensetzung des Reaktionsansatzes nach der Acylierung entsprach, bestimmt. Die Werte lagen mit 38,34 - 44,58 mN/m auch im Bereich des Dioxan/Puffer Gemischs (44,61 mN/m). Nach der Acylierung der Aminosäuren waren alle Oberflächenspannungen etwas geringer und lagen zwischen 30,03 und 38,67 mN/m, was zwar eine erfolgreiche Acylierung vermuten ließ, aber nicht belegte.

Nach Abschluss der Acylierung wurden die entstanden Acylaminosäuren durch saure Präzipitation ausgefällt und lyophilisiert. Die Präzipitate wurden in Wasser gelöst und die Oberflächenspannungen mit dem Tensiometer ermittelt. Zum Vergleich wurde Wasser sowie Aminosäurelösungen in Wasser ebenfalls vermessen. Abbildung 31 fasst die Ergebnisse zusammen. Wasser besaß eine gemessene Oberflächenspannung von 70,69 mN/m, was dem in der Literatur beschriebenen Wert von 72,81 mN/m übereinstimmte [79]. Ebenso lagen alle Aminosäurelösungen in einem Bereich von ca. 69 mN/m und haben somit offenbar keinen Einfluss auf die Oberflächenspannung. Bei allen Acylaminosäuren ist die Oberflächenspannung niedriger als die des reinen Wassers und der Aminosäurelösungen. Die Acylierungsprodukte von Alanin mit 39,54, von Lysin mit 36,57 und von Leucin mit 44,88 mN/m zeigten eine deutliche Erniedrigung der Grenzflächenspannung, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Acylierung erfolgreich war und die fast reine Acylaminosäure präzipitiert und gelöst wurde. Da ein gutes Tensid die Oberflächenspannung von 72 mN/m auf 35 mN/m senken sollte, lagen Acyllysin und Acylalanin mit Werten unter 40 mN/m im Bereich eines guten Tensids [128]. Infante *et al.* beschrieben für Lysin eine Acylierung beider NH_2 -Gruppen, was zu einer Oberflächenspannung von 36 mN/m führte [129]. Dieser Wert entspricht exakt dem in dieser Arbeit ermittelten Wert von 36,57 mN/m. Für Acyllysin sind neben den guten tensidischen auch antimikrobielle Eigenschaften beschrieben [130]. Methionin besaß mit 60,27 mN/m einen Wert, der sich nicht deutlich von der Oberflächenspannung von Wasser unterscheidet, doch da der Photometertest eine deutlich Abnahme der Aminosäure zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass die Acylierung funktioniert hatte.

Mhaskar *et al.* zeigte, dass die CMC des mit einer C_{12} - Fettsäure acylierten Lysins, bei einer Konzentration von 0,06 mg/ml, mit einer Oberflächenspannung von 35 mN/m, erreicht ist [131]. Da in dieser Arbeit eine Konzentration von 0,7 mg/ml eingesetzt wurde, ist davon auszugehen, dass die Konzentration für die CMC erreicht wurde, was die gemessene Oberflächenspannung mit einem Wert von 36,57 mN/m bestätigt. Laut Mhaskar *et al.* beträgt die CMC des mit einer C_{12} - Fettsäure acylierten Leucins 0,3 mg/ml, was zu einer Oberflächenspannung von 30 mN/m führt [131]. Die hier eingesetzte Konzentration ist 0,7 mg/ml, die Oberflächenspannung von Acylleucin beträgt hier 44,88 mN/m. Da sich Acylleucin jedoch nicht komplett im Lösungsmittel gelöst hat, muss davon ausgegangen werden, dass die CMC noch nicht erreicht ist. Ebenfalls nicht gut löslich war Acylmethionin, was in einer niedrigen Konzentration in den gemessenen Proben resultierte, weshalb nur ein schwaches Absinken der Oberflächenspannung beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch die Oberflächenspannungswerte und den Vergleich mit der Literatur eine erfolgreiche Acylierung der Aminosäuren nahezu bestätigt werden konnte. Den

endgültigen Beweis sollte eine vergleichende HPLC-Analyse des in dieser Arbeit hergestellten Acylalanins mit dem kommerziell erworbenen Standard *N*-Lauroyl-L-Alanin erbringen.

4.3.2. HPLC-Analyse von Acylalanin und *N*-Lauroyl-L-Alanin

Bei erfolgreicher *N*-Acylierung der Aminosäuren entsteht eine Amidbindung zwischen Fettsäure und Aminosäure, die genau wie eine Peptidbindung bei 206 nm nachgewiesen werden kann [132]. Die Chromatogramme in Abbildung 33 belegen eindeutig die erfolgreiche Acylierung des Alanins mit Laurinsäurechlorid. Jeweils nach 3,7 min trat ein deutlicher Peak auf, der im Falle des doppelt konzentrierten Standards *N*-Lauroyl-L-Alanin auch die doppelte Peakhöhe von ca. 50 mAU im Vergleich zum selbst hergestellten Acylalanin (ca. 25 mAU) besaß.

Gleichzeitig sollte eine OPA-Derivatisierung des Acylalanins (gelöstes Präzipitat) und des *N*-Lauroyl-L-Alanin nicht möglich sein, da nach Acylierung kein primäres Amin am *N*-Terminus mehr vorliegt und somit sollte auch keine Detektion bei 340 nm mit dem FLD-Detektor möglich sein. Somit konnte über die OPA-Derivatisierung die Reinheit der präzipitierten Acylaminosäure überprüft werden. Als Positivkontrolle wurde eine 1 mM Alaninlösung derivatisiert. Zur besseren Identifikation des Acylalanins im Falle mehrerer auftretender Peaks wurde der Standard in doppelter Konzentration angesetzt.

Die Online-Derivatisierung mit OPA (Abbildung 34), die nach einem Protokoll von Brucher *et al.* durchgeführt wurde, bestätigte eindeutig, dass die Acylierung von Alanin erfolgreich und im Präzipitat kaum noch unreaktiertes Alanin vorhanden war [133]. Die reine Aminosäure konnte derivatisiert werden und ist nach 3,09 min deutlich detektierbar (Peakhöhe ca. 800 LU). Nach der Acylierung sollte für Alanin kein Signal mehr auftreten. Während beim Standard *N*-Lauroyl-L-Alanin (Abbildung 34 c) ein sehr schwaches Signal für Alanin von ca. 3 LU auftrat, war beim selbst hergestellten Acylalanin (Abbildung 34 b) noch ein deutlicheres Signal für Alanin mit ca. 25 LU zu erkennen. Da das Acylalanin im Vergleich zum Standard nicht aufgereinigt war und die Signalstärke ca. 30 mal schwächer war als für die reine Aminosäure, konnte von einem geringen Alaningehalt im Präzipitat ausgegangen werden.

Die Messungen mit der HPLC wurden zwar nur mit Alanin, Acylalanin und dem Standard *N*-Lauroyl-L-Alanin durchgeführt und somit nur dessen Acylierungserfolg eindeutig belegt, da aber die Acylierung aller Aminosäuren nach dem gleichen Protokoll von Sander *et al.* [70] durchgeführt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Acylierung der anderen Aminosäuren ebenfalls erfolgreich war und die Schotten-Baumann-Acylierung als Acylierungsmethode erfolgreich war.

4.4. Chemische Acylierung von Oligopeptiden

Nachdem die Schotten-Baumann-Reaktion zur *N*-Acylierung von Aminosäuren etabliert wurde, sollte die Methode für die neu hergestellten Oligopeptide angewandt werden. Die Motivation für die Acylierung der Peptide ist die Vielfalt an Tensiden, die man durch den Einsatz von Aminosäuren mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften bekommt. Acylpeptide können ebenfalls in der Hautpflegeindustrie eingesetzt werden, da sie hautverträglich sind [134]. Außerdem sind für einige Acylpeptiden antimikrobielle Eigenschaften nachgewiesen [11]. Um die Oligopeptide in den Acylierungen verwenden zu können, mussten sie löslich sein bzw. durch alkalische Hydrolyse löslich gemacht werden können und dies auch bei einem pH von 10,5 bleiben. Resultierend aus den alkalischen Bedingungen der Schotten-Baumann-Acylierung war eine chemische Acylierung des kationischen Heterooligopeptids OligoLys/Met nicht möglich, da dieses wie in 4.2.2. nur bei saurem pH löslich war. Somit standen zur Acylierung nur die anionischen Oligopeptide zur Verfügung, also OligoGlu, OligoGlu/Leu und OligoGlu/Met. Im Gegensatz zur Aminosäure Glutamat war für das Peptid OligoGlu keine Anhydridbildung zu erwarten (Abbildung 13) [78], da die Peptidbindungen planar und nicht drehbar sind und sich die Carboxylgruppen der Glutamatseitenketten gegenüberliegen und nicht miteinander reagieren können[59].

Da die Oligopeptide als Gemisch mehrerer Peptidketten verschiedener Länge und Zusammensetzung vorlagen und somit keine exakte Konzentration eingesetzt werden konnte, war die Verwendung des für die Aminosäuren etablierten Photometertests nicht möglich. Ferner konnte auch kein Nachweis der Acylierung über HPLC erfolgen, da außer der entstehenden Amidbindung auch die Peptidbindungen der nicht acylierten Peptide bei 206 nm absorbieren. Zwar besitzen die Acylpeptide durch die Fettsäure stärkere hydrophobe Eigenschaften im Vergleich zu den nicht acylierten Peptiden, jedoch macht die unterschiedliche Zusammensetzung und Hydrophilität des Peptidanteils eine Auftrennung schwierig und war im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar. Dass eine HPLC-Analytik generell geeignet ist um Peptide nach ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität aufzutrennen wurde in der Literatur schon mehrfach beschrieben [135, 136].

4.4.1. Effekte der Acylierungsprodukte auf die Oberflächenspannung

Um einen ersten Hinweis auf die erfolgreiche Acylierung der drei Peptide (OligoGlu, OligoGlu/Met und OligoGlu/Leu) zu erhalten, wurden Acylierungsproben in eine 96-Well-Platte pipettiert und über einem Karomuster betrachtet. Je nach Flüssigkeit wurden die Karos engmaschiger oder größer, was durch den unterschiedlichen Brechungswinkel in dem der Flüssigkeitsfilm das Licht bricht verursacht

wird [137, 138]. Die Oberflächenspannung ist dafür verantwortlich, dass alle Flüssigkeiten eine Kugelform anstreben, die je nach Beschaffenheit des Untergrundes unterschiedlich starke Kontaktwinkel besitzt (Abbildung 55) [139]. Wird die Oberflächenspannung durch grenzflächenaktive Substanzen wie z. B. Tenside herabgesetzt, wird auch der Kontaktwinkel geringer.

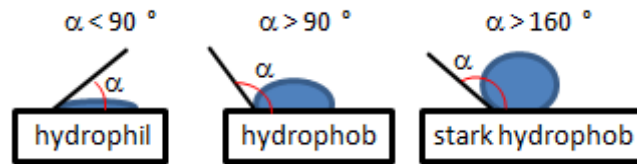


Abbildung 55: Kontaktwinkel von Wasser auf verschiedenen festen Oberflächen.

Je nach Beschaffenheit der Oberfläche ist der Kontaktwinkel unterschiedlich steil. Bei einem Winkel von mehr 160 ° tritt der sogenannte Lotuseffekt auf.

Im Falle der Mikrotiterplatte wirkt die Oberfläche der darin befindlichen Flüssigkeiten wie eine Linse und lässt je nach Oberflächenspannung das darunterliegende Karomuster entweder vergrößert oder verkleinert erscheinen. Mit sinkender Oberflächenspannung sinkt diese Krümmung und das Karomuster erscheint verkleinert. Die Ergebnisse auf der 96-Well-Platte ließen vermuten, dass alle Peptide acyliert wurden, da die Karos engmaschiger wurden (siehe Abbildung 35). Allerdings besitzt auch die Negativkontrolle (Laurinsäurechlorid ohne Peptid) ein solches Muster. Wie sich bereits in 4.3. zeigte, hatte Dioxan einen starken Einfluss auf die Oberflächenspannungen, was auch der Grund für das hier erhaltene engmaschige Muster der Kontrolle ist. Somit lässt sich über diese Methode keine aussagekräftige Schlussfolgerung ziehen.

Die tensiometrischen Messungen der sauer präzipitierten Reaktionsüberstände, die im Falle einer Acylierung die entstandenen Acylpeptide enthielten, sollten im Vergleich zum Plattentest klarere Aussagen zulassen.

Sowohl die Oligopeptide als auch die Präzipitate der Acylierungsansätze wurden in Wasser gelöst und nach der Ringmethode von du Noüy die Oberflächenspannungen gemessen [72], deren Ergebnisse in Abbildung 36 veranschaulicht sind. Für OligoGlu lag die Oberflächenspannung bei 70,03 mN/m, was dem Wert des Wassers (hier 70,69 mN/m) entspricht. Die beiden Heterooligopeptide Glu/Leu mit 66,72 mN/m und Glu/Met mit 69,94 mN/m lagen nur minimal unter 70 mN/m und hatten damit keinen Einfluss auf die Oberflächenspannung. Betrachtet man die Grenzflächenspannungswerte der acylierten Peptide ist bei den Heterooligopeptiden eine Erniedrigung der Oberflächenspannung auf 47,25 mN/m bei Acyl-OligoGlu/Leu und auf 54,81 mN/m bei Acyl-OligoGlu/Met zu erkennen, was ein deutlicher Hinweis auf eine abgelaufene Acylierungsreaktion war. Laut Mulligan senkt ein gutes

Tensid die Oberflächenspannung auf 35mN/m ab [128], wodurch die in dieser Arbeit hergestellten mit Werten über 47 mN/m keine guten Tenside darstellen.

Die Acylierung von OligoGlu mit Laurinsäurechlorid gelang nicht, was durch die Tensiometerwerte, die sich von denen des Wassers nicht unterschieden, eindeutig gezeigt werden konnte. Die o.g. Anhydridbildung sollte bei Peptidketten eigentlich nicht stattfinden. Der Grund dafür könnte die sterische Hinderung des Oligopeptids sein. Da OligoGlu eine α -helicale Form einnimmt, könnte es sein, dass die Fettsäure nicht an die freie Aminogruppe gelangt [140].

Nachdem die Tensiometerwerte bereits deutliche Hinweise auf eine geglückte Acylierung der Heterooligopeptide OligoGlu/Leu und OligoGlu/Met gaben, sollte der endgültige Beweis mittels MALDI-ToF erbracht werden.

4.4.2. MALDI-ToF-Analyse

Bei der Analyse der hergestellten Acylpeptide mit MALDI-ToF konnte anhand der Massen eindeutig festgestellt werden, ob die Acylierung erfolgreich war oder nicht. Wie schon durch die gemessene Oberflächenspannung angedeutet, war die Acylierung von OligoGlu nicht erfolgreich. Die Erklärung könnte die bereits o.g. sterische Hinderung bzw. Konformation des Oligoglutamats sein [140]. Die Massen der Aminosäureketten sind in beiden Chromatogrammen (siehe Abbildung 37 a und b), exakt gleich und die Polymerisierungsgrade unterscheiden sich um die Masse eines Glutamates (129 Da). Für jeden Polymerisierungsgrad von 6-11 wurde eine Aminosäure mehr eingebaut. In der Literatur werden Kettenlängen von 7-11 Aminosäuren angegeben [141]. Somit konnte eindeutig bestätigt werden, dass keine Acylierung des Oligoglutamats stattfand.

Die Acylierung von OligoGlu/Leu wurde durch die Oberflächenspannung laut Tensiometer bestätigt. Die MALDI-ToF Ergebnisse in Abbildung 38 zeigten hierfür keine eindeutigen Ergebnisse. In Abbildung 38 a ließen sich die Massen der verschiedenen Polymerisierungsgrade des Peptids von 7-10 wiederfinden, was den Werten der Literatur entspricht [73]. Für den Fall einer erfolgreichen Acylierung wurde in den MALDI-ToF Diagrammen zwar keine abweichende Massendifferenz zwischen den einzelnen Polymerisierungsgraden erwartet, jedoch sollten die Massen aller Peptide um die Masse des Laurinsäurechlorids (181 Da) zugenommen haben. Ein Massenzuwachs wie er allerdings in Abbildung 38 b auftritt ist nicht erklärbar und widerlegt weder, noch bestätigt er eine stattgefundene Acylierung. Da jedoch das acylierte OligoGlu/Leu die Oberflächenspannung von Wasser stark herabgesetzt hatte, konnte eine erfolgreiche Acylierung angenommen werden. Das Auftreten von ca. drei verschiedenen Massen für einen Polymerisierungsgrad war auf die

unterschiedliche Zusammensetzung der Oligopeptide zurückzuführen, die bereits in 4.2. diskutiert wurde.

Bereits die Oberflächenspannungswerte des Präzipitates der Acylierung von OligoGlu/Met ließ eine erfolgreiche Acylierung vermuten, was durch die Massenbestimmung mit MALDI-ToF eindeutig bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 39). Das Mischpeptid lag in unterschiedlichen Polymerisierungsgraden vor, die sich genau um die Massen der beiden eingebauten Aminosäuren Glutamat und Methionin unterschieden. Die genaue Sequenz der Aminosäureketten ließ sich, wie bereits in 4.2. diskutiert, mit MALDI-ToF nicht bestimmen. Das Diagramm in Abbildung 39 b zeigt die Analyse des Präzipitates aus dem Acylierungsversuch, für das zum Mischpeptid identische Polymerisierungsgrade auftraten. Der Massenunterschied betrug wieder je nach eingebauter Aminosäure 129 (Glu) oder 131 Da (Met), allerdings waren alle Massen immer um 181 Da größer im Vergleich zum Mischpeptid. Es ließ sich für jede Aminosäurekette das exakte Gegenstück mit der C₁₂-Fettsäure finden. Somit wurde im Falle der Acylierung von OligoGlu/Met eine erfolgreiche Acylierung und Entstehung von Acyl-OligoGlu/Met einwandfrei bewiesen.

Mittels MALDI-ToF Analyse kann nun sicher davon ausgegangen werden, dass die Acylierung von OligoGlu/Met erfolgreich war. Die Unterschiede der Massen zwischen OligoGlu/Met und Acyl-OligoGlu/Met betragen genau die 181 Dalton der Fettsäure. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Acylierung von OligoGlu nicht erfolgt war. Die Acylierung von OligoGlu/Leu konnte mittels MALDI-ToF weder bestätigt noch widerlegt werden.

4.4.3. Untersuchung der antimikrobiellen Eigenschaften

Viele Bakterien synthetisieren Peptide, die antimikrobielle Eigenschaften besitzen. Laut Wakabayashi *et al.* [142] weisen acylierte antimikrobielle Peptide eine noch stärkere antimikrobielle Wirkung auf, da sie einen amphiphilen Charakter besitzen und mit der Zellwand interagieren können. Um antimikrobiell wirken zu können, muss das Peptid/Acylpeptid entweder die Zellwand der Bakterien durchlässig machen, z. B. indem es selbst in die Zellwand eindringt und einen Kanal nach außen offen lässt, oder es muss in die Stoffwechselforgänge des Einzellers eingreifen.

Das Ergebnis der Untersuchung antimikrobieller Eigenschaften ist eindeutig und zeigt, dass die hergestellten Acylpeptide in Konzentration von 50 mg/ml bis 5 mg/ml bei gramnegativen und grampositiven Bakterien keine wachstumshemmende Wirkung zeigen (Abbildung 40 und Abbildung 41). Radzishovsky *et al.* beschreiben in ihrer Arbeit minimale Hemmkonzentrationen (MHK) von 156 µM [143] und Winkelmann *et al.* beschreiben für Herbicolin A eine minimale Hemmkonzentration von 0,2 – 0,6 µg/ml [144], womit die Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit um einen Faktor

10.000 – 100.000 höher liegen und somit eine antimikrobielle Wirkung definitiv ausgeschlossen werden kann.

Epand *et al.* zeigten, dass kationische Peptide eine besser antimikrobielle Wirkung gegen die negativ geladene Bakterienzellwand zeigen [145]. Da in dieser nur anionische Acylpeptide getestet und die Acylierung auch nur für Acyl-OligoGlu/Met eindeutig bewiesen wurde, könnte dies eine Erklärung dafür sein, dass die in dieser Arbeit hergestellten Acylpeptide keine Wirkung auf Bakterien zeigten.

4.5. Enzymatische Acylierung von Glutamatdiethylester

Eine interessante Alternative zur chemischen Acylierung von Aminosäuren oder Peptide stellt die Enzym-katalysierte *N*-Acylierung dar. Da es sich bei der Acylierung des *N*-Terminus von Aminosäuren und Peptiden mit einer Fettsäure um die Knüpfung einer peptidischen Amidbindung handelt, war der Einsatz von Proteasen denkbar. Müller verwendete in seiner Dissertation eine Lipase zur Acylierung von Aminosäuren und Aminosäurederivaten [57]. Lipasen katalysieren per Definition die Hydrolyse von Triglyceriden mit vorzugsweise langkettigen Fettsäureestern an Öl/Wasser Grenzflächen und sind darüber hinaus auch in organischen Lösungsmitteln aktiv [146, 147]. Aufgrund ihres aktiven Zentrums bestehend aus einer katalytischen Triade aus Serin, Histidin und Asparaginsäure werden Lipasen zu den Serinproteasen gezählt [148]. Bereits im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine Protease-katalysierte Peptidsynthese über einen kinetisch kontrollierten Ansatz erfolgreich etabliert, wofür eine aktivierte Carboxylkomponente des Acyldonor sowie Enzyme aus der Klasse der Serin- und Cysteinproteasen von Nöten war. Angewandt auf die *N*-Acylierung wäre der Acyldonor ein Fettsäureester und die Aminosäure bzw. das Peptid der Acylakzeptor.

4.5.1. Etablierung einer GC und HPLC-Analytik

In dieser Arbeit wurden vier immobilisierte Subtilisine, die ebenfalls zu den Serinproteasen zählen als Katalysatoren eingesetzt. Da Glutamat unzugänglich für die chemische Acylierung und ein gutes Substrat in den enzymatischen Peptidsynthesen war, wurde es in Form von Glutamatdiethylester als Acylakzeptor in den enzymatischen Acylierungsversuchen eingesetzt. Den Acyldonor bildet Ethylhexanoat, eine C₆-Fettsäure mit einem ethylierten C-Terminus. Als Analytik wurden eine GC- und eine HPLC-Analytik etabliert. Für erstere wurden zuerst die Peaks für C₆ bis C₁₆-Fettsäuren eines kommerziell erhältlichen Fettsäuremethylester-Mixes (FAME-Mix) durch Einzelinjektion der entsprechenden Fettsäureester identifiziert (Abbildung 42). Anschließend wurde ebenfalls kommerziell erworbenes Plantapon, ein Mix aus mit Kokosöl verestertem Glutamat, analysiert. Cocoylglutamat ist ein besonders mildes und hautschonendes Tensid und findet Anwendung in vielen Hautpflegeprodukten, weshalb dessen enzymatische Synthese von großem Interesse wäre [149]. Zur Analyse in der GC musste die Amidbindung zwischen Glutamat und den Fettsäuren durch alkalische Hydrolyse gespalten und die Carboxylgruppe durch eine Methylierung flüchtig gemacht werden. Hierfür wurde TMSH verwendet, dass bereits für Derivatisierungen in der GC beschrieben ist [150]. Das so erhaltene Gemisch aus Fettsäuremethylestern besaß für die einzelnen Ester identische Retentionszeiten zu denen des FAME-Mixes (Abbildung 43).

Da in dieser Arbeit möglichst der direkte Nachweis eines Acylierungsproduktes erfolgen sollte, wurde versucht die GC-Ergebnisse auf die HPLC zu übertragen. Da sowohl die in der GC als auch der HPLC verwendeten Säulen nach Hydrophobizität auftrennen und der hydrophile Kopf bei den intakten Produkten identisch ist, sollten die Fettsäuren entsprechend ihrer Kettenlänge retardiert werden, so dass kürzere Fettsäureketten zuerst im Chromatogramm auftauchen. Zusätzlich ließ sich die Retention über die Zusammensetzung der mobilen Phase steuern. Bei dem in Abbildung 44 gezeigten HPLC-Chromatogramm wurde ein kontinuierlich ansteigender Gradient von 10 % bis 50 % ACN (0,5 %/min) gefahren, der zu einer zufriedenstellenden Auftrennung der einzelnen Plantaponkomponenten passend zu den GC-Ergebnissen führte. Im Falle einer erfolgreichen Acylierung sollte sich also Glutamylhexanoat nachweisen lassen.

4.5.2 Enzymatische Acylierung von Glutamatdiethylester mit Ethylhexanoat

Die Acylierungen wurden, um die Hydrolyse des Esters des Acyldonors zu verhindern, zuerst in 100 % Aceton durchgeführt, wofür in der Dissertation von Müller eine hohe spezifische Aktivität des Enzyms beschrieben ist [57]. Der Probenahme nach 0, 22 und 46 h folgte eine GC-Analyse um die Abnahme der Substrate zu detektieren. In der Kontrolle lag die Ethylhexanoatkonzentration (Abbildung 45) zunächst auf Höhe der Ausgangskonzentration (100 %), ehe sie nach 22 h leicht abfiel. Nach 46 h wurde ein Anstieg über die Ausgangskonzentration detektiert (> 100 %). Da dieser Effekt auch nach 46 h für die GludiOEt-Konzentration (Abbildung 46) der Kontrolle auftrat, die sonst bei ca. 100 % lag und die Reaktion bei 50 °C ablief, kommt eine Aufkonzentrierung der Reaktanden durch Verdampfen des Acetons als mögliche Erklärung in Frage, wenngleich dicht verschlossene, lösungsmittelresistente Reaktionsgefäße benutzt wurden. War in den enzymatischen Ansätzen zunächst für P127 eine Abnahme beider Substrate detektiert und eine Acylierung vermutet worden, nahm nach 46 h die Ethylhexanoatkonzentration wieder zu, was gegen eine Acylierung sprach. Die übrigen Ansätze zeigten keine klare Tendenz in Zu- oder Abnahme der Konzentration, die auf eine Entstehung von Glutamylhexanoat schließen ließ. In HPLC-Analysen einzelner Proben konnte für keinen der Ansätze ein Acylierungsprodukt nachgewiesen werden.

Zwar sind mittlerweile lösungsmittelstabile Proteasen z. B. aus *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben und charakterisiert [151, 152], dennoch sind die meisten Proteasen in organischen Lösungsmitteln instabil und benötigen ein Minimum an Wasser um aktiv zu sein [153]. Chemische sowie physikalische Modifikationen der Enzyme wie *directed evolution*, Proteinengineering aber auch Immobilisierung können zu einer Steigerung der Stabilität und Aktivität führen [154, 155]. Obwohl die in diesen Versuchen verwendeten Enzyme immobilisiert vorlagen, konnte keine Syntheseaktivität festgestellt werden.

Aus den genannten Gründen wurden die Acylierungsversuche mit identischen Enzym- und Substratkonzentrationen wie in den Versuchen mit 100 % Aceton durchgeführt mit dem Unterschied, dass diesmal ein Gemisch aus 80 % Aceton und 20 % NaPP (pH 7,5) als Reaktionsmedium verwendet wurde. Auffällig war in diesen Versuchen, dass bei der 0 h Probe der Kontrolle zwar das eingesetzte Ethylhexanoat nachgewiesen werden konnte (Abbildung 47), aber nur ca. 75 % des eingesetzten GludiOEt (Abbildung 48). Hinsichtlich der GludiOEt-Konzentrationen bestätigte sich dies auch für die enzymatischen Ansätze, deren Ethylhexanoatkonzentration die 100 %, wenn auch nur leicht überschritten. Nach 46 h lagen die Konzentrationen der Kontrolle wieder auf Höhe der Konzentrationen bei 0 h. Für die Ansätze P126 - P128 wurde keine gleichzeitige Abnahme beider Substrate über die Reaktionszeit festgestellt, was ein Hinweis auf eine mögliche Acylierung gewesen wäre. Bei P125 hingegen konnte eine konstante Reduktion der Substratkonzentration detektiert werden, was eine Acylierung vermuten ließ. In nachfolgenden HPLC-Analysen konnte jedoch für keinen der Ansätze ein Acylierungsprodukt nachgewiesen werden. Bei den Ansätzen P126 – P128 könnte die immer noch hohe Acetonkonzentration zur Inaktivierung des Enzyms geführt haben. Bei P125 scheint der 20 %ige Anteil an wässrigem Puffer zu genügen um das Enzym aktiv werden zu lassen, was durch die Abnahme der Substrate eindeutig belegt wurde. Da nun Wasser im Reaktionsmedium enthalten ist, könnte als Nebenprodukt der kinetisch kontrollierten Synthese eine Hydrolyse des Acylenzym-Intermediates stattgefunden haben (siehe Abbildung 5), wodurch Glutamat und Hexansäure entstanden wären, die unter den verwendeten Bedingungen beide nicht in der HPLC sichtbar gewesen wären.

4.6. Ausblick

Die enzymatische Peptidsynthese durch Oligomerisierung hydrophober Aminosäuren ist bereits seit längerem etabliert. Durch den Einsatz von Glutamatdiethylester als Substrat können lösliche anionische Peptide synthetisiert werden. Bei der Herstellung löslicher kationischer Oligopeptide stellt die auftretende Produkthydrolyse aufgrund der ausbleibenden Präzipitation die größte Schwierigkeit dar. Diese kann wie von Qin *et al.* beschrieben, durch Abtrennung des Katalysators oder wie in dieser Arbeit durch Kombination mit hydrophoben Aminosäuren als Reaktionspartnern vermindert werden [76]. Da die Ausbeute an kationischen Heterooligopeptiden von ca. 30 % bislang eher niedrig ist, liegt hierin sicher noch großes Optimierungspotential. Durch Anwendung der beschriebenen Methode mit anderen (kationischen) Substraten könnte eine Erweiterung des Produktspektrums erfolgen. Ein Screening nach einem geeigneteren Katalysator, wie z. B. Trypsin das für die Spaltung an Arginin- und Lysinresten bekannt ist, kann ebenfalls zu höheren Ausbeuten führen [156].

Die chemische Acylierung der Peptide kann wahrscheinlich weiter optimiert werden indem andere Reaktionsbedingungen (Substratverhältnisse, pH, Temperatur) getestet werden.

Besonders bei der enzymatischen Acylierung besteht noch großer Forschungsbedarf. Da die Acylierung theoretisch von vielen verschiedenen Enzymklassen wie Acylasen, Proteasen, Lipasen, etc. durchgeführt werden und entweder am C- oder N-Terminus erfolgen kann, ist ein Screening nach geeigneten Katalysatoren notwendig. Wie Müller in seiner Arbeit zeigen konnte, ist hierbei auf die unterschiedliche Aktivität in organischen Lösungsmitteln sowie die Größe der verwendeten Substrate zu beachten [57]. Ist ein geeigneter Katalysator gefunden, könnte dieser durch Protein Engineering optimiert werden. Auch wenn kein Produkt nachgewiesen werden konnte, lieferten die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise auf eine mögliche Protease-katalysierte Acylierung in mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln, weshalb für diese Enzyme eine weitere Untersuchung besonders von Interesse ist. In diesem Fall wäre eine Kopplung von Peptidsynthese und Acylierung allein durch Austausch des Lösungsmittels und Zugabe des Acylierungspartners denkbar.

Wie die anionischen Heterooligopeptide sind auch kationische Heterooligopeptide amphiphile Moleküle, die zur Selbstausrichtung und Bildung von Nanostrukturen neigen [42]. Dabei bestimmt die Anordnung der hydrophoben Aminosäuren, ob eher β -Faltblätter oder eher α -Helices gebildet werden [157] und dadurch letztendlich auch die Starrheit oder Beweglichkeit der gebildeten Struktur [158]. Zhang *et al.* stellten eine Reihe von tensidischen Peptiden her, die einen hydrophoben Schwanz (Leucin) und eine positiv geladene, hydrophile Kopfgruppe trugen (Lysin), die zum Transport von DNA genutzt werden, indem die positiv geladenen Peptide die negative geladene DNA

einkapseln [159, 160]. Des Weiteren sind für kationische Oligopeptide auch antibiotische Eigenschaften beschrieben [80, 161]. Viele auf Peptiden basierende Nanostrukturen wie z. B. Hydrogele besitzen eine gute Zelladhäsion, können bioaktive Substanzen transportieren und eignen sich somit in der regenerativen Medizin zur Wundheilung oder Regeneration von Nervenzellen [162, 163]. Durch ihre gute Biokompatibilität und Abbaubarkeit eignen sie sich auch für andere biomedizinische Anwendungen [164].

5. Literaturverzeichnis

1. Banat, I.M., Makkar, R.S. and Cameotra, S.S., *Potential commercial applications of microbial surfactants*. Appl Microbiol Biotechnol, 2000. **53**(5): p. 495-508.
2. Piljac, T. and Piljac, G., *Use of rhamnolipids in wound healing, treating burn shock, atherosclerosis, organ transplants, depression, schizophrenia and cosmetics*. 2007, Paradigm Biomedical Inc.
3. Mixich, J. and Rapp, K., *Process for producing rhamnose from rhamnolipids*. 1990, Suedzucker AG.
4. Müller, M.M., *Optimization and characterization of microbial rhamnolipid production from renewable resources*, in *Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich II: Technische Biologie*. 2011, Dissertation, Karlsruhe Institut für Technologie (KIT): Karlsruhe.
5. Lang, S. and Trowitzsch-Kienast, W., *Biotenside*. 2002, Stuttgart: Teubner.
6. Lee, C.H., Kawasaki, Y. and Maibach, H.I., *Effect of Surfactant Mixtures on Irritant Contact-Dermatitis Potential in Man - Sodium Lauroyl Glutamate and Sodium Lauryl Sulfate*. Contact Dermatitis, 1994. **30**(4): p. 205-209.
7. Macian, M., Seguer, J., Infante, M.R., Selve, C. and Vinardell, M.P., *Preliminary studies of the toxic effects of non-ionic surfactants derived from lysine*. Toxicology, 1996. **106**(1-3): p. 1-9.
8. Müller, B. and Kaftan, P., *N-acyl amino acid as corrosion protection*. 2012, HENKEL AG & CO. KGAA.
9. Xia, J.D., Xia, Y.M. and Nnanna, I.A., *Structure-Function Relationship of Acyl Amino-Acid Surfactants - Surface-Activity and Antimicrobial Properties*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(4): p. 867-871.
10. Imabayashi, Y., *Biodegradability of N-Acyl amino acid surfactants in river water running through a forest*. Bulletin of the Faculty of Human Environmental Science, 1998. **29**: p. 43-48.
11. Qin, C.H., *Design and synthesis of N-acylpeptides for screening antibiotic against clinical drug-resistant microbes*. Abstracts 11th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, 2009: p. 127.
12. Krueger, M. and Goddinger, D., *Hydrolysat aus Vikunja-Wolle und dessen Verwendung in kosmetischen Zubereitungen* 2009, Henkel AG & Co KGaA.
13. Merrifield, R.B., *Solid Phase Peptide Synthesis. 1. Synthesis of a Tetrapeptide*. JACS, 1963. **85**(14): p. 2149-2154.
14. Carpino, L.A., *Oxidative Reactions of Hydrazines. 1. A New Synthesis of Acid Chlorides*. JACS, 1957. **79**(1): p. 96-98.

15. Carpino, L.A. and Han, G.Y., *9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group*. JACS, 1970. **92**(19): p. 5748-&.
16. Bergmann, M. and Zervas, L., *Über ein allgemeines Verfahren zur Peptidsynthese*. Ber. dtsh. Chem. Ges., 1932. **65**: p. 1192.
17. Roeske, R.W., *Protection of functional groups in peptide synthesis.*, in *The peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, E. Gross and J. Meienhofer, Editors. 1979, Academic Press: New York 1975-1987. p. 101.
18. Jones, J.H., *The formation of peptide bonds: a general survey*, in *The peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, E. Gross and J. Meienhofer, Editors. 1979, Academic Press: New York 1975-1987.
19. Meienhofer, J., *The azide method in peptide synthesis*, in *The peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, E. Gross and J. Meienhofer, Editors. 1979, Academic Press: New York 1975-1987.
20. Meienhofer, J., *The mixed carbonic anhydride method of peptide synthesis*, in *The peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, E. Gross and J. Meienhofer, Editors. 1979, Academic Press: New York 1975-1987.
21. Rich, D.H. and Singh, J.P., *The carbodiimide method*, in *The peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, E. Gross and J. Meienhofer, Editors. 1979, Academic Press: New York 1975-1987.
22. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H.L., Bolivar, F. and Boyer, H.W., *Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin*. Science, 1977. **198**(4321): p. 1056-63.
23. Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. and Riggs, A.D., *Expression in Escherichia-Coli of Chemically Synthesized Genes for Human Insulin*. PNAS, 1979. **76**(1): p. 106-110.
24. Wetzel, R. and Goeddel, D.V., *Synthesis of polypeptides by recombinant DNA technology*, in *The peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, J. Meienhofer and S. Udenfriend, Editors. 1979, Academic Press: New York. p. 2-65.
25. Oyama, K., Nishimura, S., Nonaka, Y., Kihara, K.I. and Hashimoto, T., *Synthesis of an Aspartame Precursor by Immobilized Thermolysin in an Organic-Solvent*. J Org Chem, 1981. **46**(25): p. 5241-5242.
26. Bruggink, A., Roos, E.C. and de Vroom, E., *Penicillin acylase in the industrial production of beta-lactam antibiotics*. Org Process Res Dev, 1998. **2**(2): p. 128-133.
27. Schoemaker, H.E., Mink, D. and Wubbolts, M.G., *Dispelling the myths--biocatalysis in industrial synthesis*. Science, 2003. **299**(5613): p. 1694-7.
28. Jakubke, H.D., Kuhl, P. and Konnecke, A., *Basic Principles of Protease-Catalyzed Peptide-Bond Formation*. Angew Chem Int Ed, 1985. **24**(2): p. 85-93.

29. Bordusa, F., *Proteases in organic synthesis*. Chem Rev, 2002. **102**(12): p. 4817-68.
30. Schellenberger, V. and Jakubke, H.D., *Protease-Catalyzed Kinetically Controlled Peptide-Synthesis*. Angew Chem Int Ed, 1991. **30**(11): p. 1437-1449.
31. Lombard, C., Saulnier, J. and Wallach, J.M., *Recent trends in protease-catalyzed peptide synthesis*. Protein Pept Lett, 2005. **12**(7): p. 621-9.
32. Bender, M.L., Gunter, C.R., Kezdy, F.J. and Clement, G.E., *Kinetics of Alpha-Chymotrypsin Reactions in Presence of Added Nucleophiles*. JACS, 1964. **86**(18): p. 3697-&.
33. Jakubke, H.D., *Peptide Ligases - Tools for Peptide-Synthesis*. Angew Chem Int Ed, 1995. **34**(2): p. 175-177.
34. Schwab, L.W., Kloosterman, W.M.J., Konieczny, J. and Loos, K., *Papain Catalyzed (co)Oligomerization of α -Amino Acids*. Polymers, 2012. **4**(1): p. 710-740.
35. Jost, R., Brambilla, E., Monti, J.C. and Luisi, P.L., *Papain Catalyzed Oligomerization of Alpha-Amino-Acids - Synthesis and Characterization of Water-Insoluble Oligomers of L-Methionine*. Helv Chim Acta, 1980. **63**(2): p. 375-384.
36. Brenner, M., Muller, H.R. and Pfister, R.W., *Eine Neue Enzymatische Peptidsynthese. 1*. Helv Chim Acta, 1950. **33**(3): p. 568-&.
37. Sluyterman, L.A. and Wijdenes, J., *Sigmoidal Progress Curves in Polymerization of Leucine Methyl-Ester Catalyzed by Papain*. Biochim Biophys Acta, 1972. **289**(1): p. 194-&.
38. Anderson, G. and Luisi, P.L., *Papain-Induced Oligomerization of Alpha-Amino-Acid Esters*. Helv Chim Acta, 1979. **62**(2): p. 488-494.
39. Brenner, M., Sailer, E. and Rufenacht, K., *Enzymatische Peptidsynthese .3. Peptidbildung Aus DL-Threonin-Isopropylester*. Helv Chim Acta, 1951. **34**(6): p. 2096-2102.
40. Langer, R. and Vacanti, J.P., *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
41. Fernandez-Lopez, S., Kim, H.S., Choi, E.C., Delgado, M., Granja, J.R., Khasanov, A., Kraehenbuehl, K., Long, G., Weinberger, D.A., Wilcoxon, K.M. and Ghadiri, M.R., *Antibacterial agents based on the cyclic DL-alpha-peptide architecture*. Nature, 2001. **412**: p. 452.
42. Vauthey, S., Santoso, S., Gong, H.Y., Watson, N. and Zhang, S.G., *Molecular self-assembly of surfactant-like peptides to form nanotubes and nanovesicles*. PNAS, 2002. **99**(8): p. 5355-5360.
43. Arima, J., Uesugi, Y., Uraji, M., Iwabuchi, M. and Hatanaka, T., *Dipeptide synthesis by an aminopeptidase from Streptomyces septatus TH-2 and its application to synthesis of biologically active peptides*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(6): p. 4225-4231.
44. Therrien, C., Lachance, P., Sulea, T., Purisima, E.O., Qi, H., Ziomek, E., Alvarez-Hernandez, A., Roush, W.R. and Menard, R., *Cathepsins X and B can be differentiated through their*

- respective mono- and dipeptidyl carboxypeptidase activities.* Biochemistry, 2001. **40**(9): p. 2702-11.
45. Lei, H., Wang, W., Chen, L.L., Li, X.C., Yi, B. and Deng, L., *The preparation and catalytically active characterization of papain immobilized on magnetic composite microspheres.* Enzyme Microb Technol, 2004. **35**(1): p. 15-21.
46. Gill, I., Lopezfandino, R. and Vulfson, E., *Enzymatic Oligopeptide Synthesis Using a Minimal Protection Strategy - Sequential Assembly of a Growing Oligopeptide Chain.* JACS, 1995. **117**(23): p. 6175-6181.
47. Uvnas-Moberg, K. and Petersson, M., *Oxytocin, a mediator of anti-stress, well-being, social interaction, growth and healing.* Z Psychosom Med Psychother, 2005. **51**(1): p. 57-80.
48. Brogden, K.A., *Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(3): p. 238-250.
49. Bender, M.L. and Kezdy, F.J., *Mechanism of Action of Proteolytic Enzymes.* Annu Rev Biochem, 1965. **34**: p. 49-&.
50. Jones, W.M., Scaloni, A., Bossa, F., Popowicz, A.M., Schneewind, O. and Manning, J.M., *Genetic relationship between acylpeptide hydrolase and acylase, two hydrolytic enzymes with similar binding but different catalytic specificities.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2194-8.
51. Wang, C.S. and Kloer, H.U., *Kinetic properties of human pancreatic carboxylesterase.* Biochim Biophys Acta, 1983. **754**(2): p. 142-9.
52. Rondel, C., Alric, I., Mouloungui, Z., Blanco, J.F. and Silvestre, F., *Synthesis and Properties of Lipoamino Acid-Fatty Acid Mixtures: Influence of the Amphiphilic Structure.* Journal of Surfactants and Detergents, 2009. **12**(3): p. 269-275.
53. Baumann, E., *Über eine einfache Methode der Darstellung von Benzoësäureäthern.* Eur J Inorg Chem, 1886. **19**: p. 3218.
54. Schotten, C., *Über die Oxydation des Piperidins.* Eur. J. Inorg. Chem., 1884. **17**: p. 2544.
55. Aha, B.S., *Biologisch abbaubare Tenside aus Nachwachsenden Rohstoffen: N-Acylaminosäuren - Synthesen und Tensideigenschaften in Fachbereich 9: Naturwissenschaften II.* 1999, Dissertation, Bergische Univeristät-GH-Wuppertal.
56. Radzishovsky, I.S., Kovachi, T., Porat, Y., Ziserman, L., Zaknoon, F., Danino, D. and Mor, A., *Structure-activity relationships of antibacterial acyl-lysine oligomers.* Chem Biol, 2008. **15**(4): p. 354-62.
57. Müller, S., *Lipase-katalysierte Acylierung von Aminosäuren und Aminosäurederivaten, in Fachbereich 9, Chemie.* 2000, Dissertation, Bergische Universität-GH-Wuppertal.

58. Montet, D., Servat, F., Pina, M., Graille, J., Galzy, P., Arnaud, A., Ledon, H. and Marcou, L., *Enzymatic-Synthesis of N-Epsilon-Acyllysines*. J Am Oil Chem Soc , 1990. **67**(11): p. 771-774.
59. Breitmaier, E. and Jung, G., *Organische Chemie: Grundlagen, Verbindungsklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur, Naturstoffe*. Vol. 6., überarbeitete Auflage. 2009, Stuttgart: Thieme.
60. Jager, S.A.W., Jekel, P.A. and Janssen, D.B., *Hybrid penicillin acylases with improved properties for synthesis of beta-lactam antibiotics*. Enzyme Microb Technol , 2007. **40**(5): p. 1335-1344.
61. Gotor, V., Menendez, E., Mouloungui, Z. and Gaset, A., *Synthesis of Optically-Active Amides from Beta-Furyl and Beta-Phenyl Esters by Way of Enzymatic Aminolysis*. J Chem Soc Perkin Trans I, 1993(20): p. 2453-2456.
62. Jaeger, K.E., Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K. and Reetz, M.T., *Biotechnological application of Pseudomonas aeruginosa lipase: Efficient kinetic resolution of amines and alcohols*. Appl Microbiol Biotechnol, 1996. **46**(2): p. 99-105.
63. Xu, K., Griebenow, K. and Klibanov, A.M., *Correlation between catalytic activity and secondary structure of subtilisin dissolved in organic solvents*. Biotechnol Bioeng, 1997. **56**(5): p. 485-91.
64. Murphy, A. and Fagain, C.O., *Dipeptide synthesis using acetylated trypsin derivative*. Biotechnol Tech, 1997. **11**(1): p. 13-16.
65. Xing, G.W., Li, X.W., Tian, G.L. and Ye, Y.H., *Enzymatic peptide synthesis in organic solvent with different zeolites as immobilization matrixes*. Tetrahedron, 2000. **56**(22): p. 3517-3522.
66. Li, G., Vaidya, A., Viswanathan, K., Cui, J.R., Xie, W.C., Gao, W. and Gross, R.A., *Rapid regioselective oligomerization of L-glutamic acid diethyl ester catalyzed by papain*. Macromolecules, 2006. **39**(23): p. 7915-7921.
67. Smith, P., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
68. Roth, M., *Fluorescence Reaction for Amino Acids*. Anal. Chem., 1971. **43**(7): p. 880-&.
69. Baek, I.-G., *Analytik von Aminosäuren und biogenen Aminen in fermentierten Lebensmitteln mittels HPLC und GC*. 1999, Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
70. Sander, A., Eilers, E., Heilemann, A. and vonKries, E., *Production and application of acylated protein hydrolysates*. Fett-Lipid, 1997. **99**(4): p. 115-120.
71. Ronwin, E., *Direct Acylation of Alpha-Amino Acids and of Alpha-Hydroxy Acid Derivatives*. J Org Chem , 1953. **18**(2): p. 127-132.
72. du Nouy, P.L., *A New Apparatus for Measuring Surface Tension*. J Gen Physiol, 1919. **1**(5): p. 521-4.

73. Li, G., Raman, V.K., Xie, W.C. and Gross, R.A., *Protease-catalyzed co-oligomerizations of L-leucine ethyl ester with L-glutamic acid diethyl ester: Sequence and chain length distributions*. *Macromolecules*, 2008. **41**(19): p. 7003-7012.
74. Uemura, T., Fujimori, M., Lee, H.H., Ikeda, S. and Aso, K., *Polyethylene-Glycol Modified Papain Catalyzed Oligopeptide Synthesis from the Esters of L-Aspartic and L-Glutamic Acids in Benzene*. *Agric Biol Chem*, 1990. **54**(9): p. 2277-2281.
75. Aso, K., Uemura, T. and Shiokawa, Y., *Protease-Catalyzed Synthesis of Oligo-L-Glutamic Acid from L-Glutamic Acid Diethyl Ester*. *Agric Biol Chem*, 1988. **52**(10): p. 2443-2449.
76. Qin, X., Xie, W.C., Su, Q., Du, W.Z. and Gross, R.A., *Protease-Catalyzed Oligomerization of L-Lysine Ethyl Ester in Aqueous Solution*. *ACS Catal*, 2011. **1**(9): p. 1022-1034.
77. Kawase, T., Nishioka, Y. and Oida, T., *Novel synthesis of N-alkoxycarbonyl amino acids and surfactant properties of their sodium salts*. *J Oleo Sci*, 2010. **59**(4): p. 191-201.
78. Jungermann, E., Gerecht, J.F. and Krems, I.J., *The Preparation of Long Chain N-Acylamino Acids*. *JACS*, 1956. **78**(1): p. 172-174.
79. Vargaftik, N.B., Volkov, B.N. and Voljak, L.D., *International Tables of the Surface-Tension of Water*. *J Phys Chem Ref Data*, 1983. **12**(3): p. 817-820.
80. Roy, S. and Das, P.K., *Antibacterial hydrogels of amino acid-based cationic amphiphiles*. *Biotechnol Bioeng*, 2008. **100**(4): p. 756-764.
81. Brenner, M. and Pfister, R.W., *Enzymatische Peptidsynthese. 2. Isolierung Von Enzymatisch Gebildetem L-Methionyl-L-Methionin Und L-Methionyl-L-Methionyl-L-Methionin - Vergleich Mit Synthetischen Produkten*. *Helv Chim Acta*, 1951. **34**(6): p. 2085-2096.
82. Brenner, M., Rufenacht, K. and Sailer, E., *Darstellung Von L-Threonin Und D-Threonin Durch Racematspaltung von N-Tosyl-DL-Threonin*. *Helv Chim Acta*, 1951. **34**(6): p. 2102-2106.
83. Dannenberg, A.M. and Smith, E.L., *Action of Proteinase-I of Bovine Lung - Hydrolysis of the Oxidized B-Chain of Insulin - Polymer Formation from Amino Acid Esters*. *J Biol Chem*, 1955. **215**(1): p. 55-66.
84. Uemura, T., Kato, K. and Aso, K., *Stereospecificity in Papain-Catalyzed Oligopeptide Synthesis*. *Agric Biol Chem*, 1990. **54**(11): p. 3009-3010.
85. Katchalski, E. and Sela, M., *Synthesis and Chemical Properties of Poly-Alpha-Amino Acids*. *Adv Protein Chem*, 1958. **13**: p. 243-492.
86. Fukuoka, T., Tachibana, Y., Tonami, H., Uyama, H. and Kobayashi, S., *Enzymatic polymerization of tyrosine derivatives. Peroxidase- and protease-catalyzed synthesis of poly(tyrosine)s with different structures*. *Biomacromolecules*, 2002. **3**(4): p. 768-74.

87. Uyama, H., Fukuoka, T., Komatsu, I., Watanabe, T. and Kobayashi, S., *Protease-catalyzed regioselective polymerization and copolymerization of glutamic acid diethyl ester*. *Biomacromolecules*, 2002. **3**(2): p. 318-23.
88. Jakubke, H.D. and Jeschkeit, H., *Aminosäuren, Peptide, Proteine*. 1982: Verlag Chemie. 40.
89. Tieke, B., *Makromolekulare Chemie*. 2000, Weinheim: Wiley-VCH.
90. Barrett, A.J., Woessner, J.F. and Rawlings, N.D., *Handbook of proteolytic enzymes*. 1998, London: Academic Press.
91. Monter, B., Herzog, B., Stehle, P. and Furst, P., *Kinetically controlled synthesis of dipeptides using ficin as biocatalyst*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1991. **14**(2): p. 183-91.
92. Khan, R.H., Rasheedi, S. and Haq, S.K., *Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain*. *Journal of Biosciences*, 2003. **28**(6): p. 709-714.
93. Mahmood, R. and Saleemuddin, M., *Additional stabilization of stem bromelain coupled to a thermosensitive polymer by uniform orientation and using polyclonal antibodies*. *Biochemistry (Mosc)*, 2007. **72**(3): p. 307-312.
94. Sizer, I.W. and Josephson, E.S., *Kinetics as a function of temperature of lipase, trypsin, and invertase activity from -70 °C to 50 °C*. *Food Res*, 1942. **7**: p. 201.
95. Schuster, M., Aaviksaar, A. and Jakubke, H.D., *Enzyme-Catalyzed Peptide-Synthesis in Ice*. *Tetrahedron*, 1990. **46**(24): p. 8093-8102.
96. Haensler, M., Thust, S., Klossek, P. and Ullmann, G., *Enzyme-catalyzed preparative peptide synthesis in frozen aqueous systems*. *J Mol Catal B: Enzym.*, 1999. **6**(1-2): p. 95-98.
97. Ullmann, G., Haensler, M., Gruender, W., Wagner, M., Hofmann, H.J. and Jakubke, H.D., *Influence of freeze-concentration effect on proteinase-catalysed peptide synthesis in frozen aqueous systems*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1338**(2): p. 253-8.
98. Andrade, E.N.d.C., *A Theory of the Viscosity of Liquids - Part I*. *London Edinb Dub Philos Mag J Sci*, 1934. **17**(112): p. 497-511.
99. Malkin, A.Y. and Isayev, A.I., *Rheology. Concepts, Methods and Application*. Vol. 2. Auflage 2012, Toronto.
100. Steinkuhler, C., Biasiol, G., Brunetti, M., Urbani, A., Koch, U., Cortese, R., Pessi, A. and De Francesco, R., *Product inhibition of the hepatitis C virus NS3 protease*. *Biochemistry*, 1998. **37**(25): p. 8899-905.
101. Devaraj, K.B., Kumar, P.R. and Prakash, V., *Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from Ficus carica*. *J Agric Food Chem*, 2008. **56**(23): p. 11417-23.

102. Hansler, M., Ullmann, G. and Jakubke, H.D., *The application of papain, ficin and clostripain in kinetically controlled peptide synthesis in frozen aqueous solutions*. J Pept Sci, 1995. **1**(5): p. 283-7.
103. Sugiura, M. and Sasaki, M., *Studies on proteinases from Ficus carica var. Horaishi. V. Purification and properties of a sugar-containing proteinase (ficin S)*. Biochim Biophys Acta, 1974. **350**(1): p. 38-47.
104. Bisswanger, H., *Enzymkinetik: Theorie und Methoden*. 2000: Wiley-VCH.
105. Tabata, K., Ikeda, H. and Hashimoto, S., *ywfE in Bacillus subtilis codes for a novel enzyme, L-amino acid ligase*. JB, 2005. **187**(15): p. 5195-5202.
106. Daabees, T.T. and Stegink, L.D., *L-Alanyl-L-Tyrosine as a Tyrosine Source during Intravenous Nutrition of Rat*. J. NUTR., 1978. **108**(7): p. 1104-1113.
107. Glazer, A.N., *Transesterification Reactions Catalyzed by Papain*. J Biol Chem, 1966. **241**(16): p. 3811-&.
108. Glazer, A.N., *Transesterification Reactions Catalyzed by Subtilisins*. J Biol Chem, 1966. **241**(3): p. 635-&.
109. Fox, S.W. and Pettinga, C.W., *Enzymic synthesis of peptide bonds; preferences of papain within the monoaminomonocarboxylic acid series*. Arch Biochem, 1950. **25**(1): p. 21-9.
110. Lorbert, S.J., Schasteen, C.S., Nam, P.K.S., Forciniti, D., Rajesh, M.P. and Kapila, S., *Enantioselective oligomerization of alpha-hydroxy carboxylic acids and alpha-amino acids*. 2002, Novus International, Inc.
111. Deming, T.J., *Synthetic polypeptides for biomedical applications*. Prog Polym Sci, 2007. **32**(8-9): p. 858-875.
112. Sanda, F. and Endo, T., *Syntheses and functions of polymers based on amino acids*. Macromol Chem and Phys, 1999. **200**(12): p. 2651-2661.
113. Minoura, N., Fujiwara, Y. and Nakagawa, T., *Permeability of Poly-L-Methionine Membrane and Its Oxidized Membrane to Water-Vapor*. J Appl Polym Sci, 1978. **22**(6): p. 1593-1605.
114. Santoso, S.S., Vauthey, S. and Zhang, S.G., *Structures, function and applications of amphiphilic peptides*. Curr Opin Colloid Interface Sci, 2002. **7**(5-6): p. 262-266.
115. Hu, X., *Hydrogel contact lens for extended delivery of ophthalmic drugs*. International Journal of Polymer Science, 2011. **2011**: p. 9.
116. Aso, K. and Kodaka, H., *Trypsin-Catalyzed Oligomerization of L-Lysine Esters*. Biosci Biotech Biochem, 1992. **56**(5): p. 755-758.
117. Shibue, M., Mant, C.T. and Hodges, R.S., *The perchlorate anion is more effective than the trifluoroacetate anion as an ion-pairing reagent for reversed-phase chromatography of peptides*. J Chromatogr A, 2005. **1080**(1): p. 49-57.

118. Shibue, M., Mant, C.T. and Hodges, R.S., *Effect of anionic ion-pairing reagent hydrophobicity on selectivity of peptide separations by reversed-phase liquid chromatography*. J Chromatogr A, 2005. **1080**(1): p. 68-75.
119. Shibue, A., Mant, C.T. and Hodges, R.S., *Effect of anionic ion-pairing reagent concentration (1-60 mM) on reversed-phase liquid chromatography elution behaviour of peptides*. J Chromatogr A, 2005. **1080**(1): p. 58-67.
120. Mandell, J.G., Falick, A.M. and Komives, E.A., *Measurement of amide hydrogen exchange by MALDI-TOF mass spectrometry*. Anal Chem, 1998. **70**(19): p. 3987-3995.
121. Barrett, G.C. and Hardy, P.M., *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*. The Protein Amino Acids, ed. P.M. Hardy. 1985: Chapman and Hall.
122. Leone-Bay, A., Santiago, N., Achan, D., Chaudhary, K., DeMorin, F., Falzarano, L., Haas, S., Kalbag, S., Kaplan, D., Leipold, H. and *et al.*, *N-acylated alpha-amino acids as novel oral delivery agents for proteins*. J Med Chem, 1995. **38**(21): p. 4263-9.
123. Syldatk, C., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. and Witte, L., *Chemical and Physical Characterization of 4 Interfacial-Active Rhamnolipids from Pseudomonas Spec DSM 2874 Grown on Normal-Alkanes*. Z Naturforsch, C: Biosci., 1985. **40**(1-2): p. 51-60.
124. Benson, J.R. and Hare, P.E., *O-phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluoescamine and ninhydrin*. PNAS, 1975. **72**(2): p. 619-22.
125. Madhurima, V., Purkayastha, D.D. and Rao, N.V.S., *Wettability, FTIR and dielectric studies of 1,4-dioxane and water system*. J Colloid Interf Sci, 2011. **357**(1): p. 229-233.
126. Mazurkiewicz, J. and Tomasik, P., *Why 1,4-dioxane is a water-structure breaker*. J Mol Liq, 2006. **126**(1-3): p. 111-116.
127. Bakshi, M.S., *Micelle Formation by Anionic and Cationic Surfactants in Binary Aqueous Solvents*. J Chem Soc, Faraday Trans, 1993. **89**(24): p. 4323-4326.
128. Mulligan, C.N., *Environmental applications for biosurfactants*. Environ Pollut, 2005. **133**(2): p. 183-198.
129. Infante, M.R., Molinero, J., Erra, P., Julia, M.R. and Dominguez, J.J.G., *A Comparative-Study on Surface-Active and Antimicrobial Properties of Some N-Alpha-Lauroyl-L-Alpha, Omega Dibasic Amino-Acids Derivatives*. Fette Seifen Anstrichmittel, 1985. **87**(8): p. 309-313.
130. Radzishovsky, I., Krugliak, M., Ginsburg, H. and Mor, A., *Antiplasmodial activity of lauryl-lysine oligomers*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(5): p. 1753-9.
131. Mhaskar, S.Y., Prasad, R.B.N. and Lakshminarayana, G., *Synthesis of Normal-Acyl Amino-Acids and Correlation of Structure with Surfactant Properties of Their Sodium-Salts*. J Am Oil Chem Soc, 1990. **67**(12): p. 1015-1019.

132. Goldfarb, A.R., Saidel, L.J. and Mosovich, E., *The Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins*. J Biol Chem , 1951. **193**(1): p. 397-404.
133. Brucher, B., *Novel Transaminases for the Biocatalytic Synthesis of Aromatic beta Amino Acids*, in *Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik*. 2012, Dissertation, Karlsruhe Institut für Technology (KIT): Karlsruhe.
134. Guala, F., Acyl Amino Acid Type Surfactants.
135. Geng, X. and Regnier, F.E., *Retention model for proteins in reversed-phase liquid chromatography*. J Chromatogr, 1984. **296**: p. 15-30.
136. Carr, D.M., *The Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC*. 2002: Grace Vydac.
137. Hecht, E., *Optik*. Vol. 4. 2002: Oldenburg Wissenschaftsverlag GmbH.
138. Adamson, A.W., *Physical chemistry of surfaces*. Vol. 5 1990: Wiley.
139. Young, T., *An Essay on the Cohesion of Fluids*. Phil. Trans. R. Soc. Lond., 1805. **vol. 95**: p. 65-87.
140. Jeon, S., Choo, J., Sohn, D. and Lee, S.N., *Hydrogen bonding effects on the conformational changes of polyglutamates containing long flexible side chains*. Polymer, 2001. **42**(25): p. 9915-9920.
141. Li, G., Vaidya, A., Viswanathan, K., Cui, J., Xie, W.C., Gao, W. and Richard A. Gross, *Rapid Regioselective Oligomerization of L-Glutamic Acid Diethyl Ester Catalyzed by Papain*. Macromolecules, 2006. **39**(23): p. 7915-7921.
142. Wakabayashi, H., Matsumoto, H., Hashimoto, K., Teraguchi, S., Takase, M. and Hayasawa, H., *N-acylated and D enantiomer derivatives of a nonamer core peptide of lactoferricin B showing improved antimicrobial activity*. Antimicrob Agents Chemother , 1999. **43**(5): p. 1267-1269.
143. Radzishewsky, I.S., Rotem, S., Bourdetsky, D., Navon-Venezia, S., Carmeli, Y. and Mor, A., *Improved antimicrobial peptides based on acyl-lysine oligomers*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(6): p. 657-9.
144. Winkelmann, G. and Adam, W., *Herbicilins-new acylpeptide antibiotics with antimycetic activity against dermatophytes*. Mycoses, 1980. **23**(6): p. 290-4.
145. Epan, R.M. and Vogel, H.J., *Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action*. Biochim Biophys Acta-Biomembranes, 1999. **1462**(1-2): p. 11-28.
146. Jensen, R.G., deJong, F.A. and Clark, R.M., *Determination of lipase specificity*. Lipids, 1983. **18**(3): p. 239-52.
147. Theil, F., *Enzyme in der organischen Synthese*. 1997: Spektrum Akad. Verlag.

148. Cygler, M., Schrag, J.D. and Ergun, F., *Advances in structural understanding of lipases*. Biotechnol Genet Eng Rev, 1992. **10**: p. 143-84.
149. Corazza, M., Lauriola, M.M., Bianchi, A., Zappaterra, M. and Virgili, A., *Irritant and sensitizing potential of eight surfactants commonly used in skin cleansers: an evaluation of 105 patients*. Dermatitis. **21**(5): p. 262-8.
150. Butte, W., *Rapid Method for the Determination of Fatty-Acid Profiles from Fats and Oils Using Trimethylsulfonium Hydroxide for Trans-Esterification*. J Chromatogr, 1983. **261**(1): p. 142-145.
151. Gupta, A. and Khare, S.K., *A protease stable in organic solvents from solvent tolerant strain of Pseudomonas aeruginosa*. Bioresour Technol, 2006. **97**(15): p. 1788-93.
152. Gupta, A., Roy, I., Khare, S.K. and Gupta, M.N., *Purification and characterization of a solvent stable protease from Pseudomonas aeruginosa PseA*. J Chromatogr A, 2005. **1069**(2): p. 155-61.
153. Gupta, M.N., *Enzyme function in organic solvents*. Eur J Biochem, 1992. **203**(1-2): p. 25-32.
154. Ogino, H. and Ishikawa, H., *Enzymes which are stable in the presence of organic solvents*. J Biosci Bioeng, 2001. **91**(2): p. 109-16.
155. Gupta, M.N. and Roy, I., *Enzymes in organic media. Forms, functions and applications*. Eur J Biochem, 2004. **271**(13): p. 2575-83.
156. Bode, W., *Activation, activity and inhibition of bovine trypsin*. Naturwissenschaften, 1979. **66**(5): p. 251-8.
157. Degrado, W.F. and Lear, J.D., *Induction of Peptide Conformation at Apolar Water Interfaces .1. A Study with Model Peptides of Defined Hydrophobic Periodicity*. JACS, 1985. **107**(25): p. 7684-7689.
158. Fairman, R. and Akerfeldt, K.S., *Peptides as novel smart materials*. Curr Opin Struct Biol, 2005. **15**(4): p. 453-463.
159. von Maltzahn, G., Vauthey, S., Santoso, S. and Zhang, S.U., *Positively charged surfactant-like peptides self-assemble into nanostructures*. Langmuir, 2003. **19**(10): p. 4332-4337.
160. Gorman, J., *Delivering the goods: gene therapy without the virus*. Sci News, 2003. **163**: p. 43-44.
161. Hancock, R.E.W. and Lehrer, R., *Cationic peptides: a new source of antibiotics*. TIBTech, 1998. **16**(2): p. 82-88.
162. Madison, R., Dasilva, C.F., Dikkes, P., Chiu, T.H. and Sidman, R.L., *Increased Rate of Peripheral-Nerve Regeneration Using Bioresorbable Nerve Guides and a Laminin-Containing Gel*. Experimental Neurology, 1985. **88**(3): p. 767-772.

163. Chung, H.J. and Park, T.G., *Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007. **59**(4-5): p. 249-262.
164. Vladkova, T.G., *Surface engineered polymeric biomaterials with improved biocontact properties*. *International Journal of Polymer Science*, 2010. **2010**: p. 22.

6. Anhang

6.1. Beruflicher und wissenschaftlicher Lebenslauf

Persönliches:

Name: Markus Andre,
Geburtsdatum: 25. April 1982
Geburtsort: Saarlouis
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

Seit 01/2009 Promotion am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich II:
Technische Biologie, KIT, Karlsruhe, Prof. Dr. Christoph Syldatk
01/2008 bis 10/2008 Diplomarbeit in der Abteilung Mikrobiologie der TU
Kaiserslautern
10/2002 – 11/2007 Biologiestudium an der TU Kaiserslautern, Abschluss: Diplom-Biologe
2001 Abitur am Max-Planck-Gymnasium Saarlouis

Beruf:

Seit 01/2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik,
Bereich II: Technische Biologie, Karlsruhe Institut für Technologie (KIT),
Karlsruhe

Weiterbildungen:

09-10/2010 Zweimonatiger Forschungsaufenthalt an der Cape Peninsula
University of Technology in Kapstadt, Südafrika
05/2009 COST Summer School Biocatalysis in Siena, Italien

6.2. Publikationen und Präsentationen

Publikationen:

Andre, M., Kühl, B., Brenner-Weiss, G., Sylдатk C., Rudat J. (2012)

Co-oligomerization of L-lysine ethylester and L-methionine ethylester towards cationic heterooligopeptides, *Polymers* (submitted)

Poster:

Andre M., Sylдатk C., Rudat J. (2012):

Enzyme-catalyzed synthesis of homo- and heterooligopeptides; Catalyzing Bio-Economy - Biocatalysts for Industrial Biotechnology, Jahrestreffen der DECHEMA-VAAM-Fachgruppe Biotransformationen.

Andre M., Sylдатk C., Rudat J. (2011):

Modified enzymatic oligopeptide synthesis towards short chain lengths; Biotrans 2011, 10th International Symposium on Biocatalysis, PC-52.

Andre M., Sylдатk C., Rudat J. (2011):

Acylpeptides as biosurfactants produced by a chemo-enzymatic one-pot reaction; Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Biospektrum Tagungsband, GWP046.

Andre M., Sylдатk C., Rudat J. (2010):

Protease-katalysierte Synthese kurzkettiger Peptide; 28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen und ProcessNet-Jahrestagung, *Chem Ing Tech*; 82, 1523, P7.01

Andre M., Sylдатk C., Rudat J. (2010):

Enzymatical peptide synthesis via reversed proteolysis in frozen aqueous solutions (FAS) and Ionic Liquids; Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) / 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)), Biospektrum Tagungsband, BTP34.