

**Mikrobielle und enzymatische Hydrolyse von cyclischen
Dipeptiden (Diketopiperazine)
sowie Etablierung von Analysemethoden zum
Nachweis der Edukte und Produkte**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Biochem. Mareike Perzborn

aus

Haan

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Stefan Bräse

Korreferent: Prof. Dr. Christoph Syldatk

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2012

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die darin angegeben Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung des Karlsruher Institut für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung beachtet habe.

Ich versichere außerdem, dass ich diese Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Den folgenden Personen und Institutionen möchte ich für die Unterstützung während dieser Doktorarbeit danken:

- Herrn Prof. Dr. Christoph Syldatk für die Überlassung des spannenden Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, das Interesse am Fortlauf der Arbeit und seine stetige Bereitschaft zur Diskussion.
- Herrn Prof. Dr. Stefan Bräse für die freundliche Übernahme des Referates.
- Herrn Dr. Jens Rudat für die hervorragende Betreuung der Doktorarbeit, die Weitergabe seines Wissens und seinen guten Anregungen. Besonders hervorzuheben ist sein stetiger Optimismus bei auftretenden Problemen.
- Frau Prof. Burton und ihrer Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme und Unterstützung während meines Forschungsaufenthalts in Kapstadt.
- Dipl.-Biochem. Frank Ströhle, M.Sc. Judit Maur, Marcel Loewert und Berthold Sämman für deren praktische Arbeit und hilfreiche Ergebnisse.
- Dr. Berna Gerçe für die Übergabe diverser Schwammproben.
- Taros Chemicals GmbH & Co. KG für die Zurverfügungstellung verschiedener Substrate.
- Dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) (Projektförderer) und der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) (Projekträger) für die Finanzierung des Verbundprojekts „Polymere Tenside aus nachwachsenden Rohstoffen mit optimierten Performance-Eigenschaften“, Teilprojekt 9: Synthese von Acylpeptiden.
- Der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich II: Technische Biologie für ein herausragendes Arbeitsklima und eine unvergessliche Zeit.
- Meiner Familie für deren unerschütterliche Unterstützung.

Zusammenfassung

Diketopiperazine (DKPs) sind cyclische Dipeptide und stellen eine in der Natur weit verbreitete Klasse biologisch aktiver Substanzen dar. Einige DKPs weisen antibakterielle, antifungale oder antivirale Aktivitäten, sowie Phytotoxizität oder Zytotoxizität auf.

In dieser Arbeit wurde die enzymatische und mikrobielle Spaltung dieser Moleküle untersucht. Dabei wurden elf DKPs verwendet, von denen acht aus proteinogenen Aminosäuren und drei aus nicht proteinogenen Aminosäuren aufgebaut sind.

Für die Quantifizierung der Edukte (DKPs) und potentieller Produkte (lineare Dipeptide) wurde eine HPLC-Analytik zur Detektion und Trennung der underivatisierten Substanzen etabliert und erfolgreich entsprechend den *bioanalytical method validation* Richtlinien der U.S. Food and Drug Administration validiert. Die entwickelten Methoden erwiesen sich als geeigneter als der Nachweis der Substanzen mittels Vorsäulenderivatisierung (z. B.: Dabsyl-Cl und Fmoc-Cl). Für das racemische DKP Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) und das entsprechende Dipeptid DL-Ala-DL-Ala konnte darüber hinaus eine Methode zur Trennung der jeweiligen Diastereomere entwickelt werden. Mit den etablierten Methoden konnten überwiegend sehr gute Trennungen (Auflösungen $R > 1,5$) und kurze Analysezeiten (Retentionszeiten $t_R < 15$ min) erzielt werden. Für alle untersuchten DKPs, Dipeptide und Aminosäuren wurden lineare Bereiche mit Bestimmtheitsmaßen R^2 von mindestens 0,998 und mit Nachweisgrenzen zwischen 0,005 und 0,1 mM bestimmt. Die Bestimmungsgrenze variierte abhängig von der Substanz zwischen 0,05 und 10 nmol pro 10 μ l Injektionsvolumen.

Die etablierten HPLC-Methoden wurden zur Identifizierung von Biokatalysatoren für den Abbau von DKPs eingesetzt. Dies führte zu folgenden Ergebnissen:

- A. Die in der Literatur beschriebene peptidasekatalysierte Hydrolyse einiger DKPs wurde widerlegt. Auch mit weiteren eingesetzten Peptidasen und DKPs wurde kein Abbau nachgewiesen. Diese Ergebnisse deuten auf eine außerordentliche Peptidasestabilität der Peptidbindungen in den untersuchten Molekülen hin.
- B. Viele Schwämme und Schwamm-assoziierte Bakterien sind für die Synthese von DKPs beschrieben. Um neue DKP-abbauende Bakterien zu identifizieren, wurde ein Screening mit Schwammproben und Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) als einziger Stickstoffquelle durchgeführt. Dabei konnten 114 marine Stämme isoliert werden. Davon wurden 49 bezüglich ihrer Fähigkeit diese DKPs abzubauen untersucht, jedoch zeigte keiner der Stämme eindeutige Aktivität.

- C. Für die Stämme *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) konnte die in der Literatur beschriebene Aktivität gegenüber Cyclo(L-Asp-L-Phe) bestätigt werden. Zudem wurde für DSM 329 erstmals die hydrolytische Spaltung von Cyclo(L-Asp-L-Asp) nachgewiesen. Die weiteren in dieser Arbeit verwendeten DKPs wurden von beiden Stämmen nicht hydrolysiert. Die Hydrolyse von Cyclo(L-Asp-L-Phe) durch DSM 329 wurde stark durch den Metallopeptidaseinhibitor EDTA und schwach durch den Serinpeptidaseinhibitor PMSF und den Cysteinpeptidaseinhibitor E-64 inhibiert. DSM 40062 zeigte einen gesteigerten Abbau von Cyclo(L-Asp-L-Phe) nach vorheriger Induktion mit dieser Substanz während der Kultivierung. Für beide Stämme konnte eine Anreicherung der DKP-hydrolysierenden Enzyme mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und Ionenaustauschchromatographie erzielt werden.
- D. Stämme mit beschriebener cyclische Amidase Aktivität, welche Hydantoine und Dihydropyrimidine umsetzen, wurden bezüglich der hydrolytischen Spaltung strukturell ähnlicher DKPs untersucht. Für alle 34 eingesetzten Stämme wurde der Abbau des als Positivkontrolle eingesetzten Dihydropyrimidins Dihydrouracil gezeigt. Darüber hinaus konnte für drei dieser Stämme erstmals der eindeutige Abbau von DKPs nachgewiesen werden. Für *Leifsonia* sp. K3 und *Bacillus* sp. A16 wurde die Hydrolyse von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) und Cyclo(Gly-L-Phe), für *Rhizobium* sp. NA04-01 die Spaltung von Cyclo(L-Asp-L-Phe), Cyclo(Gly-L-Phe) und Cyclo(L-Asp-L-Asp) detektiert.
- E. Es wurden zwei neue Isolate für den enantioselektiven Abbau von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) identifiziert, die mittels 16S rDNA Sequenzierung und Sequenzalignment als *Paenibacillus* sp. und *Microbacterium* sp. klassifiziert werden konnten. Das racemische Substrat Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) wurde nur zu 75 % abgebaut. Durch Einsatz des Enantiomers Cyclo(L-Ala-L-Ala) und der zur Trennung der Diastereomere von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) etablierten Analytik konnte die vollständige Hydrolyse von Cyclo(L-Ala-L-Ala) und Cyclo(L-Ala-D-Ala) nachgewiesen werden, wohingegen das Enantiomer Cyclo(D-Ala-D-Ala) nicht angegriffen wurde. Mit diesen beiden Eigenisolaten konnte zum ersten Mal die enantioselektive Hydrolyse eines racemischen DKPs nachgewiesen werden.

Insgesamt wurden fünf Bakterienstämme neu für die DKP-Hydrolyse identifiziert. Davon wurden zwei Stämme im Rahmen dieser Arbeit isoliert. Bei Untersuchungen mit diesen beiden Eigenisolaten konnte erstmalig die enantioselektive Hydrolyse eines racemischen DKPs nachgewiesen werden.

Zum ersten Mal konnte der mikrobielle Abbau der DKPs Cyclo(Ala-Ala) und Cyclo(Asp-Asp) gezeigt werden.

Summary

Diketopiperazines (DKPs) are cyclic dipeptides and represent a widespread class of biologically active natural compounds. Certain DKPs show antibacterial, antifungal or antiviral activities and phytotoxicity or cytotoxicity.

In this study, the enzymatic and microbial cleavage of these molecules was investigated. Eleven DKPs were examined; eight of them were composed of proteinogenic amino acids and three of non-proteinogenic amino acids.

For quantitation of the reactants (DKPs) and their potential degradation products (linear dipeptides) an HPLC analysis was established for the detection and separation of the underivatized substances. These methods were validated successfully according to the bioanalytical method validation guidelines by the U.S. Food and Drug Administration. The developed methods proved to be more suitable compared to the detection of the derivatized substances by precolumn derivatization (e.g. Dabsyl-Cl and Fmoc-Cl). Furthermore, a method to separate the diastereomers of the racemic DKP cyclo(DL-Ala-DL-Ala) and the corresponding dipeptide DL-Ala-DL-Ala was developed. The established methods led in most cases to very good separation (resolution $R > 1.5$) and short analysis time (retention times $t_R < 15$ min). For all studied DKPs, dipeptides and amino acids linear ranges with correlation coefficients R^2 greater than 0.998 were determined. Limit of detection varied from 0.005 to 0.1 mM and limit of quantitation from 0.05 and 10 nmol per 10 μ l injection, depending on the substance.

The established HPLC methods were used to identify biocatalysts for DKP degradation. The following results were obtained:

- A. Peptidase catalyzed hydrolysis of certain DKPs reported in literature was disproved. In experiments with additional peptidases and DKPs no degradation was detected. These results indicate extraordinary peptidase stability of the peptide bond in the investigated molecules.
- B. Many sponges and sponge-associated bacteria have been described to synthesize DKPs. A screening with sponge samples and cyclo(Gly-Gly) and cyclo(DL-Ala-DL-Ala) as sole nitrogen source was carried out to identify new DKP-degrading bacteria. 114 marine strains were isolated; 49 of these strains were tested for their ability to hydrolyze DKPs, but none of the strains showed reliable activity.
- C. The hydrolysis of cyclo(L-Asp-L-Phe) by *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) and *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) as described in literature was confirmed. In addition, cleavage of cyclo(L-Asp-L-Asp) by DSM 329 was detected for the first time.

Other investigated DKPs were not hydrolyzed by both strains. Hydrolysis of cyclo(L-Asp-L-Phe) by DSM 329 was strongly inhibited by the metallopeptidase inhibitor EDTA and weakly inhibited by the serine peptidase inhibitor PMSF and the cysteine peptidase inhibitor E-64. The degradation of cyclo(L-Asp-L-Phe) by DSM 40062 was shown to be inducible by this DKP during cultivation. For both strains an enrichment of the DKP-hydrolyzing enzymes was achieved by ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography.

- D. Strains with described cyclic amidase activity, cleaving hydantoins and dihydropyrimidines, were examined regarding the hydrolysis of the structurally similar DKPs. The degradation of the dihydropyrimidine dihydrouracil, used as a positive control, could be shown for all 34 tested strains. Moreover, for three of these strains DKP hydrolysis was detected for the first time. *Leifsonia* sp. K3 and *Bacillus* sp. A16 hydrolyzed cyclo(DL-Ala-DL-Ala) and cyclo(Gly-L-Phe) and *Rhizobium* sp. NA04-01 cleaved cyclo(L-Asp-L-Phe), cyclo(Gly-L-Phe) and cyclo(L-Asp-L-Asp).
- E. Two novel isolates were identified for the enantioselective hydrolysis of cyclo(DL-Ala-DL-Ala). These strains were classified as *Microbacterium* sp. and *Paenibacillus* sp. by 16S rDNA sequence analysis and alignment. The racemic substrate cyclo(DL-Ala-DL-Ala) was hydrolyzed only by 75 %. Complete hydrolysis of cyclo(L-Ala-L-Ala) and cyclo(L-Ala-D-Ala) was detected by using the enantiomer cyclo(L-Ala-L-Ala) as substrate and the established HPLC method for separation of the diastereomers of cyclo(DL-Ala-DL-Ala), whereas the enantiomer cyclo(D-Ala-D-Ala) was not hydrolyzed. The enantioselective hydrolysis of a racemic DKP could be shown for the first time.

Altogether, five bacterial strains were newly identified for DKP degradation. Two of these strains were isolated within this study. While investigating both novel isolates, the enantioselective hydrolysis of a racemic DKP was demonstrated for the first time.

Moreover the first microbial cleavage of the DKPs cyclo(Ala-Ala) and cyclo(Asp-Asp) was shown.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
Inhaltsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	12
Abkürzungen	13
1 Einleitung	15
1.1 Diketopiperazine (DKPs)	15
1.1.1 Vorkommen und Biosynthese.....	16
1.1.2 Eigenschaften	18
1.1.3 Abbau	20
1.1.3.1 Chemische Hydrolyse	20
1.1.3.2 Enzymatische Hydrolyse mit Peptidasen	20
1.1.3.3 Mikrobielle Hydrolyse	23
1.2 Screening.....	25
1.3 Cyclische Amidasen	26
1.4 Analytik von Aminosäuren, Dipeptiden und DKPs.....	28
1.4.1 Nachweis von Aminosäuren und Dipeptiden.....	28
1.4.2 Nachweis von DKPs	30
2 Zielsetzung	32
3 Materialien und Methoden	34
3.1 Materialien	34
3.1.1 Geräte	34
3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	35
3.1.3 Enzyme	36
3.1.4 Stämme	36
3.1.5 Medien.....	38
3.1.5.1 Medien für Screening mit Schwammproben.....	38
3.1.5.2 Medien für DSM 329 und DSM 40062.....	40
3.1.5.3 Lösungen für Kultivierungen	41
3.1.6 Puffer und Lösungen.....	41
3.1.6.1 Probenpuffer.....	41
3.1.6.2 Laufmittelpuffer.....	42
3.1.6.3 Ninhydrin-Assay	43
3.1.6.4 Vorsäulenderivatisierung	43
3.1.6.5 Puffer	44

3.1.6.6	Agarose-Gelelektrophorese	44
3.1.6.7	Ionenaustauschchromatographie	44
3.1.6.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
3.2	Analytische Methoden	45
3.2.1	Ninhydrin-Assay	45
3.2.2	Entwicklung einer HPLC-Analytik	45
3.2.2.1	Analytik mittels Vorsäulenderivatisierung	46
3.2.2.2	Analytik mit underivatisierten Substanzen	47
3.2.3	Validierung der HPLC-Methoden	48
3.2.3.1	Linearer Bereich	49
3.2.3.2	Präzision und Richtigkeit	49
3.2.3.3	Stabilität	49
3.2.3.4	Wiederfindungsrate	50
3.2.4	HPLC-Methoden für die Biotransformationsproben	50
3.3	Mikrobiologische Methoden	51
3.3.1	Stammhaltung	51
3.3.2	Screening mit Schwammproben	51
3.3.2.1	Probenahme	51
3.3.2.2	Anreicherungskulturen	53
3.3.2.3	Isolierung von Reinkulturen	53
3.3.2.4	Wachstumsüberprüfung mit und ohne N-Quelle	53
3.3.3	Isolierung von <i>Paenibacillus</i> sp. und <i>Microbacterium</i> sp.	53
3.3.4	Vorkulturen	54
3.3.5	Kultivierung	54
3.3.5.1	Stämme aus Screening mit Schwammproben	54
3.3.5.2	DSM 329 und DSM 40062	54
3.3.5.3	Stämme mit cyclische Amidase Aktivität	55
3.3.5.4	Eigenisolate <i>Paenibacillus</i> sp. und <i>Microbacterium</i> sp.	55
3.3.6	Zellernte	55
3.3.7	Bestimmung der Biotrockenmasse	56
3.3.8	Zellaufschluss	56
3.3.8.1	Stämme aus Screening mit Schwammproben	56
3.3.8.2	DSM 329 und DSM 40062	56
3.3.8.3	Stämme mit cyclische Amidase Aktivität	56
3.3.8.4	Eigenisolate <i>Paenibacillus</i> sp. und <i>Microbacterium</i> sp.	56
3.4	Molekularbiologische Methoden	57
3.4.1	Isolierung genomischer DNA	57
3.4.2	PCR für 16S rDNA Sequenzierung	57
3.4.3	Agarose-Gelelektrophorese	57
3.4.4	16S rDNA Sequenzierung	58
3.5	Biochemische Methoden	58
3.5.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	58
3.5.2	Proteinanreicherung	58
3.5.2.1	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	58
3.5.2.2	Ionenaustauschchromatographie	59

3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	60
3.6 Biotransformation	60
3.6.1 Peptidasen	62
3.6.2 Stämme aus Screening mit Schwammproben	63
3.6.3 DSM 329 und DSM 40062	63
3.6.4 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität	64
3.6.5 Eigenisolate <i>Paenibacillus</i> sp. und <i>Microbacterium</i> sp.	64
4 Ergebnisse.....	65
4.1 Analytik	65
4.1.1 Ninhydrin-Assay	65
4.1.2 Entwicklung einer HPLC-Analytik	65
4.1.2.1 Analytik mittels Vorsäulenderivatisierung	65
4.1.2.2 Analytik mit underivatisierten Substanzen	68
4.1.3 Validierung der HPLC-Methoden.....	75
4.1.3.1 Bestimmung der Linearität und Sensitivität	75
4.1.3.2 Bestimmung der Präzision und Richtigkeit	77
4.1.3.3 Bestimmung der Stabilität und Wiederfindungsrate	78
4.2 Hydrolyse von Diketopiperazinen.....	79
4.2.1 Peptidasen	80
4.2.2 Stämme aus Screening mit Schwammproben	81
4.2.2.1 Isolierung von Reinkulturen	81
4.2.2.2 Wachstumsüberprüfung mit und ohne N-Quelle	82
4.2.2.3 Biotransformation	83
4.2.3 DSM 329 und DSM 40062	85
4.2.3.1 Substratspektrum	85
4.2.3.2 Produktbildung	87
4.2.3.3 Induktion der Aktivität	88
4.2.3.4 Enzyminhibierung.....	90
4.2.3.5 Proteinanreicherung mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung.....	91
4.2.3.6 Proteinanreicherung mittels Ionenaustauschchromatographie	94
4.2.4 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität	98
4.2.4.1 Aktivitätsuntersuchungen mit 35 Stämmen (1. Durchgang)	98
4.2.4.2 Aktivitätsuntersuchungen mit ausgewählten Stämmen (2. und 3. Durchgang)	102
4.2.4.3 Aktivitätsuntersuchungen mit rekombinanten Stämmen (4. Durchgang)	103
4.2.4.4 Aktivitätsuntersuchungen mit DKP-hydrolysierenden Stämmen (4. Durchgang).....	103
4.2.5 Eigenisolate <i>Paenibacillus</i> sp. und <i>Microbacterium</i> sp.	109
4.2.5.1 Enantioselektive Hydrolyse von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala)	109
4.2.5.2 Klassifikation der Eigenisolate	110
4.2.5.3 Sequenzalignments.....	112

4.2.6 Vergleich der DKP-Hydrolyseaktivität verschiedener Stämme.....	113
5 Diskussion.....	114
5.1 Analytik.....	114
5.1.1 Ninhydrin-Assay.....	114
5.1.2 Entwicklung einer HPLC-Analytik.....	114
5.1.2.1 Analytik mittels Vorsäulenderivatisierung.....	114
5.1.2.2 Analytik mit underivatisierten Substanzen.....	115
5.1.3 Validierung der HPLC-Methoden.....	116
5.2 Hydrolyse von Diketopiperazinen.....	116
5.2.1 Peptidasen.....	117
5.2.2 Stämme aus Screening mit Schwammproben.....	119
5.2.3 DSM 329 und DSM 40062.....	119
5.2.3.1 Substratspektrum.....	120
5.2.3.2 Produktbildung.....	122
5.2.3.3 Induktion der Aktivität.....	124
5.2.3.4 Enzyminhibierung.....	125
5.2.3.5 Proteinanreicherung.....	126
5.2.4 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität.....	127
5.2.5 Eigenisolate <i>Paenibacillus</i> sp. und <i>Microbacterium</i> sp.....	131
5.2.5.1 Enantioselektive Hydrolyse von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala).....	131
5.2.5.2 Klassifikation der Eigenisolate und Sequenzalignments.....	133
6 Literaturverzeichnis.....	134
7 Anhang.....	144
7.1 Formeln.....	144
7.1.1 Statistische Auswertung.....	144
7.1.2 Analytik.....	144
7.1.3 Aktivitätsberechnungen.....	145
7.1.4 Proteinaufreinigung.....	145
7.2 16S rDNA Sequenzen.....	145
7.3 Alignments von 16S rDNA Sequenzen.....	146
Publikationen und Präsentationen.....	148
Lebenslauf.....	149

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Allgemeine Struktur von DKPs	15
Abbildung 1.2: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten DKPs	16
Abbildung 1.3: Strukturformeln dreier DKPs: Bicyclomycin, 1-(1- β -D-Arabinofuranosyl)- Glycinanhydrid und Rostratin C	19
Abbildung 1.4: Koloniaufnahmen und mikroskopische Bilder von <i>Paenibacillus chibensis</i> DSM 329 und <i>Streptomyces flavovirens</i> DSM 40062	24
Abbildung 1.5: Hydrolyse eines DKPs zum entsprechenden Dipeptid und weitere Hydrolyse zu den korrespondierenden Aminosäuren	25
Abbildung 1.6: Substrate für Stämme mit cyclische Amidase Aktivität; Hydantoine und Dihydropyrimidine	27
Abbildung 1.7: Enzymatische Hydrolyse von verschiedenen cyclischen Amiden	28
Abbildung 1.8: Derivatisierung einer Aminosäure mittels Dabsyl-Cl	29
Abbildung 1.9: Derivatisierung einer Aminosäure mittels Fmoc-Cl.....	29
Abbildung 1.10: Derivatisierung einer Aminosäure mittels OPA/3-MPA	30
Abbildung 1.11: Enantiomere bzw. Diastereomere von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala).....	31
Abbildung 2.1: Biokatalysatoren die für die Hydrolyse verschiedener DKPs untersucht werden sollten.....	33
Abbildung 4.1: HPLC Chromatogramme nach Derivatisierung mit Dabsyl-Cl von Gly-Gly und Gly und Ala-Ala und Ala	66
Abbildung 4.2: HPLC Chromatogramme nach Derivatisierung mit Fmoc-Cl von Gly-Gly und Gly und Ala-Ala und Ala	67
Abbildung 4.3: HPLC Chromatogramme nach Derivatisierung mit OPA/3-MPA von Gly-Gly und Gly und Ala-Ala und Ala	68
Abbildung 4.4: Auflösung <i>R</i> von je zwei benachbarten Peaks der DKPs, Dipeptide und Aminosäuren abhängig von der MeOH Konzentration oder der Flussrate	72
Abbildung 4.5: HPLC Chromatogramme von 1 mM Standards der DKPs, Dipeptide, Aminosäuren, Dihydrouracil und <i>N</i> -Carbamoyl- β -Ala unter den in dieser Arbeit etablierten besten Bedingungen	74
Abbildung 4.6: 12 Stämme die während des Screenings mit Schwammproben isoliert wurden als Beispiel für die Diversität.....	81
Abbildung 4.7: Umsatz von Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) durch beim Screening mit Schwammproben isolierte Stämme und der Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation	83
Abbildung 4.8: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) während der Ganzzellbiotransformation von vier während des Schwammscreenings isolierten Stämmen	84
Abbildung 4.9: Relative Konzentrationsänderung von 11 verschiedenen DKPs durch den Rohextrakt von <i>Paenibacillus chibensis</i> (DSM 329) und <i>Streptomyces</i> <i>flavovirens</i> (DSM 40062).....	85
Abbildung 4.10: Relative Konzentrationsänderung von als hydrolysierbar identifizierten DKPs durch <i>Paenibacillus chibensis</i> (DSM 329) und <i>Streptomyces flavovirens</i> (DSM 40062) während der Ganzzellbiotransformation	86
Abbildung 4.11: Aktivität von <i>Paenibacillus chibensis</i> (DSM 329) und <i>Streptomyces flavovirens</i> (DSM 40062) gegenüber DKPs während der Biotransformation mit ganzen Zellen bezogen auf die BTM und mit Rohextrakt bezogen auf den Proteingehalt.....	87
Abbildung 4.12: Relative Konzentrationsänderung der Substrate und Produkte durch <i>Paenibacillus chibensis</i> (DSM 329) und <i>Streptomyces flavovirens</i> (DSM 40062) während der Biotransformation mit Rohextrakt.....	88

Abbildung 4.13: Einfluss der Induktion während der Kultivierung auf die hydrolytische Aktivität von Cyclo(Asp-Phe) für <i>Paenibacillus chibensis</i> (DSM 329) und <i>Streptomyces flavovirens</i> (DSM 40062).....	89
Abbildung 4.14: Inhibierung der Aktivität von <i>Paenibacillus chibensis</i> (DSM 329) und <i>Streptomyces flavovirens</i> (DSM 40062) mit und ohne Peptidaseinhibitoren und Methanol	90
Abbildung 4.15: Aktivität bezogen auf den Proteingehalt der Überstände und Pellets nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung für <i>Paenibacillus chibensis</i> (DSM 329) und <i>Streptomyces flavovirens</i> (DSM 40062).....	91
Abbildung 4.16: SDS-PAGE Gel der Überstände und Pellets nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung von <i>Paenibacillus chibensis</i> (DSM 329) und <i>Streptomyces flavovirens</i> (DSM 40062).....	92
Abbildung 4.17: Chromatogramme der Proteinanreicherung mittels Ionenaustauschchromatographie mit linearem KCl-Gradienten für <i>Paenibacillus chibensis</i> (DSM 329) und <i>Streptomyces flavovirens</i> (DSM 40062).....	94
Abbildung 4.18: Aktivität bezogen auf den Proteingehalt im Rohextrakt und verschiedenen Fraktionen (F) nach der Proteinanreicherung mittels Anionenaustauscher für <i>Paenibacillus chibensis</i> (DSM 329) und <i>Streptomyces flavovirens</i> (DSM 40062).....	95
Abbildung 4.19: SDS-PAGE Gel ausgewählter Fraktionen der Proteinanreicherung mittels Ionenaustauschchromatographie von <i>Paenibacillus chibensis</i> (DSM 329) und <i>Streptomyces flavovirens</i> (DSM 40062).....	96
Abbildung 4.20: Relative Konzentrationsänderung der Positivkontrolle Dihydrouracil durch 35 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und einer Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation	98
Abbildung 4.21: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Ala-Ala) durch 35 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und einer Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation	99
Abbildung 4.22: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Asp-Phe) durch 35 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und einer Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation	100
Abbildung 4.23: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Gly-Phe) durch 35 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und einer Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation	100
Abbildung 4.24: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Asp-Asp) durch 35 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und einer Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation	101
Abbildung 4.25: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Pro-Tyr) durch 35 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und einer Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation	101
Abbildung 4.26: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Ala-Ala) durch <i>Bacillus</i> sp. F18, <i>Pseudomonas</i> sp. M18 und Stamm 222 während der Ganzzellbiotransformation im 2. und 3. Versuchsdurchgang	102
Abbildung 4.27: Relative Konzentrationsänderung von verschiedenen DKPs und Dihydrouracil (Positivkontrolle) durch <i>Leifsonia</i> sp. K3, <i>Bacillus</i> sp. A16 und <i>Rhizobium</i> sp. NA04-01 während der Ganzzellbiotransformation im 4. Durchgang	104
Abbildung 4.28: Relative Konzentrationsänderung von verschiedenen DKPs und Dihydrouracil (Positivkontrolle) durch <i>Leifsonia</i> sp. K3, <i>Bacillus</i> sp. A16 und <i>Rhizobium</i> sp. NA04-01 während der Biotransformation mit Rohextrakt im 4. Durchgang.....	105
Abbildung 4.29: Aktivität von <i>Leifsonia</i> sp. K3, <i>Bacillus</i> sp. A16 und <i>Rhizobium</i> sp. NA04-01 gegenüber verschiedenen DKPs und Dihydrouracil (Positivkontrolle) während der Biotransformation mit ganzen Zellen bezogen auf die BTM und mit Rohextrakt bezogen auf den Proteingehalt	106
Abbildung 4.30: Relative Konzentrationsänderung der verschiedenen Enantiomere von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) durch <i>Paenibacillus</i> sp. und <i>Microbacterium</i> sp. während der Ganzzellbiotransformation	109

Abbildung 4.31: Aktivität von <i>Paenibacillus</i> sp. und <i>Microbacterium</i> sp. gegenüber Cyclo(Ala-Ala) während der Biotransformation mit ganzen Zellen bezogen auf die BTM und mit Rohextrakt bezogen auf den Proteingehalt	110
Abbildung 4.32: Mikroskopische Aufnahmen der beiden Eigenisolate <i>Paenibacillus</i> sp. und <i>Microbacterium</i> sp.....	111
Abbildung 5.1: Pelletförmiges Wachstum von <i>Streptomyces flavovirens</i> DSM 40062 in Flüssigkultur	120
Abbildung 5.2: Spaltung von Cyclo(Asp-Phe) zu Asp-Phe oder Phe-Asp und weiterer Abbau durch Dipeptidasen zu den Aminosäuren Asp und Phe	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Übersicht von bisher untersuchten Peptidasen bezüglich der Spaltung von DKPs	22
Tabelle 3.1:	Verwendete Geräte	34
Tabelle 3.2:	Verwendete DKPs und Dihydrouracil (Substrate)	35
Tabelle 3.3:	Verwendete Dipeptide	35
Tabelle 3.4:	Verwendete Aminosäuren	36
Tabelle 3.5:	Verwendete Peptidasen für die DKP-Hydrolyse	36
Tabelle 3.6:	Stämme mit beschriebener DKP-Hydrolyseaktivität	36
Tabelle 3.7:	Stämme mit beschriebener cyclische Amidase Aktivität	37
Tabelle 3.8:	Rekombinante Stämme mit beschriebener cyclische Amidase Aktivität und Wildtypstamm	38
Tabelle 3.9:	Verwendete HPLC-Säulen.....	45
Tabelle 3.10:	HPLC-Bedingungen für den Nachweis der Substrate (und entsprechenden Produkten) bei der Biotransformation	50
Tabelle 3.11:	Verwendete Schwamm- und Vergleichsproben für das Screening nach DKP-hydrolysierenden Bakterien	52
Tabelle 3.12:	Bedingungen für die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung.....	59
Tabelle 3.13:	Biotransformationsbedingungen für verschiedene Peptidasen.....	62
Tabelle 3.14:	Verwendete Peptidaseinhibitoren	63
Tabelle 4.1:	Retentionsfaktor (k) für DKPs, Dipeptide und Aminosäuren und Trennfaktor (α) und Auflösung (R) für je zwei benachbarte Peaks unter besten Bedingungen	69
Tabelle 4.2:	Linearer Bereich, lineare Geradengleichung, Bestimmtheitsmaß R^2 und Bestimmungsgrenze	76
Tabelle 4.3:	Ergebnisse der Methodvalidierung: Präzision und Richtigkeit; RSD: relative Standardabweichung (<i>relative standard deviation</i>) und RE: relativer Fehler (<i>relative error</i>)	77
Tabelle 4.4:	Ergebnisse der Methodvalidierung: Stabilität und Wiederfindungsrate.....	78
Tabelle 4.5:	Ergebnisse der Biotransformationen verschiedener Peptidasen mit 11 DKPs	80
Tabelle 4.6:	Beim Screening mit Schwammproben isolierte Mikroorganismen	81
Tabelle 4.7:	Quantifizierung der Proteinanreicherung mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung für <i>Paenibacillus chibensis</i> (DSM 329) und <i>Streptomyces flavovirens</i> (DSM 40062)	93
Tabelle 4.8:	Quantifizierung der Proteinanreicherung mittels Ionenaustauschchromatographie für <i>Paenibacillus chibensis</i> (DSM 329) und <i>Streptomyces flavovirens</i> (DSM 40062)	97
Tabelle 4.9:	Übersicht über die Aktivität der untersuchten Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und Puffer als Negativkontrolle gegenüber DKPs und der Positivkontrolle Dihydrouracil in vier Versuchsdurchgängen	108
Tabelle 4.10:	Die drei Bakterienstämme mit der höchsten Identität beim Sequenzalignment mit der 16S rDNA Sequenz des Eigenisolats 1	111
Tabelle 4.11:	Die drei Bakterienstämme mit der höchsten Identität beim Sequenzalignment mit der 16S rDNA Sequenz des Eigenisolats 2	111
Tabelle 4.12:	Die drei Bakterienstämme mit der höchsten Identität beim Sequenzalignment mit der 16S rDNA Sequenz von <i>Leifsonia sp. K3</i> (früher <i>Microbacteriaceae sp. K3</i>).....	112
Tabelle 4.13:	Aktivität je BTM und Aktivität je Proteingehalt einiger in dieser Arbeit verwendeter Stämme gegenüber verschiedenen DKPs	113
Tabelle 5.1:	Substratspektrum von Stämmen mit cyclische Amidase Aktivität, welche neu für die Hydrolyse von DKPs identifiziert wurden	129

Abkürzungen

α	Trennfaktor
Ac	Acetat
ad	<i>adjust</i> (auffüllen)
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aqua demin.</i>	<i>Aqua demineralisata</i>
ASW	<i>Artificial seawater</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Bovines Serumalbumin)
BTM	Biotrockenmasse
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Dabsyl-Cl	4-Dimethylaminoazobenzol-4'-sulfonylchlorid
Dansyl-Cl	1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid
DKP	Diketopiperazin
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E-64	<i>N-[N-(L-3-trans-Carboxyoxiran-2-carbonyl)-leucyl]-Agmatin</i>
EC	<i>Enzyme comission</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Fraktion
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FLD	Fluoreszenzdetektor
FMOCCl	9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
fw	<i>forward</i>
x g	Erdbeschleunigung
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IFO	<i>Institute for Fermentation</i>
<i>k</i>	Retentionsfaktor
k. A.	keine Angabe
k. H.	keine Hydrolyse
λ_{Ab}	Absorptionswellenlänge
λ_{Em}	Emissionswellenlänge

LB	<i>Lysogeny broth</i>
max.	maximal
MeOH	Methanol (HPLC <i>Gradient Grade</i>)
3-MPA	3-Mercaptopropionsäure
MTP	Mikrotiterplatte
n. b.	nicht bestimmt
N-Quelle	Stickstoffquelle
OD ₆₀₀	Optische Dichte ($\lambda = 600 \text{ nm}$)
OPA	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PITC	Phenylisothiocyanat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>p</i> NPA	<i>p</i> -Nitrophenylacetat
PP	Phosphat
<i>R</i>	Auflösung
rDNA	Ribosomale DNA
RE	<i>Relative error</i> (relativer Fehler)
RP	<i>Reversed phase</i> (Umkehrphase)
RSD	<i>Relative standard deviation</i> (relative Standardabweichung)
<i>rv</i>	<i>reverse</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s. o.	siehe oben
sp.	Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGS	Tris-Glycin-SDS
t_R	Retentionszeit
t_0	Totzeit
ÜN	Übernachtkultur
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
VWD	Variabler Wellenlängendetektor
% (v/v)	<i>volume/volume</i> (Volumenprozent)
% (w/v)	<i>weight/volume</i> (Gewichtsprozent)

Für Aminosäuren wurde der Dreibuchstabencode verwendet.

1 Einleitung

1.1 Diketopiperazine (DKPs)

Bei 2,5-Diketopiperazinen (DKPs) handelt es sich um die kleinstmöglichen cyclischen Peptide (siehe Abbildung 1.1). Diese Substanzklasse ist auch unter den Namen Dioxopiperazine, Diacipiperazine, Dipeptidanhidride oder Cyclo(Xaa-Xaa) bekannt.

Erste Literaturdaten über DKPs stammen bereits aus dem 19. Jahrhundert. Im Jahre 1849 wurde eine unbekannte Substanz bei Arbeiten zur sauren Hydrolyse von Albumin gefunden (Bopp 1849), die später als Cyclo(Leu-Leu) identifiziert werden konnte (Kossel 1901). Die erste beschriebene Synthese eines cyclischen Dipeptids erfolgte im Jahr 1888, wobei das einfachste DKP Cyclo(Gly-Gly) hergestellt worden ist (Curtius, Goebel 1888).

Bevor die ersten Proteinstrukturen aufgeklärt worden sind, wurde über das Vorkommen von DKPs in Eiweißmolekülen diskutiert. Da bei der Reduktion und Oxidation von Proteinen, wie beispielsweise dem Seidenfibroin, DKPs nachgewiesen wurden, kam die Frage auf, ob diese Molekülklasse als Grundstruktur in Proteinen enthalten ist oder ob DKPs beim Proteinabbau gebildet werden (Abderhalden 1925), (Bergmann 1925). Es konnte jedoch kein eindeutiger Beweis für das Vorhandensein von DKPs in Eiweißmolekülen gefunden werden.

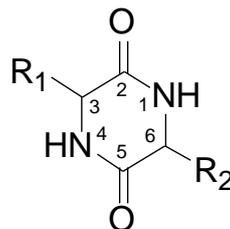


Abbildung 1.1: Allgemeine Struktur von DKPs

DKPs können sowohl *cis* als auch *trans* konfiguriert sein und weisen eine Boot-, Twist- oder planare Konformation auf (Eguchi, Kakuta 1974). Zahllose Variationen möglicher DKPs sind vorstellbar. Sie können aus proteinogenen und aus nicht proteinogenen Aminosäuren aufgebaut sein. Es wird zwischen homo-DKPs ($R_1 = R_2$) und hetero-DKPs ($R_1 \neq R_2$) (vgl. Abbildung 1.1) unterschieden. Einige Beispiele für DKPs sind anhand der in dieser Arbeit verwendeten DKPs in Abbildung 1.2 zusammengefasst.

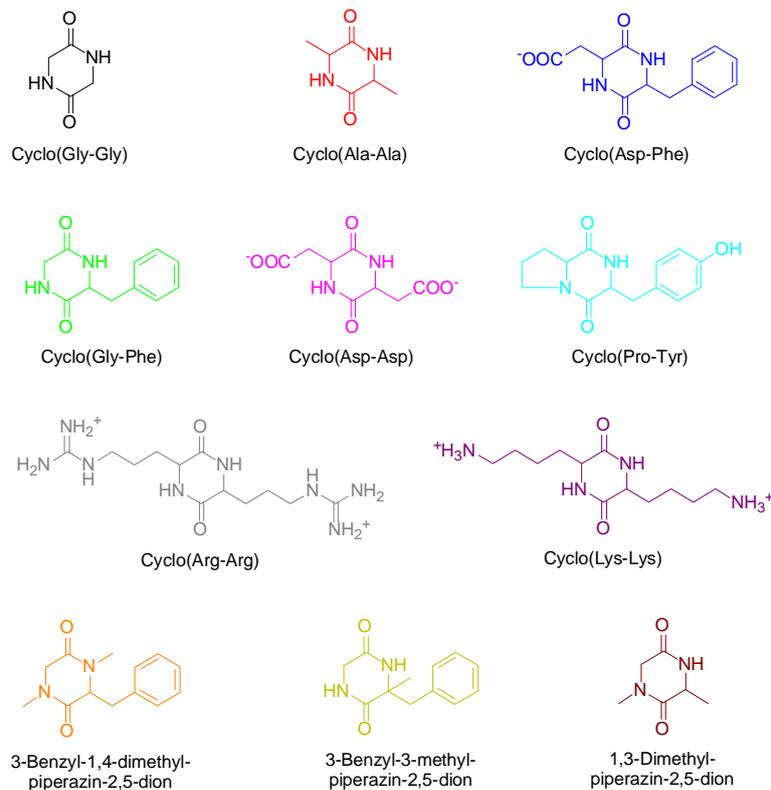


Abbildung 1.2: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten DKPs

Die Farben für die unterschiedlichen DKPs werden in der Arbeit zur besseren Erkennung beibehalten

Dargestellt sind acht aus proteinogenen Aminosäuren bestehende DKPs und drei, die nichtproteinogene Aminosäuren enthalten. Die beiden strukturell einfachsten DKPs Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) wurden als Modell-DKPs z. B. bei der Etablierung einer Analytik oder bei einem Screening nach DKP-abbauenden Organismen eingesetzt.

1.1.1 Vorkommen und Biosynthese

DKPs stellen eine in der Natur weit verbreitete Molekülklasse dar. Zahlreiche Veröffentlichungen beschreiben die Bildung von DKPs durch Organismen wie Bakterien, Pilzen, Schwämmen und Säugetieren. Im Jahr 1995 wurde berichtet, dass mehr als 100 DKPs in der Natur identifiziert worden sind (Prasad 1995) und diese Zahl hat in den letzten Jahren erheblich zugenommen. Beispielsweise werden sie von den Bakterien *Streptomyces* sp. (Johnson et al. 1951), *Bacillus subtilis* (Elkahoui et al. 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Jayatilake et al. 1996) und *Lactobacillus plantarum* (Niku-Paavola et al. 1999), den Pilzen *Alternaria alternata* (Liebermann et al. 1988), *Penicillium* sp. (Du et al. 2009), sowie von Pilzen der Gattung *Aspergillus* (Steyn 1973), (Furtado et al. 2005) und den Schwämmen *Dysidea herbacea* (Dumdei et al. 1997), *Dysidea fragilis* (Su et al. 1993) und *Geodia* sp. (Lidgren, Bohlin 1986) synthetisiert.

Für die mikrobielle Biosynthese von DKPs fassten Sioud et al. drei unterschiedliche Wege zusammen: 1. Die Synthese mittels nichtribosomaler Peptidsynthese durch einen großen Enzymkomplex, bestehend aus mehreren Modulen (nichtribosomale Peptidsynthetase); 2. Die Bildung als Nebenprodukt bei der nichtribosomalen Peptidsynthese; 3. Die Biosynthese durch mehrere Enzyme, die durch ein Gencluster für die DKP-Synthese codiert werden (Sioud et al. 2007). Der erste Weg konnte beispielsweise in *Aspergillus fumigatus* nachgewiesen werden; in diesem Pilz wurde ein Cluster aus 12 Genen identifiziert, welches für die DKP-Biosynthese von Gliotoxin verantwortlich ist (Gardiner, Howlett 2005). Durch Klonierung der Gene in *E. coli* konnte die rekombinante Expression einer aus drei Modulen bestehenden nichtribosomalen Peptidsynthetase zur Synthese von Gliotoxin erzielt werden (Balibar, Walsh 2006). Cyclo(Phe-Pro) konnte durch Klonierung zweier Gene aus dem Gencluster der nichtribosomalen Peptidsynthetase aus *Bacillus brevis* rekombinant in *E. coli* synthetisiert werden (Gruenewald et al. 2004). Die zwei klonierten Gene stammen aus dem Gencluster zur Synthese des Decapeptids Tyrocidin in *Bacillus brevis* und sind dafür verantwortlich, dass Cyclo(Phe-Pro) als Nebenprodukt bei der Synthese von Tyrocidin gebildet wird (Mootz, Marahiel 1997). Der dritte Weg zur DKP-Synthese wurde für *Streptomyces noursei* gezeigt. Hier sind mehrere Enzyme an der Synthese des DKPs Albonoursin beteiligt; aus den Aminosäuren Phe und Leu werden die entsprechenden Dipeptide synthetisiert, welche weiter zu Cyclo(Leu-Phe) und schließlich zu Albonoursin umgewandelt werden (Lautru et al. 2002). Das identifizierte Gencluster wies keine Ähnlichkeit zu einem Gencluster für die nichtribosomale Peptidsynthetase auf (Lautru et al. 2002).

DKPs wurden auch in Säugetieren identifiziert, wie z. B. in Extrakten von Kaninchenhautgewebe (Ienaga et al. 1987). Cyclo(His-Pro) wurde beispielsweise in Menschen, Ratten und Affen im zentralen Nervensystem, Blut und Gastrointestinaltrakt nachgewiesen (Prasad 1988). Dort wird es aus dem Tripeptid Thyrotropin Releasing Hormon generiert (Prasad 1988) oder *de novo* synthetisiert (Prakash et al. 2002).

DKPs sind auch in vielen alltäglichen Lebensmitteln vorzufinden. Diese enthalten vor allem prolinhaltige DKPs, die oftmals den bitteren Geschmack in Lebensmitteln verursachen. Verschiedene DKPs wurden als Bitterstoffe in gerösteten Kakaobohnen (Pickenhagen et al. 1975) und in geröstetem Kaffee (Ginz, Engelhardt 2000) nachgewiesen. Ebenfalls wurden prolinhaltige DKPs in gealterter Sake (Takahashi et al. 1974), in geschmortem und in getrocknetem Rindfleisch (Chen et al. 2009) und in Bier (Gautschi et al. 1997) nachgewiesen und für den bitteren Geschmack verantwortlich gemacht. Während des Herstellungsprozesses von dunklem Bier konnten, aufgrund des Röstens von Malz bei 210 °C, DKPs vorgefunden werden (Sakamura et al. 1978). In Sauerteig und Brot wurden ebenfalls prolinhaltige DKPs detektiert, deren Konzentration im Verlauf der Säuerung durch

das Milchsäurebakterium *Lactobacillus plantarum* bzw. während des Backens anstieg (Ryan et al. 2009). All diese Quellen legen die Schlussfolgerung nahe, dass die Bildung von DKPs hauptsächlich beim Rösten bzw. allgemein beim Erhitzen, durch längere Lagerung, oder durch Ansäuerung stattfindet.

Ebenfalls wurden DKPs als chemische Abbauprodukte von dem Aminopenicillin-Antibiotikum Amoxicillin (Lamm et al. 2009), dem Neuropeptid Substanz P (Kertscher et al. 1993) und dem Süßstoff Aspartam™ (L-Aspartyl-L-Phenylalanin-Methylester) (Furda et al. 1975) identifiziert. Amoxicillin und seine Abbauprodukte (u. a. korrespondierendes DKP) wurden in wässriger Umgebung und in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs detektiert und stehen somit aufgrund des allergieauslösenden Potentials in der Diskussion als gesundheitsgefährdende Stoffe (Lamm et al. 2009). Bei Hauttests an Patienten mit Amoxicillin und dem entsprechenden DKP konnte jedoch gezeigt werden, dass alle Patienten, die auf das DKP allergisch reagiert haben, auch auf Amoxicillin reagierten, was darauf hindeutet, dass das DKP nicht alleine für die allergische Reaktion bei der Anwendung von Amoxicillin verantwortlich ist (Ariza et al. 2009).

1.1.2 Eigenschaften

Als Sekundärmetabolite besitzen DKPs vielseitige biologische Eigenschaften. Im Folgenden werden einige Beispiele zur Verdeutlichung der außerordentlichen Aktivitäten von DKPs genannt. Sie können antibakterielle, antifungale und antivirale Aktivitäten, sowie Phytotoxizität (Pflanzentoxizität) und Zytotoxizität (Gewebezelltoxizität) aufweisen.

Das komplexe DKP Bicyclomycin (vgl. Abbildung 1.3, links) isoliert aus *Streptomyces aizunensis*, inhibiert ein breites Spektrum an gramnegativen Bakterien (Miyamura et al. 1972) und wird als Antibiotikum eingesetzt. Die strukturell einfacheren DKPs Cyclo(D-Pro-D-Phe) und Cyclo(D-Pro-D-Leu) wurden aus marinen Bakterien isoliert und zeigten einen starken antibiotischen Effekt gegenüber dem Bakterium *Vibrio anguillarum* (Fdhila et al. 2003).

Das entsprechende LL-Enantiomer Cyclo(L-Pro-L-Phe) wurde aus *Lactobacillus plantarum* isoliert und zeigte inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der Pilze *Aspergillus fumigatus* und *Penicillium roqueforti* (Ström et al. 2002).

Für den Schimmelpilz *Alternaria alternata* wurde die Synthese des phytotoxisch gegen die Rispen-Flockenblume wirkenden Maculosin (Cyclo(L-Pro-L-Tyr)) beschrieben (Stierle et al. 1988a).

Ein Derivat des Uracil-Nucleosids 1-(1-β-D-Arabinofuranosyl)-Glycinanhydrid (vgl. Abbildung 1.3, mittig) zeigte antivirale Aktivität gegenüber erkältungsauslösenden Coxsackie- und Respiratorische-Synzytial-Viren, gegenüber Herpes-Simplex-Virus 1 und Humanes Immundefizienz-Virus (HIV-1) (Sinha et al. 2004).

Aus dem Pilz *Aspergillus flavus* wurde ein neues DKP identifiziert, welches eine schwache zytotoxische Aktivität gegenüber leukämischen Zellen (HL-60) aufwies (Lin et al. 2008). Zytotoxische Wirkung gegen eine menschliche Darmkarzinomzelllinie zeigten die Rostratine A – D (z. B.: Rostratin C siehe Abbildung 1.3, rechts), welche aus dem Pilz *Exserohilum rostratum* isoliert worden waren (Tan et al. 2004). Für Cyclo(His-Phe) konnte eine Reduktion der Zellviabilität von Gebärmutterhalskrebszellen nachgewiesen werden (McClelland et al. 2004).

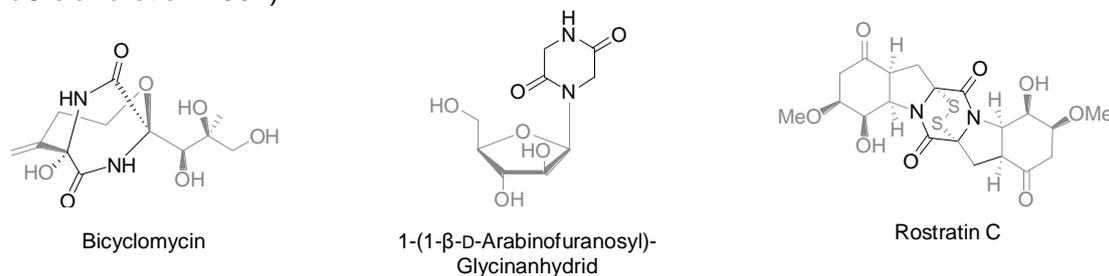


Abbildung 1.3: Strukturformeln dreier DKPs: Bicyclomycin (links), 1-(1-β-D-Arabinofuranosyl)-Glycinanhydrid (modifiziert nach Sinha et al. 2004) (mittig) und Rostratin C (modifiziert nach Tan et al. 2004) (rechts), schwarz: DKP-Grundgerüst

Die genannten biologischen Aktivitäten von DKPs stellen deren mögliches Potential für die Medizin dar; so könnten diese beispielsweise Anwendung bei der Behandlung von bakteriellen und viralen Infektionen finden, sowie in der Krebstherapie eingesetzt werden.

Bei der Zell-Zell-Kommunikation (*Quorum Sensing*) mit deren Hilfe Mikroorganismen die Populationsdichte messen, nutzen gram-negative Bakterien hauptsächlich *N*-Acyl-Homoserin-Lactone als Signalmoleküle (Fuqua et al. 1996). In den letzten Jahren wurde zunehmend über DKPs als *Quorum Sensing* Moleküle diskutiert (Barnard, Salmond 2004), (Ryan, Dow 2008). So wurden beispielsweise im Kulturüberstand des gram-negativen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* DKPs wie z. B. Cyclo(L-Pro-L-Tyr) nachgewiesen, die einen *N*-Acyl-Homoserin-Lacton Biosensor aktivieren können und wurden damit als potentielle Signalmoleküle beim *Quorum Sensing* identifiziert (Holden et al. 1999). Auch aus *Burkholderia cepacia* wurden verschiedene DKPs als potentielle Signalmoleküle isoliert; jedoch ist unklar, ob es sich dabei um neuartige Signalmoleküle handelt, oder ob diese mittels *N*-Acyl-Homoserin-Lacton basierendem *Quorum Sensing* wirken (Wang et al. 2010).

Viele weitere Funktionen sind für verschiedene DKPs beschrieben (Sammes 1975), (Borthwick 2012), wie beispielsweise die Inhibierung des bei der Blutgerinnung wichtigen Plasminogenaktivatorinhibitors Typ 1 (Bryans et al. 1996) und die Inhibierung der Topoisomerase 1 (Funabashi et al. 1994), welche die Reaktion zur Entspannung von superspiralierter DNA katalysiert.

1.1.3 Abbau

Da DKPs weit verbreitet vorkommen und diverse biologische Funktionen besitzen, wäre es naheliegend, dass diese Substanzklasse auch abgebaut werden kann. Beispielsweise ist bei deren Funktion als *Quorum Sensing* Moleküle bei der bakteriellen Zell-Zell-Kommunikation ein Abbau durch die Bakterienpopulation unerlässlich. Ebenso bei der Anwendung von DKPs in der Medizin liegt die Schlussfolgerung nahe, dass diese Moleküle vom Organismus abgebaut werden können. Doch obwohl DKPs in der Natur weit verbreitet sind, von zahlreichen Organismen synthetisiert werden, und viele biologische Aktivitäten bekannt sind, ist in der Literatur nur sehr wenig über den Abbau dieser Substanzklasse beschrieben. Vor allem die mikrobielle und enzymatische Hydrolyse von DKPs ist kaum untersucht.

1.1.3.1 Chemische Hydrolyse

Die chemische Hydrolyse von DKPs kann durch saure oder alkalische Hydrolyse erfolgen. Der DKP-Ring von Cyclo(Gly-Gly) kann durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure gespalten werden (Fischer, Fournau 1901). Ohne Erhitzen der Lösung verläuft die Reaktion allerdings sehr langsam. So war bei einem pH-Wert von 1,4 bei 37 °C nach 24 h erst 4,7 % hydrolysiert (Waldschmidt-Leitz, Schäffner 1925). Eine schnellere Spaltung dieses Moleküls und ohne Erhitzen konnte durch die Zugabe von Natronlauge erreicht werden (Fischer 1905). Mit der Reaktionsgeschwindigkeit der alkalischen Hydrolyse verschiedener DKPs beschäftigte sich Oda im Jahr 1936. Er konnte zeigen, dass Cyclo(Gly-Gly), Cyclo(Gly-Ala), Cyclo(Gly-Asp), Cyclo(Gly-Glu), Cyclo(Asp-Asp) und Cyclo(Gly-Tyr) in der genannten Reihenfolge mit abnehmender Geschwindigkeit alkalisch hydrolysiert werden (Oda 1936). Ebenfalls durch alkalische Hydrolyse können die hetero-DKPs Cyclo(Leu-Gly) und Cyclo(Leu-Ala) gespalten werden, wohingegen die homo-DKPs Cyclo(Leu-Leu) und Cyclo(Val-Val) alkalistabil sind (Fischer, Schrauth 1907).

Die Spaltung des DKP-Rings unter milderen Bedingungen kann durch verschiedene Nucleophile erreicht werden, wie beispielsweise mittels nucleophilen Angriff mit primären Aminen an die Carbonylgruppen (Parrish, Mathias 2002) oder durch Einsatz verschiedener Nucleophile an Boc(*tert*-Butyloxycarbonyl)-geschützten DKPs (Farran et al. 2009).

1.1.3.2 Enzymatische Hydrolyse mit Peptidasen

Peptidasen gehören zu der Enzymklasse der Hydrolasen (EC 3.4.X.X) und katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen. Da DKPs zwei Peptidbindungen enthalten, stellen Peptidasen potentielle Biokatalysatoren für deren Spaltung dar.

Man unterscheidet zwischen Exopeptidasen, welche am N-terminalen (Aminopeptidase) oder am C-terminalen (Carboxypeptidase) Ende einer Polypeptidkette spalten, und Endopeptidasen, die den inneren Bereich der Polypeptidketten für die Spaltung bevorzugen (Rao et al. 1998). Endopeptidasen werden weiter unterteilt in Serinpeptidasen (z. B.:

Trypsin und Subtilisine), Aspartatpeptidasen (z. B.: Pepsin), Cysteinpeptidasen (z. B.: Papain und Bromelain) und Metallopeptidasen (z. B.: Thermolysin) (Rao et al. 1998). Der Abbau von DKPs durch Peptidasen wurde in der Vergangenheit in mehreren Arbeiten untersucht (Zusammenfassung siehe Tabelle 1.1), jedoch wurden teils widersprüchliche Ergebnisse (z. B.: für Trypsin und Papain) veröffentlicht. Bereits 1925 wurde die Spaltbarkeit von DKPs durch Peptidasen untersucht. Zunächst wurde die außerordentliche Stabilität von Cyclo(Gly-Gly) in Gegenwart von Trypsin, Pepsin, Erepsin und Papain gezeigt (Waldschmidt-Leitz, Schäffner 1925). Die erste erfolgreiche Spaltung des Peptidrings wurde im Jahr 1933 beschrieben. Es konnte die Spaltbarkeit von Cyclo(Gly-Asp), Cyclo(Gly-Glu) und Cyclo(Asp-Asp) durch die Peptidase Trypsin, jedoch nicht durch Pepsin und Erepsin nachgewiesen werden (Matsui 1933). Im selben Jahr wurden diese Ergebnisse von Ishiyama bestätigt. Zusätzlich konnte er zeigen, dass Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Gly-Gln) von den drei genannten Enzymen nicht gespalten werden (Ishiyama 1933). Diese Ergebnisse führten den Autor zu der Theorie, dass die Carboxylgruppe von Asp und Glu in den genannten DKPs wichtig für deren Spaltbarkeit durch Peptidasen ist. Um dieser Überlegung nachzugehen, untersuchten Shibata et al. 1936 die Hydrolyse weiterer saurer DKPs und erstmals den Abbau von basischen DKPs. Dabei konnten die Autoren die aufgestellte Theorie widerlegen, da neben der Spaltung der sauren DKPs Cyclo(Gly-Glu) und Cyclo(Asp-Asp) durch Trypsin und Papain auch die basischen DKPs Cyclo(Arg-Arg), Cyclo(Lys-Lys) und Cyclo(His-His) durch Pepsin gespalten werden konnten (Shibata, Tazawa 1936). Im selben Jahr wurde die Stabilität eines aus einer basischen und einer sauren Aminosäure bestehenden DKPs Cyclo(Lys-Glu) gegenüber Pepsin, Trypsin und Papain gezeigt (Greenstein 1936).

Einige der bis dahin veröffentlichten Ergebnisse wurden in den darauffolgenden Jahren widerlegt. Es wurde gezeigt, dass Cyclo(Gly-Asp) und Cyclo(Gly-Glu) nicht von Trypsin und Papain gespalten werden können (Akabori, Takase 1936). Die Nichtspaltbarkeit von Cyclo(Gly-Asp) durch Trypsin, Papain, Erepsin und Pepsin konnte bestätigt werden (Damodaran, Narayanan 1938). Basierend auf diesen teils widersprüchlichen Veröffentlichungen, befasste sich Itibakase mit diesem Thema. Er konnte eine außerordentlich geringe Aktivität von Trypsin gegenüber Cyclo(Gly-Glu) messen, die aber wahrscheinlich durch eine Verunreinigung mit einer Carboxypolypeptidase verursacht worden war, denn für diese Carboxypolypeptidase konnte er die hydrolytische Spaltung von Cyclo(Gly-Glu) nachweisen. Dieses DKP konnte nicht durch Papain und Pepsin gespalten werden. Für die Carboxypolypeptidase und Trypsin wurde weiterhin die Nichtspaltbarkeit von Cyclo(Gly-Ala) und Cyclo(Gly-Pro) gezeigt (Itibakase 1940).

Tabelle 1.1: Übersicht von bisher untersuchten Peptidasen bezüglich der Spaltung von DKPs
(+) Aktivität, (-) keine Aktivität, (?) unsichere Aktivität

Enzym	Substrat	Aktivität	Literatur	
Trypsin	Cyclo(Gly-Asp)	+	(Matsui 1933), (Ishiyama 1933)	
		-	(Akabori, Takase 1936), (Damodaran, Narayanan 1938)	
	Cyclo(Gly-Glu)	+	(Matsui 1933), (Ishiyama 1933), (Shibata, Tazawa 1936)	
		-	(Akabori, Takase 1936)	
		?	(Itibakase 1940)	
	Cyclo(Asp-Asp)	+	(Matsui 1933), (Ishiyama 1933), (Shibata, Tazawa 1936)	
	Cyclo(Gly-Gly)	-	(Waldschmidt-Leitz, Schöffner 1925), (Ishiyama 1933)	
	Cyclo(Gly-Gln)	-	(Ishiyama 1933)	
	Cyclo(Lys-Glu)	-	(Greenstein 1936)	
	Cyclo(Gly-Ala)	-	(Itibakase 1940)	
	Cyclo(Gly-Pro)	-	(Itibakase 1940)	
	Pepsin	Cyclo(Arg-Arg)	+	(Shibata, Tazawa 1936)
		Cyclo(Lys-Lys)	+	(Shibata, Tazawa 1936)
		Cyclo(His-His)	+	(Shibata, Tazawa 1936)
Cyclo(Gly-Gly)		-	(Waldschmidt-Leitz, Schöffner 1925), (Ishiyama 1933)	
Cyclo(Gly-Asp)		-	(Matsui 1933), (Ishiyama 1933), (Damodaran, Narayanan 1938)	
Cyclo(Gly-Glu)		-	(Matsui 1933), (Ishiyama 1933), (Itibakase 1940)	
Cyclo(Asp-Asp)		-	(Matsui 1933), (Ishiyama 1933)	
Cyclo(Gly-Gln)		-	(Ishiyama 1933)	
	Cyclo(Lys-Glu)	-	(Greenstein 1936)	
Papain	Cyclo(Gly-Glu)	+	(Shibata, Tazawa 1936)	
		-	(Akabori, Takase 1936), (Itibakase 1940)	
	Cyclo(Asp-Asp)	+	(Shibata, Tazawa 1936)	
	Cyclo(Gly-Gly)	-	(Waldschmidt-Leitz, Schöffner 1925)	
	Cyclo(Gly-Asp)	-	(Akabori, Takase 1936), (Damodaran, Narayanan 1938)	
	Cyclo(Lys-Glu)	-	(Greenstein 1936)	
	Cyclo(Gly-Ala)	-	(Itibakase 1940)	
	Cyclo(Gly-Pro)	-	(Itibakase 1940)	
Erepsin	Cyclo(Gly-Gly)	-	(Waldschmidt-Leitz, Schöffner 1925), (Ishiyama 1933)	
	Cyclo(Gly-Asp)	-	(Matsui 1933), (Ishiyama 1933), (Damodaran, Narayanan 1938)	
	Cyclo(Gly-Glu)	-	(Matsui 1933), (Ishiyama 1933)	
	Cyclo(Asp-Asp)	-	(Matsui 1933), (Ishiyama 1933)	
	Cyclo(Gly-Gln)	-	(Ishiyama 1933)	
Carboxypoly-peptidase	Cyclo(Gly-Glu)	+	(Itibakase 1940)	
	Cyclo(Gly-Ala)	-	(Itibakase 1940)	
	Cyclo(Gly-Pro)	-	(Itibakase 1940)	

Da bis zum heutigen Zeitpunkt keine eindeutigen Ergebnisse über die Spaltung von DKPs durch verschiedene Peptidasen veröffentlicht sind, sollte der enzymatische Abbau in dieser Arbeit untersucht werden.

1.1.3.3 Mikrobielle Hydrolyse

Bisher wurden nur wenige Mikroorganismen mit der Fähigkeit zur DKP-Hydrolyse identifiziert, die alle im Folgenden vorgestellt werden.

Im Jahr 1985 wurde von Muro et al. der erste Stamm für die DKP-Hydrolyse beschrieben. *Bacillus* sp. No. 106 wurde isoliert und hydrolytische Aktivität gegenüber dem auch in dieser Arbeit verwendeten DKP Cyclo(Gly-Gly) nachgewiesen. Das als Cyclo(Gly-Gly) Hydrolase (EC 3.5.2.13) bezeichnete Enzym zeigte eine große Substratspezifität bezüglich Cyclo(Gly-Gly), da von 33 getesteten DKPs nur Cyclo(Gly-Gly) umgesetzt wurde. Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} und Sr^{2+} wirkten aktivierend, Ni^{2+} und Cu^{2+} wirkten inhibierend und K^+ und Zn^{2+} zeigten keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. Durch den Einsatz von Peptidaseinhibitoren wurden Rückschlüsse auf die Enzymklasse gezogen. Der Metallopeptidaseinhibitor Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) hemmte die Enzymaktivität stark und die mit Thiolgruppen reagierenden Substanzen *p*-Chlormercuribenzoessäure und Monoiodessigsäure führten zu einer vollständigen Inhibierung. In diesem Zusammenhang postulierten die Autoren, dass es sich bei dem untersuchten Enzym um eine Metallo- oder Cysteinpeptidase handelt (Muro et al. 1985).

Ebenfalls für die Spaltung von DKPs sind von Kanzaki et al. die Stämme *Arthrobacter* sp. 1-3-1 und ein *coryneform rod bacterium* T-1-3-Y beschrieben. Beide Stämme zeigten Aktivität gegenüber verschiedenen glycin- und tyrosinhaltigen DKPs wie beispielsweise Cyclo(Gly-Leu) Cyclo(Gly-Phe) und Cyclo(Val-Tyr). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass durch die DKP-Zugabe zum Kultivierungsmedium die Hydrolyseaktivität gesteigert werden kann (Kanzaki et al. 1997).

Für die Herstellung des Süßstoffs Aspartam™ wurde nach alternativen Herstellungsmethoden gesucht. Das DKP Cyclo(L-Asp-L-Phe) sollte mikrobiell zu L-Asp-L-Phe hydrolysiert werden, welches daraufhin durch Veresterung zu Aspartam™ umgeformt werden kann. Die 11 Stämme *Streptomyces flavovirens* (IFO 3197), *Bacillus circulans* (ATCC 9966), *Achromobacter lacticum* (AJ 2394 FERM-P 7401), *Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 4452), *Alcaligenes faecalis* (AJ 2565 FERM-P 8460), *Enterobacter agglomerans* (ATCC 12287), *Ervinia amylovora* (FERM-P 7056), *Flavobacterium rhenanum* (AJ 2468 FERM-P 8459), *Micrococcus varians* (ATCC 399), *Serratia marcescens* (AJ 2763 FERM-P 8461) und *Xanthomonas citri* (AJ 2797 FERM-P 8462) wurden für die Hydrolyse von Cyclo(L-Asp-L-Phe) identifiziert (Yokozeki et al. 1990). Die Stämme *Bacillus circulans* ATCC 9966 (entspricht *Paenibacillus chibensis* DSM 329) (Abbildung 1.4, links) und *Streptomyces flavovirens* IFO 3197 (entspricht *Streptomyces flavovirens* DSM 40062) (Abbildung 1.4, rechts) sind bei der „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ (DSMZ) verfügbar und wurden in dieser Arbeit für Untersuchungen der DKP-Hydrolyse verwendet.

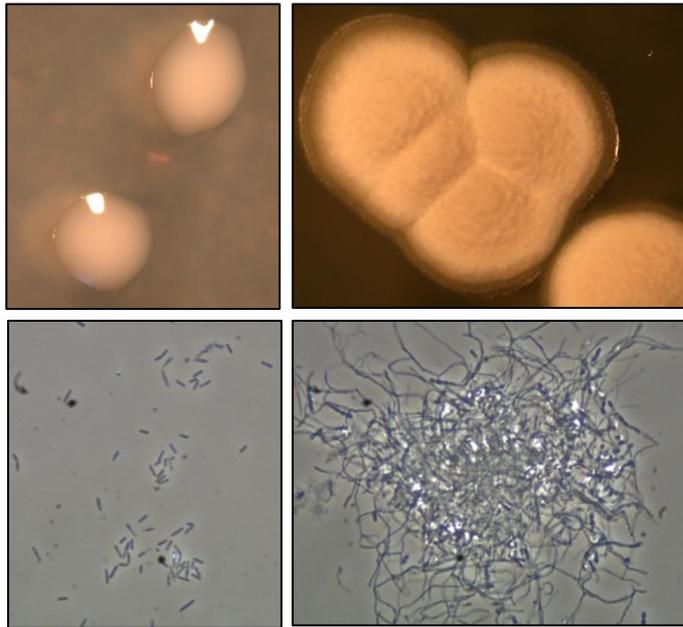


Abbildung 1.4: Kolonieaufnahmen (oben) und mikroskopische Bilder (unten) von *Paenibacillus chibensis* DSM 329 (links) und *Streptomyces flavovirens* DSM 40062 (rechts)

Eine Arbeit von Pantaleone et al. beschäftigte sich ebenfalls mit der DKP-Hydrolyse im Zusammenhang mit Aspartam™. Dieser Süßstoff ist säure- und baseinstabil, wobei es im schwach alkalischen Bereich zur Bildung des entsprechenden DKPs Cyclo(L-Asp-L-Phe) kommt (Pattanaargson et al. 2001). Außerdem ist Aspartam™ hitzeunbeständig (Prudel et al. 1986) und so wird beim Kochen oder Backen ebenfalls das entsprechende DKP gebildet. Dies führt zum Verlust der Süßkraft bzw. zu einem bitteren Geschmack. Um diesem Problem entgegen zu wirken, wurde nach Stämmen für den Abbau von Cyclo(L-Asp-L-Phe) gesucht, wobei ein *Bacillus circulans* Stamm isoliert werden konnte. Das DKP-hydrolysierende Enzym aus diesem Stamm wurde aufgereinigt und der Einfluss verschiedener Peptidaseinhibitoren auf die Aktivität untersucht. Dabei wurde ein ca. 70 kDa großes Protein identifiziert, welches durch den Serinpeptidaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) inhibiert wurde (Pantaleone et al. 1998).

Die letzte bekannte Veröffentlichung über die Hydrolyse von DKPs stammt aus dem Jahre 2000 von Kanzaki et al.. Für *Agrobacterium radiobacter* NM 5-3 wurde die Hydrolyse von Cyclo(Gly-Leu) und weiteren glycinhaltigen DKPs nachgewiesen. Die Autoren postulierten, dass bei der Hydrolyse des DKPs zuerst ein Dipeptid gebildet wird, welches daraufhin durch eine Dipeptidase zu den entsprechenden Aminosäuren abgebaut wird (siehe Abbildung 1.5) (Kanzaki et al. 2000).

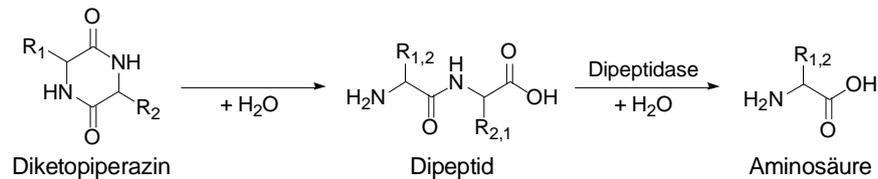


Abbildung 1.5: Hydrolyse eines DKPs zum entsprechenden Dipeptid und weitere Hydrolyse zu den korrespondierenden Aminosäuren

Der in Abbildung 1.5 gezeigte Abbauweg für DKPs ist als sehr wahrscheinlich anzusehen. Für die Spaltung des DKPs bestehen zwei mögliche Angriffspositionen, so können bei der Hydrolyse eines hetero-DKPs ($R_1 \neq R_2$) zwei verschiedene Dipeptide gebildet werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche (vor allem die Etablierung einer Analytik zum Nachweis der Edukte und Produkte) beruhen auf dieser Grundlage.

Bisher wurden weder Sequenzanalysen noch Strukturaufklärungen von DKP-hydrolysierenden Enzymen erfolgreich durchgeführt. Es ist daher von großem Interesse, in weiteren Forschungsarbeiten Aufschlüsse über die Eigenschaften von DKP-abbauenden Enzymen zu sammeln.

Die Autoren der Publikationen zur DKP-Hydrolyse konnten nicht erfolgreich kontaktiert werden, bzw. wurde von Muro mitgeteilt, dass der Stamm *Bacillus* sp. No. 106 tot sei. Daher konnten nur die bei der DSMZ erhältlichen Stämme DSM 329 und DSM 40062 in dieser Arbeit für weitere Untersuchungen der DKP-Hydrolyse eingesetzt werden.

1.2 Screening

Zur Identifizierung von neuen mikrobiellen Biokatalysatoren für den Umsatz eines definierten Substrats können verschiedene Wege verfolgt werden. Kieslich et al. schlugen dazu drei mögliche Strategien vor: 1. Screening mit bereits bekannten Mikroorganismen beispielsweise aus einer Stammsammlung, 2. Konstruktion eines neuen Stamms, 3. Screening nach einem neu zu isolierenden Mikroorganismus (Kieslich et al. 1998).

Um einen neuen Mikroorganismus für eine bestimmte Reaktion zu isolieren, stehen die Chancen höher, wenn Umweltproben für das Screening verwendet werden, die mit dem Substrat der Reaktion in Verbindung stehen (Cheetham 1987). Zur Identifizierung neuer Stämme für die Hydrolyse von DKPs wurde in dieser Arbeit ein Screening mit Schwammproben durchgeführt, da sehr viele Schwämme und Schwamm-assoziierte Bakterien für die Synthese von DKPs beschrieben sind (Huang et al. 2010). So wurde beispielsweise Cyclo(Pro-Val) aus den Schwämmen *Leucophloeus fenestrata* (Omar et al. 1988) und *Calyx cf. podatypa* (Adamczeski et al. 1995), und Cyclo(Pro-Leu) aus *Rhaphisia pallida* (Su et al. 1996) isoliert.

Oftmals sind nicht die Schwämme selbst für die DKP-Synthese verantwortlich, sondern Bakterien, die mit den Schwämmen assoziiert sind. Die Produktion von Cyclo(Pro-Leu), Cyclo(Pro-Val) und Cyclo(Pro-Ala) wurde zunächst für den karibischen Feuerschwamm *Tedania ignis* beschrieben (Schmitz et al. 1983), jedoch konnte später gezeigt werden, dass ein mit diesem Schwamm-assoziiertes Bakterium *Micrococcus* sp. für deren Synthese verantwortlich ist (Stierle et al. 1988b). Auch die Synthese von zwei chlorierten DKPs konnte nach Abtrennung der Bakterienzellen von den Schwammzellen dem symbiotischen Bakterium *Oscillatoria spongelliae* zugeordnet werden und nicht, wie zunächst angenommen, dem Wirtsschwamm *Dysidea herbacea* (Unson, Faulkner 1993). Ein weiteres Beispiel stellt die Synthese verschiedener DKPs (z. B.: Cyclo(Gly-Leu) und Cyclo(Pro-Tyr)) durch die mit dem Schwamm *Ircinia variabilis* assoziierten Bakterien *Staphylococcus* sp. und *Bacillus* sp. dar (De Rosa et al. 2003).

1.3 Cyclische Amidasen

Cyclische Amidasen gehören zu der Enzymklasse der Hydrolasen und haben die Enzymklassifikation EC 3.5.2.X. Sie spalten nicht-peptidische Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen in cyclischen Amiden [laut *Enzyme Commission*]. Eine Unterklasse der cyclischen Amidasen stellen die Dihydropyrimidinasen (EC 3.5.2.2) dar. Die Bezeichnungen Dihydropyrimidinase und Hydantoinase werden als Synonyme in der EC-Nomenklatur verwendet. Dies geht zum Teil auf die Entdeckung zurück, dass ein aus Kalbsleber angereichertes Enzym zum einen die Dihydropyrimidine Dihydrouracil und Dihydrothymin und zum anderen Hydantoin spalten konnte (Wallach, Grisolia 1957).

Allerdings gibt es auch einige Hydantoinasen, die nur Hydantoine, nicht aber Dihydropyrimidine, spalten können. Beispielsweise wurde eine Hydantoinase aus *Agrobacterium* sp. IP I-671 isoliert, die verschiedene 5-monosubstituierte Hydantoine, jedoch keine Dihydropyrimidine spalten konnte (Runser, Meyer 1993). Auch zwei aus *Escherichia coli* (*E. coli*) aufgereinigte Enzyme waren in der Lage mehrere 5-monosubstituierte Hydantoine abzubauen, zeigten jedoch keine Aktivität gegenüber Dihydrouracil und Dihydrothymin.

Ebenfalls gibt es Enzyme, die Dihydropyrimidine abbauen aber keine Hydantoine. So konnte aus *Clostridium uracilicum* M5-2 ein Enzym aufgereinigt werden, welches Dihydrouracil hydrolysiert, nicht jedoch Hydantoin (Campbell 1958).

Bei Hydantoinasen und Dihydropyrimidinasen handelt es sich also nicht immer um die gleichen Enzyme, somit werden die beiden Synonyme teilweise unabhängig voneinander verwendet. Ein wichtiges Beispiel zum Einsatz von Hydantoinasen ist die großtechnische Herstellung von Aminosäuren beim Hydantoinaseprozess (Altenbuchner et al. 2001).

Stämme mit Hydantoinase Aktivität sind weit verbreitet. Sie kommen an geographisch verschiedenen Orten (z. B.: Südafrika, Mongolei, Antarktis) mit unterschiedlichen Umweltbedingungen (z. B.: Erde, Salzsee, heiße Quellen), und in einigen Bakteriengattungen (z. B.: *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Bacillus*) vor (Dürr et al. 2006).

Bei einem Screening nach hydantoin-spaltenden Stämmen wurden 32 Stämme isoliert, die sowohl 5-Benzylhydantoin als auch Dihydrouracil spalten können (Dürr et al. 2006). Mit diesen Stämmen und verschiedenen Bakterien der Gattung *Arthrobacter* wurde neben den genannten Substraten auch der Umsatz von Hydantoin, 5-*tert*-Butylhydantoin, 5-(3-Indolylmethyl)-Hydantoin, 6-Phenyldihydrouracil und *p*-Chlor-6-Phenyldihydrouracil untersucht. Eine Übersicht der Stämme sowie deren Aktivitäten ist Tabelle 3.7 zu entnehmen. Die Substrate sind in Abbildung 1.6 dargestellt.

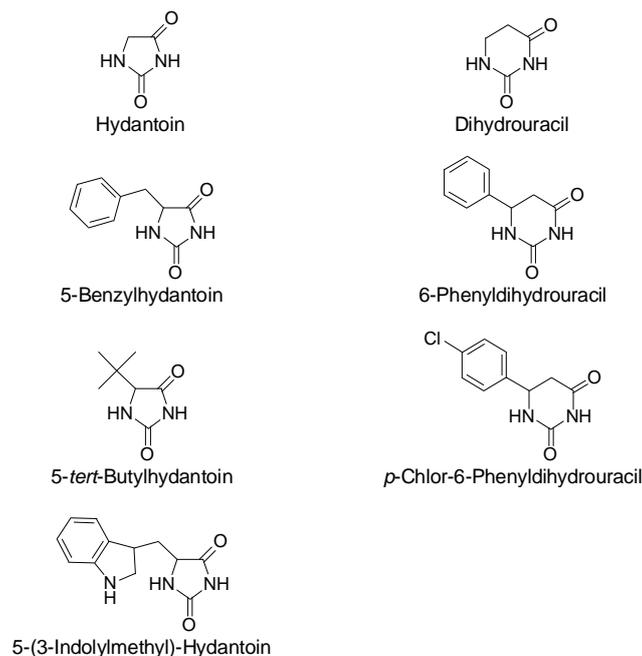


Abbildung 1.6: Substrate für Stämme mit cyclische Amidase Aktivität; links: Hydantoine, rechts: Dihydropyrimidine

Um zu untersuchen, ob für die Spaltung der Hydantoine und Dihydropyrimidine die gleichen Enzyme verantwortlich sind, wurden aus den Stämmen *Ochrobactrum* sp. G21 und *Delftia* sp. I24 die verantwortlichen D-Hydantoinase Gene kloniert, in *E. coli* rekombinant exprimiert und die Aktivität überprüft; dabei konnte die Hydrolyse zweier Hydantoine 5-Benzylhydantoin und 5-(3-Indolylmethyl)-Hydantoin (Dürr et al. 2008) durch die rekombinanten Enzyme gezeigt werden (Dürr et al. 2008). Zudem wurde die Hydrolyse zweier Dihydropyrimidine 6-Phenyldihydrouracil und *p*-Chlor-6-Phenyldihydrouracil für beide rekombinanten D-Hydantoinasen nachgewiesen (Engel et al. 2012).

Bei der Spaltung eines Hydantoin entsteht die korrespondierende *N*-Carbamoyl- α -Aminosäure und bei der Hydrolyse eines Dihydropyrimidins wird die entsprechende *N*-Carbamoyl- β -Aminosäure gebildet (vgl. Abbildung 1.7) (Syldatk et al. 1999).

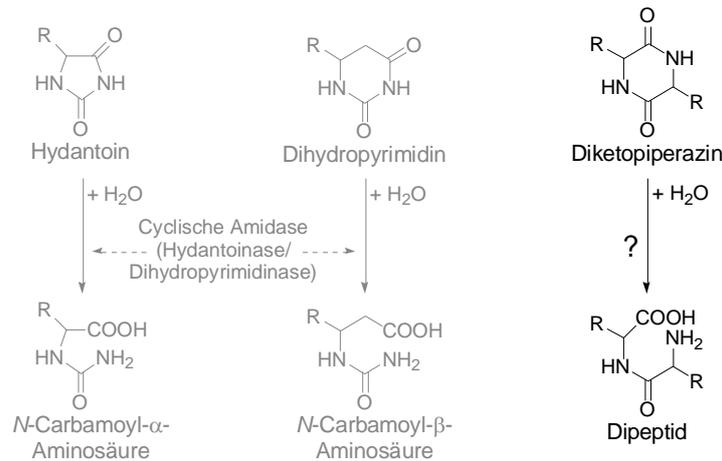


Abbildung 1.7: Enzymatische Hydrolyse von verschiedenen cyclischen Amidien

Links: Hydrolyse eines Hydantoin durch cyclische Amidasen (Hydantoinasen) zur *N*-Carbamoyl- α -Aminosäure

Mitte: Hydrolyse eines Dihydropyrimidins durch cyclische Amidasen (Dihydropyrimidinasen) zur *N*-Carbamoyl- β -Aminosäure

Rechts: bei der analogen Hydrolyse von DKPs würde das entsprechende Dipeptid entstehen; die Enzyme dafür sind bisher nicht bekannt

Aufgrund der Strukturverwandtschaft von Hydantoinen, Dihydropyrimidinen und DKPs (siehe Abbildung 1.7) wurden einige der Stämme (vgl. Tabelle 3.7 und Tabelle 3.8) in dieser Arbeit bezüglich ihrer Fähigkeit DKPs abzubauen untersucht.

1.4 Analytik von Aminosäuren, Dipeptiden und DKPs

Bei der Hydrolyse von DKPs entstehen voraussichtlich die korrespondierenden Dipeptide und schließlich die entsprechenden Aminosäuren. Somit war der Nachweis dieser Substanzklassen für diese Arbeit von großer Bedeutung.

1.4.1 Nachweis von Aminosäuren und Dipeptiden

Für den Nachweis von Aminosäuren (und Dipeptiden) sind einige Methoden bekannt, welche auf der Reaktion zwischen einer Aminogruppe und einer Derivatisierungssubstanz unter Bildung eines Chromophors beruhen. Die erste beschriebene Nachweismethode von Aminosäuren mit Ninhydrin geht auf Ruhemann zurück (Ruhemann 1910). Durch Kopplung der Farbreaktion an eine Chromatographie kann man gleichzeitig die Auftrennung, Detektion und Quantifizierung von Aminosäuren erhalten. Eine diesbezügliche Methode wurde mittels Detektion der Ninhydrinderivate und deren Auftrennung mit Stärkesäulen entwickelt (Moore, Stein 1948) und in den darauffolgenden Jahren optimiert. Weitere

Methoden stellen beispielsweise die Vorsäulenderivatisierungen mit 4-Dimethylaminoazobenzol-4'-sulfonylchlorid (Dabsyl-Cl), 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid (Dansyl-Cl), Phenylisothiocyanat (PITC), 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc-Cl), und mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) / 3-Mercaptopropionsäure (3-MPA) mit anschließender Auftrennung mittels HPLC (*High performance liquid chromatography*; Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) (Rigas 2012), (Cooper et al. 2001) dar. Die genannten Derivatisierungsmethoden beruhen auf der Reaktion mit der Aminogruppe der Aminosäure oder des Dipeptids.

Durch die Vorsäulenderivatisierung von Aminosäuren mit Dabsyl-Cl (siehe Abbildung 1.8) ist es möglich alle proteinogenen Aminosäuren durch RP-HPLC aufzutrennen; Vorteile dieser Methode sind die gute Absorption von Dabsyl-Derivaten und die Stabilität der derivatisierten Substanzen (Vendrell, Aviles 1986).

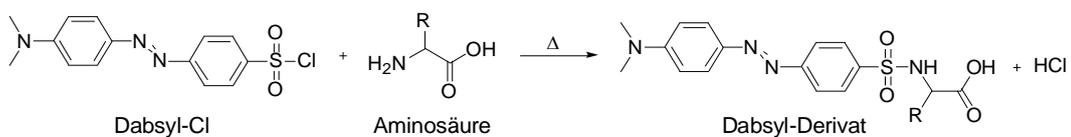


Abbildung 1.8: Derivatisierung einer Aminosäure mittels Dabsyl-Cl

Dansyl-Cl reagiert mit Aminogruppen zu im UV-Bereich absorbierenden Derivaten; die Reaktionsgeschwindigkeit ist allerdings niedrig (Mao et al. 2009). Die bei der Reaktion von Aminogruppen mit PITC gebildeten Phenylthiocarbamoyl-Derivate können mittels UV-Detektion nachgewiesen werden; nachteilig ist jedoch, dass überschüssiges PITC vor der HPLC-Messung entfernt werden muss (Cohen et al. 1986).

Die bei der Reaktion mit Fmoc-Cl entstehenden Derivate (vgl. Abbildung 1.9) fluoreszieren und absorbieren im UV-Bereich (Melucci et al. 1999). Die Reaktion verläuft schnell und führt zu stabilen Derivaten; nachteilig ist, dass das Derivatisierungsreagenz bereits fluoresziert und daher die Messung stören kann, und dass eine Extraktion des bei der Reaktion mit Wasser gebildeten Fmoc-OH vor dem Vermessen erforderlich ist (Bank et al. 1996), (Jámbor, Molnár-Perl 2009).

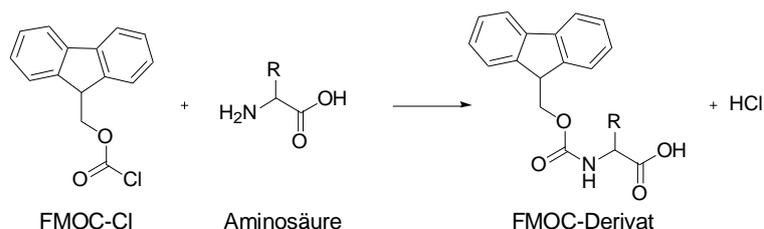


Abbildung 1.9: Derivatisierung einer Aminosäure mittels Fmoc-Cl

Als weitere Methode für den Nachweis von Aminosäuren eignet sich die Derivatisierung mit OPA/3-MPA (vgl. Abbildung 1.10). OPA bildet mit primären Aminen und Thiolen, wie 3-MPA fluoreszierende Derivate, die mittels RP-HPLC getrennt werden können (Godel et al. 1984).

Die Vorteile dieser Methode sind eine hohe Sensitivität und kurze Reaktionszeiten, nachteilig ist die Bildung teils instabiler Derivate (Hanczkó et al. 2007). Je nach Anwendung, stellt sich das Problem, dass keine Reaktion mit sekundären Aminen möglich ist (Umagat et al. 1982).

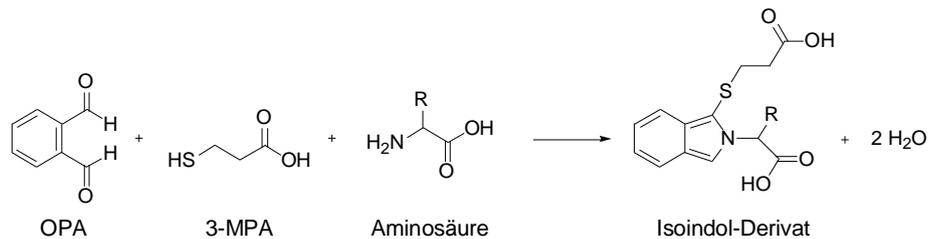


Abbildung 1.10: Derivatisierung einer Aminosäure mittels OPA/3-MPA

Die genannten Derivatisierungsmethoden wurden bisher nicht für DKPs beschrieben. Bekannt ist allerdings, dass DKPs keine positive Reaktion mit Ninhydrin eingehen. So wurde nachgewiesen, dass Cyclo(Gly-Gly) nicht mit Ninhydrin reagiert (Waldschmidt-Leitz, Schäffner 1925).

1.4.2 Nachweis von DKPs

Es wurden verschiedene Methoden für den Nachweis einzelner DKPs beschrieben.

Aspartam™ und das entstehende Abbauprodukt Cyclo(Asp-Phe) konnten beispielsweise mittels RP-HPLC und Detektion der Peptidbindung bei Wellenlängen von 195 nm (Demiralay, Ozkan 2004), 200 nm und 220 nm (George et al. 2010) oder 210 nm (Saito et al. 1989), Kapillarelektrophorese und Detektion bei einer Wellenlänge von 214 nm (Aboul-Enein, Bakr 1997), HPLC-MS/MS (Berset, Ochsenbein 2012) oder Analyse der Trimethylsilyl-Derivate mittels Gaschromatographie (Furda et al. 1975) nachgewiesen werden. Cyclo(Gly-Gly) konnte mittels RP-HPLC getrennt und bei einer Wellenlänge von 200 nm detektiert werden (Compton et al. 1979). Der ACE-Hemmer (*Angiotensin Converting Enzyme*) Enalapril und zwei Abbauprodukte (unter anderem ein DKP) konnten mittels RP-HPLC und Detektion bei 215 nm bestimmt werden (Kocijan et al. 2001). Die Analyse des DKPs, welches als Abbauprodukt von Amoxicillin entsteht, konnte mit HPLC-MS/MS (Lamm et al. 2009) oder UHPLC-MS/MS (Liu et al. 2011) durchgeführt werden.

Neben diesen Nachweisen einzelner DKPs gibt es keine umfassende Studie über die Trennung von DKPs von deren korrespondierenden Dipeptiden und Aminosäuren. Da bei der in dieser Arbeit untersuchten Hydrolyse von DKPs ein Nachweis und die Trennung unumgänglich waren, sollte dafür eine Analytik etabliert werden.

Für das in dieser Arbeit untersuchte, racemische DKP Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) ist eine chirale Analytik möglich.

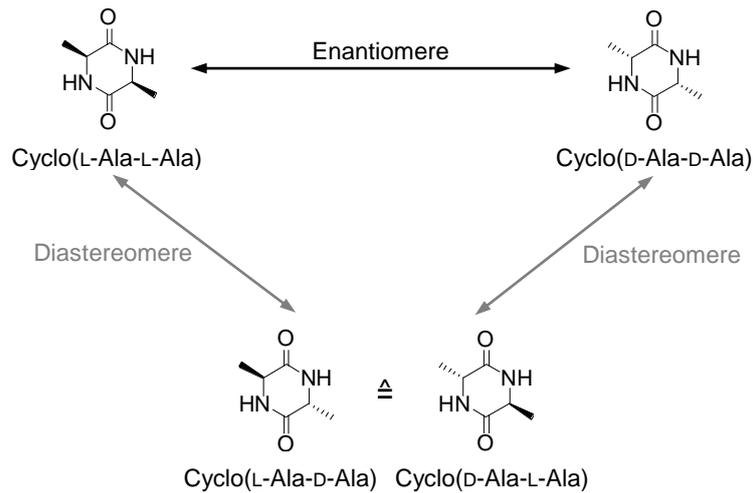


Abbildung 1.11: Enantiomere bzw. Diastereomere von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala)

In Abbildung 1.11 sind die enantiomeren und diastereomeren Beziehungen von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) dargestellt. Cyclo(L-Ala-L-Ala) und Cyclo(D-Ala-D-Ala) bilden ein Enantiomerenpaar und verhalten sich diastereomer zu der *meso*-Verbindung Cyclo(L-Ala-D-Ala). Das Racemat besteht zu 50 % aus dem Enantiomerenpaar (25 % Cyclo(L-Ala-L-Ala) und 25 % Cyclo(D-Ala-D-Ala)) und zu weiteren 50 % aus der *meso*-Verbindung. Da sich diese diastereomer zueinander verhalten ist die Trennung unter nicht chiralen Bedingungen mittels HPLC zweier gleichgroßer Peaks möglich und wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

2 Zielsetzung

Obwohl Diketopiperazine (DKPs) eine in der Natur weit verbreitete Substanzklasse repräsentieren und vielfältige Funktionen aufweisen, ist über den Abbau dieser Moleküle nur sehr wenig bekannt. Daher sollte die biologische Abbaubarkeit von DKPs auf verschiedenen Wegen untersucht werden.

Zunächst sollte eine Analytik zum Nachweis der Edukte und der potentiell entstehenden Produkte (Dipeptide und Aminosäuren) etabliert und validiert werden. Dazu sollten verschiedene Methoden (photometrische und chromatographische Messungen) angewendet werden.

Zur Untersuchung der DKP-Hydrolyse sollten mehrere Ansätze verfolgt werden (siehe Abbildung 2.1):

- A. Die in der Literatur beschriebene Spaltung von DKPs durch verschiedene Peptidasen sollte überprüft und der Umsatz weiterer DKPs durch unterschiedliche Peptidasen untersucht werden.
- B. Für die Synthese von DKPs sind viele Schwämme und Schwamm-assoziierte Bakterien beschrieben. Zur Identifizierung neuer DKP-abbauender Bakterien sollte ein Screening mit Schwammproben und DKPs als einziger Stickstoffquelle durchgeführt werden.
- C. Die Stämme *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) sind für die Hydrolyse des DKPs Cyclo(Asp-Phe) beschrieben. Nach Bestätigung dieser Aktivität sollten diese beiden Stämme für verschiedene Untersuchungen (z. B.: Bestimmung des Substratspektrums, Inhibierung der Enzyme durch verschiedene Peptidaseinhibitoren, Anreicherung der Enzyme) zur Charakterisierung der verantwortlichen Enzyme verwendet werden.
- D. Stämme, die sowohl Hydantoine als auch Dihydropyrimidine umsetzen können, sollten aufgrund der Strukturähnlichkeit dieser cyclischen Amide und DKPs bezüglich ihrer hydrolytischen Aktivität gegenüber DKPs untersucht werden.

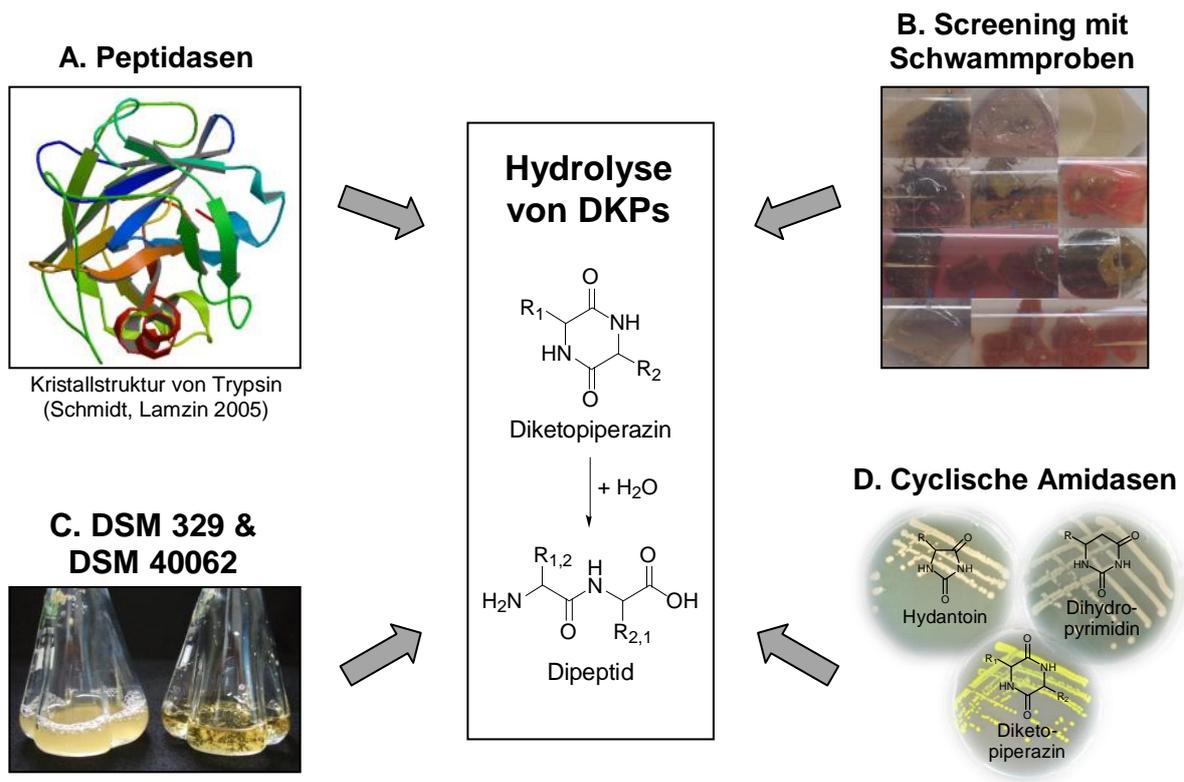


Abbildung 2.1: Biokatalysatoren die für die Hydrolyse verschiedener DKPs untersucht werden sollten

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Tabelle 3.1: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	V-150 und HX-430	Systec (Wettenberg)
Brutschrank	BBD 6220	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
DNA-Elektrophorese	Minigel-Sub [®] cell GT Netzgerät: Model 200/2.0	Bio-Rad Laboratories (Hercules, US)
Feinwaage	BP 61 S	Sartorius (Göttingen)
FPLC	ÄKTA [™] explorer 100	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK)
HPLC	1100 und 1200 Serie	Agilent Technologies (Santa Clara, US)
Magnetrührer	D-6010	neoLab [®] (Heidelberg)
Mikroskop	ECLIPSE E200	Nikon (Tokio, JP)
Mikroskopkamera	DS-Fi1	
Mikrotiterplattenschüttler	BioShake IQ	Analytik Jena (Jena)
PCR-Gerät	Mastercycler Gradient	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
pH-Meter	InoLab pH Level 1	WTW (Weilheim)
Pipetten	Research	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Plattformschüttler	Polymax 1040	Heidolph (Schwabach)
Protein-Elektrophorese	Minigel-Twin Netzgerät: Power Pack P25T	Biometra [®] (Göttingen)
Reinstwasseranlage	Purelab Plus	USF Seral (Ransbach-Baumbach)
Schüttelinkubator	Multitron	Infors HT (Bottmingen, CH)
Spektrophotometer (Küvette)	Ultrospec 1100 <i>pro</i> UV/Vis	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK)
Spektrophotometer (MTP)	µQuant [™]	BioTek [®] Instruments (Winooski, US)
Sterilbank	Lamin Air	Heto-Holten A/S (Allerød, DK)
Thermoschüttler	Thermomixer comfort und Thermomixer compact	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D Rotor: F45-24-11	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Trockenschrank	ED-240	Binder (Tuttlingen)
Überkopfschüttler	Reax 2	Heidolph (Schwabach)
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 100	Bandelin electronic (Berlin)
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls HD 3100, Sonde MS 72	Bandelin electronic (Berlin)
UV-Tisch	ECX Transilluminator	Vilber Lourmat (Torcy, FR)
Vakuumpumpe	MZ2C	Vacuubrand (Wertheim)
Reagenzglasschüttler	Reax Top	Heidolph (Schwabach)
Vakuumpkonzentrator	S-Concentrator BA-VC-300H	H. Saur (Reutlingen)
Waage	BP 3100 S	Sartorius (Göttingen)
Zentrifuge	Multifuge X3 FR; Rotor: F21-48x1.5/2.0 und 75003607	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)

3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders deklariert, von Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (St. Louis, US), Merck (Darmstadt), neoLab® (Heidelberg) und SARSTEDT (Nümbrecht) bezogen.

Tabelle 3.2: Verwendete DKPs und Dihydrouracil (Substrate)

Substanz	Hersteller	Reinheit [%]	Bestellnummer
Cyclo(Gly-Gly)	TCI Europe NV. (Zwyndrecht, BE)	> 98,0	90100
Cyclo(DL-Ala-DL-Ala)	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)	99	362557
Cyclo(L-Ala-L-Ala)	Bachem (Bubendorf, CH)	> 99	G-1655
Cyclo(L-Asp-L-Phe)	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)	97	421650
Cyclo(Gly-L-Phe)	Bachem (Bubendorf, CH)	> 99	G-1715
Cyclo(L-Asp-L-Asp)	Bachem (Bubendorf, CH)	> 99	G-1680
Cyclo(L-Pro-L-Tyr)	Bachem (Bubendorf, CH)	> 99	G-4715
Cyclo(L-Arg-L-Arg) × 2 AcOH	Taros Chemicals (Dortmund)	k. A.	15431
Cyclo(L-Lys-L-Lys) × 2 AcOH	Taros Chemicals (Dortmund)	> 95	15426
(S)-3-Benzyl-1,4-dimethyl-piperazin-2,5-dion	Taros Chemicals (Dortmund)	> 95	3759
3-Benzyl-3-methyl-piperazin-2,5-dion	Taros Chemicals (Dortmund)	> 95	8289
1,3-Dimethyl-piperazin-2,5-dion	Taros Chemicals (Dortmund)	> 95	11486
Dihydrouracil	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)	k. A.	D7628

Soweit nicht anders angegeben, wurde von Cyclo(Ala-Ala) die racemische Form Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) verwendet.

Tabelle 3.3: Verwendete Dipeptide

Substanz	Hersteller	Reinheit [%]	Bestellnummer
Gly-Gly	TCI Europe NV. (Zwyndrecht, BE)	> 99,0	G0124
DL-Ala-DL-Ala	TCI Europe NV. (Zwyndrecht, BE)	> 98	A0181
L-Ala-L-Ala	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)	k. A.	A9502
L-Asp-L-Phe	Bachem (Bubendorf, CH)	> 98	G-1620
L-Phe-L-Asp	Bachem (Bubendorf, CH)	> 99	G-2870
Gly-L-Phe	Bachem (Bubendorf, CH)	> 99	G-2175
L-Phe-Gly	Bachem (Bubendorf, CH)	> 98	G-2880
L-Asp-L-Asp	Bachem (Bubendorf, CH)	> 99	G-1565
L-Pro-L-Tyr	Bachem (Bubendorf, CH)	> 99	G-3075
L-Tyr-L-Pro	Bachem (Bubendorf, CH)	> 97	G-3625
L-Arg-L-Arg × 2 AcOH	Bachem (Bubendorf, CH)	> 98	G-1465
L-Lys-L-Lys × 2 HCl	Bachem (Bubendorf, CH)	> 99	G-2675

Tabelle 3.4: Verwendete Aminosäuren

Substanz	Hersteller	Reinheit [%]	Bestellnummer
Gly	Carl Roth (Karlsruhe)	≥ 99	3790.2
DL-Ala	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)	≥ 99	5150
L-Asp	Carl Roth (Karlsruhe)	≥ 98,5	T202.1
L-Phe	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)	≥ 99	78020
L-Pro	Carl Roth (Karlsruhe)	≥ 98,5	T202.2
L-Tyr	Carl Roth (Karlsruhe)	≥ 99	1741.1
L-Arg	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)	≥ 99,5	11009
L-Lys × H ₂ O	Carl Roth (Karlsruhe)	≥ 98,5	4207.1
N-Carbamoyl-β-Ala	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)	k. A.	C-3750

3.1.3 Enzyme

Tabelle 3.5: Verwendete Peptidasen für die DKP-Hydrolyse; * immobilisierte Enzyme

Peptidase	Ursprung	Hersteller
Ficin	<i>Ficus carica</i>	Enzybel International SA (Villers-le-Bouillet, BE)
Bromelain	<i>Ananas comosus</i>	
Chymotrypsin (>1.000 USP-E/mg)	Rinderpankreas	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypsin (5.000 USP-U/mg)	Schweinepankreas	
Pepsin (≥0,5 E/mg)	Schweinemägen	
Papain (>30.000 USP-U/mg)	<i>Carica papaya</i>	
Alcalase (Subtilisin)*	<i>Bacillus</i> sp.	Immozyme™ Protease Kit, Chiral Vision (Leiden, NL)
Savinase (Subtilisin)*	<i>Bacillus</i> sp.	
Everlase (Subtilisin)*	<i>Bacillus</i> sp.	
Esperase (Subtilisin)*	<i>Bacillus</i> sp.	
Protex 6L*	<i>Bacillus licheniformis</i>	
Protex 30L*	<i>Bacillus subtilis</i>	
Protex 40L*	<i>Bacillus subtilis</i>	
Protex 51 FP*	<i>Aspergillus oryzae</i>	
Protex 89L*	<i>Bacillus subtilis</i>	

3.1.4 Stämme

Tabelle 3.6: Stämme mit beschriebener DKP-Hydrolyseaktivität (Yokozeke et al. 1990)

Spezies	Stamm	Quelle
<i>Paenibacillus chibensis</i>	DSM 329	DSMZ (Braunschweig)
<i>Streptomyces flavovirens</i>	DSM 40062	

Tabelle 3.7: Stämme mit beschriebener cyclische Amidase Aktivität

(H) Hydantoin, (BnH) 5-Benzylhydantoin, (*t*-BH) 5-*tert*-Butylhydantoin, (IMH) 5-(3-Indolylmethyl)-Hydantoin, (DU) Dihydrouracil, (PheDU) 6-Phenyldihydrouracil, (*p*CIPheDU) *p*-Chlor-6-Phenyldihydrouracil; ¹ (Dürr 2007), ² (Dürr et al. 2006), ³ (Dürr et al. 2008), ⁴ (Engel et al. 2012)

Spezies	Stamm	Aktivität	Keine Aktivität	Quelle
<i>Leifsonia</i> sp. (früher <i>Microbacteriaceae</i> sp.)	K3	BnH ² , DU ²	H ¹ , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , PheDU ⁴	
<i>Burkholderia</i> sp.	M3	H ¹ , BnH ² , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , DU ²	PheDU ⁴	
<i>Flavobacterium</i> sp.	F8	H ¹ , BnH ² , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , DU ²	PheDU ⁴	
<i>Streptomyces</i> sp.	I20	H ¹ , BnH ² , DU ²	<i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , PheDU ¹	
<i>Bacillus</i> sp.	A16 (DSM 25052)	H ¹ , BnH ² , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , DU ² , PheDU ⁴ , <i>p</i> CIPheDU ⁴		Isolation (Dürr et al. 2006), Stammsammlung des Instituts für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich II: Technische Biologie, Karlsruher Institut für Technologie
<i>Bacillus</i> sp.	F18	H ¹ , BnH ² , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , DU ² , PheDU ¹		
<i>Bacillus</i> sp.	G18	H ¹ , BnH ² , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , DU ²	PheDU ⁴	
<i>Bacillus</i> sp.	H20	H ¹ , BnH ² , DU ²	<i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , PheDU ¹	
<i>Pseudomonas</i> sp.	G7	H ¹ , BnH ² , <i>t</i> -BH ¹ , DU ²	IMH ¹ , PheDU ⁴	
<i>Pseudomonas</i> sp.	M18	H ¹ , BnH ² , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , DU ²	PheDU ⁴	
<i>Pseudomonas</i> sp.	L9	H ¹ , BnH ² , DU ²	<i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , PheDU ¹	
<i>Ochrobactrum</i> sp.	C15	H ¹ , BnH ² , IMH ¹ , DU ²	<i>t</i> -BH ¹ , PheDU ⁴	
<i>Ochrobactrum</i> sp.	D24	H ¹ , BnH ² , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , DU ²	PheDU ¹	
<i>Ochrobactrum</i> sp.	F21 (DSM 25042)	H ¹ , BnH ² , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , DU ² , PheDU ⁴ , <i>p</i> CIPheDU ⁴		
<i>Ochrobactrum</i> sp.	I21	H ¹ , BnH ² , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , DU ² , PheDU ¹		
<i>Arthrobacter</i> sp.	E7 (DSM 24883)	H ¹ , BnH ² , DU ² , PheDU ⁴ , <i>p</i> CIPheDU ⁴	<i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹	
<i>Arthrobacter</i> sp.	K20	H ¹ , BnH ² , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , DU ²		
nicht bestimmt	725	IMH ⁴ , DU ⁴		
<i>Aminobacter</i> sp.	728 (DSM 24754)	IMH ⁴ , DU ⁴ , PheDU ⁴ , <i>p</i> CIPheDU ⁴		Isolation durch Dr. A. Puñal; Stammsammlung (s. o.)
<i>Mesorhizobium</i> sp.	731	IMH ⁴ , DU ⁴		
<i>Aminobacter</i> sp.	735 (DSM 24755)	IMH ⁴ , DU ⁴ , PheDU ⁴ , <i>p</i> CIPheDU ⁴		
nicht bestimmt	157	IMH ⁴ , DU ⁴		
nicht bestimmt	158	IMH ⁴ , DU ⁴		
nicht bestimmt	222	IMH ⁴ , DU ⁴		
nicht bestimmt	225	IMH ⁴ , DU ⁴		
<i>Rhizobium</i> sp.	NA04-01 (DSM 24917)	PheDU ⁴ , <i>p</i> CIPheDU ⁴		Isolation (Engel et al. 2012)
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	DSM 20136	H ¹ , DU ¹ , PheDU ⁴	BnH ¹ , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , <i>p</i> CIPheDU ⁴	Untersuchungen (Dürr 2007); DSMZ (Braunschweig)
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	DSM 342	H ¹ , DU ¹ , PheDU ⁴	BnH ¹ , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , <i>p</i> CIPheDU ⁴	
<i>Arthrobacter aurescens</i>	DSM 20116	H ¹ , DU ¹	BnH ¹ , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , PheDU ¹	
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	DSM 420	H ¹ , BnH ¹ , <i>t</i> -BH ¹ , DU ¹ , PheDU ¹	IMH ¹	
<i>Arthrobacter citreus</i>	DSM 20133	H ¹ , BnH ¹ , DU ¹ , PheDU ¹	<i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ ,	
<i>Arthrobacter sulfureus</i>	DSM 20167	H ¹ , DU ¹	BnH ¹ , <i>t</i> -BH ¹ , IMH ¹ , PheDU ¹	

Tabelle 3.8: Rekombinante Stämme mit beschriebener cyclische Amidase Aktivität und Wildtypstamm

Erklärung der Aktivitäten siehe Tabelle 3.7

Spezies	Stamm	Aktivität	Quelle
<i>E. coli</i>	K12 JM109		New England Biolabs (Ipswich, US)
<i>E. coli</i>	K12 JM109 pJOE5702.1 mit Hydantoinase aus <i>Ochrobactrum</i> sp. G21 (DSM 18828)	BnH ³ , IMH ³ , PheDU ⁴ , pCIPheDU ⁴ , DU (für Wildtypstamm) ²	Klonierung der Gene und Transformation in <i>E. coli</i> (Dürr et al. 2008),
<i>E. coli</i>	K12 JM109 pJOE5704.1 mit Hydantoinase aus <i>Delftia</i> sp. I24 (DSM 18833)	BnH ³ , IMH ³ , PheDU ⁴ , pCIPheDU ⁴ , DU (für Wildtypstamm) ²	Stammsammlung (siehe Tabelle 3.7)

Die beiden rekombinanten Stämme werden in dieser Arbeit teilweise als pJOE5702.1 und pJOE5704.1 benannt.

3.1.5 Medien

Alle Medien wurden vor der Benutzung für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Bestandteile, die nicht hitzestabil sind, wurden durch einen Rotilabo[®]-Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm (Carl Roth, Karlsruhe) steril filtriert und zum autoklavierten Medium hinzugefügt.

Für die Herstellung von Agarplatten wurde zu den Flüssigmedien vor dem Autoklavieren jeweils 1,6 % (w/v) Agar zugegeben.

LB-Medium: (pH 7,0) (modifiziert nach Bertani 1951)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
<i>Aqua demin.</i>	ad 1 l

Das LB-Medium wurde hauptsächlich für die Kultivierung der Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und für die beiden in dieser Arbeit isolierten Stämme *Paenibacillus* sp. und *Microbacterium* sp. verwendet.

3.1.5.1 Medien für Screening mit Schwammproben

Für alle Medien die Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) enthielten, wurden davon separate Lösungen hergestellt. Diese wurden steril filtriert und anschließend zum autoklavierten Medium hinzugefügt.

Screening Medium: (pH 7,2)

Hefeextrakt	0,1 g
Eisen(III)-citrat x H ₂ O	0,11 g
NaCl	20 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	12,6 g
Na ₂ SO ₄	3,24 g

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,38 g
KCl	0,55 g
Na ₂ CO ₃	0,16 g
KBr	80 mg
H ₃ BO ₃	22 mg
NH ₄ NO ₃	1,6 mg
Na ₂ HPO ₄	8 mg
Cyclo(Gly-Gly)	2,5 g
Cyclo(Ala-Ala)	0,5 g
<i>Aqua demin.</i>	ad 1 l

Dieses Medium wurde für die Probenahme der Schwammproben verwendet.

ASW-Screening Medium: (pH 7,2)

Tropic Marin [®] Meersalz	36,4 g	(Dr. Biener Aquarientechnik, Wartenberg)
Hefeextrakt	0,1 g	
Cyclo(Gly-Gly)	1,14 g	
Cyclo(Ala-Ala)	1,42 g	
<i>Aqua demin.</i>	ad 1 l	

Die Bestandteile dieses Mediums wurden einzeln hergestellt. Die Hefeextraktlösung wurde autoklaviert, die Meersalzlösung, sowie die DKP-Lösungen wurden steril filtriert.

Für die Herstellung von festem ASW-Screening Medium wurde Agarose anstelle von Agar verwendet.

ASW-Screening Medium diente der Anreicherung von potentiellen DKP-abbauenden Bakterien.

Komplexmedium: (pH 7,2)

Pepton	1 g
Hefeextrakt	1 g
NaCl	35 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,3 g
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,3 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,147 g
Cyclo(Gly-Gly)	0,57 g
Cyclo(Ala-Ala)	0,71 g
<i>Aqua demin.</i>	ad 1 l

Dieses Medium wurde für die Kultivierung der beim Screening isolierten Bakterien verwendet. Komplexmediumplatten wurden für die Isolierung von Reinkulturen und für die Lagerung der Stämme genutzt.

Mineralsalzmedium: (pH 7,2)

Glucose x H ₂ O	1,98 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
Na ₂ HPO ₄	1,81 g
NaCl	35 g
MgSO ₄	0,12 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	73,5 mg
(Cyclo(Gly-Gly)	1,14 g)
(Cyclo(Ala-Ala)	1,42 g)
<i>Aqua demin.</i>	ad 1 l

Es wurden einzelne Lösungen (Lösung 1 (100 ml): Glucose x H₂O; Lösung 2 (700 ml): KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl; Lösung 3 (100 ml): MgSO₄, CaCl₂ x 2 H₂O; Lösung 4 (100 ml): Cyclo(Gly-Gly), Cyclo(Ala-Ala)) hergestellt und getrennt autoklaviert bzw. steril filtriert. Das Mineralsalzmedium diente für die Wachstumskontrolle der isolierten Bakterien ohne und mit DKPs als einziger N-Quelle, daher wurde Lösung 4 wahlweise durch *Aqua demin.* ersetzt. Für die Herstellung von Mineralsalzmediumplatten wurde Agarose verwendet.

3.1.5.2 Medien für DSM 329 und DSM 40062DSMZ-Medium 1: (pH 7,0) (DSMZ Medium 1)

Pepton	5 g
Fleischextrakt	3 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,01 g
<i>Aqua demin.</i>	ad 1 l

Das DSMZ-Medium 1 diente für die erste Anzucht von DSM 329.

DSMZ-Medium 65: (pH 7,2) (DSMZ Medium 65)

Glucose	4 g
Hefeextrakt	4 g
Malzextrakt	10 g
<i>Aqua demin.</i>	ad 1 l

Das DSMZ-Medium 65 diente für die erste Anzucht von DSM 40062.

Patentmedium: (pH 7,2) (modifiziert nach Yokozeki et al. 1990)

Pepton aus Casein	10 g
Hefeextrakt	10 g
K ₂ HPO ₄	3 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
<i>Aqua demin.</i>	ad 600 ml

Zur Vervollständigung des Mediums wurden nach dem Autoklavieren entweder 400 ml *Aqua demin.* (autoklaviert) oder 400 ml DKP-Induktionslösung (steril filtriert) (siehe Abschnitt 3.1.5.3) hinzugegeben.

Das Flüssigmedium diente der Kultivierung mit anschließender Biotransformation von DSM 329 und DSM 40062. Patentmediumplatten wurden für die Lagerung beider Stämme genutzt.

3.1.5.3 Lösungen für Kultivierungen

Die folgenden Lösungen wurden vor Zugabe zu den Medien steril filtriert.

Ampicillin-Stammlösung:

Ampicillin 100 g
Aqua demin. ad 1 l

Rhamnose-Stammlösung:

L-Rhamnose x H₂O 200 g
Aqua demin. ad 1 l

DKP-Induktionslösung I: (2,5 mM)

Cyclo(Asp-Phe) 0,66 g
Aqua demin. ad 1 l

DKP-Induktionslösung II:

Cyclo(Asp-Phe) 1,25 g
Cyclo(Gly-Gly) 1,25 g
Cyclo(Ala-Ala) 1,25 g
Aqua demin. ad 1 l

DKP-Induktionslösung I wurde zur Kultivierung von DSM 40062 in Patentmedium eingesetzt. Die DKP-Induktionslösung II wurde zur Überprüfung der Induktion der Enzymaktivität in DSM 329 und DSM 40062 verwendet.

3.1.6 Puffer und Lösungen

Alle Puffer, die Verwendung bei der HPLC-Analytik fanden (Laufmittel- und Probenpuffer), wurden vor Gebrauch mit Hilfe einer Nitrocellulosemembran mit 0,2 µm Porengröße (Merck Millipore, Darmstadt) und einer Vakuumpumpe filtriert. Die Laufmittelpuffer wurden zusätzlich im Vakuumbad entgast, die Probenpuffer wurden vor Benutzung für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

3.1.6.1 Probenpuffer

50 mM NaPP Puffer: (pH 7,5)

Na₂HPO₄ x 2 H₂O 8,90 g
Aqua demin. ad 1 l

NaH₂PO₄ x 2 H₂O 7,80 g
Aqua demin. ad 1 l

Von den beiden hergestellten Lösungen wurde so viel zusammengegeben bis der gewünschte pH-Wert vorlag.

Der Puffer wurde hauptsächlich als Lösungsmittel für die DKPs, Dipeptide und Aminosäuren, zum Waschen und Resuspendieren der Bakterienzellen, für alle

Verdünnungen bei der Biotransformation und bei der Ionenaustauschchromatographie verwendet.

5 mM NaPP Puffer: (pH 7,5)

Na₂HPO₄ x 2 H₂O 0,89 g

Aqua demin. ad 1 l

NaH₂PO₄ x 2 H₂O 0,78 g

Aqua demin. ad 1 l

Anteile beider Lösungen wurden gemischt bis der gewünschte pH-Wert vorlag.

In diesem Puffer wurden die PITC-derivatisierten Standards nach dem Eindampfen gelöst.

100 mM Natriumboratpuffer: (pH 9,0)

Borsäure 6,18 g

Aqua demin. ad 1 l

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH eingestellt.

Dieser Puffer diente als Lösungsmittel der Standards für die Derivatisierungen mit Dabsyl-Cl, Dansyl-Cl, PITC, Fmoc-Cl und OPA/3-MPA.

3.1.6.2 Laufmittelpuffer

20 mM NaAc Puffer: (pH 4,0; pH 5,0)

Natriumacetat x 3 H₂O 2,72 g

Aqua demin. ad 1l

100 mM NaAc Puffer: (pH 6,4)

Natriumacetat x 3 H₂O 13,61 g

Aqua demin. ad 1l

10 mM AmmoniumAc Puffer: (pH 4,5)

Ammoniumacetat 0,77 g

Aqua demin. ad 1l

Der pH-Wert wurde jeweils mit 47 % Essigsäure eingestellt.

Der 20 mM NaAc Puffer (pH 4,0) wurde für die Trennung der Dabsyl-Derivate und der underivatisierten Proben, der 20 mM NaAc Puffer (pH 5,0) und der 10 mM AmmoniumAc Puffer (pH 4,5) für die underivatisierten Proben, und der 100 mM NaAc Puffer (pH 6,4) bei der Chromatographie der Dansyl- und PITC-Derivate verwendet.

20 mM NaPP Puffer: (pH 5,5; pH 6,5)

Na₂HPO₄ x 2 H₂O 3,56 g

Aqua demin. ad 1 l

NaH₂PO₄ x 2 H₂O 3,12 g

Aqua demin. ad 1 l

20 mM AmmoniumPP Puffer: (pH 6,5)

(NH₄)₂HPO₄ 2,64 g

Aqua demin. ad 1 l

NH₄H₂PO₄ 2,30 g

Aqua demin. ad 1 l

Für diese Puffer wurden jeweils beide hergestellten Lösungen in Volumenanteilen gemischt bis der gewünschte pH-Wert vorlag.

Diese drei Laufmittelpuffer kamen beim Nachweis der underivatisierten Proben zum Einsatz, wobei der 20 mM NaPP Puffer (pH 5,5) schließlich für die Analytik der underivatisierten Proben ausgewählt wurde. Der 20 mM NaPP Puffer (pH 6,5) wurde zusätzlich für die Trennung, der bei der OPA/3-MPA Derivatisierung erhaltenen Produkte, und der 20 mM AmmoniumPP Puffer (pH 6,5) bei der Analyse der FMOC-Derivate, verwendet.

3.1.6.3 Ninhydrin-Assay

100 mM NaPP Puffer: (pH 7,0)

Na₂HPO₄ x 2 H₂O 17,8 g

Aqua demin. ad 1 l

NaH₂PO₄ x 2 H₂O 15,6 g

Aqua demin. ad 1 l

Anteile beider Lösungen wurden so zusammengegeben bis der gewünschte pH-Wert vorlag.

Der Puffer diente als Lösungsmittel der Standards.

2,6 M NaAc Puffer: (pH 5,3)

Natriumacetat x 3 H₂O 353 g

96 % Essigsäure 69 ml

Aqua demin. ad 1 l

Ninhydrinreagenz:

Ninhydrin 0,116 g

Hydrindantin x 2 H₂O 0,116 g

2-Methoxyethanol 10 ml

3.1.6.4 Vorsäulenderivatisierung

Dabsyl-Cl Lösung:

Dabsyl-Cl 1 mg

Aceton 1 ml

Dansyl-Cl Lösung:

Dansyl-Cl 10 mg

Aceton 1 ml

PITC Lösung:

Ethanol 9 ml

PITC 1 ml

Aqua demin. 1 ml

FMOC-Cl Lösung:

FMOC-Cl 1,5 mg

Aceton 1 ml

166 mM Natriumboratpuffer: (pH 10,4)

Borsäure 10,28 g

Aqua demin. ad 1 l

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH eingestellt.

OPA Lösung:

OPA 5 mg

Natriumboratpuffer (s. o.) 1 ml

3-MPA Lösung:

3-MPA 11 µl

Natriumboratpuffer (s. o.) 989 µl

3.1.6.5 Puffer50 mM NaAcPuffer: (pH 3,1)Natriumacetat x 3 H₂O 2,72 g*Aqua demin.* ad 1l

99% Essigsäure 3,00 ml

Aqua demin. ad 1l

Beide Lösungen wurden anteilmäßig gemischt bis der gewünschte pH-Wert vorlag.

Dieser Puffer diente zum Lösen von Pepsin.

3.1.6.6 Agarose-Gelelektrophorese50x TAE-Puffer: (pH 8,0)

Tris 242 g

0,5 M EDTA 100 ml

Aqua demin. ad 1 l

Der pH-Wert wurde mit 99 %iger Essigsäure eingestellt.

3.1.6.7 IonenaustauschchromatographieElutionspuffer:

50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) mit 1 M KCl

3.1.6.8 SDS-Polyacrylamid-GelelektrophoreseLower Tris-HCl: (pH 8,8)

Tris 228 g

Aqua demin. ad 1 lUpper Tris-HCl: (pH 6,8)

Tris 76 g

Aqua demin. ad 1 l10 % APS-Lösung:

Ammoniumpersulfat 100 g

Aqua demin. ad 1 l10 % SDS-Lösung:

Sodiumdodecylsulfat 100 g

Aqua demin. ad 1 lAcrylamid-Lösung:Rotiphorese[®] Gel 30SDS-Probenpuffer:

Upper Tris-HCl 1,25 ml

Glycerin 2,5 ml

10 % SDS 2,0 ml

0,5 % Bromphenolblau 0,2 ml

β-Mercaptoethanol 0,5 ml

Aqua demin. ad 10 ml10x TGS-Laufpuffer: (pH 8,4)

Tris 30,3 g

Glycin 144,2 g

SDS 10,0 g

Aqua demin. ad 1 l

3.2 Analytische Methoden

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Hydrolyse von DKPs entstehen voraussichtlich die korrespondierenden Dipeptide und Aminosäuren. Für die Entwicklung einer Methode zum Nachweis der Substrate und potentieller Produkte wurden die folgenden Methoden verwendet.

3.2.1 Ninhydrin-Assay

Der Ninhydrin-Assay wurde für die Modell-DKPs Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) und deren korrespondierenden Dipeptide und Aminosäuren als Standard geprüft. Dazu wurden 100 µl 2,6 M NaAc Puffer (pH 5,3) mit 100 µl des jeweils 2 mM Standards in 100 mM NaPP Puffer (pH 7,0) gemischt. Nach der Zugabe von 100 µl Ninhydrinreagenz wurde die Reaktion bei 60 °C und 1.000 rpm für 20 min durchgeführt. Die Proben wurden für 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 100 µl einer 1:1 Mischung aus Isopropanol und *Aqua demin.* versetzt. Daraufhin erfolgte die Detektion der Derivate photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm.

3.2.2 Entwicklung einer HPLC-Analytik

Um eine geeignete HPLC-Analytik für den Nachweis und die Trennung der DKPs (Tabelle 3.2) von den entsprechenden Dipeptiden (Tabelle 3.3) und Aminosäuren (Tabelle 3.4) zu etablieren, wurden die in Tabelle 3.9 aufgeführten Säulen eingesetzt. Es wurden verschiedene Vorsäulenderivatisierungen getestet, ebenso wurde der Nachweis der underivatisierten Substanzen überprüft.

Tabelle 3.9: Verwendete HPLC-Säulen

Bezeichnung	Abmessungen	Partikelgröße	Hersteller
NUCLEODUR [®] C18 ec	250 mm x 4,6 mm ID	5 µm	Macherey-Nagel (Düren)
HyperClone [™] ODS (C18)	150 mm x 4,6 mm ID	5 µm	Phenomenex (Torrance, US)
Atlantis dc18	250 mm x 4,6 mm ID	5 µm	Waters (Milford, US)
Synergi [™] Hydro-RP	150 mm x 3,0 mm ID	4 µm	Phenomenex (Torrance, US)
Synergi [™] Polar-RP	150 mm x 3,0 mm ID	4 µm	Phenomenex (Torrance, US)
NUCLEODUR [®] Sphinx RP	250 mm x 4,6 mm ID	5 µm	Macherey-Nagel (Düren)

Die Säulen (bis auf Synergi[™] Hydro-RP und Synergi[™] Polar-RP) waren mit einer C₁₈-Vorsäule (3.0 mm ID x 4 mm) von Phenomenex (Torrance, US) ausgestattet.

Als Software wurde die ChemStation für LC Systeme (Agilent Technologies, Santa Clara, US) verwendet. Bei allen Methoden wurden je 10 µl Probe (Ausnahme: 17 µl nach der Derivatisierung mit OPA/3-MPA) injiziert.

3.2.2.1 Analytik mittels Vorsäulenderivatisierung

Als Reagenzien für die Vorsäulenderivatisierung von DKPs, Dipeptiden und Aminosäuren wurden Dabsyl-Cl, Dansyl-Cl, PITC und FMOC-Cl verwendet. Zum Überprüfen dieser Derivatisierungsmethoden wurden die Modell-DKPs Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) und deren korrespondierende Dipeptide und Aminosäuren jeweils in einer Konzentration von 2 mM in 100 mM Natriumboratspuffer (pH 9,0) als Standard eingesetzt. Die Vorsäulenderivatisierung mit OPA/3-MPA wurde nicht für die Modell-DKPs, sondern nur für die Standards der entsprechenden Dipeptide und Aminosäuren überprüft, da es sich um eine Derivatisierungsmethode für primäre Amine handelt und DKPs keine primäre Aminogruppe enthalten.

Derivatisierung mit Dabsyl-Cl:

Die Derivatisierung mit Dabsyl-Cl erfolgte durch 1:1 Mischung des Standards mit Dabsyl-Cl Lösung und 10-minütiger Inkubation bei 70 °C und 1.000 rpm. Die Reaktion wurde durch Abkühlen der Proben auf Eis gestoppt und die Proben wurden kurz abzentrifugiert (2 min, 21.429 x g). Der Überstand wurde für die Vermessung mittels HPLC verwendet.

Die Säulen HyperClone™ ODS (C18), Atlantis dc18 und NUCLEODUR® Sphinx RP wurden für die Trennung der Dabsyl-Derivate überprüft. Als Laufmittel wurden isokratische MeOH Konzentrationen zwischen 30 und 70 % und entsprechenden Anteilen von Puffer (20 mM NaAc Puffer (pH 4,0) oder 20 mM NaPP Puffer (pH 6,5)) getestet. Ebenfalls wurden die Flussrate (zwischen 0,8 und 1 ml/min) und die Säulentemperatur (zwischen 20 und 30 °C) variiert, um eine optimale Trennung zu erzielen. Die Detektion der Peaks erfolgte bei einer Wellenlänge von 436 nm.

Derivatisierung mit Dansyl-Cl:

Für die Derivatisierung mit Dansyl-Cl wurde der Standard 1:1 mit Dansyl-Cl Lösung gemischt. Die Reaktion erfolgte lichtgeschützt bei 50 °C und 1.000 rpm für 50 min. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis wurden diese für 5 min bei 16.485 x g zentrifugiert und der Überstand für die HPLC-Messung eingesetzt.

Die Vermessung der Proben erfolgte mit der HyperClone™ ODS (C18) Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Säulentemperatur von 30 °C. Es wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus 50 % MeOH und 50 % 100 mM NaAc Puffer (pH 6,4) verwendet.

Derivatisierung mit PITC:

Der Standard wurde 1:1 mit PITC-Lösung gemischt und für 10 min bei 25 °C und 1.000 rpm derivatisiert. Daraufhin wurde die Probe vollständig bei 50 °C und 2.000 rpm mit einem Vakuumkonzentrator eingedampft und in 5 mM NaPP Puffer (pH 7,5) aufgenommen.

Die Vermessung der PITC-Derivate erfolgte analog der Messungen der Dansyl-Derivate.

Derivatisierung mit FMOC-Cl:

Für die Derivatisierung wurde der Standard 1:1 mit FMOC-Cl Lösung gemischt und für 30 min bei 22 °C und 1.000 rpm geschüttelt. Zur Extraktion von Derivatisierungsreagenz und möglichen Nebenprodukten wurde das Gemisch in 900 µl Hexan aufgenommen, gut durchmischt und für 1 min bei 24.725 x g zentrifugiert. Die obere, organische Phase wurde verworfen und die Extraktion wurde mit der unteren Phase einmal wiederholt. Daraufhin erfolgte die Analyse der unteren Phase mittels HPLC.

Als Säulen wurden die NUCLEODUR® C18 ec und HyperClone™ ODS (C18) für die Trennung der FMOC-Derivate getestet. Es wurde zum einen mit isokratischen MeOH Konzentrationen (zwischen 40 und 60 % MeOH) und zum anderen mit einem Laufmittelgradienten (5 % auf 95 % MeOH innerhalb von 60 min) gemischt mit entsprechenden Anteilen von 20 mM AmmoniumPP Puffer (pH 6,5) gearbeitet. Die Säulentemperatur wurde auf 25 °C und die Flussrate auf 1 ml/min eingestellt. Die Detektion der Derivate erfolgte bei einer Absorptionswellenlänge von 254 nm und einer Emissionswellenlänge von 630 nm.

Derivatisierung mit OPA / 3-MPA:

Da die bei der Reaktion mit OPA und 3-MPA entstehenden Produkte sehr instabil sind, wurde die Derivatisierung direkt in der Injektionsnadel an der HPLC-Anlage durchgeführt. Dazu wurden von der Nadel 8 µl 166 mM Natriumboratpuffer (pH 10,4) und 4 µl OPA Lösung aufgezogen und gemischt. Diese Lösung wurde mit 4 µl 3-MPA Lösung vermischt. Durch Aufziehen von 1 µl des Standards und Durchmischung wurde die Derivatisierung gestartet. Nach 7,5 min Reaktionsdauer wurde die derivatisierte Probe injiziert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Injektionsnadel automatisch von außen mit *Aqua demin.* gespült.

Für die Trennung der Derivate wurde die Säule HyperClone™ ODS (C18) unter Einsatz verschiedener MeOH Konzentrationen (20, 25, 30 und 40 %) mit den entsprechenden Anteilen an 20 mM NaPP Puffer (pH 6,5) verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min und die Säulentemperatur 25 °C. Die Detektion erfolgte bei einer Absorptionswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm.

3.2.2.2 Analytik mit underivatisierten Substanzen

Für den Nachweis und die Trennung der underivatisierten Substanzen wurden verschiedene Chromatographiebedingungen untersucht. Für die Etablierung einer geeigneten Methode wurden die Modell-DKPs Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) und die Dipeptide Gly-Gly und Ala-Ala in 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) als Standards verwendet. Es wurden alle in Tabelle 3.9 aufgeführten Säulen bezüglich ihrer Trennungseigenschaften untersucht.

Je nach Säule wurden verschiedene Laufmittelzusammensetzungen eingesetzt. Diese variierten bezüglich der MeOH Konzentration (zwischen 5 und 60 % MeOH), und in der Verwendung verschiedener Puffer (20 mM AmmoniumPP Puffer (pH 6,5), 20 mM NaAc Puffer (pH 4,0; pH 5,0), 10 mM AmmoniumAc Puffer (pH 4,5) und 20 mM NaPP Puffer (pH 5,5; pH 6,5)). Die Flussrate variierte zwischen 0,3 und 1 ml/min und die Säulentemperatur zwischen 15 und 30 °C. Die Detektion erfolgte über die Absorption der Peptidbindung bei einer Wellenlänge von 210 nm.

Nach der Etablierung einer geeigneten Methode für die beiden Modell-DKPs wurde die Trennung der anderen in dieser Arbeit verwendeten DKPs, Dipeptide, aromatischen Aminosäuren, Dihydrouracil und *N*-Carbamoyl- β -Ala untersucht. Dazu wurde jeweils die Trennung der 1 mM Standards in 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) bei 10, 20 und 30 % MeOH bestimmt. Für (S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion und 3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion wurde zusätzlich 45 % MeOH verwendet. Es wurde die NUCLEODUR® Sphinx RP (250 mm x 4,6 mm ID, 5 μ m Partikelgröße) von Macherey-Nagel (Düren) eingesetzt. Als Laufmittelpuffer wurden die genannten MeOH Konzentrationen mit entsprechenden Anteilen 20 mM NaPP Puffer (pH 5,5) verwendet.

Diese entwickelten Methoden wurden validiert (siehe Abschnitt 3.2.3).

3.2.3 Validierung der HPLC-Methoden

Die etablierten Methoden (siehe Abschnitt 3.2.2.2 und Tabelle 3.10) wurden bezüglich Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Präzision, Richtigkeit, Stabilität und Wiederfindungsrate entsprechend den *bioanalytical method validation* Richtlinien der U.S. Food and Drug Administration (FDA 2001) validiert. Für (S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion, 3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion, 1,3-Dimethylpiperazin-2,5-dion, Dihydrouracil und *N*-Carbamoyl- β -Ala wurden nur der lineare Bereich und die Nachweisgrenze bestimmt.

Von den in Tabelle 3.2, Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 (nur Phe und Tyr) aufgeführten DKPs und Dihydrouracil, Dipeptiden und Aminosäuren wurden jeweils Stammlösungen in 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) hergestellt und weiter verdünnt. Es wurden jeweils eine niedrige, eine mittlere und eine hohe Konzentration der Standards eingesetzt. Die niedrige Konzentration entsprach der jeweiligen Bestimmungsgrenze, die hohe Konzentration dem obersten Wert des linearen Bereichs.

Als biologische Matrix wurde ein hitzebehandelter Rohextrakt von *Paenibacillus chibensis* DSM 329 (Tabelle 3.6) verwendet. Dazu wurde dieser Stamm, wie unter Abschnitt 3.3.5 bzw. 3.3.5.2 beschrieben, kultiviert (End-OD₆₀₀ von 2,1), die Zellen geerntet (Abschnitt 3.3.6) und mit einer eingestellten OD₆₀₀ von ca. 17 für 25 min aufgeschlossen (Abschnitt 3.3.8, bzw. 3.3.8.2). Nach Abtrennung der Zelltrümmer (30 min, 4.816 x g, 4 °C) wurde der Rohextrakt bei 90 °C und 1.500 rpm für 20 min hitzebehandelt und die

ausgefallenen Proteine unter den gleichen Bedingungen wie zuvor abzentrifugiert. Vom Rohextrakt wurde die Proteinkonzentration bestimmt (Abschnitt 3.5.1) und dieser daraufhin so verdünnt, dass eine Proteinkonzentration von 0,3 mg/ml vorlag.

Für die Methodvalidierung (außer Bestimmung des linearen Bereichs und der Nachweisgrenze) wurde der hitzebehandelte Rohextrakt 1:1 mit den entsprechenden Standards gemischt. Die HPLC-Messungen fanden unter den etablierten optimalen Separationsbedingungen statt (vgl. Tabelle 3.10).

3.2.3.1 Linearer Bereich

Die Stammlösungen wurden mit 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) verdünnt und die unterschiedlichen Konzentrationen für die Bestimmung des linearen Bereichs eingesetzt. Die Kalibriergeraden wurden basierend auf sieben Konzentrationen im linearen Bereich erstellt. Als Nachweisgrenze wurde jeweils der unterste Wert des linearen Bereichs (Nachweis eines auswertbaren Peaks) bestimmt.

3.2.3.2 Präzision und Richtigkeit

Zur Bestimmung der Intra-Assay Präzision und der Richtigkeit wurden je fünf Replikate von niedriger, mittlerer und hoher Konzentration aufeinanderfolgend vermessen. Die Inter-Assay Präzision wurde unter den gleichen experimentellen Bedingungen an drei verschiedenen Tagen ermittelt. Die Präzision wurde als relative Standardabweichung (*relative standard deviation*; RSD) und die Richtigkeit als relativer Fehler (*relative error*; RE) angegeben (Berechnung siehe Anhang).

Die Akzeptanzgrenzen wurden auf maximal $\pm 20\%$ bei niedriger Konzentration und auf maximal $\pm 15\%$ bei mittlerer und hoher Konzentration festgelegt. Für die Intra-Assay und Inter-Assay Präzision und die Richtigkeit wurden für alle Substanzen jeweils die Mittelwerte von allen drei Konzentrationen berechnet.

Die Bestimmungsgrenze wurde als die Konzentration definiert, die maximal eine Abweichung von $\pm 20\%$ für Präzision und Richtigkeit aufwies.

3.2.3.3 Stabilität

Die Kurzzeitstabilität und die Frier-Tau Stabilität wurden mit frisch angesetzten Proben bei niedriger und hoher Konzentration in Triplikaten bestimmt. Die Stabilität wurde durch den Vergleich der gemessenen Peakflächen bei direkter Injektion der Proben, nach Lagerung für 24 h bei 21 °C und nach drei Frier-Tau Zyklen berechnet. Für die Frier-Tau Stabilität wurden die Proben bei -20 °C für 24 h gefroren, komplett aufgetaut und erneut für 21 h eingefroren. Die Frier-Tau-Zyklen wurden zweimal wiederholt und die Proben nach dem dritten Zyklus vermessen.

3.2.3.4 Wiederfindungsrate

Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die Peakflächen von Rohextraktproben verglichen, die zum einen vor der Hitzebehandlung (90 °C, 1.400 rpm, 10 min) und zum anderen nach der Hitzebehandlung mit den jeweiligen Standards versetzt worden waren. Es wurden jeweils fünf Replikate bei niedriger, mittlerer und hoher Konzentration vermessen.

3.2.4 HPLC-Methoden für die Biotransformationsproben

Zur Quantifizierung der DKPs (und teils der gebildeten Dipeptide und aromatischen Aminosäuren) in den Proben der Biotransformation (siehe Abschnitt 3.6) wurden die in dieser Arbeit zum Nachweis der underivatisierten Substanzen etablierten und validierten HPLC-Methoden verwendet. Die HPLC-Bedingungen sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

Tabelle 3.10: HPLC-Bedingungen für den Nachweis der Substrate (und entsprechenden Produkten) bei der Biotransformation

Substrat	MeOH [%]	Flussrate [ml/min]	Temperatur [°C]	Wellenlänge [nm]
Cyclo(Gly-Gly)	10	0,7	20	210
Cyclo(Ala-Ala)	10	0,7	20	210
Cyclo(Asp-Phe)	20	0,7	20	210
Cyclo(Gly-Phe)	30	0,7	30	210
Cyclo(Asp-Asp)	10	0,3	15	210
Cyclo(Pro-Tyr)	30	0,7	30	210
Cyclo(Arg-Arg)	10	0,7	20	268
Cyclo(Lys-Lys)	10	0,7	20	210
(S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion	45	0,7	30	210
3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion	45	0,7	30	210
1,3-Dimethylpiperazin-2,5-dion	10	0,7	20	210
Dihydrouracil	10	0,7	20	210

Zur Trennung der in Tabelle 3.10 genannten Substrate von den entsprechenden potentiellen Produkten wurde die NUCLEODUR® Sphinx RP Säule (250 mm x 4,6 mm ID, 5 µm Partikelgröße) von Macherey-Nagel (Düren) gekoppelt mit einer C₁₈-Vorsäule (3.0 mm ID x 4 mm) von Phenomenex (Torrance, US) verwendet. Als Laufmittel wurden die in Tabelle 3.10 angegebenen MeOH Konzentrationen gemischt mit entsprechenden Anteilen des 20 mM NaPP Puffers (pH 5,5) eingesetzt. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl. Für die Auswertung wurde die Software ChemStation für LC Systeme (Agilent Technologies, Santa Clara, US) genutzt.

Für die Quantifizierung der Substrat- bzw. Produktkonzentration wurden jeweils Standards in 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) in fünf Konzentrationen mitvermessen, die im linearen Bereich lagen (siehe Tabelle 4.2).

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Stammhaltung

Die kurzfristige Lagerung aller in dieser Arbeit verwendeten Stämme erfolgte bei 4 °C auf Agarplatten des für die jeweiligen Stämme entsprechenden Mediums (siehe Abschnitt 3.1.5). Zur längerfristigen Aufbewahrung und für die Stammsammlung wurden 750 µl einer ÜN-Kultur mit 250 µl 60 %-igem Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Screening mit Schwammproben

3.3.2.1 Probenahme

Für das Screening nach Schwamm-assoziierten Bakterien für die DKP-Hydrolyse wurden die in Tabelle 3.11 aufgeführten Proben verwendet. Die Probenahme und die Klassifikation der Schwämme erfolgten durch Dr.-Ing. Berna Gerçe. (Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich II: Technische Biologie, Karlsruher Institut für Technologie) in Kooperation mit dem Ruđer Bošković Institut (Zagreb, HR). Dazu wurden bei Tauchgängen in Kroatien verschiedene Schwammproben gesammelt. Von diesen wurden ca. 1 cm³ große Stücke in jeweils 15 ml Screening Medium gegeben. Hieraus wurden nach 2,5 Wochen die Proben für die Anreicherungskulturen entnommen.

Tabelle 3.11: Verwendete Schwamm- und Vergleichsproben für das Screening nach DKP-hydrolysierenden Bakterien

Probe-nummer	Datum	Probe	Ort	Habitus
1 und 2	26.05.09	1 ml Meerwasser	Insel Figarola	
3 und 4	26.05.09	Luft		
5 und 6	25.05.09	<i>Dysidea avara</i>	Limski-Kanal	
7 und 8	25.05.09	<i>Aplysina aerophoba</i>	Limski-Kanal	
9 und 10	25.05.09	<i>Ircinia</i> sp.	Limski-Kanal	
11 und 12	26.05.09	<i>Chondrosia reniformis</i>	Insel Figarola	
13 und 14	26.05.09	<i>Chondrilla nucula</i>	Insel Figarola	
15 und 16	25.05.09	<i>Axinella polypoides</i>	Limski-Kanal	
17 und 18	25.05.09	<i>Tethya</i> sp.	Limski-Kanal	
19 und 20	27.05.09	<i>Petrosia ficiformis</i>	Insel San Giovanni	
21	27.05.09	<i>Agelas oroides</i>	Insel San Giovanni	
22	28.05.09	<i>Axinella polypoides</i>	Castello	
23	28.05.09	<i>Geodia</i> sp.	Castello	
24	25.05.09	Keine Probe		

3.3.2.2 Anreicherungskulturen

Für die Anreicherungskulturen wurden je 500 µl des bewachsenen Mediums in 4,5 ml frisches ASW-Screening Medium überimpft und bei 15 °C und 140 rpm für ca. 3 Wochen kultiviert. Daraus wurde die nächste Probe für die Anreicherung entnommen. Dieses Verfahren wurde vier Mal wiederholt, um so Schritt für Schritt die Bestandteile der Schwämme zu eliminieren und Bakterien für den Abbau von Cyclo(Gly-Gly) oder Cyclo(Ala-Ala) anzureichern.

3.3.2.3 Isolierung von Reinkulturen

Alle Proben der Anreicherungskulturen wurden auf festem ASW-Screening Medium mit der 13-Strich-Methode ausplattiert und für 12 Tage bei 15 °C kultiviert. Zur weiteren Vereinzelnung wurden Einzelkolonien gepickt, mit der 13-Strich-Methode auf Komplexmediumplatten ausgestrichen und bei 15 °C kultiviert bis einzelne Kolonien gut sichtbar waren. Dies wurde bis zur Isolierung von Reinkulturen wiederholt. Die Kolonien wurden dabei anhand der Größe, Farbe, Form des Kolonierandes und Beschaffenheit der Oberfläche unterschieden, um somit möglichst viele verschiedene Bakterien zu isolieren. Die Namensgebung erfolgte zunächst aus der Probennummer der Schwammprobe (z. B.: 7), daraufhin aus dem ersten Vereinzelnungsschritt (z. B.: 7A), danach aus dem nächsten Vereinzelnungsschritt (z. B.: 7A-1), und zuletzt aus der maximal durchgeführten dritten Vereinzelnung (z. B.: 7A-1.1).

3.3.2.4 Wachstumsüberprüfung mit und ohne N-Quelle

Zur ersten Überprüfung auf DKP-hydrolysierende Bakterien wurden alle isolierten Reinkulturen zum einen auf Mineralsalzmediumplatten mit Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) als einziger N-Quelle ausplattiert, zum anderen auf Mineralsalzmediumplatten ohne DKPs. Nach 20 Tagen Kultivierung bei 15 °C wurde das Wachstum auf beiden Medien miteinander verglichen.

3.3.3 Isolierung von *Paenibacillus* sp. und *Microbacterium* sp.

In dieser Arbeit wurden zwei neue Stämme aus Versuchsansätzen mit den Stämmen DSM 329 und DSM 40062 für die DKP-Hydrolyse isoliert. Je 20 µl aus zwei Biotransformationsproben, bestehend aus 5 mM Cyclo(Ala-Ala) in 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) und Rohextrakt von DSM 329 bzw. DSM 40062 (Tabelle 3.6), nach 9-tägiger Inkubation bei 30 °C und 1.400 rpm wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert. Diese wurden für 6 d bei 30 °C inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden zwei isoliert und bei einer Biotransformation mit Cyclo(Ala-Ala) auf ihre Aktivität überprüft.

3.3.4 Vorkulturen

Die Vorkulturen wurden in Kultivierungsröhrchen mit 5 ml des Mediums angesetzt, welches später für die Hauptkultivierung verwendet wurde. Das Animpfen des Mediums erfolgte mit je einer Einzelkolonie von Agarplatten oder aus Glycerinkulturen. Die Vorkulturen wurden über Nacht (teils auch bis zu 2 Tage) bei 30 °C (bzw. 15 °C für Bakterien aus dem Screening) und bei 140 rpm inkubiert.

3.3.5 Kultivierung

Für alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme galten folgende allgemeine Kultivierungsbedingungen. Das entsprechende Medium wurde mit einer Vorkultur so angeimpft, dass die Kultur eine Anfangs-OD₆₀₀ von 0,05 aufwies. Die Kultivierungen erfolgten bei 30 °C und die Schüttelgeschwindigkeit betrug je nach Kolbengröße zwischen 100 und 140 rpm. Nach 24 h wurden die Kultivierungen beendet, die OD₆₀₀ bestimmt und die Zellen geerntet.

Auf Abweichungen und Besonderheiten für die einzelnen Stämme wird im Folgenden genauer eingegangen.

3.3.5.1 Stämme aus Screening mit Schwammproben

Die Stämme, die während des Screenings mit Schwammproben isoliert worden waren (Tabelle 4.6), wurden für deren Aktivitätsüberprüfung mittels Biotransformation in 10 oder 100 ml Komplexmedium kultiviert. Abweichend von den oben genannten allgemeinen Bedingungen erfolgte die Kultivierung bei 15 °C, da es sich um Isolate aus Meerwasser mit einer jährlichen Durchschnittstemperatur von 11 °C (Lombardi et al. 2006) handelte.

3.3.5.2 DSM 329 und DSM 40062

Die Stämme DSM 329 und DSM 40062 (Tabelle 3.6) wurden in 10, 50 oder 100 ml Patentmedium (mit DKP-Induktionslösung I für DSM 40062 und ohne Induktionslösung für DSM 329) entsprechend der oben beschriebenen Bedingungen kultiviert. DSM 40062 bildet während des Wachstums Pellets, weshalb es für diesen Stamm nicht möglich war, die OD₆₀₀ zu bestimmen. Es wurden jeweils die gleichen Volumina für beide Stämme zum Animpfen, Waschen und Resuspendieren verwendet.

Induktion der Enzymaktivität:

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit der Enzymaktivität wurden die Stämme DSM 329 und DSM 40062 in Patentmedium mit DKP-Induktionslösung II und zum Vergleich in Patentmedium mit *Aqua demin.* kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Hydrolyse von 10 mM Cyclo(Asp-Phe) im Ganzzellsystem.

Zur Überprüfung ob die Induktion der Aktivität für DSM 40062 konzentrationsabhängig ist, erfolgten vier verschiedene Kultivierungen mit 0, 0,25, 0,5 und 1 mg/ml Cyclo(Asp-Phe) im Patentmedium (Zugabe von steril filtrierten Lösungen zum autoklavierten Medium).

Anschließend wurde die Aktivität gegenüber 10 mM Cyclo(Asp-Phe) während der Biotransformation mit Rohextrakt aus den verschiedenen Kultivierungen verglichen. Die Biotransformationen wurden jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.3.5.3 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität

Um die Aktivität gegenüber DKPs für die in Tabelle 3.7 und Tabelle 3.8 aufgeführten Stämme nachzuweisen, erfolgten vier Versuchsdurchgänge. Im ersten Durchgang wurden alle 35 Stämme verwendet, in den darauffolgenden Versuchen wurden nur noch die jeweils potentiell DKP-hydrolysierenden Stämme eingesetzt. Die Kultivierungen erfolgten in 10 ml (erster Durchgang), 50 ml (zweiter und dritter Durchgang) oder in 100 ml (vierter Durchgang) LB-Medium. Beim ersten Durchgang wurde für die Stämme *Ochrobactrum* sp. C15 bis *Rhizobium* sp. NA04-01 (vgl. Tabelle 3.7) 5 mM Cyclo(Gly-Gly) zum Medium hinzugegeben. In den folgenden Versuchen wurde darauf verzichtet, da für keinen der Stämme Aktivität gegenüber Cyclo(Gly-Gly) nachgewiesen werden konnte.

Die beiden rekombinanten *E. coli* Stämme besitzen aufgrund des jeweiligen Plasmids (Tabelle 3.8) eine Ampicillin-Resistenz, daher wurde bei deren Kultivierung Ampicillin (0,1 g/l Endkonzentration) zum Medium hinzugegeben. Bei einer OD_{600} von ca. 0,5 wurde 0,2 % Rhamnose (aus 20 %iger Stammlösung) zum Medium aller drei Stämme (rekombinante Stämme und Wildtypstamm), zur Induktion der rekombinanten Gene bzw. beim Wildtypstamm zum Vergleich, hinzugegeben.

3.3.5.4 Eigenisolate *Paenibacillus* sp. und *Microbacterium* sp.

Die in dieser Arbeit isolierten Stämme *Paenibacillus* sp. und *Microbacterium* sp. wurden in 10 oder 50 ml LB-Medium mit 5 mM Cyclo(Ala-Ala) kultiviert.

3.3.6 Zellernte

Die Zellernte erfolgte für alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme wie nachfolgend beschrieben. Zunächst wurde der komplette Kultivierungsansatz in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und die Zellen bei 4.816 x g für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet wurde dreimal mit 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) gewaschen. Dazu wurde das Pellet in so viel Puffer aufgenommen bis es komplett resuspendiert war und erneut für 30 min und bei 4 °C 4.816 x g zentrifugiert. Beim dritten Waschschrift wurde das Pellet in soviel NaPP Puffer aufgenommen, dass eine definierte OD_{600} (zwischen 5 und 20, je nach Zellmenge während der Kultivierung und weiterer Verwendung) erhalten wurde.

3.3.7 Bestimmung der Biotrockenmasse

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße bei 60 °C für 24 h im Trockenschrank getrocknet. Nach kurzem Abkühlen wurde das Leergewicht bestimmt. Die Reaktionsgefäße wurden mit 1 ml der Zelllösung, die für die Biotransformation eingesetzt wurde, befüllt und bei 24.725 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Zellpellet bei 60 °C getrocknet und nach 24 h das Gesamtgewicht ermittelt. Die Differenz aus Gesamt- und Leergewicht entspricht der Biotrockenmasse. Die BTM wurde jeweils dreifach bestimmt.

3.3.8 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Die Zellen wurden mit einer Amplitude zwischen 20 und 50 % für 8,5 bis 15 min (genaue Bedingungen siehe folgende Abschnitte) in an/aus Rhythmen zu jeweils 30 s aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurde für 30 min bei 4 °C und 4.816 x g zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die löslichen Proteine befanden, wurde für die Biotransformation mit Rohextrakt verwendet.

3.3.8.1 Stämme aus Screening mit Schwammproben

Die Stämme 8D-2.2, 15B, 22C und 23A aus dem Screening mit Schwammproben (OD_{600} von 10) wurden mit einer Amplitude von 20 % für 8,5 min aufgeschlossen.

3.3.8.2 DSM 329 und DSM 40062

Für DSM 329 (OD_{600} von 5) und DSM 40062 (OD_{600} nicht bestimmbar, vgl. Abschnitt 3.3.5.2) erfolgte der Zellaufschluss mit einer Amplitude von 35 % für 8,5 min. Für die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (siehe Abschnitt 3.5.2.1) wurde DSM 329 17 min und DSM 40062 14 min aufgeschlossen.

3.3.8.3 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität

Für den dritten und vierten Versuchsdurchgang wurde eine OD_{600} von 10 für den Zellaufschluss eingestellt. Beim dritten Durchgang wurden die Stämme mit einer Amplitude von 30 % für 8,5 min und beim vierten Durchgang mit 35 % für 10,5 min aufgeschlossen.

3.3.8.4 Eigenisolate *Paenibacillus* sp. und *Microbacterium* sp.

Paenibacillus sp. (OD_{600} von 5) wurde für 10,5 min mit einer Amplitude von 35 % aufgeschlossen. Hingegen ließ sich *Microbacterium* sp. schlecht aufschließen und es wurde ein verändertes Aufschlussverfahren durchgeführt. Der Zellaufschluss (OD_{600} von 10) erfolgte mit eine Amplitude von 50 % für 15 min in an/aus Rhythmen zu jeweils 1 s.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolierung genomischer DNA

Es wurden 2 ml einer ÜN-Kultur bei 24.725 x g für 15 min zentrifugiert und mit Hilfe des FastDNA™ SPIN Kit for Soil von MP (Santa Ana, US) wurde entsprechend der Herstellerangaben die genomische DNA isoliert. Diese wurde zur Amplifikation eines 16S rDNA Abschnitts mittels PCR (*Polymerase chain reaction*; Polymerase-Kettenreaktion) 1:10 mit *DNA-free water* (Molzym, Bremen) verdünnt.

3.4.2 PCR für 16S rDNA Sequenzierung

Zur Amplifikation der 16S rDNA wurde die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

PCR-Ansatz: (50 µl)

10x PCR-Puffer	5 µl	(Qiagen (Hilden))
10 mM dNTP-Mix	1 µl	(GE Healthcare Chalfont St. Giles, UK)
0,1 mM fw-Primer (27f)	2 µl	(Sequenz: 5'-aga gtt tga tc(ac) tgg ctc ag-3')
0,1 mM rv-Primer (1385r)	2 µl	(Sequenz: 5'-cgg tgt gt(ag) caa ggc cc-3')
genomische DNA	10 µl	
DNA-Polymerase	0,25 µl	(HotStarTaq™ 5 U/µl von Qiagen (Hilden))
Wasser	ad 50 µl	(<i>DNA-free water</i> von Molzym (Bremen))

PCR-Programm:

	Temperatur	Dauer	
1. Denaturierung	95 °C	15 min	
2. Denaturierung	94 °C	60 s	} 30 Zyklen
Annealing	55 °C	60 s	
Elongation	72 °C	90 s	
<u>Endelongation</u>	<u>72 °C</u>	<u>10 min</u>	

3.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden die Resultate der PCR überprüft. Dazu wurde 1 % (w/v) Agarose unter Erhitzen in 1x TAE-Puffer gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde die Agarose-Lösung mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,1 µg/ml) versetzt und in einen Gelschlitten mit Probetaschenkamm gegossen. Sobald das Gel erstarrt war, wurde dieses in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Je 5 µl Probe wurden mit 1 µl 6x Gelladepuffer (Roti®-Load DNA, Carl Roth, Karlsruhe) versetzt und in die Taschen des vorbereiteten Gels aufgetragen. Als Marker wurde die Quick-Load® 1 kb DNA Ladder von New England Biolabs (Ipswich, US) verwendet. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 100 V angelegt.

3.4.4 16S rDNA Sequenzierung

Sequenzierungen von 16S rDNA-Abschnitten erfolgten bei der Firma GATC Biotech (Konstanz) mit dem 27F fw-Primer (Abschnitt 3.4.2). Sequenzvergleiche (Sequenzalignment) wurden im Internet unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> durchgeführt. Es wurden die *nucleotide collection (nr/nt)* als Datenbank und der *megablast* Algorithmus ausgewählt. *Uncultured/environmental sample sequences* wurden ausgeschlossen. Für die Algorithmusparameter wurden die Standardeinstellungen verwendet.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt wurde der Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, US) verwendet. Die Messungen wurden abhängig von der Anzahl der Proben in Küvetten oder MTPs durchgeführt.

Für die Bestimmung in Küvetten wurde die Bradford-Lösung 1:5 mit *Aqua demin.* verdünnt. Davon wurden 1.000 µl mit 20 µl Probe gemischt und die Proben wurden 5 min bei 21 °C und 1.000 rpm im Thermoschüttler inkubiert.

Für Messungen in MTPs wurden 200 µl einer 1:7 verdünnten Bradford-Lösung mit 10 µl Probe in eine MTP pipettiert und auf dem Mikrotiterplattenschüttler mit 500 rpm für 5 min bei 21 °C gemischt.

Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurden bei jeder Messung fünf BSA-Standards in Konzentrationen von 0 bis 800 µg/ml vermessen.

Die Proteinkonzentration wurde jeweils dreifach bestimmt.

3.5.2 Proteinanreicherung

Für die Proteinanreicherung wurden die Stämme DSM 329 und DSM 40062 (Tabelle 3.6) entsprechend Abschnitt 3.3.5.2 kultiviert, wie unter Abschnitt 3.3.6 beschrieben, geerntet und die Zellen aufgeschlossen (Abschnitt 3.3.8.2). Der jeweilige Rohextrakt wurde für die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (Abschnitt 3.5.2.1) sowie die Ionenaustauschchromatographie (Abschnitt 3.5.2.2) eingesetzt.

3.5.2.1 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Die fraktionierte Fällung erfolgte bei 20, 40, 60 und 80 % Ammoniumsulfatsättigung. Für die vier Fällungsschritte wurde je eine definierte Menge Ammoniumsulfat (entsprechend Pingoud, Urbanke 1997) zum Rohextrakt hinzugegeben, um die gewünschte Sättigung zu erreichen.

Ein Becherglas mit dem jeweiligen Rohextrakt wurde auf einem Magnetrührer in einer Schale mit Eis so positioniert, dass eine permanente Durchmischung und Kühlung des Rohextrakts gewährleistet war. Durch sehr langsame Zugabe von gemörsertem kristallinen Ammoniumsulfat zum Rohextrakt wurden die Proteine ausgefällt. Anschließend wurde weitere 20 min kontinuierlich gerührt und die Probe daraufhin bei 4.816 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und teils für den nächsten Fällungsschritt eingesetzt. Das Pellet wurde in ¼ des für die Fällung eingesetzten Volumens in 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) aufgenommen.

Die Bedingungen für die vier Fällungsschritte sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst.

Tabelle 3.12: Bedingungen für die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Fällungsschritt (Ammoniumsulfat-sättigung)	Rohextrakt- volumen [ml]	Ammonium- sulfat [g]	Zentrifugations- zeit [min]	Pellet- resuspension [ml]
0 zu 20 %	19	2,014	30	4,75
20 zu 40 %	15	1,695	30	3,75
40 zu 60 %	11	1,320	35	2,75
60 zu 80 %	7	0,903	40	1,75

Von den jeweiligen Überständen und resuspendierten Pellets wurde die Proteinkonzentration (Abschnitt 3.5.1) und mittels Biotransformation (Doppelbestimmung) (Abschnitt 3.6.3) die Aktivität gegenüber Cyclo(Asp-Phe) bestimmt.

3.5.2.2 Ionenaustauschchromatographie

Als Vorversuch für die Proteinanreicherung mittels Ionenaustauschchromatographie wurde die Aktivität der Rohextrakte in Anwesenheit von 1 M KCl bestimmt. Dafür wurde das Zellpellet nach der Kultivierung (Abschnitt 3.3.5.2) zum einen in 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) und zum anderen im Elutionspuffer der Ionenaustauschchromatographie (50 mM NaPP Puffer mit 1 M KCl (pH 7,5)) aufgenommen und aufgeschlossen (siehe Abschnitt 3.3.8.2). Die Aktivität gegenüber Cyclo(Asp-Phe) wurde jeweils für die Rohextrakte in den Puffern mit und ohne KCl verglichen.

Die Ionenaustauschchromatographie der DKP-hydrolysierenden Enzyme aus DSM 329 und DSM 40062 wurde mittels FPLC und Verwendung eines starken Anionenaustauschers (HiTrap™ Q-Sepharose Fast Flow, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) bei 4 °C durchgeführt. Die Säule wurde vor der Aufreinigung mit 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) äquilibriert und anschließend mit 3,5 ml Rohextrakt beladen. Die nichtgebundenen Proteine wurden mit 8 ml 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) von der Säule gewaschen und in den Durchflussfraktionen gesammelt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit Hilfe eines linearen Gradienten von 0 bis 1 M KCl über 20 ml (50 mM/ml).

Von ausgewählten Fraktionen (DSM 329: F2, F7, F8, F9, F10 + F11 (1/1); DSM 40062: F2 + F3 (1/1), F6 + F7 (1/1), F8, F9, F10) wurden die Proteinkonzentrationen (Abschnitt 3.5.1)

und die Aktivität gegenüber Cyclo(Asp-Phe) mittels Biotransformation (Abschnitt 3.6.3) bestimmt.

3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) diente der Reinheitsüberprüfung nach der Proteinanreicherung mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und Ionenaustauschchromatographie.

Zusammensetzung der Gele:

<u>Trenngel (1Gel):</u>	<u>12,5 %</u>	<u>Sammelgel (1 Gel):</u>	<u>5 %</u>
Lower Tris-HCl (pH 8,8)	1,20 ml	Upper Tris-HCl (pH 6,8)	0,40 ml
10 % SDS-Lösung	60 µl	10 % SDS-Lösung	20 µl
Acrylamid-Lösung	2,50 ml	Acrylamid-Lösung	0,33 ml
<i>Aqua demin.</i>	2,24 ml	<i>Aqua demin.</i>	1,25 ml
10 % APS-Lösung	30 µl	10 % APS-Lösung	10 µl
TEMED	5 µl	TEMED	2 µl

Die Proben wurden 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben 5 min bei 95 °C und 1.000 rpm im Thermoschüttler inkubiert und anschließend zentrifugiert (21.429 x g, 2 min, 4 °C). Es wurden jeweils 20 µl des Überstandes bzw. 7 µl des Proteinmarkers PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Molekulargewicht von 10-200 kDa) von Fermentas (Burlington, CA) in die Taschen des vorbereiteten SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1 x TGS-Puffer verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V solange bis die Bromphenolblau-Front am unteren Ende des Gels angelangt war. Nach dreimaligem Waschen der SDS-Gele mit *Aqua demin.* wurden diese mit der Imperial™ Protein Stain Solution von Thermo Fisher Scientific (Waltham, US) für 2,5 h auf einem Wippschüttler angefärbt und daraufhin mit *Aqua demin.* entfärbt.

3.6 Biotransformation

Für die Biotransformationen wurden Enzyme, ganze Zellen oder Rohextrakte als Biokatalysatoren eingesetzt. Als Substrate wurden die in Tabelle 3.2 aufgeführten DKPs und Dihydrouracil (Positivkontrolle für Stämme mit cyclische Amidase Aktivität) verwendet. Sofern nicht anders aufgeführt, erfolgten alle Biotransformationen und die Probenahme während den Biotransformationen wie nachfolgend beschrieben. Auf Besonderheiten in Abhängigkeit vom eingesetzten Biokatalysator wird in den Abschnitten 3.6.1 bis 3.6.2 eingegangen.

Die Substrate wurden bis auf 3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion, welches aufgrund der schlechten Löslichkeit in einer Konzentration von 1 mM verwendet wurde, in einer

Konzentration von 5 mM eingesetzt. Die Biotransformationen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 30 °C und 1.400 rpm im Thermoschüttler oder bei Versuchen mit sehr vielen Proben im Überkopfschüttler bei Stufe 3 und ebenfalls 30 °C durchgeführt. Das Ansatzvolumen variierte je nach Versuch zwischen 0,5 und 1,5 ml.

Zu jeder Biotransformation wurde eine Negativkontrolle für jedes Substrat angesetzt, wobei anstelle des Biokatalysators 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) verwendet wurde. Des Weiteren wurde für die spätere Auswertung mittels HPLC je ein Ansatz mit Enzymlösung, Zellsuspension oder Rohextrakt hergestellt, jedoch mit NaPP Puffer anstatt Substrat. Dieser Ansatz diente zum Vergleich der Chromatogramme, um auszuschließen, dass es zu Überlagerungen von Peaks des Biokatalysators mit Substratpeaks kam. In den meisten Fällen wurden die Chromatogramme zur Auswertung voneinander abgezogen (Chromatogramm von Biokatalysator mit Substrat – Chromatogramm von Biokatalysator mit Puffer).

Biotransformation im Ganzzellsystem:

Die Zellen wurden, wie unter Abschnitt 3.3.5 und 3.3.6 beschrieben, kultiviert und geerntet. Die Zellsuspension in 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) mit einer definierten OD_{600} wurde mit den verschiedenen Substratlösungen in dem gleichen Puffer so gemischt, dass die gewünschte Substratkonzentration und OD_{600} (meist 10) vorlag.

Für die Berechnung der Aktivität je BTM wurde die jeweilige BTM der eingesetzten Zellsuspension bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.7).

Biotransformation mit Rohextrakt:

Die Stämme wurden, wie unter Abschnitt 3.3.8 beschrieben, aufgeschlossen und die Proteinkonzentration im Rohextrakt bestimmt (Abschnitt 3.5.1). Der Ansatz erfolgte analog zum Ganzzellbiotransformationsansatz.

Die im Rohextrakt gemessene Aktivität wurde auf die jeweilige Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 3.5.1) bezogen.

Probenahme während der Biotransformation:

Nach dem Ansetzen der Biotransformationen wurde zur Kontrolle der eingesetzten Substratkonzentration zum Zeitpunkt 0 h die erste Probe genommen. Nach bestimmten Zeiten wurden für die Überprüfung der Hydrolyseaktivität weitere Proben genommen. Dazu wurde ein definiertes Volumen (zwischen 60 und 250 µl) aus den Reaktionsansätzen entnommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert.

Wurde mit Rohextrakt gearbeitet, erfolgte zunächst eine Inaktivierung der Enzyme bei 90 °C und 1.000 rpm für 10 min mit anschließendem Abkühlen der Proben auf Eis. Durch Zentrifugation (24.725 x g, 4 °C, 20 min) wurden bei den Proben der Ganzzellbiotransformation die Zellen, bei der Biotransformation mit Rohextrakt die

ausgefällten Proteine abgetrennt. Es wurde ein definiertes Volumen (zwischen 45 und 200 μl) des Überstands abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, in welches eine dem Probevolumen entsprechende Menge des 50 mM NaPP Puffers (pH 7,5) vorgelegt worden war. Dadurch wurden alle Proben für die Vermessung mittels HPLC 1:2 verdünnt. Die Proben wurden entweder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Vermessung gelagert oder direkt mit den in dieser Arbeit etablierten Methoden (siehe Abschnitt 3.2.4) analysiert.

Je nach verwendetem Biokatalysator unterschieden sich die Biotransformationen teilweise von der allgemein beschriebenen Durchführung. Auf Abweichungen und Besonderheiten wird im Folgenden eingegangen.

3.6.1 Peptidasen

Die in Tabelle 3.5 aufgeführten Peptidasen wurden für die Biotransformation mit verschiedenen DKPs verwendet. Anstelle von ganzen Zellen oder Rohextrakt wurden hierfür aufgereinigte, teils immobilisierte Enzyme (in 50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) genutzt. Die Biotransformationen wurden unter den in Tabelle 3.13 zusammengefassten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 3.13: Biotransformationsbedingungen für verschiedene Peptidasen

Bedingungen	Ficin / Bromelain / Chymotrypsin	Trypsin	Pepsin	Papain	Immobilisierte Peptidasen
Enzymkonzentration [mg/ml]	20	5	5	5	10 (Immobilisat)
Reaktionsbedingungen	40 $^{\circ}\text{C}$, 1.000 rpm	37 $^{\circ}\text{C}$, 1.000 rpm	30 $^{\circ}\text{C}$, 1.400 rpm	30 $^{\circ}\text{C}$, 1.000 rpm	25 $^{\circ}\text{C}$, Stufe 3
Zeitproben [h]	0, 2, 19, 24	0, 24, 48, 170	0, 2, 24, 48, 170	0, 2, 24, 48, 148	0, 19, 43, 67
Enzymhitzeinaktivierung	99 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 1.000 rpm	90 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 1.000 rpm	90 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 1.000 rpm	90 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 1.000 rpm	-

Pepsin hat sein pH-Optimum im sauren Bereich (Piper, Fenton 1965), deswegen wurde dieses Enzym in 50 mM NaAc Puffer (pH 3,1) aufgenommen. Da die Substrate in 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) gelöst worden waren, wurde durch Zugabe von 99 % Essigsäure der pH-Wert im Ansatz auf 2,4 eingestellt. Für die Vermessung der Proben mittels HPLC wurde der pH-Wert mit einem 3:2 Gemisch aus 50 mM NaPP Puffer (pH 7,5) und 10 M NaOH auf pH 6,0 eingestellt.

p-Nitrophenylacetat (pNPA) Assay:

Zur Überprüfung der Aktivität der 20 Enzyme des Immozyme™ Protease Kits von Chiral Vision (Leiden, NL) wurde der vom Hersteller empfohlene p-NPA Assay durchgeführt. Dazu wurden je 19 mg der immobilisierten Peptidasen in 1881 μl 50 mM NaPP (pH 7,5) aufgenommen und durchmischt. Zum Start der Reaktion wurden je 19 μl 20 mg/ml pNPA in 96 % Ethanol dazugegeben und bei 25 $^{\circ}\text{C}$ und 1.000 rpm inkubiert. Als Negativkontrolle

diente eine Probe mit NaPP Puffer und pNPA. Nach einer einstündigen Reaktion wurden die immobilisierten Enzyme durch Zentrifugation bei 23.077 x g für 10 min abgetrennt. Vom Überstand wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 400 nm bestimmt.

3.6.2 Stämme aus Screening mit Schwammproben

Für die Stämme, die während des Screenings mit Schwammproben isoliert worden waren, erfolgte die Biotransformation bei 15 °C. Als Substrate wurden die beim Screening verwendeten Modell-DKPs Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) eingesetzt. Während der Probenahme wurde, abweichend vom im allgemeinen Teil beschriebenen Verfahren, der Überstand unverdünnt für die HPLC-Analytik untersucht.

3.6.3 DSM 329 und DSM 40062

Die Biotransformationen mit DSM 329 und DSM 40062 wurden, wie im allgemeinen Teil beschrieben, durchgeführt.

Cyclo(Asp-Phe) diente als Testsubstrat für die Versuche zur Enzymcharakterisierung und Proteinanreicherung. Für die Versuche zur Überprüfung der Induktion der Aktivität, der Enzyminhibierung, der Aktivität in Anwesenheit von 1 M KCl und der Aktivitätsbestimmung der bei der Ionenaustauschchromatographie erhaltenen Fraktionen wurde Cyclo(Asp-Phe) in einer Konzentration von 10 mM anstatt 5 mM eingesetzt.

Enzyminhibierung durch Peptidaseinhibitoren

Zur Bestimmung der möglichen Inhibierung der Enzymaktivität gegenüber DKPs bei der Biotransformation mit DSM 329 und DSM 40062 wurden die in Tabelle 3.14 aufgeführten Peptidaseinhibitoren eingesetzt.

Tabelle 3.14: Verwendete Peptidaseinhibitoren

Inhibitor	Inhibition von	Stammlösung	Lösungsmittel	eingesetzte Konzentration
EDTA	Metallopeptidasen	250 mM	50 mM NaPP Puffer (pH 7,5)	10 mM
E-64	Cysteinpeptidasen	1 mM	50 mM NaPP Puffer (pH 7,5)	10 µM
Pepstatin	Aspartatpeptidasen	1 mM	Methanol	10 µM
PMSF	Serinpeptidasen	100 mM	Methanol	1 mM

Dazu wurden die Inhibitoren in den in Tabelle 3.14 aufgeführten Konzentrationen (entsprechend Sciencegateway Protease inhibitors) mit dem Rohextrakt jeweils eines Stammes gemischt und die Biotransformation (Doppelbestimmung) ohne Vorinkubation durch Zugabe von Cyclo(Asp-Phe) gestartet. Da die Inhibitoren Pepstatin und PMSF in Methanol gelöst worden waren, wurde ein Kontrollansatz mit Methanol in der entsprechenden Konzentration (1 %) mitgeführt, um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Enzymaktivität auszuschließen.

3.6.4 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität

Es wurden vier Biotransformationsdurchgänge mit Stämmen mit cyclische Amidase Aktivität durchgeführt. Die Durchgänge unterschieden sich in folgenden Bedingungen voneinander. Der erste Durchgang fand mit allen in Tabelle 3.7 und Tabelle 3.8 aufgeführten Stämmen und allen unter Tabelle 3.2 genannten Substraten mittels Ganzzellbiotransformation und einer Einfachbestimmung statt. Die Substrate Cyclo(Gly-Gly), Cyclo(Ala-Ala), (S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion, 1,3-Dimethylpiperazin-2,5-dion und Dihydrouracil wurden jeweils in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. In den drei folgenden Versuchsdurchgängen wurde für je ausgesuchte Stämme die Hydrolyse von gewählten Substraten mittels Dreifachbestimmung untersucht. Beim dritten und vierten Durchgang wurde neben der Ganzzellbiotransformation auch die Biotransformation mit Rohextrakt durchgeführt.

3.6.5 Eigenisolate *Paenibacillus* sp. und *Microbacterium* sp.

Für die zwei in dieser Arbeit isolierten Stämme *Paenibacillus* sp. und *Microbacterium* sp. wurde die Hydrolyse des Racemats Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) und des Enantiomers Cyclo(L-Ala-L-Ala) untersucht; darüber hinaus wurde die Aktivität gegenüber Dihydrouracil überprüft. Das Enantiomer wurde mit 2,5 mM in einer halb so hohen Konzentration im Vergleich zum Racemat eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Analytik

Um die Substrate und potentiellen Produkte der in dieser Arbeit untersuchten Reaktion vom DKP zum korrespondierenden Dipeptid und den entsprechenden Aminosäuren nachweisen zu können, wurden photometrische (Ninhydrin-Assay) und chromatographische Messungen (HPLC) eingesetzt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

4.1.1 Ninhydrin-Assay

Der Ninhydrin-Assay sollte dem schnellen Nachweis der Hydrolysereaktion von DKPs dienen. Dazu wurde die Derivatisierbarkeit der Modell-DKPs Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) und der entsprechenden Dipeptide Gly-Gly und Ala-Ala und Aminosäuren Gly und Ala untersucht. Ninhydrin reagierte erwartungsgemäß mit den Dipeptiden und Aminosäuren, nicht jedoch mit den beiden DKPs. Somit war es nicht möglich, die DKPs mittels Ninhydrin-Assay nachzuweisen. Zum Nachweis eventuell gebildeter Dipeptide und Aminosäuren während der Biotransformation war der Ninhydrin-Assay nicht geeignet, da die Hintergrundreaktion mit Aminosäuren und kurzen Peptiden des Rohextrakts zu hoch war.

4.1.2 Entwicklung einer HPLC-Analytik

Um die Reaktion vom DKP zum Dipeptid und anschließend zur Aminosäure zu quantifizieren, wurde eine Nachweismethode mittels HPLC entwickelt. Zum einen wurde der Nachweis der Substrate und potentiellen Produkte mittels Derivatisierung untersucht. Zum anderen wurden Methoden zur Trennung der underivatisierten Substanzen entwickelt und diese basierend auf den *bioanalytical method validation* Richtlinien der FDA (FDA 2001) validiert.

4.1.2.1 Analytik mittels Vorsäulenderivatisierung

Es sollten die beiden Modell-DKPs Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala), die korrespondierenden Dipeptide Gly-Gly und Ala-Ala und die Aminosäuren Gly und Ala derivatisiert und die entstandenen Derivate mittels HPLC voneinander getrennt werden, um DKP, Dipeptid und Aminosäure zusammen nachzuweisen. Dazu wurden die Derivatisierungen mit Dabsyl-Cl, Dansyl-Cl, PITC und FMOC-Cl getestet. Darüber hinaus wurde die Derivatisierung mittels OPA/3-MPA für die genannten Dipeptide und Aminosäuren verwendet. Diese Methode wurde nicht für die beiden Modell-DKPs eingesetzt, da die Methode nur für die Derivatisierung von primären Aminen anwendbar ist.

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 4.1 bis Abbildung 4.3) sind beispielhaft einige Chromatogramme, die die besten Ergebnisse bezüglich Derivatisierung und Trennung lieferten, dargestellt.

Derivatisierung mit Dabsyl-Cl:

Die besten HPLC Ergebnisse nach der Derivatisierung mit Dabsyl-Cl sind in Abbildung 4.1 gezeigt.

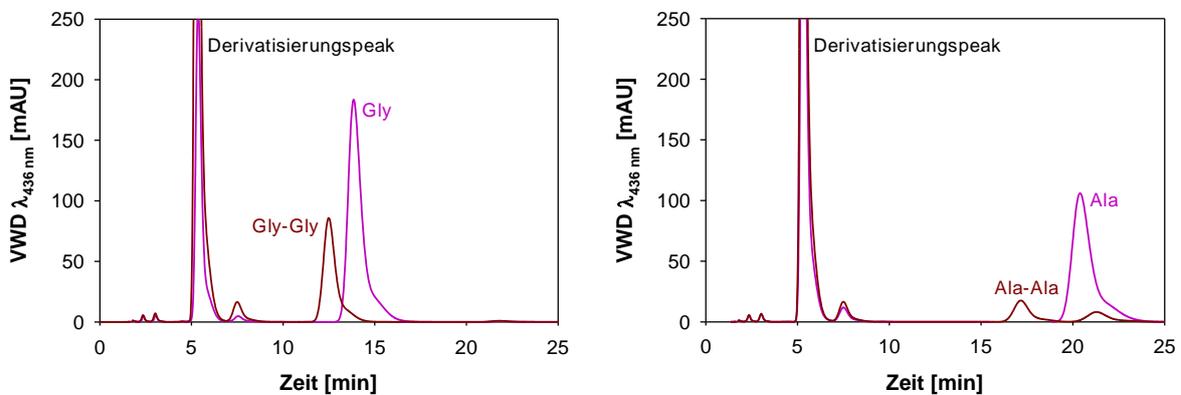


Abbildung 4.1: HPLC Chromatogramme nach Derivatisierung mit Dabsyl-Cl von Gly-Gly und Gly (links) und Ala-Ala und Ala (rechts)

Säule: HyperClone™ ODS (C18), Laufmittel: 50 % MeOH / 50 % 20 mM NaAc Puffer (pH 4,0), Flussrate: 1 ml/min, Säulentemperatur: 25 °C

Für die DKPs Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) konnten keine Derivatisierungsprodukte nachgewiesen werden. Die Trennung von Gly-Gly und Gly erfolgte unter den gezeigten Bedingungen in einer kurzen Analysenzeit mit einer Auflösung R von 1,02 (Abbildung 4.1, links). Für Ala-Ala und Ala wurde eine weniger gute Trennung erzielt (Abbildung 4.1, rechts). Bei den angeführten Bedingungen erhielt man zwei Peaks für die Dabsyl-Derivate von Ala-Ala, von denen einer sich mit dem Ala-Peak überlagerte. Bei den zwei Peaks handelt es sich vermutlich um das Enantiomerenpaar L-Ala-L-Ala und D-Ala-D-Ala, welches sich diastereomer zu der *meso*-Form L-Ala-D-Ala verhält (entsprechend Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) gezeigt in Abbildung 1.11). Die Diastereomere können mit einer nicht chiralen Säule getrennt werden und somit können zwei Peaks nachgewiesen werden. Mit keiner der getesteten Bedingungen konnte eine zufriedenstellende Analytik für die Trennung von Ala-Ala und Ala etabliert werden, entweder es erfolgte keine ausreichende Trennung der Peaks oder die Substanzen wiesen Retentionszeiten von über 70 min auf.

Derivatisierung mit Dansyl-Cl:

Bei der Derivatisierung mit Dansyl-Cl erfolgte ebenfalls keine Derivatisierung der Modell-DKPs. Die Derivatisierung der Dipeptide und Aminosäuren war zwar erfolgreich, aber unter den getesteten Bedingungen traten viele Nebenproduktpeaks auf und die Trennung der Peaks war unzureichend. Somit wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

Derivatisierung mit PITC:

Für die Derivatisierung mittels PITC gilt dasselbe wie für die Derivatisierung mit Dansyl-Cl.

Derivatisierung mit FMOC-Cl:

Die mit FMOC-Cl entstandenen Derivate und deren beste Trennung ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

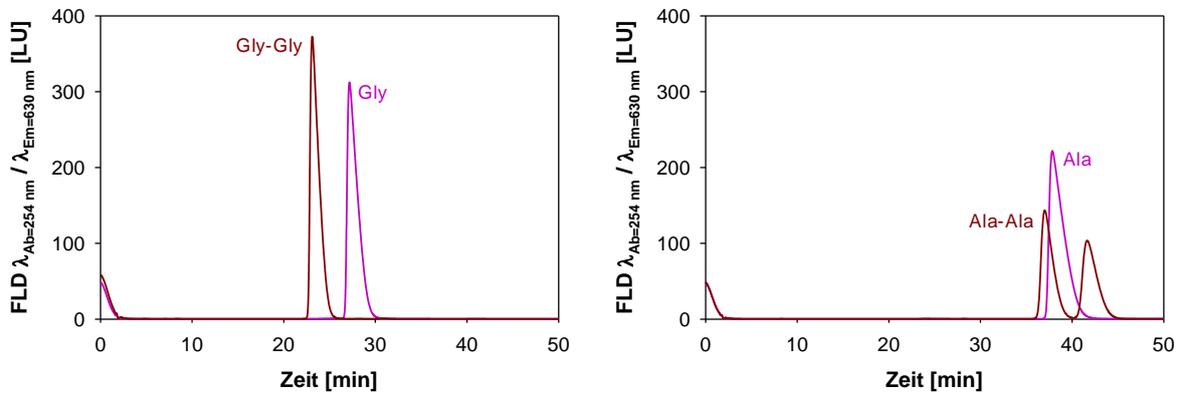


Abbildung 4.2: HPLC Chromatogramme nach Derivatisierung mit FMOC-Cl von Gly-Gly und Gly (links) und Ala-Ala und Ala (rechts)

Säule: HyperClone™ ODS (C18), Laufmittel: 40 % MeOH / 60 % 20 mM AmmoniumPP Puffer (pH 6,5), Flussrate: 1 ml/min, Säulentemperatur: 25 °C

Mit FMOC-Cl konnten die beiden Modell-DKPs ebenfalls nicht derivatisiert werden. Die Trennung mit einer sehr guten Auflösung von 2,30 innerhalb annehmbarer Retentionszeiten konnte für Gly-Gly und Gly unter den genannten Bedingungen erreicht werden (Abbildung 4.2, links). Allerdings konnte unter keiner der getesteten Bedingungen Ala-Ala optimal von Ala getrennt werden. Im gezeigten Beispiel (Abbildung 4.2, rechts) traten wie bei der Derivatisierung mit Dabsyl-Cl (siehe Abbildung 4.1, rechts) zwei Peaks für Ala-Ala auf. Hierbei handelt es sich vermutlich ebenfalls um die Trennung der Diastereomere von DL-Ala-DL-Ala. Beim ersten dieser Peaks kam es mit einer sehr geringen Auflösung von 0,34 zur Überlagerung mit dem Peak von Ala. Die Trennung von Ala von dem zweiten Ala-Ala-Peak erfolgte mit einer annehmbaren Auflösung von 1,45.

Derivatisierung mit OPA/3-MPA:

Die besten Chromatogramme die nach der Derivatisierung mit OPA/3-MPA erhalten wurden, sind in Abbildung 4.3 gezeigt.

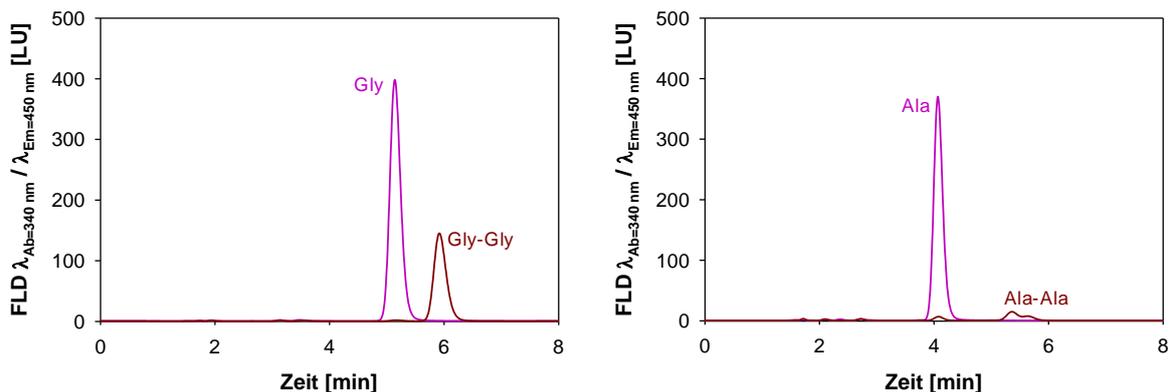


Abbildung 4.3: HPLC Chromatogramme nach Derivatisierung mit OPA/3-MPA von Gly-Gly und Gly (links) und Ala-Ala und Ala (rechts)

Säule: HyperClone™ ODS (C18), Laufmittel: 20 % MeOH / 80 % 20 mM NaPP Puffer (pH 6,5) (links), 30 % MeOH / 70 % 20 mM NaPP Puffer (pH 6,5) (rechts), Flussrate: 1 ml/min, Säulentemperatur: 25 °C

Unter den genannten Bedingungen wurde mit einer Auflösung von 2,05 eine gute Trennung von Gly-Gly und Gly erzielt (Abbildung 4.3, links). Mit dieser Derivatisierungsmethode wurden drei Peaks für Ala-Ala detektiert (Abbildung 4.3, rechts). Einer der Peaks liegt genau unter dem Ala-Peak, was die Vermutung aufbringt, dass es bei der Derivatisierungsreaktion teilweise zum Zerfall des Dipeptids zur Aminosäure kam. Die zwei Peaks zwischen 5 und 6 min, lassen sich wie für die Derivatisierung mit Dabsyl-Cl und FMOC-Cl mit der Trennung der Diastereomere erklären. Diese beiden Peaks wurden sehr gut vom Ala-Peak getrennt.

Mit allen getesteten Derivatisierungsmethoden konnten die sekundären Aminogruppen von Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) nicht derivatisiert werden. Somit war der gleichzeitige Nachweis von DKPs, Dipeptiden und Aminosäuren mit den beschriebenen Derivatisierungsmethoden nicht möglich.

4.1.2.2 Analytik mit underivatisierten Substanzen

Aufgrund der nicht zufriedenstellenden Ergebnisse für die Trennung von Ala-Ala und Ala und dem nicht möglichen gleichzeitigen Nachweis der entsprechenden DKPs Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) (siehe Abschnitt 4.1.2.1) bei verschiedenen Derivatisierungsmethoden, wurden unterschiedliche Bedingungen zum Nachweis der Trennung der underivatisierten Substanzen getestet. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 210 nm, beruhend auf der Absorption der Peptidbindung bzw. des aromatischen Rings. Somit war es nur möglich die DKPs, Dipeptide und aromatischen Aminosäuren

nachzuweisen, nicht aber die nicht aromatischen Aminosäuren. Für die Methodenetablierung wurden die Modell-DKPs Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) und die beiden entsprechenden Dipeptide verwendet. Die Herausforderung war eine Säule zu finden, die eine ausreichende Retention der Substanzen ermöglichte. Dafür wurden alle in Tabelle 3.9 aufgeführten Säulen mit jeweils unterschiedlichen Laufmittelzusammensetzungen, Flussraten und Säulentemperaturen untersucht.

Die besten Trennungen wurden mit der Säule NUCLEODUR® Sphinx RP und mit 20 mM NaPP Puffer (pH 5,5) als wässrige Phase des Laufmittels erzielt. Lediglich mit dieser Säule konnte eine ausreichende Trennung von Cyclo(Gly-Gly) und Gly-Gly (siehe Abbildung 4.5 a), und von Cyclo(Ala-Ala) und Ala-Ala (siehe Abbildung 4.5 b) erreicht werden. Für die Trennung der anderen in dieser Arbeit verwendeten DKPs, Dipeptide und aromatischen Aminosäuren (und Dihydrouracil und *N*-Carbamoyl- β -Ala) mussten die Methoden angepasst werden. Dazu wurde jeweils das Retentionsverhalten aller Substanzen bei 10, 20 und 30 % MeOH (zusätzlich 45 % MeOH für (S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion und 3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion) mit der NUCLEODUR® Sphinx RP Säule untersucht. Für die Substanzen, die bei einer MeOH Konzentration über 20 % analysiert wurden, musste die Säulentemperatur von 20 auf 30 °C erhöht werden, damit der Druck in einem für die Säule verträglichen Bereich blieb.

Zur Auswertung wurde von jeweils zwei benachbarten Peaks der Trennfaktor α und die Auflösung R berechnet (Abbildung 4.4, Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Retentionsfaktor (k) für DKPs, Dipeptide und Aminosäuren und Trennfaktor (α) und Auflösung (R) für je zwei benachbarte Peaks unter besten Bedingungen

Beste Bedingungen	Substanz	Retentionsfaktor k	Trennfaktor α	Auflösung R
10 % MeOH, 20 °C, 0,7 ml/min	Cyclo(Gly-Gly)	1,03	1,63	5,47
	Gly-Gly	0,63		
	Cyclo(L-Ala-D-Ala)	2,34	1,18	3,26
	Cyclo(L-Ala-L-Ala) und Cyclo(D-Ala-D-Ala)	2,75		
	L-Ala-L-Ala und D-Ala-D-Ala	0,67	1,25	1,83
	L-Ala-D-Ala	0,84		
	Cyclo(L-Ala-D-Ala)	2,34	2,79	13,77
	L-Ala-D-Ala	0,84		
	Cyclo(Arg-Arg)	1,08	1,36	1,55
	Arg-Arg	0,79		
	Cyclo(Lys-Lys)	0,72	1,19	0,67
	Lys-Lys	0,61		
	1,3-Dimethylpiperazin-2,5-dion	2,88	-	-
	Dihydrouracil	1,52	2,07	8,52
<i>N</i> -Carbamoyl- β -Ala	0,74			
10 % MeOH, 15 °C, 0,3 ml/min	Cyclo(Asp-Asp)	0,61	1,15	1,04
	Asp-Asp	0,53		

Fortsetzung von Tabelle 4.1

Beste Bedingungen	Substanz	Retentionsfaktor k	Trennfaktor α	Auflösung R
20 % MeOH, 20 °C, 0,7 ml/min	Cyclo(Asp-Phe)	3,33	1,14	2,31
	Phe	2,93		
	Asp-Phe	2,10	1,40	5,45
	Phe	2,93		
	Asp-Phe	2,10	1,59	5,88
Phe-Asp	1,32			
30 % MeOH, 30 °C, 0,7 ml/min	Cyclo(Gly-Phe)	4,36	2,31	16,12
	Phe-Gly	1,89		
	Phe-Gly	1,89	1,01	0,17
	Phe	1,87		
	Gly-Phe	1,84	1,02	0,27
	Phe	1,87		
	Cyclo(Pro-Tyr)	3,75	2,26	9,44
	Tyr-Pro	1,66		
	Tyr-Pro	1,66	1,76	4,23
	Tyr	0,95		
Pro-Tyr	0,93	1,02	0,22	
Tyr	0,95			
45 % MeOH, 30 °C, 0,7 ml/min	(S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion	4,26	-	-
	3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion	2,52	-	-

Totzeit $t_0 = 2,167$ min (Herstellerangabe)

Die besten für die Trennung der DKPs, Dipeptide und der Aminosäuren Phe und Tyr identifizierten Bedingungen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Der Trennfaktor α und die Auflösung R wurden bei verschiedenen MeOH Konzentrationen und den entsprechenden Anteilen von 20 mM NaPP Puffer (pH 5,5) als Laufmittel berechnet (Abbildung 4.4 a-c). Es sollte für jedes DKP, die entsprechenden Dipeptide und aromatischen Aminosäuren eine Methode identifiziert werden, bei der die Auflösung R größer als 1,5 ist und die Retentionszeiten t_R maximal 15 min betragen.

Für (S)-3-Benzyl-1,4-dimethyl-piperazin-2,5-dion, 3-Benzyl-3-methyl-piperazin-2,5-dion und 1,3-Dimethyl-piperazin-2,5-dion waren die entsprechenden Dipeptide nicht vorhanden, sodass nur die Retentionsfaktoren bei verschiedenen MeOH Konzentrationen bestimmt werden konnten.

Trennung von Cyclo(Gly-Gly) und Gly-Gly, Cyclo(Arg-Arg) und Arg-Arg, Cyclo(Lys-Lys) und Lys-Lys, und Dihydrouracil und N-Carbamoyl- β -Ala:

Für die Trennung von Cyclo(Gly-Gly) von Gly-Gly, Cyclo(Arg-Arg) von Arg-Arg, Cyclo(Lys-Lys) von Lys-Lys (Abbildung 4.4 a), und Dihydrouracil von N-Carbamoyl- β -Ala wurden die besten Ergebnisse mit 10 % MeOH gemischt mit 90 % 20 mM NaPP Puffer (pH 5,5) als Laufmittel, 20 °C Säulentemperatur und einer Flussrate von 0,7 ml/min erzielt (Tabelle 4.1).

Beim Nachweis von Cyclo(Arg-Arg) bei einer Wellenlänge von 210 nm wurden vier Peaks detektiert, aber es konnte keine eindeutige Zuordnung eines Peaks zu Cyclo(Arg-Arg) erfolgen. Mögliche Verunreinigungen der Probe sind nicht auszuschließen, da keine Angaben über die Reinheit vorlagen. Wurde hingegen die Absorption der Guanidinogruppen bei $\lambda = 268$ nm detektiert, wurde ein symmetrischer Peak nachgewiesen (Abbildung 4.5 g). Cyclo(Arg-Arg) wurde daher bei allen weiteren Untersuchungen bei einer Wellenlänge von 268 nm detektiert.

Insgesamt konnten optimale Methoden (Anforderungen: $R > 1,5$, $t_R < 15$ min) für alle oben genannten Substanzen etabliert werden, mit der Ausnahme von Cyclo(Lys-Lys) und Lys-Lys mit einer Auflösung unter 1,5.

Trennung von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) und DL-Ala-DL-Ala:

Die beste Trennung von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) von DL-Ala-DL-Ala wurde ebenfalls mit 10 % MeOH erreicht (Abbildung 4.4 a). Darüber hinaus konnte für diese racemischen Substanzen die Trennung der Diastereomere erreicht werden (dargestellt in Abbildung 1.11). Cyclo(L-Ala-D-Ala) wurde von dem Enantiomerenpaar bestehend aus Cyclo(L-Ala-L-Ala) und Cyclo(D-Ala-D-Ala) getrennt, und L-Ala-D-Ala von dem Enantiomerenpaar L-Ala-L-Ala und D-Ala-D-Ala (Abbildung 4.5 b). Durch die Messung der Enantiomere Cyclo(L-Ala-L-Ala) und L-Ala-L-Ala konnten die Peaks den entsprechenden Enantiomeren zugeordnet werden.

Trennung von Cyclo(Asp-Asp) und Asp-Asp:

Es konnte keine Trennung von Cyclo(Asp-Asp) und Asp-Asp bei 10 % MeOH, 20 °C Säulentemperatur und einer Flussrate von 0,7 ml/min erreicht werden. Unter diesen Bedingungen konnte nur eine Auflösung von 0,62 berechnet werden (Abbildung 4.4 d). 10 % MeOH ist die für die Säule geringstmögliche Konzentration an organischer Phase. Durch Verringerung der Flussrate auf 0,3 ml/min und der Säulentemperatur auf 15 °C konnte die Auflösung auf 1,04 verbessert werden (Abbildung 4.4 d, Abbildung 4.5 e).

Trennung von Cyclo(Asp-Phe), Asp-Phe, Phe-Asp und Phe:

Die besten Bedingungen für die Trennung von Cyclo(Asp-Phe), Asp-Phe, Phe-Asp und Phe mit Retentionszeiten geringer als 15 min wurden bei 20 % MeOH, 20 °C Säulentemperatur und einer Flussrate von 0,7 ml/min erreicht (Abbildung 4.5 c). Eine noch bessere Auflösung wurde mit 10 % MeOH erzielt (Abbildung 4.4 b), jedoch waren die Retentionszeiten länger als 15 min.

Trennung von Cyclo(Gly-Phe), Gly-Phe, Phe-Gly und Phe:

Cyclo(Gly-Phe) konnte mit 30 % MeOH, 30 °C Säulentemperatur und einer Flussrate von 0,7 ml/min von den korrespondierenden Dipeptiden und Phe getrennt werden, allerdings war unter diesen Bedingungen keine Trennung der zwei Dipeptide und der Aminosäure untereinander möglich (Abbildung 4.5 d). Die Trennung aller vier Substanzen voneinander

wurde mit 10 % MeOH, 20 °C Säulentemperatur und einer Flussrate von 0,7 ml/min mit einer Auflösung von 2,01 für Gly-Phe und Phe und 4,66 für Gly-Phe und Phe-Gly erreicht (Abbildung 4.4 c). Jedoch resultierte dies in einer Analysendauer von ca. 30 min.

Trennung von Cyclo(Pro-Tyr), Pro-Tyr, Tyr-Pro und Tyr:

Für Cyclo(Pro-Tyr), Pro-Tyr, Tyr-Pro und Tyr wurde die beste Trennung und kurze Retentionszeiten ebenfalls mit 30 % MeOH, 30 °C Säulentemperatur und einer Flussrate von 0,7 ml/min beobachtet (Abbildung 4.5 f). Jedoch konnte unter diesen Bedingungen Pro-Tyr von Tyr nur mit einer Auflösung von 0,22 getrennt werden (Abbildung 4.4 c).

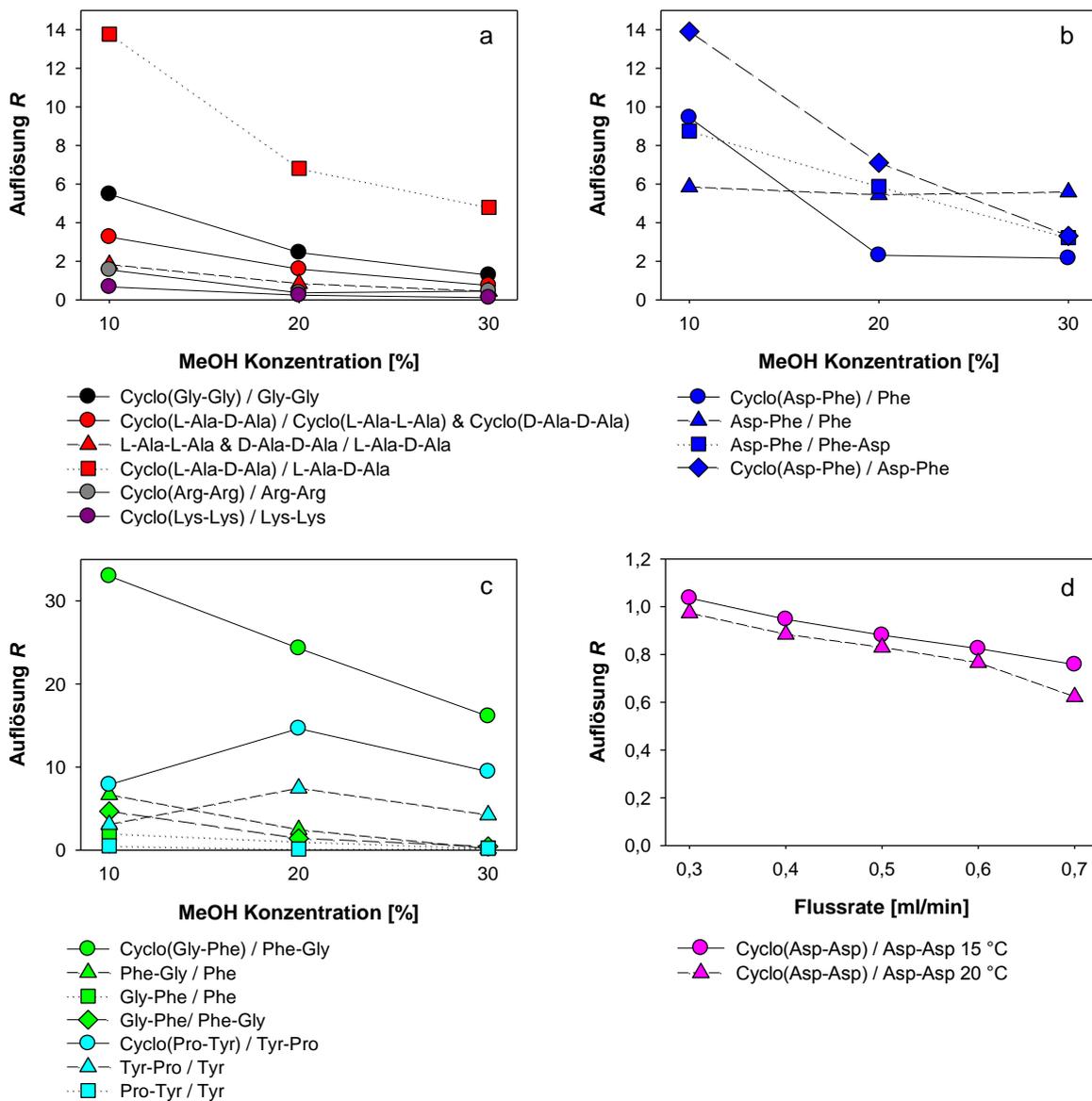
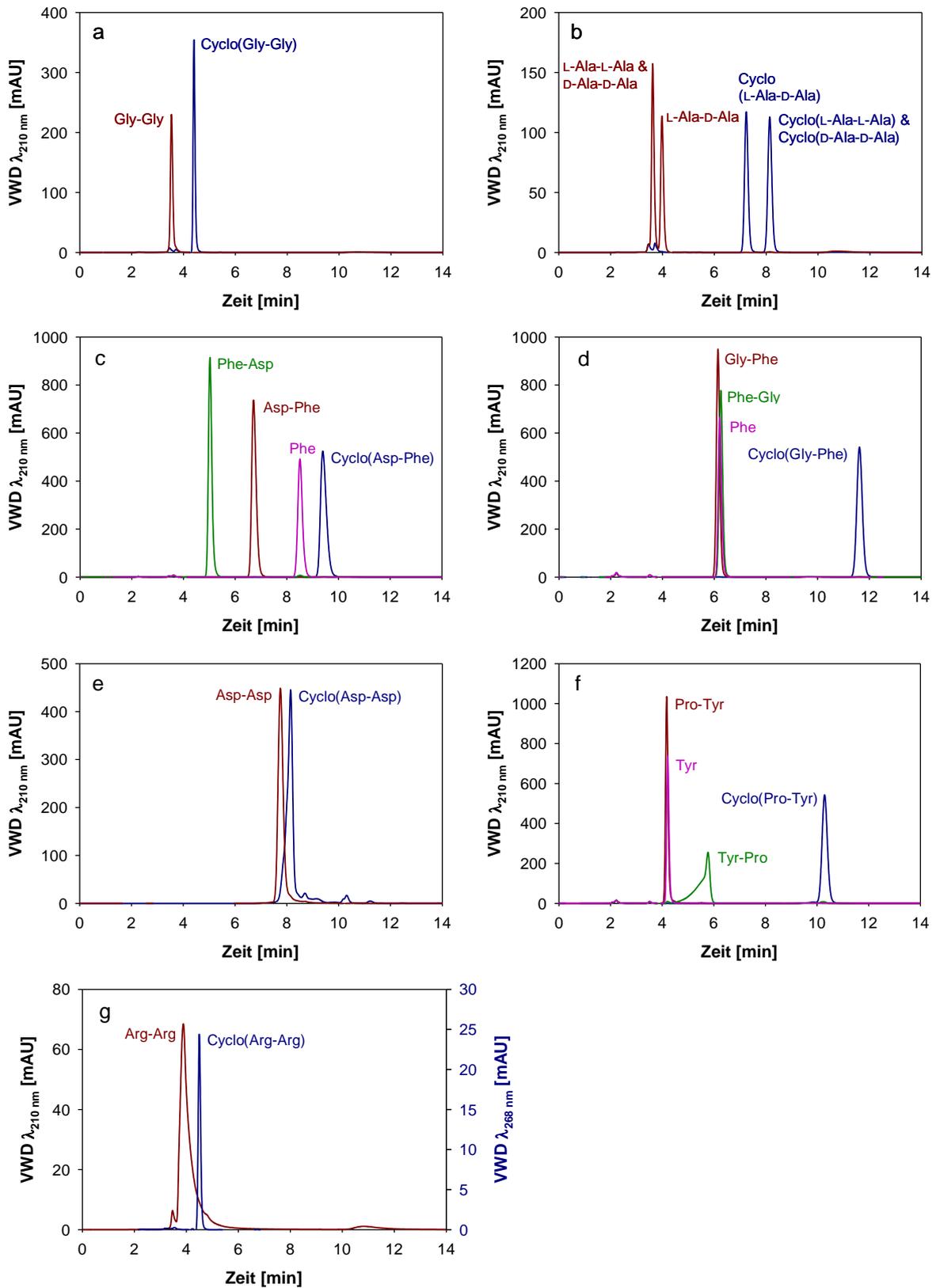


Abbildung 4.4: Auflösung R von je zwei benachbarten Peaks der DKPs, Dipeptide und Aminosäuren abhängig von der MeOH Konzentration (a-c) oder der Flussrate (d)

MeOH Konzentration die als am besten für die Trennung der in der jeweiligen Abbildung dargestellten Substanzen ausgewählt wurde: a) 10 % MeOH; b) 20 % MeOH; c) 30 % MeOH; d) Cyclo(Asp-Asp) und Asp-Asp bei einer Flussrate von 0,3 bis 0,7 ml/min bei 15 und 20 °C Säulentemperatur und 10 % MeOH

Für alle untersuchten Substanzen sind die Chromatogramme von je 1 mM Standards unter den jeweils besten Bedingungen gezeigt (Abbildung 4.5). Diese Bedingungen kamen bei der Quantifizierung der Substrate und möglichen Produkte in den Proben der Biotransformationen zum Einsatz.



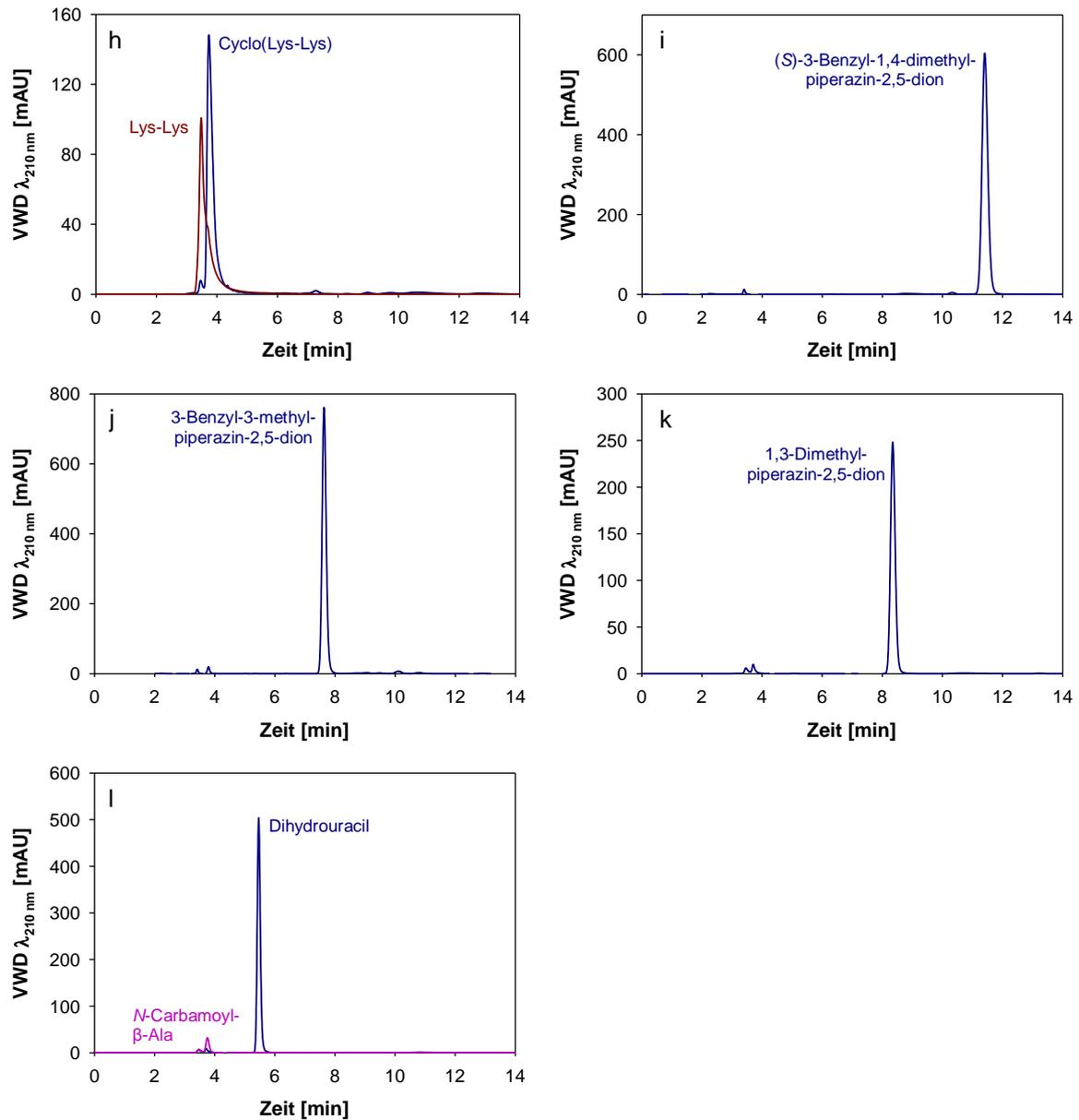


Abbildung 4.5: HPLC Chromatogramme von 1 mM Standards der DKPs, Dipeptide, Aminosäuren, Dihydrouracil und *N*-Carbamoyl- β -Ala unter den in dieser Arbeit etablierten besten Bedingungen

a, b, g, h, k, l: 10 % MeOH, 0,7 ml/min, 20 °C; c: 20 % MeOH, 0,7 ml/min, 20 °C; d, f: 30 % MeOH, 0,7 ml/min, 30 °C; e: 10 % MeOH, 0,3 ml/min, 15 °C; i, j: 45 % MeOH, 0,7 ml/min, 30 °C; alle bei $\lambda = 210$ nm, außer Cyclo(Arg-Arg) bei $\lambda = 268$ nm; Säule: NUCLEODUR® Sphinx RP

a) Cyclo(Gly-Gly) und Gly-Gly; b) Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) und DL-Ala-DL-Ala (je Trennung der Diastereomere vgl. Abbildung 1.11); c) Cyclo(Asp-Phe), Asp-Phe, Phe-Asp und Phe; d) Cyclo(Gly-Phe), Gly-Phe, Phe-Gly und Phe; e) Cyclo(Asp-Asp) und Asp-Asp; f) Cyclo(Pro-Tyr), Pro-Tyr, Tyr-Pro, Tyr; g) Cyclo(Arg-Arg) und Arg-Arg; h) Cyclo(Lys-Lys) und Lys-Lys; i) (S)-3-Benzyl-1,4-dimethyl-piperazin-2,5-dion; j) 3-Benzyl-3-methyl-piperazin-2,5-dion; k) 1,3-Dimethyl-piperazin-2,5-dion; l) Dihydrouracil und *N*-Carbamoyl- β -Ala

Für alle Substanzen bis auf Tyr-Pro, Arg-Arg und Lys-Lys wurden symmetrische Peaks ohne nennenswertes *fronting* und *tailing* detektiert (Abbildung 4.5). Bei den genannten Ausnahmen wurde für Tyr-Pro ein sehr starkes *fronting* und für Arg-Arg und Lys-Lys ein schwaches *tailing* beobachtet. Der Schwerpunkt der Methodenentwicklung lag auf dem Nachweis der DKPs. Für diese Substanzklasse konnten gut auswertbare Peaks, die den festgelegten Anforderungen für eine optimale Trennung entsprachen, nachgewiesen werden.

4.1.3 Validierung der HPLC-Methoden

Die Methodvalidierung wurde für die DKPs Cyclo(Gly-Gly), Cyclo(Ala-Ala), Cyclo(Asp-Phe), Cyclo(Gly-Phe), Cyclo(Asp-Asp), Cyclo(Pro-Tyr), Cyclo(Arg-Arg), Cyclo(Lys-Lys) und deren korrespondierenden Dipeptiden und den aromatischen Aminosäuren Phe und Tyr durchgeführt. Die Methoden wurden bezüglich Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Linearität, Präzision, Richtigkeit, Stabilität und Wiederfindungsrate entsprechend den *bioanalytical method validation* Richtlinien der FDA (FDA 2001) unter den besten Bedingungen für die Trennung (siehe Tabelle 4.1) validiert. Die Validierung der Methoden wurde exemplarisch im Rohextrakt des Stammes DSM 329 als biologische Matrix durchgeführt, jedoch wurde davon ausgegangen, dass die validierten Methoden für alle in dieser Arbeit verwendeten Rohextrakte und Ganzzellextrakte anwendbar sind.

Die Nachweismethoden für (S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion, 3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion, 1,3-Dimethylpiperazin-2,5-dion, Dihydrouracil und *N*-Carbamoyl- β -Ala wurden nur bezüglich Linearität und Nachweisgrenze validiert.

4.1.3.1 Bestimmung der Linearität und Sensitivität

In Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse für den linearen Bereich, die lineare Geradengleichung, das Bestimmtheitsmaß R^2 , die Bestimmungs- und Nachweisgrenze für die verschiedenen DKPs, Dipeptide und Aminosäuren dargestellt.

Tabelle 4.2: Linearer Bereich, lineare Geradengleichung, Bestimmtheitsmaß R^2 und Bestimmungsgrenze; n. b.: nicht bestimmt

Substanz	Linearer Bereich (mM)	Lineare Geradengleichung	R^2	Bestimmungsgrenze (nmol / 10 μ l Injektion)
Cyclo(Gly-Gly)	0,010 - 5,00	$y = 1732x + 107$	0,9980	5,00
Gly-Gly	0,010 - 5,00	$y = 1355x + 124$	0,9989	10,00
Cyclo(L-Ala-D-Ala)	0,025 - 5,00	$y = 2188x + 93$	0,9991	5,00
Cyclo(L-Ala-L-Ala) und Cyclo(D-Ala-D-Ala)	0,025 - 5,00	$y = 2271x + 96$	0,9991	0,25
L-Ala-L-Ala und D-Ala-D-Ala	0,025 - 5,00	$y = 1821x + 111$	0,9996	5,00
L-Ala-D-Ala	0,025 - 5,00	$y = 1642x + 60$	0,9996	5,00
Cyclo(Asp-Phe)	0,005 - 5,00	$y = 8227x + 162$	0,9998	0,05
Asp-Phe	0,005 - 5,00	$y = 8258x + 132$	0,9999	0,05
Phe-Asp	0,005 - 2,50	$y = 8389x + 122$	0,9994	0,50
Phe (20 % MeOH)	0,005 - 5,00	$y = 5845x + 131$	0,9997	0,10
Cyclo(Gly-Phe)	0,005 - 5,00	$y = 7662x + 165$	0,9997	0,05
Gly-Phe	0,005 - 2,50	$y = 8360x + 106$	0,9995	0,10
Phe-Gly	0,005 - 2,50	$y = 7392x + 109$	0,9993	0,10
Phe (30 % MeOH)	0,005 - 2,50	$y = 6121x + 60$	0,9997	0,10
Cyclo(Asp-Asp)	0,005 - 2,50	$y = 6855x + 307$	0,9992	5,00
Asp-Asp	0,010 - 5,00	$y = 5192x + 225$	0,9990	5,00
Cyclo(Pro-Tyr)	0,005 - 5,00	$y = 8256x + 116$	0,9999	0,05
Pro-Tyr	0,005 - 2,50	$y = 7164x + 87$	0,9997	1,00
Tyr-Pro	0,010 - 10,00	$y = 6127x + 172$	0,9997	5,00
Tyr	0,010 - 2,50	$y = 4929x + 43$	1,0000	10,00
Cyclo(Arg-Arg)	0,100 - 50,00	$y = 162x + 5$	1,0000	1,00
Arg-Arg	0,010 - 10,00	$y = 1611x + 86$	0,9996	5,00
Cyclo(Lys-Lys)	0,010 - 10,00	$y = 1916x + 166$	0,9993	5,00
Lys-Lys	0,050 - 10,00	$y = 1692x + 122$	0,9999	10,00
(S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion	0,005 - 2,50	$y = 8169x + 251$	0,9999	n. b.
3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion	0,005 - 2,50	$y = 7312x + 82$	0,9996	n. b.
1,3-Dimethylpiperazin-2,5-dion	0,010 - 10,00	$y = 2449x + 159$	0,9992	n. b.
Dihydrouracil	0,010 - 5,00	$y = 3557x + 82$	0,9996	n. b.
N-Carbamoyl- β -Ala	0,100 - 25,00	$y = 163x + 89$	0,9995	n. b.

Die Nachweisgrenze entspricht dem minimalen Wert des linearen Bereichs und lag zwischen 0,005 und 0,100 mM. Das Maximum des linearen Bereichs war ebenfalls stark abhängig von der Substanz und variierte zwischen 2,50 und 50,00 mM. Die niedrigste Bestimmungsgrenze wurde mit 0,05 nmol je 10 μ l Injektion für Cyclo(Asp-Phe), Asp-Phe, Cyclo(Gly-Phe) und Cyclo(Pro-Tyr) gemessen und reichte bis 10,00 nmol je 10 μ l Injektion für Gly-Gly, Tyr und Lys-Lys.

Die berechneten linearen Geradengleichungen unterschieden sich stark von Substanz zu Substanz. Die Steigungen waren für die aromatischen Substanzen aufgrund der Absorption des aromatischen Rings höher als für die meisten nicht aromatischen Substanzen.

Das Bestimmtheitsmaß R^2 der Geradengleichung des definierten linearen Bereichs war für alle Substanzen mindestens 0,9990, außer für Cyclo(Gly-Gly) und Gly-Gly mit Werten von 0,9980 und 0,9989.

4.1.3.2 Bestimmung der Präzision und Richtigkeit

Die Ergebnisse der Intra-Assay und Inter-Assay Präzision und die Richtigkeit sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Methodvalidierung: Präzision und Richtigkeit; RSD: relative Standardabweichung (*relative standard deviation*) und RE: relativer Fehler (*relative error*)

Substanz	Intra-Assay Präzision RSD [%]	Inter-Assay Präzision RSD [%]	Richtigkeit RE [%]
Cyclo(Gly-Gly)	1,1	0,7	4,7
Gly-Gly	0,9	2,6	7,7
Cyclo(L-Ala-D-Ala)	0,7	0,9	8,1
Cyclo(L-Ala-L-Ala) und Cyclo(D-Ala-D-Ala)	1,1	3,5	-0,3
L-Ala-L-Ala und D-Ala-D-Ala	1,3	3,9	6,6
L-Ala-D-Ala	1,1	1,7	2,9
Cyclo(Asp-Phe)	1,1	3,0	2,2
Asp-Phe	2,7	9,9	2,3
Phe-Asp	2,1	1,9	0,3
Phe (20 % MeOH)	1,5	3,1	2,3
Cyclo(Gly-Phe)	2,9	1,4	-4,2
Gly-Phe	1,3	3,4	0,3
Phe-Gly	0,9	2,7	-2,0
Phe (30 % MeOH)	1,2	4,0	1,8
Cyclo(Asp-Asp)	1,0	1,3	5,1
Asp-Asp	1,1	1,9	2,1
Cyclo(Pro-Tyr)	4,7	5,4	0,7
Pro-Tyr	1,4	4,5	4,3
Tyr-Pro	1,3	2,0	-0,1
Tyr	1,9	4,4	6,4
Cyclo(Arg-Arg)	1,5	6,4	3,9
Arg-Arg	0,5	6,7	-0,3
Cyclo(Lys-Lys)	0,7	5,5	-0,7
Lys-Lys	0,5	1,9	4,3

Für die Intra-Assay Präzision war die geringste relative Standardabweichung (RSD) 0,5 % für Arg-Arg und Lys-Lys und der höchste RSD-Wert wurde mit 4,7 % für Cyclo(Pro-Tyr) bestimmt. Für die Inter-Assay Präzision wurde der niedrigste RSD-Wert mit 0,7 % für Cyclo(Gly-Gly) und der höchste RSD-Wert mit 9,9 % für Asp-Phe bestimmt.

Für Substanzen, welche höhere gemessene als tatsächliche Konzentrationen aufwiesen, war der höchste relative Fehler (RE) für die Richtigkeit 8,1 % für Cyclo(L-Ala-D-Ala). Die beste Richtigkeit der Methode wurde mit 0,3 % RE für Phe-Asp und Gly-Phe bestimmt. Für Substanzen, die geringere gemessene als tatsächliche Konzentrationen zeigten, wurde die beste Richtigkeit mit -0,1 % RE für Tyr-Pro und der höchste RE-Wert mit -4,2 % für Cyclo(Gly-Phe) bestimmt. Alle Werte für Präzision und Richtigkeit lagen unterhalb der maximalen Grenze von 15 % Abweichung entsprechend den FDA-Richtlinien.

4.1.3.3 Bestimmung der Stabilität und Wiederfindungsrate

Die Stabilität der Substanzen wurde nach 24 h Lagerung bei 21 °C und nach drei Frier-Tau Zyklen bestimmt. Außerdem wurde die Wiederfindungsrate nach Hitzebehandlung bei 90 °C für 10 min ermittelt. Dies entsprach den Bedingungen für die Inaktivierung der Rohextrakte bei der Probenahme während der Biotransformation. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Methodenvvalidierung: Stabilität und Wiederfindungsrate

Substanz	Stabilität (24 h, 21 °C) [%]	Stabilität (3 Frier-Tau Zyklen) [%]	Wieder- findungsrate [%]
Cyclo(Gly-Gly)	100	97	97
Gly-Gly	99	98	99
Cyclo(L-Ala-D-Ala)	101	98	99
Cyclo(L-Ala-L-Ala) und Cyclo(D-Ala-D-Ala)	99	99	99
L-Ala-L-Ala und D-Ala-D-Ala	100	101	100
L-Ala-D-Ala	97	100	100
Cyclo(Asp-Phe)	102	98	100
Asp-Phe	94	99	99
Phe-Asp	103	98	101
Phe (20 % MeOH)	100	98	98
Cyclo(Gly-Phe)	97	100	99
Gly-Phe	98	100	103
Phe-Gly	101	100	98
Phe (30 % MeOH)	100	100	100
Cyclo(Asp-Asp)	100	100	101
Asp-Asp	101	98	98
Cyclo(Pro-Tyr)	100	93	99
Pro-Tyr	98	99	99
Tyr-Pro	98	98	98
Tyr	101	94	98
Cyclo(Arg-Arg)	102	101	100
Arg-Arg	99	99	98
Cyclo(Lys-Lys)	100	98	100
Lys-Lys	101	99	100

Nach Lagerung bei 21 °C für 24 h konnten mindestens 97 % der anfänglichen Konzentration nachgewiesen werden. Die einzige Ausnahme davon war Asp-Phe mit einer Stabilität von 94 %. Für die Frier-Tau Stabilität wurden ebenfalls 97 % oder mehr gemessen, außer für Cyclo(Pro-Tyr) und Tyr mit 93 % und 94 % Stabilität. Somit ist eine Messdauer über einen Zeitraum von mindestens 24 h bei 21 °C und eine Lagerung der Substanzen bei -20 °C mit dreimaligem Auftauen möglich.

Für alle untersuchten DKPs, Dipeptide und Aminosäuren betrug die Wiederfindungsrate nach der Hitzebehandlung mindestens 97 %. Damit wurde diese Behandlung als effizient für die Inaktivierung des Rohextrakts mit gleichzeitig hoher Wiederfindungsrate der Substrate und potentieller Produkte während der Biotransformation validiert.

4.2 Hydrolyse von Diketopiperazinen

Um Enzyme bzw. Mikroorganismen für die Hydrolyse von DKPs zu identifizieren, wurden mehrere Ansätze verfolgt. Verschiedene Peptidasen, die teilweise in der Literatur für die DKP-Hydrolyse beschrieben sind (vgl. Tabelle 1.1), wurden untersucht.

Zur Identifizierung neuer DKP-abbauender Bakterien wurde ein Screening mit Schwammproben durchgeführt. Zwei Stämme, für die die hydrolytische Spaltung eines DKPs beschrieben ist (Yokozeki et al. 1990), wurden eingesetzt. Des Weiteren wurden Stämme, die für die Hydrolyse anderer cyclischer Amide (Hydantoine und Dihydropyrimidine) beschrieben sind (vgl. Tabelle 3.7 und Tabelle 3.8), auf ihre Aktivität gegenüber DKPs untersucht. Außerdem wurden zwei Stämme während dieser Arbeit isoliert und auf ihre Fähigkeit DKPs zu hydrolysieren getestet. Als Substrate kamen 11 verschiedene DKPs (vgl. Tabelle 3.2) zum Einsatz. Bei allen DKPs außer Cyclo(Ala-Ala) handelte es sich um die enantiomerenreinen Verbindungen Cyclo(L-Xaa-L-Xaa). Für Cyclo(Ala-Ala) wurde, wenn nicht anderweitig erwähnt, das racemische Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) eingesetzt.

Da in allen Negativkontrollen (Substrat ohne Biokatalysator) keine Aktivität nachgewiesen wurde, werden diese Ergebnisse nur teilweise gezeigt.

4.2.1 Peptidasen

Die in Tabelle 3.5 aufgeführten Peptidasen wurden auf ihre Aktivität gegenüber DKPs getestet. Für die 20 Enzyme des Immozyme™ Protease Kits von Chiral Vision (Leiden, NL) war zunächst der vom Hersteller empfohlene *p*-Nitrophenylacetat Assay zur Überprüfung der Aktivität verwendet worden. Dabei wurden neun eindeutig aktive Peptidasen identifiziert. Diese wurden auf hydrolytische Aktivität von DKPs getestet.

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Biotransformationen verschiedener Peptidasen mit 11 DKPs

(k. H.: keine Hydrolyse (rot); k. H.*: keine Hydrolyse mit Vorbehalt (orange); n. b.: nicht bestimmt (grau))

Peptidase	Cyclo(Gly-Gly)	Cyclo(Ala-Ala)	Cyclo(Asp-Phe)	Cyclo(Gly-Phe)	Cyclo(Asp-Asp)	Cyclo(Pro-Tyr)	Cyclo(Arg-Arg)	Cyclo(Lys-Lys)	(S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion	3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion	1,3-Dimethylpiperazin-2,5-dion
Ficin	k. H.	k. H.	k. H.	n. b.	n. b.	n. b.					
Bromelain	k. H.	k. H.	k. H.	n. b.	n. b.	n. b.					
Chymotrypsin	k. H.	k. H.	k. H.	n. b.	n. b.	n. b.					
Trypsin	k. H.	k. H.	k. H.								
Pepsin	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.	k. H.						
Papain	k. H.	k. H.	k. H.								
Alcalase	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.	n. b.	n. b.	n. b.
Savinase	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.	n. b.	n. b.	n. b.
Everlase	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.	n. b.	n. b.	n. b.
Esperase	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.	n. b.	n. b.	n. b.
Protex 6L	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.	n. b.	n. b.	n. b.
Protex 30L	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.	n. b.	n. b.	n. b.
Protex 40L	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.	n. b.	n. b.	n. b.
Protex 51FP	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.	n. b.	n. b.	n. b.
Protex 89L	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.*	k. H.	k. H.	n. b.	n. b.	n. b.

In Tabelle 4.5 ist eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Peptidasen mit den getesteten DKPs dargestellt. Bis auf wenige Ausnahmen konnte für diese Peptidasen eindeutig keine Hydrolyse der DKPs nachgewiesen werden (Tabelle 4.5, rot). Die Hydrolyse von Cyclo(Lys-Lys) durch Pepsin und die Hydrolyse von Cyclo(Gly-Phe) und Cyclo(Pro-Tyr) durch die immobilisierten Enzyme war infolge zu großer Schwankungen im Verlauf der Biotransformation nicht mit Sicherheit auszuschließen (Tabelle 4.5, orange), jedoch deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass keine Hydrolyse stattfindet.

4.2.2 Stämme aus Screening mit Schwammproben

4.2.2.1 Isolierung von Reinkulturen

Beim Screening mit 19 Schwamm- und 5 Vergleichsproben (Tabelle 3.11) nach DKP-hydrolysierenden Stämmen wurden 114 Reinkulturen isoliert. Beispiele einiger dieser Stämme sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

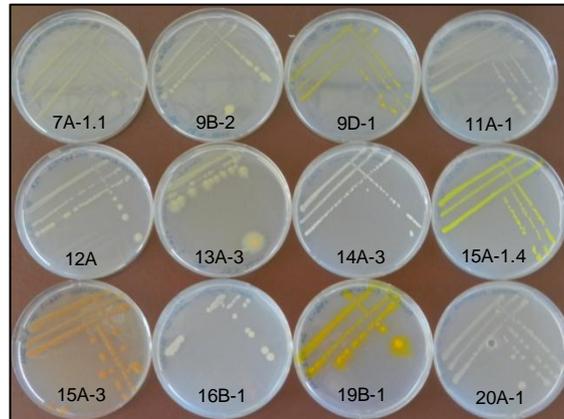


Abbildung 4.6: 12 Stämme die während des Screenings mit Schwammproben isoliert wurden als Beispiel für die Diversität

Zur Isolierung möglichst vieler verschiedener Stämme wurden die Kolonien anhand der Größe, Farbe, Form des Kolonierandes und der Beschaffenheit der Oberfläche unterschieden (vgl. Abbildung 4.6). Dabei wurden die in Tabelle 4.6 aufgeführten Reinkulturen isoliert.

Tabelle 4.6: Beim Screening mit Schwammproben isolierte Mikroorganismen

Fett markiert sind die Stämme, die für Biotransformation verwendet wurden

Probe	Probennummer	isolierte Mikroorganismen			
Meerwasser	1	1A	1B	1D	
	2	2A	2B	2C	2D
Luft	3				
	4				
<i>Dysidea avara</i>	5	5A-1 5A-2	5B		
	6	6A	6B	6C	6D
<i>Aplysina aerophoba</i>	7	7A-1.1	7B	7C	
		7A-1.2 7A-2			
	8	8A	8B-1 8B-2.1 8B-2.2	8C-1 8C-2	8D-1 8D-2.1 8D-2.2
<i>Ircinia sp.</i>	9	9A			9D-1 9E-1
			9B-2		
	10	10A	10B	10C	10D-1 10D-2.1 10D-2.2

Fortsetzung von Tabelle 4.6

Probe	Probennummer	isolierte Mikroorganismen				
<i>Chondrosia reniformis</i>	11	11A-1 11A-2	11C			
	12	12A			12D	12E
<i>Chondrilla nucula</i>	13	13A-1 13A-2 13A-3	13B-1 13B-2	13C	13D-1 13D-2	13E
	14	14A-1 14A-2 14A-3	14C-1 14C-2			
	15	15A-1.1 15A-1.2 15A-1.4 15A-2 15A-3	15B	15C	15D	15E
<i>Axinella polypoides</i>	16	16A-1 16A-2	16B-1	16C-1 16C-2		
	17	17A-1 17A-2	17B-1 17B-2	17C	17D-1 17D-2	17E-1 17E-2
<i>Tethya sp.</i>	18	18A			18D	
<i>Petrosia ficiformis</i>	19	19B-1 19B-2		19C	19D	
	20	20A-1 20A-2	20B	20C	20D	
<i>Agelas oroides</i>	21	21A	21B-1 21B-2	21C	21D-1 21D-2	
<i>Axinella polypoides</i>	22	22A-1 22A-2	22B	22C	22D	
<i>Geodia sp.</i>	23	23A	23B-1 23B-2	23C		
Keine Probe	24	24A-1 24A-2	24B-1 24B-2			

4.2.2.2 Wachstumsüberprüfung mit und ohne N-Quelle

Die isolierten Stämme (Tabelle 4.6) wurden auf Mineralsalzmediumplatten mit Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) als einziger N-Quelle, und auf Mineralsalzmediumplatten ohne DKPs auf ihr Wachstum untersucht. Dabei sollten nur die Stämme anwachsen, die Cyclo(Gly-Gly) oder Cyclo(Ala-Ala) abbauen und somit als N-Quelle nutzen können. Es wurden jedoch keine Stämme identifiziert, die nur auf den DKP enthaltenden Agarplatten gewachsen waren und nicht auf den Platten ohne DKPs. Deswegen wurde die Intensität des Wachstums auf den Agarplatten mit und ohne DKPs miteinander verglichen und die Stämme identifiziert, die eindeutig besser in Anwesenheit von DKPs angewachsen waren. Diese Stämme (siehe Tabelle 4.6, fett markiert) wurden zur weiteren Untersuchung auf Aktivität für die Biotransformation eingesetzt.

4.2.2.3 Biotransformation

Die bei der Wachstumsüberprüfung ausgewählten Stämme (siehe Abschnitt 4.2.2.2) wurden auf ihre Aktivität gegenüber Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) mittels Ganzzellbiotransformation untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

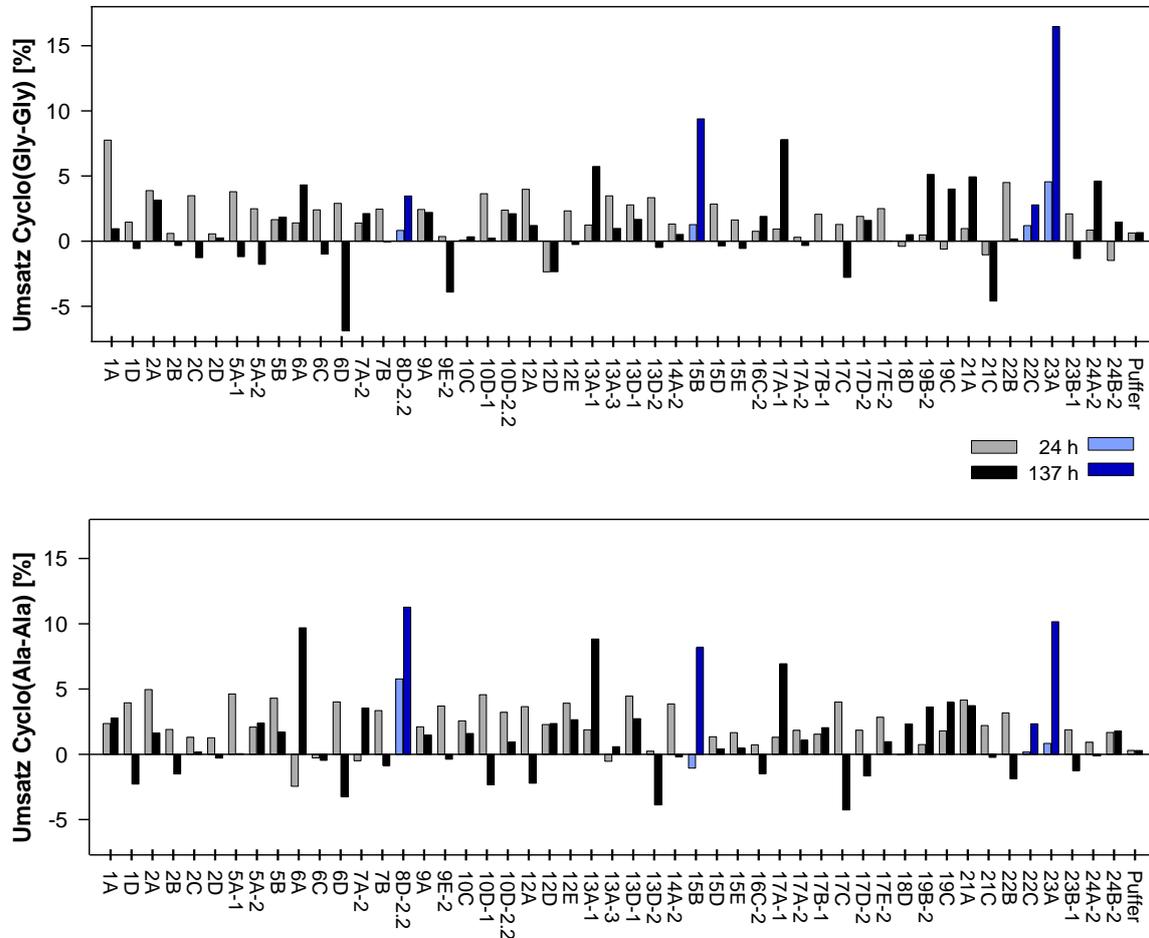


Abbildung 4.7: Umsatz von Cyclo(Gly-Gly) (oben) und Cyclo(Ala-Ala) (unten) durch beim Screening mit Schwammproben isolierte Stämme und der Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation; in Blau sind die Stämme dargestellt, die für eine Wiederholung zur Überprüfung der Ergebnisse verwendet wurden

Cyclo(Gly-Gly): Umsatz < 16 %; Cyclo(Ala-Ala): Umsatz < 11 %

Für die Stämme 8D-2.2, 13A-1, 17A-1, 19B-2, 22C und 23A konnte ein über zwei Zeitproben ansteigender Abbau von Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) gemessen werden (Abbildung 4.7, oben und unten). Hingegen wurde für die Stämme 5B, 6A, 7A-2, 15B, 16C-2, 21A und 24A-2 nur der kontinuierliche Abbau von Cyclo(Gly-Gly) (Abbildung 4.7, oben), und für die Stämme 1A, 5A-2, 12D, 17B-1, 19C und 24B-2 nur der kontinuierliche Umsatz von Cyclo(Ala-Ala) nachgewiesen (Abbildung 4.7, unten). Die höchste Aktivität zeigte der Stamm 23A gegenüber Cyclo(Gly-Gly) mit einem Umsatz von 16 % nach 137 h. Die Aktivitäten waren teilweise so gering, dass diese eher auf Ungenauigkeiten bei den Probenahmen während der Biotransformation und Messungenauigkeiten zurückzuführen

waren. Dies würde auch die gemessenen negativen Umsätze erklären. Teils waren die Proben während der Probenahme sehr schleimig und dadurch schwierig zu pipettieren. Des Weiteren waren die Proben nicht 1:2 vor der Vermessung mittels HPLC verdünnt worden; dieser Verdünnungsschritt hatte sich im Verlauf der Arbeit jedoch als sehr sinnvoll für exaktere HPLC-Messungen herausgestellt.

Es wurden vier Stämme ausgewählt (Abbildung 4.7, blau markiert), deren potentielle Aktivität während der Ganzzellbiotransformation überprüft und zusätzlich die Aktivität im Rohextrakt untersucht wurde.

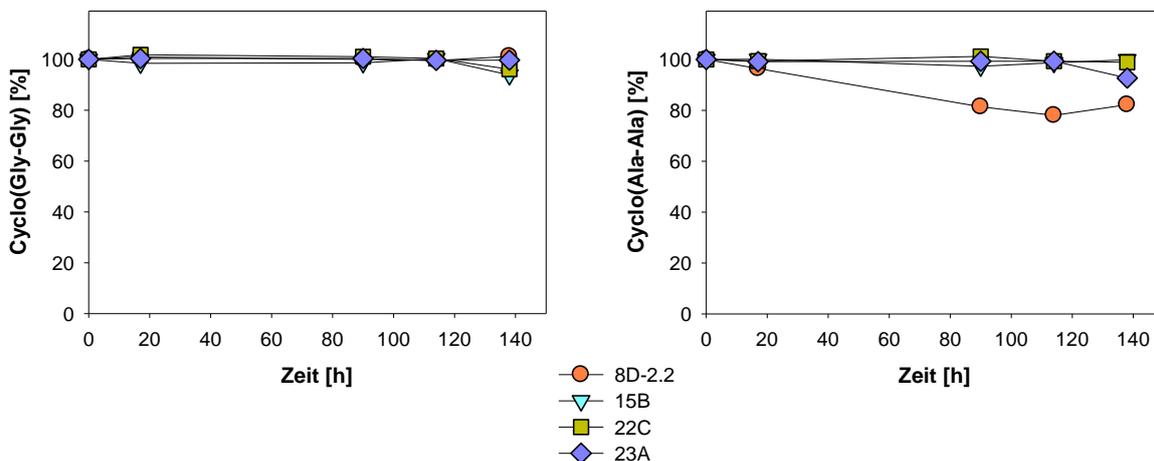


Abbildung 4.8: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Gly-Gly) (links) und Cyclo(Ala-Ala) (rechts) während der Ganzzellbiotransformation von vier während des Schwammscreenings isolierten Stämmen

geringer Abbau von Cyclo(Ala-Ala) durch ganze Zellen von Stamm 8D-2.2 (orange), keine weitere Aktivität nachweisbar

In Abbildung 4.8 sind die Ergebnisse der Ganzzellbiotransformation mit den Substraten Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) mit den Stämmen 8D-2.2, 15B, 22C, 23A dargestellt. Bis auf einen 20 %igen Abbau von Cyclo(Ala-Ala) nach 138 h durch den Stamm 8D-2.2 konnte weder im Ganzzellsystem noch im Rohextrakt (Ergebnisse nicht gezeigt) Aktivität nachgewiesen werden. Bei einer weiteren Überprüfung der Aktivität des Stammes 8D-2.2 konnte diese nicht mehr bestätigt werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Da für keinen der untersuchten Stämme eindeutige und signifikante Aktivität gegenüber Cyclo(Gly-Gly) oder Cyclo(Ala-Ala) nachgewiesen werden konnte, wurden keine weiteren Versuche mit den beim Screening isolierten Stämmen durchgeführt.

Alle isolierten Stämme (siehe Tabelle 4.6) wurden als Glycerinkulturen in der Stammsammlung hinterlegt.

4.2.3 DSM 329 und DSM 40062

Für die Stämme *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) wurde der Abbau von Cyclo(L-Asp-L-Phe) beschrieben (Yokozeki et al. 1990). Für diese beiden Stämme wurden Untersuchungen zur Charakterisierung der DKP-hydrolysierenden Enzyme durchgeführt, die im Folgenden dargestellt werden.

4.2.3.1 Substratspektrum

Zur Ermittlung des Substratspektrums von DSM 329 und DSM 40062 wurden Rohextrakte beider Stämme für die Biotransformation der in Tabelle 3.2 aufgeführten DKPs verwendet (Dreifachbestimmung).

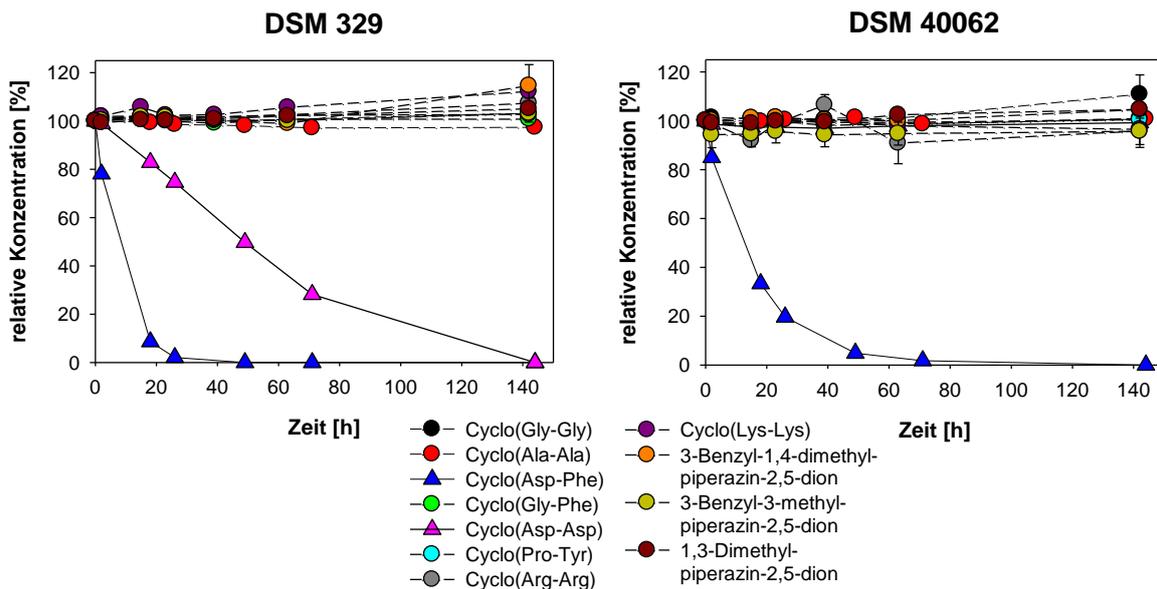


Abbildung 4.9: Relative Konzentrationsänderung von 11 verschiedenen DKPs durch den Rohextrakt von *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) (links) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) (rechts)
Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) (blau) durch beide Stämme und von Cyclo(Asp-Asp) (pink) durch DSM 329, kein Abbau der anderen DKPs

Für beide Stämme konnte die bereits beschriebene Aktivität gegenüber Cyclo(Asp-Phe) bestätigt werden (Abbildung 4.9). Für DSM 329 konnte darüber hinaus erstmals die Hydrolyse von Cyclo(Asp-Asp) gezeigt werden (Abbildung 4.9, links). Die weiteren untersuchten DKPs wurden von keinem der beiden Stämme hydrolysiert.

Bei den anschließenden Untersuchungen mittels Ganzzellbiotransformation wurden die Substrate untersucht, die im Rohextrakt abgebaut worden waren (Dreifachbestimmung).

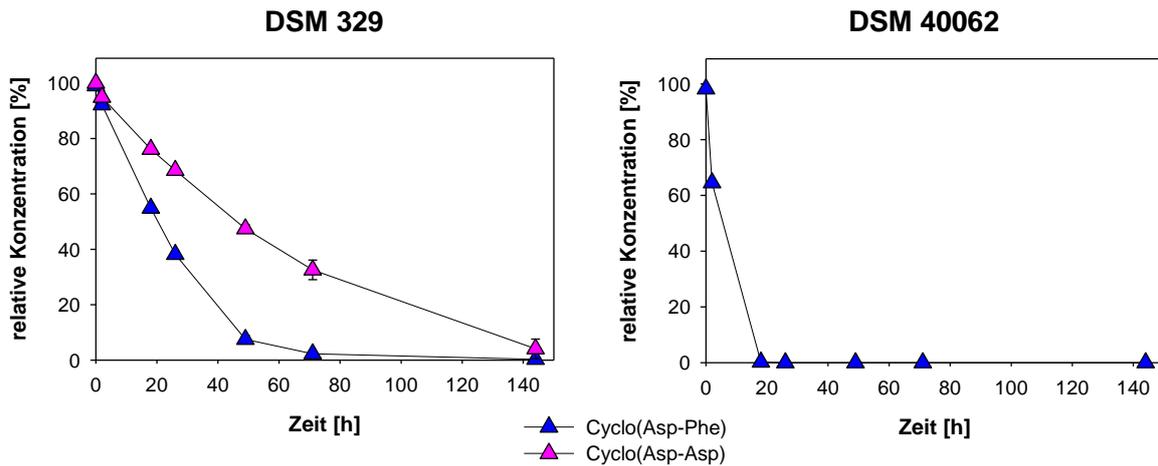


Abbildung 4.10: Relative Konzentrationsänderung von als hydrolysierbar identifizierten DKPs durch *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) (links) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) (rechts) während der Ganzzellbiotransformation

Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) (blau) durch beide Stämme und von Cyclo(Asp-Asp) (pink) durch DSM 329

Die Aktivitäten mit den Rohextrakten beider Stämme konnten bei der Ganzzellbiotransformation bestätigt werden. Sowohl der Umsatz von Cyclo(Asp-Phe) als auch die Aktivität gegenüber dem neu identifizierten Substrat Cyclo(Asp-Asp) konnte für DSM 329 gezeigt werden (Abbildung 4.10, links). Auch für DSM 40062 wurde die Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) mit ganzen Zellen nachgewiesen (Abbildung 4.10, rechts).

Da bei diesen Untersuchungen nicht die gleiche Zell- bzw. Proteinmenge für beide Stämme verwendet wurde, kann die Abnahme der Substrate mit der Zeit (wie in Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10 dargestellt) nicht direkt miteinander verglichen werden. Deswegen wurde die Aktivität bezogen auf die BTM (Ganzzellsystem) und die Aktivität bezogen auf den Proteingehalt (Rohextrakt) berechnet. Die Aktivitäten bezogen auf die BTM wurden aus der negativen Steigung ($\mu\text{mol}/\text{min}$) innerhalb der ersten zwei Stunden berechnet. Für die Berechnung der Aktivitäten bezogen auf den Proteingehalt wurde der Zeitraum zwischen 0 und 18 h ausgewählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11 dargestellt.

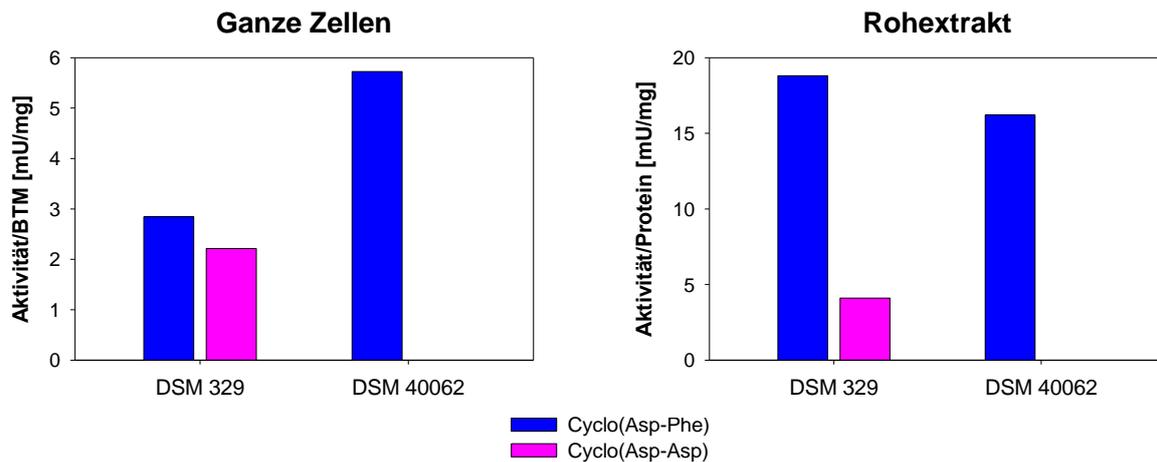


Abbildung 4.11: Aktivität von *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) gegenüber DKPs während der Biotransformation mit ganzen Zellen bezogen auf die BTM (links) und mit Rohextrakt bezogen auf den Proteingehalt (rechts)

Während der Ganzzellbiotransformation mit DSM 329 wurden mit 2,84 bzw. 2,21 mU/mg (Aktivität/BTM) gegenüber Cyclo(Asp-Phe) bzw. Cyclo(Asp-Asp) vergleichbare Aktivitäten bestimmt. DSM 40062 zeigte mit 5,72 mU/mg eine mehr als doppelt so hohe Aktivität gegenüber Cyclo(Asp-Phe) (Abbildung 4.11, links).

Im Rohextrakt wurde mit 18,80 mU/mg (Aktivität/Protein) für DSM 329 und 16,20 mU/mg für DSM 40062 eine ähnliche Aktivität für das Substrat Cyclo(Asp-Phe) bestimmt. Cyclo(Asp-Asp) wurde hingegen deutlich geringer (4,10 mU/mg) von DSM 329 umgesetzt.

Aufgrund der ermittelten Ergebnisse wurde Cyclo(Asp-Phe) bei allen weiteren Untersuchungen mit DSM 329 und DSM 40062 zur Enzymcharakterisierung und Proteinanreicherung als Substrat eingesetzt.

4.2.3.2 Produktbildung

Bei der Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) durch DSM 329 und DSM 40062 und Cyclo(Asp-Asp) durch DSM 329 wurden die gebildeten Produkte während der Biotransformation mit Rohextrakt untersucht.

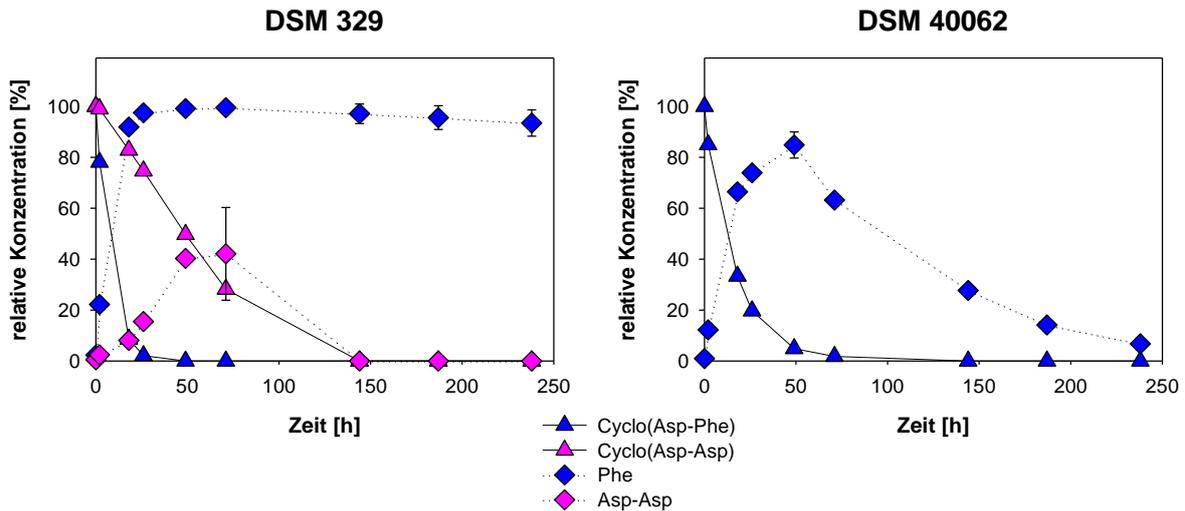


Abbildung 4.12: Relative Konzentrationsänderung der Substrate und Produkte durch *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) (links) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) (rechts) während der Biotransformation mit Rohextrakt

Abbau von Cyclo(Asp-Phe) unter Bildung von Phe durch beide Stämme (blau), sowie Hydrolyse von Cyclo(Asp-Asp) unter Bildung von Asp-Asp (pink) durch DSM 329

In Abbildung 4.12 ist die Substratabnahme und Produktzunahme für beide Stämme dargestellt. Bei der Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) wurde Phe als Produkt nachgewiesen; Asp wurde aufgrund der nicht möglichen Detektion bei einer Wellenlänge von 210 nm nicht mituntersucht. Zu keinem Zeitpunkt konnte eines der potentiell gebildeten Produkte Asp-Phe oder Phe-Asp detektiert werden.

Für DSM 329 wurde ein äquimolarer Abbau von Cyclo(Asp-Phe) und Bildung von Phe gezeigt (Abbildung 4.12, links). Beim Abbau von Cyclo(Asp-Asp) konnte das gebildete Dipeptid Asp-Asp nachgewiesen werden. Es konnten nur maximal 42 % nachgewiesen werden, da Asp-Asp vermutlich weiter hydrolysiert wurde. Nach 71 h war die Abbaurrate höher als die Bildungsrate. Für DSM 40062 wurde während der Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) nach 49 h mit 84 % das Maximum der Bildung von Phe gemessen.

4.2.3.3 Induktion der Aktivität

Für DSM 329 und DSM 40062 wurde untersucht, ob durch Zugabe eines Gemischs aus Cyclo(Gly-Gly), Cyclo(Ala-Ala) und Cyclo(Asp-Phe) zum Kultivierungsmedium (Induktion) die hydrolytische Aktivität gegenüber Cyclo(Asp-Phe) während der Ganzzellbiotransformation beeinflusst wird. Für DSM 40062 wurde außerdem getestet, ob die potentielle Induktion der Aktivität abhängig von der DKP-Konzentration im Medium ist. Bei den Biotransformationen handelte es sich jeweils um Doppelbestimmungen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 dargestellt.

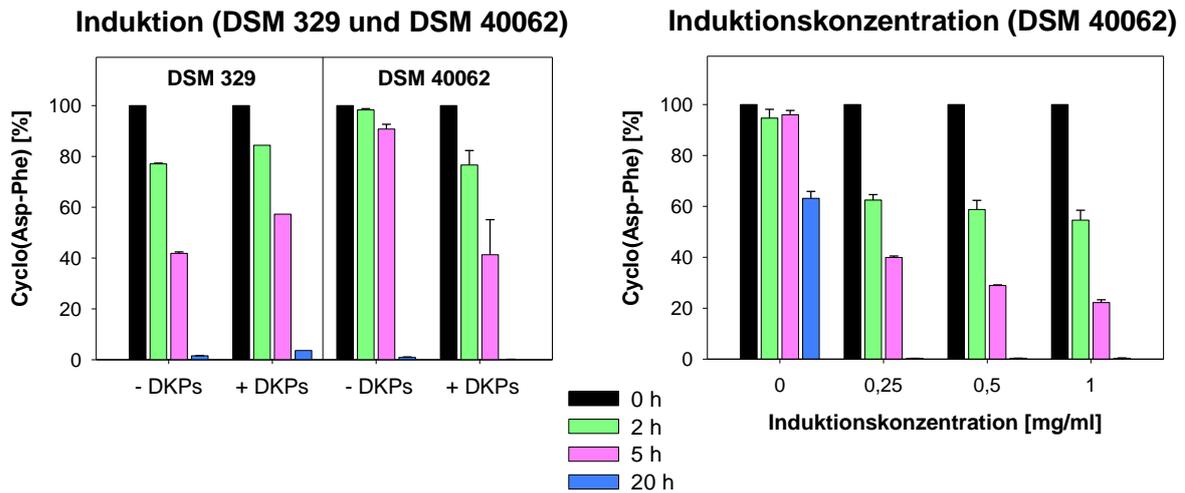


Abbildung 4.13: Einfluss der Induktion während der Kultivierung auf die hydrolytische Aktivität von Cyclo(Asp-Phe) für *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062)

Links: relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Asp-Phe) während der Ganzzellbiotransformation ohne (- DKP) und mit (+ DKP) vorheriger Induktion für DSM 329 und DSM 40062; für DSM 40062 Nachweis einer gesteigerten Hydrolyserate von Cyclo(Asp-Phe) nach Induktion

Rechts: relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Asp-Phe) während der Biotransformation mit Rohextrakt von DSM 40062 nach vorheriger Induktion mit unterschiedlichen Konzentrationen; Nachweis einer konzentrationsabhängigen Induktion der Aktivität

Für DSM 329 konnte kein signifikanter Unterschied bei der Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) nach der Kultivierung mit und ohne DKPs im Medium festgestellt werden (Abbildung 4.13, links). Hingegen war der Abbau von Cyclo(Asp-Phe) durch DSM 40062 deutlich gesteigert, wenn im Kultivierungsmedium DKPs enthalten waren. Die Induktion ist allerdings nicht zwingend erforderlich, da auch ohne vorherige Induktion Aktivität nachgewiesen wurde. Um jedoch die gesteigerte Aktivität zu nutzen, erfolgte bei allen in diesem Abschnitt (4.2.3) beschriebenen Experimenten eine Induktion während der Kultivierung von DSM 40062.

Es lag nahe, dass Cyclo(Asp-Phe) für die Induktion der Aktivität in DSM 40062 verantwortlich war, da die beiden anderen eingesetzten DKPs nicht hydrolysiert werden. Als nächster Schritt wurde daher für DSM 40062 untersucht, ob die Aktivitätssteigerung abhängig von der Cyclo(Asp-Phe) Konzentration im Kultivierungsmedium ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) im Rohextrakt mit steigender Induktionskonzentration von 0,25 bis 1 mg/ml beschleunigt wurde, jedoch war dieser Effekt geringer als die Aktivitätssteigerung zwischen keiner Induktion (0 mg/ml) und der Induktion mit 0,25 mg/ml Cyclo(Asp-Phe) (Abbildung 4.13, rechts).

4.2.3.4 Enzyminhibierung

Um eine mögliche Inhibierung der DKP-Hydrolasen von DSM 329 und DSM 40062 zu bestimmen, wurden die Rohextrakte in Gegenwart von Peptidaseinhibitoren (Tabelle 3.14) auf ihre hydrolytische Aktivität gegenüber Cyclo(Asp-Phe) untersucht (Doppelbestimmung). Zur Klassifizierung der Enzyme wurden ein Metallopeptidaseinhibitor (EDTA), ein Cysteinpeptidaseinhibitor (E-64), ein Aspartatpeptidaseinhibitor (Pepstatin) und ein Serinpeptidaseinhibitor (PMSF) eingesetzt und mit einer Kontrolle ohne Inhibitor verglichen. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit Methanol getestet, um einen Einfluss des Lösungsmittels zweier Inhibitoren auf die Enzymaktivität auszuschließen.

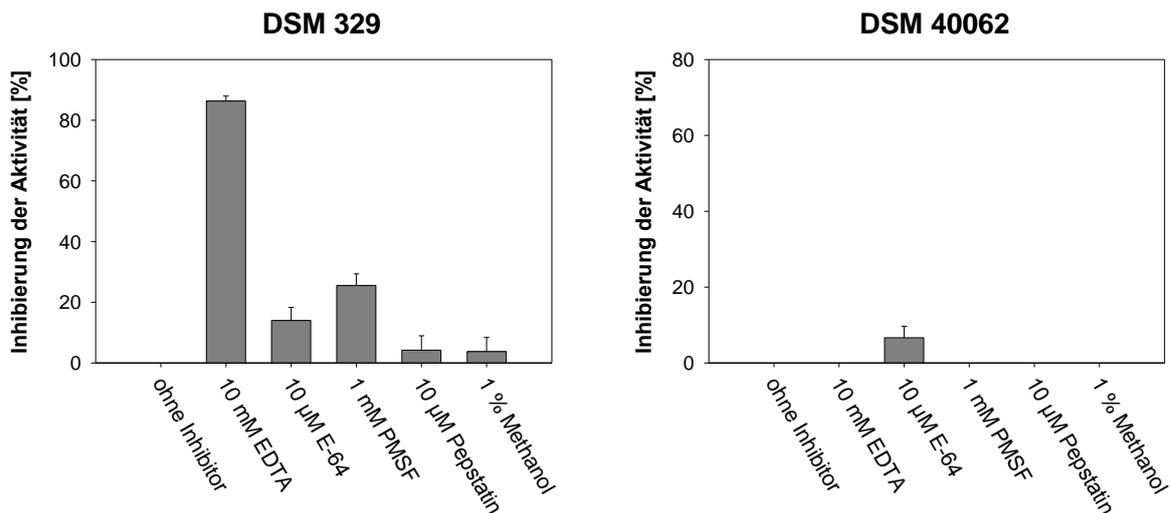


Abbildung 4.14: Inhibierung der Aktivität von *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) (links) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) (rechts) mit und ohne Peptidaseinhibitoren und Methanol

DSM 329: Starke Inhibierung der Enzymaktivität durch EDTA (Metallopeptidaseinhibitor) und schwache Inhibierung durch E-64 (Cysteinpeptidaseinhibitor) und PMSF (Serinpeptidaseinhibitor)

DSM 40062: keine signifikante Inhibierung der Aktivität durch einen der Peptidaseinhibitoren

Die Inhibierung der Aktivität in Prozent wurde bezogen auf den Ansatz ohne Inhibitor berechnet. Für DSM 329 (Abbildung 4.14, links) konnte gezeigt werden, dass die Vergleichskontrolle mit Methanol und der Inhibitor Pepstatin mit je 4 % Inhibierung keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hatten. E-64 und PMSF bewirkten mit 14 % bzw. 25 % eine schwache Inhibierung der Aktivität. Den stärksten Effekt auf die Enzymaktivität zeigte der Metallopeptidaseinhibitor EDTA mit einer Inhibierung von 86 %.

Für DSM 40062 (Abbildung 4.14, rechts) hatten Methanol und die Inhibitoren EDTA, PMSF und Pepstatin in den genannten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. Nur E-64 zeigte mit 6 % einen geringen inhibitorischen Effekt, wobei dieser Wert im Bereich der Schwankungen lag.

4.2.3.5 Proteinanreicherung mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung

Die DKP-hydrolysierenden Enzyme aus DSM 329 und DSM 40062 wurden in einem ersten Aufreinigungsschritt mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung (20, 40, 60 und 80 % Ammoniumsulfatsättigung) angereichert. Von dem jeweiligen Überstand und Pellet wurde die Hydrolyserate von Cyclo(Asp-Phe) bestimmt.

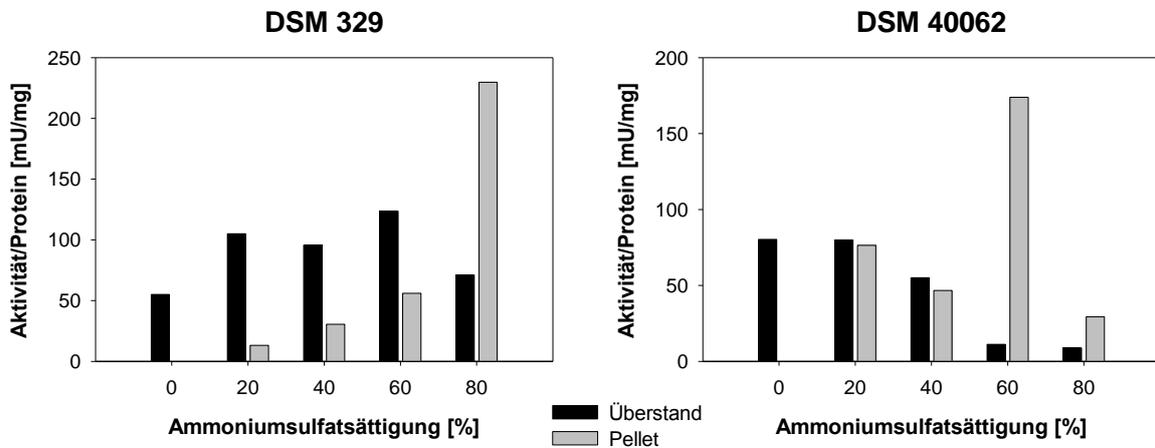


Abbildung 4.15: Aktivität bezogen auf den Proteingehalt der Überstände und Pellets nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung für *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) (links) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) (rechts)

DSM 329: höchste Aktivität/Protein im Pellet nach Fällung mit 80 % Ammoniumsulfatsättigung

DSM 40062: höchste Aktivität/Protein im Pellet nach Fällung mit 60 % Ammoniumsulfatsättigung

In Abbildung 4.15 sind die Aktivitäten bezogen auf den Proteingehalt der Fraktionen nach der Ammoniumsulfatfällung dargestellt.

Für DSM 329 wurde die höchste Aktivität/Protein mit 230 mU/mg im Pellet nach der Fällung mit 80 % Ammoniumsulfatsättigung nachgewiesen; außerdem war die Aktivität im Überstand dieser Sättigung geringer als bei den Überständen mit niedrigerer Ammoniumsulfatsättigung (Abbildung 4.15, links). Dies lässt darauf schließen, dass das Enzym, welches für die Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) verantwortlich ist, bei einer Ammoniumsulfatsättigung von ca. 80 % ausgefällt wird.

Für DSM 40062 wurde nach der Fällung mit 60 % Ammoniumsulfatsättigung die höchste Hydrolyserate mit 173 mU/mg im Pellet gemessen; im Überstand dieser Fraktion wurde nur ein geringer Substratabbau detektiert, was darauf hindeutet, dass bei diesem Stamm das DKP-hydrolysierende Enzym bei einer Ammoniumsulfatsättigung von ca. 60 % ausgefällt wird.

Die Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung beider Stämme wurden mittels SDS-PAGE untersucht (siehe Abbildung 4.16).

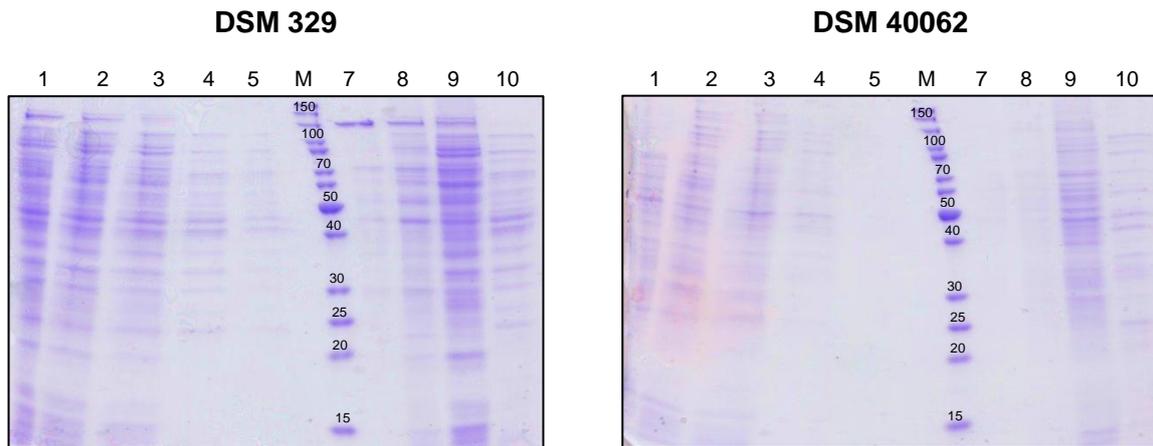


Abbildung 4.16: SDS-PAGE Gel der Überstände und Pellets nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung von *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) (links) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) (rechts)

Spur 1 - 5: Überstände von 0 % (entspricht Rohextrakt vor der Fällung) (1), 20 % (2), 40 % (3), 60 % (4) und 80 % (5) Ammoniumsulfatsättigung

M: Marker (angegebene Werte: Molekulargewicht in kDa)

Spur 7 - 10: Pellets von 20 % (7), 40 % (8), 60 % (9) und 80 % (10) Ammoniumsulfatsättigung

Aufgrund der nachgewiesenen Aktivitäten sollte für DSM 329 eine angereicherte Bande im Pellet nach der Fällung mit 80 % Ammoniumsulfatsättigung (Spur 10 in Abbildung 4.16, links) und für DSM 40062 im Pellet nach der Fällung mit 60 % Ammoniumsulfatsättigung (Spur 9 in Abbildung 4.16, rechts) sichtbar sein. Da keine Molekulargewichte der DKP-hydrolysierenden Enzyme bekannt sind, ist keine eindeutige Zuordnung der gesuchten Proteine möglich.

Für beide Stämme ist zu erkennen, dass mit zunehmender Ammoniumsulfatsättigung die Proteinkonzentration und die Anzahl der Banden im Rohextrakt abnimmt und im Pellet (bis 60 %) zunimmt.

Zur Quantifizierung der Proteinanreicherung wurden die Gesamtproteinmenge, die Gesamtaktivität, die Aktivität/Protein (entspricht Abbildung 4.15), die Ausbeute und der Reinigungsfaktor der Überstände und Pellets berechnet (siehe Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: Quantifizierung der Proteinanreicherung mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung für *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062)

Ü: Überstand, P: Pellet

Stamm	Probe	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [mU]	Aktivität/Protein [mU/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
DSM 329	Rohextrakt	9,5	521,9	55,1	100	1,0
	Ü 20 % Sättigung	9,0	946,3	105,1	181	1,9
	P 20 % Sättigung	0,4	4,7	13,2	1	0,2
	Ü 40 % Sättigung	6,1	581,2	95,6	78	1,7
	P 40 % Sättigung	0,6	19,3	30,5	3	0,6
	Ü 60 % Sättigung	2,5	307,1	123,6	72	2,2
	P 60 % Sättigung	1,5	85,0	56,0	20	1,0
	Ü 80 % Sättigung	1,3	88,9	71,0	45	1,3
	P 80 % Sättigung	0,4	80,2	229,7	41	4,2
DSM 40062	Rohextrakt	3,7	298,0	80,3	100	1,0
	Ü 20 % Sättigung	4,8	380,3	79,7	128	1,0
	P 20 % Sättigung	0,1	8,4	76,4	3	1,0
	Ü 40 % Sättigung	3,9	213,4	55,1	71	0,7
	P 40 % Sättigung	0,2	9,8	46,7	3	0,6
	Ü 60 % Sättigung	1,7	19,5	11,2	12	0,1
	P 60 % Sättigung	0,5	94,7	173,9	61	2,2
	Ü 80 % Sättigung	1,0	8,6	8,7	69	0,1
	P 80 % Sättigung	0,2	6,3	29,3	51	0,4

Die Gesamtproteinmenge und die Gesamtaktivität nimmt im Verlauf der Fällung ab (vgl. Tabelle 4.7). Dies lässt sich damit erklären, dass für jeden Fällungsschritt nicht der gesamte Überstand des vorherigen Fällungsschritts verwendet wurde (vgl. Tabelle 3.12), da Teile davon für die Protein- und Aktivitätsbestimmung eingesetzt wurden. Um die Effizienz der einzelnen Fällungsschritte zu bestimmen, wurde die Ausbeute je aus der Differenz der eingesetzten Gesamtaktivität (Werte nicht in Tabelle gezeigt) und der erhaltenen Gesamtaktivität berechnet.

Bei den letzten drei Fällungsschritten konnte für DSM 329 eine Ausbeute (Summe von Überstand und Pellet) zwischen 81 und 92 % erzielt werden. Im ersten Fällungsschritt betrug die Ausbeute 182 %. Mit zunehmender Ammoniumsulfatsättigung stieg die Ausbeute im Pellet, bei gleichzeitiger Abnahme im Überstand, auf 41 % an. Der höchste Reinigungsfaktor wurde mit 4,2 im Pellet nach der Fällung mit 80 % Ammoniumsulfatsättigung erreicht.

Für DSM 40062 wurden für die letzten drei Fällungsschritte Ausbeuten zwischen 73 und 120 % ermittelt. Die Ausbeute im Pellet erreichte mit 61 % ihr Maximum bei einer Ammoniumsulfatsättigung von 60 %. In dieser Fraktion wurde mit 2,2 der höchste Reinigungsfaktor bestimmt.

4.2.3.6 Proteinanreicherung mittels Ionenaustauschchromatographie

Die Enzyme, die für die DKP-Hydrolyse in DSM 329 und DSM 40062 verantwortlich sind, sollten mittels Ionenaustauschchromatographie mit einem starken Anionenaustauscher aufgereinigt werden. Da die Elution der Proteine mit einem Gradienten bis zu einer Endkonzentration von 1 M KCl erfolgen sollte, wurde zunächst für beide Stämme die Enzymaktivität in Gegenwart von 1 M KCl überprüft. Es konnte kein Aktivitätsverlust identifiziert werden und somit wurde KCl als Elutionsmittel bei der Aufreinigung verwendet. Im Folgenden werden die Chromatogramme, SDS-PAGE Gele und die ermittelten Aktivitäten der Proteinanreicherung beider Stämme gezeigt.

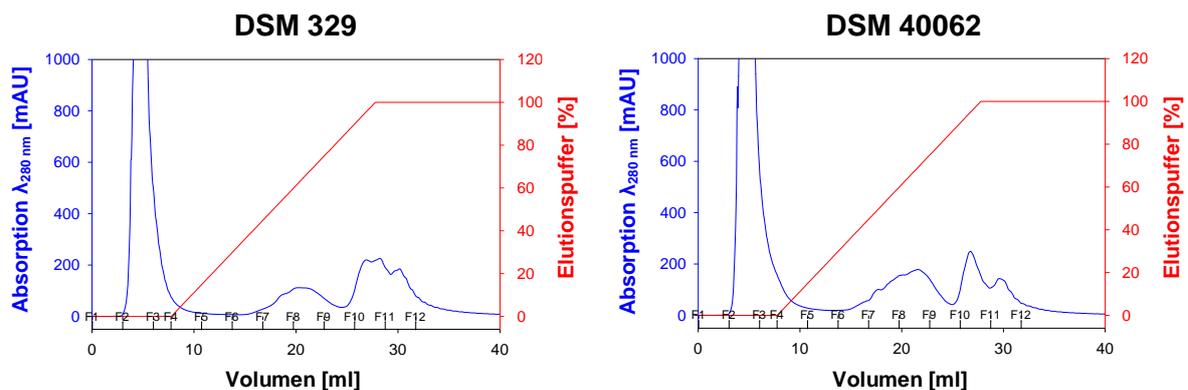


Abbildung 4.17: Chromatogramme der Proteinanreicherung mittels Ionenaustauschchromatographie mit linearem KCl-Gradienten für *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) (links) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) (rechts)

Bei der Ionenaustauschchromatographie (siehe Abbildung 4.17) erfolgte der Durchfluss bei einem Volumen von 0 bis 8 ml (Fraktionen F1 bis F4). Daraufhin wurden die Proteine mittels linearem KCl-Gradienten eluiert, wobei für beide Stämme ein erster Proteinpeak ab F6 bis F10 bei einer KCl Konzentration zwischen ca. 0,3 und 0,9 M und ein zweiter Proteinpeak ab F10 bei einer KCl Konzentration von ca. 0,9 M beobachtet werden konnte.

Anhand der Chromatogramme wurden für DSM 329 die Fraktionen F2, F7, F8, F9 und F10 + F11 (1/1) und für DSM 40062 die Fraktionen F2 + F3 (1/1), F6 + F7 (1/1), F8, F9 und F10 für die Bestimmung der Enzymaktivität gegenüber Cyclo(Asp-Phe) ausgewählt (siehe Abbildung 4.18).

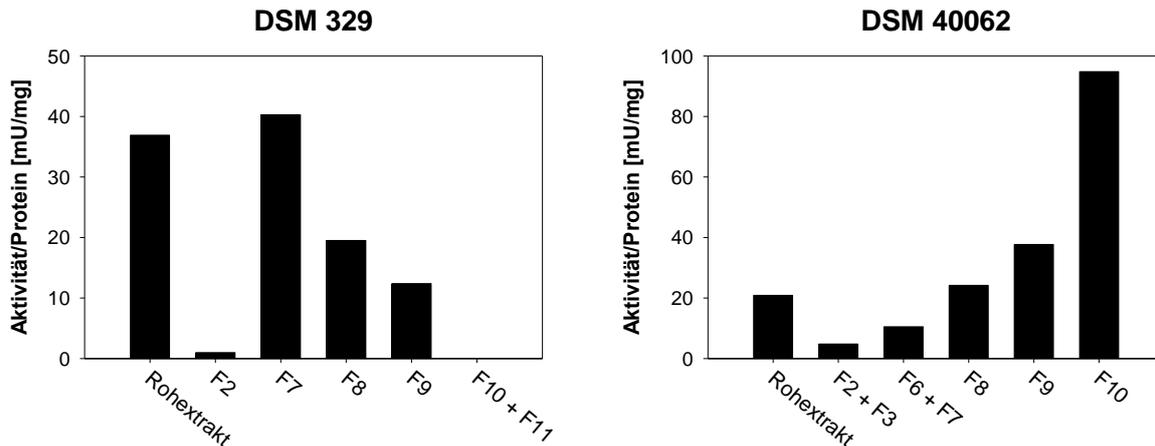


Abbildung 4.18: Aktivität bezogen auf den Proteingehalt im Rohextrakt und verschiedenen Fraktionen (F) nach der Proteinanreicherung mittels Anionenaustauscher für *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) (links) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) (rechts)

DSM 329: höchste Aktivität/Protein in F7, sowie Aktivitätsnachweis in F8, F9 (und F2)

DSM 40062: höchste Aktivität/Protein in F10, sowie Aktivitätsnachweis in F6 + F7, F8, F9 (und F2 + F3)

Für DSM 329 wurde Aktivität im ersten Elutionspeak (F7, F8 und F9) (vgl. Abbildung 4.17) nachgewiesen, dabei wurde die höchste Aktivität/Protein mit 40,3 mU/mg in Fraktion 7 (ca. 0,45 M KCl) bestimmt (Abbildung 4.18, links). Im zweiten Elutionspeak (F10 + F11) konnte keine Aktivität ermittelt werden.

Bei der Proteinanreicherung mit DSM 40062 wurde in allen Elutionsfraktionen Aktivität nachgewiesen (Abbildung 4.18, rechts). Die höchste Aktivität je Protein wurde zwar mit 94,8 mU/mg in F10 gemessen, ist jedoch auf eine sehr geringe Proteinkonzentration von 0,006 mg/ml zurückzuführen. Zudem enthielt diese Fraktion eine sehr geringe Gesamtaktivität (vgl. Tabelle 4.8). Da in den Fraktionen F8 und F9 (ca. 0,6 und 0,75 M KCl) ebenfalls erhöhte Aktivitäten/Protein und höhere Gesamtaktivitäten (vgl. Tabelle 4.8) bestimmt wurden, ist anzunehmen, dass das gesuchte Protein überwiegend in diesen Fraktionen eluiert worden war.

Da bei beiden Proteinanreicherungen keine signifikante Aktivität im Durchfluss (F2 bzw. F2 + F3) detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass die Säule nicht überladen worden war und die gesuchten Proteine vollständig an die Säule gebunden hatten.

Von den Fraktionen, für die die Aktivität überprüft worden war, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Die für die Aktivitätsbestimmung zusammengeführten Fraktionen wurden einzeln aufgetragen.

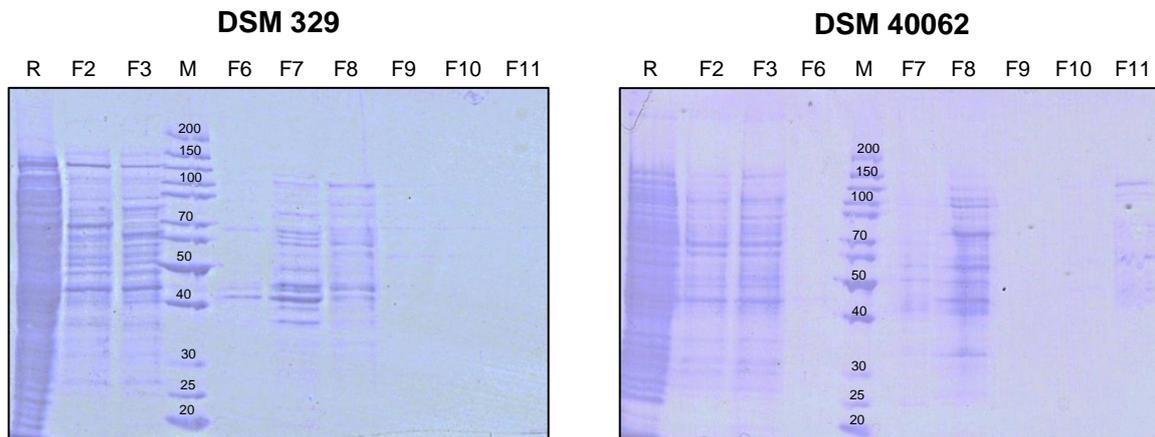


Abbildung 4.19: SDS-PAGE Gel ausgewählter Fraktionen der Proteinanreicherung mittels Ionenaustauschchromatographie von *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) (links) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) (rechts)

R: Rohextrakt vor der Ionenaustauschchromatographie

F2 - F11: Fraktionen 2 bis 11 der Ionenaustauschchromatographie (vgl. Abbildung 4.17)

M: Marker (angegebene Werte: Molekulargewicht in kDa)

In Abbildung 4.19 ist zu erkennen, dass sich die höchste Proteinkonzentration im Rohextrakt beider Stämme befand; darüber hinaus zeigten sich viele Proteinbanden im Durchfluss (F2, F3). In F6, F7, F8 und F9 des Gels von DSM 329 (Abbildung 4.19, links) wurden weitere Proteinbanden detektiert, wobei die meisten Banden in F7 und F8 auftraten. Für DSM 40062 (Abbildung 4.19, rechts) wurden in F7, F8 und F11 Proteinbanden detektiert, wobei in F8 die meisten Proteine nachgewiesen werden konnten.

Zur Quantifizierung der Proteinanreicherung wurden die Gesamtproteinmenge, die Gesamtaktivität, die Aktivität/Protein (entspricht Abbildung 4.18), die Ausbeute und der Reinigungsfaktor der Überstände und Pellets berechnet (siehe Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: Quantifizierung der Proteinanreicherung mittels Ionenaustauschchromatographie für *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062)

Stamm	Probe	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [mU]	Aktivität/Protein [mU/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
DSM 329	Rohextrakt	4,73	174,5	36,9	100	1,0
	F2	0,59	0,6	0,98	0	0,0
	F7	0,55	22,3	40,3	13	1,1
	F8	0,73	14,2	19,5	8	0,5
	F9	0,20	2,5	12,4	1	0,3
	F10 + F11	0,01	0,0	0,0	0	0,0
DSM 40062	Rohextrakt	6,19	129,2	20,9	100	1,0
	F2 + F3	0,42	2,0	4,8	2	0,2
	F6 + F7	0,22	2,3	10,5	2	0,2
	F8	0,91	22,0	24,2	17	1,2
	F9	0,31	11,6	37,7	9	1,8
	F10	0,02	1,8	94,8	1	4,5

Für DSM 329 wurde lediglich ein Reinigungsfaktor von 1,1 in Fraktion 7 erzielt. In dieser Fraktion wurde mit 13 % die höchste Ausbeute erreicht.

Der höchste Reinigungsfaktor für DSM 40062 wurde mit 4,5 in F10 ermittelt, jedoch mit einer sehr geringen Ausbeute von 1 %. Die Fraktionen F8 und F9 sind mit einer Ausbeute von 17 und 9 % und einem Reinigungsfaktor von 1,2 und 1,8 als interessanter einzustufen.

4.2.4 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität

Die in Tabelle 3.7 und Tabelle 3.8 aufgeführten Stämme mit beschriebener cyclische Amidase Aktivität wurden auf ihre hydrolytische Aktivität gegenüber den DKPs Cyclo(Gly-Gly), Cyclo(Ala-Ala), Cyclo(Asp-Phe), Cyclo(Gly-Phe), Cyclo(Asp-Asp), Cyclo(Pro-Tyr), (S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion, 3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion und 1,3-Dimethylpiperazin-2,5-dion geprüft. Des Weiteren wurde Dihydrouracil als Positivkontrolle für die Aktivitätsüberprüfung der cyclische Amidase Stämme ausgewählt. Da die Stämme zuvor noch nicht unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen untersucht worden waren, sollte die Aktivität gegenüber Dihydrouracil gezeigt werden. Darüber hinaus sollten institutsinterne, nicht veröffentlichte Ergebnisse zur Hydrolyse von Dihydrouracil durch einige Stämme bestätigt werden. Für wenige Stämme war der Umsatz dieses Substrats zuvor noch nicht untersucht worden.

Es wurden vier Versuchsdurchgänge vorgenommen, in denen Durchgang für Durchgang Aktivitäten bestätigt bzw. widerlegt wurden. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Durchgänge für alle Stämme ist in Tabelle 4.9 dargestellt. Auf die Ergebnisse der Durchgänge wird in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen.

4.2.4.1 Aktivitätsuntersuchungen mit 35 Stämmen (1. Durchgang)

Im ersten Durchgang wurden alle 35 Stämme und NaPP Puffer (50 mM, pH7,5) als Negativkontrolle mit den genannten DKPs und Dihydrouracil in der Ganzzellbiotransformation (Einfachbestimmung) getestet (Abbildung 4.20 bis Abbildung 4.25).

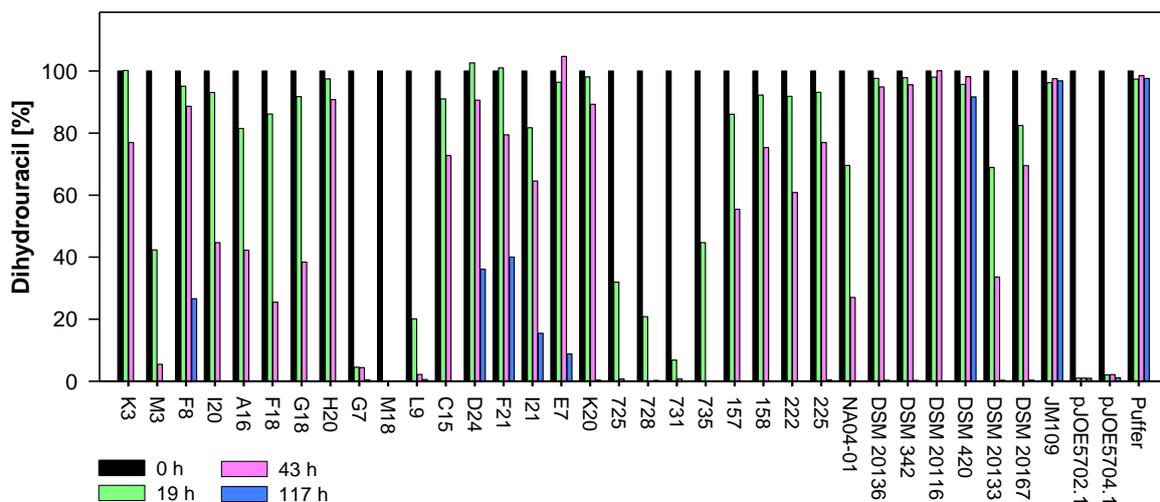


Abbildung 4.20: Relative Konzentrationsänderung der Positivkontrolle Dihydrouracil durch 35 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und einer Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation

Abbau von Dihydrouracil durch alle getesteten Stämme, außer *E. coli* JM 109

In Abbildung 4.20 sind die Ergebnisse dieser Stämme mit dem als Positivkontrolle ausgewählten Dihydrouracil gezeigt. Mit allen Stämmen bis auf *Arthrobacter* sp. E7,

Arthrobacter aureescens (DSM 20116), *Arthrobacter nicotinovorans* (DSM 420) und *E. coli* JM109 konnte eine kontinuierliche, eindeutige Abnahme des Substrats gemessen werden. Mit den beiden erstgenannten Stämmen wurde erst nach 117 h kaum oder kein Substrat mehr nachgewiesen. Für *Arthrobacter nicotinovorans* (DSM 420) wurde eine sehr geringe Dihydrouracilabnahme gemessen. Der Wildtypstamm *E. coli* JM109 wurde als Vergleichsstamm zu den beiden rekombinanten Stämmen *E. coli* JM109 mit pJOE5702.1 (Hydantoinasegen aus *Ochrobactrum* sp. G21) und *E. coli* JM109 mit pJOE5704.1 (Hydantoinasegen aus *Delftia* sp. I24) eingesetzt. Beschrieben war die Aktivität gegenüber Dihydrouracil für die beiden Wildtypstämme *Ochrobactrum* sp. G21 und *Delftia* sp. I24 (Dürr et al. 2006), nicht aber für die beiden rekombinanten *E. coli* Stämme. Für diese beiden Stämme konnte damit erstmalig gezeigt werden, dass die rekombinant exprimierten Enzyme Dihydrouracil abbauen können. Auch für *Rhizobium* sp. NA04-01 wurde zum ersten Mal die Hydrolyse von Dihydrouracil nachgewiesen.

Für die untersuchten Stämme eignete sich Dihydrouracil als Positivkontrolle sehr gut, da alle Stämme (außer *E. coli* Wildtypstamm) dieses Substrat unter den hier verwendeten Bedingungen abbauen konnten.

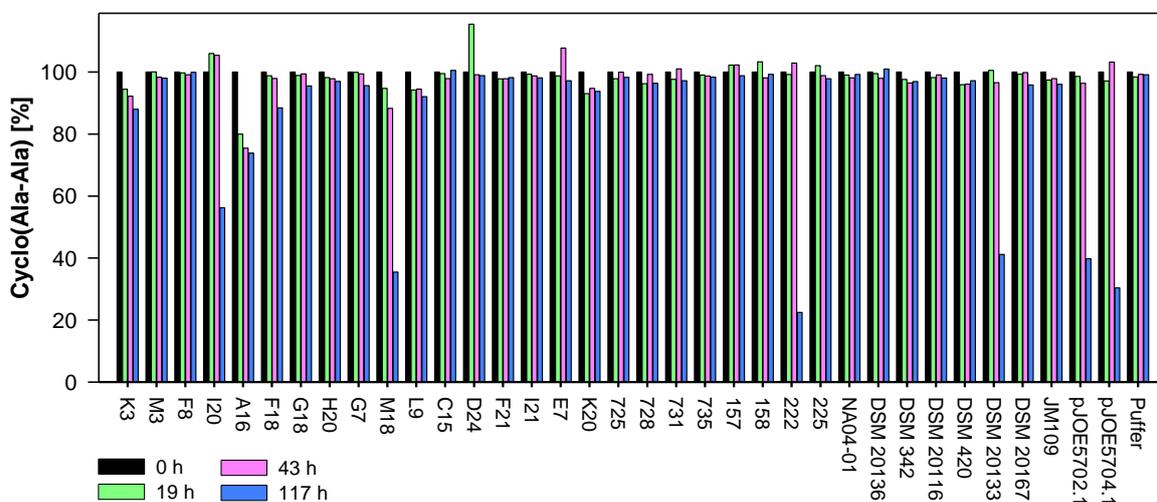


Abbildung 4.21: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Ala-Ala) durch 35 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und einer Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation

Abbau von Cyclo(Ala-Ala) durch *Leifsonia* sp. K3, *Streptomyces* sp. I20, *Bacillus* sp. A16, *Bacillus* sp. F18, *Pseudomonas* sp. M18, Stamm 222, *Arthrobacter citreus* (DSM 20133) und *E. coli* mit pJOE5702.1 und mit pJOE5704.1

Der Abbau von Cyclo(Ala-Ala) durch die cyclische Amidase Stämme ist in Abbildung 4.21 dargestellt. Die Stämme *Leifsonia* sp. K3, *Bacillus* sp. A16, *Bacillus* sp. F18, *Pseudomonas* sp. M18 und *E. coli* mit pJOE5702.1 zeigten eine kontinuierliche Substratabnahme oberhalb des Schwankungsbereichs. *Streptomyces* sp. I20, Stamm 222, *Arthrobacter citreus*

(DSM 20133) und *E. coli* mit pJOE5704.1 bewirkten ebenfalls eine Abnahme von Cyclo(Ala-Ala), jedoch erst nach 117 h.

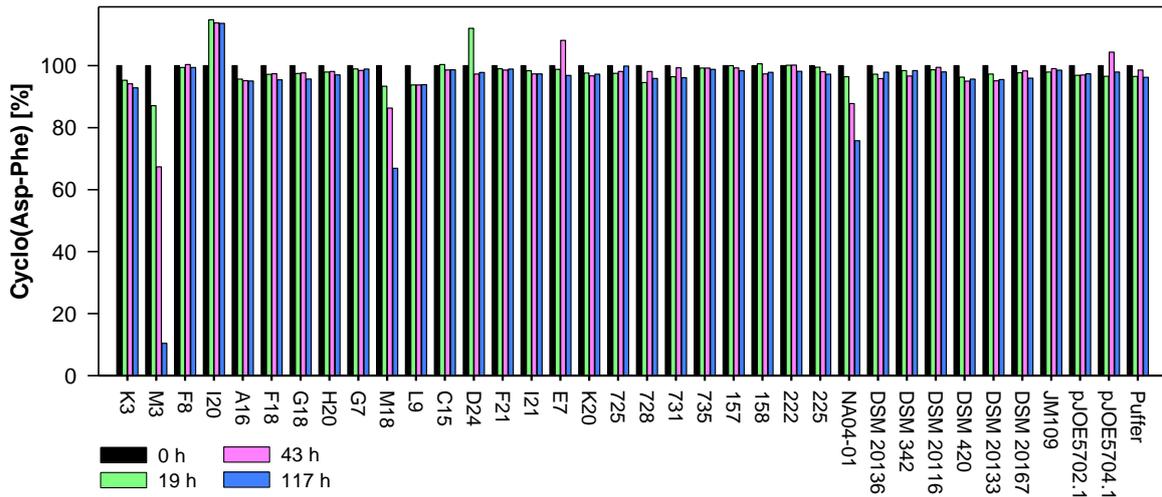


Abbildung 4.22: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Asp-Phe) durch 35 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und einer Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation

Abbau von Cyclo(Asp-Phe) durch *Burkholderia* sp. M3, *Pseudomonas* sp. M18 und *Rhizobium* sp. NA04-01

Mit den Bakterien *Burkholderia* sp. M3, *Pseudomonas* sp. M18 und *Rhizobium* sp. NA04-01 wurde eine eindeutige, kontinuierliche Abnahme des Substrats Cyclo(Asp-Phe) nachgewiesen (Abbildung 4.22).

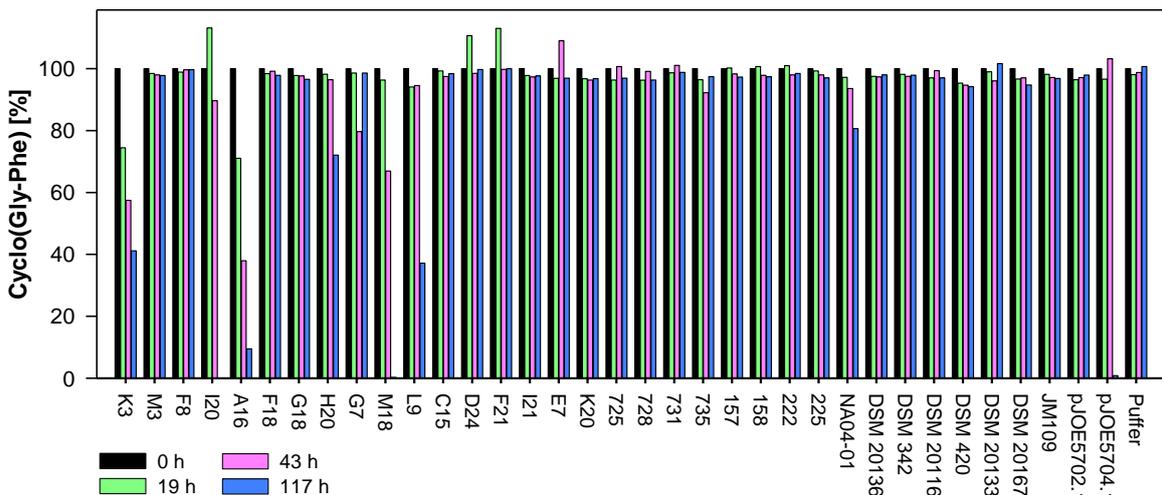


Abbildung 4.23: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Gly-Phe) durch 35 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und einer Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation

Abbau von Cyclo(Gly-Phe) durch *Leifsonia* sp. K3, *Streptomyces* sp. I20, *Bacillus* sp. A16, *Bacillus* sp. H20, *Pseudomonas* sp. M18, *Pseudomonas* sp. L9, *Rhizobium* sp. NA04-01 und *E. coli* mit pJOE5704.1

Die Ergebnisse der Biotransformation mit Cyclo(Gly-Phe) sind in Abbildung 4.23 dargestellt. *Leifsonia* sp. K3, *Bacillus* sp. A16, *Pseudomonas* sp. M18 und *Rhizobium* sp. NA04-01 zeigten eine eindeutige, kontinuierliche Substratabnahme. *Streptomyces* sp. I20, *Bacillus* sp. H20, *Pseudomonas* sp. L9 und *E. coli* mit pJOE5704.1 zeigten zu späteren Zeitpunkten ebenfalls eine Substratabnahme.

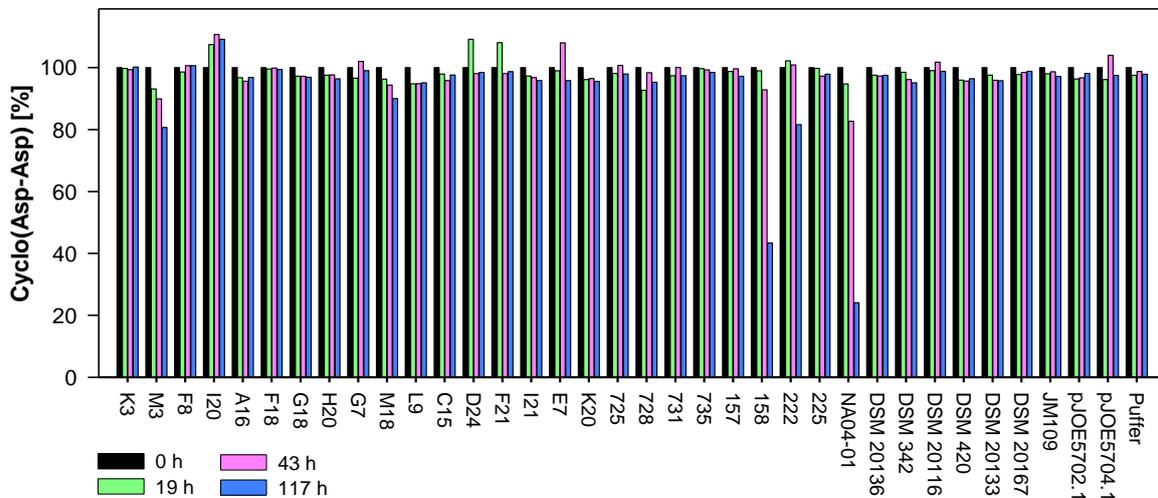


Abbildung 4.24: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Asp-Asp) durch 35 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und einer Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation

Abbau von Cyclo(Asp-Asp) durch *Burkholderia* sp. M3, *Pseudomonas* sp. M18, Stamm 158, Stamm 222 und *Rhizobium* sp. NA04-01

Mit *Burkholderia* sp. M3, *Pseudomonas* sp. M18, Stamm 158 und *Rhizobium* sp. NA04-01 wurde eine eindeutige, kontinuierliche Abnahme von Cyclo(Asp-Asp) detektiert (Abbildung 4.24). Mit dem Stamm 222 wurde erst nach 117 h eine Substratabnahme gemessen.

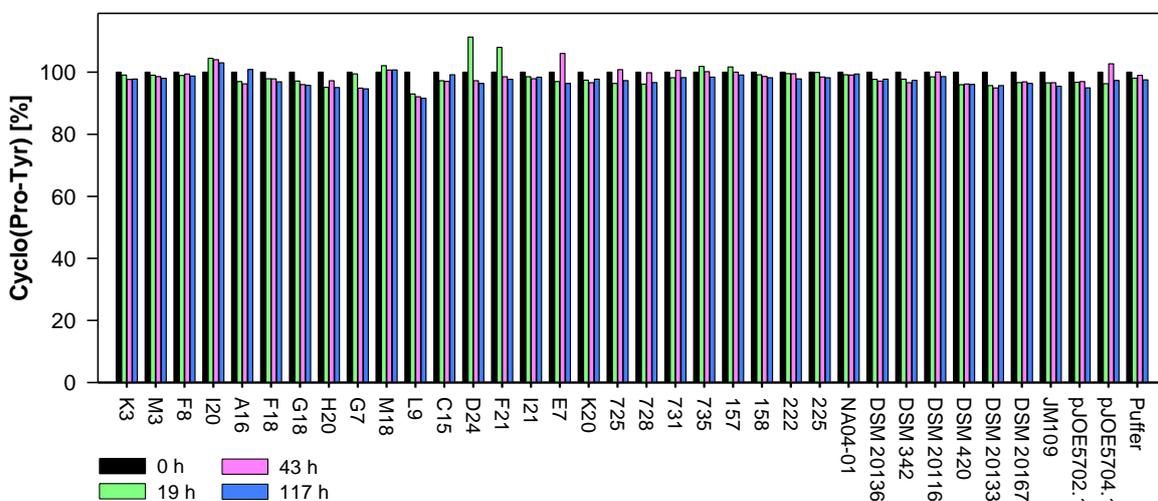


Abbildung 4.25: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Pro-Tyr) durch 35 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und einer Negativkontrolle (50 mM NaPP Puffer, pH 7,5) während der Ganzzellbiotransformation

Abbau von Cyclo(Pro-Tyr) durch *Pseudomonas* sp. L9

Gegenüber dem Substrat Cyclo(Pro-Tyr) zeigte nur der Stamm *Pseudomonas* sp. L9 eine geringe Aktivität (Abbildung 4.25).

Für die Substrate Cyclo(Gly-Gly), (S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion, 3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion und 1,3-Dimethylpiperazin-2,5-dion wurde mit keinem der 35 Stämme eine Substratabnahme nachgewiesen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Da bei dem ersten Versuchsdurchgang aufgrund der sehr großen Probenanzahl jeweils nur Einfachbestimmungen durchgeführt werden konnten, wurde die Aktivität aller als sehr wahrscheinlich aktiv und eventuell aktiv eingestuften Stämme (vgl. Tabelle 4.9) in einem zweiten und teilweise dritten Durchgang überprüft (Dreifachbestimmung). Dabei wurde für einige Stämme die Aktivität widerlegt und daher nicht weiter verfolgt. Für drei Stämme konnte geringe Aktivität gezeigt werden (siehe folgender Abschnitt). Die in den ersten drei Durchgängen nicht eindeutige Hydrolyse von Cyclo(Ala-Ala) durch die beiden rekombinanten *E. coli* Stämme (vgl. Tabelle 4.9) wurde erneut untersucht (siehe Abschnitt 4.2.4.3). Für drei Stämme wurde die Aktivität eindeutig bestätigt und diese wurden für weitere Untersuchungen eingesetzt (siehe Abschnitt 4.2.4.4).

4.2.4.2 Aktivitätsuntersuchungen mit ausgewählten Stämmen (2. und 3. Durchgang)

Die Aktivitäten aller Stämme, die im 2. und 3. Durchgang untersucht wurden, sind in Tabelle 4.9 dargestellt.

Mit den Stämmen *Bacillus* sp. F18, *Pseudomonas* sp. M18 und Stamm 222 wurde im 2. und 3. Durchgang eindeutige Aktivität gegenüber der Positivkontrolle Dihydrouracil und geringe Aktivität gegenüber Cyclo(Ala-Ala) während der Ganzzellbiotransformation nachgewiesen. Die DKP-Abnahme begann im 3. Durchgang erst nach 22 h (Abbildung 4.26).

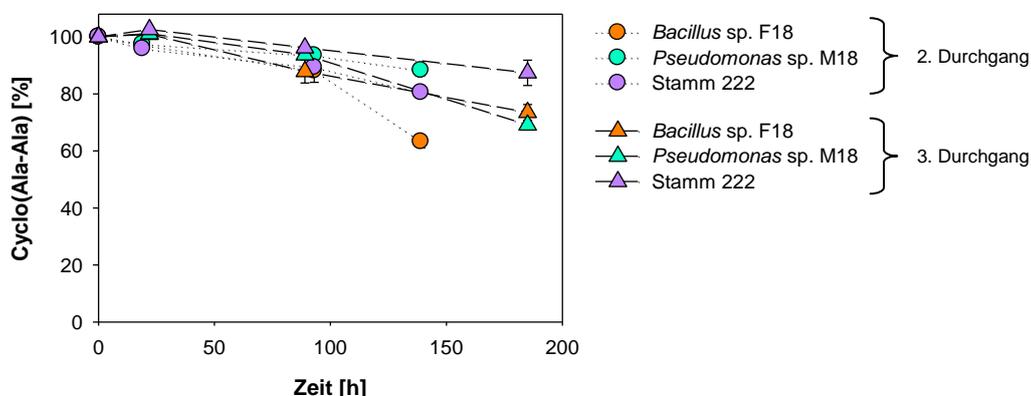


Abbildung 4.26: Relative Konzentrationsänderung von Cyclo(Ala-Ala) durch *Bacillus* sp. F18, *Pseudomonas* sp. M18 und Stamm 222 während der Ganzzellbiotransformation im 2. und 3. Versuchsdurchgang

Hydrolyse von Cyclo(Ala-Ala) durch alle drei Stämme in beiden Versuchsdurchgängen

Für die drei Stämme lag der Umsatz von Cyclo(Ala-Ala) zwischen 12 % für *Pseudomonas* sp. M18 und 37 % für *Bacillus* sp. F18 (2. Durchgang). Im Rohextrakt konnte für diese Stämme Aktivität gegenüber Dihydrouracil detektiert, jedoch keine Hydrolyse von Cyclo(Ala-Ala) nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Da die beschriebene Aktivität verhältnismäßig gering und teilweise nicht kontinuierlich war, wurden diese drei Stämme nicht für die Weiterführung der Versuchsreihe verwendet.

4.2.4.3 Aktivitätsuntersuchungen mit rekombinanten Stämmen

(4. Durchgang)

Der Nachweis der DKP-Hydrolyse durch die rekombinanten *E. coli* Stämme war von besonderem Interesse, da dies gezeigt hätte, dass die rekombinanten cyclischen Amidasen für die Aktivität verantwortlich sind. Für die beiden rekombinanten *E. coli* Stämme konnte jedoch in den ersten drei Durchgängen kein eindeutiges Ergebnis bezüglich der Hydrolyse von Cyclo(Ala-Ala) gezeigt werden. Somit wurden diese Stämme in einem 4. Versuchsdurchgang mit Dreifachbestimmung und mehr Zeitproben als zuvor untersucht, mit dem Ergebnis, dass Cyclo(Ala-Ala) nicht abgebaut wird (Ergebnisse der vier Durchgänge vgl. Tabelle 4.9).

4.2.4.4 Aktivitätsuntersuchungen mit DKP-hydrolysierenden Stämmen

(4. Durchgang)

Die Stämme *Leifsonia* sp. K3, *Bacillus* sp. A16 und *Rhizobium* sp. NA04-01 zeigten in den ersten drei Durchgängen eindeutige und kontinuierliche Substratabnahmen verschiedener DKPs (vgl. Tabelle 4.9); somit wurden diese drei Stämme in einem 4. Versuchsdurchgang mit mehr Zeitproben genauer auf ihre Aktivität untersucht.

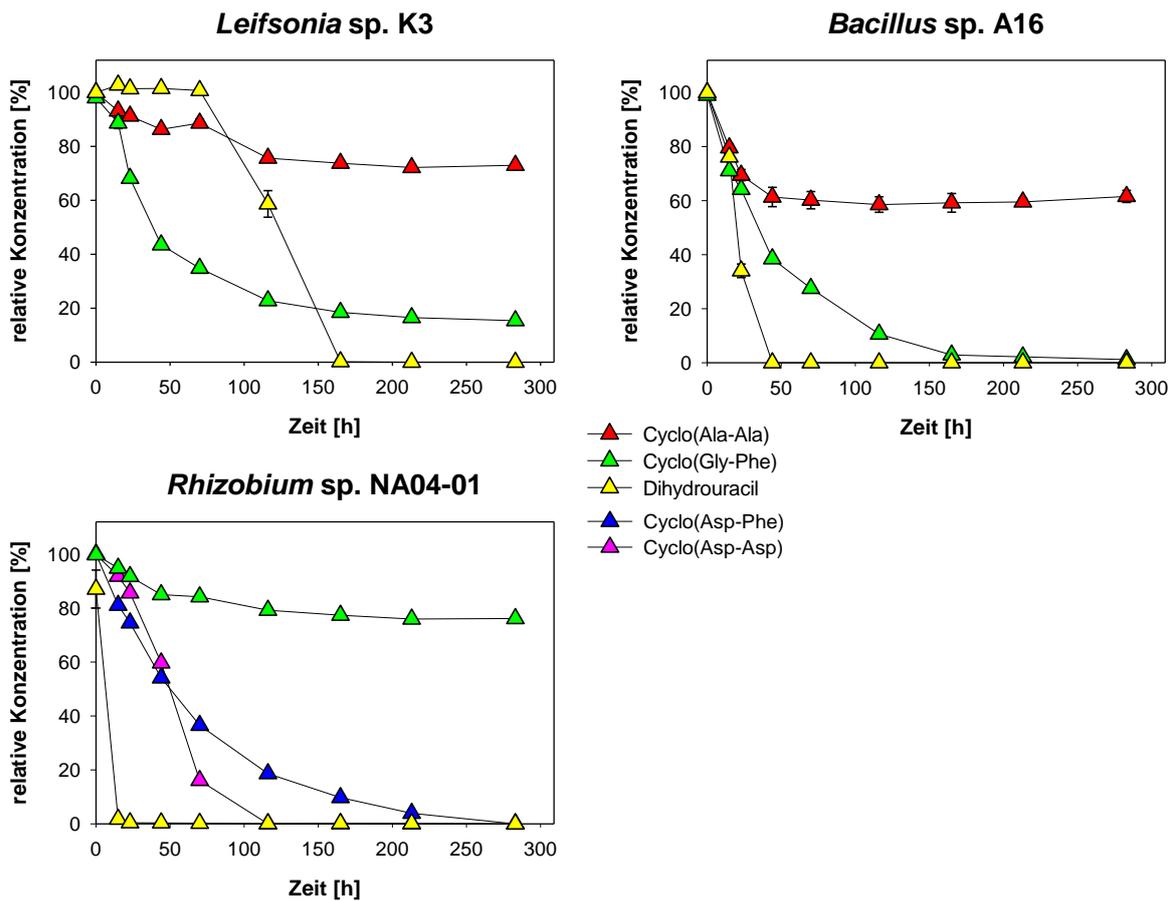


Abbildung 4.27: Relative Konzentrationsänderung von verschiedenen DKPs und Dihydrouracil (Positivkontrolle) durch *Leifsonia* sp. K3 (oben links), *Bacillus* sp. A16 (oben rechts) und *Rhizobium* sp. NA04-01 (unten links) während der Ganzzellbiotransformation im 4. Durchgang

Leifsonia sp. K3 und *Bacillus* sp. A16: Hydrolyse von Cyclo(Ala-Ala) (rot), Cyclo(Gly-Phe) (grün) und Dihydrouracil (gelb)

Rhizobium sp. NA04-01: Hydrolyse von Cyclo(Gly-Phe) (grün), Cyclo(Asp-Phe) (blau), Cyclo(Asp-Asp) (pink) und Dihydrouracil (gelb)

In Abbildung 4.27 sind die Ergebnisse des 4. Biotransformationdurchgangs mit ganzen Zellen von *Leifsonia* sp. K3, *Bacillus* sp. A16 und *Rhizobium* sp. NA04-01 gezeigt. Gegenüber der Positivkontrolle Dihydrouracil zeigten alle drei Stämme hydrolytische Aktivität. Mit *Leifsonia* sp. K3 konnte allerdings erst nach 70 h ein Abbau dieses Substrats nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte der Umsatz der Substrate Cyclo(Ala-Ala) und Cyclo(Gly-Phe) für diesen Stamm gezeigt werden. Diese beiden DKPs wurden ebenfalls durch den Stamm *Bacillus* sp. A16 abgebaut. Cyclo(Ala-Ala) wurde von *Leifsonia* sp. K3 nur zu 27 % und von *Bacillus* sp. A16 zu 40 % innerhalb von 283 h abgebaut. Es konnte allerdings für die einzelnen Enantiomere des verwendeten racemischen Substrats Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) kein enantioselektiver Umsatz festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). *Rhizobium* sp. NA04-01 zeigte ebenfalls hydrolytische Aktivität gegenüber

Cyclo(Gly-Phe), jedoch nur einen Umsatz von 24 % nach 283 h, wohingegen der vollständige Abbau von Cyclo(Asp-Phe) und Cyclo(Asp-Asp) nachgewiesen wurde.

Des Weiteren wurde für diese drei Stämme die Substrathydrolyse im Rohextrakt untersucht.

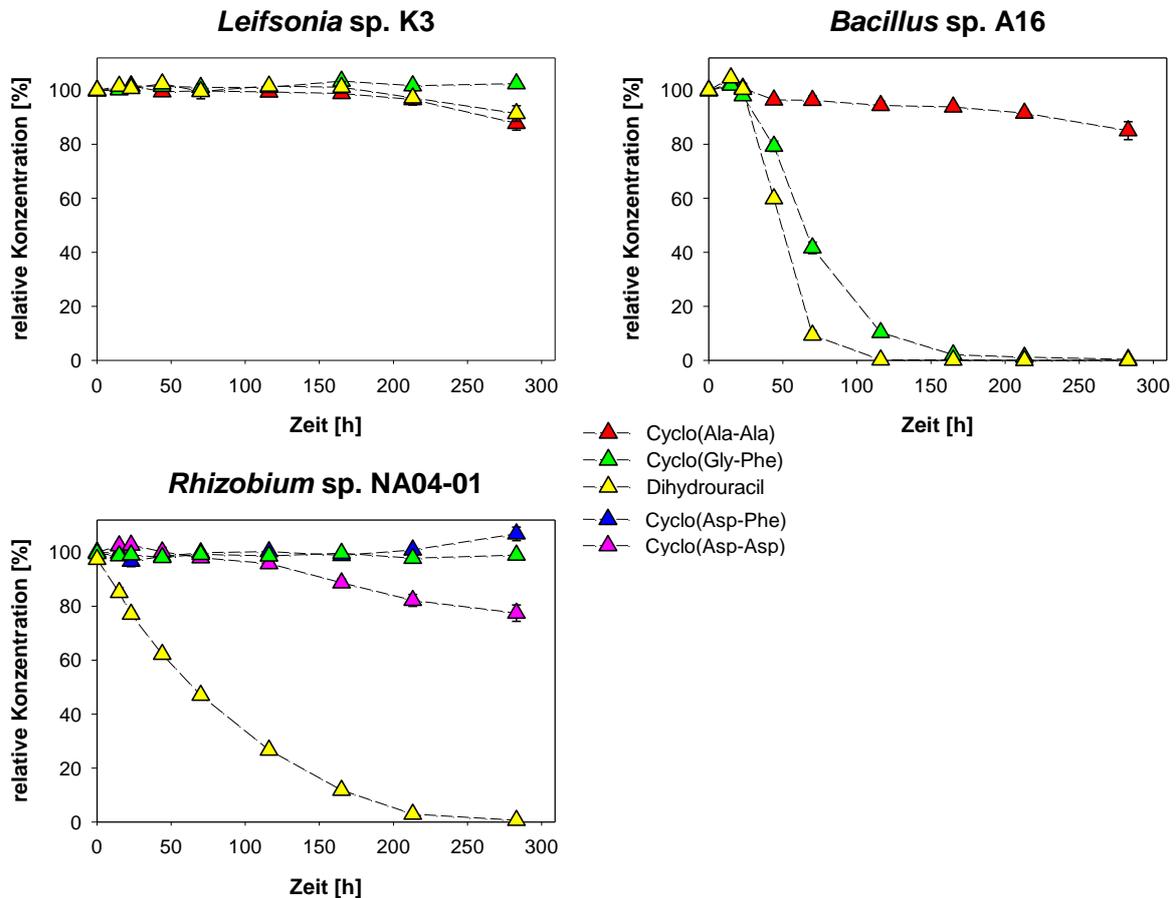


Abbildung 4.28: Relative Konzentrationsänderung von verschiedenen DKPs und Dihydrouracil (Positivkontrolle) durch *Leifsonia* sp. K3 (oben links), *Bacillus* sp. A16 (oben rechts) und *Rhizobium* sp. NA04-01 (unten links) während der Biotransformation mit Rohextrakt im 4. Durchgang

Leifsonia sp. K3: kein Abbau der untersuchten Substrate

Bacillus sp. A16: Hydrolyse von Cyclo(Ala-Ala) (rot), Cyclo(Gly-Phe) (grün) und Dihydrouracil (gelb)

Rhizobium sp. NA04-01: Hydrolyse von Cyclo(Asp-Asp) (pink) und Dihydrouracil (gelb), kein Abbau von Cyclo(Gly-Phe) (grün) und Cyclo(Asp-Phe) (blau)

Im Rohextrakt dieser drei Stämme (Abbildung 4.28) konnten nicht alle Aktivitäten, die während der Ganzzellbiotransformation (Abbildung 4.27) gemessen worden waren, gezeigt werden. Für *Leifsonia* sp. K3 konnte für keines der drei Substrate eindeutige Aktivität im Rohextrakt nachgewiesen werden. Auch die Positivkontrolle Dihydrouracil war nicht eindeutig umgesetzt worden, was darauf hindeutet, dass es zu einem Aktivitätsverlust im Rohextrakt gekommen war. Das Aktivitätsprofil von *Bacillus* sp. A16 im Rohextrakt entsprach dem mit ganzen Zellen, jedoch mit einer sehr geringen Hydrolyse von 15 % innerhalb von 283 h gegenüber Cyclo(Ala-Ala). Für *Rhizobium* sp. NA04-01 konnte im

Rohextrakt neben der vollständigen Hydrolyse von Dihydrouracil ein 23 %iger Umsatz von Cyclo(Asp-Asp) gemessen, jedoch kein Abbau von Cyclo(Asp-Phe) und Cyclo(Gly-Phe) nachgewiesen werden.

Die in Abbildung 4.27 und Abbildung 4.28 gezeigten Substratabnahmen über die Zeit sind für die drei Stämme nicht direkt vergleichbar, da nicht die gleiche Zell- bzw. Proteinmenge eingesetzt wurde. Um die Aktivitäten untereinander vergleichen zu können, wurde die Aktivität bezogen auf die BTM und bezogen auf den Proteingehalt berechnet. Außerdem wurden die Ergebnisse aus drei Versuchsdurchgängen gemittelt und dadurch abgesichert. Die Aktivitäten ($\mu\text{mol}/\text{min}$) bezogen auf die BTM wurden aus den Zeiträumen 0 bis 19 h, 0 bis 22 h bzw. 0 bis 23 h für den 2., 3., bzw. 4. Durchgang berechnet. Da die Reaktionen im Rohextrakt langsamer abliefen als bei der Ganzellbiotransformation, wurden für die Berechnung der Aktivität bezogen auf den Proteingehalt die Zeiträume von 0 bis 89 h bzw. 0 bis 70 h des 3. bzw. 4. Durchgangs verwendet.

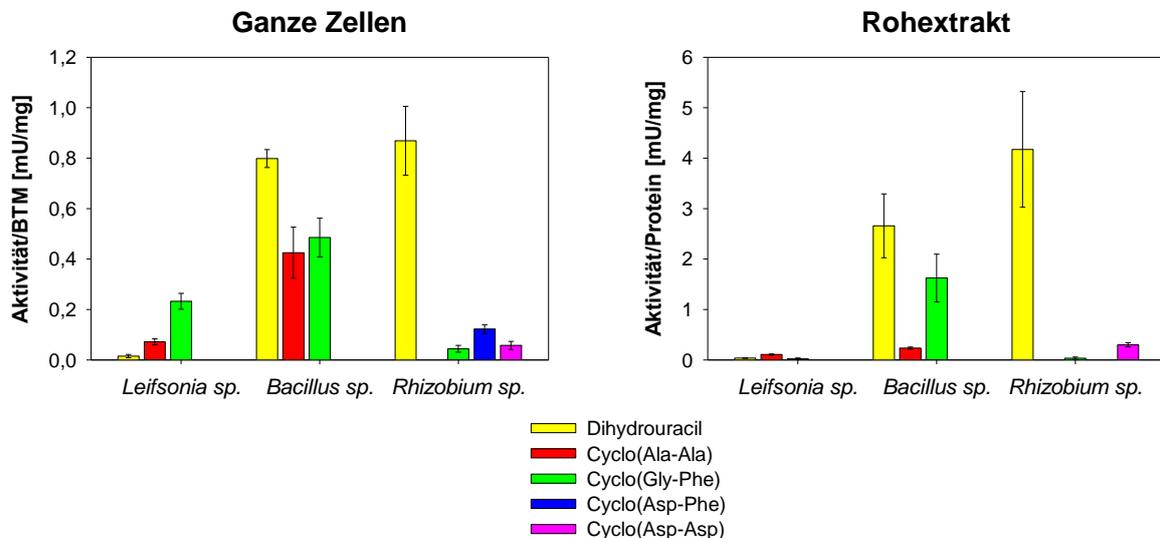


Abbildung 4.29: Aktivität von *Leifsonia sp.* K3, *Bacillus sp.* A16 und *Rhizobium sp.* NA04-01 gegenüber verschiedenen DKPs und Dihydrouracil (Positivkontrolle) während der Biotransformation mit ganzen Zellen bezogen auf die BTM (links) und mit Rohextrakt bezogen auf den Proteingehalt (rechts)

Höchste Aktivität gegenüber Dihydrouracil (gelb) durch *Bacillus sp.* A16 und *Rhizobium sp.* NA04-01 sowohl mit ganzen Zellen als auch mit Rohextrakt; geringere Aktivität gegenüber verschiedenen DKPs durch alle drei Stämme

Für die Stämme *Leifsonia sp.* K3, *Bacillus sp.* A16 und *Rhizobium sp.* NA04-01 ist die Aktivität bezogen auf die BTM (Abbildung 4.29, links) und die Aktivität bezogen auf den Proteingehalt (Abbildung 4.29, rechts) gezeigt. Für den für die Berechnung zugrundeliegenden Zeitraum wurde für *Leifsonia sp.* weder Aktivität mit ganzen Zellen noch mit Rohextrakt gegenüber Dihydrouracil nachgewiesen, während für die Stämme *Bacillus sp.* A16 mit 0,80 mU/mg (Aktivität/BTM) bzw. 2,66 mU/mg (Aktivität/Protein) und

Rhizobium sp. NA04-01 mit 0,87 mU/mg (Aktivität/BTM) bzw. 4,17 mU/mg (Aktivität/Protein) die Positivkontrolle Dihydrouracil das am besten umgesetzte Substrat war.

Bei der Ganzzellbiotransformation mit *Leifsonia* sp. K3 wurde Cyclo(Gly-Phe) mit 0,23 mU/mg (Aktivität/BTM) schneller hydrolysiert als Cyclo(Ala-Ala) mit 0,07 mU/mg.

Bacillus sp. A16 zeigte mit ganzen Zellen einen ähnlich schnellen Umsatz von Cyclo(Ala-Ala) und Cyclo(Gly-Phe); im Rohextrakt war die Aktivität/Protein gegenüber Cyclo(Gly-Phe) mit 1,63 mU/mg höher als für Cyclo(Ala-Ala) mit 0,24 mU/mg.

Rhizobium sp. NA04-01 zeigte während der Ganzzellbiotransformation mit 0,12 mU/mg (Aktivität/BTM) höhere Aktivität gegenüber Cyclo(Asp-Phe) als gegenüber Cyclo(Gly-Phe) und Cyclo(Asp-Asp). Im Rohextrakt hingegen wurde nur Cyclo(Asp-Asp) mit 0,30 mU/mg umgesetzt.

Vergleicht man die Stämme untereinander, findet man den höchsten DKP-Umsatz für den Stamm *Bacillus* sp. A16 gegenüber Cyclo(Ala-Ala) und Cyclo(Gly-Phe) mit 0,43 und 0,49 mU/mg für die Ganzzellbiotransformation und mit 1,63 mU/mg gegenüber Cyclo(Gly-Phe) mit Rohextrakt.

Die Ergebnisse aller vier Durchgänge sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst. Handelte es sich um eine eindeutige und kontinuierliche Substratabnahme wurde die Aktivität als sehr wahrscheinlich eingestuft, wurde hingegen eine nicht kontinuierliche oder nur eine sehr geringe jedoch oberhalb des Schwankungsbereichs liegende Abnahme des Substrats nachgewiesen, wurde dies als eventuelle Aktivität bewertet.

Tabelle 4.9: Übersicht über die Aktivität der untersuchten Stämme mit cyclische Amidase Aktivität und Puffer als Negativkontrolle gegenüber DKPs und der Positivkontrolle Dihydrouracil in vier Versuchsdurchgängen; **rot**: keine Aktivität, **hellgrün**: eventuelle Aktivität, **dunkelgrün**: sehr wahrscheinliche Aktivität, **grau**: nicht bestimmt

Stamm	Dihydro-uracil				Cyclo (Ala-Ala)				Cyclo (Asp-Phe)				Cyclo (Gly-Phe)				Cyclo (Asp-Asp)				Cyclo (Pro-Tyr)			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
K3																								
M3																								
F8																								
I20																								
A16																								
F18																								
G18																								
H20																								
G7																								
M18																								
L9																								
C15																								
D24																								
F21																								
I21																								
E7																								
K20																								
725																								
728																								
731																								
735																								
157																								
158																								
222																								
225																								
NA04-01																								
DSM 20136																								
DSM 342																								
DSM 20116																								
DSM 420																								
DSM 20133																								
DSM 20167																								
JM109																								
pJOE5702.1																								
pJOE5704.1																								
Puffer																								

Da die die Substrate Cyclo(Gly-Gly), (S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion, 3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion und 1,3-Dimethylpiperazin-2,5-dion von keinem der Stämme abgebaut wurden, sind diese nicht in der Tabelle aufgeführt.

4.2.5 Eigenisolate *Paenibacillus* sp. und *Microbacterium* sp.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei neue Stämme isoliert (siehe Abschnitt 3.3.3), die Cyclo(Ala-Ala) abbauen. Diese wurden bezüglich ihrer Fähigkeit Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) enantioselektiv zu hydrolysieren, untersucht (siehe folgender Abschnitt) und klassifiziert (siehe Abschnitt 4.2.5.2).

4.2.5.1 Enantioselektive Hydrolyse von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala)

Für die beiden Isolate *Paenibacillus* sp. und *Microbacterium* sp. wurde durch Einsatz des racemischen Substrats Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) und des Enantiomers Cyclo(L-Ala-L-Ala) die enantioselektive Hydrolyse während der Ganzzellbiotransformation bestimmt.

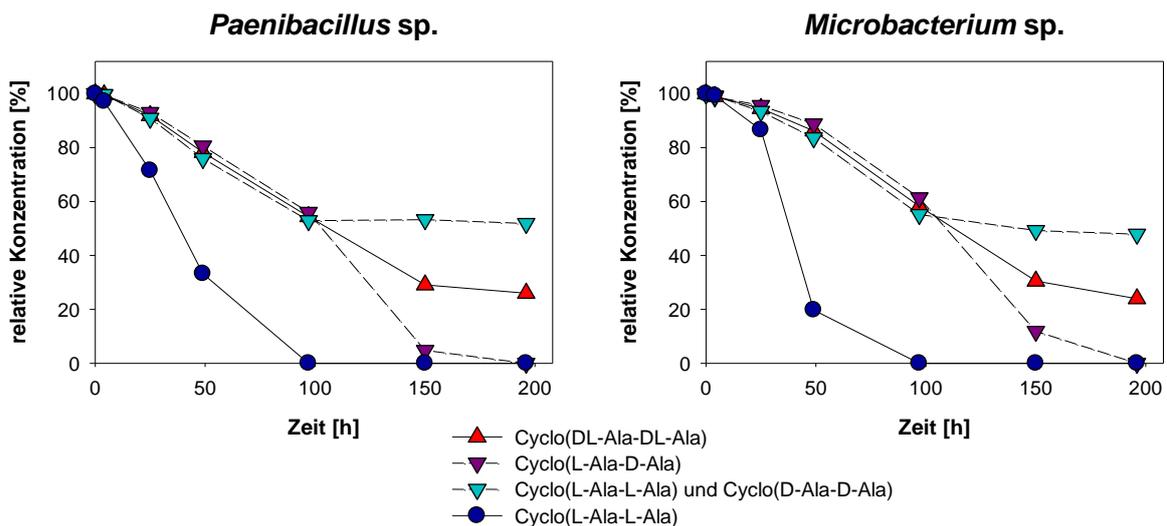


Abbildung 4.30: Relative Konzentrationsänderung der verschiedenen Enantiomere von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) durch *Paenibacillus* sp. (links) und *Microbacterium* sp. (rechts) während der Ganzzellbiotransformation

Für beide Stämme 75 %iger Abbau von racemischen Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) (rot), 100 %iger Abbau von Cyclo(L-Ala-D-Ala) (lila), 50 %iger Abbau des Enantiomerenpaares Cyclo(L-Ala-L-Ala) und Cyclo(D-Ala-D-Ala) (türkis) und 100 %iger Abbau des Enantiomers Cyclo(L-Ala-L-Ala) (dunkelblau)

In Abbildung 4.30 ist der enantioselektive Abbau von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) durch die Eigenisolate dargestellt. Für beide Stämme konnte gezeigt werden, dass das Racemat Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) nur zu 75 % abgebaut wird. Betrachtet man die Diastereomere (vgl. Abbildung 1.11 & Abbildung 4.5 b), wurde der 100 %ige Abbau von Cyclo(L-Ala-D-Ala) und ein 50 %iger Abbau des Enantiomerenpaares Cyclo(L-Ala-L-Ala) und Cyclo(D-Ala-D-Ala) nachgewiesen. Durch den Einsatz des Enantiomers Cyclo(L-Ala-L-Ala) als Substrat, welches zu 100 % abgebaut worden war, konnte geschlossen werden, dass das Enantiomer Cyclo(D-Ala-D-Ala) von beiden Stämmen nicht abgebaut wird.

Es konnte keines der bei der Spaltung potentiell entstehenden Dipeptide nachgewiesen werden, was vermutlich auf die Aktivität von Dipeptidasen zurückzuführen ist.

Für beide Stämme wurde ebenfalls die Aktivität gegenüber Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) bezogen auf die BTM und bezogen auf den Proteingehalt berechnet, um die Aktivitäten miteinander vergleichen zu können (siehe Abbildung 4.31). Hierzu wurde jeweils die Hydrolyserate der ersten 48 h einer Dreifachbestimmung herangezogen.

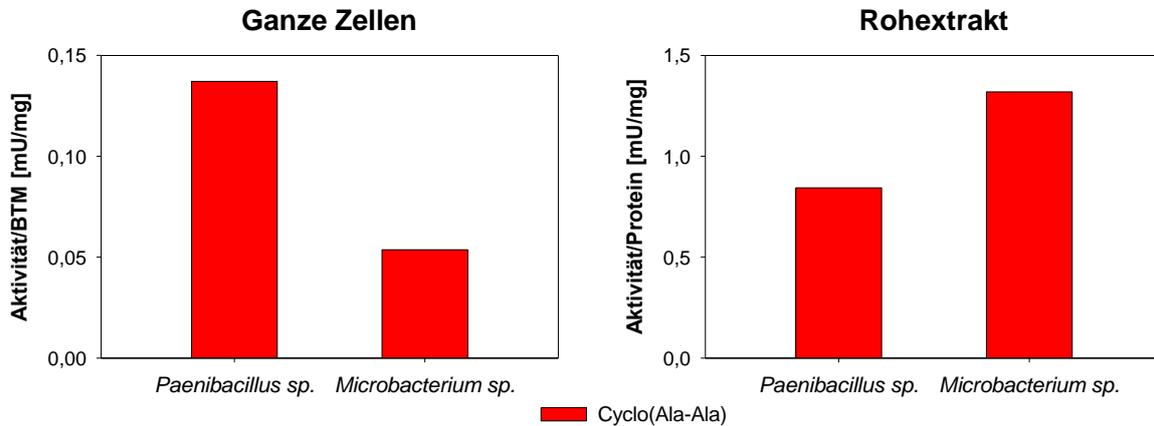


Abbildung 4.31: Aktivität von *Paenibacillus sp.* und *Microbacterium sp.* gegenüber Cyclo(Ala-Ala) während der Biotransformation mit ganzen Zellen bezogen auf die BTM (links) und mit Rohextrakt bezogen auf den Proteingehalt (rechts)

Für die Aktivität bezogen auf die BTM konnte für *Paenibacillus sp.* mit 0,14 mU/mg eine mehr als doppelt so hohe Aktivität wie für *Microbacterium sp.* mit 0,05 mU/mg nachgewiesen werden (Abbildung 4.31, links). Im Rohextrakt hingegen war die Aktivität/Protein mit 1,32 mU/mg für *Microbacterium sp.* höher als für *Paenibacillus sp.* mit 0,84 mU/mg.

Zusätzlich wurde untersucht, ob diese beiden Stämme die Positivkontrolle der cyclische Amidase Stämme Dihydrouracil abbauen können. Für beide Stämme wurde keine hydrolytische Aktivität gegenüber diesem Substrat identifiziert (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.2.5.2 Klassifikation der Eigenisolate

Die beiden in dieser Arbeit isolierten Stämme, für die eine enantioselektive Hydrolyse von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) nachgewiesen werden konnte, sollten klassifiziert werden. Dazu wurden beide Stämme zunächst mikroskopisch untersucht.

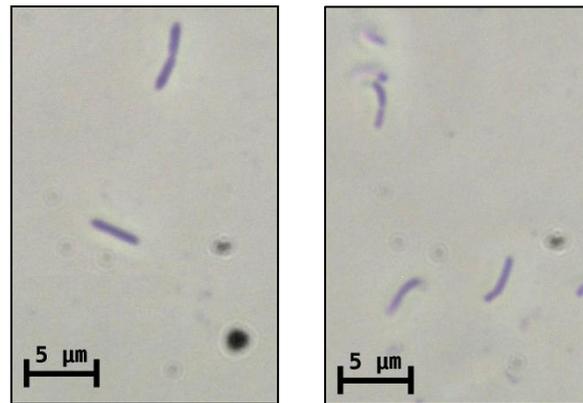


Abbildung 4.32: Mikroskopische Aufnahmen der beiden Eigenisolate *Paenibacillus* sp. (links) und *Microbacterium* sp. (rechts)

Für beide Stämme konnte ein stäbchenförmiges Wachstum identifiziert werden (siehe Abbildung 4.32).

Zur genauen Bestimmung beider Stämme wurden diese mit Hilfe der 16S rDNA-Sequenzierung und Sequenzvergleichen klassifiziert (siehe Tabelle 4.10 und Tabelle 4.11).

Tabelle 4.10: Die drei Bakterienstämme mit der höchsten Identität beim Sequenzalignment mit der 16S rDNA Sequenz des Eigenisolats 1

Accession	Beschreibung	Total score	Query coverage [%]	E-Wert	Max. Identität [%]
FJ432004.1	<i>Paenibacillus chibensis</i> strain ZYb3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1759	99	0,0	99
FN397529.1	<i>Paenibacillus</i> sp. 9-2AIA partial 16S rRNA gene, strain 9-2AIA	1757	99	0,0	99
EU497639.1	<i>Paenibacillus</i> sp. Gi-691 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1748	99	0,0	99

Aufgrund der höchsten Identitäten zu zwei *Paenibacillus chibensis* Stämmen und zu einem *Paenibacillus* sp. Stamm (Tabelle 4.10), wurde dieser eigenisolierte Stamm (Eigenisolat 1) als *Paenibacillus* sp. klassifiziert und als solcher in dieser Arbeit benannt.

Tabelle 4.11: Die drei Bakterienstämme mit der höchsten Identität beim Sequenzalignment mit der 16S rDNA Sequenz des Eigenisolats 2

Accession	Beschreibung	Total score	Query coverage [%]	E-Wert	Max. Identität [%]
JQ917793.1	<i>Microbacterium</i> sp. I_29-J6NFA10A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1779	100	0,0	99
JN942151.1	<i>Microbacterium</i> sp. OB57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1779	100	0,0	99
HM569613.2	<i>Microbacterium</i> sp. IITD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1779	100	0,0	99

Beim Sequenzalignment der 16S rDNA des anderen Eigenisolats (Eigenisolat 2) zeigten drei *Microbacterium* sp. Stämme die höchste Identität (Tabelle 4.11). Somit wurde dieser Stamm als *Microbacterium* sp. klassifiziert und als solcher in dieser Arbeit benannt.

4.2.5.3 Sequenzalignments

Da ein *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) in dieser Arbeit verwendet wurde, sollte sichergestellt werden, dass es sich nicht um denselben Stamm handelt, wie der neu isolierte Stamm *Paenibacillus* sp.. Allerdings war dies unwahrscheinlich aufgrund der nicht vorhandenen Aktivität von DSM 329 gegenüber Cyclo(Ala-Ala), im Gegensatz zu der Aktivität des hier isolierten Stammes. Um zu analysieren wie ähnlich sich die beiden Stämme sind, wurde die 16S rDNA von DSM 329 sequenziert und mit der von *Paenibacillus* sp. verglichen. Das Sequenzalignment ist im Anhang dargestellt. Es wurde eine Identität von 99 % festgestellt und somit konnte bestätigt werden, dass es sich nicht um dieselben Stämme handelt.

Der in dieser Arbeit als *Leifsonia* sp. K3 benannte Stamm wurde in der Vergangenheit als *Microbacteriaceae* sp. K3 klassifiziert (Dürr et al. 2006). Um zu vergleichen wie ähnlich der in dieser Arbeit isolierte Stamm *Microbacterium* sp. mit dem *Microbacteriaceae* sp. K3 ist, wurde die 16S rDNA von letztgenanntem erneut sequenziert und mit der des erstgenannten verglichen (Sequenzalignment siehe Anhang). Dabei wurde lediglich eine Identität von 93 % bestimmt. Des Weiteren wurde ein Sequenzalignment zur Klassifizierung durchgeführt (siehe Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12: Die drei Bakterienstämme mit der höchsten Identität beim Sequenzalignment mit der 16S rDNA Sequenz von *Leifsonia* sp. K3 (früher *Microbacteriaceae* sp. K3)

Accession	Beschreibung	Total score	Query coverage [%]	E-Wert	Max. Identität [%]
NR_043662.1	<i>Leifsonia naganoensis</i> strain DB103; JCM10592 16S ribosomal RNA, partial sequence	1748	100	0,0	100
JF330166.1	<i>Leifsonia aquatica</i> strain NSBx.29(ZZ1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1748	100	0,0	100
DQ232612.2	<i>Leifsonia naganoensis</i> strain DB103 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1748	100	0,0	100

Aufgrund der maximalen Identitäten wurde der Stamm *Microbacteriaceae* sp. K3 zu *Leifsonia* sp. K3 umklassifiziert und als solcher in dieser Arbeit benannt.

Die sequenzierten Abschnitte der 16S rDNA von *Paenibacillus* sp., *Microbacterium* sp., DSM 329, DSM 40062 (nicht in dieser Arbeit sequenziert) und *Leifsonia* sp. K3 sind im Anhang aufgeführt.

4.2.6 Vergleich der DKP-Hydrolyseaktivität verschiedener Stämme

Eine vergleichende Gegenüberstellung nachgewiesener Aktivitäten der verschieden in dieser Arbeit verwendeten Stämme ist zusammenfassend in Tabelle 4.13 aufgeführt.

Tabelle 4.13: Aktivität je BTM und Aktivität je Proteingehalt einiger in dieser Arbeit verwendeter Stämme gegenüber verschiedenen DKPs

Spezies	Stamm	Substrat	Aktivität/BTM [mU/mg]	Aktivität/Protein [mU/mg]
<i>Paenibacillus chibensis</i>	DSM 329	Cyclo(Asp-Phe)	2,84	18,8 ^a ; 55,1 ^b ; 36,9 ^c
		Cyclo(Asp-Asp)	2,21	4,10
<i>Streptomyces flavovirens</i>	DSM 40062	Cyclo(Asp-Phe)	5,72	16,2 ^a ; 80,3 ^b ; 20,9 ^c
<i>Leifsonia</i> sp.	K3	Cyclo(Ala-Ala)	0,07 ¹	0,11 ²
		Cyclo(Gly-Phe)	0,23 ¹	0,02 ²
<i>Bacillus</i> sp.	A16	Cyclo(Ala-Ala)	0,43 ¹	0,24 ²
		Cyclo(Gly-Phe)	0,49 ¹	1,63 ²
		Cyclo(Asp-Phe)	0,12 ¹	0,00 ²
<i>Rhizobium</i> sp.	NA04-01	Cyclo(Gly-Phe)	0,04 ¹	0,03 ²
		Cyclo(Asp-Asp)	0,06 ¹	0,30 ²
<i>Paenibacillus</i> sp.		Cyclo(Ala-Ala)	0,14	0,84
<i>Microbacterium</i> sp.		Cyclo(Ala-Ala)	0,05	1,32

¹ gemittelte Werte aus drei Versuchsdurchgängen

² gemittelte Werte aus zwei Versuchsdurchgängen

^a Werte aus Versuch zur Bestimmung des Substratspektrums

^b Werte aus Versuch zur fraktionierten Ammoniumsulfatfällung

^c Werte aus Versuch zur Ionenaustauschchromatographie

Zusammenfassend kann folgende Schlussfolgerung gezogen werden: Die Stämme DSM 329 und DSM 40062 zeigten insgesamt die höchste Aktivität bezogen auf die BTM und auf den Proteingehalt. Ebenfalls hohe Aktivität je Protein wiesen *Bacillus* sp. A16 gegenüber Cyclo(Gly-Phe) und *Microbacterium* sp. gegenüber Cyclo(Ala-Ala) auf.

5 Diskussion

Diketopiperazine (DKPs), die kleinstmöglichen cyclischen Peptide, stellen eine weitverbreitete Klasse von biologisch aktiven Substanzen dar. Die Bildung von DKPs ist weit verbreitet, so sind zahlreiche Organismen für deren Synthese beschrieben, ebenso gibt es sehr viele Beispiele für die Entstehung von DKPs als chemische Abbauprodukte. Ganz im Gegensatz dazu ist über den Abbau dieser Substanzklasse bisher nur sehr wenig bekannt. Daher wurde in dieser Arbeit die Hydrolyse ausgewählter DKPs durch Peptidasen und Bakterien untersucht. Zunächst wurden verschiedene Analysemethoden für den Nachweis der Edukte (DKPs) und potentieller Produkte (Dipeptide und Aminosäuren) untersucht.

5.1 Analytik

5.1.1 Ninhydrin-Assay

Der Ninhydrin-Assay wurde für den Nachweis der Hydrolysereaktion von DKPs überprüft. Es ist bereits beschrieben, dass Cyclo(Gly-Gly) nicht mit Ninhydrin reagiert (Waldschmidt-Leitz, Schäffner 1925). Dies konnte bestätigt werden und darüber hinaus gezeigt werden, dass Ninhydrin ebenfalls keine positive Reaktion mit Cyclo(Ala-Ala) eingeht. Die entsprechenden Dipeptide Gly-Gly und Ala-Ala und Aminosäuren Gly und Ala konnten mittels Ninhydrin derivatisiert werden. Allerdings eignete sich der Nachweis dieser Substanzen mittels Ninhydrinderivatisierung nicht für die Proben der Biotransformationen, da die Hintergrundreaktion mit Aminosäuren und kurzen Peptiden des Rohextrakts zu hoch war. Daher wurden chromatographische Methoden zum Nachweis der DKP-Hydrolyse entwickelt.

5.1.2 Entwicklung einer HPLC-Analytik

Bei der Hydrolyse von DKPs werden vermutlich die korrespondierenden Dipeptide gebildet, welche weiter zu den entsprechenden Aminosäuren abgebaut werden. Basierend auf dieser Annahme sollte eine Analytik zur Quantifizierung der Reaktion entwickelt werden. Dafür wurden verschiedene Vorsäulenderivatisierungsmethoden und Trennung mittels HPLC überprüft, jedoch stellten sich der Nachweis und die Trennung der underivatisierten Substanzen als erfolgreicher heraus.

5.1.2.1 Analytik mittels Vorsäulenderivatisierung

Die bereits für die Vorsäulenderivatisierung von Aminosäuren beschriebenen Methoden mittels Dabsyl-Cl, Dansyl-Cl, PITC und FMOCl (Rigas 2012), (Cooper et al. 2001) wurden bezüglich ihrer Anwendbarkeit zum Nachweis der DKP-Hydrolysereaktion untersucht (vgl.

Abschnitt 4.1.2.1). Zunächst wurde die Derivatisierbarkeit von Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) untersucht. Mit keiner der genannten Derivatisierungsmethoden konnte eine Reaktion mit den beiden DKPs gezeigt werden. Daher wurden diese Methoden nicht für den DKP-Nachweis verwendet.

Als weitere Methode wurde die Derivatisierung mit OPA/3-MPA herangezogen. Bei dieser Methode ist nur der Nachweis primärer Amine möglich (Umagat et al. 1982). Daher wurde diese Derivatisierung nicht für DKPs überprüft. OPA/3-MPA und die vier zuvor genannten Reagenzien wurden für den Nachweis und die Trennung von Gly-Gly von Gly und von Ala-Ala von Ala untersucht. Mit allen getesteten Derivatisierungsreagenzien wurde eine erfolgreiche Derivatisierung der Dipeptide und Aminosäuren erzielt, jedoch konnte mit keiner dieser Vorsäulenderivatisierungsmethoden bei unterschiedlichen Chromatographiebedingungen eine zufriedenstellende Trennung erzielt werden. Beispielsweise wurden bei den Derivatisierungen mittels Dabsyl-Cl und FMOC-Cl zwei Ala-Ala-Peaks nachgewiesen, welche sich mit dem Ala-Peak überlagerten. Die Detektion von zwei Ala-Ala-Peaks ist vermutlich auf den Einsatz des racemischen Dipeptids DL-Ala-DL-Ala zurückzuführen. Ein Peak entspricht wahrscheinlich dem Enantiomerenpaar L-Ala-L-Ala und D-Ala-D-Ala und der zweite Peak der sich dazu diastereomer verhaltenden *meso*-Form L-Ala-D-Ala (in Abbildung 1.11 gezeigt für Cyclo(DL-Ala-DL-Ala)). Diastereomere können theoretisch unter nicht chiralen Bedingungen voneinander getrennt werden (Matuszewski, Constanzer 1992), jedoch stellte sich dies in diesem Fall als Herausforderung heraus. Eine Methodenentwicklung könnte beispielsweise mittels Gradientenelution und daraus ermittelter Parameter bezüglich der Trennung durchgeführt werden (Snyder, Dolan 1996). Jedoch wurde in dieser Arbeit der Nachweis der DKP-Hydrolyse mittels Derivatisierung nicht weiter verfolgt.

5.1.2.2 Analytik mit underivatisierten Substanzen

Im Gegensatz zu dem nicht erfolgreichen Nachweis und der Trennung der DKPs, Dipeptide und Aminosäuren mittels Vorsäulenderivatisierung, konnte eine HPLC-Analytik der underivatisierten Substanzen etabliert werden (vgl. Abschnitt 4.1.2.2). Für die Methoden-etablierung wurden unterschiedliche Säulen, MeOH Konzentrationen in der mobilen Phase, Säulentemperaturen und Flussraten getestet. Die 11 untersuchten DKPs, die entsprechenden Dipeptide und die aromatischen Aminosäuren Phe und Tyr wurden über die Absorption der Peptidbindung bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert. Eine Ausnahme davon stellte Cyclo(Arg-Arg) dar, da sich die Detektion der Guanidinogruppen bei einer Wellenlänge von 268 nm als geeigneter erwies.

Im Gegensatz zum Nachweis mittels Derivatisierung konnte für das underivatisierte racemische Dipeptid DL-Ala-DL-Ala und für Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) eine Trennung der jeweiligen Diastereomere (vgl. Abbildung 1.11) erzielt werden. Damit konnte eine Methode

zur Trennung sowie zur Quantifizierung der Diastereomere dieser racemischen Substanzen etabliert werden.

Für acht aus natürlichen Aminosäuren bestehenden DKPs wurden Methoden für die Trennung der DKPs von den entsprechenden Dipeptiden und den aromatischen Aminosäuren mit größtenteils sehr guten Auflösungen ($R > 1,5$) und kurzen Retentionszeiten ($t_R < 15$ min) entwickelt.

5.1.3 Validierung der HPLC-Methoden

Die entwickelten HPLC-Methoden wurden entsprechend den *bioanalytical method validation* Richtlinien der FDA (FDA 2001) validiert (vgl. Abschnitt 4.1.3).

Für alle untersuchten DKPs, Dipeptide und Aminosäuren wurden lineare Bereiche mit Bestimmtheitsmaßen R^2 von mindestens 0,998 bestimmt. Beispielsweise wurde für Cyclo(Asp-Phe) mit 0,005 bis 5,00 mM ein deutlich breiterer linearer Bereich ermittelt als die beschriebenen linearen Bereiche von 0,5 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ (0,002 bis 0,038 mM) (Saito et al. 1989) oder 5 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ (0,02 bis 0,38 mM) (Aboul-Enein, Bakr 1997). Abhängig von der Substanz lagen die Nachweisgrenzen zwischen 0,005 und 0,100 mM. Für Cyclo(Gly-Gly) wurde eine Nachweisgrenze von 0,01 mM bestimmt, die niedriger ist als die beschriebene Nachweisgrenze von 5 $\mu\text{g/ml}$ (entspricht 0,04 mM) für die Detektion bei einer Wellenlänge von 200 nm (Compton et al. 1979). Für Cyclo(Asp-Phe) wurden Nachweisgrenzen von 10 ng pro 20 μl Injektion (0,002 mM) (George et al. 2010) bzw. 2,5 ng pro 10 μl Injektion (0,001 mM) (Saito et al. 1989) beschrieben. Diese sind zwar geringer, liegen jedoch im gleichen Bereich wie die in dieser Arbeit gezeigten 0,005 mM. Die Bestimmungsgrenze variierte abhängig von der Substanz zwischen 0,05 und 10 nmol pro 10 μl Injektionsvolumen. Die relative Standardabweichung (%) der Intra-Assay bzw. der Inter-Assay Präzision lag zwischen 0,5 und 4,7 % bzw. zwischen 0,7 und 9,9 %. Für die Richtigkeit der Methoden wurden relative Fehler zwischen -4,2 und 8,1 % ermittelt. Die Kurzzeitstabilität (24 h bei 21 °C) und die Stabilität nach drei Frier-Tau Zyklen betrug mindestens 93 %. Die Wiederfindungsrate nach 10-minütiger Hitzebehandlung bei 90 °C lag bei mindestens 97 %.

Der beschriebene Nachweis der underivatisierten DKPs, Dipeptide und der aromatischen Aminosäuren Phe und Tyr und die Auftrennung mittels HPLC wurden zur Identifizierung von DKP-abbauenden Biokatalysatoren verwendet.

5.2 Hydrolyse von Diketopiperazinen

DKPs können chemisch, enzymatisch und mikrobiell hydrolysiert werden. In dieser Arbeit wurde die enzymatische und mikrobielle Hydrolyse von DKPs untersucht und wird im Folgenden diskutiert.

5.2.1 Peptidasen

Der Abbau von DKPs durch die Spaltung der Peptidbindung durch Peptidasen ist in der Vergangenheit (1925 bis 1940) mehrfach untersucht worden. Neuere Ergebnisse liegen nicht vor, auch sind die bisher veröffentlichten Ergebnisse teils widersprüchlich (vgl. Tabelle 1.1 in der Einleitung). Die beschriebenen Aktivitäten sollten daher teilweise überprüft werden (vgl. Abschnitt 4.2.1).

Die Hydrolyse von Cyclo(Asp-Asp) durch Trypsin (Matsui 1933), (Ishiyama 1933), (Shibata, Tazawa 1936) und durch Papain (Shibata, Tazawa 1936), sowie die Spaltung von Cyclo(Arg-Arg) und Cyclo(Lys-Lys) durch Pepsin (Shibata, Tazawa 1936) konnte nicht bestätigt werden. Gründe hierfür könnten beispielsweise in der damaligen Aufarbeitung der Enzyme und den Nachweismethoden liegen. Das von Shibata et al. verwendete Trypsin wurde aus Pankreatin (Enzymgemisch aus Lipasen, Amylasen und verschiedenen Peptidasen) durch Adsorption an Tonerde (C_V) aus Aluminiumhydroxid $Al(OH)_3$ gemäß (Waldschmidt-Leitz, Purr 1929) aufgereinigt, wobei vorwiegend polypeptidspaltende Enzyme abgetrennt wurden (Shibata, Tazawa 1936). Das eingesetzte Trypsin könnte daher durch andere Enzyme verunreinigt gewesen sein. Der Nachweis der Reaktion erfolgte bei Matsui, Ishiyama, Shibata et al. und Akabori et al. über die Änderung des pH-Werts, aufgrund der bei der DKP-Hydrolyse frei werdenden Carboxylgruppe, durch Titration mit alkoholischer Kalilauge gemäß (Willstätter, Waldschmidt-Leitz 1921). Zusätzlich bestimmten Shibata et al. auch die Bildung der frei werdenden Aminogruppe nach Van Slyke (Van Slyke 1911). Diese Nachweismethoden sind unspezifischer als der Nachweis der Produktabnahme mittels HPLC, da sie beispielsweise durch den Selbstverdau der Peptidasen zu falschen Ergebnissen führen könnten. Ein weiterer Grund dafür, dass die von Shibata et al. beschriebenen Aktivitäten nicht bestätigt werden konnten, könnte an den eingesetzten Enantiomeren liegen. Die Autoren zeigten die Spaltung von Cyclo(D-Asp-L-Asp), Cyclo(D-Arg-D-Arg) und Cyclo(D-Lys-D-Lys) (Shibata, Tazawa 1936), in dieser Arbeit wurde hingegen die Hydrolyse der entsprechenden L-Enantiomere untersucht.

Die Stabilität von Cyclo(Gly-Gly) gegenüber Trypsin, Pepsin (Waldschmidt-Leitz, Schöffner 1925), (Ishiyama 1933) und Papain (Waldschmidt-Leitz, Schöffner 1925), und von Cyclo(Asp-Asp) gegenüber Pepsin (Matsui 1933), (Ishiyama 1933) konnte bestätigt werden. Auch der Einsatz weiterer Peptidasen, wie beispielsweise Bromelain, Ficin und verschiedene Subtilisine führte zu keiner DKP-Hydrolyse durch diese Enzymklasse. Als Schlussfolgerung gilt festzuhalten, dass die Peptidbindungen in DKPs nicht einfach durch proteolytische Enzyme gespalten werden können.

Betrachtet man die Spezifitäten einiger untersuchter Peptidasen, so spaltet Trypsin sehr spezifisch nach den basischen Aminosäuren Lys und Arg (Olsen et al. 2004), Pepsin bevorzugt die Spaltung nach Phe und Leu (oder Met, Cys, Glu, Trp, und Tyr) und vor Tyr,

Trp, und Phe (Hamuro et al. 2008) und Subtilisin spaltet bevorzugt nach Tyr, Phe (Leu, Met, Lys) (Perona, Craik 1995). Einige dieser Spezifitäten für die Spaltung können nicht auf die Hydrolyse von DKPs übertragen werden. So konnte gezeigt werden, dass Trypsin nicht in der Lage ist Cyclo(Lys-Lys) und Cyclo(Arg-Arg) zu spalten. Pepsin und verschiedene Subtilisine konnten keines der untersuchten DKPs mit Phe oder Tyr spalten. Die Enzymspezifitäten können außerdem erklären, warum weitere DKPs, die keine der genannten Aminosäuren enthalten, nicht gespalten werden konnten.

Es stellt sich die Frage, welche Enzyme die Spaltung der Peptidbindung in cyclischen Peptiden katalysieren können. Für Endopeptidasen ist beschrieben, dass die Anwesenheit von freien N- und C-Termini zur Minderung der Enzymaktivität führt (Rao et al. 1998). Obwohl DKPs aufgrund der cyclischen Struktur keine freien N- und C-Termini enthalten, konnte für alle untersuchten Endopeptidasen kein DKP-Abbau detektiert werden. Für bakterielle Exopeptidasen ist hingegen beschrieben, dass diese eine freie Aminogruppe (Gonzales, Robert-Baudouy 1996) bzw. Carboxylgruppe (Ravin, Seligman 1951) für die Spaltung benötigen. Daher sind diese Enzyme vermutlich ebenfalls nicht für die Spaltung der Peptidbindung in DKPs geeignet. Somit könnte eine neue Gruppe von Enzymen für deren Spaltung verantwortlich sein. Auch Muro et al. schlussfolgerten, dass es sich bei der Cyclo(Gly-Gly) Hydrolase aus *Bacillus* sp. No. 106 um ein neuartiges Enzym handelt, da dieses nur eine sehr geringe Aktivität gegenüber Kasein und Hämoglobin aufwies (Muro et al. 1985).

Auch für den Abbau größerer cyclischer Peptide sind verschiedene Stämme beschrieben, jedoch ist ebenfalls unklar, welche Enzyme dafür verantwortlich sind. Bakterien der Gattungen *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* und *Oscillatoria* können toxische cyclische Heptapeptide (Microcystine) synthetisieren (Carmichael et al. 1985). Für *Sphingomonas* sp. wurde der Abbau von Microcystin LR nachgewiesen und gezeigt, dass zunächst eine definierte Peptidbindung im cyclischen Molekül gespalten wird und daraufhin das gebildete lineare Molekül durch weitere Enzyme abgebaut wird (Bourne et al. 1996). Auch *Sphingosinicella* sp. konnte Peptidbindungen in verschieden langen, cyclischen Peptiden hydrolysieren (Kato et al. 2007). Des Weiteren können sowohl gram-positive als auch gram-negative Bakterien 35 bis 78 Aminosäuren lange, cyclische Peptide ribosomal synthetisieren; diese Strukturen sind als äußerst stabil beschrieben (Thorsthalm, Craik 2012).

Da bisher keine Aminosäuresequenzen und Proteinstrukturen von DKP-hydrolysierenden Enzymen bekannt sind, können keine Vergleiche zu anderen Enzymen gezogen werden. Daher wurden der Abbau von DKPs und dafür verantwortliche Enzyme näher untersucht.

5.2.2 Stämme aus Screening mit Schwammproben

Bisher wurden alle DKP-hydrolysierenden Bakterien aus Bodenproben isoliert. Eine weitere Quelle für Mikroorganismen die DKPs abbauen können stellen Schwämme dar, da die Synthese von DKPs (Umkehrreaktion der Hydrolyse) für viele Schwamm-assoziierte Bakterien beschrieben ist (Huang et al. 2010). Daher wurde ein Screening nach neuen DKP-abbauenden Bakterien mit Schwammproben und Cyclo(Gly-Gly) und Cyclo(Ala-Ala) als einziger N-Quelle durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.2.2). Insgesamt wurden dabei 114 marine Stämme isoliert. Von diesen wurden 49 Stämme als mögliche Kandidaten für den Abbau, der beim Screening eingesetzten DKPs, identifiziert und diesbezüglich näher untersucht. Jedoch konnte für keinen der Stämme ein DKP-Abbau nachgewiesen werden. Bei diesen mit DKPs als einziger organischer Stickstoffquelle angereicherten Stämmen handelt es sich vermutlich um Stickstofffixierer. Einige Bakterien der Gattung *Rhizobium* und verwandte Gattungen sind in der Lage molekularen Stickstoff (N_2) zu fixieren (Oke, Long 1999). Den in dieser Arbeit isolierten Stämmen diente zum Überleben und Wachsen vermutlich ebenfalls N_2 und nicht die im ASW-Screening Medium eingesetzten DKPs Cyclo(Gly-Gly) oder Cyclo(Ala-Ala). Bei der Wachstumskontrolle auf Mineralsalzmediumplatten mit und ohne DKPs konnten alle 114 Stämme auf beiden Platten, also auch ohne organische Stickstoffquelle, wachsen. Bestätigt wurde die Annahme, dass die isolierten Stämme keine DKPs abbauen können durch die Ergebnisse aus den Biotransformationsversuchen mit 49 ausgewählten Stämmen.

Das ursprüngliche Ziel des Screenings, die Identifizierung von neuen DKP-abbauenden Bakterien, wurde nicht erreicht. Es konnten jedoch eine Vielzahl an Stämmen, bei denen es sich vermutlich um Stickstofffixierer handelt, aus marinen Organismen unter definierten Bedingungen isoliert werden. Diese Stämme wurden für weitere Untersuchungen an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ute Hentschel Humeida (Universität Würzburg) übergeben, die sich mit der Diversität, Physiologie und den molekularen Mechanismen von Interaktionen zwischen Tieren (z. B.: Schwämmen) bzw. Pflanzen und mikrobiellen Symbionten beschäftigt.

Um das Problem der Stickstofffixierer zu umgehen, würde sich ein Screening mit DKPs als einziger Kohlenstoffquelle anbieten. Beispielsweise wiesen bei einem Screening nach einer L-Sorbose Dehydrogenase mit 2-Keto-L-Gulonsäure als einziger Kohlenstoffquelle 50 % der isolierten Stämme die gewünschte Aktivität auf (Lee, Pan 1999).

5.2.3 DSM 329 und DSM 40062

Für die Stämme *Bacillus circulans* ATCC 9966 (entspricht *Paenibacillus chibensis* DSM 329) und *Streptomyces flavovirens* IFO 3197 (entspricht DSM 40062) ist die Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) mit ganzen Zellen beschrieben (Yokozeki et al. 1990). Dies konnte mittels Ganzzellbiotransformation bestätigt werden. Erstmals wurde die Spaltung

von Cyclo(Asp-Phe) auch mit dem Rohextrakt beider Stämme gezeigt. Dabei wurden für DSM 329 spezifische Aktivitäten zwischen 19 und 55 mU/mg_{Protein} und für DSM 40062 Werte im Bereich von 16 bis 80 mU/mg_{Protein} bestimmt. Diese Schwankungen lassen sich teils auf geringe Unterschiede bei der Versuchsdurchführung (z. B. Dauer des Zellaufschlusses, Zeitabschnitt für Aktivitätsberechnung) zurückführen. Für Stämme der Gattung *Streptomyces* sind für die Kultivierung in Flüssigmedium unterschiedliche Wachstumsformen wie die Bildung von Pellets oder Myzelien beschrieben (Whitaker 1992). Der verwendete Stamm *Streptomyces flavovirens* DSM 40062 wies ein pelletförmiges Wachstum auf (vgl. Abbildung 5.1). Daher konnte für dieses Bakterium keine OD₆₀₀ bei der Kultivierung und dem Zellaufschluss eingestellt werden, was weitere Schwankungen bei den Ergebnissen erklärt.

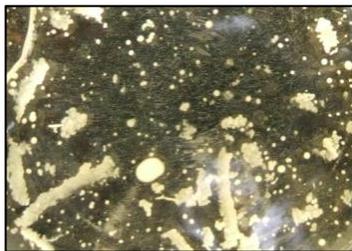


Abbildung 5.1: Pelletförmiges Wachstum von *Streptomyces flavovirens* DSM 40062 in Flüssigkultur

Für den Rohextrakt eines *Bacillus circulans* Stammes wurde für die hydrolytische Spaltung von Cyclo(Asp-Phe) eine spezifische Aktivität von 33 mU/mg_{Protein} beschrieben (Pantaleone et al. 1998). Die Werte für die spezifische Aktivität der DKP-hydrolysierenden Enzyme aus DSM 329 und DSM 40062 liegen im gleichen Bereich.

Mit diesen beiden Stämmen wurden verschiedene Untersuchungen zur Charakterisierung der Enzyme durchgeführt, die im Folgenden diskutiert werden.

5.2.3.1 Substratspektrum

Zur Bestimmung des Substratspektrums wurde die Abbaubarkeit weiterer DKPs, Cyclo(Gly-Gly), Cyclo(Ala-Ala), Cyclo(Gly-Phe), Cyclo(Asp-Asp), Cyclo(Pro-Tyr), Cyclo(Arg-Arg), Cyclo(Lys-Lys), (S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion, 3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion und 1,3-Dimethylpiperazin-2,5-dion, untersucht (vgl. Abschnitt 4.2.3.1). Dabei konnte die Hydrolyse von Cyclo(Asp-Asp) durch DSM 329 nachgewiesen werden. Beschrieben ist der Abbau dieses DKPs durch die Peptidasen Trypsin und Papain (Matsui 1933), (Ishiyama 1933), (Shibata, Tazawa 1936). Diese Aktivitäten wurden jedoch widerlegt (siehe Abschnitt 5.2.1). Damit kann bisher nur DSM 329 zur Spaltung von Cyclo(Asp-Asp) verwendet werden.

Die anderen aufgeführten DKPs wurden von beiden Stämmen nicht abgebaut.

Mit Cyclo(Asp-Asp) und Cyclo(Gly-Phe) waren zwei Substrate untersucht worden, die in mindestens einer Aminosäure dem Substrat Cyclo(Asp-Phe) entsprechen. Für DSM 329

konnte die Hydrolyse der beiden DKPs mit Aspartatrest gezeigt werden, was auf eine diesbezügliche Präferenz hinweist. Cyclo(Gly-Phe) konnte nicht umgesetzt werden, was darauf hindeutet, dass im Substrat Cyclo(Asp-Phe) der saure Aspartatrest und nicht der aromatische Phenylalaninrest eine entscheidende Rolle für die Enzymaktivität spielt. Interessanterweise wurde in der Vergangenheit das Vorhandensein einer Carboxylgruppe in DKPs durch die Reste Asp oder Glu als Notwendigkeit für die DKP-Hydrolyse betrachtet (Ishiyama 1933), jedoch wurde diese These später widerlegt. Es existieren allerdings einige Aminopeptidasen, die sehr spezifisch gegenüber Peptiden mit einer sauren N-terminalen Aminosäure (Asp und Glu) sind; dies lässt sich damit begründen, dass die meisten Aminopeptidasen mit einem breiten Substratspektrum keine Aktivität gegenüber Peptiden mit diesen Resten aufweisen (Gonzales, Robert-Baudouy 1996). Beispielsweise spaltet eine Aspartataminopeptidase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* spezifisch an Peptiden mit einem N-terminalen Asp (Yokoyama et al. 2006). Eine Dipeptidase aus *Salmonella enterica* zeigte eine hohe Spezifität gegenüber diversen Asp-Xaa Dipeptiden (Lassy, Miller 2000). Die genannten Spezifitäten bezüglich eines N-terminalen Asp in linearen Peptiden könnten auf eine entsprechende Enzymaktivität bezüglich der Spaltung in cyclischen Dipeptiden durch DSM 329 übertragen werden.

Unterschiedliche Substratspezifitäten gegenüber DKPs wurden bereits für verschiedene Stämme beschrieben. Die Stämme *Arthrobacter* sp. 1-3-1 und *coryneform rod bacterium* T-1-3-Y zeigten ein relativ breites Substratspektrum und wiesen eine Präferenz für DKPs mit Glycinresten auf (Kanzaki et al. 1997). Für den Stamm *Agrobacterium radiobacter* NM 5-3 wurde die Hydrolyse von drei glycinhaltigen DKPs beschrieben (Kanzaki et al. 2000).

Da die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht mit aufgereinigten Enzymen, sondern im Rohextrakt bzw. mit ganzen Zellen durchgeführt wurden, bleibt offen, ob die Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) und Cyclo(Asp-Asp) durch das gleiche oder durch zwei verschiedene Enzyme katalysiert worden ist. Um dies zu überprüfen, könnten beispielsweise eine Proteinaufreinigung oder Untersuchungen mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt werden. Alternativ könnten die Aktivitäten gegenüber beiden Substraten unter verschiedenen Versuchsbedingungen (z. B.: Variation des pH-Werts oder der Temperatur) verglichen werden. Würden dabei für den Umsatz der zwei DKPs unterschiedliche Optima bestimmt, wären vermutlich zwei Enzyme an der Hydrolyse beteiligt.

Für DSM 40062 liegt durch den Umsatz nur eines DKPs eine hohe Substratspezifität nahe. Eine hohe Substratspezifität wurde bereits für die Cyclo(Gly-Gly) Hydrolase aus *Bacillus* sp. No. 106 beschrieben; diese konnte von 33 untersuchten DKPs nur Cyclo(Gly-Gly) umsetzen (Muro et al. 1985).

Für eine genauere Bestimmung der Substratspektren müsste die Hydrolyse weiterer DKPs untersucht werden. Für DSM 329 wären Untersuchungen von DKPs mit Aspartatrest interessant und für DSM 40062 DKPs mit Aminosäureresten, die andere als die bisher untersuchten funktionellen Gruppen enthalten, wie z. B. die Thiolgruppe im Cystein. Ebenfalls wären Untersuchungen mit strukturverwandten Substraten (z. B.: Dihydropyrimidine) interessant.

5.2.3.2 Produktbildung

Bei der Spaltung eines DKPs mit zwei verschiedenen Aminosäureresten können je nach Angriffsstelle des Enzyms zwei mögliche Dipeptide entstehen. In Abbildung 5.2 ist dies beispielhaft für die Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) gezeigt. Je nachdem welche Peptidbindung angegriffen wird, kann Asp-Phe oder Phe-Asp gebildet werden. Wird mit nicht aufgereinigten Enzymen gearbeitet, befinden sich in den Zellen bzw. im Rohextrakt Dipeptidasen, welche die Hydrolyse der Dipeptide zu den korrespondierenden Aminosäuren Asp und Phe katalysieren können (Pantaleone et al. 1998).

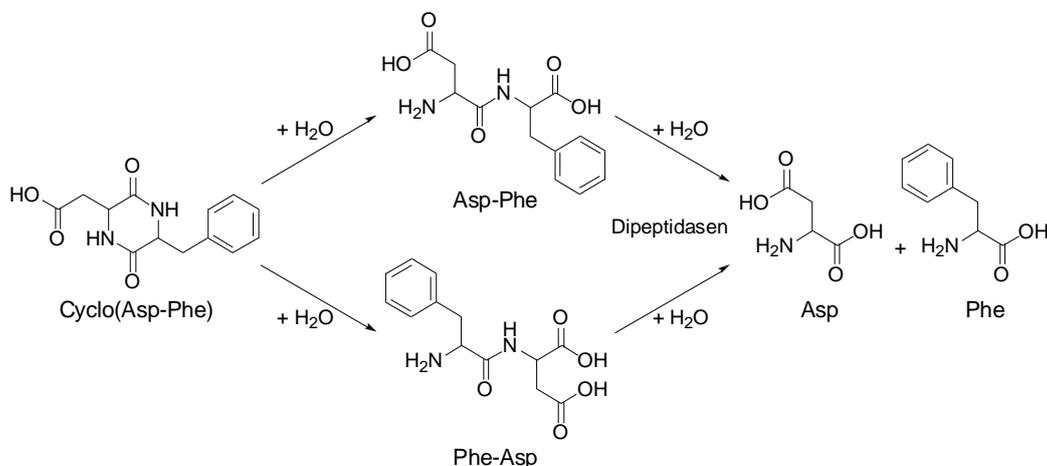


Abbildung 5.2: Spaltung von Cyclo(Asp-Phe) zu Asp-Phe oder Phe-Asp und weiterer Abbau durch Dipeptidasen zu den Aminosäuren Asp und Phe (modifiziert nach Pantaleone et al. 1998)

Für *Paenibacillus chibensis* DSM 329 und *Streptomyces flavovirens* DSM 40062 wurde die Produktbildung überprüft (vgl. Abschnitt 4.2.3.2). Bei Biotransformationen mit den Rohextrakten beider Stämme wurde bei der Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) Phenylalanin als Produkt bestimmt. DSM 329 zeigte beim Abbau des Substrats Cyclo(Asp-Phe) eine äquimolare Bildung des Produkts. Hingegen konnte für DSM 40062 bei vollständigem Substratabbau keine 100 %ige Bildung von Phe nachgewiesen werden; dies wurde vermutlich weiter abgebaut. Die Bildung des wahrscheinlich äquimolar entstehenden Aspartats konnte bei der Detektion bei einer Wellenlänge von 210 nm nicht gemessen werden. Die potentiell entstehenden Dipeptide Asp-Phe oder Phe-Asp konnten für beide Stämme nicht bestimmt werden, was vermutlich auf die Aktivität von Dipeptidasen im Rohextrakt dieser Stämme zurückzuführen ist. Somit kann keine Aussage darüber getroffen

werden, welche Peptidbindung im DKP-Ring gespalten wird, oder ob beide Bindungen hydrolysiert werden.

Für DSM 329 konnte bei der Hydrolyse von Cyclo(Asp-Asp) das Dipeptid Asp-Asp nachgewiesen werden. Bei diesem Substrat handelt es sich um ein symmetrisches Molekül, daher ist die Bildung von nur einem Dipeptid möglich. Maximal konnten nur 42 % Asp-Asp bezogen auf die Anfangssubstratkonzentration bei 100 %igem Substratabbau detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass Asp-Asp ebenfalls zumindest teilweise durch im Rohextrakt vorhandene Dipeptidasen abgebaut wird.

Dass die potentiell entstehenden Dipeptide durch Dipeptidasen abgebaut werden, ist sehr wahrscheinlich, da beim mikrobiellen Proteinkatabolismus die Proteine zunächst durch Endopeptidasen in kleinere Peptide zerlegt und danach schrittweise durch Exopeptidasen zu den einzelnen Aminosäuren abgebaut werden (Rao et al. 1998). Beispielsweise ist der Abbau von Dipeptiden aus nahezu allen proteinogenen L-Aminosäuren und Glycin durch *E. coli* beschrieben (Miller 1975). Am Abbau der Dipeptide sind zum einen Enzyme mit einem breiten Substratspektrum verantwortlich, wie beispielsweise die aus *E. coli* identifizierte Peptidase A und Peptidase D (Miller, Schwartz 1978) und eine Dipeptidase (Patterson et al. 1973), sowie eine Dipeptidase aus *Lactobacillus helveticus* (ebenso wie *Paenibacillus chibensis* DSM 329 ein Bakterium der Klasse *Bacilli*) (Shao et al. 1997). Zum anderen sind spezifische Enzyme an der Dipeptidhydrolyse beteiligt, wie beispielsweise die aus *E. coli* identifizierte Peptidase P und Peptidase Q (Miller, Schwartz 1978), sowie eine Peptidase E aus *Salmonella typhimurium*, welche mehrere Dipeptide mit N-terminalen Asp (z. B.: Asp-Phe, Asp-Asp), jedoch keine Dipeptide mit C-terminalen Asp (z. B.: Phe-Asp) spalten kann (Carter, Miller 1984). Entsprechende Dipeptidasen könnten in DSM 329 und DSM 40062 für den Abbau der potentiell bei der Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) bzw. von Cyclo(Asp-Asp) entstehenden Dipeptide verantwortlich sein.

In der Literatur sind unterschiedliche Produktbildungen bei der DKP-Hydrolyse beschrieben. Wie bei der Spaltung von Cyclo(Asp-Phe) durch DSM 329 und DSM 40062 konnten bei der Hydrolyse verschiedener DKPs durch *Arthrobacter* sp. 1-3-1 und *coryneform rod bacterium* T-1-3-Y nur die entsprechenden Aminosäuren, nicht aber die korrespondierenden Dipeptide nachgewiesen werden (Kanzaki et al. 1997). Dies veranlasste die Autoren zu der Vermutung, dass die entstehenden Dipeptide von dipeptidspaltenden Enzymen mindestens ebenso schnell abgebaut werden, wie sie bei der DKP-Hydrolyse gebildet werden (Kanzaki et al. 1997). Im Gegensatz zu den bisher diskutierten Ergebnissen, konnte für das Cyclo(Asp-Phe)-abbauende Enzym aus *Bacillus circulans* die Bildung von Asp-Phe gezeigt werden, nicht jedoch von Phe-Asp (Pantaleone et al. 1998). Eine weitere Möglichkeit bei der Produktbildung besteht im Nachweis beider möglicher Dipeptide. Für das Cyclo(Gly-Leu)-hydrolysierende Enzym aus *Agrobacterium radiobacter* NM 5-3 wurden beide

möglichen Dipeptide Gly-Leu und Leu-Gly nachgewiesen (Kanzaki et al. 2000). Darüber hinaus wurden die entsprechenden Aminosäuren Gly und Leu als Produkte identifiziert (Kanzaki et al. 2000). Sowohl durch den Einsatz von verschiedenen Dipeptidaseinhibitoren, als auch durch die Anreicherung zweier Fraktionen konnten die Autoren bestätigen, dass am Abbau des DKPs zu den korrespondierenden Dipeptiden und anschließender Hydrolyse zu den Aminosäuren mindestens zwei verschiedene Enzyme (DKP-Hydrolase und Dipeptidase) beteiligt sind (Kanzaki et al. 2000).

Zur weiteren Charakterisierung der Produktbildung durch die DKP-hydrolysierenden Enzyme aus DSM 329 und DSM 40062, wäre der Einsatz von Dipeptidaseinhibitoren oder die Enzymbaufreinigung sinnvoll. Dadurch könnte bestimmt werden, ob die Spaltung des DKPs zum entsprechenden Dipeptid und die weitere Hydrolyse zu den Aminosäuren durch zwei verschiedene Enzyme katalysiert werden. Außerdem wäre es möglich die potentiell gebildeten Dipeptide nachzuweisen, um Informationen bezüglich der Angriffsstelle im cyclischen Dipeptid zu erhalten.

5.2.3.3 Induktion der Aktivität

Für *Streptomyces flavovirens* DSM 40062 konnte eine gesteigerte Hydrolyserate von Cyclo(Asp-Phe) nach Induktion mit dieser Substanz während der Kultivierung gezeigt werden (vgl. Abschnitt 4.2.3.3). Die Aktivitätssteigerung war abhängig von der Cyclo(Asp-Phe) Konzentration. Eine konzentrationsabhängige Induktion der Enzymaktivität ist auch für die DKP-Hydrolyse mit den Stämmen *Arthrobacter* sp. 1-3-1 und einem *coryneform rod bacterium* T-1-3-Y beschrieben (Kanzaki et al. 1997). Im Gegensatz dazu zeigte die Zugabe von Cyclo(Asp-Phe) zum Kultivierungsmedium keinen Einfluss auf die Enzymaktivität in *Paenibacillus chibensis* DSM 329.

Ein gut untersuchtes Beispiel für die Regulation der Genexpression in Bakterien stellt der Lactosemetabolismus in *E. coli* dar. In Anwesenheit von Lactose wird die Genexpression von Enzymen, die an der Spaltung dieses Disaccharids beteiligt sind, wie beispielsweise der β -Galactosidase, induziert (Jacob, Monod 1961). Die substratabhängige Genexpression ist auch für andere Bakterien und Enzyme beschrieben. So wird die β -Lactamase aus *Enterobacter cloacae* in Anwesenheit von verschiedenen β -Lactam-Antibiotika exprimiert (Minami et al. 1980). Für eine Amidase aus *Pseudomonas aeruginosa* stellte das Substrat Acetamid einen effektiven Induktor dar (Brammar, Clarke 1964), und die Aktivität einer Peptidase aus *Nocardia orientalis* wurde durch die Zugabe von Aminosäuren oder Dipeptiden zum Kultivierungsmedium gesteigert (Sugie et al. 1986).

Bezüglich der DKP-Hydrolyse in den beiden untersuchten Stämmen kann folgendes geschlussfolgert werden: Bei DSM 329 handelt es sich vermutlich um ein konstitutives Gen, welches auch in Abwesenheit des Substrats exprimiert wird. Somit könnte das Enzym am Grundstoffwechsel der Zelle beteiligt sein, wo es eventuell eine andere als die hier

nachgewiesene Reaktion katalysiert. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei DSM 40062 vermutlich um ein reguliertes Gen, welches zwar auch in Abwesenheit von Cyclo(Asp-Phe) exprimiert wird, aber in Gegenwart des Substrats konzentrationsabhängig induziert wird.

5.2.3.4 Enzyminhibierung

Um Hinweise für die Enzymklassifikation der DKP-hydrolysierenden Enzyme aus *Paenibacillus chibensis* DSM 329 und *Streptomyces flavovirens* DSM 40062 zu erhalten, wurde der Einfluss von vier Peptidaseinhibitoren untersucht (vgl. Abschnitt 4.2.3.4). Dabei wurden EDTA (Metallopeptidaseinhibitor), E-64 (Cysteinpeptidaseinhibitor), Pepstatin (Aspartatpeptidaseinhibitor) und PMSF (Serinpeptidaseinhibitor) verwendet.

Für DSM 329 konnte eine starke Inhibierung der Cyclo(L-Asp-L-Phe)-Hydrolyseaktivität durch EDTA und eine schwache Inhibierung durch PMSF und E-64 nachgewiesen werden. Als Komplexbildner hemmt EDTA generell metallionenabhängige Enzyme. Dies legt den Schluss nahe, dass das untersuchte Enzym aus DSM 329 ein metallionenabhängiges Protein, jedoch nicht zwangsläufig eine Metallopeptidase ist.

Aufgrund der allerdings schwächeren Hemmung durch PMSF und E-64 könnte es auch eine Serinpeptidase oder Cysteinpeptidase sein. Da PMSF zwar vor allem Serinpeptidasen inhibiert (Fahrney, Gold 1963), aber auch die Cysteinpeptidase Papain (Whitaker, Perez-Villaseñor 1968), wäre es möglich, dass das DKP-hydrolysierende Enzym aus DSM 329 eine Cysteinpeptidase ist, die auch durch PMSF inhibiert wird.

Bereits in der Vergangenheit wurden aufgrund von Inhibierungen DKP-abbauender Enzyme durch verschiedene Peptidaseinhibitoren Rückschlüsse auf die Enzymklassifikation gezogen. So wurde die Cyclo(Gly-Gly) Hydrolase aus *Bacillus* sp. No. 106 stark durch EDTA und vollständig durch die mit Thiolgruppen reagierenden Substanzen *p*-Chlormercuribenzoessäure und Monoiodessigsäure inhibiert (Muro et al. 1985). Die Autoren postulierten, dass es sich bei dem untersuchten Enzym um ein metallionenabhängiges Thioenzym handelt. Diese Hypothese wurde durch Beobachtungen gestützt, dass das Enzym durch verschiedene Metallionen aktiviert wurde (Muro et al. 1985). Ein Enzym aus einem *Bacillus circulans* Stamm wurde aufgrund der Inhibierung durch PMSF als Serinpeptidase-ähnliches Enzym klassifiziert (Pantaleone et al. 1998).

Für das Cyclo(Asp-Phe)-spaltende Enzym aus DSM 40062 zeigte keiner der vier Peptidaseinhibitoren eine signifikante Inhibierung der Aktivität. Daher liegen die Schlussfolgerungen nahe, dass die verwendeten Peptidaseinhibitorkonzentrationen nicht ausreichend hoch eingesetzt worden waren, oder dass es sich nicht um ein durch die untersuchten Peptidaseinhibitoren inhibiertes Enzym handelt. Die eingesetzten Konzentrationen waren allerdings anhand empfohlener Werte ausgewählt worden (Sciencegateway Protease inhibitors).

5.2.3.5 Proteinanreicherung

Da bisher weder Charakterisierungen der aufgereinigten Cyclo(Asp-Phe) hydrolysierenden Enzyme aus DSM 329 und DSM 40062 vorgenommen wurden, noch deren Sequenzen vorliegen, wurden erste Schritte zur Proteinaufreinigung durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.2.3.5 und 4.2.3.6). Dabei konnte eine Anreicherung der Enzyme beider Stämme mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und Ionenaustauschchromatographie erreicht werden. Bei der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung wurde der höchste Reinigungsfaktor für DSM 329 mit 4,2 im Pellet bei einer Ammoniumsulfatsättigung von 80 % und für DSM 40062 mit 2,2 im Pellet bei 60 % Sättigung erreicht. Damit war die Anreicherung geringer als für die Cyclo(Gly-Gly) Hydrolase aus *Bacillus* sp. No. 106 mit einem Reinigungsfaktor von 6,7 bei der Ammoniumsulfatfällung (Muro et al. 1985). Jedoch konnte eine erste Anreicherung der gesuchten Enzyme aus DSM 329 und DSM 40062 erzielt und die ungefähren Ammoniumsulfatsättigungen bestimmt werden, bei denen die Enzyme gefällt werden.

Mittels eines starken Anionenaustauschers und der Elution der Proteine mittels linearem KCl-Gradienten bei der Ionenaustauschchromatographie wurde das Enzym aus DSM 329 mit einem Reinigungsfaktor von 1,1 bei einer Ausbeute von 13 % (beste Fraktion) und aus DSM 40062 mit einem Reinigungsfaktor von 1,2 bzw. 1,8 bei einer Ausbeute von 17 bzw. 9 % (besten zwei Fraktionen) angereichert. Dies entspricht noch nicht den guten Aufreinigungen mittels Ionenaustauschchromatographie wie für die Cyclo(Gly-Gly) Hydrolase aus *Bacillus* sp. No. 106 mit einem Reinigungsfaktor von 6,7 und einer Ausbeute von 71 % (Muro et al. 1985) oder für das Cyclo(Asp-Phe)-hydrolysierende Enzym aus *Bacillus circulans* mit einem Reinigungsfaktor von 7,0 und einer 100 %igen Ausbeute (Pantaleone et al. 1998) beschrieben ist. Es ist möglich, dass die Enzyme durch den strapaziösen und nicht optimierten Aufreinigungsschritt einen Aktivitätsverlust erlitten haben. Jedoch konnte erstmalig gezeigt werden, dass diese Aufreinigungsmethode für die Enzyme beider Stämme anwendbar ist. Außerdem konnten Hinweise für die Elutionsbedingungen (KCl-Konzentration) der Enzyme gesammelt werden.

Anzustreben wäre eine ebenso gute Aufreinigung wie für das DKP-abbauende Enzym aus *Bacillus circulans* beschrieben, welches nach fünf Aufreinigungsschritten 85-fach aufgereinigt mit einer 15 %igen Ausbeute vorlag (Pantaleone et al. 1998). Für das aufgereinigte Enzym wurde mittels Gelfiltration ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa bestimmt (Pantaleone et al. 1998). Werden zum Vergleich die SDS-Gele nach den Proteinanreicherungen von DSM 329 und DSM 40062 betrachtet, so lässt sich die von Pantaleone et al. bestimmte Proteingröße weder belegen noch widerlegen, da die Proteinanreicherungen keine Fraktionen mit nur wenigen Proteinbanden lieferten. Somit

können keine Rückschlüsse auf die Größe der DKP-Hydrolasen aus diesen beiden Stämmen gezogen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Aufreinigungsmethoden für die DKP-hydrolysierenden Enzyme beider Stämme geeignet sind, jedoch müssten diese jeweils optimiert werden. Bei der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung kann der identifizierte Sättigungsbereich, in dem die gesuchten Enzyme gefällt werden, für weitere Untersuchungen genutzt werden. Bei der Ionenaustauschchromatographie kann anhand der ermittelten Werte der Elutionsgradient optimiert werden, wie beispielsweise durch Verwendung eines Stufengradienten anstelle der linearen Elution. Um reine Enzyme zu erhalten sind weitere Aufreinigungsschritte, wie z. B. mittels hydrophober Interaktionschromatographie und Größenausschluss-Chromatographie, nötig. Da es sich bei DSM 329 vermutlich um ein metallionenabhängiges Enzym handelt (siehe Abschnitt 5.2.3.4), könnte eine erfolgreiche Aufreinigung auch durch Einsatz der Metallchelate-Affinitätschromatographie erreicht werden. So wurde beispielsweise eine metallionenabhängige Amidohydrolase aus Kalbsleber erfolgreich aufgereinigt (Kautz, Schnackerz 1989). Die aufgereinigten Enzyme könnten durch Bestimmung verschiedener Eigenschaften z. B. Temperatur- und pH-Optima, sowie kinetische Parameter näher charakterisiert werden. Nach Sequenzanalyse der reinen Enzyme könnte die Zuordnung zu einer Enzymklasse erfolgen.

5.2.4 Stämme mit cyclische Amidase Aktivität

Für einige Stämme wurde sowohl die Hydrolyse von Hydantoinen als auch die Spaltung von Dihydropyrimidinen beschrieben. Eine Zusammenfassung der Aktivitäten der verschiedenen Stämme ist in Tabelle 3.7 und Tabelle 3.8 dargestellt. Aufgrund der Strukturhomologie von Hydantoinen, Dihydropyrimidinen und DKPs wurde für diese Stämme die Hydrolyse verschiedener DKPs untersucht (vgl. Abschnitt 4.2.4).

Mit Ausnahme des *E. coli* Wildtypstamms (Negativkontrolle) konnte für alle 35 untersuchten Stämme Aktivität gegenüber dem als Positivkontrolle eingesetzten Dihydropyrimidin Dihydrouracil gezeigt werden. Dabei wurden größtenteils zuvor beschriebene Aktivitäten (Dürr 2007) und (Dürr et al. 2006) bestätigt. Für die Stämme *Aminobacter* sp. 728, *Mesorhizobium* sp. 731, *Aminobacter* sp. 735, und die nicht klassifizierten Stämme 725, 157, 158, 222, 225 wurden institutsinterne nicht veröffentlichte Ergebnisse bestätigt. Für den Stamm *Rhizobium* sp. NA04-01 wurde bisher nur die Hydrolyse von 6-Phenyldihydrouracil und *p*-Chlor-6-Phenyldihydrouracil beschrieben (Engel et al. 2012), somit konnte die Hydrolyse von Dihydrouracil zum ersten Mal gezeigt werden.

Erstmals konnte der Abbau von verschiedenen DKPs durch sechs dieser Stämme nachgewiesen werden. Die Stämme *Bacillus* sp. F18, *Pseudomonas* sp. M18 und ein nicht

klassifizierter Stamm mit der Bezeichnung 222 zeigten einen geringen, teils erst nach einer längeren Zeit einsetzenden Umsatz von Cyclo(Ala-Ala). Dies bleibt unter optimierten Versuchsbedingungen, wie längere Versuchsdauer mit mehr Zeitproben und dem Einsatz größerer Zellmengen zu bestätigen.

Für drei weitere Stämme konnte hingegen eindeutig der Abbau mehrerer DKPs mit ganzen Zellen gezeigt werden. *Leifonia* sp. (früher *Microbacteriaceae* sp.) K3 und *Bacillus* sp. A16 hydrolysierten Cyclo(Ala-Ala) und Cyclo(Gly-Phe), und *Rhizobium* sp. NA04-01 hydrolysierte Cyclo(Asp-Phe), Cyclo(Gly-Phe) und Cyclo(Asp-Asp).

Der Vergleich der Substratspektren dieser Stämme (siehe Tabelle 5.1 mit Angabe der jeweiligen Literaturstellen) zeigt, dass von den Stämmen *Leifonia* sp. K3, *Bacillus* sp. A16, *Bacillus* sp. F18, *Pseudomonas* sp. M18 und Stamm 222 jeweils mindestens ein Hydantoin, Dihydropyrimidin und nun auch ein strukturverwandtes DKP hydrolysiert werden kann. Für *Rhizobium* sp. NA04-01 wurde bisher die Spaltung zweier Dihydropyrimidine beschrieben. Nun konnte zusätzlich die Hydrolyse von drei DKPs gezeigt werden. Für den Abbau von Hydantoinen liegen keine Daten vor.

Für *Leifonia* sp. K3 konnte neben der beschriebenen Spaltung von 5-Benzylhydantoin mit Cyclo(Gly-Phe) die Hydrolyse eines weiteren Substrats mit einem aromatischen Ring als Rest gezeigt werden. *Bacillus* sp. A16 konnte alle getesteten Hydantoine und Dihydropyrimidine abbauen und in dieser Arbeit wurde zusätzlich die Hydrolyse zweier DKPs bestimmt. Dieser Stamm weist somit ein breites Substratspektrum auf. *Bacillus* sp. F18 bzw. *Pseudomonas* sp. M18 besitzen mit der beschriebenen Hydrolyse von sechs bzw. fünf Hydantoinen und Dihydropyrimidinen und nun je eines DKPs ebenfalls ein relativ breites Substratspektrum. Für den Stamm 222 und *Rhizobium* sp. NA04-01 wurde bisher erst die Spaltung weniger Substrate untersucht, somit ist keine Aussage zum jeweiligen Substratspektrum möglich. Für *Rhizobium* sp. NA04-01 ist allerdings das DKP-Substratspektrum sehr interessant. Mit Cyclo(Asp-Phe), Cyclo(Gly-Phe) und Cyclo(Asp-Asp) wurden DKPs hydrolysiert, die in den Aminosäureresten teils übereinstimmen. Es kann eine Präferenz für Substrate mit einem Phenylalaninrest bzw. einem Aspartatrest vermutet werden. Jedoch sind nicht beide Reste für die Hydrolyse notwendig, da auch DKPs mit nur je einem dieser beiden Reste hydrolysiert werden können.

Tabelle 5.1: Substratspektrum von Stämmen mit cyclische Amidase Aktivität, welche neu für die Hydrolyse von DKPs identifiziert wurden

(grün) Aktivität, (rot) keine Aktivität, (grau) nicht untersucht, Aktivität in Klammern: geringer Umsatz, der erst nach einiger Zeit eingesetzt hat;

(H) Hydantoin, (BnH) 5-Benzylhydantoin, (*t*-BH) 5-*tert*-Butylhydantoin, (IMH) 5-(3-Indolylmethyl)-Hydantoin, (DU) Dihydrouracil, (PheDU) 6-Phenyldihydrouracil, (*p*ClPheDU) *p*-Chlor-6-Phenyldihydrouracil, (cAA) Cyclo(Ala-Ala), (cDF) Cyclo(Asp-Phe), (cGF) Cyclo(Gly-Phe), (cDD) Cyclo(Asp-Asp)

Spezies	Stamm	H	BnH	<i>t</i> -BH	IMH	DU	PheDU	<i>p</i> ClPheDU	DKP
<i>Leifsonia</i> sp.	K3	- ¹	+ ²	- ¹	- ¹	+ ²	- ⁴		cAA ⁵ , cGF ⁵
<i>Bacillus</i> sp.	A16	+ ¹	+ ²	+ ¹	+ ¹	+ ²	+ ⁴	+ ⁴	cAA ⁵ , cGF ⁵
<i>Bacillus</i> sp.	F18	+ ¹	+ ²	+ ¹	+ ¹	+ ²	+ ¹		(cAA) ⁵
<i>Pseudomonas</i> sp.	M18	+ ¹	+ ²	+ ¹	+ ¹	+ ²	- ⁴		(cAA) ⁵
nicht bestimmt	222				+ ⁴	+ ⁴			(cAA) ⁵
<i>Rhizobium</i> sp.	NA04-01					+ ⁵	+ ⁴	+ ⁴	cDF ⁵ , cGF ⁵ , cDD ⁵

¹ (Dürr 2007), ² (Dürr et al. 2006), ³ (Dürr et al. 2008), ⁴ (Engel et al. 2012), ⁵ diese Arbeit

Die Strukturformeln der untersuchten Hydantoine und Dihydropyrimidine sind in Abbildung 1.6 und die der DKPs in Abbildung 1.2 dargestellt.

In einer früheren Untersuchung wurde bereits das Substratspektrum eines Stammes bezüglich der Hydrolyse von DKPs und eines Dihydropyrimidins untersucht. Es wurde gezeigt, dass der Stamm *Bacillus* sp. No. 106 zwar Cyclo(Gly-Gly) abbauen kann, aber kein Dihydrouracil (Muro et al. 1985). Damit konnten in dieser Arbeit zum ersten Mal Stämme für die gleichzeitige Hydrolyse von Hydantoinen, Dihydropyrimidinen und DKPs identifiziert werden. Es kann jedoch nicht gesagt werden, ob die Hydrolyse der drei Substratklassen durch die gleichen Enzyme katalysiert werden. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zwei *E. coli* Stämme mit je einem rekombinanten D-Hydantoinase kodierenden Gen (aus *Ochrobactrum* sp. G21 und aus *Delftia* sp. I24) untersucht. Für diese Stämme ist bekannt, dass jeweils die rekombinant exprimierten Hydantoinasen für die gleichzeitige Hydrolyse von Hydantoinen und Dihydropyrimidinen verantwortlich sind. So ist für diese beiden Hydantoinasen die Hydrolyse zweier Hydantoine (5-Benzylhydantoin und 5-(3-Indolylmethyl)-Hydantoin) (Dürr et al. 2008) und zweier Dihydropyrimidine (6-Phenyldihydrouracil und *p*-Chlor-6-Phenyldihydrouracil) (Engel et al. 2012) beschrieben. Mit den beiden Stämmen und dem *E. coli* Wildtypstamm als Negativkontrolle wurde untersucht, ob die rekombinant exprimierten D-Hydantoinasen auch die Hydrolyse von DKPs katalysieren können. Für beide rekombinanten Stämme konnte die Hydrolyse von Dihydrouracil nachgewiesen werden. Dies wurde zuvor nur für die beiden Wildtypstämme *Ochrobactrum* sp. G21 und *Delftia* sp. I24 beschrieben (Dürr et al. 2006). Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass die rekombinant exprimierten Enzyme Dihydrouracil abbauen können. Hingegen waren beide rekombinanten Stämme (sowie der *E. coli*

Wildtypstamm) nicht in der Lage eines der getesteten DKPs zu hydrolysieren. Daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob Hydantoinasen auch DKPs hydrolysieren können.

Die zunächst in dieser Arbeit verfolgte Hypothese, dass DKPs eventuell durch Peptidasen gespalten werden können (vgl. Abschnitt 5.2.1) lässt sich mit den Arbeiten mit Stämmen, die Hydantoinase Aktivität aufweisen in Verbindung bringen. So konnte für die Peptidase Papain der Umsatz von 5-mono- und 5,5'-disubstituierten Hydantoinen gezeigt werden (Rai, Taneja 1998).

Betrachtet man die DKPs, die für die Untersuchungen mit den cyclische Amidase Stämmen verwendet wurden, so kann folgendes festgehalten werden. Der in dieser Arbeit gezeigte Abbau von Cyclo(Asp-Phe) bzw. Cyclo(Gly-Phe) durch einen bzw. drei der Stämme ist bereits für andere Bakterien beschrieben worden. Für die Hydrolyse von Cyclo(Asp-Phe) sind beispielsweise 11 Stämme beschrieben (Yokozeiki et al. 1990), von denen die beiden Stämme *Paenibacillus chibensis* DSM 329 und *Streptomyces flavovirens* DSM 40062 ebenfalls in dieser Arbeit untersucht wurden. Der Abbau von Cyclo(Gly-Phe) wurde für die Stämme *Arthrobacter* sp. 1-3-1 und *coryneform rod bacterium* T-1-3-Y gezeigt (Kanzaki et al. 1997). Im Gegensatz dazu wurde weder die enzymatische noch die mikrobielle Hydrolyse von Cyclo(Ala-Ala) zuvor beschrieben. Damit konnten erstmals Stämme für den Abbau dieses DKPs identifiziert werden. Zudem wurde für das Substrat Cyclo(Asp-Asp) neben DSM 329 (vgl. Abschnitt 5.2.3.1) ein weiterer Stamm für dessen Hydrolyse identifiziert. Cyclo(Pro-Tyr) ist ein in der Natur verbreitetes DKP, welches beispielsweise aus den Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* (Jayatilake et al. 1996), *Vibrio parahaemolyticus* (Bell et al. 1994) und *Actinomyces* sp. (Arunrattiyakorn et al. 2006), der Hefe *Alternaria alternata* (Stierle et al. 1988a) und dem Schwamm *Jaspis digonoxea* (Rudi et al. 1994) isoliert wurde. Die Schlussfolgerung liegt nahe, dass Stämme existieren, die dieses DKP abbauen können. Trotz der Vielfalt der untersuchten Stämme konnte kein Stamm für die Hydrolyse von Cyclo(Pro-Tyr) identifiziert werden. Auch war keiner der Stämme in der Lage das einfachste DKP Cyclo(Gly-Gly), sowie die aus nicht proteinogenen Aminosäuren bestehenden DKPs (S)-3-Benzyl-1,4-dimethylpiperazin-2,5-dion, 3-Benzyl-3-methylpiperazin-2,5-dion und 1,3-Dimethylpiperazin-2,5-dion abzubauen.

In der Literatur ist die DKP-Hydrolyse für ganze Zellen wie z. B. für *Agrobacterium radiobacter* NM 5-3 (Kanzaki et al. 2000), *Arthrobacter* sp. 1-3-1 und ein *coryneform rod bacterium* T-1-3-Y (Kanzaki et al. 1997) beschrieben, sowie für die Rohextrakte von *Bacillus* sp. No. 106 (Muro et al. 1985) und *Bacillus circulans* (Pantaleone et al. 1998) nachgewiesen. Auch für *Leifonia* sp. K3, *Bacillus* sp. A16 und *Rhizobium* sp. NA04-01 wurde der Substratabbau sowohl mit ganzen Zellen als auch mit Rohextrakt untersucht. Für alle drei Stämme wurde ein eindeutiger DKP-Abbau während der Ganzzellbiotransformation

nachgewiesen. Daher ist davon auszugehen, dass die DKPs durch die Zellmembran ins Innere der Zellen gelangen können. Der DKP-Transport von innen nach außen wurde bereits für *E. coli* beschrieben, jedoch ist unklar, ob es sich um Diffusion oder einen Membrantransport handelt (Gruenewald et al. 2004).

Für *Bacillus* sp. A16 wurden die mit ganzen Zellen bestimmten Aktivitäten im Rohextrakt bestätigt. Für *Rhizobium* sp. NA04-01 und *Leifsonia* sp. K3 konnten nicht alle Aktivitäten der Ganzzellbiotransformationen auch mit Rohextrakt nachgewiesen werden. So konnte für *Rhizobium* sp. NA04-01 zwar ein vollständiger Abbau der Positivkontrolle Dihydrouracil und eine schwache Hydrolyse von Cyclo(Asp-Asp), jedoch keine Aktivität gegenüber Cyclo(Asp-Phe) und Cyclo(Gly-Phe) gemessen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Reaktionen nicht von den gleichen Enzymen katalysiert werden. Mit *Leifsonia* sp. K3 wurde weder die Positivkontrolle noch die beiden DKPs Cyclo(Ala-Ala) und Cyclo(Gly-Phe) umgesetzt. Der Aktivitätsverlust im Rohextrakt könnte auf sehr instabile Enzyme zurückzuführen oder durch den Zellaufschluss verursacht worden sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich um cofaktorabhängige Enzyme handelt. Für die DKP-hydrolysierenden Enzyme aus *Arthrobacter* sp. 1-3-1 und *coryneform rod bacterium* T-1-3-Y konnte ebenfalls kein aktiver Rohextrakt hergestellt werden und die Aktivität nur mit ganzen Zellen nachgewiesen werden (Kanzaki et al. 2000).

Für die untersuchten Stämme mit cyclische Amidase Aktivität wäre es von Interesse zu identifizieren, ob die gleichen Enzyme die Hydrolyse von Hydantoinen, Dihydropyrimidinen und DKPs katalysieren können. Dafür wären ebenso wie für DSM 329 (vgl. Abschnitt 5.2.3.1) eine Enzymaufreinigung oder die Bestimmung der Aktivitäten gegenüber den unterschiedlichen Substraten unter verschiedenen Versuchsbedingungen notwendig. Untersuchungen mit weiteren Substraten würden einen guten Überblick über das jeweilige Substratspektrum liefern.

5.2.5 Eigenisolate *Paenibacillus* sp. und *Microbacterium* sp.

5.2.5.1 Enantioselektive Hydrolyse von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala)

Aus Versuchsansätzen zur Bestimmung des Substratspektrums von *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) und *Streptomyces flavovirens* (DSM 40062) ergaben sich Hinweise auf die Hydrolyse von Cyclo(DL-Ala-DL-Ala). Allerdings wurde in darauffolgenden Versuchen eindeutig gezeigt, dass diese beiden Stämme Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) nicht hydrolysieren können (vgl. Abschnitt 5.2.3.1). Um dieser Aktivität nachzugehen, waren die Proben der Biotransformation auf Komplexmedium ausplattiert worden. Dabei konnten zwei neue Stämme isoliert werden. Diese wurden bezüglich ihrer Aktivität gegenüber dem racemischen Substrat Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) analysiert (vgl. Abschnitt 4.2.5.1). Es wurde festgestellt, dass dieses Substrat lediglich zu 75 % von beiden Stämmen abgebaut wird.

Durch die etablierte HPLC-Analytik zur Trennung der Diastereomere konnte der 100 %ige Abbau der *meso*-Form Cyclo(L-Ala-D-Ala) und der 50 %ige Abbau des Enantiomerenpaares bestehend aus Cyclo(L-Ala-L-Ala) und Cyclo(D-Ala-D-Ala) nachgewiesen werden. Beim Einsatz des Enantiomers Cyclo(L-Ala-L-Ala) als Substrat konnte eine 100 %ige Hydrolyse bestimmt werden. Aus diesen Ergebnissen kann für beide Stämme ein enantioselektiver Abbau des racemischen Substrats Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) geschlussfolgert werden, wobei Cyclo(L-Ala-D-Ala) und Cyclo(L-Ala-L-Ala) vollständig hydrolysiert werden und das Enantiomer Cyclo(D-Ala-D-Ala) nicht gespalten wird.

In Untersuchungen von Kanzaki et al. war für *Arthrobacter* sp. 1-3-1 und *coryneform rod bacterium* T-1-3-Y der Abbau von Cyclo(Gly-L-Leu) mit dem von Cyclo(Gly-D-Leu), und von (Gly-L-Ala) mit dem von Cyclo(Gly-D-Ala) verglichen worden. *Arthrobacter* sp. 1-3-1 zeigte keine enantioselektive Hydrolyse von Cyclo(Gly-Leu), bevorzugte jedoch Cyclo(Gly-L-Ala) gegenüber dem D-Enantiomer (Kanzaki et al. 1997). Für das *coryneform rod bacterium* T-1-3-Y konnte eine Präferenz für Cyclo(Gly-L-Leu) identifiziert werden, jedoch wurde auch das entsprechende D-Enantiomer in geringem Maße hydrolysiert; Cyclo(Gly-L-Ala) wurde in sehr geringen Mengen abgebaut und das D-Enantiomer überhaupt nicht (Kanzaki et al. 1997). In einer weiteren Arbeit untersuchten die Autoren die enantioselektive Hydrolyse der gleichen Substrate für *Agrobacterium radiobacter* NM 5-3, wobei jedoch beide Enantiomere beider DKPs ungefähr gleich gut hydrolysiert wurden (Kanzaki et al. 2000).

Damit wurde zwar der enantioselektive Abbau von DKPs untersucht, jedoch konnten zuvor keine enantioselektiven Stämme identifiziert werden, die spezifisch nur ein Enantiomer abbauen. Auch war bisher der enantioselektive Umsatz eines DKPs mit zwei racemischen Aminosäuren wie Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) noch nicht beschrieben. Somit konnten erstmals zwei Stämme für die spezifische enantioselektive Hydrolyse eines DKPs isoliert werden.

Bei der Hydrolyse von Cyclo(L-Ala-L-Ala) wird vermutlich das entsprechende Dipeptid L-Ala-L-Ala gebildet. Abhängig davon, welche Peptidbindung in Cyclo(L-Ala-D-Ala) gespalten wird, würde L-Ala-D-Ala oder D-Ala-L-Ala gebildet. Da jedoch keines der genannten Dipeptide nachgewiesen werden konnte, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine oder beide Peptidbindungen von Cyclo(L-Ala-D-Ala) gespalten wurden. Bei der Spaltung von nur einer Peptidbindung wäre es von Interesse zu analysieren, welche der beiden Bindungen gespalten wird. Dies würde weitere Informationen über die Enantioselektivität der Enzyme liefern.

Beim Vergleich zwischen der neu identifizierten Enantioselektivität bezüglich cyclischer Dipeptide und den Spezifitäten bekannter proteolytischer Enzyme für lineare Peptide kann folgendes festgehalten werden: Für die meisten bakteriellen Aminopeptidasen ist beschrieben, dass sie bevorzugt Peptidbindungen nach einer L-Aminosäure am N-Terminus spalten (Gonzales, Robert-Baudouy 1996). Eine Spezifität bezüglich L-Aminosäuren kann

auch für die Enzyme der beiden Eigenisolate vermutet werden. Es gibt jedoch auch Enzyme, die nur N-terminale D-Aminosäuren abspalten, wie beispielsweise eine Aminopeptidase aus *Ochrobactrum anthropi*, die D-Ala-L-Ala und D-Ala-D-Ala spalten kann, hingegen L-Ala-D-Ala und L-Ala-L-Ala nicht hydrolysiert (Asano et al. 1989). Ebenso wurde für mehrere Stämme der Gattung *Nocardia* gezeigt, dass diese in der Lage sind, Peptidbindungen neben D-Aminosäuren wie z. B. in D-Ala-D-Ala und L-Ala-D-Ala zu spalten (Sugie et al. 1986). Eine vergleichbare Spezifität wäre ebenfalls für die Enzyme der beiden Eigenisolate möglich, abhängig davon welche Peptidbindung in Cyclo(L-Ala-D-Ala) gespalten wird.

Enzyme mit den beschriebenen Aminopeptidaseaktivitäten könnten auch in den beiden isolierten Stämmen vorhanden sein, was erklären würde, warum keines der potentiell gebildeten Dipeptide detektiert werden konnte.

5.2.5.2 Klassifikation der Eigenisolate und Sequenzalignments

Die beiden enantioselektiven Eigenisolate wurden mittels 16S rDNA Sequenzierung und Sequenzalignment als *Paenibacillus* sp. und *Microbacterium* sp. klassifiziert (vgl. Abschnitt 4.2.5.2). Es fällt auf, dass der aus *Paenibacillus chibensis* (DSM 329) isolierte Stamm ebenfalls zu der Gattung *Paenibacillus* gehört. Sequenzabschnitte der 16S rDNA beider Stämme wurden miteinander verglichen (Sequenzalignment siehe Anhang S.146f) und eine Identität von 99 % bei einem Abschnitt von 972 bp ermittelt. Bei diesem Stamm könnte es sich daher eventuell um eine Mutante von DSM 329 handeln, die im Gegensatz zu dem Wildtypstamm die Fähigkeit zur Cyclo(Ala-Ala) Hydrolyse besitzt.

Auch die 16S rDNA Abschnitte des isolierten Stamms *Microbacterium* sp. und des bis dahin als *Microbacteriaceae* sp. K3 bezeichneten Stamms wurden miteinander verglichen (Sequenzalignment siehe Anhang S.146). Aufgrund einer Identität von 93 % kann eindeutig ausgeschlossen werden, dass es sich um identische Stämme handelt. Dieser Stamm könnte ein Luft- bzw. Laborkeim sein, der sich im Rohextrakt von DSM 40062 mit Cyclo(Ala-Ala) ansiedeln konnte.

Die beiden für die enantioselektive Cyclo(DL-Ala-DL-Ala) Hydrolyse identifizierten Stämme wurden durch ein unbeabsichtigtes Screening mit diesem DKP als Hauptkohlenstoff- und Stickstoffquelle isoliert. Aufgrund ihrer enantioselektiven Aktivität könnten diese Stämme von großem Interesse bei der weiteren Charakterisierung von DKP-abbauenden Enzymen sein.

6 Literaturverzeichnis

- Abderhalden E. (1925)** Über die Konstitution von Proteinkörpern. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 142 (5-6):306-313
- Aboul-Enein H. Y., Bakr S. A. (1997)** Comparative study of the separation and determination of aspartame and its decomposition products in bulk material and diet soft drinks by HPLC and CE. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 20:1437-1444
- Adamczeski M., Reed A. R., Crews P. (1995)** New and known diketopiperazines from the caribbean sponge, *Calyx cf. podatypa*. *Journal of Natural Products* 58 (2):201-208
- Akabori S., Takase S. (1936)** Über die Spezifität von Proteinasen. *Proceedings of the Imperial Academy* 12:242-244
- Altenbuchner J., Siemann-Herzberg M., Syldatk C. (2001)** Hydantoinases and related enzymes as biocatalysts for the synthesis of unnatural chiral amino acids. *Current Opinion in Biotechnology* 12 (6):559-563
- Ariza A., Torres M., Fernandez J., Moreno E., Laguna J., Mayorga C., Perez-Inestrosa E., Suau R., Blanca M., Rondon C. (2009)** Minor determinants of amoxicillin in the evaluation of immediate allergic reactions to amoxicillin. *Allergy* 64:24-25
- Arunrattiyakorn P., Nitoda T., Kanzaki H. (2006)** Enzymatic conversion - based method for screening cyclic dipeptide - producing microbes. *Peptides* 27 (4):633-639. doi:10.1016/j.peptides.2005.08.017
- Asano Y., Nakazawa A., Kato Y., Kondo K. (1989)** Properties of a novel D-stereospecific aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi*. *Journal of Biological Chemistry* 264 (24):14233-14239
- Balibar C. J., Walsh C. T. (2006)** GliP, a multimodular nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus*, makes the diketopiperazine scaffold of gliotoxin. *Biochemistry* 45 (50):15029-15038. doi:10.1021/Bi061845b
- Bank R. A., Jansen E. J., Beekman B., Koppele J. M. T. (1996)** Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Improved derivatization and detection conditions with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytical Biochemistry* 240 (2):167-176
- Barnard A. M. L., Salmond G. P. C. (2004)** Quorum Sensing: The complexities of chemical communication between bacteria. *Complexus* 2 (2):87-101
- Bell R., Carmeli S., Sar N. (1994)** Vibrindole A, a metabolite of the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*, isolated from the toxic mucus of the boxfish *Ostracion cubicus*. *Journal of Natural Products* 57 (11):1587-1590
- Bergmann M. (1925)** Über die Konstitution von Proteinkörpern. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 144 (3-6):276-277
- Berset J. D., Ochsenbein N. (2012)** Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Chemosphere* 88 (5):563-569. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.03.030
- Bertani G. (1951)** Studies on lysogenesis 1. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62 (3):293-300

Bopp F. (1849) Einiges über Albumin, Casein und Fibrin. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 69 (1):16-37. doi:10.1002/jlac.18490690104

Borthwick A. D. (2012) 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chemical Reviews* 112 (7):3641-3716. doi:10.1021/cr200398y

Bourne D. G., Jones G. J., Blakeley R. L., Jones A., Negri A. P., Riddles P. (1996) Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (11):4086-4094

Brammar W. J., Clarke P. H. (1964) Induction and repression of *Pseudomonas aeruginosa* amidase. *Journal of General Microbiology* 37 (3):307-319

Bryans J., Charlton P., Chicarelli-Robinson I., Collins M., Faint R., Latham C., Shaw I., Trew S. (1996) Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 activity by two diketopiperazines, XR330 and XR334 produced by *Streptomyces* sp. *Journal of Antibiotics* 49 (10):1014-1021

Campbell L. L. (1958) Reductive degradation of pyrimidines .4. Purification and properties of dihydrouracil hydrase. *Journal of Biological Chemistry* 233 (5):1236-1240

Carmichael W. W., Jones C. L. A., Mahmood N. A., Theiss W. C. (1985) Algal toxins and water based diseases. *Crc Critical Reviews in Environmental Control* 15 (3):275-313

Carter T. H., Miller C. G. (1984) Aspartate-specific peptidases in *Salmonella typhimurium*: Mutants deficient in peptidase E. *Journal of Bacteriology* 159 (2):453-459

Cheetham P. S. J. (1987) Screening for novel biocatalysts. *Enzyme and Microbial Technology* 9 (4):194-213

Chen M. Z., Dewis M. L., Kraut K., Merritt D., Reiber L., Trinnaman L., Da Costa N. C. (2009) 2,5-Diketopiperazines (cyclic dipeptides) in beef: Identification, synthesis, and sensory evaluation. *Journal of Food Science* 74 (2):C100-C105. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01062.x

Cohen S. A., Bidlingmeyer B. A., Tarvin T. L. (1986) PITC derivatives in amino acid analysis. *Nature* 320 (6064):769-770

Compton B. J., Purdy W. C., Phelps D. J. (1979) A high-performance liquid-chromatographic technique for the determination of 2,5-piperazinedione in complex-reaction mixtures. *Analytica Chimica Acta* 105 (1):409-412

Cooper C., Packer N., Williams K. (2001) Amino acid analysis protocols, vol 159. Methods in Molecular Biology. Humana Press

Curtius T., Goebel F. (1888) Ueber Glycocolläther. *Journal für Praktische Chemie* 37 (1):150-181. doi:10.1002/prac.18880370113

Damodaran M., Narayanan E. K. (1938) Enzymic proteolysis: Hydrolysis of asparagine, asparagine peptides and anhydroglycyl-asparagine. *Biochemical Journal* 32 (12):2105-2113

De Rosa S., Mitova M., Tommonaro G. (2003) Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. *Biomolecular Engineering* 20 (4-6):311-316. doi:10.1016/S1389-0344(03)00038-8

Demiralay E. C., Ozkan G. (2004) Optimization strategy for isocratic separation of α -aspartame and its breakdown products by reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia* 60 (9-10):579-582

DSMZ Medium 1.

http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium1.pdf. Zugriff: 16.07.2012

DSMZ Medium 65.

http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium65.pdf. Zugriff: 16.07.2012

Du L., Yang X. Y., Zhu T. J., Wang F. P., Xiao X., Park H., Gu Q. Q. (2009) Diketopiperazine alkaloids from a deep ocean sediment derived fungus *Penicillium* sp. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 57 (8):873-876

Dumdei E. J., Simpson J. S., Garson M. J., Byriel K. A., Kennard C. H. L. (1997) New chlorinated metabolites from the tropical marine sponge *Dysidea herbacea*. *Australian Journal of Chemistry* 50 (2):139-144

Dürr R. (2007) Screening and description of novel hydantoinases from distinct environmental sources. Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), <http://dx.doi.org/10.5445/KSP/1000007011>

Dürr R., Neumann A., Vielhauer O., Altenbuchner J., Burton S. G., Cowan D. A., Syldatk C. (2008) Genes responsible for hydantoin degradation of a halophilic *Ochrobactrum* sp. G21 and *Delftia* sp. I24 - New insight into relation of D-hydantoinases and dihydropyrimidinases. *Journal of Molecular Catalysis B - Enzymatic* 52-3:2-12. doi:10.1016/j.molcatb.2007.10.008

Dürr R., Vielhauer O., Burton S. G., Cowan D. A., Punal A., Brandao P. F. B., Bull A. T., Syldatk C. (2006) Distribution of hydantoinase activity in bacterial isolates from geographically distinct environmental sources. *Journal of Molecular Catalysis B - Enzymatic* 39 (1-4):160-165. doi:10.1016/j.molcatb.2006.01.017

Eguchi C., Kakuta A. (1974) Cyclic dipeptides. I. Thermodynamics of the *cis-trans* isomerization of the side chains in cyclic dipeptides. *Journal of the American Chemical Society* 96 (12):3985-3989. doi:10.1021/ja00819a042

Elkahoui S., Abdel rahim H., Tabbene O., Shaaban M., Limam F., Laatsch H. (2012) Cyclo-(His,Leu): A new microbial diketopiperazine from a terrestrial *Bacillus subtilis* strain B38. *Natural Product Research*:1-9. doi:10.1080/14786419.2012.660635

Engel U., Syldatk C., Rudat J. (2012) Stereoselective hydrolysis of aryl-substituted dihydropyrimidines by hydantoinases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94 (5):1221-1231. doi:10.1007/s00253-011-3691-7

Fahrney D. E., Gold A. M. (1963) Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reaction with acetylcholinesterase, α -chymotrypsin, and trypsin. *Journal of the American Chemical Society* 85 (7):997-1000. doi:10.1021/ja00890a037

Farran D., Echaliier D., Martinez J., Dewynter G. (2009) Regioselective and sequential reactivity of activated 2,5-diketopiperazines. *Journal of Peptide Science* 15 (7):474-478. doi:10.1002/Psc.1139

FDA Guidance for industry - Bioanalytical method validation.

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance/UCM070107.pdf>. Zugriff: 24.05.2012

Fdhila F., Vazquez V., Sanchez J. L., Riguera R. (2003) DD-Diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *Journal of Natural Products* 66 (10):1299-1301

Fischer E. (1905) Synthese von Polypeptiden. IX. Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 38 (1):605-619. doi:10.1002/cber.190503801103

Fischer E., Fourneau E. (1901) Über einige Derivate des Glykocolls. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 34 (2):2868-2877. doi:10.1002/cber.190103402249

- Fischer E., Schrauth W. (1907)** Aufspaltung von Diketopiperazinen und Dipeptide des Tyrosins. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 354 (1):21-38. doi:10.1002/jlac.19073540104
- Funabashi Y., Horiguchi T., Iinuma S., Tanida S., Harada S. (1994)** Tan-1496 A, C and E, diketopiperazine antibiotics with inhibitory activity against mammalian DNA topoisomerase I. *Journal of Antibiotics* 47 (11):1202-1218
- Fuqua C., Winans S. C., Greenberg E. P. (1996)** Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology* 50:727-751
- Furda I., Malizia P. D., Kolor M. G., Vernieri P. J. (1975)** Decomposition products of L-aspartyl-L-phenylalanine methyl-ester and their identification by gas-liquid-chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23 (2):340-343
- Furtado N. A. J. C., Pupo M. T., Carvalho I., Campo V. L., Duarte M. C. T., Bastos J. K. (2005)** Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* brazilian strain. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16 (6B):1448-1453
- Gardiner D. M., Howlett B. J. (2005)** Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters* 248 (2):241-248. doi:10.1016/j.femsle.2005.05.046
- Gautschi M., Schmid J. P., Peppard T. L., Ryan T. P., Tuorto R. M., Yang X. (1997)** Chemical characterization of diketopiperazines in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (8):3183-3189. doi:10.1021/jf9700992
- George V., Arora S., Wadhwa B. K., Singh A. K. (2010)** Analysis of multiple sweeteners and their degradation products in lassi by HPLC and HPTLC plates. *Journal of Food Science and Technology* 47 (4):408-413
- Ginz M., Engelhardt U. H. (2000)** Identification of proline-based diketopiperazines in roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (8):3528-3532. doi:jf991256v
- Godel H., Graser T., Földi P., Pfaender P., Fürst P. (1984)** Measurement of free amino acids in human biological fluids by high performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography* 297 (Aug):49-61
- Gonzales T., Robert-Baudouy J. (1996)** Bacterial aminopeptidases: Properties and functions. *FEMS Microbiology Reviews* 18 (4):319-344. doi:10.1111/j.1574-6976.1996.tb00247.x
- Greenstein J. P. (1936)** Studies of multivalent amino acids and peptides. *Journal of Biological Chemistry* 112 (2):517-522
- Gruenewald S., Mootz H. D., Stehmeier P., Stachelhaus T. (2004)** In vivo production of artificial nonribosomal peptide products in the heterologous host *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (6):3282-3291. doi:10.1128/Aem.70.6.3282-3291.2004
- Hamuro Y., Coales S. J., Molnar K. S., Tuske S. J., Morrow J. A. (2008)** Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22 (7):1041-1046. doi:10.1002/rcm.3467
- Hanczkó R., Jámbor A., Perl A., Molnár-Perl I. (2007)** Advances in the omicron-phthalaldehyde derivatizations comeback to the omicron-phthalaldehyde-ethanethiol reagent. *Journal of Chromatography A* 1163 (1-2):25-42. doi:10.1016/j.chroma.2007.06.013
- Holden M. T. G., Chhabra S. R., de Nys R., Stead P., Bainton N. J., Hill P. J., Manefield M., Kumar N., Labatte M., England D., Rice S., Givskov M., Salmond G. P. C., Stewart G. S. A. B., Bycroft B. W., Kjelleberg S., Williams P. (1999)** Quorum-sensing cross talk:

Isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology* 33 (6):1254-1266

Huang R., Zhou X., Xu T., Yang X., Liu Y. (2010) Diketopiperazines from marine organisms. *Chemistry & Biodiversity* 7 (12):2809-2829. doi:10.1002/cbdv.200900211

Ienaga K., Nakamura K., Goto T. (1987) Bioactive compounds produced in animal tissues (I); two diketopiperazine plant-growth regulators containing hydroxyproline isolated from rabbit skin tissue extract. *Tetrahedron Letters* 28 (12):1285-1286

Ishiyama T. (1933) Über fermentative Aufschließung des Diketopiperazinrings. *Journal of biochemistry* 17 (2):285-297

Itibakase M. (1940) Über die fermentative Spaltbarkeit von Dioxopiperazinen. *Journal of biochemistry* 32 (3):355-369

Jacob F., Monod J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* 3 (3):318-356

Jámbor A., Molnár-Perl I. (2009) Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride Literature overview and further study. *Journal of Chromatography A* 1216 (15):3064-3077. doi:10.1016/j.chroma.2009.01.068

Jayatilake G. S., Thornton M. P., Leonard A. C., Grimwade J. E., Baker B. J. (1996) Metabolites from an antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Natural Products* 59 (3):293-296

Johnson J. L., Jackson W. G., Eble T. E. (1951) Isolation of L-leucyl-L-proline anhydride from microbiological fermentations. *Journal of the American Chemical Society* 73 (6):2947-2948

Kanzaki H., Oda S., Kobayashi A., Kawazu K. (1997) Microbial hydrolysis of diketopiperazines: Different types of diketopiperazine-assimilating bacteria. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83 (4):386-388

Kanzaki H., Mizuta N., Nitoda T., Kawazu K. (2000) Novel diketopiperazine metabolism in a microorganism: Two-step hydrolysis of cyclo(Gly-Leu) to amino acids and preliminary characterization of cyclo(Gly-Leu) hydrolase and dipeptidase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89 (6):602-605

Kato H., Imanishi S. Y., Tsuji K., Harada K.-i. (2007) Microbial degradation of cyanobacterial cyclic peptides. *Water Research* 41 (8):1754-1762

Kautz J., Schnackerz K. D. (1989) Purification and Properties of 5,6-Dihydropyrimidine Amidohydrolase from Calf Liver. *European Journal of Biochemistry* 181 (2):431-435

Kertscher U., Bienert M., Krause E., Sepetov N. F., Mehlis B. (1993) Spontaneous chemical degradation of substance-P in the solid-phase and in solution. *International Journal of Peptide and Protein Research* 41 (3):207-211

Kieslich K., Van der Beek C. P., De Bont J. A. M., Van den Tweel W. J. J. (1998) General introduction to biocatalysis and screening, vol 53. Studies in Organic Chemistry. Elsevier, ISBN:0165-3253

Kocijan A., Grahek R., Kocijan D., Zupancic-Kralj L. (2001) Effect of column temperature on the behaviour of some angiotensin converting enzyme inhibitors during high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B - Biomedical Sciences and Applications* 755:229-235

Kossel A. (1901) Ueber den gegenwärtigen Stand der Eiweisschemie. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 34 (3):3214-3245. doi:10.1002/cber.19010340303

- Lamm A., Gozlan I., Rotstein A., Avisar D. (2009)** Detection of amoxicillin-diketopiperazine-2', 5' in wastewater samples. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 44 (14):1512-1517
- Lassy R. A. L., Miller C. G. (2000)** Peptidase E, a peptidase specific for N-terminal aspartic dipeptides, is a serine hydrolase. *Journal of Bacteriology* 182 (9):2536-2543
- Lautru S., Gondry M., Genet R., Pernodet J. L. (2002)** The albonoursin gene cluster of *S. noursei*. Biosynthesis of diketopiperazine metabolites independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & Biology* 9 (12):1355-1364. doi:Pii S1074-5521(02)00285-5
- Lee H. W., Pan J. G. (1999)** Screening for L-sorbose and L-sorbosone dehydrogenase producing microbes for 2-keto-L-gulononic acid production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 23 (2):106-111
- Lidgren G., Bohlin L. (1986)** Studies of swedish marine organisms VII. A novel biologically active indole alkaloid from the sponge *Geodia baretii*. *Tetrahedron Letters* 27 (28):3283-3284
- Liebermann B., Ihn W., Baumann E., Tresselt D. (1988)** Dihydrotentoxin and a related dipeptide produced by *Alternaria alternata*. *Phytochemistry* 27 (2):357-359
- Lin A. Q., Fang Y. C., Zhu T. J., Gu Q. Q., Zhu W. M. (2008)** A new diketopiperazine alkaloid isolated from an algicolous *Aspergillus flavus* strain. *Pharmazie* 63 (4):323-325
- Liu C. J., Wang H., Jiang Y. B., Du Z. X. (2011)** Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879 (7-8):533-540. doi:10.1016/j.jchromb.2011.01.016
- Lombardi C., Cocito S., Occhipinti-Ambrogi A., Hiscock K. (2006)** The influence of seawater temperature on zooid size and growth rate in *Pentapora fascialis* (Bryozoa : Cheilostomata). *Marine Biology* 149 (5):1103-1109. doi:10.1007/s00227-006-0295-3
- Mao H. M., Chen B. G., Qian X. M., Liu Z. M. (2009)** Simultaneous determination of twelve biogenic amines in serum by high performance liquid chromatography. *Microchemical Journal* 91 (2):176-180. doi:10.1016/j.microc.2008.10.005
- Matsui J. (1933)** Konstitution der Polypeptide und proteolytische Fermente. *Journal of biochemistry* 17 (2):253-258
- Matuszewski B. K., Constanzer M. L. (1992)** Indirect chiral separation and analyses in human biological fluids of the stereoisomers of a thienothiopyran-2-sulfonamide (TRUSOPT), a novel carbonic anhydrase inhibitor with two chiral centers in the molecule. *Chirality* 4 (8):515-519. doi:10.1002/chir.530040810
- McClelland K., Milne P. J., Lucieto F. R., Frost C., Brauns S. C., Van De Venter M., Du Plessis J., Dyason K. (2004)** An investigation into the biological activity of the selected histidine-containing diketopiperazines cyclo(His-Phe) and cyclo(His-Tyr). *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56 (9):1143-1153. doi:10.1211/0022357044139
- Melucci D., Xie M., Reschiglian P., Torsi G. (1999)** Fmoc-Cl as derivatizing agent for the analysis of amino acids and dipeptides by the absolute analysis method. *Chromatographia* 49 (5-6):317-320
- Miller C. G. (1975)** Peptidases and proteases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Annual Review of Microbiology* 29:485-504

- Miller C. G., Schwartz G. (1978)** Peptidase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 135 (2):603-611
- Minami S., Yotsuji A., Inoue M., Mitsuhashi S. (1980)** Induction of β -lactamase by various β -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 18 (3):382-385
- Miyamura S., Matsuki K., Take T., Tanaka H., Uchiyama T., Koizumi K., Ogasawara N., Ochiai H., Otsuka H., Niwayama S., Hoshino T., Abe K., Asao K. (1972)** Antibiotic No. 5879, a new water-soluble antibiotic against gram-negative bacteria. *Journal of Antibiotics* 25 (10):610-612
- Moore S., Stein W. H. (1948)** Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *Journal of Biological Chemistry* 176 (1):367-388
- Mootz H. D., Marahiel M. A. (1997)** The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: Complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *Journal of Bacteriology* 179 (21):6843-6850
- Muro T., Tominaga Y., Okada S. (1985)** Purification and some properties of cyclo(Gly-Gly) hydrolase from a strain of *Bacillus* sp. No-106. *Agricultural and Biological Chemistry* 49 (6):1567-1572
- Niku-Paavola M. L., Laitila A., Mattila-Sandholm T., Haikara A. (1999)** New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* 86 (1):29-35
- Oda M. (1936)** Studies on the alkali hydrolysis of diketopiperazines and aniline peptides and its dissociation constants. *Journal of Biochemistry* 23 (2):241-266
- Oke V., Long S. R. (1999)** Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Current Opinion in Microbiology* 2 (6):641-646
- Olsen J. V., Ong S. E., Mann M. (2004)** Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & Cellular Proteomics* 3 (6):608-614. doi:10.1074/mcp.T400003-MCP200
- Omar S., Tenenbaum L., Manes L. V., Crews P. (1988)** Novel marine sponge derived amino acids 7. The fenestins. *Tetrahedron Letters* 29 (43):5489-5492
- Pantaleone D. P., Giegel D. A., Schnell D. (1998)** Isolation, partial purification and characterization of a novel cyclic dipeptidase. In: *Studies in Organic Chemistry*, vol 53. Elsevier: 201-210
- Parrish D. A., Mathias L. J. (2002)** Five- and six-membered ring opening of pyroglutamic diketopiperazine. *Journal of Organic Chemistry* 67 (6):1820-1826. doi:10.1021/Jo0160928
- Pattanaargson S., Chuapradit C., Srisukphonraruk S. (2001)** Aspartame degradation in solutions at various pH conditions. *Journal of Food Science* 66 (6):808-809
- Patterson E. K., Gatmaitan J. S., Hayman S. (1973)** Substrate specificity and pH dependence of dipeptidases purified from *Escherichia coli* B and from mouse ascites tumor cells. *Biochemistry* 12 (19):3701-3709
- Perona J. J., Craik C. S. (1995)** Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science* 4 (3):337-360
- Pickenhagen W., Dietrich P., Keil B., Polonsky J., Nouaille F., Lederer E. (1975)** Identification of the bitter principle of cocoa. *Helvetica Chimica Acta* 58 (4):1078-1086. doi:10.1002/hlca.19750580411

Pingoud A., Urbanke C. (1997) Arbeitsmethoden der Biochemie. 1. Auflage. De Gruyter, ISBN:3110165139

Piper D. W., Fenton B. H. (1965) pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut* 6 (5):506-508

Prakash K. R. C., Tang Y., Kozikowski A. P., Flippen-Anderson J. L., Knoblach S. M., Faden A. I. (2002) Synthesis and biological activity of novel neuroprotective diketopiperazines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10 (9):3043-3048

Prasad C. (1988) Cyclo(His-Pro) - Its distribution, origin and function in the human. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 12 (1):19-22

Prasad C. (1995) Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides* 16 (1):151-164

Prudel M., Davidkova E., Davidek J., Kminek M. (1986) Kinetics of decomposition of aspartame hydrochloride (usal) in aqueous solutions. *Journal of Food Science* 51 (6):1393-1397

Rai R., Taneja V. (1998) Papain catalysed hydantoin hydrolysis in the synthesis of amino acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244 (3):889-892

Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3):597-635

Ravin H. A., Seligman A. M. (1951) The colorimetric estimation of carboxypeptidase activity. *Journal of Biological Chemistry* 190 (1):391-402

Rigas P. G. (2012) Liquid chromatography - post-column derivatization for amino acid analysis: Strategies, instrumentation, and applications. *Instrumentation Science & Technology* 40 (2-3):161-193. doi:10.1080/10739149.2011.651669

Rudi A., Kashman Y., Benayahu Y., Schleyer M. (1994) Amino acid derivatives from the marine sponge *Jaspis digonoxea*. *Journal of Natural Products* 57 (6):829-832

Ruhemann S. (1910) Cyclic di- and tri-ketones. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 97:1438-1449

Runser S. M., Meyer P. C. (1993) Purification and biochemical-characterization of the hydantoin hydrolyzing enzyme from *Agrobacterium species* - a hydantoinase with no 5,6-dihydropyrimidine amidohydrolase activity. *European Journal of Biochemistry* 213 (3):1315-1324

Ryan L. A. M., Dal Bello F., Arendt E. K., Koehler P. (2009) Detection and quantitation of 2,5-diketopiperazines in wheat sourdough and bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (20):9563-9568. doi:10.1021/Jf902033v

Ryan R. P., Dow J. M. (2008) Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology* 154:1845-1858. doi:10.1099/mic.0.2008/017871-0

Saito K., Horie M., Hoshino Y., Nose N., Nakazawa H., Fujita M. (1989) Determination of diketopiperazine in soft drinks by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* 12 (4):571-582

Sakamura S., Furukawa K., Kasai T. (1978) Bitter diketopiperazines in roasted malts for beer brewing. *Agricultural and Biological Chemistry* 42 (3):607-612

Sammes P. G. (1975) Naturally occurring 2,5-dioxopiperazines and related compounds. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*:51-118

Schmidt A., Lamzin V. S. (2005) Extraction of functional motion in trypsin crystal structures. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 61:1132-1139. doi:10.1107/S0907444905016732

Schmitz F. J., Vanderah D. J., Hollenbeak K. H., Enwall C. E. L., Gopichand Y., Sengupta P. K., Hossain M. B., Vanderhelm D. (1983) Metabolites from the marine sponge *Tedania ignis* - A new atisanediol and several known diketopiperazines. *Journal of Organic Chemistry* 48 (22):3941-3945

Sciencegateway. Protease inhibitors

<http://www.sciencegateway.org/resources/protease.htm>. Zugriff: 07.06.2010

Shao W. L., Yuksel G. U., Dudley E. G., Parkin K. L., Steele J. L. (1997) Biochemical and molecular characterization of PepR, a dipeptidase, from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (9):3438-3443

Shibata K., Tazawa Y. (1936) Über die Aufspaltung der Peptidringe durch Proteinasen. *Proceedings of the Imperial Academy of Japan* 12:340-345

Sinha S., Srivastava R., De Clercq E., Singh R. K. (2004) Synthesis and antiviral properties of arabino and ribonucleosides of 1,3-dideazaadenine, 4-nitro-1, 3-dideazaadenine and diketopiperazine. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 23:1815-1824

Sioud S., Karray-Rebai I., Aouissaoui H., Aigle B., Bejar S., Mellouli L. (2007) Targeted gene disruption of the cyclo (L-Phe, L-Pro) biosynthetic pathway in *Streptomyces* sp. US24 strain. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*:1-9. doi:10.1155/2007/91409

Snyder L. R., Dolan J. W. (1996) Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development .1. Use of a starting gradient run. *Journal of Chromatography A* 721 (1):3-14

Steyn P. S. (1973) Structures of 5 diketopiperazines from *Aspergillus ustus*. *Tetrahedron* 29 (1):107-120

Stierle A. C., Cardellina J. H., Strobel G. A. (1988a) Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (21):8008-8011

Stierle A. C., Cardellina J. H., Singleton F. L. (1988b) A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia* 44 (11-12):1021

Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J. (2002) *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (9):4322-4327

Su J., Zhong Y., Zeng L., Wu H., Shen X., Ma K. (1996) A new *N*-carboxyindole alkaloid from the marine sponge *Rhaphisia pallida*. *Journal of Natural Products* 59 (5):504-506. doi:10.1021/np9600917

Su J. Y., Zhong Y. L., Zeng L. M., Wei S., Wang Q. W., Mak T. C. W., Zhou Z. Y. (1993) Three new diketopiperazines from a marine sponge *Dysidea fragilis*. *Journal of Natural Products* 56 (4):637-642

Sugie M., Suzuki H., Tomizuka N. (1986) A new peptidase specific to D-amino acid peptides from a *Nocardia* sp. *Agricultural and Biological Chemistry* 50 (6):1633-1634

Syldatk C., May O., Altenbuchner J., Mattes R., Siemann M. (1999) Microbial hydantoinases - industrial enzymes from the origin of life? *Applied Microbiology and Biotechnology* 51 (3):293-309

- Takahashi K., Tadenuma M., Kitamoto K., Sato S. (1974)** L-Prolyl-L-leucine anhydride a bitter compound formed in aged sake. *Agricultural and Biological Chemistry* 38 (5):927-932
- Tan R. X., Jensen P. R., Williams P. G., Fenical W. (2004)** Isolation and structure assignments of rostratins A-D, cytotoxic disulfides produced by the marine-derived fungus *Exserohilum rostratum*. *Journal of Natural Products* 67 (8):1374-1382. doi:10.1021/Np049920b
- Thorsthalm L., Craik D. J. (2012)** Discovery and applications of naturally occurring cyclic peptides. *Drug Discovery Today: Technologies* 9 (1):e13-e21
- Umagat H., Kucera P., Wen L. F. (1982)** Total amino acid analysis using pre-column fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography A* 239:463-474
- Unson M. D., Faulkner D. J. (1993)** Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera). *Experientia* 49 (4):349-353
- Van Slyke D. D. (1911)** A method for quantitative determination of aliphatic amino groups. *Journal of Biological Chemistry* 9 (3):185-204
- Vendrell J., Aviles F. X. (1986)** Complete amino acid analysis of proteins by dabsyl derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 358 (2):401-413
- Waldschmidt-Leitz E., Schöffner A. (1925)** Über die Bedeutung der Diketopiperazine für den Aufbau der Proteine. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* 58 (7):1356-1360. doi:10.1002/cber.19250580730
- Waldschmidt-Leitz E., Purr A. (1929)** Über Proteinase und Carboxy-Polypeptidase aus Pankreas (XVII. Mitteilung zur Spezifität tierischer Proteasen). *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* 62 (8):2217-2226. doi:10.1002/cber.19290620857
- Wallach D. P., Grisolia S. (1957)** The purification and properties of hydroxypyrimidine hydrolase. *Journal of Biological Chemistry* 226 (1):277-288
- Wang J. H., Quan C. S., Qi X. H., Li X., Fan S. D. (2010)** Determination of diketopiperazines of *Burkholderia cepacia* CF-66 by gas chromatography - mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396 (5):1773-1779. doi:10.1007/s00216-009-3379-3
- Whitaker A. (1992)** Actinomycetes in submerged culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 32 (1):23-35. doi:10.1007/bf02922146
- Whitaker J. R., Perez-Villaseñor J. (1968)** Chemical modification of papain: I. Reaction with the chloromethyl ketones of phenylalanine and lysine and with phenylmethylsulfonyl fluoride. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 124:70-78
- Willstätter R., Waldschmidt-Leitz E. (1921)** Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* 54 (11):2988-2993. doi:10.1002/cber.19210541107
- Yokoyama R., Kawasaki H., Hirano H. (2006)** Identification of yeast aspartyl aminopeptidase gene by purifying and characterizing its product from yeast cells. *FEBS Journal* 273 (1):192-198. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.05057.x
- Yokozeiki K., Usui N., Yukawa T., Hirose Y., Kubota K. (1990)** Process for producing L-aspartyl-L-phenylalanine and its diketopiperazine. European Patent 0220028 B1

7 Anhang

7.1 Formeln

7.1.1 Statistische Auswertung

Mittelwert:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

n : Probenanzahl

Standardabweichung (standard deviation; SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

7.1.2 Analytik

Retentionsfaktor:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

t_R : Retentionszeit

t_0 : Totzeit

Trennfaktor:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

$k_{1,2}$: Retentionsfaktor von Peak 1 und 2

Auflösung:

$$R = \frac{1,18(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_{50_2} + W_{50_1}}$$

$t_{R_{1,2}}$: Retentionszeit von Peak 1 und 2

$W_{50_{1,2}}$: Halbwertsbreite von Peak 1 und 2

Präzision \triangleq Relative Standardabweichung (relative standard deviation; RSD):

$$RSD (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

Richtigkeit \triangleq Relativer Fehler (relative error; RE):

$$RE (\%) = \frac{\text{gemessene Konzentration} - \text{wahre Konzentration}}{\text{wahre Konzentration}} \times 100$$

7.1.3 Aktivitätsberechnungen

$$\text{Aktivität/Protein} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right] = \frac{\frac{\text{Substratkonzentration} [\mu\text{mol}]}{\text{Zeit} [\text{min}]}}{\text{Proteinmenge} [\text{mg}]}$$

$$\text{Aktivität/BTM} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right] = \frac{\frac{\text{Substratkonzentration} [\mu\text{mol}]}{\text{Zeit} [\text{min}]}}{\text{Biotrockenmasse (BTM)} [\text{mg}]}$$

7.1.4 Proteinaufreinigung

$$\text{Ausbeute} [\%] = \frac{\text{Gesamtaktivität (nach der Aufreinigung)} [\text{mU}]}{\text{Gesamtaktivität (vor der Aufreinigung)} [\text{mU}]} \times 100$$

$$\text{Reinigungsfaktor} = \frac{\frac{\text{Aktivität}}{\text{Protein}} \text{ (nach der Aufreinigung)} \left[\frac{\text{mU}}{\text{mg}} \right]}{\frac{\text{Aktivität}}{\text{Protein}} \text{ (vor der Aufreinigung)} \left[\frac{\text{mU}}{\text{mg}} \right]}$$

7.2 16S rDNA Sequenzen

Paenibacillus chibensis (DSM 329):

TGCAGTCGAGCGGACTTGATGAGGTGCTTGCCTCTGATGGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTACCGGAA
ACGGTAGCTAATACCGGATAATTTATTTCTCTCTGGGGAGATAATGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTACAGATGGGCCCTGCGGGCATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAACGGCTCACCAAGCGCAGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAAGCTCCGGTAGAGTAACT
GCTACCGGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCGGGAATTTGGGCGTAAA
GCGCGCGCAGGGCTCACTTAAGTCTGGTGTAAAGCCAAAGGCTCAACCTTGGTTCGCACTGGAACTGGGTGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCCA
CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCCACTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCCGCAAGCGTGGGGAGCAACAG
GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCCTGGGGAGT
ACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAAGCTTACCAAGTCTTGACAT
CCCTCTGAATCCTCTAGAGATAGAGGCGGCCCTTCGGGACAGAGGTGACAGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTC

Streptomyces flavovirens strain NRRL B-2685 (GenBank: DQ026635.1) (DSM 40062):

TCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGGTCTTAACACATGCAAGTGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAAACAGTGGGCAA
TCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCC
CGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCTACCAAGGCCACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAG
ACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAG
CAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCGGGAATTTGG
GCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTGTACGCTCGGATGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCCGGGTCTGCATTGATACGGGCTAGCTAGAGTGGTAGGGGAGATC
GGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGG
AGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTTGGGAATAAGGTGTTGGCGACATCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACCGCATTAAAGTTC
CCCGCTGGGAGTAGCGCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGCAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAAATCGACGCAACGGGAAGAAGCTT
ACCAAGCTTGACATATACCGGAAAGCTCAGAGATGGTGCCTCCCTTGTGGTGGTATACAGGTGGTGATGGCTGTCGTGAGTGTGGTGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGGTGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTTCAACTCGGAGGAAGTGGGG
ACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGCTTGGGCTGCACAGTGTACAATGGCCGTTACAATGAGCTGCGAAGTGTGAGGGGAGCGAATCTCAAAAAGCCG
GTCTCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTGTGATGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAAGCTCCGGTAGA
CCGCCGCTACGTCACGAAAGTGGTAACACCCGAAGCCGTTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGCAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGC

Paenibacillus sp. (Eigenisolat 1):

TATCTGCAAGTCGAGCGGACTTGATGAGGTGCTTGCACCTCTGATGCTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTAC
CGGAAACGGTAGCTAATACCGGATAATTTATTTCTCTCTGGGGAGATAATGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTACAGATGGGCCCTGCGGGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGCGCAGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGGCGCTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAAGCTCCGGTAGA
GTAATGCTACCGGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCGGGAATTTGGG

CGTAAAGCGCGCGCAGCGGCTCACTTAAGTCTGGTGTAAAGGCCAAGGCTCAACCTTGTTTCGCACTGGAACTGGGTGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG
AATCCACGTGTACGGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTAACGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCCTGGTATCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTAGGGGTTTCGATACCCCTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAAGCATTCCGCCTG
GGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGATATGTGTTTAAATTCGAAGCAACCGCGGAAGAACCTTACCAAGT
CTTTGACATCCCTCTGAATCCTCTAG

Microbacterium sp. (Eigenisolat 2):

GCAGGAGCTTGCTCTTGTGGATCAGTGGGAAACGGGTGAGTAACACGCTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGCAGACGGGCTTAATACTGGAT
ATGTGACGTGACCAAAATGGTCTGCGTTTTGAAAGATTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGCCATCAGCTTGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGCGCTCGACG
GGTAGCCGGCCTGAGAGGGTACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTG
ATGCAGCAACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAATCCCGAGGC
TCAACCTCGGGCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGAT
GGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACGTACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAAC
GTTGTGGGTCATCCACGGATTCCGTGACGAGCTAACGCATTAAGTCCCGCCTGGGAGTACGCGCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACC
CGCAAGCGCGCGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCCAGAAATGGTCAACTCTTTGGACACT
CGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC

Leifsonia sp. K3 (früher Microbacteriaceae sp. K3):

TCGAACGATGAACAGGAGCTTGCTCTTGGGATTAGTGGCAACGGGTGAGTAACACGCTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAACCTCCGGAACCGGAAGCT
AATACCGGATACGAACTGCGAAGGCATCTTACGAGTTGAAAGAACCTTCGGTCAAGGATGGACTCGCGCCATCAGGTAGTTGGTGAAGTAAGGCTCACCAAG
CCTACGACGGGTAGCCGCCCTGAGAGGGTACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGC
GCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAAAAAGCACC
GGCTAACTACGTCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCGGAAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTGTGTCGCGTCTGCTGTGAAA
ACCCGAGGCTCAACCTCGGGCTGCACTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTGGGAGAAATGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAG
GAACACCGATGGCGAAGGCAGTTCTCTGGGCCGTAACGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCG
TTGGGCGCTAGATGTGGGGACCATCCACGGTTCCGTGTGCGAGCTAACGCATTAAGCAGCCCGCCTGGGAGTACGCGCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATT
GACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCTAGAAATAGTCAACT
C

7.3 Alignments von 16S rDNA Sequenzen

Paenibacillus chibensis (DSM 329) und Paenibacillus sp. (Eigenisol.):

Score = 1759 bits (952), Expect = 0,0
Identities = 966/972 (99%), Gaps = 4/972 (0%)

DSM 329	TGC-AGTCGAGCGGACTTGATGAGGTGCTTGCTTCCTCTGATGGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAAC	76
Eigenisol.	TGCAAGTCGAGCGGACTTGATGAGGTGCTTGCACTCTGATGGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAAC	81
DSM 329	CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAATACCGGATAATTTATTTTCTCTCTGGGAGATAAT	153
Eigenisol.	CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAATACCGGATAATTTATTTTCTCTCTCTGGGAGATAAT	158
DSM 329	GAAAGACGGAGCAATCTGTCACCTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG	230
Eigenisol.	GAAAGACGGAGCAATCTGTCACCTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG	235
DSM 329	CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA	307
Eigenisol.	CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA	312
DSM 329	GCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTA	384
Eigenisol.	GCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTA	389
DSM 329	AAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAAGCTCCGGTAGAGTAACGTGCTACCGGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGC	461
Eigenisol.	AAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAAGCTCCGGTAGAGTAACGTGCTACCGGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGC	466
DSM 329	TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCCAG	538
Eigenisol.	TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCCAG	543
DSM 329	GCGGCTCACTTAAGTCTGGTGTAAAGGCCAAGGCTCAACCTTGGTTCGCACTGGAACCTGGGTGACTTGAGTGCAGA	615
Eigenisol.	GCGGCTCACTTAAGTCTGGTGTAAAGGCCAAGGCTCAACCTTGGTTCGCACTGGAACCTGGGTGACTTGAGTGCAGA	620
DSM 329	AGAGGAGAGTGGAATTCACGCTGAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC	692
Eigenisol.	AGAGGAGAGTGGAATTCACGCTGAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC	697

DSM 329	TGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA	769
Eigenisol.	TGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA	774
DSM 329	CGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCCTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCGCCCTGGGGAGTA	846
Eigenisol.	CGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCCTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCGCCCTGGGGAGTA	851
DSM 329	CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG-ACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCA	922
Eigenisol.	CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCA	928
DSM 329	ACGCG-AAGAACCTTACCAAGTCTT-GACATCCCTCTGAATCCTCTAG	968
Eigenisol.	ACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTT-GACATCCCTCTGAATCCTCTAG	976

Leifsonia sp. (K3) und Microbacterium sp. (Eigenisol.):

Score = 1360 bits (736), Expect = 0,0
Identities = 870/936 (93%), Gaps = 4/936 (0%)

K3	CAGGAGCTTGCTCTTGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACG-TGAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAC	76
Eigenisol.	CAGGAGCTTGCTCTTGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACG-TGAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAC	77
K3	CTCCGAAACGGAAGCTAATAACGGATACG-AACTGCGAAGGATCTTCAGCAGTTGGAAGA-ACTTCGGTCAAGG	151
Eigenisol.	CTCCGAAACGGAAGCTAATAACGGATACG-AACTGCGAAGGATCTTCAGCAGTTGGAAGA-ACTTCGGTCAAGG	153
K3	ATGGACTCGCGGCCTATCAGGTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGT	228
Eigenisol.	ATGGACTCGCGGCCTATCAGGTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGT	230
K3	GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCC	305
Eigenisol.	GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCC	307
K3	AAGCCTGATGCAGCAACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAA	382
Eigenisol.	AAGCCTGATGCAGCAACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAA	384
K3	GTGACGGTACTGCAGAAAAAGCA-CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGCTGCAGCGTTGTC	459
Eigenisol.	GTGACGGTACTGCAGAAAAAGCA-CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGCTGCAGCGTTGTC	461
K3	CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGT-TGTGCGCTCTGCTGTGAAA-CCCGAGGCTCAACCTCGGGCCT	536
Eigenisol.	CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGT-TGTGCGCTCTGCTGTGAAA-CCCGAGGCTCAACCTCGGGCCT	538
K3	GCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTGGGGAGAA-TGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCA	613
Eigenisol.	GCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTGGGGAGAA-TGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCA	615
K3	GGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGTCTCTGGGCGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC-GTGGGGAGCGAACAGG	690
Eigenisol.	GGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGTCTCTGGGCGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC-GTGGGGAGCGAACAGG	692
K3	ATTAGATACCCTGGTAGTCCAC-CCGTAAACGTTGGGCGCTAG-TGTGGGG-CCATTCCACGGTTTCCGTGTCGCAG	767
Eigenisol.	ATTAGATACCCTGGTAGTCCAC-CCGTAAACGTTGGGCGCTAG-TGTGGGG-CCATTCCACGGTTTCCGTGTCGCAG	769
K3	CTAACGCATTAAGC-CCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGG-CCCCGCACAA	844
Eigenisol.	CTAACGCATTAAGT-CCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGG-CCCCGCACAA	846
K3	GCGGGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCTAGA	921
Eigenisol.	GCGGGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCTAGA	923
K3	AATAGTCAACTC	933
Eigenisol.	AATGGTCAACTC	935

Publikationen und Präsentationen

Publikationen

Perzborn M., Syldatk C., Rudat J. (2013):

Separation of Cyclic Dipeptides (Diketopiperazines) from Their Corresponding Linear Dipeptides by RP-HPLC and Method Validation; *Chromatography Research International*; vol. 2013, Article ID 310269, 8 pages.

Wulf H., **Perzborn M.**, Sievers G., Scholz F., Bornscheuer U.T. (2012):

Kinetic resolution of glyceraldehyde using an aldehyde dehydrogenase from *Deinococcus geothermalis* DSM11300 combined with electrochemical cofactor recycling; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; **74**, 144-150.

Vortrag

Perzborn M., Syldatk C., Rudat J. (2012):

Novel biocatalysts for the hydrolysis of diketopiperazines; Catalyzing Bio-Economy - Biocatalysts for Industrial Biotechnology, Jahrestreffen der DECHEMA-VAAM-Fachgruppe Biotransformationen.

Poster

Perzborn M., Syldatk C., Rudat J. (2012):

Mikrobielle und enzymatische Hydrolyse von Diketopiperazinen; 30. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen und ProcessNet-Jahrestagung, LMP.5.10.

Perzborn M., Syldatk C., Rudat J. (2012):

Challenging Microbial Infallibility: Investigations on the Biodegradability of Cyclic Peptides; Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Biospektrum Tagungsband, EMP1-FG.

Perzborn M., Ströhle F., Syldatk C., Rudat J. (2011):

Diketopiperazines as novel substrates for hydantoinases; Biotrans 2011, 10th International Symposium on Biocatalysis, PC-13.

Perzborn M., Ströhle F., Gerçe B., Syldatk C., Rudat J. (2011):

Biodegradation of diketopiperazines; Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Biospektrum Tagungsband, EMP105.

Perzborn M., Gerçe B., Syldatk C., Rudat J. (2010):

Diketopiperazines as potential substrates for hydantoinases; 28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen und ProcessNet-Jahrestagung, *Chem Ing Tech*; **82**, 1532, P7.21.

Perzborn M., Gerçe B., Syldatk C., Rudat J. (2010):

Diketopiperazines as potential substrates for hydantoinases; Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) / 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Biospektrum Tagungsband, BTP33.

Lebenslauf

Name	Mareike Perzborn
Geburtsdatum	07.08.1984
Geburtsort	Haan
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch
Anschrift	Nuitsstraße 18 76185 Karlsruhe
E-Mail	Mareike_Perzborn@gmx.de

Ausbildung

12/2008 bis 10/2012	Doktorarbeit am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich II: Technische Biologie, KIT, Karlsruhe, Prof. Dr. Christoph Syldatk
11/2007 bis 08/2008	Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Abteilung für Biotechnologie & Enzymkatalyse, Greifswald, Prof. Dr. Uwe Bornscheuer Thema: Biochemische Oxidation von Glycerin-Derivaten
10/2003 bis 08/2008	Studium der Biochemie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald Abschluss: Diplom-Biochemikerin
1994 bis 2003	Städtisches Gymnasium Vohwinkel, Wuppertal Abschluss: Abitur
1990 bis 1994	Städtische Gemeinschaftsgrundschule Radenberg, Wuppertal

Beruf

seit 12/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich II: Technische Biologie, KIT, Karlsruhe, Prof. Dr. Christoph Syldatk
10/2009 bis 12/2009	Forschungsaufenthalt in der „Biocatalysis and Technical Biology Research Group“ an der Cape Peninsula University of Technology, Kapstadt, Südafrika, Prof. Stephanie Burton
11/2006 bis 10/2007	Studentische Hilfskraft am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Greifswald, Prof. Dr. Reinhard Walther