



Doctoral Thesis

## Untersuchungen an Aggregaten aus Aminosäureamphiphilen

**Author(s):**

Cescato, Claudio

**Publication Date:**

1996

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001658865> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 11709

**Untersuchungen an Aggregaten  
aus  
Aminosäureamphiphilen**

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
CLAUDIO CESCATO  
Dipl. Chem. ETH  
geboren am 6. Oktober 1966  
von Müstair (GR)

Angenommen auf Antrag von:  
Prof. Dr. P. L. Luisi, Referent  
Prof. Dr. S. A. Benner, Korreferent

Zürich 1996

## A) ZUSAMMENFASSUNG UND ABSTRACT

### Zusammenfassung

Die Grundidee dieser Arbeit war eine Gegenüberstellung der Eigenschaften von natürlichen Proteinen mit jenen von Aggregaten aus Aminosäureamphiphilen. Die Grundlage für diesen Vergleich bildete die Analogie zwischen einem globulären Protein und einer aus Aminosäureamphiphilen aufgebauten Vesikel, die beide ein hydrophobes Inneres und eine mit hydrophilen Aminosäuren bestückte Oberfläche besitzen.

Um diese Idee zu realisieren, wurden verschiedene einzel- und doppelkettige Aminosäureamphiphile synthetisiert.

Im Rahmen der Synthese von Aminosäureamphiphilen wurden Versuche zur Synthese von sogenannten Phosphatidylpeptiden gemacht. Ein solches Molekül besteht aus einem hydrophoben Diacylglycerol- und einem hydrophilen Peptid-Kopfteil, die über eine Phosphatbrücke miteinander verbunden sind. Konkret handelte es sich bei den Peptiden um serinenthaltende Dipeptide. Solche Dipeptide sollten mit Hilfe eines Enzyms, der Phospholipase D aus *Streptomyces sp.*, mit der Cholin-Kopfgruppe von Lecithin ausgetauscht werden. Diese Reaktion wird als sogenannte Transphosphatidylierungsreaktion bezeichnet. In bezug auf das Substrat, das gegen die Cholin-Kopfgruppe von Lecithin ausgetauscht werden kann, bestehen aber Limitierungen. Es stellte sich heraus, dass die erwähnten Serin-Dipeptide keine Substrate für diese Reaktion darstellten. Dagegen funktionierte die Reaktion mit 4-(Hydroxymethyl)-imidazol. Somit konnte ein imidazolenthaltendes Phospholipid (PHMI) als Ersatz für ein histidinenthaltendes Amphiphil synthetisiert werden.

Daneben wurden die einzelkettigen Aminosäureamphiphile N-Oleoyl-L-serin und N-Oleoyl-L-asparaginsäure, sowie die doppelkettigen N-Lauroyl-L-glutaminsäure-1-laurylamid und  $\alpha$ -N-Lauroyl-L-arginin-laurylamid-acetat hergestellt.

Mit Liposomen bestehend aus Lecithin, dem imidazolenthaltenden Lipid und den beiden einzelkettigen Amphiphilen wurden Versuche zur katalytischen Spaltung von Carbonsäureestern gemacht. Bei der Wahl der funktionellen Gruppen der Amphiphile diente die Protease  $\alpha$ -

Chymotrypsin mit ihrer katalytischen Triade bestehend aus Serin, Histidin und Asparaginsäure als Vorbild.

Mit den funktionalisierten Aggregaten konnte ein kleiner katalytischer Effekt gemessen werden. Dieser war auf die Anwesenheit des Imidazolrings zurückzuführen. Ein synergistischer Effekt zwischen den drei funktionalisierten Amphiphilen konnte aber nicht beobachtet werden. Mit Liposomen aus DMPHMI alleine wurden Versuche über die enantioselektive Esterspaltung von D- bzw. L-Phenylalanin-*p*-nitrophenylester unternommen. Diese Versuche wurden unterhalb der Phasenübergangstemperatur des Lipids durchgeführt, um dadurch die Steife der Liposomenmembran zu erhöhen. Es konnte aber kein signifikanter enantioselektiver Effekt gemessen werden.

Bei den synthetisierten, doppelkettigen Aminosäureamphiphilen handelte es sich um neuartige Verbindungen. Deshalb wurde zuerst das Aggregationsverhalten dieser Amphiphile untersucht. Dabei wurde ein interessantes, temperaturabhängiges Phänomen beobachtet. Oberhalb der jeweiligen Phasenübergangstemperatur der Amphiphile bildeten diese Vesikeln oder Scheiben. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur erfolgte ein Umwandlungsprozess dieser Aggregate in Helices und Röhren. Dieser Prozess war reversibel. Die verschiedenen Aggregate wurden mit Elektronen- und Lichtmikroskopie charakterisiert.

Im Falle des Argininamphiphils konnte der Umwandlungsprozess CD-spektroskopisch verfolgt werden. Die Bildung der Helices und Röhren hatte eine massive Erhöhung des CD-Signals im Bereich des Amidchromophores zur Folge.

Das Glutaminsäureamphiphil konnte nur in deprotonierter Form dispergiert werden. Die protonierte Form führte zu Präzipitation. Aus einem Titrationsexperiment konnten keine Anhaltspunkte für die Existenz von Aggregaten bestehend aus protonierter und deprotonierter Form des Amphiphils, wie es bei Fettsäuren möglich ist, gefunden werden.

Zur Weiterführung des Projektes wurde die Synthese von Analoga der beiden doppelkettigen Aminosäureamphiphile vorgeschlagen. Die vorgeschlagenen Amphiphile sollten es ermöglichen, Vesikeln mit einer "proteinähnlichen" Oberfläche zu bilden.

## Abstract

The basic aim of the work reported here was to compare the properties of natural proteins with those of aggregates made out of amino acid amphiphiles. To simplify matters, a globular protein was approximated as a sphere with a hydrophobic interior and a hydrophilic exterior, a model analogous to a vesicle formed from amino acid amphiphiles. Such a vesicle also has a hydrophobic interior (the hydrophobic area of the vesicle membrane) and a hydrophilic exterior (the surface of the vesicle covered with hydrophilic amino acids).

In the course of the synthesis of amino acid amphiphiles, attempts to synthesize phosphatidyl-peptides were undertaken. Such molecules consist of a hydrophobic diacylglycerol moiety and a hydrophilic peptide headgroup which are connected to each other by a phosphate bridge. Dipeptides containing one serine residue, which could be exchanged with the choline headgroup of lecithin enzymatically, were used. This reaction, called transphosphatidylation, was catalysed by phospholipase D from *Streptomyces sp.* It transpired however, that there were limitations on the nature of the substrate accepted by the enzyme and that seryl dipeptides were not suitable. However the reaction worked very well with 4-(hydroxymethyl)-imidazole as a substrate, and it was possible to synthesize an imidazole-containing phospholipid (PHMI) as a substitute for a histidine-containing amphiphile. In addition the two single-tailed amino acid amphiphiles N-oleoyl-L-serine and N-oleoyl-L-aspartic acid, as well as the two double-tailed amphiphiles N-lauroyl-L-glutamic acid-1-laurylamide and  $\alpha$ -N-lauroyl-L-arginine-laurylamide acetate were synthesized.

The catalytic cleavage of *p*-nitrophenyl esters of carboxylic acids in the presence of liposomes consisting of lecithin, the imidazole-containing lipid and the two single-tailed amphiphiles was investigated. The functional groups of the amphiphiles (serine, histidine, aspartic acid) were chosen so as to imitate the catalytic triad of the protease  $\alpha$ -chymotrypsin.

Only a small catalytic effect could be measured in this system and it was due to the presence of the imidazole ring. A synergistic effect of all three functionalized amphiphiles was not observed.

Experiments were carried out with liposomes consisting of DMPHMI alone in order to investigate the possibility of enantioselective cleavage of the *p*-nitrophenyl esters of D- and L-phenylalanine. These experiments were carried out below the phase transition temperature of the lipid in order to increase the rigidity of the liposome membrane. However no significant enantioselective effect could be measured.

The double-tailed amino acid amphiphiles were representatives of a new class of amino acid amphiphiles. It was first, therefore, necessary to investigate their aggregation behavior. In the course of this investigation an interesting, temperature dependent effect could be observed. Above their respective phase transition temperatures the amphiphiles formed vesicles or discs, while below this temperature transformation of these aggregates into helices and tubes took place. The different aggregates were characterised by electron and light microscopy and the process was found to be reversible.

In the case of the arginine amphiphile the transformation process could be followed by CD-spectroscopy, the formation of helices and tubes causing a strong increase in the CD signal of the amide chromophore.

The glutamic acid amphiphile could only be dispersed in the deprotonated form, and the protonated form precipitated. A titration experiment gave no indication of the existence of aggregates consisting of both protonated and unprotonated forms of the amphiphile, as occurs in the case of fatty acids.

To continue this research project the synthesis of analoga of the double-tailed amino acid amphiphiles was proposed. These amphiphiles should allow the formation of vesicles with a "proteine-like" surface.