

UNTERSUCHUNGEN ZUR
REGIO- UND STEREOSELEKTIVITÄT VON LIPASEN
DURCH COMPUTERGESTÜTZTES
MOLECULAR MODELING **UND**
MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

AN DER FAKULTÄT CHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART
ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE EINES
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.)

EINGEREICHTE DISSERTATION

VON

HOLGER SCHEIB

AUS BACKNANG

HAUPTBERICHTER: PROF. DR. ROLF D. SCHMID

MITBERICHTER: PROF. DR. DIETER H. WOLF

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG:

10. Dezember 1999

STUTTGART 1999

Hiermit versichere ich, daß ich die Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Stuttgart, den

Für Anja

**IHR, IHR DORT AUßEN IN DER WELT
DIE NASEN EINGESPANNT
SO MANCHEN MANN, SO MANCHEN HELD
IM FRIEDEN GUT UND STARK IM FELD
GEBAR DAS SCHWABENLAND**

(Friedrich Schiller)

**A MODEL MUST BE WRONG,
IN SOME RESPECT
ELSE IT WOULD BE THE THING ITSELF.
THE TRICK IS TO SEE WHERE IT IS RIGHT.**

(Henry A. Bent)

DANKSAGUNG

Prof. Rolf D. Schmid danke ich für die Überlassung des Themas, die anregenden Diskussionen und die großzügige Förderung meiner Arbeit.

Dr. Jürgen Pleiss danke ich für die ausgezeichnete Betreuung während der vergangenen Jahre.

Den Profs. Wolf und Roduner danke ich für die Durchsicht und Begutachtung dieser Arbeit.

Dem Arbeitskreis von Prof. Fritz Paltauf, insbesondere Dr. Peter Stadler und Dr. Andrea Kovac, bin ich zu Dank verpflichtet für die Synthese der Triacylglycerid-Substrate und deren Analoga sowie für die Messung der Stereoselektivitäten.

Dem Arbeitskreis von Prof. Fritz Spener, und hier besonders Dr. Lutz Haalck, Dr. Andreas Potthoff und Dr. Sabine Irmer, danke ich für die Herstellung der ROL-Mutanten.

Den Arbeitsgruppenleitern molekulare Biotechnologie, Dr. Jutta Schmitt, Biokatalyse, Dr. Uwe Bornscheuer, und Fermentation, Dipl.-Ing. (FH) Gaby Neumann, danke ich für die hervorragende Betreuung meiner "Ausflüge" in die jeweiligen Labors.

Besonderer Dank an folgende Mitarbeiter für ihre ständige Unterstützung und immer währende Hilfe: Petra Traub, Ulrike Schmid, Sandra Vorlová, Cornelius Bessler, Markus Fischer, Christian Gentner, Erik Henke, Ulrich Kahlow, Stefan Minning, Volker Nödinger, Dr. Ulrich Schwaneberg und Dr. Quyen Dinh Thi.

Dr. Ralf Otto gilt mein herzlicher Dank für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und den hervorragenden Lemberger.

Bum-Yeol Hwang danke ich für seine Arbeit und sein Engagement bei der Modellierung der Lactone.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Bioinformatik-Gruppe danke ich für das tolle und menschliche Klima, bei der Arbeit und nach Dienstschluß.

Allen Mitarbeitern des ITB gilt mein Dank für die schöne und produktive Zeit der vergangenen Jahre.

Einen ganz persönlichen Dank an die Menschen, die mich während der ganzen Jahre unterstützt und als Freund wertgeschätzt haben.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich von ganzem Herzen für den Respekt für meine Entscheidung, Ihre Unterstützung, unermüdliche Hilfe und Liebe.

Anja, Dir gilt mein ganz besonderer Dank für Deine Liebe, Deine Geduld, Dein Feuer und die Kraft, die Du mir gibst.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Stereoselektivität von mikrobiellen Lipasen bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und deren in Position *sn*-2 strukturell modifizierten Analoga konnte in dieser Arbeit erstmals in ihren molekularen Zusammenhängen verstanden werden. Demnach beruht die Stereoselektivität auf sterischen Wechselwirkungen nur weniger Reste der Lipase mit dem *sn*-2 Substituenten des Substrats. Die Lipase aus *Rhizopus oryzae* (ROL) spaltet *flexible* Triacylglyceride und Analoga, bei denen der *sn*-2 Substituent über eine rotierbare O'-C1' Ester- bzw. Etherbindung mit dem Glycerid verbunden ist, bevorzugt in Position *sn*-1. *Starre* Triacylglycerid Analoga, mit einer nicht rotierbaren N'-C1' Amidbindung bzw. einem Phenylsubstituenten in *sn*-2, werden von ROL überwiegend in Position *sn*-3 hydrolysiert. Die unterschiedliche Stereopräferenz für *flexible* und *starre* Substrate ließ sich hauptsächlich zurückführen auf repulsive sterische Wechselwirkungen zwischen der funktionellen Gruppe des *sn*-2 Substituenten und L258, dem C-terminalen Nachbarn des katalytisch aktiven H257. *Flexible* Triacylglyceride und Analoga sind aufgrund der rotierbaren O'-C1' Bindung in der Lage, abstoßende sterische Interaktionen mit der Lipase zu reduzieren, wohingegen *starre* Substrate dies nicht können.

Molecular modeling Untersuchungen der entsprechenden ROL-Substrat Komplexe wurden in zwei Orientierungen durchgeführt. In *sn*-1 Orientierung wird die Abspaltung der *sn*-1 Fettsäurekette simuliert, während in *sn*-3 Orientierung die *sn*-3 Fettsäurekette hydrolysiert wird. Aufgrund der unterschiedlichen Konfiguration am prochiralen Zentrum, C2 des Glycerids, wechselwirkten die *sn*-2 Substituenten eines in *sn*-1 Orientierung gebundenen Substrats unterschiedlich mit der Lipase im Vergleich zu den in *sn*-3 Orientierung gebundenen Substraten. Die hieraus resultierenden Unterschiede in der Intensität repulsiver sterischer Wechselwirkungen zwischen Lipase und Substrat beeinflussten direkt die Geometrie des gebundenen Substrats. So konnte eine Korrelation zwischen der Stereopräferenz der ROL bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und deren Analoga und der Substratgeometrie gefunden werden. Ein Torsionswinkel um die O3-C3 Bindung im *sn*-3 orientierten Substrat gibt an, ob vom gespaltenen Triacylglycerid bzw. Analogon bevorzugt die *sn*-1 oder die *sn*-3 Fettsäure hydrolysiert wird. Der Wert des Torsionswinkels $\Phi_{O3-C3} > 150^\circ$ korreliert mit *sn*-1, $\Phi_{O3-C3} < 150^\circ$ mit *sn*-3 Stereopräferenz.

Der Austausch der Aminosäure L258 durch das kleine und unpolare Alanin, das kleine und polare Serin sowie das voluminöse und unpolare Phenylalanin führte zu Mutanten mit veränderter Stereoselektivität. Die Auswertung der entsprechenden molekulardynamischen

Simulationen stützte die experimentellen Beobachtungen. So führte eine Vergrößerung der Bindungstasche (ROL-L258A und ROL-L258S) zu einer Umkehr der Stereopräferenz für das Phenyl-Analogon von *sn*-3 nach *sn*-1 sowie einer Verschiebung der Stereoselektivität in Richtung *sn*-1 für das Amid-Analogon. Umgekehrt führte eine Verkleinerung der Bindungstasche (L258F) bei der Umsetzung der *starren* Substrate zu einer weiteren Verschiebung in Richtung *sn*-3.

Die zusätzliche Verkleinerung der ROL-Bindungstasche in der Doppelmutante L258F/L254F ergab eine verstärkte Verschiebung der Stereoselektivität für *starre* Triacylglycerid Analoga nach *sn*-3, wenngleich der Einfluß der Aminosäure 254 auf die Stereoselektivität eher marginal ist.

Die zur ROL homologe Lipase aus *Rhizomucor miehei* (RML) hydrolysiert trotz großer sequentieller und struktureller Übereinstimmung sowohl *flexible* als auch *starre* Substrate bevorzugt in *sn*-1. *Molecular modeling* Untersuchungen ergaben, daß die Lage der Aminosäure G266 in beiden Lipasen unterschiedlich ist. In RML kann das dem G266 N-terminal benachbarte T265 eine H-Brücken Bindung zu H143 ausbilden, welches an der Stabilisierung der Seitenkette des katalytisch aktiven H257 beteiligt ist. Eine vergleichbare attraktive Wechselwirkung zwischen E265 und dem entsprechenden H144 in ROL konnte nicht beobachtet werden. Die Ausbildung der H-Brücken Bindung zwischen T265 und H143 in RML bewirkt eine Verschiebung des mit dem Substrat in direktem Kontakt stehenden G266 zum Kern des Enzyms hin. Dadurch können Triacylglyceride und Analoga in RML tiefer in die Bindungstasche binden, wobei die sterischen Wechselwirkungen mit L258, auch bei der Umsetzung von *starren* Triacylglycerid Analoga, deutlich abnehmen. In der Konsequenz können auch *starre* Substrate von RML überwiegend in Position *sn*-1 gespalten werden. Wie im Fall der ROL korrelierte auch in RML die experimentell beobachtete Stereopräferenz mit der Substratgeometrie, d.h. dem Torsionswinkel $\Phi_{O_3-C_3}$. Alle untersuchten Substrate wiesen einen Wert von $\Phi_{O_3-C_3} > 150^\circ$ auf.

Im nächsten Schritt erfolgte die Übertragung des Modells zum Verständnis und zur gezielten Vorhersage der Stereopräferenz von Lipasen aus *Mucorales* auf die weniger verwandten mikrobiellen Lipasen aus *Pseudomonas cepacia* (PCL), *Candida rugosa* (CRL) sowie die *Candida antarctica* Lipase B (CAL B) erfolgte. Wie für ROL und RML korrelierte die Stereopräferenz dieser Lipasen mit der Substratgeometrie der molekulardynamisch simulierten Triacylglyceride und deren Analoga. Die molekularen Ursachen der Stereoselektivität waren auch in diesen Fällen sterische Interaktionen zwischen dem *sn*-2 Substituenten und einer dem katalytisch aktiven Histidin strukturell benachbarten

Aminosäure, wobei es sich lediglich bei der PCL um einen dem aktiven Histidin auch sequentiell benachbarten Rest handelt (L287). In CRL entsprach dies F344, in CAL B I189.

Dabei wurde für die PCL ein zu den Untersuchungen an ROL analoger Aminosäureaustausch von L287 zu Phenylalanin durchgeführt. Die Einführung der Punktmutation L287F in das Gen der PCL erfolgte durch die QuikChange Methode. Anschließend wurde das Lipasegen in 5'-3'- und in 3'-5'-Richtung sequenziert, um den korrekten Einbau der Mutation zu überprüfen. Expression, Aufschluß der als inaktive Einschlußkörper vorliegenden Lipase sowie die Umfaltung in aktive Lipase unter Zuhilfenahme eines Helferproteins erfolgte analog zu Quyen und Mitarbeitern (Quyen *et al.* 1999). Die Auswertung von sowohl *molecular modeling* als auch von experimentellen Studien ergab, daß eine Verschiebung der Stereopräferenz bei der Hydrolyse des Phenyl-Analogons von *sn*-1 durch den Wildtyp zu *sn*-3 durch die PCL-L287F Mutante erfolgt war.

In der zweiten Phase dieser Arbeit wurde die Enantioselektivität von PCL bei der Spaltung von Estern primärer Alkoholsubstrate durch *molecular modeling* Methoden untersucht. Die hierbei molekulardynamisch simulierten Substrate können in zwei Klassen eingeteilt werden:

- 1) primäre Alkoholsubstrate, die untereinander ähnlich sind, sich strukturell jedoch deutlich von den Triacylglyceriden und ihren Analoga abheben, deren Enantioselektivitäten und -präferenzen bekannt sind und untereinander signifikante Unterschiede aufweisen.
- 2) geschützte Triacylglyceride, mit unterschiedlich großen Schutzgruppen an den nicht-hydrolysierten Positionen *sn*-3(1) und *sn*-2.

Die Auswertung der molekulardynamischen Simulationen der Komplexe von PCL mit Substraten der Klasse 1 ergab, daß kein einfacher Zusammenhang zwischen Enantiopräferenz und der Geometrie bzw. inneren Energie der Substrate besteht. Vielmehr sind mehrere Faktoren bei der Beurteilung der Enantioselektivität nötig:

- 1) Das Verhalten von Substrat und Aminosäuren in der Bindungstasche der Lipase während der molekulardynamischen Simulation
- 2) Die Lage des Imidazolrings des katalytisch aktiven H287
- 3) Analyse der H-Brücken Bindungen zwischen Substrat und PCL.

Ein Zusammenfassen dieser Einzelgrößen zu einer grundlegenden mathematischen Bewertungsfunktion, mit deren Hilfe die Enantiopräferenz von PCL bei der Hydrolyse primärer Alkoholsubstrate vorhergesagt werden könnte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr verwirklicht werden.

Das Modell zur Beschreibung der Stereoselektivität von mikrobiellen Lipasen konnte für die in nur geringem Maße enantioselektiv umgesetzten geschützten Triacylglyceride der Klasse 2

nicht angewendet werden, da entsprechende abstoßende sterische Wechselwirkungen zwischen Protein und Substrat nicht beobachtet werden konnten.

In der dritten Phase dieser Arbeit war es möglich, die *molecular modeling* Methodik für Triacylglyceride und Analoga auf die Enantioselektivität von PCL bei der Hydrolyse von γ - und δ -Lactonen zu übertragen, wenngleich aufgrund des rigiden Lactonrings eine geometrische Analyse des Substrats, ähnlich dem Torsionswinkel $\Phi_{O_3-C_3}$, nicht möglich war. Vielmehr existiert für PCL ein direkter Zusammenhang zwischen der relativen Lage der Seitenkette des H286 in der Bindungstasche und der Enantiopräferenz. So wurde der Abstand des N ϵ 2 Atoms des Imidazolrings zum O γ des katalytisch aktiven S87, zum O1 des Lactons sowie zum C γ des katalytisch aktiven D264 bestimmt und dieser Wert in einem sogenannten (R)_{His}- bzw. (S)_{His}-Wert zusammengefaßt. Überschreitet dieser einen Schwellenwert von 0,10 Å, so bricht das katalytisch relevante Netzwerk aus H-Brücken Bindungen zusammen und die Umsetzung des jeweiligen Enantiomers wird benachteiligt. Es konnte folgender halbquantitativer Zusammenhang festgestellt werden. Eine große Differenz zwischen (S)_{His}- und (R)_{His}-Wert eines Substrats ($\Delta(S)_{His}-(R)_{His}$) korreliert mit moderater bis großer Enantioselektivität. Dabei wird im Bereich zwischen $\Delta(S)_{His}-(R)_{His} = 0,12 \text{ \AA}$ bis $0,15 \text{ \AA}$ eine empirische Unterscheidung zwischen Substraten möglich, die mit niedriger ($E \leq 10$) bzw. mäßiger ($E = 45$) bis hoher ($E > 100$) Enantioselektivität umgesetzt werden.

Neben der *sn*-1 bzw. *sn*-3 Stereoselektivität wurde die *sn*-2 Regioselektivität von mikrobiellen Lipasen bei der hydrolytischen Esterspaltung von strukturierten Triacylglyceriden untersucht. Aus der Literatur war bekannt, daß Lipasen Triacylglyceride zum überwiegenden Teil *sn*-1(3) regioselektiv hydrolysieren. Es liegen nur von wenigen Lipasen experimentelle Daten vor, nach denen diese in der Lage sind, Fettsäuren auch in Position *sn*-2 zu spalten (z.B. Lipase A aus *Candida antarctica*, CAL A und CRL). Die Esterspaltung in *sn*-2 steht jedoch in Konkurrenz zur Acylwanderung der Fettsäurekette von Position *sn*-2 nach *sn*-1(3), was eine *sn*-2 regioselektive Spaltung vortäuschen kann. Experimentelle Untersuchungen mit Aceton als Lösungsmittel schloß für die auf EP100 immobilisierten Lipasen Acylwanderung prinzipiell aus, da diese bevorzugt in wäßrigem Medium auftritt. In diesem System wurde die Spaltung strukturierter Triacylglyceride, 1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerid (OPO) und 1,3-Dipalmitoyl-2-oleoylglycerid (POP), durch die wenig *sn*-1(3) regioselektive CAL A, die zu 95 % *sn*-1(3) regioselektive CRL sowie die mit der ROL identische und ausschließlich *sn*-1(3) regioselektive *Rhizopus delemar* Lipase (RDL) experimentell untersucht. Die Bildung von 1-Monooleoyl- (aus OPO) bzw. 1-Monopalmitoylglycerid (aus POP) konnte durch Gaschromatographie überprüft werden. Es konnte gezeigt werden, daß CAL A in der Lage ist,

Fettsäuren selektiv in Position *sn*-2 zu hydrolysieren und unter den gegebenen Bedingungen Acylwanderung auszuschließen. CRL zeigte nur wenig Aktivität bei der Spaltung von POP. Durch die geringe Intensität der entsprechenden Peaks im Gaschromatogramm konnte kein Nachweis für die Bildung von 1-Monopalmitoylglycerid, und damit Hydrolyse in Position *sn*-2, erbracht werden, wenngleich ein schwaches Signal dies vermuten läßt.

Molecular modeling Untersuchungen zur *sn*-2 regioselektiven Esterspaltung zeigten, daß sich die Bindungstasche von CRL in ihrer Form von denen der ROL, PCL und CAL B unterscheidet. In CRL kann ein Triacylglycerid tiefer in die Bindungstasche binden als in den anderen untersuchten mikrobiellen Lipasen, was zu einer veränderten Substratgeometrie führt, die in den Triacylglycerid Komplexen mit ROL, PCL und CAL B nicht beobachtet werden konnte. Die Torsionswinkel Φ_M und Φ_L liegen für CRL um ca. 50° höher als die der anderen Lipasen. Wie für die Stereoselektivität von mikrobiellen Lipasen bei der Umsetzung von Triacylglyceriden und deren Analoga, könnte auch für die *sn*-2 regioselektive Fettsäurespaltung, die Substratgeometrie mit der experimentell beobachteten *sn*-2 Regioselektivität korrelieren.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Lipasen.....	1
1.1.1 Vorkommen von Lipasen.....	1
1.1.2 Eigenschaften und Verwendung von Lipasen.....	1
1.1.3 Der Reaktionsmechanismus von Lipasen.....	5
1.1.4 Struktur und Aufbau von Lipasen.....	7
1.1.5 Allgemeine Informationen zur Nomenklatur und Systematik von Lipasen.....	12
1.1.6 <i>Rhizopus oryzae</i> Lipase, ROL.....	13
1.1.7 <i>Rhizomucor miehei</i> Lipase, RML.....	14
1.1.8 <i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase, PCL.....	14
1.1.9 <i>Candida rugosa</i> Lipase, CRL.....	16
1.1.10 <i>Candida antarctica</i> Lipase B.....	16
1.2 Substrate.....	17
1.2.1 Triacylglyceride und Triacylglycerid Analoga.....	17
1.2.2 Strukturierte Triacylglyceride.....	17
1.2.3 Weitere von Lipasen umgesetzte Substrate.....	18
1.3 Regio- und Stereoselektivität von Lipasen in der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga.....	19
1.3.1 Regioselektivität.....	19
1.3.2 Stereoselektivität.....	20
1.3.3 Modell für sekundäre Alkohole.....	23
1.3.4 Modell für primäre Alkohole.....	25
1.3.5 Modell für Triacylglyceride und Analoga.....	26
1.3.6 Experimentelle Befunde zur Stereoselektivität von Lipasen in der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga.....	27
1.3.7 Bindung von Triacylglyceriden und Analoga an ROL.....	27
1.4 <i>Protein Engineering</i>	28
2. Zielsetzung	31
3. Materialien und Methoden	33
3.1 Verwendete Hardware.....	33
3.2 Verwendete Software und Online-Datenbanken.....	33
3.3 Lipasestrukturen.....	34
3.3.1 Experimentell bestimmte Lipasestrukturen.....	34
3.3.2 Strukturmodell für ROL.....	34
3.4 Charakterisierung der Substratbindungsstellen in Lipasen.....	34
3.4.1 Die katalytische Triade.....	35
3.4.2 Das <i>oxyanion hole</i>	35
3.4.3 Identifizierung hydrophober und hydrophiler Bindungsstellen.....	36
3.5 Substratbindung in die Bindungstasche.....	36
3.5.1 Allgemeine Bemerkungen.....	36
3.5.2 Stereoselektivität.....	37
3.5.3 <i>sn</i> -1(3) vs. <i>sn</i> -2 Regioselektivität.....	42
3.5.4 Anpassung der Partialladungen von Lipase und Substrat in der ersten tetraedrischen Zwischenverbindung.....	42
3.6 <i>Molecular modeling</i>	44
3.6.1 Kraftfeld.....	44
3.6.2 Energieminimierung.....	46
3.6.3 Molekulardynamische Simulation.....	48

3.7	Auswertung molekulardynamischer Simulationen.....	53
3.7.1	Erstellen einer mittleren Struktur und Überprüfung der katalytischen Aktivität.....	53
3.7.2	Auswertung der Trajektorie.....	53
3.7.3	Bestimmung der Substratgeometrie für Triacylglyceride und Analoga.....	54
3.7.4	Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung für die Energien und ermittelten Torsionswinkel bei Triacylglyceriden und Analoga.....	55
3.7.5	Auswertung molekulardynamischer Simulationen an Komplexen der PCL mit Estern primärer Alkohole.....	56
3.7.6	Berechnung der Standardabweichung der Positionsverschiebung der Seitenkette des aktiven Histidins für γ - und δ -Lactone.....	56
3.8	Chemikalien und Enzyme.....	57
3.9	Geräte.....	58
3.10	Verbrauchsmaterialien.....	59
3.11	Nährmedien, Puffer und Lösungen.....	60
3.11.1	Medien.....	60
3.11.2	Allgemein verwendete Puffer.....	61
3.12	Bakterienstämme und Plasmid PCYTEXP1.....	62
3.12.1	<i>E. coli</i> Dh5 α	62
3.12.2	Das Plasmid pCYTEXP1.....	62
3.12.3	Das Plasmid pT-LipHp.....	63
3.12.4	Das Plasmid ompA Δ 70HpHis.....	64
3.13	Stammhaltung.....	65
3.13.1	Stammhaltung auf festen Nährböden.....	65
3.13.2	Anlegen von Glycerinkulturen.....	65
3.14	Anzucht in Flüssigmedium.....	66
3.15	Molekulargenetische Methoden.....	66
3.15.1	Polymerase Kettenreaktion, PCR.....	66
3.15.2	Positionsgerichtete Mutagenese mit QuikChange.....	67
3.15.3	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese.....	68
3.15.4	Transformation in <i>E. coli</i> DH5 α	69
3.15.5	Isolierung von Nucleinsäuren.....	70
3.15.6	Vorbereitung der DNA zur Sequenzierung.....	70
3.15.7	DNA-Sequenzierung.....	71
3.16	Biochemische Methoden.....	73
3.16.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	73
3.17	Expression der rekombinanten PCL und Helferprotein.....	76
3.17.1	<i>Fermentation im 5 l und 25 l Maßstab</i>	76
3.18	Zellaufschluß und Umfaltung der <i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase.....	77
3.19	Proteingewinnung.....	78
3.19.1	<i>cross-flow</i> Filtration.....	78
3.19.2	Lyophilisierung.....	78
3.20	Bestimmung der Lipaseaktivität.....	78
3.21	Untersuchungen zur <i>sn</i> -2 Regioselektivität von Lipasen.....	79
3.21.1	Strukturierte Triacylglyceride.....	79
3.21.2	Immobilisierung der Lipasen.....	80
3.21.3	Messung der hydrolytischen Aktivität der Immobilisate.....	80
3.21.4	Alkoholyse von strukturierten Triacylglyceriden.....	80
3.21.5	Ermittlung der Produktverteilung mittels GC-Analyse.....	81

4 Ergebnisteil	82
4.1 Charakterisierung der Substratbindungstaschen für Lipasen	82
4.2 Stereoselektivität von Lipasen bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga	86
4.2.1 Einfluß des Substrats auf die Stereoselektivität	86
4.2.2 Einfluß der Substratbindungsstelle auf die Stereoselektivität	90
4.2.3 Anwendung des Modells auf <i>Rhizomucor miehei</i> Lipase.....	91
4.2.4 Anwendung des Modells auf <i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase.....	94
4.2.5 Modifikation der Substrat-Bindungstasche für <i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase.....	96
4.2.6 Anwendung des Modells für <i>Candida rugosa</i> Lipase	99
4.2.7 Anwendung des Modells für <i>Candida antarctica</i> Lipase B	100
4.3 Stereoselektivität von Lipasen in der Hydrolyse von Estern primärer Alkohole	101
4.3.1 Primäre Alkoholsubstrate der Klasse 1.....	102
4.3.2 Primäre Alkoholsubstrate der Klasse 2.....	110
4.4 Stereoselektivität von Lipasen in der Hydrolyse von γ - und δ -Lactonen.....	111
4.4.1 δ -Lactone	112
4.4.2 γ -Lactone	116
4.5 Untersuchungen zur <i>sn</i> -2 regioselektiven Hydrolyse von strukturierten Triacylglyceriden durch Lipasen	118
4.5.1 Molecular modeling.....	118
4.5.2 Biokatalytische Untersuchungen	123
5. Diskussion	126
5.1 Gültigkeit des Modells zur Beschreibung und Vorhersage der Stereoselektivität von Lipasen.....	126
5.1.1 Stereoselektivität von Lipasen bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga.....	126
5.1.2 Modell zur Beschreibung der Stereopräferenz von ROL in der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga	128
5.1.3 Erweiterung des Modells auf RML	131
5.1.4 Erweiterung des Modells zur Vorhersage der Stereopräferenz von mikrobiellen Lipasen in der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga	134
5.2 Ester primärer Alkohole	137
5.2.1 Visuelle Analyse der Trajektorie	139
5.2.2 H-Brücken Bindungen	139
5.2.3 Lage der Substituenten in der Bindungstasche.....	140
5.2.4 Position des katalytisch aktiven H286.....	140
5.2.5 Komplexität des Phänomens der Enantiopräferenz primärer Alkoholsubstrate.....	141
5.2.6 Modell für primäre Alkoholsubstrate im Vergleich zum Kazlauskas-Modell für sekundäre Alkoholsubstrate	142
5.3 γ - und δ -Lactone	145
5.4 <i>sn</i> -2 Regioselektivität versus Acylwanderung.....	150
6. Ausblick	153
7. Literaturverzeichnis	154

8. Anhang	165
8.1 Sequenzalignment ROL, RML, PCL, CRL, CAL B	165
8.2 Nucleinsäure- und Aminosäuresequenz des Plasmids pT-LipHp mit dem Gen der <i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase ATCC21808	167
8.3 Sequenzen der verwendeten Mutagenese-Primer	173
8.4 Sequenzen der verwendeten Sequenzierprimer	173

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**Substrate**

Amid-Analogon	1,3-Dioctanoyl-2-deoxy-2-octanoyl-aminoglycerid
Benzylether-Analogon	1,3-Dioctanoyl-2- <i>O</i> -benzylglycerid
Ester-Analogon	Trioctanoin
Ether-Analogon	1,3-Dioctanoyl-2- <i>O</i> -octylglycerid
OOO	Triolein
OPO	1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerid
POP	1,3-Dipalmitoyl-2-oleoylglycerid
Phenyl-Analogon	1,3-Dioctanoyl-2-deoxy-2-phenylglycerid
PPO	1,2-Dipalmitoyl-3-oleoylglycerid

Lipasen

ANL	<i>Aspergillus niger</i> Lipase
BTL2	<i>Bacillus thermocatenulatus</i> Lipase 2
CAL A	<i>Candida antarctica</i> Lipase A
CAL B	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CLL	<i>Candida lipolytica</i> Lipase
CRL	<i>Candida rugosa</i> Lipase
CVL	<i>Chromobacterium viscosum</i> Lipase
FSC	<i>Fusarium solani pisi</i> Cutinase
GCL	<i>Geotrichum candidum</i> Lipase
HLL	<i>Humicola lanuginosa</i> Lipase
PcamL	<i>Penicillium camembertii</i> Lipase
PCL	<i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase
PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Lipase
PPL	<i>Porcine pancreatic</i> Lipase (Schweinepankreas Lipase)
PSpL	<i>Pseudomonas species</i> Lipase (KWI 51)
RAL	<i>Rhizopus arrhizus</i> Lipase
RML	<i>Rhizomucor miehei</i> Lipase
ROL	<i>Rhizopus oryzae</i> Lipase

Weitere Abkürzungen

Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
c	Umsatz einer Lipase-katalysierten Reaktion oder stöchiometrische Konzentration in mol/l
CPU	<i>Central Processing Unit</i>
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
ddATP	2',3'-Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	2',3'-Didesoxycytosin-5'-triphosphat
ddGTP	2',3'-Didesoxyguanosin-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphat
ddTTP	2',3'-Didesoxythymidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	Enantioselektivität oder Energie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ee _p	Enantiomerenüberschuß des Produkts
ee _s	Enantiomerenüberschuß des Substrats
E _{ges}	Gesamtenergie
E _{kin}	kinetische Energie
E _{pot}	potentielle Energie
Φ	Torsionswinkel
FID	Flammenionisations-Detektor

GC	Gaschromatographie
Hp	Gen des Helferproteins der PCL im Vektor pCYTEXP1
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid
kb	Kilobasen
L258A	Mutante der ROL, in der Leucin 258 durch Alanin ersetzt wurde
L258F	Mutante der ROL, in der Leucin 258 durch Phenylalanin ersetzt wurde
L258F/L254A	Mutante der ROL, in der Leucin 258 durch Phenylalanin und das Leucin 254 durch Alanin ersetzt wurde
L258F/L254F	Mutante der ROL, in der Leucin 258 durch Phenylalanin und das Leucin 254 durch Phenylalanin ersetzt wurde
L258F/L254V	Mutante der ROL, in der Leucin 258 durch Phenylalanin und das Leucin 254 durch Valin ersetzt wurde
L258S	Mutante der ROL, in der Leucin 258 durch Serin ersetzt wurde
L287F	Mutante der PCL, in der Leucin 287 durch Phenylalanin ersetzt wurde
LB	Luria Bertani-Medium
Lip	Gen der PCL im Vektor pCYTEXP1
m/v	Masse pro Volumen
MD-Simulation	molekulardynamische Simulation
MSHFBA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilylheptafluorobutyrat
OD ₅₇₈	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat
pT	Vektor pCYTEXP1
σ	Standardabweichung
<i>sn</i>	stereospezifische Numerierung
TEMED	Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TY	Trypton-Hefe-Medium
U	Unit in mmol/min

Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
λ	Wellenlänge in nm

Aminosäuren

A, Ala	Alanin
C, Cys	Cystein
D, Asp	Asparaginsäure, Aspartat
E, Glu	Glutaminsäure, Glutamat
F, Phe	Phenylalanin
G, Gly	Glycin
H, His	Histidin
I, Ile	Isoleucin
K, Lys	Lysin
L, Leu	Leucin
M, Met	Methionin
N, Asn	Asparagin
P, Pro	Prolin
Q, Gln	Glutamin
R, Arg	Arginin
S, Ser	Serin
T, Thr	Threonin
V, Val	Valin
W, Trp	Tryptophan
Y, Tyr	Tyrosin

GLOSSAR DER VERWENDETEN ANGLISMEN

<i>annealing</i>	Anlagerungsschritt bei der PCR. In einem Temperaturbereich zwischen 45°C und 65°C erfolgt die Anlagerung der Primer an die Einzelstrang-DNA
<i>BTL</i>	Bindungstasche für den großen Rest des Alkohols
<i>BTM</i>	Bindungstasche für den mittleren Rest des Alkohols
<i>cavity</i>	Dritte Bindungsregion in der Bindungstasche von Lipasen bestehend aus polaren und unpolaren Resten. Nicht vorhanden bei Lipasen aus <i>Mucorales</i> .
<i>fold</i>	Charakteristisches Faltungsmuster eines Proteins im Raum bedingt durch seine Aminosäuresequenz und (in einigen Fällen) die Anwesenheit eines Helferproteins
<i>G-elbow loop</i>	Kurze, drei Aminosäuren lange Schleife (→ <i>loop</i>) in Lipasen aus <i>Mucorales</i> . Liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zum Stereozentrum eines Triacylglycerids bzw. Analogons.
<i>His gap</i>	Spalte zwischen den Seitenketten des katalytisch aktiven Histidins und einer strukturell benachbarten Aminosäure des <i>hydrophobic dent</i> , in die sich die funktionelle Gruppe eines <i>sn-2</i> Substituenten eines Triacylglycerids bzw. Analogons orientieren kann. Für ROL, RML und PCL sind die Aminosäuren des <i>His gap</i> direkte Sequenznachbarn.
<i>hydrophobic crevice</i>	Bindestelle für die zu spaltende Säure. In allen Lipasen vorhanden, aufgebaut aus unpolaren Aminosäuren
<i>hydrophobic dent</i>	In allen Lipasen vorhandene kleinere Bindestelle aus unpolaren Resten. Bildet einen Teil der BTL. Anlagerung des <i>sn-2</i> Substituenten bei Triacylglyceriden und Analoga
<i>interfacial activation</i>	Aktivierung einer Lipase durch Öffnung des <i>lids</i> an einer Lipid-Wasser Grenzschicht.

<i>lid, flap</i>	Flexibles Sekundärstrukturelement (eine oder zwei α -Helices), das in hydrophiler Umgebung den Zugang zur Substratbindungstasche und dem aktiven Zentrum blockiert. In lipophiler Umgebung erfolgt eine Konformationsänderung. Der Deckel klappt auf, das Substrat kann gebunden werden.
<i>loop</i>	Schleife im Rückgrat eines Proteins, der keine höhere Sekundärstrukturordnung zugewiesen werden kann.
<i>molecular modeling</i>	Imitation des Verhaltens von Molekülen und molekularen Systemen, in der Regel durch Computer-Anwendungen
<i>open reading frame</i>	Offenes Leseraster bei der Übersetzung des DNA-Codes in die Aminosäuresequenz. Dabei ist von einem Gen lediglich das Stopcodon bekannt, nicht jedoch dessen Beginn. Ein Codon besteht aus drei Purin- bzw. Pyrimidinbasen und ist charakteristisch für eine Aminosäure. Von drei aufeinander folgenden Aminosäuren kann demnach jede den Beginn eines Codons darstellen. Ein Gen kann somit in drei Aminosäuresequenzen übersetzt werden.
<i>oxyanion hole</i>	Strukturelement in der Bindungstasche der Lipase. Aufgebaut aus zwei Aminosäuren, deren Säureamidgruppen als H-Brücken Donoren zum Oxyanion dienen.
<i>protein engineering</i>	Design von Proteinen mit veränderten Eigenschaften durch gentechnische Methoden.
<i>refolding</i>	Umfaltung von als inaktive Einschlußkörper vorliegendem Protein zu aktivem Protein unter Zuhilfenahme eines spezifischen Helferproteins (auch Chaperone oder Refoldase).
<i>screening</i>	Durchsuchen einer großen Anzahl von Proben und Auswahl geeigneter Spezies mit einem charakteristischen Assay
<i>sequence alignment</i>	Vergleich von DNA-, RNA- und Proteinsequenzen und deren bestmögliche Überlagerung nach einer Bewertungsfunktion.
<i>template</i>	DNA-Vorlage bei der Polymerase Kettenreaktion.

<i>united atoms</i>	Zusammenfassen der Atome und Massen von CH- CH ₂ - bzw. CH ₃ -Gruppen.
<i>wall</i>	Verhindert das tiefere Anlagern eines Substrats in die Bindungstasche der Lipase. Besteht bei ROL und RML aus dem <i>G-elbow loop</i> , bei PCL, CRL und CAL B aus den Seitenketten einiger Aminosäuren der Bindungstasche.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Übersicht über die von Lipasen katalysierten Biotransformationen am Beispiel eines Triacylglycerols bei der Umsetzung durch eine <i>sn</i> -1(3) regioselektive Lipase	2
Abbildung 2: Reaktionsmechanismus von Lipasen am Beispiel der Hydrolyse eines Butyrats.....	6
Abbildung 3: RML in offener Konformation mit gebundenem Trioctanoin.....	8
Abbildung 4: Geschlossene und offene Form der Lipase von <i>Rhizomucor miehei</i> in Sekundärstrukturzuordnung nach Kabsch-Sander.....	9
Abbildung 5: RML in offener Form.	10
Abbildung 6: Grenzflächenaktivierung einer Lipase im Vergleich zu einer Esterase.....	11
Abbildung 7: Strukturformel eines Triacylglycerids und stereospezifische Numerierung der an das Glycerid gebundenen Substituenten.....	17
Abbildung 8: Die Strukturformeln von OPO (1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerid) und POP (1,3-Dipalmitoyl-2-oleoylglycerid).....	18
Abbildung 9: Stereoselektive Hydrolyse eines prochiralen Triacylglycerids zum chiralen 2,3(1,2)-Diacylglycerid durch eine <i>sn</i> -1(3) regioselektive Lipase.....	22
Abbildung 10: Empirische Regel zur Vorhersage des bevorzugt umgesetzten Enantiomers eines sekundären Alkoholsubstrats bei der Lipase-katalysierten Umsetzung.....	25
Abbildung 11: Die empirischen Regeln für die Enantiopräferenz von PCL für sekundäre und primäre Alkohole.....	26
Abbildung 12: Die vier postulierten Möglichkeiten der Bindung eines Triacylglycerids bzw. Analogons an eine <i>sn</i> -1(3) regioselektive Lipase	28
Abbildung 13: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Triacylglyceride und Analoga	38
Abbildung 14: Strukturformeln der untersuchten primären Alkoholsubstrate	40
Abbildung 15: Strukturformeln und Nomenklatur der untersuchten δ - und γ -Lactone	41
Abbildung 16: Die Bindung eines Trioctanoin-Moleküls an die Bindungstasche von ROL unter der Annahme einer Esterspaltung in <i>sn</i> -2.....	42
Abbildung 17: Erste tetraedrische Zwischenverbindung bei der Enzym-katalysierten Esterhydrolyse durch Serin-Proteasen.....	44
Abbildung 18: Bindende und nicht-bindende Wechselwirkungen	45
Abbildung 19: Energieprofil entlang einer Reaktionskoordinate	47
Abbildung 20: Berechnung der Trajektorie einer molekulardynamischen Simulation	51
Abbildung 21: Definition der Torsionswinkel Φ_1 bis Φ_7	54
Abbildung 22: Definition der Torsionswinkel Φ_M und Φ_L	55
Abbildung 23: Das Plasmid pCYTEXP1.....	63

Abbildung 24: Das Plasmid pT-LipHp mit den Genen der PCL ATCC 21808 und des Helferproteins	64
Abbildung 25: Das Plasmid ompA Δ 70Hp des Helferproteins der PCL mit ompA-Signalsequenz	65
Abbildung 26: Sequenzalignment der reifen Lipasen aus <i>Mucorales</i>	82
Abbildung 27: Die Substratbindungsstellen der ROL und RML.....	83
Abbildung 28: Die Substratbindungstasche der PCL	84
Abbildung 29: Die Substratbindungstasche der CRL.....	85
Abbildung 30: Die Substratbindungstasche der CAL B.....	86
Abbildung 31: Beispiele für die sterischen Wechselwirkungen zwischen dem <i>sn</i> -2 Substituenten und der Seitenkette von L258 in ROL	87
Abbildung 32: Das Ester-Analogon in <i>sn</i> -1 Orientierung im Komplex mit ROL und RML.....	93
Abbildung 33: Nukleotid- <i>alignment</i> der experimentell erhaltenen Sequenzen der Wildtyp-PCL und der L287F-Mutante.	97
Abbildung 34: SDS-Gel der fermentierten <i>E. coli</i> Dh5 α Zellen unter Kontrolle des λ P _L -Promotors	98
Abbildung 35: Werte für die Torsionswinkel Φ_{O-C} in (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)-Enantiomeren der primären Alkohole der Klasse 1	103
Abbildung 36: Lage der mittleren Strukturen des (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)-Enantiomers der Verbindung 6 in der Bindungstasche der PCL	106
Abbildung 37: Lage der mittleren Strukturen des (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)-Enantiomers der Verbindung 7 in der Bindungstasche der PCL	107
Abbildung 38: Lage der mittleren Strukturen des (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)-Enantiomers der Verbindung 8 in der Bindungstasche der PCL	108
Abbildung 39: Lage der mittleren Strukturen des (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)-Enantiomers der Verbindung 9 in der Bindungstasche der PCL	109
Abbildung 40: Die Lage der mittleren Strukturen des (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)-Enantiomers der Verbindung 11 in der Bindungstasche der PCL	111
Abbildung 41: Die überlagerten mittleren Strukturen der PCL-Komplexe mit (<i>R</i>)- δ - und (<i>S</i>)- δ -Undecalacton	115
Abbildung 42: Die überlagerten mittleren Strukturen der PCL-Komplexe mit (<i>R</i>)- γ - und (<i>S</i>)- γ -Undecalacton	117
Abbildung 43: Mittlere Struktur des in <i>sn</i> -2 hydrolysierten Triacylglycerids in der Bindungstasche der ROL.....	119
Abbildung 44: Mittlere Struktur des in <i>sn</i> -2 hydrolysierten Triacylglycerids in der Bindungstasche der PCL.....	120
Abbildung 45: Mittlere Struktur des in <i>sn</i> -2 hydrolysierten Triacylglycerids in der Bindungstasche der CRL.....	121
Abbildung 46: Mittlere Struktur des in <i>sn</i> -2 hydrolysierten Triacylglycerids in der Bindungstasche der CAL B	122

Abbildung 47: Gaschromatogramm der Reaktion von auf EP100 immobilisierter CAL A mit OPO in Aceton bei 60°C	124
Abbildung 48: Gaschromatogramme der Reaktionen von auf EP100 immobilisierter CRL mit POP in Aceton bei 60°C.....	125
Abbildung 49: Die für die Enantioselektivität von primären Alkoholsubstraten entscheidenden Bindungen im Substrat.....	144
Abbildung 50: Bevorzugte Konformation eines Carbonyl-Sauerstoffs am Stereozentrum eines primären Alkoholsubstrats	146
Abbildung 51: Korrelation zwischen experimentell bestimmten E- und $\Delta(S)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$ -Werten	149

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Übersicht über die Verwendung von Lipasen als Detergentien	4
Tabelle 2:	Einteilung von Lipasen auf Grundlage ihrer Proteinsequenz.....	13
Tabelle 3:	Klassifizierung der <i>Pseudomonas</i> Lipasen nach Gilbert.....	15
Tabelle 4:	Modell und Messungen zur Stützung der Modelle zur Vorhersage der Enantiopräferenz von Lipasen bei der Umsetzung von sekundären Alkoholen und deren Derivaten basierend auf der Größe der Substituenten am Stereozentrum.....	24
Tabelle 5:	Die Aminosäuren der katalytischen Triade in den untersuchten mikrobiellen Lipasen.....	35
Tabelle 6:	Die Aminosäuren des <i>oxyanion holes</i> in den untersuchten Lipasen.	35
Tabelle 7:	Einstellungen bei der Durchführung einer Energieminimierung	48
Tabelle 8:	Parametereinstellungen der durchgeführten molekulardynamischen Simulationen an mikrobiellen Lipasen.....	49
Tabelle 9:	Verwendeter <i>E. coli</i> -Stamm mit Genotyp und Resistenz.....	62
Tabelle 10:	Verwendetes Plasmid pCYTEXP1 mit Angabe von Genotyp und Resistenz.....	62
Tabelle 11:	Temperaturprogramm der QuikChange-PCR bei der Einführung einer Punktmutation in das Plasmid pT-LipHp.....	68
Tabelle 12:	Temperaturprogramm für die zyklische Sequenzierreaktion	73
Tabelle 13:	Zusammensetzung des Proteinstandards.....	76
Tabelle 14:	Die zur Untersuchung der <i>sn</i> -2 Regioselektivität verwendeten Lipasen	80
Tabelle 15:	Stereopräferenzen von Wildtyp-ROL, ROL-Mutanten L258X (X=A,S,F) und ROL-Doppelmutanten L258F/L254Y (Y=A,V,F) bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga.	88
Tabelle 16:	Stereoselektivitäten von RML bei der hydrolytischen Esterspaltung von Triacylglyceriden und Analoga.....	91
Tabelle 17:	Stereoselektivitäten von PCL bei der hydrolytischen Esterspaltung von Triacylglyceriden und Analoga.....	96
Tabelle 18:	Aktivität der Wildtyp-PCL und der L287F-Mutante bei der Hydrolyse von pNPP bei 37°C.	99
Tabelle 19:	Stereoselektivitäten von CRL bei der hydrolytischen Esterspaltung von Triacylglyceriden und Analoga.....	100
Tabelle 20:	Stereoselektivitäten von CAL B bei der hydrolytischen Esterspaltung von Trioctanoin	101
Tabelle 21:	Experimentelle Daten und <i>molecular modeling</i> Ergebnisse für die Umsetzung der primären Alkoholsubstrate der Klasse 1 durch PCL.....	103
Tabelle 22:	Die Strukturen der (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- δ -Lactone, ihre Geometrie im Komplex mit PCL sowie die experimentell bestimmten E-Werte.....	112

Tabelle 23: Die Strukturen der (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- γ -Lactone, ihre Geometrie im Komplex mit PCL sowie die experimentell bestimmten E-Werte.....	116
Tabelle 24: Vergleich der regioselektiven Hydrolyse der <i>sn</i> -2 Fettsäurekette durch Rogalska <i>et al.</i> und <i>molecular modeling</i> Ergebnissen.	122
Tabelle 25: Überblick über den zeitlichen Verlauf der Substrat-Spaltung in Position <i>sn</i> -2.	123

1. EINLEITUNG

1.1 LIPASEN

1.1.1 VORKOMMEN VON LIPASEN

Lipasen (Triacylglyceridhydrolasen EC 3.1.1.3. (Tipton 1994; Barrett 1995; Barrett 1996; Barrett 1997)) gehören zur Familie der Serin-Hydrolasen und kommen in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen vor (Borgstrom und Brockman 1984; Alberghina *et al.* 1991; Boland *et al.* 1991; Faber 1997; Schmid und Verger 1998; Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Sie sind dabei nicht an einen bestimmten Zelltyp gebunden. Ihre biologische Funktion ist der hydrolytische Abbau von Triacylglyceriden zu Di- und Monoacylglyceriden, freien Fettsäuren und Glycerin. Glyceride sind die Hauptbestandteile der Speicherfette in Tieren und Pflanzen. Liegen sie fest vor, nennt man sie Fette, in flüssigem Aggregatzustand Öle (Haas und Joerger 1995).

1.1.2 EIGENSCHAFTEN UND VERWENDUNG VON LIPASEN

Lipasen sind jedoch nicht nur in der Lage, Triacylglyceride zu spalten. Vielmehr katalysieren sie darüber hinaus die Hydrolyse eines breiten Spektrums von natürlichen und unnatürlichen wasserunlöslichen Estern. Neben der Hydrolyse katalysieren Lipasen auch andere Biotransformationen wie Alkoholyse, die Veresterung primärer, sekundärer und tertiärer Alkohole sowie Umesterungsreaktionen (Abbildung 1) (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Dabei erfolgt die Umsetzung in vielen Fällen mit hoher Regio- und Enantioselektivität. Darüber hinaus setzen Lipasen auch alkoholanaloge Substrate wie Amine, Thiole und Hydroperoxide um.

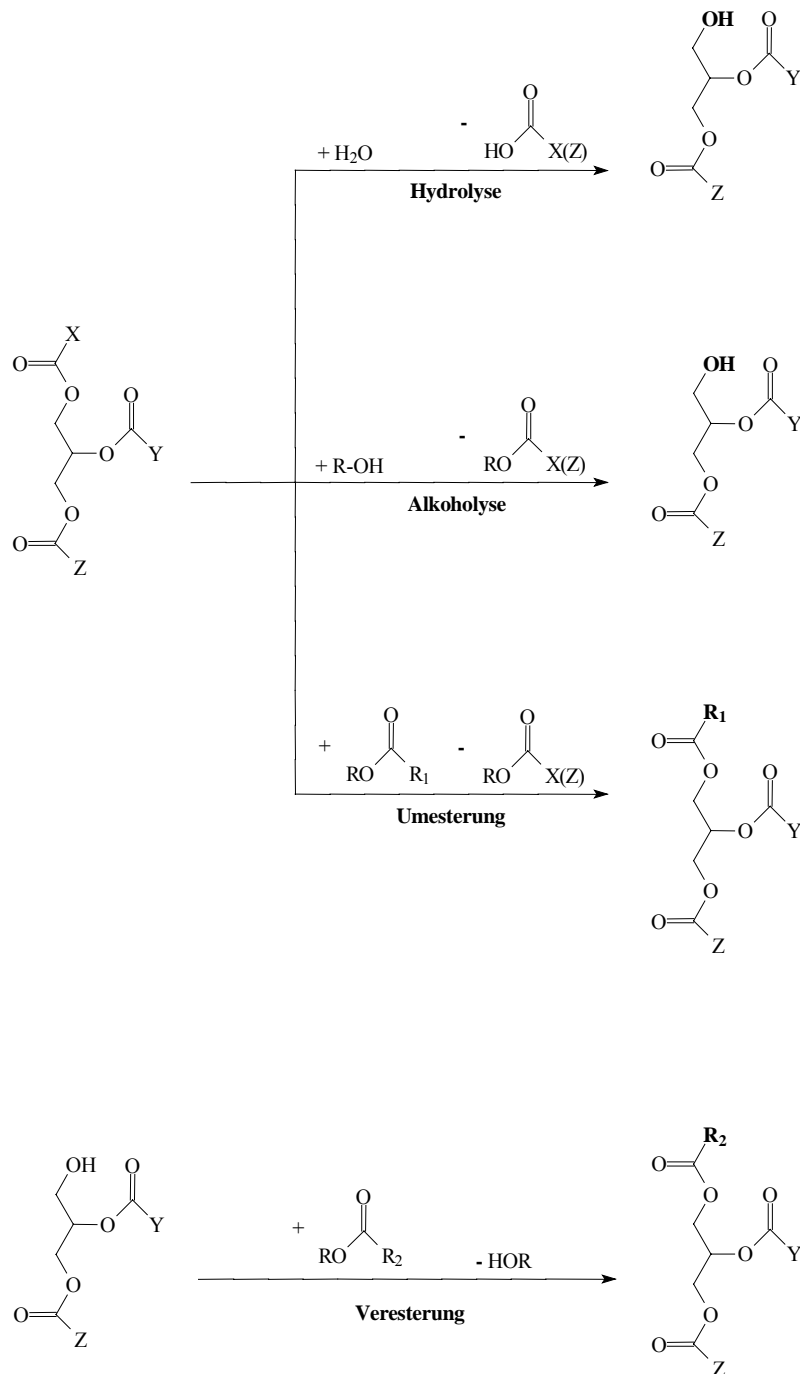


Abbildung 1: Übersicht über die von Lipasen katalysierten Biotransformationen am Beispiel eines Triacylglycerids bei der Umsetzung durch eine *sn*-1(3) regioselektive Lipase (nach Haas und Joerger (Haas und Joerger 1995)):

Ein weiterer Vorteil von Lipasen ist ihre Aktivität an einer Lipid-Wasser Grenzschicht (Ransac *et al.* 1996; Verger 1997). Diese Eigenschaft macht Lipasen als Biokatalysatoren für die organische Synthese in unpolaren Medien interessant (einen umfassenden Überblick geben Bornscheuer und Kazlauskas (Bornscheuer und Kazlauskas 1999)). Es konnte gezeigt

werden, daß die meisten Lipasen ohne diese Grenzschicht nur wenig aktiv sind (Ransac *et al.* 1996; Verger 1997). Die Aktivität der meisten Lipasen erhöht sich um ein Vielfaches, wenn das Enzym in wäßrigen Medium Kontakt mit einem unpolaren Fetttropfen oder einer Micelle bekommt bzw. in organisches Lösungsmittel exponiert wird. Dieses Phänomen bezeichnet man als Grenzflächenaktivierung (engl. *interfacial activation*; eine Übersicht geben Verger sowie Ransac und Mitarbeiter (Ransac *et al.* 1996; Verger 1997). Dabei wird die Lipase einerseits nahe am Substrat plaziert, andererseits erfährt das Enzym eine Konformationsänderung, die das aktive Zentrum für das Substrat erst zugänglich macht und die Bildung des sogenannten *oxyanion holes* bedingt, eines essentiellen Strukturelements für die Umsetzung von Substraten durch Lipasen (siehe Kapitel 1.1.3).

Verwendung von Lipasen in Waschmitteln und Haushaltsreinigern

Industriell wird mit Lipasen, nach Proteasen und Carbohydrasen, weltweit der drittgrößte Umsatz auf dem Enzymmarkt erzielt (weltweiter Markt für industrielle Enzyme 1998: US\$ 1,3 Mrd. (Novo-Nordisk 1998)). In absoluten Zahlen ist der Anteil von Lipasen am Weltmarkt jedoch eher gering (US\$ 70 Mio (Sheldon 1996)). Dies resultiert einerseits aus der kurzen Geschichte der industriellen Nutzung von Lipasen, andererseits ist die Produktion von Lipasen im großtechnischen Maßstab häufig ökonomisch nicht konkurrenzfähig zu entsprechenden chemischen Verfahren. Für eine detailliertere Übersicht über die Verwendung von Lipasen in industriellen Prozessen steht eine Reihe von ausführlichen Übersichtsartikeln zur Verfügung (Schmid und Verger 1998; Bornscheuer und Kazlauskas 1999).

Lipasen werden hauptsächlich als Waschmittelzusatzstoffe eingesetzt (Tabelle 1). Die dabei verwendeten Lipasen sind ausschließlich mikrobiellen Ursprungs und müssen hohe pH- und Temperaturstabilität aufweisen.

Lange Zeit entfaltete sich die fettlösende Eigenschaft der Lipasen jedoch erst nach mehrmaligem Waschen. Der Waschvorgang war in der Regel zu kurz, um signifikante Mengen an Fett zu spalten. Da die Lipase jedoch auch nach dem Waschen am Fetttropfen haften blieb, konnte dieser trotzdem abgebaut werden. Beim darauf folgenden Waschvorgang wurden die Abbauprodukte der Fette von der Faser entfernt. Darüber hinaus verhindern Lipasen die weitere Anlagerung von Fett an die Faser. Novo Nordisk führte 1998 mit LipoPrimeTM eine neue, durch *protein engineering* erhaltene Lipase ein, die schon beim ersten Waschgang ausreichend fettlösende Eigenschaften besitzt (Novo-Nordisk 1998).

Für die besondere Verwendung von Lipasen in Haushaltsreinigern ist weniger die Temperaturstabilität sondern vielmehr deren Stabilität gegenüber Proteasen und alkalischem pH-Wert entscheidend.

Tabelle 1: Übersicht über die Verwendung von Lipasen als Detergentien (Jaeger *et al.* 1994)

Organismus	Produktname	Hersteller	Jahr der Markteinführung	pH Optimum	T Optimum
<i>Humicola lanuginosa</i> Klonierung und Expression in <i>Aspergillus oryzae</i>	Lipolase	NOVO-Nordisk A/S (Dänemark)	1988	10,0	40 °C
<i>Pseudomonas mendocina</i> Klonierung und Expression in <i>Bacillus species</i>	Lumafast	Genencor International B.V. (Niederlande)	1992	10,5	40 °C
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> Umklonierung und Expression in <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Lipomax	Royal Gist-Brocades N.V.(Niederlande) ^{a)}	1995	11,0	45 °C

^{a)} wurde 1995 von Genencor International B.V. (Niederlande) erworben

Verwendung von Lipasen in der Lebensmittelindustrie und zur Synthese diätetischer Fette

Bei der Käseherstellung findet die Lipase-katalysierte Hydrolyse von Milchfetten verbreitete Anwendung bei der Geschmacksverstärkung, bei der Beschleunigung der Reifung sowie bei der Herstellung käseartiger Produkte, z.B. diverser Streichkäsesorten (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). So sekretieren Mikroben, die bei der Reifung des Käses eine Rolle spielen, Lipasen (z.B. *Penicillium roquefortii*). Während bei der traditionellen Käseherstellung dem Frischkäse zusätzlich Lipasen in Form von Rohextrakten zugegeben werden, welche dem Käse seinen charakteristischen Geschmack verleihen, werden diese in der modernen Käseherstellung durch kommerziell erhältliche Lipasen ersetzt, wie z.B. die Lipasen aus *Aspergillus niger* und *Rhizomucor miehei* (Berry und Paterson 1990; Cheetham 1993; Vulfson 1994; Haas und Joerger 1995).

Lipasen werden zudem bei der Herstellung strukturierter Triacylglyceride eingesetzt, so z.B. bei der Synthese von Kakaobutter-Ersatz oder diätetischen Fetten. Allgemein bezeichnet man als strukturierte Triacylglyceride modifizierte Fette, bei denen eine Fettsäure ausgetauscht oder die Position mindestens einer Fettsäure im Triacylglycerid verändert wurde. Kakaobutter besteht zum überwiegenden Teil aus Triacylglyceriden, die in Position *sn*-1 und *sn*-3 Palmitin- (C16:0) und/oder Stearinsäure (C18:0) und in *sn*-2 Oleinsäure (C18:1) tragen. Die Firmen Unilever und Fuji Oil haben Verfahren entwickelt, um Kakaobutter-Äquivalente enzymatisch im Tonnenmaßstab herzustellen, wobei das Produkt durch Umesterung einer deutlich preiswerteren Palmölfraction mit Stearinsäure in Anwesenheit einer *sn*-1(3)

regioselektiven Lipase, z.B. RML, erfolgt (Coleman und Macrae 1977; Matsuo *et al.* 1981). Das selbe Verfahren eignet sich nicht nur zur Veredlung preisgünstiger Gemische von Triacylglyceriden, sondern gleichfalls zur Herstellung von synthetischen Milchfetten für Säuglingsnahrung oder spezielle Diäten. Menschliches Milchfett (1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerid, OPO) kann durch synthetische Fette ersetzt werden, bei denen eine Palmölfraction enzymatisch mit Ölsäure umgeestert wurde (King und Padley 1990; Quinlan und Moore 1993). Für Patienten, die an pankreatischen Erkrankungen leiden und deren Fettaufnahme geschädigt ist, können Fette hergestellt werden, die an *sn*-1 und *sn*-3 mit einer mittellangen gesättigten Fettsäure sowie in Position *sn*-2 mit einer langkettigen, ungesättigten Fettsäure verestert wurden (siehe Kapitel 1.2.2) (Jandacek *et al.* 1987; Soumanou *et al.* 1997; Soumanou *et al.* 1998; Schmid *et al.* 1999).

Verwendung von Lipasen zur Synthese optisch reiner Zwischenstufen in der organischen Synthese und in der Pharmaindustrie

Die Verwendung von Lipasen als Katalysatoren in Biotransformationen ist in den meisten Fällen wirtschaftlich nicht konkurrenzfähig. Für bestimmte Reaktionen werden häufig Lipasen als Katalysatoren verwendet, die ursprünglich auf einen anderen Zweck hin untersucht wurden und daher leicht verfügbar sind. Herausragendes Beispiel für die großtechnische Anwendung von Lipase-katalysierten Biotransformationen ist die Synthese eines breiten Spektrums von optisch reinen Aminen unter Verwendung von *Pseudomonas glumae* Lipase als Biokatalysator (Balkenhohl *et al.* 1997).

Lipasen finden darüber hinaus bei einer Vielzahl von Synthesen pharmazeutisch relevanter Zwischenstufen Anwendung. Dabei werden optisch reine Verbindungen hergestellt, die wiederum als Edukte zur Synthese von Wirkstoffen gegen Krebs, AIDS, Asthma, Pilzkrankungen u.a. dienen. Einen Überblick geben Bornscheuer und Kazlauskas (Bornscheuer und Kazlauskas 1999).

1.1.3 DER REAKTIONSMECHANISMUS VON LIPASEN

Die Lipase-katalysierte Esterspaltung ist ein über mehrere Stufen verlaufender Prozeß, der in zwei ähnliche Teile untergliedert werden kann (Abbildung 2).

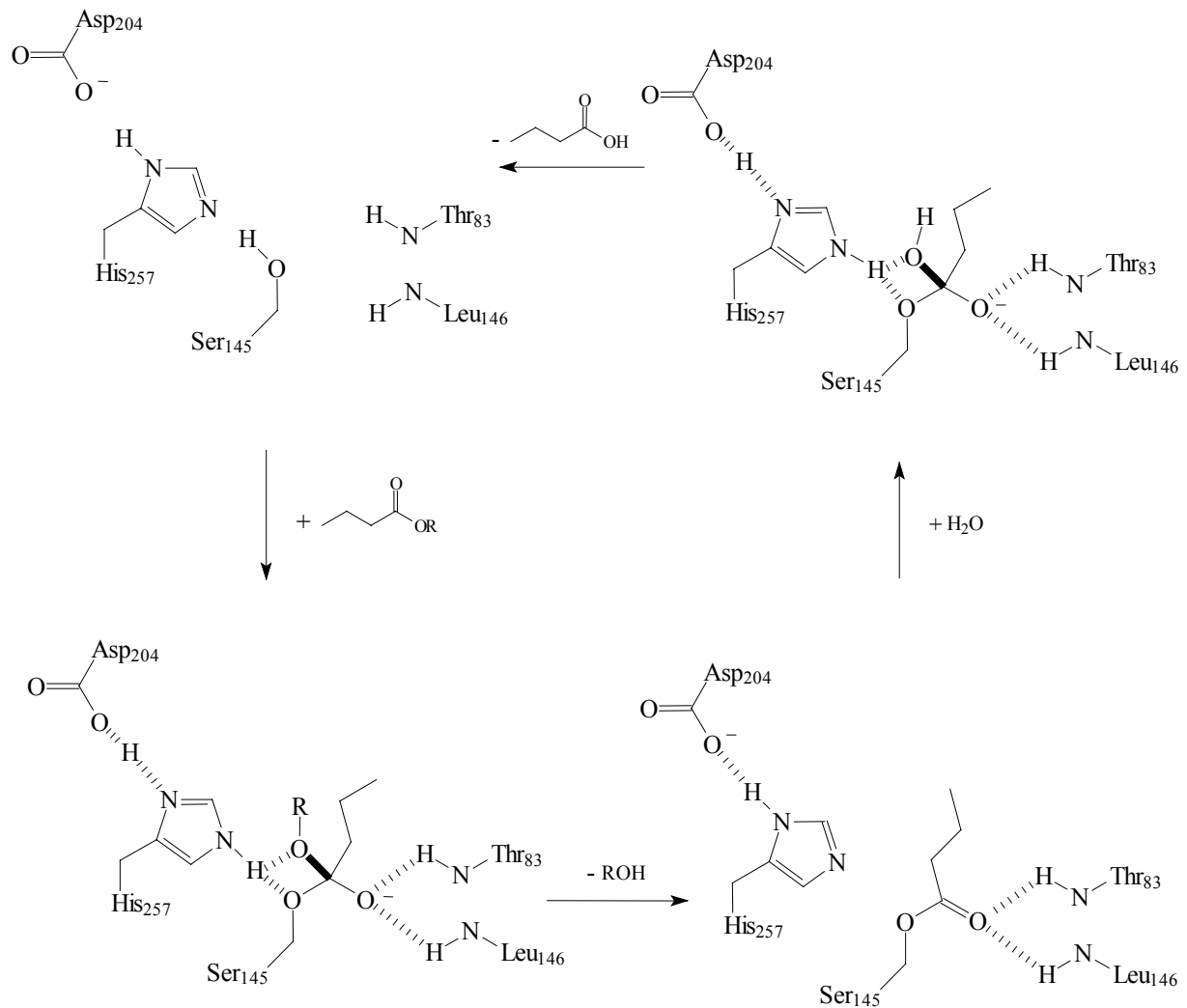


Abbildung 2: Reaktionsmechanismus von Lipasen (Carter und Wells 1988) am Beispiel der Hydrolyse eines Butyrats. Die dargestellten Aminosäuren und ihre Sequenznummern entsprechen dem aktiven Zentrum der Lipase aus *Rhizopus oryzae* (nach (Bornscheuer und Kazlauskas 1999)). H-Brücken Bindungen sind gestrichelt, die gespaltene Bindung ist **fett** hervorgehoben.

Zunächst bindet ein Carbonsäureester über Wasserstoffbrücken an die Aminosäuren des *oxyanion holes*. Es kommt zur Ausbildung des sogenannten Michaelis-Komplexes. Im ersten Reaktionsschritt greift das katalytisch aktive Serin nucleophil an den Carbonylkohlenstoff des Substrats an. Dabei wird zuerst das H δ der Hydroxylgruppe der Serin-Seitenkette auf das N ϵ 2 des aktiven Histidins übertragen. Das resultierende Nucleophil, O γ , greift anschließend an das Carboxylkohlenstoffatom des Substrats an. Es kommt zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Serin und Substrat. Daraus folgt eine Umhybridisierung des Carboxylkohlenstoffs von sp² zu sp³. Die negative Partiaalladung des O γ des Serins wird auf das Substrat übertragen und findet sich dort am Carbonylsauerstoff. Die Ladung am

resultierenden Oxyanion wird durch H-Brücken der Aminosäuren des *oxyanion holes* stabilisiert. Die positive Ladung, die zum Ladungsausgleich in dieser Intermediärverbindung notwendig ist, ist am aktiven Histidin lokalisiert und wird durch das Aspartat der katalytischen Triade stabilisiert. Das erste tetraedrische Intermediat entsteht. Im nächsten Schritt überträgt das aktive Histidin das zwischenzeitlich gebundene Proton auf den Sauerstoff der Estergruppe, gibt also seine positive Ladung ab. Die negative Partialladung am Oxyanion wird gleichfalls auf den Sauerstoff der Estergruppe übertragen. Es kommt zum Ladungsausgleich, woraus die Spaltung der C-O-Bindung zwischen tetraedrischem Kohlenstoff und Estersauerstoff resultiert. Es bilden sich das sogenannte Acylenzym und ein Alkoholmolekül. Der Alkohol verläßt die Bindungstasche, ein Wassermolekül nimmt seinen Platz ein. In Umkehr der vorangehenden Schritte wird das Wassermolekül an das Acylenzym gebunden. Es bildet sich ein zweites tetraedrisches Intermediat, in dem die Ladungen wie im ersten verteilt sind. Abschließend überträgt das Histidin ein Proton von N ϵ 2 auf das O γ des Serins. Der Katalyseprozeß ist beendet. Ein Molekül freie Fettsäure entsteht.

Die Bildung der ersten tetraedrischen Zwischenverbindung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Lipase-katalysierten Esterhydrolyse (Beer *et al.* 1996). Kürzlich durchgeführte *molecular modeling* Untersuchungen an CRL bestätigten den Katalysemechanismus als Ganzes und demnach auch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (Monecke *et al.* 1998). Zum Verständnis der Stereo- und Regioselektivität durch *molecular modeling* Studien wurden Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat im ersten tetraedrischen Intermediat untersucht.

1.1.4 STRUKTUR UND AUFBAU VON LIPASEN

Der α/β -Hydrolase fold

Lipasen weisen signifikante Unterschiede in ihren Proteinsequenzen auf. So gibt es Lipasen, deren Struktur durch mehr als 500 Aminosäuren bestimmt wird (z.B. *Candida rugosa* Lipase), wohingegen andere Lipasen aus nur wenig mehr als 200 Resten aufgebaut sind (z.B. *Candida antarctica* Lipase B). Dabei fällt auf, daß die Struktur der Lipasen stärker konserviert ist als die Aminosäuresequenz (Ollis *et al.* 1992). Ollis und Mitarbeiter fanden ein für Lipasen charakteristisches Faltungsmuster, den sogenannten α/β -Hydrolase *fold* (Ollis *et al.* 1992). Alle bislang aufgeklärten Raumstrukturen von Lipasen und Esterasen folgen diesem

Bauprinzip. Den Kern dieses Faltungsmusters bilden acht antiparallel angeordnete β -Faltblattstrukturen, die durch α -Helices untereinander verbunden sind (Abbildung 3).

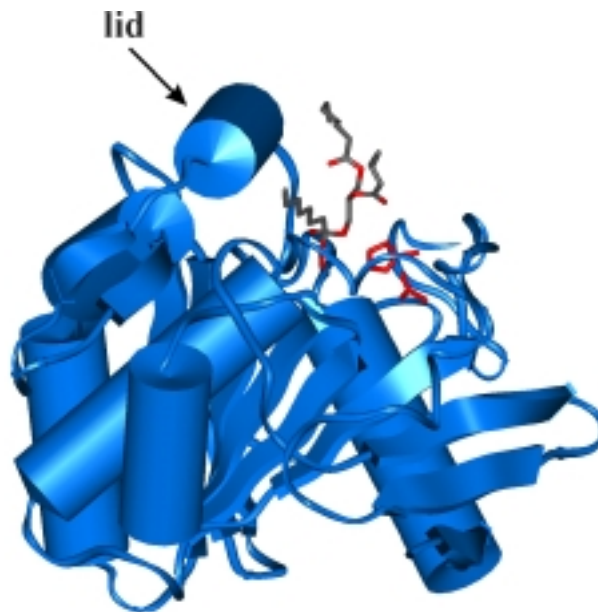


Abbildung 3: RML in offener Konformation mit gebundenem Trioctanoin (erste tetraedrische Zwischenstufe). Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot hervorgehoben. Die Sekundärstrukturzuordnung erfolgte nach Kabsch-Sander (Kabsch und Sander 1983). Das Faltungsmuster des α/β -Hydrolase *folds* ist deutlich zu erkennen: acht antiparallele β -Stränge, die den Kern des Enzyms bilden sind von α -Helices umgeben (Ollis *et al.* 1992).

Die katalytische Triade

Die katalytische Maschinerie von Lipasen beruht auf einer Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und, in der Regel, Aspartat (Abbildung 3). In GCL (Schrag *et al.* 1991; Cygler *et al.* 1993) und CRL (Grochulski *et al.* 1993; Grochulski *et al.* 1994) sowie in Acetylcholinesterase (Ollis *et al.* 1992) ist das Aspartat durch Glutamat ersetzt. Die Orientierung der Aminosäuren der katalytischen Triade ist in allen Lipasen und Esterasen ähnlich, ist sie doch unverzichtbar für das Auftreten katalytischer Aktivität. Außer den Enzymen, die nach dem α/β -Hydrolase *fold* falten, besitzen auch Serin- und Cystein-Proteasen sowie Subtilisine eine katalytische Triade (Dodson und Wlodawer 1998). Die weite Verbreitung katalytischer Triaden in den unterschiedlichsten Enzymen gibt ein anschauliches Beispiel für konvergente Evolution in der Natur (Ollis *et al.* 1992).

Das nucleophile Serin der katalytischen Triade sitzt auf einer Haarnadelschleife zwischen einem β -Strang und einer α -Helix. Die übrigen Aminosäuren der katalytischen Triade sind C-terminal zum aktiven Serin lokalisiert, wohingegen die Aminosäuren des *oxyanion holes* in Richtung des N-Terminus liegen. Dabei folgt das Serin in der Aminosäureabfolge direkt einer

der Aminosäuren des *oxyanion holes*. Allen α/β -Hydrolase-*fold* Enzymen ist ein Pentapeptid-Motiv gemein. Die Sequenz GX SXG ist hoch konserviert, wobei S dem katalytisch aktiven Serin entspricht (Cygler *et al.* 1994).

Grenzflächenaktivierung und lid

Lipasen katalysieren, obwohl selbst wasserlöslich, die Hydrolyse von wasserunlöslichen Estern an einer Lipid-Wasser Grenzschicht. Man bezeichnet den Übergang des katalytisch inaktiven zum aktiven Enzym als Grenzflächenaktivierung (Sarda und Desnuelle 1958). Das aktive Zentrum wird in wässriger Umgebung durch das sogenannte *lid* bzw. *flap* für das Lösungsmittel unzugänglich bedeckt (Brzozowski *et al.* 1991; Derewenda *et al.* 1992; Tilbeurgh *et al.* 1993; Grochulski *et al.* 1994). Bei diesem Sekundärstrukturelement handelt es sich in der Regel um eine kurze starre amphiphile α -Helix, wie z.B. in der RML (Brzozowski *et al.* 1991; Derewenda *et al.* 1992). Im Fall der Lipase aus *Geotrichum candidum* besteht das *lid* aus zwei α -Helices (Schrag *et al.* 1991). Dabei ist in der geschlossenen Konformation der polare Teil der Helix zum Lösungsmittel, der unpolare Teil ins Innere der Lipase orientiert. Wird die Lipase in eine hydrophobe Lösungsumgebung exponiert oder kommt es zur Adsorption an ein Fetttropfen, wodurch die Lipase in räumliche Nähe zum Substrat kommt, öffnet sich das *lid* und das katalytische Zentrum wird zugänglich. Diese Konformationsänderung bewirkt, daß die Innenseite des *lids* nach außen orientiert wird (Abbildung 4; (Brady *et al.* 1990; Winkler *et al.* 1990; Schrag *et al.* 1991).

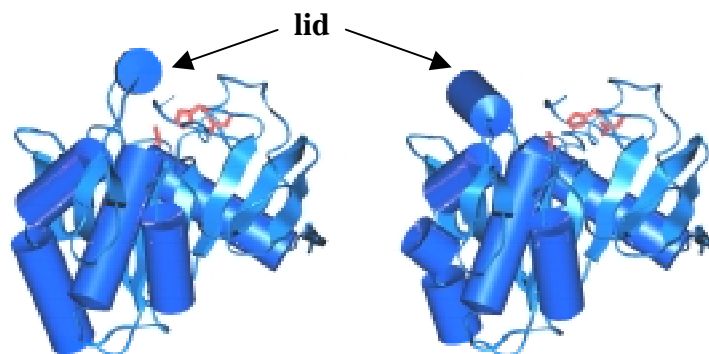


Abbildung 4: Geschlossene (links) und offene (rechts) Form der Lipase von *Rhizomucor miehei* in Sekundärstrukturordnung nach Kabsch-Sander (Kabsch und Sander 1983). Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind in rot dargestellt.

Daraus resultiert eine Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche um das aktive Zentrum, was wiederum die Bindung hydrophober Substrate erleichtert. So beträgt die für die RML zugängliche hydrophobe Oberfläche in der offenen Konformation ca. 8 % der

Gesamtoberfläche (Derewenda *et al.* 1992). Vasel und Mitarbeiter errechneten für die RML eine Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche von 10560 \AA^2 in der geschlossenen auf 11816 \AA^2 in der offenen Konformation (Vasel *et al.* 1993). Abbildung 5 zeigt die RML in offener Konformation, wobei die Aminosäuren entsprechend ihrer Hydrophobizität eingefärbt sind. Zur Orientierung befindet sich ein Trioctanoinmolekül in der Substratbindungstasche. Dabei fällt auf, daß in unmittelbarer Umgebung der Fettsäureketten überwiegend hydrophobe Aminosäuren vorkommen.

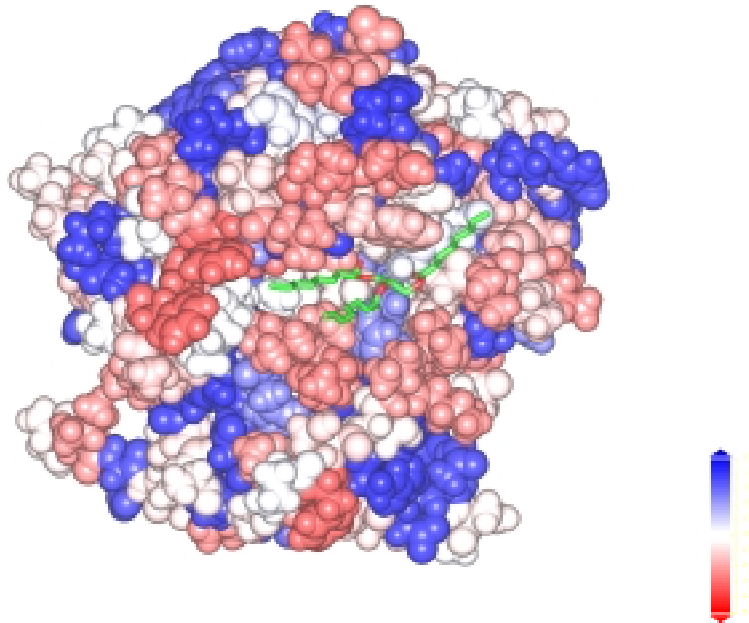


Abbildung 5: RML in offener Form. Zur Orientierung wurde ein Trioctanoin-Molekül in die Bindungstasche gebunden. Die Aminosäuren wurden nach Hydrophobizität eingefärbt. Rote Färbung weist auf hydrophobe, blaue Färbung auf hydrophile Aminosäuren hin. Die Substratbindungstasche besteht überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren.

Der spezielle Aktivierungsmechanismus der Lipasen hat weitreichende Konsequenzen auf die Kinetik dieser Enzyme. Während z.B. Esterasen, die kein *lid* aufweisen, der Michaelis-Menten Kinetik folgen, benötigen Lipasen eine Schwellenkonzentration an Substrat, um vollständig aktiv zu sein (Abbildung 6). Es finden demnach zwei „Reaktionsschritte“ statt: (1) Adsorption des Enzyms an die Lipid-Wasser Grenzschicht und (2) anschließende Hydrolyse. Gestützt wird die Theorie der Grenzflächenaktivierung durch Untersuchungen an Acetylcholinesterase und *Fusarium solani pisi* Cutinase (FSC), die beide kein *lid* besitzen und der Michaelis-Menten Kinetik gehorchen (Martinez *et al.* 1992; Derewenda und Sharp 1993; Martinez *et al.* 1994).

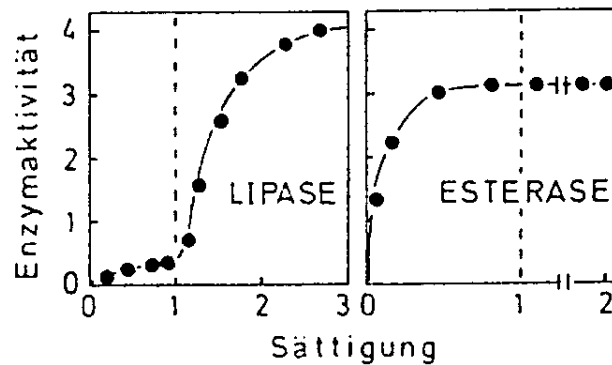


Abbildung 6: Grenzflächenaktivierung einer Lipase im Vergleich zu einer Esterase. Aufgetragen ist die jeweilige Enzymaktivität als Funktion der Substratkonzentration, die in Vielfachen der Substratsättigung angegeben ist. Die gestrichelten Linien zeigen den Substratsättigungspunkt an (Sarda und Desnuelle 1958).

Der genaue Mechanismus, nach dem die Aktivierung der Lipasen an einer Lipid-Wasser Grenzschicht erfolgt, ist bislang nicht bekannt. Ging man aufgrund der Ergebnisse früher Röntgenstrukturanalysen von einem Zwei-Stufen-Mechanismus aus, der nur die geschlossene und offene Konformation der Lipase zuläßt, was ein quasi "Einrasten" des *lids* voraussetzt (Holmquist *et al.* 1993; Holmquist *et al.* 1993; Martinelle *et al.* 1996), wurde in späteren Veröffentlichungen vermutet, daß die *lid*-Öffnung über mehrere Zwischenstufen erfolgt (Derewenda *et al.* 1994; Peters *et al.* 1996; Peters *et al.* 1997).

Die Lipasen CAL B, CVL und *Pseudomonas aeruginosa* Lipase weisen keine Grenzflächenaktivierung auf, obwohl sie ein *lid* besitzen. Hingegen zeigt die Lipase aus *Staphylococcus hyicus* nur für bestimmte Substrate Aktivierung an einer Lipid-Wasser Grenzschicht, für andere nicht. Einen Überblick über den Stand der Forschung geben die Übersichtsartikel von Ransac und Mitarbeitern sowie Verger (Ransac *et al.* 1996; Verger 1997).

Das oxyanion hole

Die Öffnung des *lids* bewirkt nicht nur, daß die Bindungstasche und damit das aktive Zentrum der Lipase für das Substrat zugänglich wird. Darüber hinaus führt die Umorientierung einiger Aminosäuren zur Ausbildung des sogenannten *oxyanion holes*, eines Strukturelements, welches bei der katalytischen Umsetzung der Substrate eine tragende Rolle spielt. Das *oxyanion hole* wird aus den Amidgruppen zweier Aminosäuren gebildet. Die Säureamidgruppen dienen als Wasserstoffdonoren zum Oxyanion, welches bei der Umsetzung eines Substrats vorübergehend entsteht (Abbildung 2). Durch Ausbildung dieser relevanten Wasserstoffbrücken wird die negative Ladung am Oxyanion stabilisiert. Eine

eingehendere Diskussion des Mechanismus zur Hydrolyse von Estern durch Lipasen erfolgte bereits in Kapitel 1.1.3.

Die Bildung des *oxyanion holes* im Verlauf der *lid*-Öffnung wurde für die meisten Lipasen bestätigt. Eine Ausnahme bildet die FSC, die kein *lid* besitzt. Aufgrund von Röntgenstrukturanalysen ging man bislang davon aus, daß die FSC ein ständiges *oxyanion hole* aufweist (Martinez *et al.* 1994). Die Strukturbestimmung von FSC in Lösung durch NMR-Techniken ergab jedoch, daß, obwohl die Struktur in Lösung der im Kristall in weiten Bereichen stark ähnelt, einzelne Domänen des Enzyms eine unerwartete Dynamik aufwiesen (Prompers *et al.* 1997). Zu diesen dynamischen Regionen zählt das *oxyanion hole*. Diese Beobachtungen widersprechen demnach der Theorie eines vorgefertigten *oxyanion holes*, die FSC wäre keine Ausnahme mehr.

1.1.5 ALLGEMEINE INFORMATIONEN ZUR NOMENKLATUR UND SYSTEMATIK VON LIPASEN

Die Nomenklatur von Lipasen beruht auf dem Mikroorganismus, der die Lipase produziert. Bei tierischen Lipasen gehen sowohl der Organismus als auch das die Lipase produzierende Organ in die Namensgebung mit ein. Im Fall der Mikroorganismen kommt es hin und wieder zu Namensänderungen, wenn im Laufe der Zeit genauere Informationen zur Klassifizierung der Mikroorganismen vorliegen. So wurde *Pseudomonas fluorescens*, deren Lipase von Amano unter dem Produktnamen "Amano P" vertrieben wurde, Anfang der 1990er Jahre umklassifiziert zu *Pseudomonas cepacia* (PCL). Diese Namensänderung wurde jedoch nicht allgemein akzeptiert. In letzter Zeit erfolgte eine erneute Umklassifizierung und PCL wurde zu *Burkholderia cepacia* Lipase (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). In Anbetracht der noch weitgehend üblichen alten Bezeichnung wird in dieser Arbeit der Begriff *Pseudomonas cepacia* Lipase verwendet.

Im Fall der Lipasen aus dem Pilz *Rhizopus* wurde 1995 durch Haas und Joerger eine Vereinfachung eingeführt. Alle *Rhizopus* Lipasen, d.h. die Lipasen aus *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus delemar* und *Rhizopus niveus*, wurden aufgrund ihrer nahezu vollständigen Sequenzidentität zu *Rhizopus oryzae* Lipase umbenannt (Haas und Joerger 1995). *Candida rugosa* Lipase wurde ebenfalls umklassifiziert. In älteren Veröffentlichungen ist noch von *Candida cylindracea* Lipase die Rede.

Eine Einteilung von Lipasen kann einerseits, analog der Nomenklatur, nach ihrer Herkunft erfolgen. Als sinnvoller hat sich jedoch eine Klassifikation auf der Basis ihrer Aminosäuresequenz erwiesen. Hier geht man von der empirisch gefundenen Beobachtung

aus, daß Proteine ähnlicher Sequenz in der Regel auch ähnliche Faltung aufweisen. Man unterscheidet zwischen drei Gruppen:

- 1) tierische Lipasen,
- 2) Pilzlipasen und
- 3) bakterielle Lipasen,

wobei die beiden letztgenannten Gruppen in jeweils zwei Untergruppen gegliedert werden können. Bei den Pilzen unterscheidet man die *Rhizomucor*- und *Candida rugosa*-Familie, bei den Bakterien die *Pseudomonas*- und *Staphylococcus*-Familie (Tabelle 2).

Tabelle 2: Einteilung von Lipasen auf Grundlage ihrer Proteinsequenz (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Abkürzungen der Lipasen finden sich im Abkürzungsverzeichnis.

Klassifizierung	Molekulargewicht [kDa]	Typische Vertreter
Tierische (pankreatische) Lipasen	ca. 50	PPL
Pilzlipasen		
<i>Candida rugosa</i> -Familie	59-65	CRL, GCL
<i>Rhizomucor</i> -Familie	29-42	CAL B, RML, ROL, PcamL, HLL
Sonstige		ANL, CAL A, CLL
Bakterielle Lipasen		
<i>Pseudomonas</i> -Familie	30-35	PCL, PFL, CVL
<i>Staphylococcus</i> -Familie	68-73	BTL2

1.1.6 *RHIZOPUS ORYZAE* LIPASE, ROL

Rhizopus species gehören zu den *Mucorales* (Jochpilze), zu denen auch *Rhizomucor miehei* oder der Brotschimmel gehören. Sie kommen im Boden, als Parasiten in Pflanzen, Pilzen und Tieren vor. Für den Menschen sind sie jedoch nur selten pathogen (Haas und Joerger 1995).

Die Lipasen der *Rhizopus* species weisen in der Regel ausgeprägte *sn*-1(3) Regioselektivität bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden auf, unterscheiden sich jedoch in ihrer Stereoselektivität und Kettenlängenspezifität (Rogalska *et al.* 1993). Vor einigen Jahren wurden alle Mitglieder der *Rhizopus* Familie umklassifiziert, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus javanicus* wurden zu *Rhizopus oryzae* ATCC 853. Durch die Bestimmung der homologen Aminosäuresequenzen von RNL, RDL, RJL und ROL wurde diese Maßnahme im Nachhinein bestätigt (siehe auch Kapitel 1.1.5). Eine Übersicht geben Haas und Joerger (Haas und Joerger 1995).

Die reife ROL besteht aus 269 Aminosäuren. Die in mikrobiellen Lipasen eigentlich unübliche Pro-Sequenz, die jedoch in allen Lipasen aus *Mucorales* gefunden wurde, ist vermutlich für den Schutz der Zelle vor der schädigenden Wirkung des aktiven Enzyms verantwortlich (Phospholipaseaktivität der reifen ROL), sowie für die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken bei der Proteinfaltung (Beer *et al.* 1996).

1.1.7 *RHIZOMUCOR MIEHEI* LIPASE, RML

RML besitzt ein Molekulargewicht von 33 kDa (Huge-Jensen *et al.* 1987). Das reife Enzym besteht aus 269 Aminosäuren. Es handelt sich bei der kommerziell erhältlichen Lipase um ein rekombinantes Enzym aus dem Pilz *Aspergillus* (Huge-Jensen *et al.* 1989). In ihrer Primär- und Sekundärstruktur ist sie der ROL ähnlich (siehe auch Kapitel 4.1).

1.1.8 *PSEUDOMONAS CEPACIA* LIPASE, PCL

Allgemeine Bemerkungen zu Pseudomonas Lipasen

Von den mikrobiellen Lipasen wurden die *Pseudomonas* Lipasen in Bezug auf *screening*, Aufreinigung, Charakterisierung, Klonierung und Expression mit am intensivsten untersucht. Gilbert (Gilbert 1993) führte 1993, basierend auf deren sequentieller Verwandtschaft, eine Unterteilung in *Pseudomonas* Lipasen von Typ I und II ein (Tabelle 3).

Viele *Pseudomonas* Lipasen (Gruppe I) benötigen ein zweites Protein, das auf der DNA in 3'-Richtung hinter dem Lipasegen kodiert ist, um in eine aktiven Konformation gefaltet zu werden. Man nennt diese Proteine Helferproteine, Chaperone oder Refoldasen. Gilbert (Gilbert 1993) untergliederte die Gruppe I Lipasen aus den unterschiedlichen *Pseudomonas*-Stämmen weiter in zwei Klassen (Klasse I und II, Tabelle 3), wobei die Einteilung aufgrund der Sequenzhomologie der Helferproteine zueinander erfolgte. Die in dieser Arbeit experimentell untersuchte *Pseudomonas cepacia* Lipase ATCC 21808 gehört zu den Lipasen der Gruppe I, Klasse II.

Tabelle 3: Klassifizierung der *Pseudomonas* Lipasen nach Gilbert (Gilbert 1993). Die in dieser Arbeit untersuchte Lipase stammt aus *Pseudomonas cepacia* ATCC 21808, einer Lipase der Gruppe I, Klasse II (grau unterlegt).

Gruppe	Klasse	<i>Pseudomonas</i> Spezies	Referenz
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EF2	(Gilbert <i>et al.</i> 1991)
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAC 1R	(Jaeger <i>et al.</i> 1992)
I		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	(Wohlfarth <i>et al.</i> 1992); (Andreoli <i>et al.</i> 1989)
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TE 3285	(Nishioka <i>et al.</i> 1991)
		<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> M1	(Andreoli <i>et al.</i> 1989)
		<i>Pseudomonas</i> species 109	(Ihara <i>et al.</i> 1992); (Ihara <i>et al.</i> 1991)
I		<i>Pseudomonas cepacia</i> ATCC 21808	(Kordel <i>et al.</i> 1991)
		<i>Pseudomonas cepacia</i> DSM 3959	(Jorgensen <i>et al.</i> 1991)
II		<i>Pseudomonas cepacia</i> M-12-33	(Nakanishi <i>et al.</i> 1991); (Nakanishi <i>et al.</i> 1989)
		<i>Pseudomonas</i> species KWI-56	(Iizumi <i>et al.</i> 1991)
		<i>Pseudomonas glumae</i>	(Batenburg <i>et al.</i> 1991)
		<i>Pseudomonas fragi</i> IFO 3458	(Kugimiya <i>et al.</i> 1986)
		<i>Pseudomonas fragi</i> IFO 12049	(Aoyama <i>et al.</i> 1988)
II		<i>Pseudomonas fluorescens</i> B52	(Tan und Miller 1992)
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	(Chung <i>et al.</i> 1991)
		<i>Pseudomonas</i> species LS107d2	(Johnson <i>et al.</i> 1992)

Das zunehmende Interesse der Industrie an Lipasen und ihren Eigenschaften in den letzten Jahren hatte eine Entwicklung zur Folge, in deren Verlauf neue Lipasen gesucht, auf bestimmte biochemische Merkmale getestet und isoliert, oder bereits bekannte Lipasen hinsichtlich ihrer Eigenschaften modifiziert wurden. Dabei spielten rekombinante DNA-Techniken eine wichtige Rolle sowohl bei der Identifizierung als auch dem Transfer von Lipase-DNA in einen heterologen Wirtsorganismus. Darüber hinaus kann mit diesen Methoden die Genregulation beeinflusst werden, mit der Konsequenz, Enzym in großen Mengen produzieren zu können. Die Verwendung von Lipasen in großtechnischen Prozessen setzt jedoch voraus, daß der Umgang mit dem Wirtsorganismus einfach, ungefährlich und wirtschaftlich ist und daß genetische Veränderungen gleichfalls einfach durchzuführen sind. Aus diesen Gründen werden *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* häufig als Wirtsorganismen zur Produktion von Lipasen verwendet. PCL ATCC 21808 wurde sowohl in *Bacillus subtilis* (Hom und Mielenz 1991), *E. coli* (Quyen *et al.* 1999), *Pseudomonas* (Hom *et al.* 1991) und *Staphylococcus lividans* (Nakanishi *et al.* 1989; Jorgensen *et al.* 1991; Nakanishi *et al.* 1991) exprimiert.

Die Expression von *Pseudomonas* Lipasen der Klassen I und II wird durch den Bedarf an Helferprotein eingeschränkt. Quyen und Mitarbeiter (Quyen *et al.* 1999) entwickelten eine Methode, die es erstmalig ermöglichte, durch eine effektive Prozedur die Umfaltung von inaktiven Einschlußkörpern in aktive Lipase zu erreichen und *Pseudomonas cepacia* Lipase in großen Mengen zu gewinnen.

PCL ATCC 21808 ist aus 320 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von 33 kDa. Die kommerziell erhältliche PCL (Amano P oder Amano PS) ist vermutlich kein rekombinantes Enzym.

1.1.9 *CANDIDA RUGOSA* LIPASE, CRL

CRL besteht aus 524 Aminosäuren und gehört zu den am besten untersuchten Lipasen. So ist ihre Kristallstruktur schon seit langem bekannt (Grochulski *et al.* 1993; Grochulski *et al.* 1994). Von CRL wurden fünf verschiedene Isoenzyme kloniert (Lotti *et al.* 1993), die jedoch alle ähnliche Molekulargewichte aufweisen. Aufgrund eines unüblichen Codons für das Serin des aktiven Zentrums, war es lange Zeit nicht möglich, CRL rekombinant herzustellen. Erst kürzlich gelang Brocca und Mitarbeitern die Synthese des Gens der CRL (Brocca *et al.* 1998). Auffällig ist ihr selbst für Lipasen breites Substratspektrum und ihre Fähigkeit zur Umsetzung ungewöhnlicher Substrate (einen Überblick geben Bornscheuer und Kazlauskas (Bornscheuer und Kazlauskas 1999)).

1.1.10 *CANDIDA ANTARCTICA* LIPASE B

CAL B besitzt ein Molekulargewicht von 33 kDa. Kommerziell erhältliche Formulierungen enthalten zwischen 16 und 51 Gew-% Protein (Weber *et al.* 1995). Die Lipase ist ein rekombinantes Protein, das in *Aspergillus* exprimiert werden konnte (Hoegh *et al.* 1995). CAL B zeigt keine oder nur geringe Grenzflächenaktivierung und spaltet langkettige Triacylglyceride nur sehr langsam. Ihre Eigenschaften ähneln deshalb mehr denen einer Esterase. Sie findet Verwendung als vielseitig einsetzbarer Katalysator in der organischen Synthese (Bornscheuer und Kazlauskas 1999).

1.2 SUBSTRATE

1.2.1 TRIACYLGLYCERIDE UND TRIACYLGLYCERID ANALOGA

Lipasen katalysieren in der Natur die hydrolytische Spaltung von Triacylglyceriden. Dabei entstehen Di- und Monoglyceride sowie Glycerin und freie Fettsäuren. Die Fettmoleküle besitzen drei Esterbindungen, wobei die beiden äußeren Ester primärer Alkohole (*sn*-1 bzw. *sn*-3), die mittlere den Ester eines sekundären Alkohols (*sn*-2) darstellen (Abbildung 7). Sind die Reste an *sn*-1 und *sn*-3 identisch, so ist das Triacylglycerid prochiral. *sn* ist demnach die "stereospezifische Numerierung".

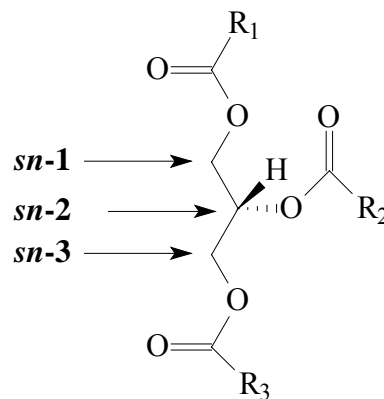
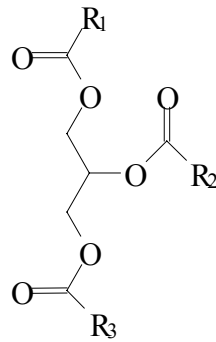


Abbildung 7: Strukturformel eines Triacylglycerids und stereospezifische Numerierung der an das Glycerid gebundenen Substituenten.

1.2.2 STRUKTURIERTE TRIACYLGLYCERIDE

Strukturierte Triacylglyceride sind Triacylglyceride, in denen entweder die veresterte Fettsäure oder die Position der Fettsäuren modifiziert wurden. Die in dieser Arbeit verwendete OPO-Fraktion (1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerid) wurde von Schmid und Mitarbeitern synthetisiert und für die Untersuchung der *sn*-2 Regioselektivität von Lipasen zur Verfügung gestellt (Schmid *et al.* 1999). Das für die Untersuchungen mit CRL verwendete POP (1,3-Dipalmitoyl-2-oleoylglycerid) wurde von Sigma erhalten. Abbildung 8 zeigt die Strukturformeln von OPO und POP:



OPO	POP
R₁ = C17:1	R₁ = C15:0
R₂ = C15:0	R₂ = C17:1
R₃ = C17:1	R₃ = C15:0

Abbildung 8: Die Strukturformeln von OPO (1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerid) und POP (1,3-Dipalmitoyl-2-oleoylglycerid).

1.2.3 WEITERE VON LIPASEN UMGESetzte SUBSTRATE

Lipasen sind in der Lage, neben ihren natürlichen Substraten, den Triacylglyceriden, weitere Biotransformationen zu katalysieren. Darunter fallen die Hydrolyse von Estern und die Veresterung von primären und sekundären Alkoholen sowie von Lactonen (Bornscheuer und Kazlauskas 1999).

Primäre Alkohole

Lipasen zeigen im allgemeinen geringere Enantioselektivität bei der Umsetzung von primären als von sekundären Alkoholen. Ihre Enantioselektivität ist bis heute nicht verstanden und in hohem Maße empirisch (siehe auch Kapitel 1.3.4). Untersuchungen zu den molekularen Ursachen der Enantioselektivität von PCL bei der Umsetzung primärer Alkoholsubstrate waren Teil dieser Arbeit.

Sekundäre Alkohole

Sekundäre Alkohole und ihre Derivate sind die am häufigsten von Lipasen umgesetzten Substrate. Die in diesem Zusammenhang am intensivsten untersuchten Lipasen sind CAL B, CRL, PPL, PCL und RML. Zur Beschreibung ihrer Enantiopräferenz existiert eine empirische Regel, die allein auf dem Größenunterschied der Liganden am Stereozentrum basiert (siehe auch Kapitel 1.3.3; Kazlauskas *et al.* 1991).

Lactone

Lactone sind wichtige Aromastoffe und Synthesezwischenstufen. Lipasen finden Verwendung bei der Synthese enantiomerenreiner Lactone entweder durch direkte Reaktion an der Lactonbindung oder indirekt durch Reaktionen, die letztendlich zum enantiomerenreinen Lacton führen. Weitere Anwendung von Lipasen ist die selektive Bildung von Makroliden und Dioliden aus Hydroxysäuren (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Intensive Untersuchungen wurden mit PPL und PCL (PSP_L) durchgeführt.

1.3 REGIO- UND STEREOSELEKTIVITÄT VON LIPASEN IN DER HYDROLYSE VON TRIACYLGLYCERIDEN UND ANALOGA

Bei chemischen Reaktionen von Lipasen mit Triacylglyceriden und Analoga unterscheidet man drei Selektivitätstypen:

- 1) *Fettsäureselektivität*: Lipasen besitzen unterschiedliche Präferenzen für die Umsetzung von Substraten mit langen und kurzen sowie gesättigten und ungesättigten (*cis/trans*) Fettsäuren.
- 2) *Regioselektivität*: Bei der Lipase-katalysierten Hydrolyse eines Triacylglycerids steht die Spaltung der Ester primärer Alkohole (Position *sn-1* bzw. *sn-3*) in Konkurrenz mit der Umsetzung des Esters eines sekundären Alkohols in *sn-2* Position.
- 3) *Stereoselektivität*: Die Hydrolyse erfolgt entweder an *sn-1* oder *sn-3*. Die entstehenden Produkte sind Stereoisomere. Man unterscheidet die Untertypen Diastereoselektivität und Enantioselektivität.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen zur Selektivität von mikrobiellen Lipasen beschränkten sich auf die Regio- und Stereoselektivität.

1.3.1 REGIOSELEKTIVITÄT

Die meisten der bekannten Lipasen weisen ausgeprägte *sn-1(3)* Regioselektivität auf, d.h. Esterspaltung erfolgt entweder an *sn-1* oder *sn-3*, kaum jedoch an *sn-2*. ROL besitzt mit 100 % Hydrolyse in *sn-1* bzw. *sn-3* die am stärksten ausgeprägte *sn-1(3)* Regioselektivität. Dagegen fanden Rogalska und Mitarbeiter für CAL A, CRL und GCL zusätzlich die Spaltung von Triacylglyceriden in Position *sn-2* (Rogalska *et al.* 1993).

Riaublanc *et al.* untersuchten die Fettspaltung durch Katalyse mit *Candida parapsilosis* Lipase in wässrigem Medium (Riaublanc *et al.* 1993). Dabei postulierten sie neben der Reaktion in *sn*-1(3) auch Hydrolyse in *sn*-2. Weitere Informationen zur Triacylglyceridspaltung in *sn*-2 finden sich bei Jensen und Mitarbeitern (Jensen *et al.* 1990). Briand *et al.* untersuchten die Hydrolyse von Triolein durch *Candida parapsilosis* Lipase (Briand *et al.* 1995). Dabei wurde offenkundig, daß die vordergründig von Riaublanc *et al.* gefundene *sn*-2 Regioselektivität der Lipase im Grunde auf eine nicht-selektive Hydrolyse gefolgt von einer Acylwanderung von *sn*-2 nach *sn*-1(3) zurückgeht. Rogalska und Mitarbeiter schlossen Acylwanderung für ihre Untersuchungen unter den gewählten Reaktionsbedingungen zwar aus (Rogalska *et al.* 1993), doch blieb die Datenlage weiter widersprüchlich. Um den Konflikt zwischen *sn*-2 Regioselektivität und Acylwanderung zu entschärfen, wurde in der vorliegenden Arbeit die *sn*-2 Regioselektivität für CAL B, CRL, PCL und ROL mit *molecular modeling* Techniken untersucht und für CAL A, CRL und RDL experimentell verifiziert.

1.3.2 STEREOSELEKTIVITÄT

Die Stereochemie befaßt sich mit der dreidimensionalen Struktur von Molekülen (griech.: *stereos* - starr). Stereoisomere besitzen die selbe Konstitution¹, unterscheiden sich jedoch in der räumlichen Anordnung ihrer Atome. Man unterscheidet in der Regel drei Arten der Stereoisomerie:

- 1) *Konfigurations-, Spiegelbild- oder optische Isomerie* (z.B. *R* vs. *S*)²
- 2) *cis-trans-Isomerie*
- 3) *Konformations-, Rotationsisomerie* (z.B. ekliptisch vs. gestaffelt)³

Zu den Spiegelbildisomeren gehören Diastereomere und Enantiomere. Diastereomerie liegt dann vor, wenn in einer Verbindung mit zwei chiralen⁴ Gruppen sich nur Teile des Moleküls wie Bild und Spiegelbild zueinander verhalten, die anderen Bereiche jedoch identische Raumstruktur aufweisen. Sind in einer solchen Verbindung nicht nur einzelne Gruppen

¹ Konstitution bezeichnet die eindeutige und für jede chemische Verbindung charakteristische Anordnung von Atomen, Gruppen und Bindungen in einem Molekül, ohne Rücksichtnahme auf deren Ausrichtung im Raum.

² Konfigurationsisomere lassen sich durch Rotation nicht ineinander überführen.

³ Konformationsisomere lassen sich durch Rotation ineinander überführen.

⁴ Chiralität von *cheir* (griech. Hand) abgeleitete Eigenschaft eines Objektes, sich von seinem Spiegelbild zu unterscheiden.

sondern das ganze Molekül spiegelbildlich zueinander angeordnet, so spricht man von Enantiomeren. Enantiomere Verbindungen verhalten sich demnach zueinander wie Bild und Spiegelbild (griech.: *enantion* - Gegenteil).

Stereo- bzw. Enantiopräferenz der in dieser Arbeit untersuchten Lipase-katalysierten Biotransformationen geben Aufschluß über den bevorzugt umgesetzten Antipoden. Stereo- bzw. Enantioselektivität hingegen sind ein Maß für die Fähigkeit eines Enzyms, zwischen zwei Stereoisomeren bzw. Enantiomeren zu unterscheiden. Die Enantioselektivität E läßt sich experimentell durch eine der drei unten stehenden Gleichungen berechnen, wenn zwei der drei Variablen, Enantiomerenüberschuß des Produkts, ee_P , Enantiomerenüberschuß des Substrats, ee_S , und Umsatz, c , bestimmt wurden (Chen *et al.* 1982; Chen *et al.* 1987):

$$E = \frac{\ln [1 - c(1 + ee_P)]}{\ln [1 - c(1 - ee_P)]} \quad E = \frac{\ln [(1 - c)(1 - ee_S)]}{\ln [(1 - c)(1 + ee_S)]} \quad E = \frac{\ln \left[\frac{1 - ee_S}{1 + \frac{ee_S}{ee_P}} \right]}{\ln \left[\frac{1 + ee_S}{1 + \frac{ee_S}{ee_P}} \right]}$$

Der Umsatz errechnet sich wie folgt:

$$c [\%] = \frac{ee_S}{ee_S + ee_P} * 100$$

Im Gegensatz zu Lipasen setzen andere Hydrolasen (Proteasen, Phospholipasen, Glucosidasen, Nucleasen) unter physiologischen Bedingungen nur einen optischen Antipoden ihrer Substrate um. Lipasen hingegen reagieren in den meisten Fällen mit beiden chiralen Formen, genauso wie mit prochiralen Substraten, jedoch mit unterschiedlicher Stereo- bzw. Enantioselektivität (Rogalska *et al.* 1993). Untersuchungen zur stereoselektiven Hydrolyse von chiralen und prochiralen Triacylglyceriden und Analoga wurden u.a. von Stadler *et al.* und Rogalska *et al.* durchgeführt (Rogalska *et al.* 1993; Stadler *et al.* 1995).

Abbildung 9 stellt die *sn*-1(3) regioselektive Hydrolyse eines Triacylglycerids dar, die zu unterschiedlichen Stereoisomeren führt. Bei der Hydrolyse der *sn*-1 bzw. *sn*-3 Kette an C2 (2) entstehen unterschiedliche Konformationen für die Diacylglyceride. So entsteht durch Hydrolyse der *sn*-1 Fettsäure das (*R*)-, bei Hydrolyse an *sn*-3 das (*S*)-Konfigurationsisomer.

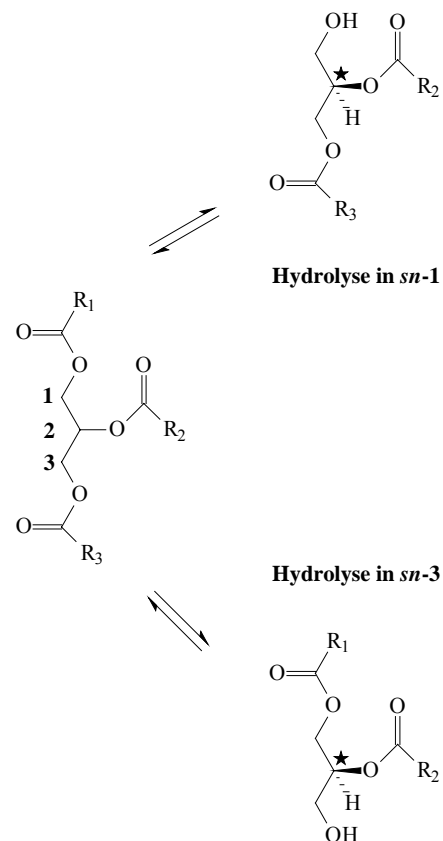


Abbildung 9: Stereoselektive Hydrolyse eines prochiralen Triacylglycerids ($R_1 = R_2$) zum chiralen 2,3(1,2)-Diacylglycerid durch eine *sn*-1(3) regioselektive Lipase. Erfolgt die Esterspaltung in *sn*-1, entsteht am C1 (**1**) des Glycerids ein primärer Alkohol und damit an C2 (**2**) ein Stereozentrum (\star). Findet die Hydrolyse in *sn*-3 statt, entsteht der primäre Alkohol an C3 (**3**) und das Stereozentrum gleichfalls an C2 (**2**).

Ursachen der und Einflüsse auf die Stereoselektivität von Lipasen

Lipasen sind in der Lage, ein breites Substratspektrum mit unterschiedlich ausgeprägter Stereopräferenz und -selektivität umzusetzen. Dabei spielen drei Faktoren eine entscheidende Rolle:

- 1) *Einflüsse des Enzyms*. Die Größe und Gestalt der Substratbindungstasche der Lipase bestimmt in vielen Fällen entscheidend die Stereopräferenz, d.h. welches Stereoisomer eines Substrats bevorzugt gespalten wird. Dies gilt nur in eingeschränkter Form für sekundäre Alkoholsubstrate (siehe Kapitel 1.3.3), in jedem Fall jedoch für Triacylglyceride und Analoga. Pleiss und Mitarbeiter führten eine umfassende Studie der Form und Charakteristika unterschiedlicher Lipasen durch (Pleiss *et al.* 1998).
- 2) *Einflüsse des Substrats*. Der Einfluß des Substrats auf die Stereoselektivität ist mannigfaltig. So beeinflussen die Kettenlänge, die chemische Natur des veresterten

Alkohols, der Grad an Unsättigung sowie bei Triacylglyceriden und deren Analoga die chemische Struktur des *sn*-2 Substituenten die Stereoselektivität (Kazlauskas und Bornscheuer 1998).

- 3) *Äußere Einflüsse*. Äußere Einflüsse auf die Stereopräferenz und -selektivität sind vor allem die Reaktionstemperatur sowie die Polarität des Lösungsmittels (Bornscheuer und Kazlauskas 1999).

1.3.3 MODELL FÜR SEKUNDÄRE ALKOHOLE

Die enantioselektive Umsetzung von sekundären Alkoholsubstraten durch Lipasen gehört zu den am besten untersuchten und verstandenen Reaktionen. Kazlauskas *et al.* etablierten eine allgemeingültige empirische Regel, mit der es möglich ist, das bevorzugt umgesetzte Enantiomer eines sekundären Alkoholsubstrats bei der Hydrolyse respektive Veresterung vorherzusagen (Kazlauskas *et al.* 1991). Diese Regel wurde durch die experimentellen Ergebnisse weiterer Lipase-katalysierter Biotransformationen von sekundären Alkoholsubstraten bestätigt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Modell und Messungen zur Stützung des Modells zur Vorhersage der Enantiopräferenz von Lipasen bei der Umsetzung von sekundären Alkoholen und deren Derivaten, basierend auf der Größe der Substituenten am Stereozentrum (siehe auch Abbildung 10).

Lipase	Referenz	Bemerkungen
CAL B	(Orrenius <i>et al.</i> 1995)	8 Substrate
CRL	(Kazlauskas <i>et al.</i> 1991)	86 Substrate gültig für cyclische, nicht aber acyclische Substrate
PAL	(Kim und Cho 1992)	28 Substrate
PCL	(Laumen 1987)	auch primäre Alkoholsubstrate
PCL	(Xie <i>et al.</i> 1990)	6 Substrate
PCL	(Kazlauskas <i>et al.</i> 1991)	64 Substrate
PFL	(Burgess und Jennings 1991)	31 Substrate
PFL	(Naemura <i>et al.</i> 1993; Naemura <i>et al.</i> 1995)	27 Substrate
PPL	(Janssen <i>et al.</i> 1991)	23 Substrate
PPL	(Lutz <i>et al.</i> 1992)	21 Substrate
RML	(Roberts 1989)	6 Substrate
Lipase QL	(Naemura <i>et al.</i> 1996)	27 Substrate

Das Modell basiert auf der Größe der Substituenten am Stereozentrum und postuliert die Vorhersagbarkeit der Enantioselektivität allein aufgrund des Größenunterschiedes der Substituenten. Tatsächlich ist es einer Reihe von Wissenschaftlern gelungen, die Enantioselektivität durch Variation der Substituentengröße zu modifizieren (Kazlauskas *et al.* 1991; Gupta und Kazlauskas 1993; Rotticci *et al.* 1997). Abbildung 10 zeigt die Orientierung des bevorzugt umgesetzten Enantiomers (nach Kazlauskas *et al.* (Kazlauskas *et al.* 1991)):

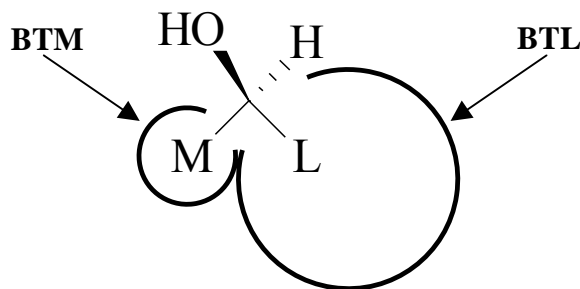


Abbildung 10: Empirische Regel zur Vorhersage des bevorzugt umgesetzten Enantiomers eines sekundären Alkoholsubstrats bei der Lipase-katalysierten Umsetzung. **M** ist ein Substituent mittlerer Größe, z.B. Methyl, der an die BTM (Bindungstasche für den mittelgroßen Substituenten) bindet. **L** ist ein großer Substituent, z.B. Phenyl, der an die BTL (Bindungstasche für den großen Substituenten) bindet. In Hydrolysereaktionen stellt das dargestellte Enantiomer das bevorzugt gespaltene Substrat dar.

1.3.4 MODELL FÜR PRIMÄRE ALKOHOLE

Weissfloch und Kazlauskas postulierten eine Regel, die, analog zur Regel für sekundäre Alkohole, die Enantioselektivität von PCL für primäre Alkoholsubstrate beschreibt (Weissfloch und Kazlauskas 1995). Grundsätzlich beruht diese Regel gleichfalls auf der Größe der Substituenten am Stereozentrum. Jedoch unterscheidet sich die Enantiopräferenz für sekundäre von der für primäre Alkoholsubstrate (Abbildung 11). Die Hydroxylgruppe des sekundären Alkoholderivats zeigt demnach in die der Hydroxymethylgruppe des primären Alkohols entgegengesetzte Richtung. Weissfloch und Kazlauskas führten dies auf einen Knick zurück, dem sich die Methylengruppe bei der Bindung des primären Alkoholsubstrats an die Lipase unterwerfen muß, soll eine katalytisch aktive Bindung erreicht werden. In diesem Fall binden **M** und **L** in die selben Bindungstaschenbereiche wie bei der Umsetzung von sekundären Alkoholsubstraten (Abbildung 11, mitte). Die Autoren postulierten noch einen zweiten Bindungsmodus für primäre Alkoholsubstrate, der von ihnen jedoch als nicht wahrscheinlich interpretiert wurde. Hierbei binden **M** und **L** in die Bindungstasche für den großen Substituenten, während die Bindungstasche für den Substituenten mittlerer Größe von einem Wasserstoff der Methylengruppe besetzt wird. Dieser Bindungsmodus hat den Vorteil, daß der Knick in Modus 1 vermieden wird. Neue *molecular modeling* Studien zeigen jedoch, daß die Alkoholsubstituenten in primären und sekundären Alkoholsubstraten nicht in den selben Bindungstaschenbereich binden (Tuomi und Kazlauskas 1999).

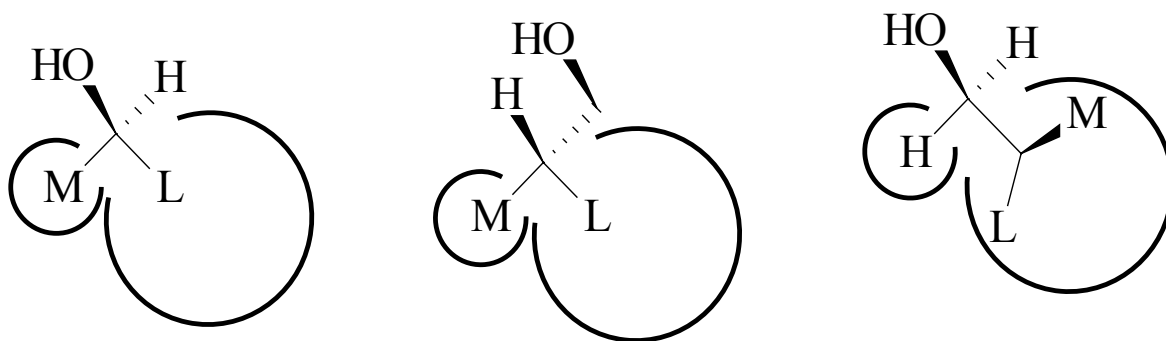


Abbildung 11: Die empirischen Regeln für die Enantiopräferenz von PCL für sekundäre (links) und primäre (mitte und rechts) Alkohole. **Links:** Enantiomer des bevorzugt umgesetzten sekundären Alkoholsubstrats in dem von Kazlauskas *et al.* postulierten Bindungsmodus (nach Kazlauskas *et al.* (Kazlauskas *et al.* 1991)). **Mitte:** Enantiomer des bevorzugt umgesetzten primären Alkoholsubstrats in dem von Weissfloch und Kazlauskas sowie von Tuomi und Mitarbeitern postulierten Bindungsmodus (Hypothese 1) (Weissfloch und Kazlauskas 1995; Tuomi und Kazlauskas 1999). **Rechts:** Enantiomer des bevorzugt umgesetzten primären Alkoholsubstrats in alternativem Bindungsmodus (Hypothese 2) (Weissfloch und Kazlauskas 1995). Die Regel für primäre Alkoholsubstrate besitzt keine Gültigkeit, wenn ein Sauerstoffatom direkt benachbart zum Stereozentrum lokalisiert ist (nach Weissfloch und Kazlauskas (Weissfloch und Kazlauskas 1995)).

Nachteile dieser Regel sind, daß sie lediglich für PCL aufgestellt wurde und nur für primäre Alkoholsubstrate gilt, die kein Sauerstoffatom direkt benachbart zum Stereozentrum besitzen. Die restlichen untersuchten primären Alkoholsubstrate sind in 89% der Fälle korrekt durch die Regel beschrieben (in 54 von 61 Fällen). Zudem ist eine Änderung der Enantioselektivität durch die Änderung der Größe der Substituenten analog der sekundären Alkoholsubstrate nicht möglich.

1.3.5 MODELL FÜR TRIACYLGLYCERIDE UND ANALOGA

Eine Übertragung der erweiterten empirischen Regel von Weissfloch und Kazlauskas (Weissfloch und Kazlauskas 1995) auf Triacylglyceride war bislang nicht möglich, obwohl Triacylglyceride strukturell Ester primärer Alkohole darstellen. Jedoch besitzen Triacylglyceride und Analoga ein Sauerstoffatom am Stereozentrum.

1.3.6 EXPERIMENTELLE BEFUNDE ZUR STEREOSELEKTIVITÄT VON LIPASEN IN DER HYDROLYSE VON TRIACYLGLYCERIDEN UND ANALOGA

Experimentelle Untersuchungen ergaben einerseits, daß unterschiedliche Lipasen das gleiche Triacylglycerid (Trioctanoin bzw. Triolein) mit unterschiedlicher Stereoselektivität und -präferenz hydrolysieren (Rogalska *et al.* 1993). Andererseits ist der *sn*-2 Substituent eines Triacylglycerids entscheidend an der korrekten Positionierung des Substrats in die Bindungstasche beteiligt (Stadler *et al.* 1995). Stadler und Mitarbeiter untersuchten die Stereoselektivität mikrobieller Lipasen (CRL, CVL, PSpL, RAL) bei der Hydrolyse von Triacylglycerid Analoga, die an Position *sn*-2 unterschiedliche chemische Struktur aufwiesen. Die ausgewählten Triacylglycerid Analoga besaßen in *sn*-2 eine Ether-, Ester-, Amid- bzw. Phenylgruppe (siehe Kapitel 3.5.2). Hydrophobizität und sterischer Anspruch der *sn*-2 Substituenten wurde durch Modifikation der funktionellen Gruppe, die dem prochiralen C2 des Glycerids direkt benachbart ist, sowie die Länge und den Grad der Unsatigung der Fettsäuren variiert. Stadler *et al.* fanden, daß nur geringe strukturelle Änderungen am *sn*-2 Substituenten die Stereoselektivität und -präferenz von Lipasen signifikant beeinflussen können, wohingegen bei den untersuchten Lipasen die Kettenlänge der Fettsäuren in *sn*-1(3) eine nur untergeordnete Rolle spielt. Die Autoren postulierten den Einfluß verschiedener Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat, die polare, hydrophobe und sterische Einflüsse berücksichtigen sollten (Stadler *et al.* 1995). Weitergehende Studien ergaben, daß die chemische Natur der *sn*-1(3) Substituenten nur einen geringen Effekt auf Stereoselektivität hat (Stadler *et al.* 1995; Kovac *et al.* 1996).

1.3.7 BINDUNG VON TRIACYLGLYCERIDEN UND ANALOGA AN ROL

Holzwarth *et al.* postulierten, daß ein Triacylglycerid bzw. Analogon nicht nur in zwei sogenannten Orientierungen (*sn*-1 bzw. *sn*-3), sondern zusätzlich in zwei Bindungsmodi (*sn*-2 down bzw. *sn*-2 up) an eine Lipase binden können (Holzwarth *et al.* 1997). Untersuchungen der Bindungstaschencharakteristika der ROL lieferten zwei charakteristische Bindungsbereiche, an die hydrophobe Fettsäureketten binden können. Diese Informationen in Verbindung mit der Kenntnis des Katalysemechanismus (siehe Kapitel 1.1.3) ergaben für ROL, daß die Bindung der hydrolysierten *sn*-1(3) Fettsäure an den sogenannten *hydrophobic crevice* erfolgt. Wird die *sn*-1 Fettsäure abgespalten, bindet das Molekül in *sn*-1 Orientierung, bei Hydrolyse des *sn*-3 Fettsäureesters bindet das Substrat in *sn*-3 Orientierung. Der kleinere

und weniger tiefe *hydrophobic dent* bindet den *sn-2* Substituenten im sogenannten *sn-2 down* Bindungsmodus, in *sn-2 up* die nicht-hydrolysierte *sn-3(1)* Fettsäurekette. Abbildung 12 zeigt die vier Möglichkeiten der Bindung eines Triacylglycerids bzw. Analogons an eine *sn-1(3)* regioselektive Lipase (Holzwarth *et al.* 1997).

Holzwarth und Mitarbeiter postulierten, daß die Bindung im *sn-2 down* Modus der konventionellen Substratbindung entspricht, während die Bindung in *sn-2 up* dann auftritt, wenn ein sterisch anspruchsvoller Substituent an die *sn-2* Position substituiert ist (Holzwarth *et al.* 1997).

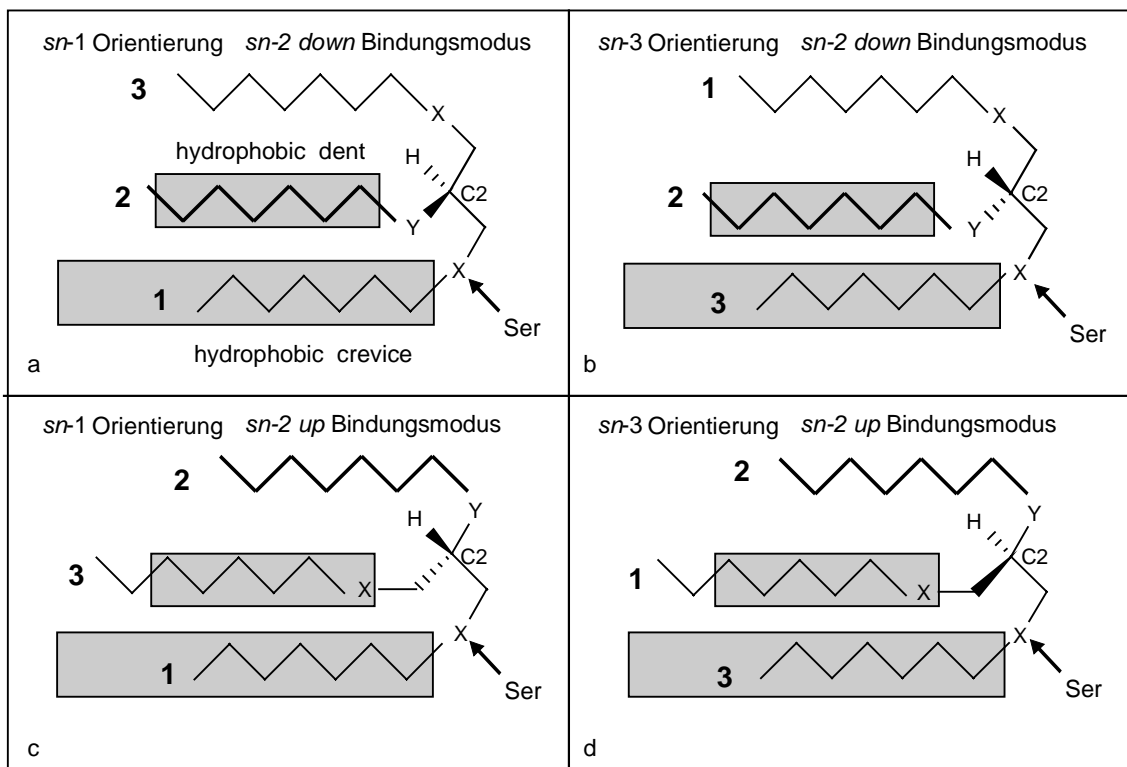


Abbildung 12: Die vier postulierten Möglichkeiten der Bindung eines Triacylglycerids bzw. Analogons an eine *sn-1(3)* regioselektive Lipase. Es existieren je zwei Orientierungen (*sn-1* bzw. *sn-3*) und Bindungsmodi (*sn-2 down* bzw. *sn-2 up*). In der linken Spalte (**a** und **c**) bindet die *sn-1* Fettsäurekette an den *hydrophobic crevice* (*sn-1* Orientierung), in der rechten Spalte (**b** und **d**) die *sn-3* Fettsäurekette (*sn-3* Orientierung). In der oberen Reihe (**a** und **b**) bindet der *sn-2* Substituent an den *hydrophobic dent* (*sn-2 down*), in der unteren Reihe (**c** und **d**) die nicht-hydrolysierte *sn-3(1)* Fettsäurekette (*sn-2 up*). X: OC(O) Estergruppe, Y: funktionelle Gruppe am *sn-2* Substituenten.

1.4 PROTEIN ENGINEERING

Enzyme sind in ihrer Effizienz und Präzision den konventionellen Katalysatoren weit überlegen. Dennoch sind natürlich vorkommende Enzyme für den kommerziellen Einsatz nur in Ausnahmefällen geeignet, da sie die für die jeweilige Anwendung wichtigen Kriterien zumeist nur unvollständig erfüllen. Aus diesem Manko erwuchs der Wunsch nach speziellen

Biokatalysatoren, deren Eigenschaften optimal an die jeweilige Reaktion angepaßt sind. Um dieses Ziel zu erreichen, stehen zwei prinzipiell unterschiedliche Ansätze zur Verfügung: evolutive Methoden und rationales Proteindesign.

Die resultierenden veränderten Enzyme besitzen beispielsweise modifizierte Aktivität und Substratspezifität, erhöhte Thermostabilität, verbesserte Stabilität gegenüber alkalischen oder sauren Medien und chemischen Einflüssen wie z.B. Oxidationsmitteln oder dem Abbau durch Proteasen (Frenken *et al.* 1993; Bott *et al.* 1994). Zudem wurden gezielt Mutationen in die Gene von Enzymen eingeführt, um die für die katalytische Aktivität essentiellen Aminosäuren zu identifizieren (z.B. für ROL: Beer *et al.* (Beer *et al.* 1996), für PCL: Quyen *et al.* (Quyen *et al.* 1999)).

Strategien

Evolutives Proteindesign bietet durch ungerichteten Einbau von Mutationen in das entsprechende Gen die Möglichkeit, in kurzer Zeit eine Vielzahl an Mutanten zu erhalten. Diese werden dann mit Hilfe spezifischer Assays auf verbesserte Eigenschaften getestet und nur im Fall eines positiven Assaysignals charakterisiert.

Die Methode des rationalen Proteindesigns setzt eine eingehende Kenntnis der Struktur-Funktions-Beziehungen im Protein voraus. Dazu notwendig ist entweder eine experimentell durch Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Techniken ermittelte 3D-Struktur oder ein theoretisches Strukturmodell, das auf der Aminosäuresequenz basiert. Davon ausgehend werden mögliche und vielversprechende potentielle Mutageneseorte identifiziert und die Mutationen ortsgerichtet in das Gen eingeführt. Schließlich werden die Mutanten auf verbesserte Eigenschaften untersucht.

Um gezielt Mutationen in ein Gen einzuführen, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die ersten entwickelten Verfahren beschränkten sich auf die Manipulation in der Umgebung von Restriktionsschnittstellen. Durch Schneiden an solchen Stellen, Auffüllen der überhängenden Enden und Religieren können Insertionen, d.h. zusätzliche Nucleotide, eingeführt werden. Das Schneiden an zwei benachbarten Stellen und Religieren führt zu Deletionen, d.h. dem Herausschneiden von Nucleotiden aus der DNA-Sequenz. Die zielgerichtete Mutagenese unter Verwendung synthetischer Oligonucleotide wurde von Dalbadie-McFarland und Mitarbeitern etabliert, wobei die synthetischen Oligonucleotide an das zu mutierende Gen hybridisiert wurden und der Gegenstrang im Anschluß von Phagen synthetisiert wurde (Dalbadie-McFarland *et al.* 1982). Diese Methode wurde von Hemsley *et al.* zur *in vitro* Mutagenese unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

weiterentwickelt, der heute am verbreitetsten Methode zur Einführung von gezielten Mutationen (Hemsley *et al.* 1989). Die Einführung von Mutationen nach dieser Methode (Punktmutation, Deletion bzw. Insertion) erfordert spezielle Oligonucleotide, die Träger der gewünschten Modifikation sind, ansonsten jedoch in ihrer Sequenz mit dem Wildtyp übereinstimmen. Optional können noch charakteristische Restriktionsschnittstellen eingebaut werden, die eine schnelle, einfache und billige Überprüfung der Mutagenese erlauben. Diese kurzen Sequenzfragmente dienen dann als Primer in einer enzymatischen Synthesekette (PCR), in der das zu mutierende Plasmid als Vorlage dient. Nach Abschluß der QuikChange PCR wird das parentale Plasmid durch enzymatischen *DpnI*-Verdau abgebaut. Damit wird gewährleistet, daß lediglich die Mutation tragende DNA transformiert wird. Das Vorhandensein der Mutation in den Transformanden wird entweder qualitativ mit Hilfe der charakteristischen neu eingeführten Restriktionsschnittstellen oder durch Sequenzierung der Plasmid-DNA überprüft.

2. ZIELSETZUNG

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung mehrerer theoretischer Modelle zum molekularen Verständnis der Stereo- bzw. Enantioselektivität von mikrobiellen Lipasen bei der hydrolytischen Esterspaltung von:

- 1) Triacylglyceriden und deren in Position *sn*-2 modifizierten Analoga
- 2) weiteren primären Alkoholsubstraten
- 3) γ - und δ -Lactonen

mit dem Ziel, Vorhersagen treffen und gezielt Modifikationen an Lipase und/oder Substrat vorschlagen zu können, die die Stereo- bzw. Enantiopräferenz deutlich beeinflussen.

Ausgehend von der Lipase aus *Rhizopus oryzae* sollten die Wechselwirkungen zwischen Lipase und Triacylglyceriden bzw. deren Analoga mittels molekulardynamischer Simulationen untersucht und analysiert werden. In Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen Spener, Münster, und Paltauf, Graz, sollten gezielt Mutationen in das Gen der *Rhizopus oryzae* Lipase eingeführt werden, die zu modifizierter Stereoselektivität bzw. -präferenz führen und mit deren Hilfe die Gültigkeit des Computermodells überprüft werden sollte.

Im nächst folgenden Schritt sollte das bestehende Modell dann für weitere mikrobielle Lipasen aus *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa* sowie die Lipase B aus *Candida antarctica* erweitert werden. Dazu gehörte neben den *molecular modeling* Studien die gezielte Veränderung der Stereoselektivität von *Pseudomonas cepacia* Lipase durch positionsgerichtete Mutagenese.

In der zweiten Phase sollte die Enantioselektivität von *Pseudomonas cepacia* Lipase bei der Umsetzung von Estern anderer primärer Alkohole untersucht werden. Die hierfür notwendigen experimentellen Daten wurden der Literatur entnommen. Dabei sollten sich die *molecular modeling* Untersuchungen auf zwei Klassen von Substraten beschränken:

- 1) primäre Alkoholsubstrate, die sich von den Triacylglyceriden unterscheiden, jedoch untereinander strukturell verwandt sind und signifikant unterschiedliche Enantioselektivitäten und -präferenzen aufweisen
- 2) geschützte Triacylglyceride, die an *sn*-3(1) und *sn*-2 Position mit unterschiedlichen Schutzgruppen verestert worden waren.

Das Ziel dieses Arbeitsabschnitts war, wie für Triacylglyceride und Analoga, die molekularen Ursachen der Enantioselektivität zu verstehen und zu beschreiben.

In der dritten Phase sollte die Enantioselektivität der *Pseudomonas cepacia* Lipase bei der Hydrolyse von γ - und δ -Lactonen molekulardynamisch untersucht werden. Die hierzu

benötigten experimentellen Daten wurden gleichfalls der Literatur entnommen. Die Lactone stellen einen Sonderfall sekundärer Alkoholsubstrate dar, da ihr Ringsystem für eine, von den weithin verbreiteten linearen sekundären Alkoholsubstraten, veränderte Enantioselektivität verantwortlich ist. Ziel dieses Arbeitsabschnittes war, die bislang noch nicht verstandenen molekularen Ursachen der Enantioselektivität von *Pseudomonas cepacia* Lipase bei der Spaltung von γ - und δ -Lactonen zu identifizieren und ein Modell zu entwickeln, mit dessen Hilfe die Enantioselektivität vorhergesagt werden kann.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 VERWENDETE HARDWARE

Silicon Graphics Workstation	Prozessor	Arbeitsspeicher
Indigo 2	MIPS-R10000	128 MB
Indy	MIPS-R4400	64 MB

3.2 VERWENDETE SOFTWARE UND ONLINE-DATENBANKEN

Verwendung	Programm	URL	Literatur
Proteinsequenzen	Swiss-Prot	http://expasy.hcuge.ch/srs5/	(Bairoch und Apweiler 1997; Bairoch und Apweiler 1999)
Proteinsequenz ROL	PIR	http://www.embl-heidelberg.de/srs5bin/cgi-bin/wgetz?-fun+pagelibinfo+-info+PIR	(Sidman <i>et al.</i> 1988)
Sequenzvergleich	dialign2	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/	(Morgenstern <i>et al.</i> 1996)
Proteinstrukturen	Protein Datenbank (PDB)	http://www.pdb.bnl.gov/pdb-bin/pdbmain	(Bernstein <i>et al.</i> 1977)
Visualisierung	insightII	http://www.biosym.com/	-
Bindungstaschenanalyse	GRID	-	(Goodford 1985)
Energieminimierung	sybyl6.4	http://www.tripos.com	-
Molekulardynamische Simulationen	sybyl6.4	http://www.tripos.com	-

3.3 LIPASESTRUKTUREN

3.3.1 EXPERIMENTELL BESTIMMTE LIPASESTRUKTUREN

Experimentell bestimmte Kristallstrukturen der offenen Konformation der Lipasen aus *Rhizomucor miehei* (4tgl (Derewenda *et al.* 1992; Derewenda *et al.* 1992)), *Pseudomonas cepacia* (2lip (Schrag *et al.* 1997)), *Candida rugosa* (1lpm (Cygler *et al.* 1994; Grochulski *et al.* 1994)) sowie der Lipase B aus *Candida antarctica* (1lbs (Uppenberg *et al.* 1995)) wurden aus der Protein Datenbank, PDB übernommen (Bernstein *et al.* 1977).

3.3.2 STRUKTURMODELL FÜR ROL

Liegen für ein Protein keine experimentellen Strukturdaten vor, kann ein Homologiemodell zu einem nahe verwandten Protein erstellt werden. Dabei werden die Aminosäuresequenzen der Proteine verglichen und bestmöglich überlagert (*sequence alignment*). Anschließend werden die Atomkoordinaten des Proteinrückgrats der Sequenzvorlage auf die Zielsequenz übertragen. Die Seitenketten werden ergänzt und in die vorhandenen "Lücken" eingepaßt. Abschließend wird das Gesamtsystem energetisch minimiert.

Für *Rhizopus* Lipase liegt keine experimentell bestimmte 3D-Struktur der Lipase mit geöffnetem *lid* vor. Allerdings konnte eine halb offene Struktur der RDL kristallisiert werden, bei der jedoch ausschließlich das Proteinrückgrat aufgelöst werden konnte (1tic (Derewenda *et al.* 1994)). Zudem liegen Strukturdaten der geschlossenen Konformation der RNL vor (1lgy (Kohno *et al.* 1996)). Für ROL konnte jedoch auf ein entsprechendes Strukturmodell von Gerd Wohlfahrt zurückgegriffen werden, das auf Basis der RML erstellt wurde (Beer *et al.* 1996).

3.4 CHARAKTERISIERUNG DER SUBSTRATBINDUNGSSTELLEN IN LIPASEN

Die in diesem Abschnitt abgehandelten Daten lagen zu Beginn der in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen vor und dienten zur Orientierung bei der Bindung der Substrate an die jeweilige Lipase sowie bei der Identifizierung und Beurteilung der Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat.

3.4.1 DIE KATALYTISCHE TRIADE

In allen Fällen war für die verwendeten Lipasen die Lage der Aminosäuren der katalytischen Triade in der Substrat-Bindungstasche bekannt (Tabelle 5) (Pleiss *et al.* 1999). So auch für ROL, für die eine Kristallstruktur der halb geöffneten (RDL) (Derewenda *et al.* 1994) bzw. geschlossenen Konformation der Lipase (RNL) vorlag (Kohno *et al.* 1996).

Tabelle 5: Die Aminosäuren der katalytischen Triade in den untersuchten mikrobiellen Lipasen

Lipase	Katalytische Triade		
ROL	S145	D204	H257
RML	S144	D203	H257
PCL	S87	D264	H286
CRL	S209	E341	H449
CAL B	S105	D187	H224

3.4.2 DAS OXYANION HOLE

Die bei der Umsetzung von Substraten durch Lipasen entstehende Zwischenstufe ist kovalent an das Nucleophil gebunden. Die negative Ladung wird dabei vom Serin der katalytischen Triade auf das Substrat übertragen und findet sich dort bevorzugt am Carboxyl-Sauerstoff (Oxyanion). Stabilisiert wird die negative Ladung durch Ausbildung von mindestens zwei H-Brücken Bindungen von Resten der Lipase zum Oxyanion hin. Diese Aminosäuren bilden das sogenannte *oxyanion hole* (Tabelle 6).

Tabelle 6: Die Aminosäuren des *oxyanion holes* in den untersuchten Lipasen.

Lipase	<i>oxyanion hole</i>	
ROL	T83	L146
RML	S82	L145
PCL	L17	Q88
CRL	G124	A210
CAL B	T40	Q106

3.4.3 IDENTIFIZIERUNG HYDROPHOBER UND HYDROPHILER BINDUNGSSTELLEN

Die Substratbindungsstellen der untersuchten Lipasen wurden mit verschiedenen Sonden der *GRID*-Software analysiert (Goodford 1985). Hierfür wurden die Methyl-, Wasser- sowie die *dry*-Sonde verwendet. Die Methylsonde entspricht einer CH_3 -Gruppe, die über die Proteinoberfläche geführt wird und zum Auffinden unpolarer Regionen dient. Die Wassersonde repräsentiert ein Wassermolekül, mit dessen Hilfe sich hydrophile Bindungsstellen auf der Proteinoberfläche identifizieren lassen. Die *dry*-Sonde besitzt ähnliche strukturelle Parameter wie die Wassersonde, jedoch mit umgekehrten Eigenschaften hinsichtlich Hydrophobizität und der Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Sie wird verwendet, um hydrophobe Bereiche auf der Proteinoberfläche aufzufinden. Die berechneten Oberflächen wurden in das *sybyl* Softwarepaket eingelesen und dienten als Vorlage für die manuelle Bindung der Substrate an die Lipase.

3.5 SUBSTRATBINDUNG IN DIE BINDUNGSTASCHE

3.5.1 ALLGEMEINE BEMERKUNGEN

Molecular modeling Untersuchungen zur Enantioselektivität von Lipasen bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden, deren Analoga, Lactonen und Estern primärer Alkohole wurden an Lipase-Substrat Komplexen durchgeführt, bei denen das Substrat kovalent an die Lipase gebunden ist. Jeder dieser Komplexe entsprach der ersten tetraedrischen Zwischenverbindung der Esterhydrolyse in Serin-Proteasen und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (siehe Kapitel 1.1.3). Die Positionierung des Substrats in der Bindungstasche der Lipase im Vorfeld von Energieminimierung und molekulardynamischer Simulation wurde durch mehrere Einflußgrößen bestimmt:

- 1) Die Lage der Aminosäuren der katalytischen Triade und des *oxyanion holes* bestimmen die Position des tetraedrischen Kohlenstoffs, des Oxyanions und des Estersauerstoffs O1, O2 bzw. O3.
- 2) Die Lage der hydrolysierten Fettsäurekette resultiert aus der Analyse der Substratbindungstasche unter Verwendung von *GRID* (*hydrophobic crevice*, Abbildung 12). Zusätzlich konnte für RML, CRL und CAL B aus der Lage eines Inhibitors auf die Ausrichtung der gespaltenen Fettsäurekette geschlossen werden.

- 3) Die Position des Alkoholrestes in der Substratbindungstasche ergab sich aus der individuellen Struktur und dem Verhältnis von hydrophoben zu hydrophilen Bereichen in der Alkoholbindungstasche.

3.5.2 STEREOSELEKTIVITÄT

Triacylglyceride und Analoga

Für die *molecular modeling* Untersuchungen wurden Trioctanoin sowie Analoga verwendet, die mit einer anderen als der Estergruppe in *sn*-2 Position an das C2 Atom des Glycerids binden. Die Auswahl der Substrate erfolgte dergestalt, daß zwei Substratklassen gebildet werden konnten, abhängig von der Größe und der chemischen Struktur der funktionellen Gruppe am C2 des Glycerids (Abbildung 13):

- 1) *Flexible* Substrate koppeln in *sn*-2 Position mit einer rotierbaren O'-C1' Ester- bzw. Etherbindung an das C2 des Glycerids.
- 2) *Starre* Substrate sind Triacylglycerid Analoga, die in Position *sn*-2 einen Substituenten mit einer Bindungsordnung größer eins besitzen: eine starre N'-C1' Amidbindung bzw. einen großen und rigiden Phenyl-Substituenten.

Es wurden Trioctanoin und drei (ROL vier) weitere Triacylglycerid Analoga an die Lipasen gebunden. Drei der untersuchten Substrate gehörten zur Gruppe der *flexiblen*, zwei zur Gruppe der *starren* Substrate. Abbildung 13 gibt einen Überblick über die chemische Struktur der *sn*-2 Substituenten, sowie deren Trivialnomenklatur. Die systematischen Namen der Substrate finden sich im Abkürzungsverzeichnis. Das Ether-Analogon (**1**) bindet über eine kleine und flexible O'-C1'-Alkylether-Bindung an das Glycerid. Das Ester-Analogon (**3**) besitzt die Flexibilität der O'-C1'-Einfachbindung, ist jedoch deutlich größer als der Alkylether-Substituent. Das Benzylether-Analogon (**2**) bindet einerseits über eine flexible O'-C1'-Etherbindung an das Glycerid, andererseits ist der aromatische Ring sterisch anspruchsvoll. Das Amid-Analogon (**4**) bindet über eine starre Amidbindung an das C2 des Glycerids. Die Raumerfüllung der Amidgruppe entspricht in etwa der der Estergruppe. Im Phenyl-Analogon (**5**) bindet der Aromat direkt an das C2 des Glycerids. Die benachbarte C1'-C2'-Bindung im *sn*-2 Substituenten ist demnach gleichfalls rigide. Die Planarität des Aromaten läßt sich unter den gegebenen Bedingungen nicht aufheben.

Dabei wurde der C8:0 *sn*-2 Ester (**3**) durch ein Ether- (**1**), Amid- (**4**), Phenyl- (**5**) und, im Fall der ROL, durch ein Benzylether-Analogon (**2**) ersetzt. Abbildung 13 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Substrate:

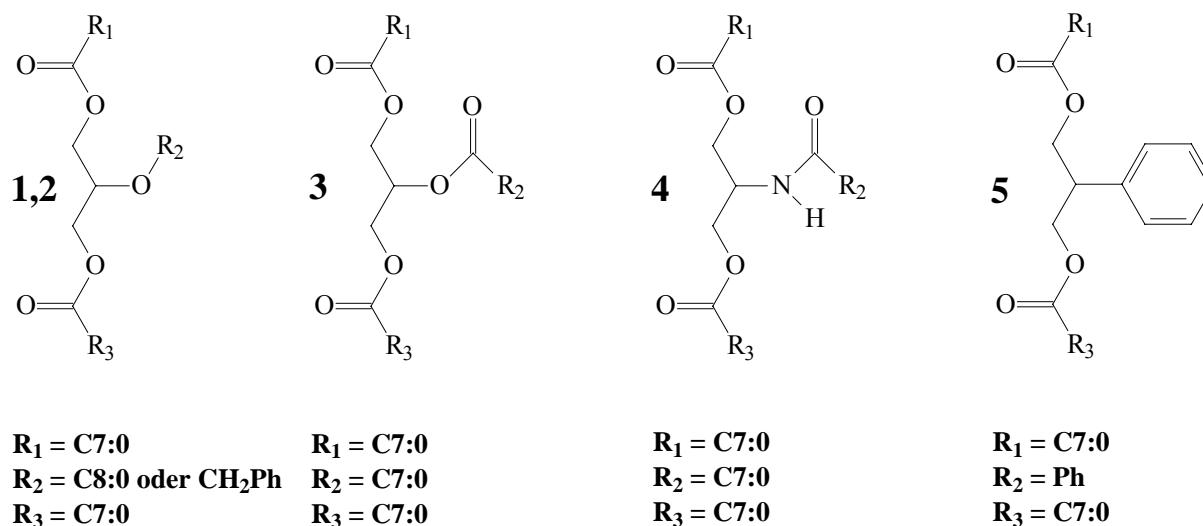


Abbildung 13: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Triacylglyceride und Analoga. Das Trioctanoin ($R_2 = C7:0$; **3**) wurde durch einen aliphatischen Ether- ($R_2 = C8:0$; **1**), Benzylether- ($R_2 = CH_2Ph$; **2**) (nur ROL), Amid- ($R_2 = C7:0$; **4**) bzw. Phenyl-Substituenten ($R_2 = Ph$; **5**) ersetzt.

Die *sn-2* Substituenten der Triacylglyceride und ihrer Analoga wurden im *sn-2 down* Bindungsmodus in den *hydrophobic dent* orientiert, im *sn-2 up* Bindungsmodus beherbergte der *hydrophobic dent* die nicht-hydrolysierte *sn-3* Fettsäurekette (Abbildung 12).

Experimentelle Untersuchungen wurden mit Triolein und Analoga am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie der Technischen Universität Graz im Arbeitskreis von Professor Fritz Paltauf durchgeführt. Kovac und Mitarbeiter zeigten bereits in einer früheren Arbeit, daß für die Lipasen aus *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas cepacia* und *Candida rugosa* die Stereoselektivität nicht von der Kettenlänge abhängt (Kovac *et al.* 1996), was *molecular modeling* Untersuchungen mit Trioctanoin und Analoga ermöglichte.

Ester primärer Alkohole

Zwei Klassen von Estern primärer Alkohole wurden molekulardynamisch im System mit PCL untersucht (Abbildung 14):

- 1) Substrate, die trotz ähnlicher chemischer Struktur signifikante Unterschiede in ihrer Enantioselektivität aufweisen.
- 2) Geschützte Triacylglyceride mit unterschiedlich großen Schutzgruppen.

Bei den Reaktionen handelt es sich für Substrate der Klasse 1 um die PCL-katalysierte Esterhydrolyse (Terao *et al.* 1988; Egri *et al.* 1996), für Substrate der Klasse 2 um die Veresterung mit Vinylacetat (Gaziola *et al.* 1996).

Die Ester der Klasse 1 Substrate **6** (2-*O*-Acetyl-3-phenyl-propen-1,2-diol), **7** (2-*O*-Acetyl-4-phenyl-butan-1,2-diol), **8** (2-Methyl-3-phenyl-propan-1-ol) und **9** (2-*O*-Benzylglycerin) werden im folgenden abgekürzt als z.B. Verbindung **6** bezeichnet. Analog verhält es sich mit den Substraten der Klasse 2: Verbindung **10** (4-Hydroxymethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan), **11** (4-Hydroxymethyl-2,2-dipropyl-1,3-dioxolan), **12** (4-Hydroxymethyl-2,2-diisobutyl-1,3-dioxolan) und **13** (1,2-Di-*O*-Cyclohexylidenglycerin).

Die Verbindungen **6** bis **8** werden bevorzugt in (*S*)-, Verbindung **9** in (*R*)-Konfiguration hydrolysiert. Dabei folgen **6**, **7** und **8** der empirischen Regel für primäre Alkohole. Verbindung **9** besitzt ein Sauerstoffatom am Stereozentrum und gehorcht nicht der Regel von Weissfloch und Kazlauskas (Weissfloch und Kazlauskas 1995). Trotz struktureller Ähnlichkeit der Verbindungen **6** bis **9** unterscheidet sich die Enantioselektivität von PCL bei der Esterspaltung deutlich (Abbildung 14).

Die Bindung der Klasse 1 Substrate erfolgte analog der Regel von Weissfloch und Kazlauskas (Abbildung 11). Der kleinere Substituent am Stereozentrum wurde in die BTM (Bindungstasche für den mittelgroßen Rest), der große Substituent in die BTL (Bindungstasche für den großen Rest) gebunden. Die hydrolysierte Säure war an den *hydrophobic crevice* angelagert. Die geschützten Triacylglyceride wurden analog den Triacylglyceriden und deren Analoga in die Lipase gebunden, wobei die Schutzgruppen im Vorfeld von Energieminimierung und molekulardynamischer Simulation in den *hydrophobic dent*, der Acylrest in den *hydrophobic crevice* orientiert wurden.

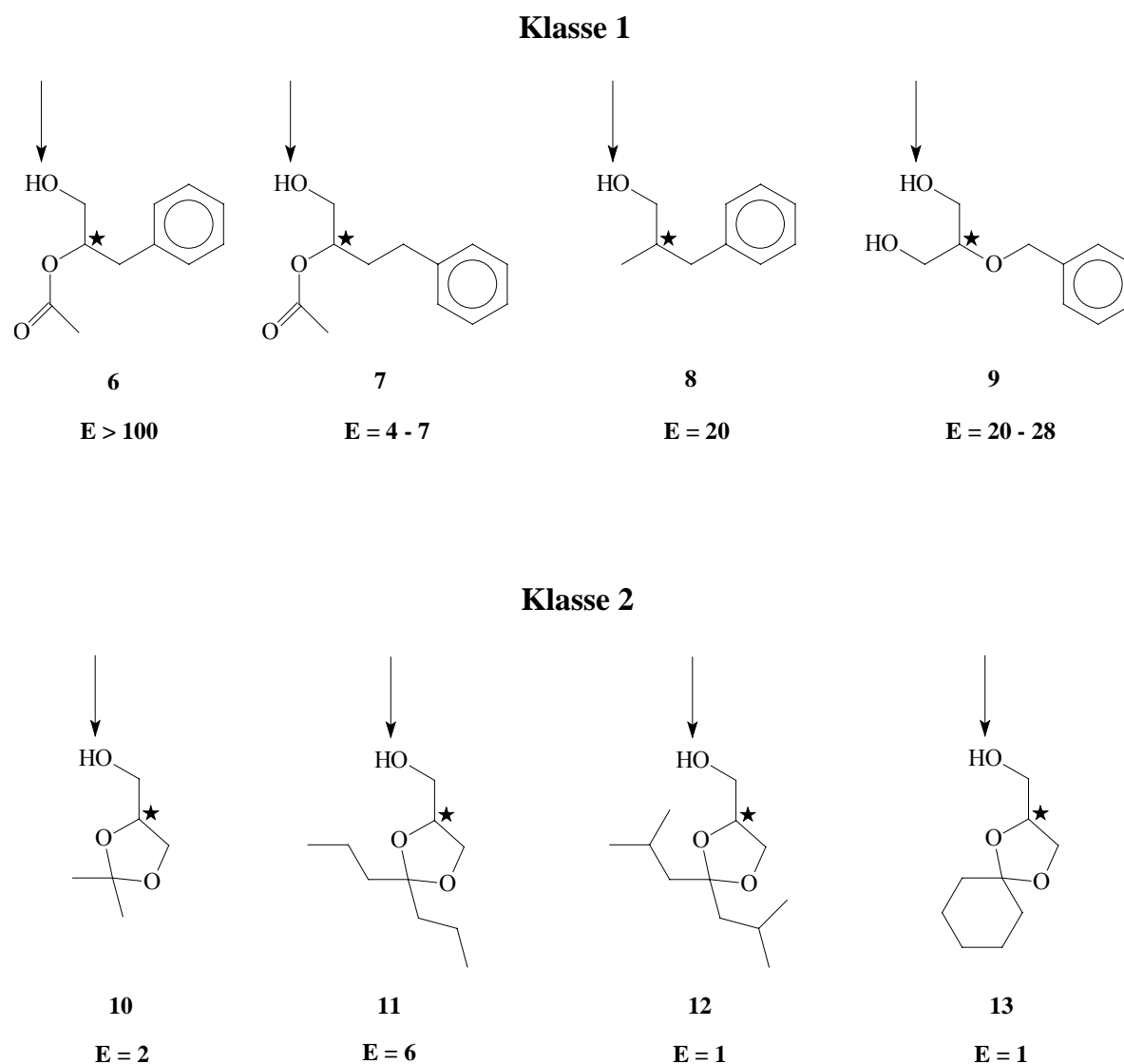


Abbildung 14: Strukturformeln der untersuchten primären Alkoholsubstrate. **Oben:** Substrate der Klasse 1. Dargestellt sind die Hydrolyseprodukte. Verbindungen **6** und **7** sind Spaltprodukte der entsprechenden Essigsäureester (Egri *et al.* 1996), **8** (Egri *et al.* 1996) und **9** (Terao *et al.* 1988) waren mit Vinylacetat verestert. **Unten:** Substrate der Klasse 2. Es handelt sich in der Abbildung um die Verbindungen **10** bis **13**, die unter PCL-Katalyse mit Vinylacetat verestert wurden (Gaziola *et al.* 1996).

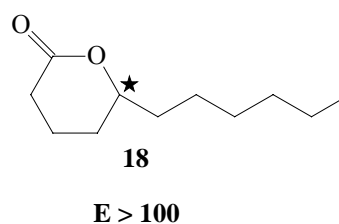
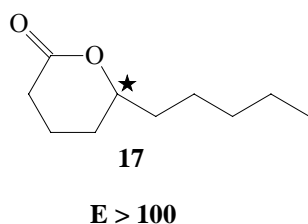
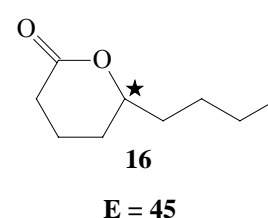
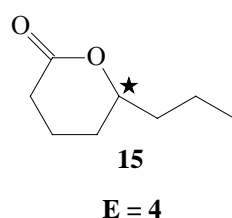
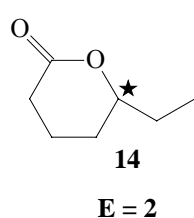
γ und δ -Lactone

Die Lipase-katalysierte Hydrolyse von Lactonen zu freien Fettsäuren und optisch reinen Alkoholen wurde untersucht an PCL im Komplex mit Substraten unterschiedlicher Ringgröße (γ -Lactone: Fünfring, δ -Lactone: Sechsring) sowie aliphatischer Alkylketten unterschiedlicher Länge am, dem Lactonsauerstoff benachbarten, C4- bzw. C5-Atom. Die untersuchten δ -Lactone waren δ -Hepta- (**14**), δ -Octa- (**15**), δ -Nona- (**16**), δ -Deca- (**17**) und δ -Undecalacton (**18**), die entsprechenden γ -Lactone waren γ -Hepta- (**19**), γ -Octa- (**20**), γ -Nona- (**21**) und

γ -Decalacton (**22**). Die chemische Struktur der untersuchten Substrate zeigt Abbildung 15. Die experimentellen Ergebnisse zur Enantioselektivität von γ - und δ -Lactonen wurden von Enzelberger und Mitarbeitern durchgeführt (Enzelberger *et al.* 1997).

Die Bindung der Lacton-Substrate in die Bindungstasche von PCL erfolgte analog zur Bindung der Triacylglyceride und Analoga ohne Ausrichtung eines Substituenten in die BTM. Vielmehr wurden die aliphatischen Alkylketten der γ - und δ -Lactone in die *cavity* orientiert. Der *hydrophobic crevice* blieb wegen der Ringform nahezu unbesetzt.

δ -Lactone



γ -Lactone

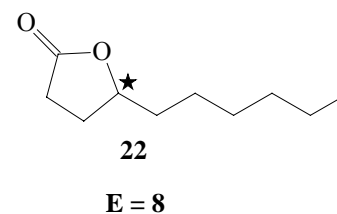
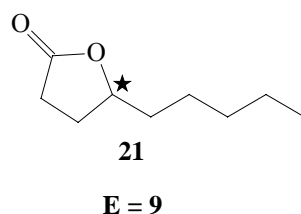
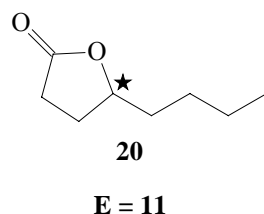
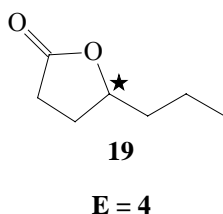


Abbildung 15: Strukturformeln und Nomenklatur der untersuchten δ - (links) und γ -Lactone (rechts).

3.5.3 sn -1(3) VERSUS sn -2 REGIOSELEKTIVITÄT

Bei den Untersuchungen zur sn -2 regioselektiven Esterspaltung in Konkurrenz zur sn -1(3) Regioselektivität wurde Trioctanoin in die Bindungstasche von CAL B, CRL, PCL und ROL gebunden, wobei die sn -2 Fettsäurekette in den *hydrophobic crevice* (CAL B, PCL, ROL) bzw. *hydrophobic tunnel* (CRL) orientiert wurde. Die Ausrichtung der sn -1 und sn -3 Fettsäureketten erfolgte analog den in sn -1(3) hydrolysierten Triacylglyceriden bzw. Analoga in den *hydrophobic dent* und die *cavity* (bei ROL entsprechend der nicht-hydrolysierten sn -3(1) Fettsäurekette (Abbildung 16).

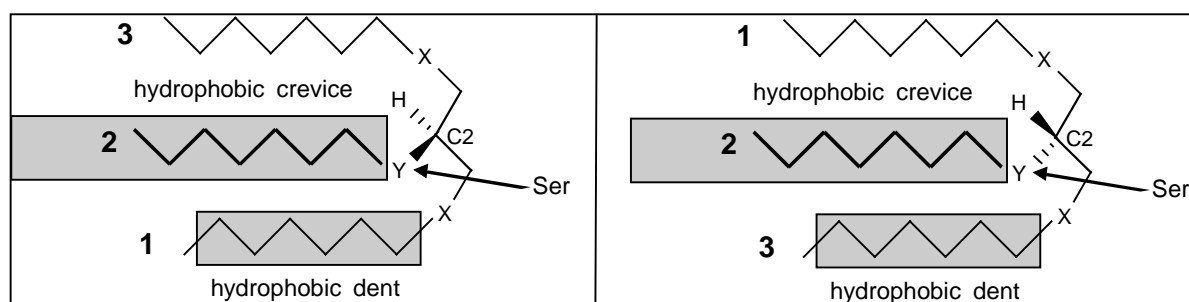


Abbildung 16: Die Bindung eines Trioctanoin-Moleküls an die Bindungstasche von ROL unter der Annahme einer Esterspaltung in sn -2. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in dieser Abbildung (im Gegensatz zu Abbildung 12) der *hydrophobic crevice* zwischen *hydrophobic dent* und nicht-hydrolysierten Fettsäurekette angeordnet. Die sn -2 Fettsäurekette bindet an den *hydrophobic crevice*, der *hydrophobic dent* wird durch die sn -1 (links) oder die sn -3 Fettsäurekette (rechts) besetzt. Da sich die sn -1 und sn -3 Fettsäureketten nicht unterscheiden, sind die dargestellten Bindungsalternativen identisch. Um die sn -2 regioselektive Hydrolyse mit *molecular modeling* Methoden untersuchen zu können, war eine molekulardynamische Simulation pro Lipase-Trioctanoin Komplex ausreichend.

Da es sich bei den sn -1 und sn -3 Fettsäuren um identische und in beiden Fällen um Ester primärer Alkohole handelt, unterscheiden sich die in Abbildung 16 dargestellten Bindungsalternativen nicht. Durch Drehung um eine horizontale Achse lassen sich beide Formen ineinander überführen. Für jede untersuchte Lipase konnte die Anzahl der molekulardynamischen Simulationen auf einen Lipase-Trioctanoin-Komplex beschränkt werden.

3.5.4 ANPASSUNG DER PARTIALLADUNGEN VON LIPASE UND SUBSTRAT IN DER ERSTEN TETRAEDRISCHEN ZWISCHENVERBINDUNG

Nach der Bindung der Substrate mußten die Partiaalladungen vor jeder Energieminimierung entsprechend angepaßt werden. Die Berechnung der Partiaalladungen von Lipase und Substrat

erfolgte unter Verwendung des sybyl6.4 Software-Pakets nach der Methode von Gasteiger-Hückel, einer Kombination der Gasteiger-Marsili- und der Hückel-Methode. Erstere dient zur Berechnung des σ -Beitrags zur Partiaalladung (Gasteiger und Marsili 1980), zweitere zur Berechnung des π -Anteils. Die resultierenden Partiaalladungen für die Seitenketten von aktivem Serin und Histidin sowie der Umgebung am tetraedrischen Kohlenstoff wurden jedoch nicht an die veränderte chemische Umgebung in der ersten tetraedrischen Zwischenstufe angepaßt, wie z.B. dem protonierten N ϵ 2 im Imidazolring des Histidins bzw. dem Oxyanion. Holzwarth und Mitarbeiter etablierten eine Methode zur Berechnung der Partiaalladungen, deren Ergebnisse als Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Energieminimierungen und molekulardynamischen Simulationen diente (Holzwarth *et al.* 1997). Abbildung 17 zeigt die nach *MNDO94/PM3* (Dewar und Thiel 1977; Dewar und Thiel 1977; Stewart 1989; Stewart 1989) modifizierte Partiaalladungen an den Aminosäuren Serin und Histidin der katalytischen Triade sowie Teilen eines Triacylglycerids im Vergleich zu den nach Gasteiger und Hückel berechneten Daten. Die Werte der Partiaalladungen nach Holzwarth *et al.* (schwarz) stimmen weitgehend mit denen aus dem *GROMOS*-Datensatz 37C4 überein (grün) (van Gunsteren und Berendsen 1987). Die Gesamtladung des Imidazolrings im aktiven Histidin ergibt nach dem *GROMOS*-Datensatz 37C4 exakt eins. Die Ladungen für die beiden C-H Gruppen im Imidazolring wurden für sogenannte *united atoms* berechnet. Dabei werden die beiden Atome der C-H Gruppe zu einem um die Masse eines H-Atoms vergrößerten Kohlenstoffatom zusammengefaßt.

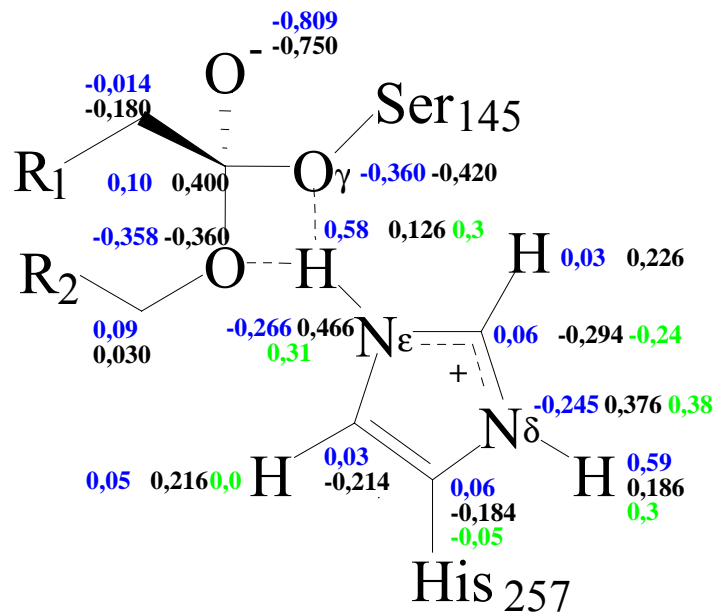


Abbildung 17: Erste tetraedrische Zwischenverbindung bei der Enzym-katalysierten Esterhydrolyse durch Serin-Proteasen. Die Werte der Partialladungen wurden nach Gasteiger und Hückel (blau; Gasteiger und Marsili 1980), nach Holzwarth *et al.* (schwarz; Holzwarth *et al.* 1997) und dem *GROMOS*-Datensatz 37C4 (grün; van Gunsteren und Berendsen 1987) ermittelt.

3.6 MOLECULAR MODELING

3.6.1 KRAFTFELD

Im Laufe von molekulardynamischen Simulationen werden aufeinanderfolgende Konformere eines Systems durch Integration der Newton-Bewegungsgleichungen erhalten. Als Ergebnis resultiert eine Trajektorie, die sowohl die Positionen als auch die Geschwindigkeiten der Atome im System über den jeweiligen Simulationszeitraum beinhaltet. Ein Molekülsystem besteht demnach aus untereinander verbundenen Atomen, die miteinander wechselwirken. Die Positionen der einzelnen Atome führen zu einer charakteristischen Molekül-Topologie, die auf bindenden und nicht-bindenden Interaktionen basiert. Abbildung 18 gibt einen schematischen Überblick über die Einflußgrößen.

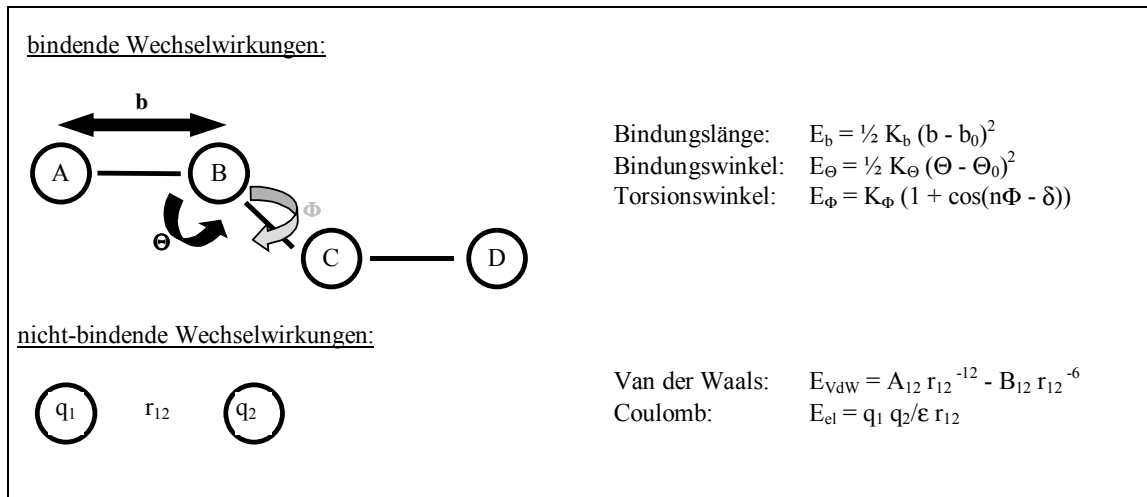


Abbildung 18: Bindende und nicht-bindende Wechselwirkungen, die auf ein Molekül wirken:

Bindungslänge b zwischen den Atomen A, B

Bindungswinkel Θ zwischen den Atomen A, B, C

Torsionswinkel Φ zwischen den beiden Ebenen aus Atomen A, B, C und B, C, D

Van-der-Waals Wechselwirkung zwischen den Atomen 1, 2

Coulomb-Wechselwirkung zwischen den Ladungen der Atome 1, 2

n = Anzahl der auftretenden Minima, δ = Phasenverschiebung. K , A und B = Konstanten, r_{12} = der Van-der-Waals Radius. q = Ladung eines Atoms, ϵ = Dielektrizitätskonstante.

Bindende Wechselwirkungen werden bestimmt durch (Abbildung 18):

- die Bindungslänge b zwischen zwei Atomen (A und B),
- den Bindungswinkel Θ zwischen drei Atomen (A, B, C) und
- den Torsionswinkel Φ , der den Winkel zwischen zwei Ebenen beschreibt. Jede Ebene wird durch die Position von drei Atomen definiert (A, B, C und B, C, D).

Nicht-bindende Wechselwirkungen beruhen auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen, die durch das Lennard-Jones Potential beschrieben werden, und auf elektrostatischen Kräften, denen ein Coulomb-Potential zu Grunde liegt.

Diese und weitere Größen gehen mit unterschiedlichen Wertigkeiten in die verschiedenen Kraftfeldgleichungen ein. Dabei ergibt sich die potentielle Energie eines Systems aus der Summe der Einzelgleichungen des jeweiligen Kraftfeldes:

$$E_{\text{pot}} = \sum E_b + E_\Theta + E_\Phi + E_{\text{vdW}} + E_{\text{El}}$$

Gängige Kraftfelder als Grundlage molekulardynamischer Simulationen sind *GROMOS* (van Gunsteren und Berendsen 1987), *Amber* (Weiner *et al.* 1984), *CHARMM* (Gelin und Karplus 1979) und *Tripes* (Clark *et al.* 1989). Sie unterscheiden sich in Zahl und Parametrisierung der Atomtypen und Kraftfeldgleichungen. Energieminimierungen und molekulardynamische

Simulationen im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich unter Verwendung der Standardeinstellungen des *Tripes 5.2* Kraftfeldes durchgeführt. Der Vorteil dieses Kraftfeldes liegt in seiner umfassenden Parametrisierung vieler Atomtypen, weshalb es zur Simulation unterschiedlichster Verbindungen verwendet werden kann. Darüber hinaus ist das *Tripes 5.2* Kraftfeld in der Lage, an ein Makromolekül gebundene Substrate zu behandeln. Die generelle Anwendbarkeit des *Tripes 5.2* Kraftfeldes kann sich jedoch auch nachteilig auf die Ergebnisse molekular-dynamischer Simulationen auswirken. So liefert die Anwendung spezieller Kraftfelder für die Behandlung eines begrenzten Systems häufig genauere Ergebnisse. Zudem können bei der Betrachtung geladener Systeme die Einflüsse von Ladungen nicht ausreichend berücksichtigt werden.

3.6.2 ENERGIEMINIMIERUNG

Im Vorfeld der molekular-dynamischen Simulationen wurden die Enzym-Substrat Komplexe einer Energieminimierung unterzogen. Energetisch ungünstige Bindungslängen und -winkel, die durch die manuelle Einbindung des Substrats in die Lipase entstehen, erhöhen die innere Energie des Systems und können im Extremfall zu einem Abbruch der molekular-dynamischen Simulation führen. Um Bereiche ungünstiger geometrischer Anordnungen rasch zu entspannen, wurde der molekular-dynamischen Simulation die Energieminimierung vorgeschaltet. Der prinzipielle Unterschied zwischen einer Energieminimierung und einer molekular-dynamischen Simulation ist die Suche nach einem lokalen Minimum bei Verwendung eines Minimierers, im Gegensatz zur Suche nach dem globalen Minimum bei einer molekular-dynamischen Simulation (Abbildung 19).

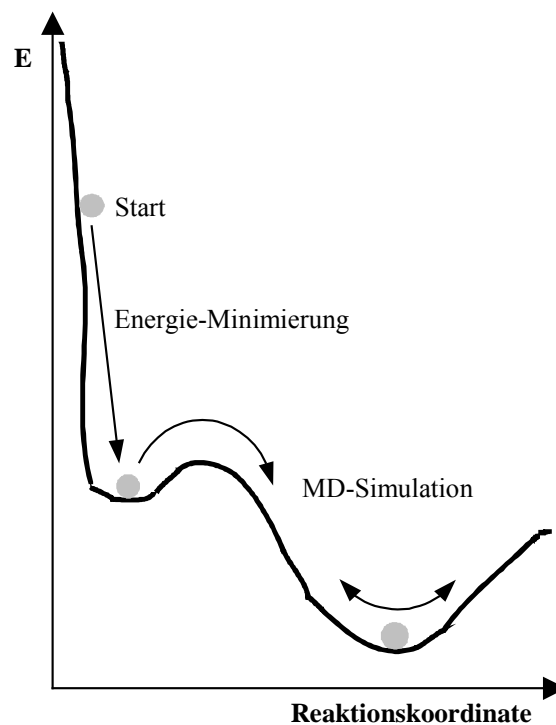


Abbildung 19: Energieprofil entlang einer Reaktionskoordinate. Ausgehend von der Startstruktur wird durch Energieminimierung ein lokales Minimum erreicht. Eine molekulardynamische (MD-) Simulation ermöglicht das Erreichen eines globalen Energieminimums.

Prinzip

Die Energie ist eine Funktion der Atomkoordinaten. Im Verlauf einer Energieminimierung werden einem System Koordinaten zugewiesen, die ein lokales Energieminimum darstellen. Ein lokales Energieminimum befindet sich nahe der Ausgangskoordinaten und gibt keine Information über ein globales Energieminimum im System. Minimierungsmethoden, die auf diesem Prinzip basieren, werden als *descent series* Methoden bezeichnet. Es handelt sich dabei um eine iterative Technik, in deren Verlauf Atomkoordinaten von einem Schritt zum nächsten modifiziert werden.

Der *SIMPLEX*-Algorithmus basiert auf einer ableitungsfreien Rechnung (Press *et al.* 1988). Dabei wird Atom für Atom soweit optimiert, bis die maximale Kraft, die ein Atom erfährt, unter einen vorgegebenen Schwellenwert sinkt. In stark verzerrten Systemen sind sowohl die Energiehyperflächen als auch ihre Ableitungen häufig diskontinuierlich. Der *SIMPLEX*-Algorithmus ist in der Lage, solche Systeme zu optimieren.

Um das lokale Minimum einer Funktion zu erhalten, wird von der jeweiligen Startposition eine Richtung in den n -dimensionalen Raum festgelegt und so lange verfolgt, bis ein

Minimum erreicht wird. Der in dieser Arbeit verwendete *Powell*-Algorithmus beruht auf diesem Prinzip (Powell 1977). Er gehört zur Familie der *Conjugate Gradient* Minimierer (Press *et al.* 1988). Diese Algorithmen berücksichtigen Informationen vorhergehender Minimierungsschritte. Deshalb sind ihre Konvergenzeigenschaften denen des *SIMPLEX*-Algorithmus überlegen. Der Vorteil des *Powell*-Algorithmus liegt in seinen verbesserten Eigenschaften zur Bestimmung der Minimierungsrichtung, die den Algorithmus signifikant schneller machen. Zudem ist er für ein breites Spektrum von Systemen anwendbar.

Tabelle 7: Einstellungen bei der Durchführung einer Energieminimierung

	<i>SIMPLEX</i> -Algorithmus	<i>Powell</i> -Algorithmus
Anzahl der Schritte	100	100
Abbruchkriterium	Gradient	Gradient
Gradient	1000 kcal/mol	0,05 kcal/molÅ

Die Minimierungsmethode der Wahl bestand aus einer Kombination von *SIMPLEX*- und *Powell*-Minimierung. Maximal 100 *SIMPLEX*-Schritte wurden vorgegeben, die jedoch in keinem Fall ausgeschöpft wurden, da das System schon vorher, üblicherweise nach ca. 10 Schritten, die zum Abbruch der *SIMPLEX*-Minimierung vorgegebene Energieschwelle von 1000 kcal/mol für das Gesamtsystem unterschritt. Anschließend wurde der Enzym-Substrat-Komplex mit dem *Powell*-Algorithmus minimiert. Die Zahl der maximalen Minimierungsschritte lag bei 100. Als Abbruchkriterium wurde ein Gradient gewählt (0,05 kcal/molÅ). Alle weiteren Parameter wurden wie vorgegeben übernommen.

3.6.3 MOLEKULARDYNAMISCHE SIMULATION

Während einer molekulardynamischen (MD-) Simulation werden Modifikationen von Ladungen, Bindungslängen und Bindungswinkeln durchgeführt, die sowohl das Substrat als auch das Protein betreffen.

Einstellungen

Tabelle 8: Parametereinstellungen der durchgeführten molekulardynamischen Simulationen an mikrobiellen Lipasen.

	Dauer [ps]	Temperatur [K]	Schrittweite [fs]	Kopplung [fs]	Startgeschwindigkeit
Heizphase 1	2000	5	1,0	10	wie vorher
Heizphase 2	2000	30	1,0	10	wie vorher
Heizphase 3	2000	70	0,5	10	wie vorher
Heizphase 4	10000	100	0,5	10	wie vorher
Produktionsphase	2000	100	0,5	10	wie vorher

Die durchgeführten molekulardynamischen Simulationen gliedern sich in fünf Schritte (Tabelle 8). Die Enzym-Substrat Komplexe wurden zu Beginn in drei Heizschritten von je 2 ps Länge bei 5 K, 30 K und 70 K geheizt. Während der 10 ps langen Relaxationsphase wurde das System auf 100 K geheizt und hinreichend energetisch entspannt. Eine ausreichende Entspannung für ein makromolekulares System bei einer molekulardynamischen Simulation *in vacuo* nimmt mindestens 5 ps in Anspruch. Demnach muß der Relaxationsschritt in den durchgeführten Simulationen um ein mehrfaches länger sein als die einzelnen Stufen der Heizphasen.

Vorsichtiges und langsames Aufwärmen eines makromolekularen Systems ist eine Grundvoraussetzung zur erfolgreichen Durchführung einer MD-Simulation, damit lokale Energiebarrieren möglichst gleichmäßig überwunden werden können. Zu schnelles oder sprunghaftes Heizen hat zur Folge, daß sich lokal Bereiche mit sehr hohen Energien bilden können, die zur Zerstörung des Enzym-Substrat Komplexes führen können.

Dauer

Die drei Heizschritte bei 5 K, 30 K und 70 K waren je 2 ps, die Relaxationsphase 10 ps und die Produktionsphase wiederum 2 ps lang. Die Enzym-Substrat Komplexe wurden also insgesamt über einen Zeitraum von 18 ps molekulardynamisch simuliert. Auf der verwendeten Hardware dauerte eine molekulardynamische Simulation ca. 24 CPU-Stunden.

Temperatur

Neben der Intervalllänge ist die Temperatur der wichtigste Parameter bei der Durchführung einer MD-Simulation. Die Enzym-Substrat Komplexe wurden auf 100 K erwärmt, wobei für

jedes neue Intervall die Endwerte des vorherigen als Startwerte übernommen wurden. Zu Beginn ist die Wahrscheinlichkeit einer intensiven energetischen Wechselwirkung im System größer als zu einem späteren Zeitpunkt. Deshalb wird die Temperatur erst im vierten Schritt auf 100 K erhöht. Die maximale Temperatur von 100 K bei molekulardynamischen Simulationen war Folge des Wunsches, die Untersuchungen *in vacuo* durchzuführen, mit den daraus resultierenden Vorteilen einer um eine bis zwei Größenordnungen kürzeren Simulationsdauer und der geringeren Zahl von Einflußgrößen auf den zu beobachtenden Effekt der Regio- bzw. Stereoselektivität. Zudem zeigten frühere Untersuchungen von Enzym-Substrat Wechselwirkungen durch molekulardynamische Simulationen bei 300 K eine beträchtliche Beweglichkeit der Substrate in der Substratbindungstasche der Lipasen, die in einer realen Umgebung mit Lösungsmittel und umgebenden Fettmolekülen nicht wahrscheinlich ist (Scheib 1997).

Schrittweite

Die Schrittweite gibt an, wieviel Zeit zwischen zwei Integrationsschritten der Newton-Bewegungsgleichung verstreicht. Die Schrittweite sollte dabei kleiner sein, als die schnellste Bewegung. Dies gewährleistet, daß der Phasenraum effizient durchlaufen wird und elastische Kollisionen auftreten. Wird die Schrittweite zu klein gewählt, wird der Phasenraum nur langsam durchlaufen. Dies geht zu Lasten der Rechenökonomie. Ist die Zeit zwischen zwei Integrationschritten zu groß gewählt, tritt Instabilität innerhalb des Systems auf, die zur Zerstörung der Moleküle führen kann.

Zu Beginn einer Simulation liegen sowohl eine Startkoordinate auf der Trajektorie, $x(0)$, als auch eine Startgeschwindigkeit, $v(0)$, vor. Durch die Gleichung

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m_i v_i^2$$

hängt die Geschwindigkeit mit der kinetischen Energie zusammen. Für $v(0)$ findet sich eine kinetische Startenergie, $E_{kin}(0)$. Durch die Newton-Gleichung besteht ein Zusammenhang zwischen x_i , v_i , der potentiellen Energie, E_{pot} , und der Kraft, F_i :

$$-\nabla E_{pot} = F_i = m_i \frac{d^2}{dt^2} x_i$$

Die Berechnung von x , v , E_{pot} , E_{kin} und F zu den durch die Schrittweite definierten Zeiten ergibt eine Trajektorie, die sich als Abfolge von Einzelwerten beschreiben lässt (Abbildung 20).

Anfangsbedingung:	$t = 0$	\rightarrow	$x(0), v(0)$	\rightarrow	$E_{\text{pot}}(0)$	\rightarrow	$F(0)$	\rightarrow	$d^2/dt^2 x(0)$
1. Simulationsschritt:	$t = \Delta t$	\rightarrow	$x(\Delta t), v(\Delta t)$	\rightarrow	$E_{\text{pot}}(\Delta t)$	\rightarrow	$F(\Delta t)$	\rightarrow	$d^2/dt^2 x(\Delta t)$
2. Simulationsschritt:	$t = 2\Delta t$	\rightarrow	$x(2\Delta t), v(2\Delta t)$	\rightarrow	$E_{\text{pot}}(2\Delta t)$	\rightarrow	$F(2\Delta t)$	\rightarrow	$d^2/dt^2 x(2\Delta t)$
	\vdots								
	\vdots								
	\vdots								
Trajektorie: $x(t), v(t), E_{\text{pot}}(t), E_{\text{kin}}(t), F(t)$									

Abbildung 20: Berechnung der Trajektorie einer molekulardynamischen Simulation.

Kopplung

Die Temperaturkopplung entspricht einer Relaxation erster Ordnung. Als Vergleichswert dient die Referenztemperatur T_{ref} . Die Geschwindigkeit v eines Atoms i zu einem bestimmten Zeitpunkt t ist abhängig von einem Kopplungsfaktor λ , d.h. bei jedem Simulationsschritt erfolgt eine Zuweisung:

$$v(t_i) \leftarrow \lambda_i v(t_i)$$

Dieser Faktor berechnet sich wie folgt:

$$\lambda_i = \sqrt{\left[1 + \frac{c_v^{\text{df}}}{\left(\frac{k_B}{2}\right)} \times \frac{\Delta t}{\tau} \times \left(\frac{T_{\text{ref}}}{T(t_i)} - 1 \right) \right]}$$

wobei τ die Relaxationszeit, c_v^{df} die Wärmekapazität pro Freiheitsgrad und k_B die Boltzmannkonstante ($1,38662 \times 10^{-23}$ J/K) darstellen. Für $\Delta t \ll \tau$ erhält man eine gute Näherung der Temperaturkopplung an ein externes Wärmebad (van Gunsteren und Berendsen 1990).

Tritt enge Kopplung auf, d.h. die Relaxationszeit ist verhältnismäßig kurz (ca. 10 fs), so ist es dem System möglich, Energiebarrieren relativ leicht zu überwinden. Bei loser Kopplung mit vergleichsweise langer Relaxationszeit (ca. 100 fs), können Störungen des Systems leichter unterdrückt werden (Pleiss 1990).

Startgeschwindigkeit

Es gibt zwei prinzipiell unterschiedliche Möglichkeiten, die Startgeschwindigkeit einzustellen:

- 1) Die zufällige Zuordnung eines der jeweiligen Temperatur entsprechenden Geschwindigkeitsparameters wird verwendet, um den Einfluß der Startbedingungen auf das System zu kontrollieren und die Zufälligkeit der vorgegebenen Orientierungen zu untersuchen.
- 2) Die Geschwindigkeitswerte des vorausgehenden Schrittes werden übernommen. Als Startparameter dienen Geschwindigkeitswerte und Orientierungen, die den inneren Kräften des Moleküls entsprechen. Diese Einstellung wird in der Regel für eine Reihe aufeinander folgender Simulationen verwendet.

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten molekulardynamischen Simulationen wurden die Geschwindigkeitswerte der vorangegangenen Schritte verwendet (Option 2).

Cutoff-Radius

Der *Cutoff*-Radius definiert die Größe einer Kugel, außerhalb der eine Wechselwirkung der äußeren Atome mit den inneren lediglich nach dem Verstreichen einer festgelegten Zeitspanne neu berechnet wird. In der Zwischenzeit gilt der alte Wert. Dies hat eine Verringerung des Rechenaufwands zur Folge (van Gunsteren und Berendsen 1990).

Dielektrizitätskonstante

Alle molekulardynamischen Simulationen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, erfolgten im Vakuum. Es wurden keine Lösungsmiteleinflüsse berücksichtigt. Die Dielektrizitätskonstante beträgt in diesem Fall 1,0 (van Gunsteren und Berendsen 1990).

Festhalten des Proteinrückgrats

Das Festhalten des Proteinrückgrats ist bei einer molekulardynamischen Simulation *in vacuo* essentiell, da bei Freigabe des Proteinrückgrats in Ermangelung einer Lösungsumgebung die Faltung des Proteins nicht aufrecht erhalten werden könnte und das Enzym in der Folge denaturiert. Darüber hinaus gilt in erster Näherung, daß Wechselwirkungen bevorzugt zwischen Seitenkettenatomen auftreten und Veränderungen der Position von Atomen des Proteinrückgrats nur eine untergeordnete Rolle spielen.

3.7 AUSWERTUNG MOLEKULARDYNAMISCHER SIMULATIONEN

Die Auswertung der molekulardynamischen Simulationen konzentrierte sich hauptsächlich auf drei Punkte:

- 1) Wechselwirkungen des Substrats mit den Aminosäuren der Substratbindungstasche
- 2) Auswirkungen dieser Wechselwirkungen auf die Geometrie des Substrats
- 3) Auswirkungen dieser Wechselwirkungen auf die Position der Aminosäureseitenketten

3.7.1 ERSTELLEN EINER MITTLEREN STRUKTUR UND ÜBERPRÜFUNG DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄT

Die 50 Strukturen der Produktionsphase (siehe Kapitel 3.6.3) wurden überlagert und eine mittlere Struktur berechnet. Diese hat den Vorteil, das entspannte System über einen Zeitraum von 2 ps relativ genau wiederzugeben. Atomen und Seitenketten, die mit großer Amplitude schwingen, wird ein geometrischer Mittelwert zugeordnet. Grundlegende Voraussetzung für das Erstellen einer mittleren Struktur ist das Vorliegen eines hinreichend entspannten Systems. Nachteil dieses Verfahrens ist, daß Bereiche großer Beweglichkeit und intensiver Wechselwirkungen nicht erkannt werden können. Zudem sollte das System nicht um zwei relevante Grenzstrukturen schwingen, da eine Mittelwertbildung in diesem Fall einen unwahren Zustand beschreiben würde. Der mittleren Struktur muß deshalb eine Betrachtung der Trajektorie folgen, die Eindrücke über die Dynamik des Enzym-Substrat Komplexes gibt. Zur Überprüfung der katalytischen Aktivität der Enzym-Substrat Komplexe wurden die essentiellen H-Brücken Bindungen der mittleren Strukturen untersucht. Die Bildung von H-Brücken zwischen Donoren und Akzeptoren erfolgte in einem Abstand von 0,8 Å bis 2,8 Å und einem Winkel von maximal 120° (sybyl6.1 1994).

3.7.2 AUSWERTUNG DER TRAJEKTORIE

Die Auswertung der dynamischen Interaktionen zwischen Lipase und Substrat erfolgte durch visuelle Analyse der Trajektorie, die Struktur- und Geschwindigkeitsdaten über den Verlauf der Simulation enthält. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Art und Intensität der sterischen Wechselwirkungen zwischen Substrat und Lipase.

3.7.3 BESTIMMUNG DER SUBSTRATGEOMETRIE FÜR TRIACYLGLYCERIDE UND ANALOGA

Die Analyse der Geometrieänderungen im Substrat bei den molekulardynamischen Simulationen zur Regio- und Stereoselektivität von Triacylglyceriden und Analoga erfolgte durch Messung von Torsionswinkeln im Glycerid und dem *sn*-2 Substituenten (Abbildung 21).

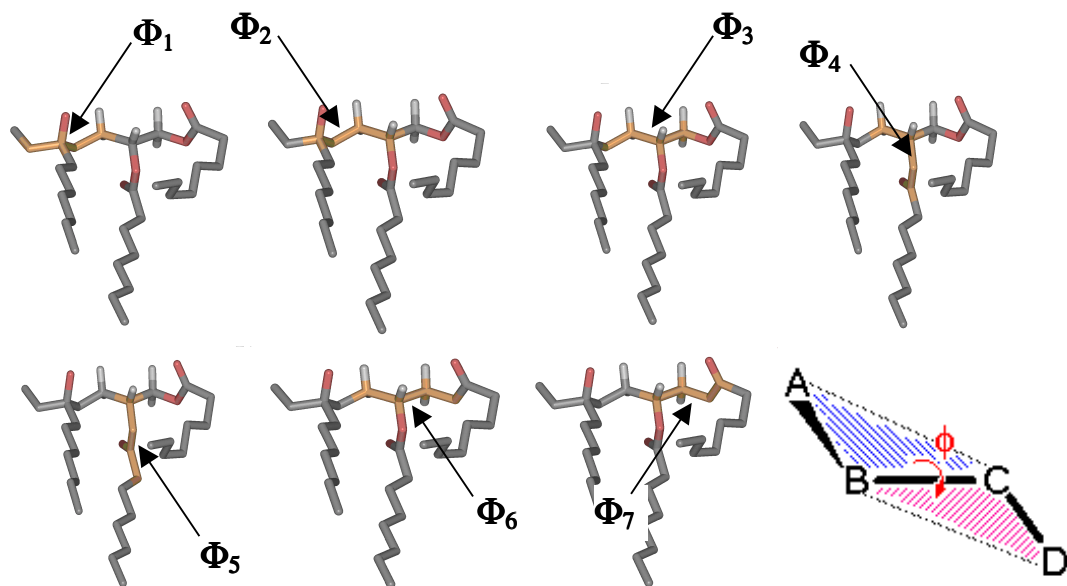


Abbildung 21: Definition der Torsionswinkel Φ_1 bis Φ_7 (von oben links nach unten rechts). Unten rechts ist die Definition eines Torsionswinkels zwischen den aus den Punkten A, B, C und B, C, D aufgebauten Ebenen abgebildet.

Für die *molecular modeling* Studien zur *sn*-2 regioselektiven Spaltung von Triacylglyceriden wurden zwei Torsionswinkel gemessen, Φ_M und Φ_L (Abbildung 22). Φ_M ist der Torsionswinkel über C2-C1(3)-O1(3)-C1(3)' und beschreibt den entsprechenden Torsionswinkel in der *sn*-1(3) Fettsäurekette, die tiefer in die Bindungstasche der Lipase bindet. Φ_L wird über C2-C3(1)-O3(1)-C3(1)' gemessen und repräsentiert den Torsionswinkel der *sn*-3(1) Fettsäurekette, die weniger tief in die Bindungstasche bindet.

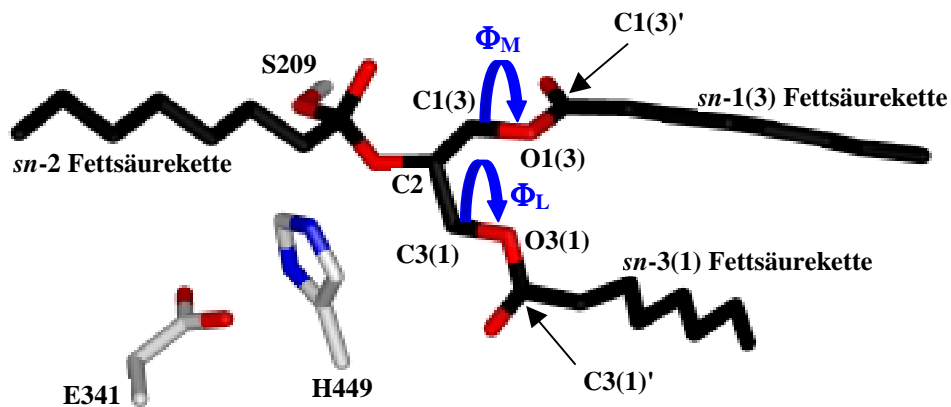


Abbildung 22: Definition der Torsionswinkel Φ_M (Torsionswinkel um die Bindungen C2-C1(3)-O1(3)-C1(3)') und Φ_L (Torsionswinkel um die Bindungen C2-C3(1)-O3(1)-C3(1)') bei den *molecular modeling* Untersuchungen zur *sn-2* regioselektiven Spaltung von Triacylglyceriden. Φ_M beschreibt den Torsionswinkel entlang der tiefer in die Bindungstasche bindenden *sn-1(3)* Fettsäurekette, Φ_L den entlang der weniger tief bindenden *sn-3(1)* Fettsäurekette.

3.7.4 BERECHNUNG DES MITTELWERTES UND DER STANDARDABWEICHUNG FÜR DIE ENERGIEN UND ERMITTELTEN TORSIONSWINKEL BEI TRIACYLGLYCERIDEN UND ANALOGA

Die Mittelwerte von potentieller, kinetischer und Gesamtenergie sowie der Torsionswinkel wurden als arithmetisches Mittel aus den 50 Strukturen der Produktionsphase berechnet. Die Standardabweichungen dieser Größen errechneten sich zu:

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

wobei $N = 50$, $x_i = E_{\text{pot}}, E_{\text{kin}}, E_{\text{ges}}$ bzw. Φ am Punkt i , \bar{x} = der Mittelwert von $E_{\text{pot}}, E_{\text{kin}}, E_{\text{ges}}$ bzw. Φ ist.

3.7.5 AUSWERTUNG MOLEKULARDYNAMISCHER SIMULATIONEN AN KOMPLEXEN DER PCL MIT ESTERN PRIMÄRER ALKOHOLE

Die Auswertung der molekulardynamischen Simulationen von PCL mit Estern primärer Alkohole erfolgte analog den Untersuchungen zur Stereoselektivität von Triacylglyceriden und Analoga durch visuelle Analyse der Trajektorie, wodurch repulsive Wechselwirkungen zwischen Substrat und Lipase identifiziert werden konnten. In einem zweiten Schritt wurden die mittleren Strukturen analysiert. Dabei stand die Art der Bindung des Substrats in die Bindungstasche, die Ausbildung von H-Brücken Bindungen von der Lipase zum Substrat sowie die Beeinflussung der relativen Position der Seitenkette des aktiven H286 im Mittelpunkt. Die Bindungsaffinität zwischen PCL und Substrat wurde berechnet und mit Hilfe der *score*-Software in einen Wert zusammengefaßt, die auf einer empirischen Bewertungsfunktion aufbaut, in die Beiträge der Van-der-Waals Wechselwirkungen, K_{VdW} , der Metall-Ligand-, K_{Metall} , und H-Brücken-Bindung, $K_{H-Brücke}$, der Desolvation, K_{Desolv} , und Deformation, K_{Deform} , eingehen (Wang *et al.* 1998):

$$pK_d = K_0 + K_{VdW} + K_{Metall} + K_{H-Brücke} + K_{Desolv} + K_{Deform}$$

3.7.6 BERECHNUNG DER STANDARDABWEICHUNG DER POSITIONSVERSCHIEBUNG DER SEITENKETTE DES AKTIVEN HISTIDINS FÜR γ - UND δ -LACTONE

Die Enantioselektivität von PCL bei der Umsetzung von γ - und δ -Lactonen konnte durch die Auswirkungen der Lipase-Substrat Wechselwirkungen auf die Lage der Seitenkette des aktiven H286 erklärt werden. Dabei wurde die relative Position des N ϵ 2 im Imidazolring des Histidins im Verhältnis zu den weitgehend fixierten Atomen O γ der Hydroxylgruppe des aktiven S87 (N ϵ 2-O γ), O1 des Lactonrings (N ϵ 2-O1) und C γ des aktiven D264 (N ϵ 2-C γ) gemessen. Diese Meßgrößen konnten zu einem charakteristischen (R)_{His}- bzw. (S)_{His}-Wert zusammengefaßt werden. (R)_{His} und (S)_{His} wurden nach folgender Formel berechnet:

$$(R)_{His} / (S)_{His} = \sqrt{\frac{1}{3} (X_{N\epsilon 2-O\gamma} - 3.2)^2 + (X_{N\epsilon 2-O1} - 2.6)^2 + (X_{N\epsilon 2-C\gamma} - 5.4)^2}$$

3.8 CHEMIKALIEN UND ENZYME

Bio Rad Laboratories, Richmond, USA	SDS-PAGE-Standard (<i>low molecular weight</i>)
DIFCO-Laboratories, Detroit, USA	Trypton
Fluka Chemie, Buchs, Schweiz	Agar
	Bromphenolblau
	Calciumchlorid (CaCl ₂)
	Coomassie Brilliant Blue R-250
	Dimethylsulfoxid (DMSO)
	Dithiothreitol (DTT)
	Ethidiumbromid
	Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Natriumsalz
	Glucose-Monohydrat
	Hefeextrakt
	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid (IPTG)
	Magnesiumchlorid (MgCl ₂)
	Methanol
	Natriumacetat (NaOAc)
	Natriumchlorid (NaCl)
	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	Natriumhydroxid (NaOH)
	PEG 6000
	Salzsäure 35 % (HCl)
	Tetramethylethylendiamin (TEMED)
	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)
Gibco BRL GmbH, Eggenstein	1 kb-Ladder (Standard für Agarosegele)
Interaktiva	Oligonukleotide
MBI Fermentas, St. Leon-Rot	Restriktionsendonukleasen
	T4-DNA-Ligase
Perkin Elmer, Weiterstadt	Big Dye Sequencing Kit
Pharmacia LKB, Freiburg	Ultrapure dNTP-Set
Qiagen GmbH, Hilden	QIAGEN Midi-Plasmid-Präparations-Kit
	QIAprep Spin Miniprep-Plasmid Präparations-Kit
Riedel-de Haen, Seelze	Essigsäure 100 %, Eisessig
	Ethanol
	Glycerin

Roth GmbH, Karlsruhe	Ampicillin (Natrium-Salz) Glycin Rotiphorese NF-10x TBE-Puffer Rotiphorese NF-Harnstoff Rotiphorese [®] NF-Acrylamid/Bisacrylamid Lösung 30 % (30/08) für PAGE Rotiphorese NF-Acrylamid/Bisacrylamid- Lösung 40 % (19:1) für Sequenzierung
Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg	Agarose
Stratagene, La Jolla, USA	Pfu-Polymerase Pfu-Polymerase Puffer QuikChange-Kit

3.9 GERÄTE

Verwendete Geräte	Typbezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese	DNA Sub Cell , Gel-Dryer 583, Mini Sub DNA Cell, Mini Sub Cell GT	BioRad
	Video Copy Processor P66E	Mitsubishi
	BWM 9X Monitor	Javelin Electronics
	UV-Leuchttisch	MWG-Biotech
Brutschränke	WTE	Binder
	UM 500	Memmert
Chromatographiesäule für GC	Optima 5 25 m × 0,25 mm i.d.	Machery und Nagel
DNA-Sequenzierer	373A DNA Sequencer	Applied Biosystems
	Macintosh Quadra 650	Apple Macintosh
Fermenter	Bioengineering D1180 (30 l)	Bioengineering AG
	Infors HT (5 l)	Infors AG
Gaschromatograph	Fisons GC	Fisons Instruments Mega Series
Gefriertrockner	Lyovac GT 2	Finn-Aqua
Inkubatoren	HT - Schüttelinkubator (30°C, 37°C)	Infors AG
Mikrowellengerät	Micro-Chef FM A935	Moulinex
PAGE	Minigel-Twin G42	Biometra [®]

	Model 583 Gel Dryer	BioRad
PCR-Geräte	DNA Thermocycler	Perkin Elmer
	Robocycler [®] Gradient 40	Eppendorf Stratagene
pH-Meter	Digital pH Meter pH525	WTW
Photometer	UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec 3000)	Pharmacia Biotech
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
"Vortexer"	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waagen	Basic, MC1 Research RC 210 D	Sartorius
	Precision Advanced	OHAUS
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417 C	Eppendorf
	Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf
	Universal 30 F	Hettich
	KR 22 i (Rotor: AK 500-11, 155 mm)	Jouan
	G412	Jouan
	Sorvall RC-5B (Rotor: SA 600)	Du Pont Instruments

3.10 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Verbrauchsmaterialien	Herstellerfirma
Millipore Filter 0,025 µm für Dialyse	Millipore
Eppendorf-Reaktions-Gefäße 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Filterpapier (25 µm)	BioRad
½ Mikro-Einmalplastikküvetten (10 x 4 x 45 mm)	Ratiolab
PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Labortechnik

3.11 NÄHRMEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN

3.11.1 MEDIEN

LB (Luria-Bertani) Medium (für 1 l Medium) (Luria *et al.* 1960)

Bacto Trypton, 1 % (w/v)	10 g
Hefeextrakt, 0,5 % (w/v)	5 g
NaCl, 1 % (w/v)	10 g
Glucose Monohydrat 0,1 % (w/v)	1 g
H ₂ O	ad 1 l

Mit 5 N wässriger KOH-Lösung auf pH 7,5 einstellen. Anschließend autoklavieren.

Für feste Medien wird vor dem Autoklavieren 16 g/l Agar zugegeben. Medium zur Selektion von Transformanden wird Ampicillin-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

TSS-Medium (Transformation-Storage Solution) (für 100 ml Medium)

LB	85 ml
PEG 6000, 10 % (w/v)	10 g
DMSO, 5 % (v/v)	5 ml
MgCl ₂ (1M)	10 ml

pH-Wert auf 6,5 eingestellt.

TY/Glycerin-Medium

Bacto Trypton	1,0 %
Hefeextrakt	0,5 %

pH auf 7,2 einstellen. Autoklaviertes TY-Medium und autoklaviertes 86 % Glycerin werden im Verhältnis 1:1 gemischt.

3.11.2 ALLGEMEIN VERWENDETE PUFFER

DNA-Auftragspuffer (10x)

Bromphenolblau	0,1 %
Glycerin	50,0 %
EDTA (0,5 M, pH 8)	49,9 %

Gelelektrophoresepuffer (TAE(50x)) (für 1 l Puffer)

Tris	15,0 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (Natrium-Salz)	18,6 g
dH ₂ O	ad 1,0 l

SDS-Laufpuffer(5x) (für 1 l Puffer)

Tris	15 g
Glycin	72 g
SDS	5 g
dH ₂ O	ad 1 l

TE 10:1

Tris/HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

Tris-Puffer

50 mM Tris-HCl pH 7,5

3.12 BAKTERIENSTÄMME UND PLASMID PCYTEXP1

3.12.1 *E. coli* DH5 α

Der in dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stamm wurde von Hanahan generiert (Hanahan 1983) und von Quyen modifiziert (Tabelle 9) (Quyen 1998).

Tabelle 9: Verwendeter *E. coli*-Stamm mit Genotyp und Resistenz

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 [φ80lacZΔM15] hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Quyen 1998)

3.12.2 DAS PLASMID PCYTEXP1

Das Plasmid pCYTEXP1 wurde von Quyen und Mitarbeitern als Vektor für die Expression der PCL gewählt. Das Plasmid hat eine Größe von 4985 bp und besitzt Amp^R als Selektionsmarker. Es enthält die starken Bakteriophagen-Promotoren P_R und P_L und wird durch einen Temperatur-empfindlichen Repressor des cIts857-Gens kontrolliert (Tabelle 10, Abbildung 23; Belev *et al.* 1991). Der λ-Promotor eignet sich in besonderem Maße zur Kontrolle der Expression eines Fremdgens in einem Plasmid.

Tabelle 10: Verwendetes Plasmid pCYTEXP1 mit Angabe von Genotyp und Resistenz.

Plasmid	relevanter Genotyp	Resistenz	Referenz
pCYTEXP1	cIts857, P _R P _L	Amp ^R	(Belev <i>et al.</i> 1991)

Das Plasmid pCYTEXP1 exprimiert ein eingebautes Gen nach Induktion in großen Mengen in *E. coli*. In einem Temperaturbereich zwischen 30°C und 37°C wird der Repressor exprimiert, der die Transkription des P_R bzw. P_L Promotors unterdrückt. Bei 42°C ist das Repressorgen inaktiviert. Das Repressorprotein kontrolliert den Promotor λP_L nicht länger und das Gen kann exprimiert werden, d.h. die Bindungsstelle für Ribosom wird für die Transkription frei.

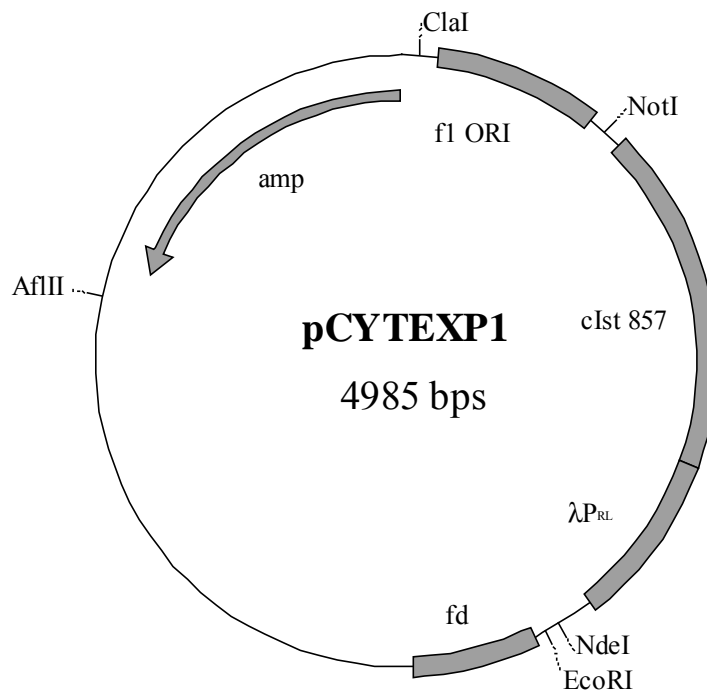


Abbildung 23: Das Plasmid pCYTEXP1 von Belev und Mitarbeitern war das Grundlage für die von Quyen *et al.* durchgeführten Modifikationen (Belev *et al.* 1991).

3.12.3 DAS PLASMID PT-LIPHP

Quyen und Mitarbeiter fügten sowohl das Gen der *Pseudomonas cepacia* Lipase ATCC 21808 (Lip) als auch das Gens des Helferproteins (Hp) in das pCYTEXP1-Plasmid ein (Quyen *et al.* 1999). Überexpression der Lipase in *E. coli* wurde am besten erzielt, wenn die Genfunktion durch den Temperatur-induzierbaren λP_L Promotor reguliert wurde und die Signalsequenz der Lipase entfernt wurde (Abbildung 24).

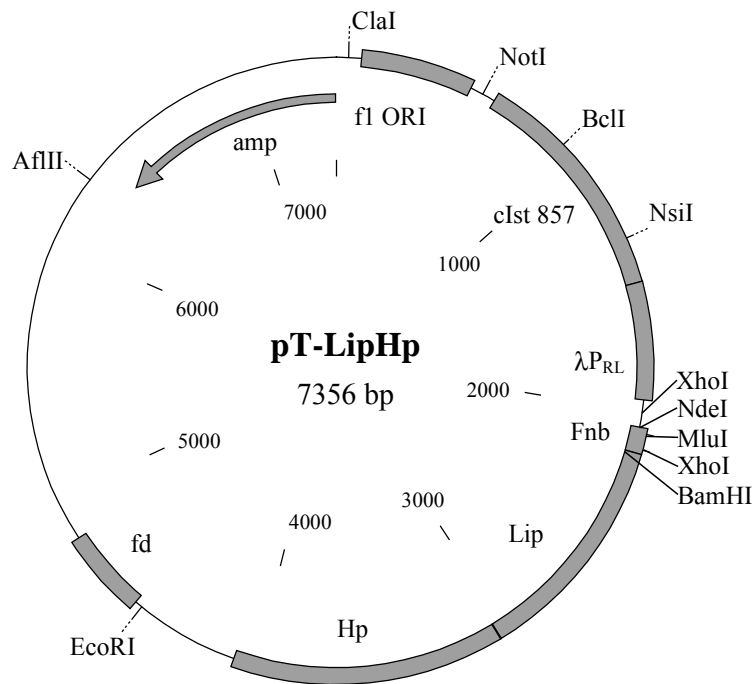


Abbildung 24: Das Plasmid pT-LipHp mit den Genen der PCL ATCC 21808 und des PCL-Helferproteins (Quyen *et al.* 1999).

3.12.4 DAS PLASMID OMPAΔ70HPHIS

Pseudomonas Lipasen der Klasse 1 und 2 benötigen ein Helferprotein, um die bei der Expression des Enzyms in *E. coli* anfallenden Einschlußkörper korrekt zu falten und aktive Lipase zu erhalten. Dabei erwies sich die von der Lipase unabhängige Expression des Helferproteins als Methode der Wahl. Da Helferproteine von *Pseudomonas* Lipasen sowohl als Membrananker fungieren als auch an der Faltung der Lipase während der Sekretion beteiligt sind, entfernten Quyen und Mitarbeiter 70 vorwiegend hydrophobe Aminosäuren vom N-terminalen Ende des Chaperones, um zu verhindern, daß die Überexpression des Proteins blockiert wird (Quyen *et al.* 1999).

Proteine, die vom Cytoplasma durch die cytoplasmatische Membran von *E. coli* ins Periplasma transportiert werden, besitzen in der Regel eine N-terminale Signalsequenz. Diese besteht in den meisten Fällen aus 20 bis 40 Aminosäuren und ist für das jeweilige Protein spezifisch. Diese Signalsequenzen können gezielt eingesetzt werden, um rekombinante Proteine aus dem Cytoplasma in das Periplasma zu überführen. So erhielten Quyen und Mitarbeiter durch Einführung einer ompA-Signalsequenz in das Gen des Helferproteins eine erhöhte Überexpression und Stabilität des Proteins (Abbildung 25). Diese geht zurück auf die im Periplasma gegenüber dem Cytoplasma günstigere Umgebung zur Ausbildung von

Disulfidbrücken für die korrekte Faltung des Proteins und die geringere Konzentration von Proteasen in dieser Umgebung. Die Gen-Regulation erfolgte auch im Chaperone durch den starken λP_L -Promotor.

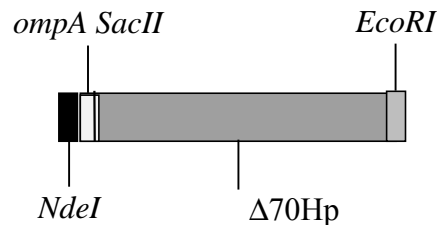


Abbildung 25: Das Plasmid *ompAΔ70Hp* des Helferproteins der PCL mit *ompA*-Signalsequenz, sowie einem um 70 Aminosäuren gekürzten Chaperonegen der PCL (Quyen *et al.* 1999).

3.13 STAMMHALTUNG

3.13.1 STAMMHALTUNG AUF FESTEN NÄHRBÖDEN

Die Stämme auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum wurden nach dem Anwachsen bei 37°C über Nacht mit Parafilm verschlossen und im Kühlraum bei 4°C gelagert.

3.13.2 ANLEGEN VON GLYCERINKULTUREN

Zur Langzeitlagerung wurden Einzelkolonien von der Agar-Platte in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum angeimpft und bis zu einer OD_{578} von 0,5-1,0 bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Kulturen bei 4500 Upm 5 min abzentrifugiert (Eppendorffzentrifuge), das Pellet in 2 x 1 ml TY/Glycerin-Medium resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -80°C aufbewahrt. Alternativ dazu wurden 500 μ l Übernachtskultur mit 500 μ l 75 % Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

3.14 ANZUCHT IN FLÜSSIGMEDIUM

Ausgehend von Einzelkolonien auf Agarplatten wurden 3 ml LB-Vorkulturen mit Selektionsantibiotikum angelegt und über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. Daraus wurden 200 ml oder 50 ml LB-Amp-Kulturen in 1000 ml- oder 250 ml- Erlenmeyerkolben mit einer 1:100 Verdünnung angeimpft und im Schüttler bei 37°C bis zur gewünschten Zelldichte inkubiert.

Messung der Zelldichte

Das Wachstum von *E. coli* DH5 α wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte, OD₅₇₈, bei 578 nm gegen Medium verfolgt.

Für *E. coli* DH5 α -Kulturen gilt im Bereich OD₅₇₈ = 0-0,3:

$$OD_{578} = 5 \times 10^8 \times N \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right)$$

Kulturen, mit einer OD₅₇₈ von über 0,3, mußten für die Messung mit LB auf eine OD₅₇₈ < 0,3 verdünnt werden.

3.15 MOLEKULARGENETISCHE METHODEN

3.15.1 POLYMERASE KETTENREAKTION, PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde 1986 von Mullis entwickelt. Sie findet breite Anwendung in der spezifischen Amplifizierung einer DNA-Vorlage, dem sogenannten *template* (Mullis *et al.* 1986). Ein Zyklus von drei Reaktionsschritten wird bis zu 40mal durchlaufen. Der erste Reaktionsschritt eines jeden Zyklus ist die Denaturierung des Doppelstranges der *template*-DNA bei ca. 95°C. Hierbei entsteht Einzelstrang-DNA. Der zweite Reaktionsschritt, *annealing* bzw. Anlagerungsschritt, wird in einem Temperaturbereich von 45°C–65°C durchgeführt. Die *annealing*-Temperatur hängt von der Schmelztemperatur des verwendeten Primers ab. Beim *annealing* lagert sich der entsprechende Primer an den zu ihm komplementären Einzelstrang an. Im darauf folgenden dritten Reaktionsschritt, der Extension, werden zwei neue DNA-Stränge synthetisiert. Dabei werden die Primer bei ca. 72°C am 3'-Ende verlängert, wobei die Reaktion durch thermostabile Polymerasen katalysiert wird. Diese beiden DNA-Stränge

dienen in den folgenden Zyklen als DNA-Vorlage. Aufgrund der exponentiellen Zunahme (2^n , n: Zahl der PCR-Zyklen) an DNA sind für die PCR nur geringe Mengen an *template*-DNA erforderlich.

Für die Durchführung einer PCR zur positionsgerichteten Mutagenese wird grundsätzlich ein äquimolares Gemisch aus Desoxy-Nucleotid-Triphosphat eingesetzt. Die Zusammensetzung eines solchen dNTP-Mixes war wie folgt:

dNTP-Mix

dATP (100 mM)	2,5 µl
dCTP (100 mM)	2,5 µl
dGTP (100 mM)	2,5 µl
dTTP (100 mM)	2,5 µl
ddH ₂ O	90,0 µl

3.15.2 POSITIONSGERICHTETE MUTAGENESE MIT QUIKCHANGE

Zum spezifischen Austausch von Aminosäuren in einem Gen werden Punktmutationen eingeführt. Hierfür werden zwei komplementäre Primer benötigt, mit dem gewünschten Basenaustausch in der Mitte. Als *template* dient das Plasmid mit dem zu mutierenden Gen. Auf den ersten Schritt der Polymerase Kettenreaktion, die Denaturierung des Plasmids, folgt im Anlagerungsschritt die Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge des Plasmids. Im Syntheseschritt wird das gesamte restliche Plasmid kopiert. Am Ende der PCR besitzen alle DNA-Stränge die entsprechende Mutation, mit Ausnahme der *template*-DNA. Diese liegt methyliert vor, da sie durch Plasmidisolierung aus Zellen gewonnen wird. Im Gegensatz hierzu sind die während der PCR *in vitro* gebildeten Tochterstränge nicht methyliert. Der Verdau der Elternstränge mit *DpnI*, das selektiv methylierte DNA angreift, läßt nur DNA übrig, die die gewünschte Mutation trägt. Die PCR erfolgt bei dieser Methode nicht als Kettenreaktion mit exponentiellem Wachstum. Es bilden sich lediglich $2n$ Tochterstränge. Für die ortsspezifische Mutagenese wurde das "QuikChange-Kit" (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wurde folgendermaßen abgewandelt:

Pipettierschema

10 x <i>Pfu</i> -Polymerase Puffer mit MgCl ₂	10 µl
dNTP-Mix (c = 2,5 mM)	2 µl
DMSO	10 µl
Primer <i>L287F forward</i> (c = 5 pmol/µl)	2,5 µl
Primer <i>L287F revers</i> (c = 5 pmol/µl)	2,5 µl
pT-LipHp (<i>template</i> -DNA) (c = 0,6 µg/µl)	2 µl
Turbo <i>Pfu</i> -Polymerase(1 U/µl)	2 µl
autoklaviertes dH ₂ O	69 µl

Einstellungen/Temperaturprogramm

Zur Einführung der Punktmutation L287F wurde folgendes Temperaturprogramm entworfen (Tabelle 11):

Tabelle 11: Temperaturprogramm der QuikChange-PCR bei der Einführung einer Punktmutation in das Plasmid pT-LipHp

Programmschritt	Denaturierung	<i>annealing</i>	Extension
1	95°C 7 min		
2 (20 Zyklen)	95°C 1 min	58°C 1 min 30 sec	68°C 15 min
3			68°C 20 min

Nach beendeter Reaktion wurde der Reaktionsansatz mit 1 µl *DpnI* versetzt und 2 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurden zur Entfernung von Salzen, die die Transformation negativ beeinflussen könnten, 15 µl des Ansatzes auf einen, auf bidestilliertem Wasser schwimmenden, Dialyse-Filter aufgetragen, 2 Std. bei Raumtemperatur dialysiert und anschließend der gesamte Ansatz in *E. coli* DH5α transformiert.

3.15.3 AUFTRENNUNG VON DNA DURCH AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Die analytische oder präparative Auftrennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe erfolgte durch Elektrophorese in einem Agarosegel. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle im angelegten elektrischen Feld zur Anode, wobei die

Wanderungsgeschwindigkeit von der Porengröße der Matrix (Agarose), der angelegten Spannung und der Größe der DNA-Moleküle abhängt. Um einen eindeutigen Zusammenhang von Molekülgröße und Molekularmasse zu erhalten, müssen die DNA-Moleküle vollständig linearisiert sein. Dies wird erreicht durch Zugabe von Ethidiumbromid, das sich in die DNA-Moleküle einlagert. Ethidiumbromid wird durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt und kann daher verwendet werden, um DNA-Fragmente sichtbar zu machen.

Herstellung eines 1%-igen Agarosegels und Durchführung der Elektrophorese

Die Agarose (1% (m/v)) wurde durch Aufkochen im Mikrowellengerät in 1 l 1x TAE-Puffer gelöst und bei 80°C aufbewahrt. Die auf ca. 60°C abgekühlte Gellösung wurde mit 0,0075 % (v/v) Ethidiumbromid versetzt und in den Gelträger mit eingesetztem Probenaschenkamm gegossen. Nach Abkühlung wurde das feste Gel mitsamt des Gelträgers in die Elektrophoresekammer gesetzt, mit 1x TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die DNA-Proben (1 Vol. DNA + 1 Vol. Auftragspuffer) wurden in die Probenaschen eingebracht. Als Größenstandard wurde ein kommerzieller DNA-Standard verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei max. 120 V so lange, bis die Bromphenolblau-Bande das Gel zu ca. 80 % durchlaufen hatte.

Zur Detektion wurde das Gel auf den UV-Leuchttisch gelegt. Das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 480 \text{ nm}$ zur Fluoreszenz angeregt. Damit konnte das DNA-Bandenmuster fotografiert werden. Die Intensität der Banden entspricht der Menge an dazugehöriger DNA. Allerdings ist dabei zu beachten, daß kleinere DNA-Moleküle bei gleicher Konzentration ein schwächeres Signal ergeben, da sie weniger Moleküle Ethidiumbromid einlagern können als größere DNA-Fragmente.

3.15.4 TRANSFORMATION IN *E. COLI* DH5 α

Herstellung kompetenter Zellen nach Chung et al. (Chung et al. 1989)

Aus einer LB-Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α ohne Selektionsantibiotikum wurden 50 ml LB-Medium 1:100 angeimpft und bei 37°C bis $OD_{578} = 0,4-0,6$ geschüttelt. Die Zellkultur wurde bei 3500 Upm und 4°C für 10 min zentrifugiert (Universal 30 F), der Überstand verworfen, das Pellet in 2 ml TSS Puffer (0°C) resuspendiert und für 2 Std. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in 200 μl Portionen aliquotiert und direkt transformiert.

Transformation von kompetenten DH5 α Zellen

Zu je 200 μ l kompetenter Zellen wurden 50 μ l mit *DpnI* verdaute und dialysierte DNA zupipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz jeweils 45 sec bei 42°C und für weitere 5 min auf Eis inkubiert und 1 ml LB-Medium zugegeben. Die Ansätze wurden dann bei 37°C 1 Std. unter Schütteln inkubiert und danach die Zellen bei 4000 Upm für 3 min bei 4°C abzentrifugiert. Das resuspendierte Pellet wurde auf LB-Amp Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.15.5 ISOLIERUNG VON NUCLEINSÄUREN

Mini-Plasmid-DNA-Isolation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)

Für Anwendungen, die besonders reine Plasmid-DNA erforderten, wie z.B. PCR- und Sequenz-Reaktionen, wurde diese Plasmid-Präparationsmethode verwendet. Sie beruht auf der alkalischen Lyse von Zellen (Birnboim und Doly 1979) und der spezifischen Bindung von DNA an Ionenaustauschersäulen.

Nach Abtrennung der Zellen von 1,5 ml einer Übernacht-Kultur durch Zentrifugation (14000 Upm, 1 min) wurde der Kulturüberstand verworfen und die Plasmid-Isolation aus den Zellen exakt nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Midi-Plasmid-DNA-Isolation mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen)

Diese Methode wurde zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA verwendet. Sie basiert auf den selben Prinzipien wie die Mini-Präparation.

Eine 50 ml Übernacht-Kultur wurde für 10 min bei 5000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die Plasmid-Isolation aus dem Zellpellet erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers.

3.15.6 VORBEREITUNG DER DNA ZUR SEQUENZIERUNG

Die DNA wurde mit 2 bis 3 Volumenteilen Ethanol (100 %, -20 °C) und 0,1 Volumenteil einer 3 M Na-Acetat Lösung (pH 6,5) gefällt. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min bei 0°C inkubiert und 20 min bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstands wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und schließlich in Resuspensionslösung aufgenommen.

3.15.7 DNA-SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der von Frederick Sanger entwickelten enzymatischen Ketten-Abbruch-Methode (Sanger *et al.* 1977). Dabei werden unterschiedlich lange DNA-Fragmente erzeugt, hervorgerufen durch eine kontrollierte Unterbrechung der Synthese mittels spezifischer Terminatoren (2',3'- Didesoxynukleosid-5'-triphosphate, ddNTPs), die zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden zum Reaktionsansatz gegeben werden. Die ddNTPs besitzen an ihrer 3'-Position keine OH-Gruppe. Dadurch kann ein entstehendes DNA-Fragment, nach dem statistischen Einbau eines Terminators, nicht mehr durch die Ausbildung weiterer Phosphodiester-Bindungen zum nächsten anzuhängenden 2'-Desoxynukleotid verlängert werden. Es kommt zum Kettenabbruch. In der Praxis werden vier separate Reaktionen, jede mit einem anderen ddNTP als Terminator, angesetzt und anschließend nebeneinander in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese der im Originalprotokoll durch radioaktiv markierte ddNTPs sichtbar gemachten, neu synthetisierten Fragmente, kann direkt aus dem Signalmuster die DNA-Sequenz abgelesen werden.

Bei der automatischen DNA-Sequenzierung mit dem *373A-DNA-Sequencer* von Applied Biosystems sind die vier ddNTPs mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und werden zusammen in einer Spur des Gels aufgetrennt (Prober *et al.* 1987; Freeman *et al.* 1990). Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch zwei Argonlaser mit Emissionsbanden von 488 nm und 514 nm angeregt und detektiert. Diese Vierfarbentechnik erhöht sowohl den Durchsatz pro Gel als auch die Geschwindigkeit der Datenerfassung, die bereits während des Gellaufs durch einen angeschlossenen Rechner erfolgt.

Die Verwendung thermostabiler Polymerasen erlaubt die zur PCR (Mullis *et al.* 1986) analoge zyklische Sequenzierung, bei der die enzymatischen Sequenzreaktionen mit einem Primer über mehrere Zyklen durchgeführt werden. Dies erfordert nur geringere Mengen an Ausgangs-DNA und erlaubt andererseits die Automatisierung.

Gellösung

Rotiphorese	NF-Harnstoff	30,0 g
Rotiphorese	NF-10x-TBE-Puffer	6,0 ml
Rotiphorese	NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (29:1)	9,0 ml
ddH ₂ O		23,5 ml

Die fertige Lösung wurde durch eine Membran (Porengröße 0,22 μm) filtriert und entgast. Gestartet wurde die Polymerisation durch Zugabe von 24 μl TEMED und 180 μl 10 % (m/v) APS.

Resuspensionslösung

Formamid	80 % (v/v)
25 mM EDTA, pH 8,0	20 % (v/v)

Gießen des Polyacrylamidgels

Um die exakte Erfassung der Fluoreszenzsignale während des Gellaufs zu gewährleisten, wurden die Glasplatten vor dem Gießen des Gels mit dem Detergenz Alkanox und Wasser gereinigt, und anschließend mit Isopropanol poliert.

Durch die Zugabe von APS und TEMED zur Gellösung, wurde die Polymerisation gestartet. Die Gellösung wurde zwischen die durch Abstandshalter (*spacer*) getrennten Glasplatten gegossen, der "Vorkamm" eingesetzt und die Platten mit Klammern während der zweistündigen Polymerisationszeit abgedichtet. Anschließend wurden die Klammern entfernt, der "Vorkamm" durch einen "Haifisch-Kamm" ersetzt und das Gel in den Sequenzierer eingebaut. Nach Kontrolle des Basissignals erfolgte ein einstündiger Vorlauf (28 W, 18-20 mA).

Die zyklische Sequenzreaktion

Der Ansatz zur zyklischen Sequenzreaktion wurde mit dem *Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* und der AmpliTaq DNA Polymerase FS angesetzt. Da im *Terminator Ready Reaction Kit* bereits die benötigten Mengen an dNTPs, Terminatoren, Salzen, Puffer und Polymerase vorliegen, mußten lediglich die zu sequenzierende DNA, der Sequenzier-Primer und Wasser zugegeben werden. Damit wurde der endgültige Reaktionsansatz wie folgt auf Eis pipettiert:

<i>Terminator Ready Reaction Mix</i>	4 μl
Sequenzier-Primer	3,2 pmol
DNA	300-500 ng
ddH ₂ O	ad 20 μl

Die Sequenzierreaktion erfolgte im Thermocycler unter den in Tabelle 12 angegebenen Bedingungen:

Tabelle 12: Temperaturprogramm für die zyklische Sequenzierreaktion

Programmschritt	Denaturierung	<i>annealing</i>	Extension
1	95°C 6 min	-	-
2 (25x)	95°C 40 sec	55°C 30 sec	60°C 4 min
3	-	-	60°C 4 min

Die Sequenzierprodukte wurden durch Ethanolfällung gereinigt. Der getrocknete Niederschlag an DNA wurde in 4 µl Resuspensionslösung gelöst, 3 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und nach kurzer Zentrifugation in die Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht nach den vom Hersteller empfohlenen Programmparametern (2500 V, 40 mA, 30 W).

3.16 BIOCHEMISCHE METHODEN

3.16.1 POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Mittels PAGE können Proteine in analytischem oder präparativem Maßstab nach Größe von entfalteter oder gefalteter Proteinkette (SDS- und native PAGE) oder nach dem relativen Gehalt an sauren und basischen Gruppen (isoelektrische Fokussierung) aufgetrennt werden (Laemmli 1970). Dabei wandern die Proteine unter dem Einfluß des angelegten elektrischen Feldes durch die Poren eines Polyacrylamidgels, wobei die Wanderungsrichtung und -geschwindigkeit von der Ladung der Proteine, der Porengröße des Gels und der angelegten Spannung abhängen. Während die Auftrennung der Proteine bei der nativen PAGE im nicht-denaturierten Zustand erfolgt, werden die Proteine zur Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht durch Bindung des Detergenz SDS proportional zu ihrer Größe negativ geladen (ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste) und denaturiert. Bei der isoelektrischen Fokussierung erfolgt die Wanderung der Proteine in einem Gel ohne SDS-Zusatz mit genau definiertem pH-Gradienten (Righetti und Drysdale 1974). Da die Nettoladung eines Proteins von der Anzahl seiner positiv und negativ geladenen Aminosäuren und somit vom pH-Wert

der Umgebung abhängig ist, endet die Wanderung an dem Punkt im pH-Gradienten, dem isoelektrischen Punkt (pI), an dem die Anzahl der negativen und positiven Ladungen gleich ist. Die Nettoladung ist hier gleich Null und somit auch die Beweglichkeit im elektrischen Feld.

Puffer und Lösungen

4x-Sammelgel-Puffer

Tris	12,1 g
SDS	0,8 g
ddH ₂ O	ad 200 ml
Mit HCl auf pH 6,8 einstellen	

4x-Trenngel-Puffer

Tris	36,5 g
SDS	0,8 g
ddH ₂ O	ad 200 ml
Mit HCl auf pH 8,8 einstellen	

Sammelgel (4%)

Acrylamidlösung (30/0,8) 30 % (m/v)	0,52 ml
4x-Sammelgel-Puffer	1 ml
ddH ₂ O	2,47 ml
TEMED	4 µl
APS 10 % (m/v)	40 µl

Trenngel (12,5%)

Acrylamidlösung (30/0,8) 30 % (m/v)	3,33 ml
4x-Trenngel-Puffer	2 ml
ddH ₂ O	2,67 ml
TEMED	4 µl
APS 10 % (m/v)	40 µl

2x-SDS-Proben-Puffer (Sambrook et al. 1989)

Tris	100 mM
DTT	200 mM
SDS	4 %
Bromphenolblau	0,2 %
Glycerin	20 %
ddH ₂ O	ad 10 ml

Elektrophorese-Puffer

Tris	6 g
Glycin	28,8 g
SDS	2 g
ddH ₂ O	ad 2 l

Mit HCl auf pH 8,3 einstellen

Fixierlösung

Methanol	400 ml
Essigsäure	100 ml
dH ₂ O	500 ml

Herstellung des SDS-Gels und Durchführung der Elektrophorese

Zunächst wurde zwischen die beiden gründlich gereinigten, durch Abstandshalter getrennten und zusammen geklammerten Glasplatten die Trenngellösung luftblasenfrei bis ca. 2,5 cm unter den oberen Rand gegossen und mit etwa 200 µl Isobutanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels (20 min bei Raumtemperatur) wurde das Isobutanol entfernt, die Sammelgellösung auf das mit dH₂O gespülte Trenngel gegossen und der Probenaschenkamm eingesetzt. Nach weiteren 20 min konnten die Klammern, der Abstandshalter und der Probenaschenkamm entfernt und die Probenaschen mit dH₂O gespült werden. Das so vorbereitete Gel wurde zur Durchführung der Elektrophorese in die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoreseapparatur eingesetzt.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen 1:1 mit 2x-SDS-Probenpuffer verdünnt, 5 min bei 95°C denaturiert und kurz zentrifugiert. Als Molekulargewichts-Standard wurden 5 µl bis 10 µl LMW-Standard (siehe Tabelle 13) aufgetragen.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Proteinstandards, *low molecular weight* Standard (LMW)

Protein	Molekulargewicht [kDa]
Phosphorylase B	97,4
BSA	66,3
Ovalbumin	45,0
Carboanhydrase	31,0
Trypsininhibitor	21,5
Lysozym	14,4

Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA pro Gel bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreicht hatte, bzw. bereits aus dem Gel in den Elektrophoresepuffer gewandert war. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine im Gel gefärbt.

Coomassie-Blue Färbung von Polyacrylamidgelen

Nach beendeter Elektrophorese wurden die Glasplatten und der Abstandhalter entfernt und das Gel für mehrere Stunden in der wäßrigen Färbelösung aus 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 30 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure geschwenkt. Anschließend wurde die Fixierlösung abdekantiert und das Gel zweimal für 2 bis 3 min in demineralisiertem Wasser (60°C) gespült. Das Gel wurde über Nacht in wäßriger Lösung mit 30 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt. Abschließend wurde noch dreimal mit demineralisiertem Wasser gespült. Zur Aufbewahrung wurde das Gel luftblasenfrei zwischen Filterpapier und eine Kopierfolie gelegt und 2 Std. im Geltrockner bei 80°C im Vakuum getrocknet.

3.17 EXPRESSION DER REKOMBINANTEN PCL UND HELFERPROTEIN

3.17.1 FERMENTATION IM 5 L UND 25 L MAßSTAB

Die Vorkultur der Fermentation wurde hergestellt durch Animpfen von 500 ml LB-Amp-Medium (Ampicillin 100 µg/ml) mit 100 µl Glycerin-Dauerkultur und anschließender Vermehrung bei 30°C über Nacht im Schüttler (200 Upm). Die Übernacht-Kultur wurde in 4,5 l steriles LB-Amp-Medium gegeben. Die Kulturbrühe wurde 2 bis 3 Std. bei 30°C, 500 Upm, bis zu einer OD₅₇₈ von 0,9 bis 1,0 inokkuliert. Anschließend wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch Aufheizen des Fermenters auf 42°C für 4 Std. induziert

(500 Upm). Abschließend wurden die Zellen geerntet, durch *cross-flow* Filtration aufkonzentriert, bei 4°C, 4000 Upm 20 min abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

Da sowohl Wildtyp als auch die L287F-Mutante der PCL beim Zellaufschluß als inaktive Einschlußkörper anfallen, wurde für beide Lipasen Helferprotein ompAΔ70Hp benötigt.

500 ml LB-Amp-Medium (100 µg/ml) wurden mit 100 µl Glycerin-Dauerkultur angeimpft und über Nacht bei 30°C im Schüttler (200 Upm) vermehrt. Die Übernacht-Kultur wurde zu 24,5 l sterilem LB-Amp-Medium zugegeben. Das Zellwachstum erfolgte über vier Std. bei 30°C unter Rühren (500 Upm) bis zu einer OD₅₇₈ von 0,8. Anschließend wurden die Zellen bei 42°C durch die Hitzeschockmethode induziert und für weitere 4 Std. gerührt. Die Zellernte erfolgte über *cross-flow* Filtration und anschließende Zentrifugation (4°C, 4000 Upm, 20 min). Die Biofeuchtmasse wurde bei -20°C gelagert.

3.18 ZELLAUFSCHLUß UND UMFALTUNG DER *PSEUDOMONAS CEPACIA* LIPASE

Sowohl PCL als auch Helferprotein wurden in Abwandlung der Methode von Quyen *et al.* chemisch in *Refolding*-Puffer B aufgeschlossen (Quyen *et al.* 1999).

Refolding-Puffer B (500 ml)

Tris	0,61 g
Harnstoff (8M)	240 g
Na ₂ HPO ₄	3,55 g

Mit dH₂O auffüllen und mit HCl auf pH 8,0 einstellen.

Ca. 5 g Biofeuchtmasse *E. coli* Zellen wurden in 25 ml *Refolding*-Puffer B aufgenommen und für 6 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Der Zellaufschluß des Helferproteins erfolgte durch Rühren einer Suspension von 10,11 g Biofeuchtmasse und 35 ml *Refolding*-Puffer für ebenfalls 6 Std.

Wildtyp PCL	5,16 g in 25 ml <i>Refolding</i> -Puffer B
PCL L287F	5,07 g in 25 ml <i>Refolding</i> -Puffer B
ompAΔ70Hp	10,11 g in 50 ml <i>Refolding</i> -Puffer B

Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 4°C, 4000 Upm für 20 min abzentrifugiert. 25 ml Lipase-Überstand und 25 ml Überstand des Helferproteins wurden in 25 l demineralisiertem Wasser aufgenommen, gerührt und für 2 Wochen bei 4°C inkubiert.

3.19 PROTEINGEWINNUNG

3.19.1 CROSS-FLOW FILTRATION

Die Aufkonzentration des Lipase-Chaperone Gemisches erfolgte durch *cross-flow* Filtration über eine 10 kDa Membran der Firma Omega (Stamford, CT, USA) bis zu einem Endvolumen von 50 ml. Anschließend wurde die Membran mit mehreren Litern 0,1 N NaOH und dH₂O gereinigt. Die je 50 ml Lipase-Lösung wurden auf je zwei Petrischalen verteilt und bei -20°C eingefroren.

3.19.2 LYOPHYLISIERUNG

Die Petrischalen mit den tiefgefrorenen wäßrigen Lösungen von Lipase und Helferprotein wurden für 36 Std. im Gefriertrockner lyophilisiert und anschließend bei -20°C gelagert. Eine weitere Aufreinigung erfolgte nicht.

3.20 BESTIMMUNG DER LIPASEAKTIVITÄT

Ein photometrischer Assay wurde durchgeführt, um die Aktivität von Wildtyp PCL und L287F-Mutante zu bestimmen. Basierend auf der Methode von Winkler und Stuckmann (Winkler und Stuckmann 1979) wurde der pNPP-Assay in folgender Modifikation durchgeführt:

Puffer und Lösungen

Tris-HCl Puffer (500 ml)

Tris, 100 mM	6,04 g
Na-Cholat, 0,8% (w/v)	3,98 g
<i>Gummi arabicum</i> , 1,0% (w/v)	4,99 g

Das Gemisch wurde in 500 ml demineralisiertem Wasser aufgenommen und auf pH 7,5 eingestellt.

pNPP-DMSO-Lösung (10 ml)

<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat, 10 mM	37,75 mg
DMSO	10 ml

Das pNPP wurde in DMSO aufgenommen und sofort verwendet.

Durchführung

In einer 1 ml Einwegküvette wurden zu 800 µl bis 890 µl Tris-HCl Puffer 10 µl bis 100 µl geeignet verdünnte Lipaselösung und 100 µl pNPP-DMSO zu einem Gesamtvolumen von 1 ml zupipettiert. Die Kinetik wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 410$ nm gegen ein Gemisch aus 9 Volumenteilen Tris-HCl Puffer und 1 Volumenteil pNPP-DMSO aufgenommen. Unter den verwendeten Reaktionsbedingungen entsprach 1 U der Enzymmenge, die pro Minute 1 µmol *p*-Nitrophenol freisetzt.

3.21 UNTERSUCHUNGEN ZUR *sn*-2 REGIOSELEKTIVITÄT VON LIPASEN

3.21.1 STRUKTURIERTE TRIACYLGLYCERIDE

Das strukturierte Triacylglycerid OPO (Abbildung 8) wurde verwendet um zu untersuchen, ob Lipasen in der Lage sind, *sn*-2 Estergruppen in Triacylglyceriden zu spalten oder ob die entsprechenden Produkte lediglich das Resultat einer Acylwanderung sind (siehe auch Kapitel 1.3.1). Die im Experiment verwendeten Lipasen sind in Tabelle 14 aufgeführt. OPO wurde synthetisiert von Ulrike Schmid, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart (Schmid *et al.* 1999).

Da CRL langkettige Triacylglyceride weniger gut umsetzt als mittel- oder kurzkettige, wurde für CRL die Umsetzung mit POP durchgeführt.

Tabelle 14: Die zur Untersuchung der *sn*-2 Regioselektivität verwendeten Lipasen. Alle untersuchten Lipasen wurden auf Polypropylen EP100 immobilisiert.

Lipase	Handelsname	Hersteller
CAL A	Chirazyme -L-5, Lyo.	Boehringer Mannheim, Mannheim
CRL	Amano AYS	Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Nagoya, Japan
RDL	-	Unilever B.V., Niederlande

3.21.2 IMMOBILISIERUNG DER LIPASEN

CAL A und CRL wurden auf dem Polypropylen-Trägermaterial EP 100 nach einer Methode von Schmid *et al.* immobilisiert (Schmid *et al.* 1999). Dabei wurden 150 mg EP100 mit 500 µl Ethanol gemischt. 10 mg Lipase wurden in 2,5 ml Natriumphosphat-Puffer gelöst, dem Trägermaterial beigemischt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die immobilisierte Lipase wurde filtriert, dreimal mit Natriumphosphat-Puffer gewaschen und lyophilisiert. Das Immobilisat von RDL auf Polypropylen wurde von Unilever B.V. erhalten.

3.21.3 MESSUNG DER HYDROLYTISCHEN AKTIVITÄT DER IMMOBILISATE

Die Messung der hydrolytischen Aktivität der immobilisierten Lipasen erfolgte in einer Olivenöl-Emulsion durch einen pH-Stat Assay. 10 ml Olivenöl und 4 g *Gummi arabicum* wurden in 200 ml demineralisiertem Wasser im Ultraturrax emulgiert. Für den Assay wurden 20 ml Emulsion, 470 µl Calciumchlorid-Lösung (22%, w/v) und ca. 10 mg Lipase (CAL A: 11,93 mg, CRL 11,44 mg, RDL: 11,34 mg) gemischt. Die bei der Umsetzung frei werdenden Fettsäuren wurden automatisch mit 0,1 M Natronlauge titriert, um einen konstanten pH-Wert von 7,5 einzuhalten. 1 U Lipaseaktivität entspricht der Menge an Enzym, die 1 µmol Fettsäure pro Minute freisetzt (Schmid *et al.* 1999).

3.21.4 ALKOHOLYSE VON STRUKTURIERTEN TRIACYLGLYCERIDEN

In einem typischen Ansatz (Schmid *et al.* 1999) wurden 30 mg Substrat in 1 ml Aceton aufgenommen und mit 20 µl Ethanol (getrocknet über 3 Å Molekularsieb) vermischt. Die

Reaktion wurde durch Zugabe von 15 U immobilisierter und auf eine Wasseraktivität von $a_w = 0,43$ eingestellte Lipase (ca. 3 mg) gestartet. Die Reaktionstemperatur betrug 60°C, Probenentnahme erfolgte nach 27 Std. und 150 Std. Im Fall der Reaktion von CRL mit POP wurden zu 30 mg POP 15 U Immobilisat zugegeben. Probenentnahme (10 µl) erfolgte nach 27 Std. und 150 Std.

3.21.5 ERMITTLUNG DER PRODUKTVERTEILUNG MITTELS GC-ANALYSE

Das Lösungsmittel der entnommenen Proben wurde im Stickstoffstrom entfernt und der Niederschlag durch Zugabe von 10 µl *N*-Methyl-*N*-trimethylsilylheptafluorbutyrat (MSHFBA) derivatisiert. Das MSHFBA setzt die frei werdenden Fettsäuren zu den entsprechenden Trisilylmethylestern um. Zudem werden freie Hydroxylgruppen von Alkoholen silyliert. Nach Zugabe des MSHFBA wurden die Proben 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 70 µl Methylenchlorid verdünnt.

Die GC-Analyse erfolgte auf einem Fisons GC mit FID auf einer unpolaren Säule (Optima 5). Die Chromatographiesäule wurde auf 200°C (2 min) vorgeheizt und in Schritten zu 8°C pro Minute bis zu einer Endtemperatur von 360°C erhitzt. Als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet. Der eingestellte Gasdruck war 130 kPa. Die Temperatur von Injektor und Detektor betrug 370°C. Die Verwendung dieser GC-Analytik erlaubte die Trennung von Estern, Fettsäuren, Mono-, Di- und Triacylglyceriden sowie den Isomeren von 1(3)- und 2-Monopalmitin bzw. 1,3- und 1,2(2,3)-Dipalmitin (Schmid *et al.* 1999).

4 ERGEBNISTEIL

4.1 CHARAKTERISIERUNG DER SUBSTRATBINDUNGSTASCHEN FÜR LIPASEN

Lipasen aus *Mucorales*

Die Lipasen ROL und RML aus *Mucorales* besitzen 56% identische und zusätzlich weitere 14% ähnliche Aminosäuren. Eine Übersicht über die Homologie gibt Abbildung 26.

ROL	1	S-DGGKVAATTAQIQEF ²⁶⁸ TKYAGIAATAY ²⁶⁸ CRSVVPGNKWDCVQCQKWVDPGKIIT
RML	1	SIDGG-IRAATSQEINELTY ²⁶⁸ TTLSANSY ²⁶⁸ CRTVIPGATWDCIHCD-ATEDLKI ²⁶⁸ IK
consensus	1	* ** . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
ROL	55	TFTSLLSDTNGYVLRSDKQKTIYLVFRGINSFRSAITDIVFNFS ²⁶⁸ DKPVKGAKVH
RML	54	TWSTLIYDTNAMVARGDSEKTIYIVFRGSSSIRNWIADLTFV ²⁶⁸ PVSYPVSGTKVH
consensus	55	* . . * . * . . * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
ROL	110	AGFLSSYEQVVDYFV ²⁶⁸ VQEQ ²⁶⁸ LTAHPTYKVI ²⁶⁸ VTGHSLGG ²⁶⁸ QAALLAGMDLYQREPR
RML	109	KGFLDSYGEVQNELVATVLDQ ²⁶⁸ FKQY ²⁶⁸ PSYKVAVTGHSLGG ²⁶⁸ AALLCALDLYQREEG
consensus	110	** * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
ROL	165	LSPKNLSIFTVGGPRVGNPTFAYYVESTGIPFQRTVHKRDIVPHVPPQSFGFLHP
RML	164	LSSSNLFLYTQGGPRVGDPAFANYVVSTGIPYRRTVNERDIVPHLPAAFGFLHA
consensus	165	** * * . * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
ROL	220	GVESWIKSG-TSNVQICTSEIETKDCS ²⁶⁸ NSIVPFTSLLDHL ²⁶⁸ SYFDINEGS ²⁶⁸ CL
RML	219	GEEYWITDNSPETVQVCTSDLETSDCS ²⁶⁸ NSIVPFTSLLDHL ²⁶⁸ SYFGINTGL ²⁶⁸ CT
consensus	220	* * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

Abbildung 26: Sequenzalignment der reifen Lipasen ROL und RML aus *Mucorales*. Beide Lipasen besitzen 56 % identische ("*") bzw. 70 % identische und ähnliche Reste ("*" und "."). Die katalytische Triade ist hervorgehoben in rot (z.B. S145), die Reste des *hydrophobic crevice* in grün (z.B. T83), der *hydrophobic dent* in gelb (z.B. L258). Die Aminosäuren 265 bis 267 sind grau (z.B. G266). Die Cystein-Reste, die die Disulfidbrücke zwischen dem C- und N-Terminus ausbilden sind durch einen Kasten hervorgehoben (z.B. C268). Das lid reicht von N84 (ROL) bzw. S83 (RML) bis F97 (ROL) bzw. P96 (RML).

Die Charakterisierung der Form und chemischen Umgebung der Substrat-Bindungstaschen von ROL und RML ergab, daß in beiden Lipasen das katalytische Zentrum in einer Art flachen Schale (Pleiss *et al.* 1998) lokalisiert ist, an deren Wänden zwei hydrophobe Bereiche sitzen, an die eine Fettsäurekette binden kann (Abbildung 27). Der große und tiefe *hydrophobic crevice* (Abbildung 27: grün) besteht bei ROL aus T83, A89, I93, F95, F112, L146, P178, V206, V209, P210 und F216, bei RML aus S82, W88, L92, F94, F111, L145, P177, V205, L208, P209 und F215. Der flachere *hydrophobic dent* (Abbildung 27: orange) wird bei ROL aus den Aminosäuren I205, T252, L254 und L258 gebildet, bei RML aus I204, T252, V254 und L258. In Abbildung 27 sind die Substratbindungsstellen von ROL (links) und RML (rechts) nach der Oberflächendarstellung von Connolly abgebildet (Connolly 1983).

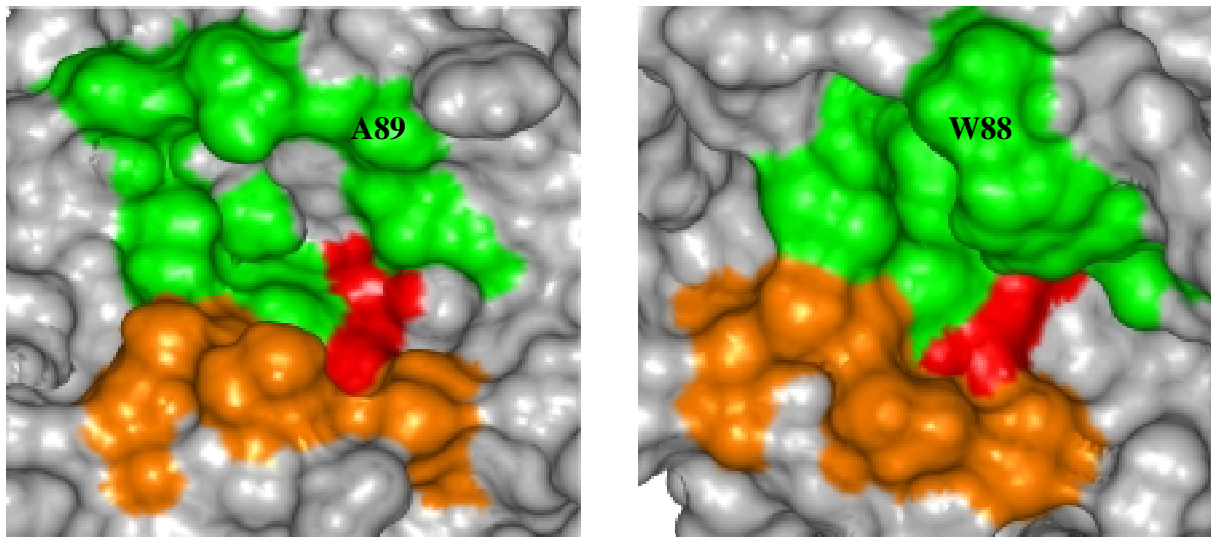


Abbildung 27: **Links:** Die Substratbindungsstelle der ROL. **Rechts:** Die Substratbindungstasche der RML. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot, die des *hydrophobic crevice* grün, die des *hydrophobic dent* orange eingefärbt. Die Form beider Bindungstaschen ist weitgehend ähnlich. Es fällt jedoch auf, daß in RML mit W88 ein großer hydrophober Rest Teil des *hydrophobic crevice* ist, dessen entsprechender Nachbar in ROL das deutlich kleinere A89 ist.

Die Bindung eines Triacylglycerids bzw. Analogons an die *sn*-1(3) regioselektiven Lipasen aus *Mucorales* erfolgte nach folgendem Schema: Die hydrolysierte *sn*-1(3) Fettsäurekette wurde in den *hydrophobic crevice* orientiert unter besonderer Berücksichtigung der kovalenten Bindung zwischen Carboxyl-Kohlenstoff und O γ des aktiven Serins sowie der Orientierung des Oxyanions in das *oxyanion hole*. Die Bindung des *sn*-2 Substituenten erfolgte an den *hydrophobic dent*. Die nicht-hydrolysierte *sn*-3(1) Fettsäure bleibt frei, d.h. ohne spezifische Wechselwirkung mit dem Protein. Zusätzlich zum eben beschriebenen *sn*-2 *down* Bindungsmodus existiert noch ein zweiter, alternativer Bindungsmodus (*sn*-2 *up*), in dem die hydrolysierte *sn*-1(3) Fettsäurekette gleichfalls an den *hydrophobic crevice* bindet, der *hydrophobic dent* jedoch von der nicht-hydrolysierten *sn*-3(1) Fettsäurekette besetzt wird und der *sn*-2 Substituent ohne spezifische Bindung an die Lipase bleibt. Der *sn*-2 *up* Bindungsmodus wurde für die RML nicht untersucht (siehe Kapitel 4.2.1).

PCL

Die Bindungstasche der PCL entspricht einem elliptischen Trichter (Pleiss *et al.* 1998), dessen Spitze das katalytische Zentrum bildet und an dessen Wänden drei Bereiche auftreten, an die die Substituenten eines Substrats anlagern können. Wie die Lipasen aus *Mucorales* besitzt auch die PCL einen *hydrophobic crevice* zur Bindung der hydrolysierten *sn*-1(3)

Fettsäurekette sowie einen *hydrophobic dent*, zur Bindung des *sn-2* Substituenten (*sn-2 down* Bindungsmodus) bzw. der nicht-hydrolysierten *sn-3(1)* Fettsäurekette (*sn-2 up* Bindungsmodus). Der *hydrophobic crevice* der PCL wird gebildet aus den Aminosäuren L17, P113, S117, F119, V123, L164, L167 und V267, der *hydrophobic dent* aus L248, T251, V266 und L287. Die dritte Bindungsregion teilt die Alkoholbindungstasche in zwei Teile. Neben dem *hydrophobic dent* besitzt die PCL die sogenannte *cavity*, ein Strukturelement bestehend aus fünf unpolaren (V26, L27, F146, I290 und L293) und fünf polaren Aminosäuren (T18, Y29, P243, S244 und Q292). Abbildung 28 zeigt die Bindungstasche der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* nach der Oberflächendarstellung von Connolly (Connolly 1983).

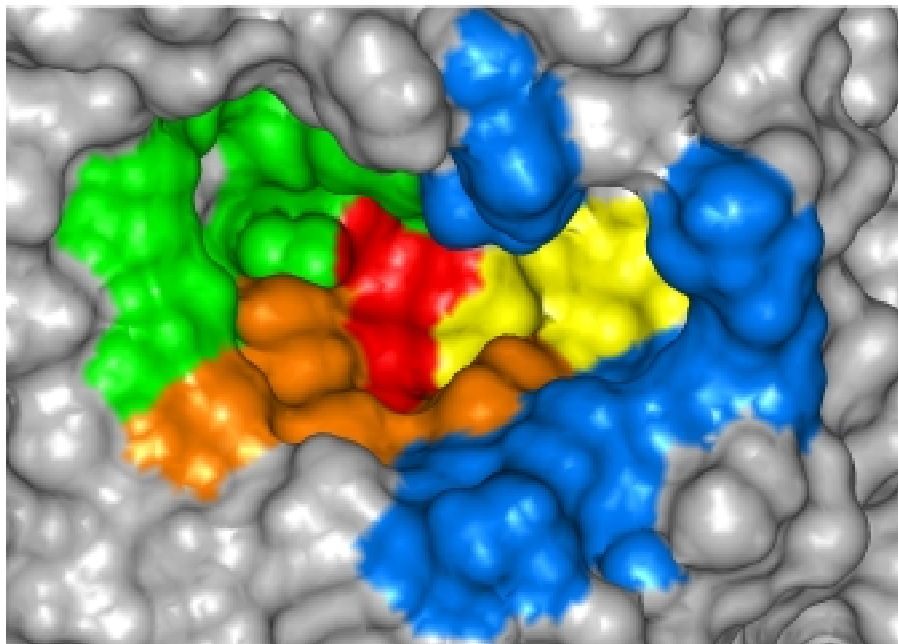


Abbildung 28: Die Substratbindungstasche der PCL. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot, die des *hydrophobic crevice* grün, die des *hydrophobic dent* orange, die der *cavity* blau und die der *wall* gelb eingefärbt. Die Oberflächendarstellung der Lipase erfolgt nach Connolly (Connolly 1983).

Untersuchungen zur Stereoselektivität von PCL bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und deren Analoga erfolgte an Enzym-Substrat-Komplexen, die das Substratmolekül sowohl in *sn-2 down* als auch im *sn-2 up* Bindungsmodus gebunden enthielten. Die für die *molecular modeling* Studien zur Enantioselektivität von PCL bei der Umsetzung mit primären Alkoholsubstraten wichtigen Regionen BTM und BTL bestehen bei der PCL aus L17, H86 und L287 (BTM) bzw. dem offenen Teil der Alkoholbindungstasche (BTL) (Kazlauskas 1994; Kazlauskas 1995).

CRL

Die Lipase aus *Candida rugosa* besitzt in ihrer Substrat-Bindungstasche einen hydrophoben Tunnel, in den sich die zu spaltende Fettsäurekette hinein orientiert. Die Alkoholbindungsstelle des Enzyms ist sehr groß und bietet einer Vielzahl auch sterisch anspruchsvoller Alkoholreste Platz. Der *hydrophobic tunnel* besteht aus den folgenden Aminosäuren: G124, F125, M213, V245, P246, S247, L302, L304, L307, F345, F415 und V534, der *hydrophobic dent* aus P65, L78, V81, M82, G124, G127, F296, F344 und F345. Wie die PCL besitzt auch die CRL eine dritte Bindungstasche, *cavity*, aus polaren und unpolaren Aminosäuren: G122, T132, F133, E208, S450, I453, V454, Y458. Abbildung 29 zeigt die Bereiche der CRL Bindungstasche, an die unpolare Reste binden können. Untersuchungen zur Stereoselektivität bei der Spaltung von Fetten und Analoga wurden in beiden Bindungsmodi (*sn-2 down* und *sn-2 up*) des Substrats durchgeführt.

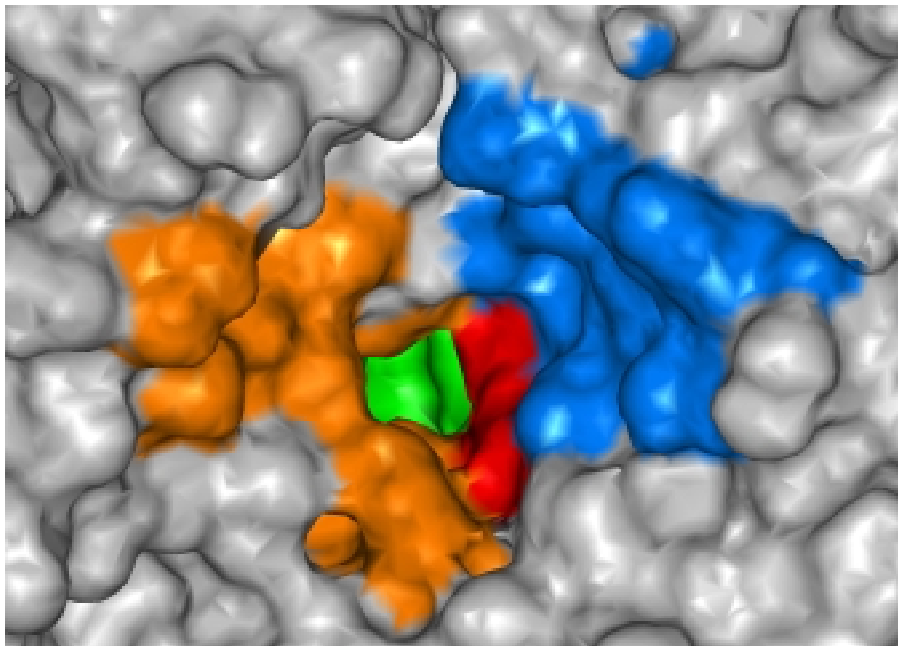


Abbildung 29: Die Substratbindungstasche der CRL. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot, die des *hydrophobic tunnel* grün, die des *hydrophobic dent* orange und die der *cavity* blau eingefärbt. Die Oberflächendarstellung der Lipase erfolgt nach Connolly (Connolly 1983).

CAL B

Die Bindungstasche der CAL B ist im Gegensatz zur CRL flach und eng. Die zu hydrolysierende Fettsäurekette bindet an den *hydrophobic crevice*, der aus den Aminosäuren T40, Q106, L109, D134, T138, A141, L144, V154 und Q157 besteht. Die Länge der ungehindert durch CAL B umgesetzten Fettsäureketten ist beschränkt durch L144. Fettsäuren, die länger als C8 sind, müssen sich um diese Aminosäure herum orientieren. Es resultiert ein ungünstiger Knick bei der Bindung des Substrats.

Dem *hydrophobic crevice* direkt benachbart ist der *hydrophobic dent*. Er wird aus den Aminosäuren E188, I189, I285 und V286 aufgebaut. Die Größe der Alkoholbindungstasche wird jedoch stark eingeschränkt durch L278, das zur dritten Bindungsregion der CAL B gehört. Diese flache hydrophobe Region, *cavity*, besteht außer L278 aus A279, A281 und A282. Durch die flache Form der Bindungstasche wird eine Bindung sperriger Alkoholreste ermöglicht, in dem der Rest, aus der Lipase heraus, in den Fetttropfen ragt. Abbildung 30 zeigt die einzelnen Bereiche der Bindungstasche von CAL B nach der Oberflächendarstellung von Connolly (Connolly 1983).

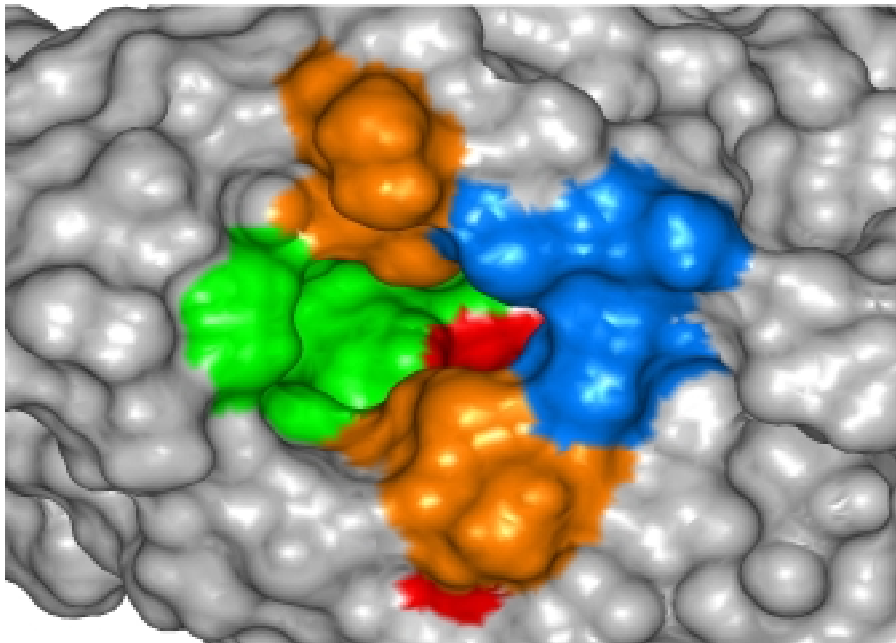


Abbildung 30: Die Substratbindungstasche der CAL B. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot, die des *hydrophobic crevice* grün, die des *hydrophobic dent* orange und die der *cavity* blau eingefärbt. Die Oberflächendarstellung der Lipase erfolgt nach Connolly (Connolly 1983).

4.2 STEREOSELEKTIVITÄT VON LIPASEN BEI DER HYDROLYSE VON TRIACYLGLYCERIDEN UND ANALOGA

4.2.1 EINFLUSS DES SUBSTRATS AUF DIE STEREOSELEKTIVITÄT

Wildtyp ROL

Die stereoselektive Hydrolyse von fünf Triacylglyceriden und Analoga mit *sn*-2 Substituenten unterschiedlicher Größe und chemischer Struktur durch die *sn*-1(3) regioselektive Lipase aus *Rhizopus oryzae* wurde mit *molecular modeling* Methoden untersucht. Die Substrate konnten anhand der Bindungsordnung in der funktionellen Gruppe des *sn*-2 Substituenten in zwei Klassen, *flexible* und *starre*, eingeteilt werden (Kapitel 1.2.1). Die Bindungsordnung ist dabei

kohärent zur Rotierbarkeit entlang der O'-C1' (in Ether- (1), Benzylether- (2) und Ester-Analogen (3)), N'-C1' (im Amid-Analogen (4)) bzw. der C1'-C2' Bindung (im Phenyl-Analogen (5)).

sn-2 down Bindungsmodus

Die Auswertung der Trajektorien der molekulardynamischen Simulationen und die Erstellung von mittleren Strukturen ergab (Kapitel 3.7.1), daß in allen untersuchten ROL-Substrat-Komplexen sterische Wechselwirkungen zwischen dem Triacylglycerid bzw. den Analoga und der L258 Seitenkette des *hydrophobic dents* auftraten. Der *sn*-2 Substituent orientierte sich nahe dem C2 des Glycerids in den sogenannten *His gap*, eine Spalte zwischen den Seitenketten des aktiven H257 und L258 (3,8 Å C α -C α Abstand). In *sn*-1 Orientierung wurde ein kleinster Abstand zwischen L258 und dem Carbonyl-Sauerstoff des *sn*-2 Substituenten von 2,5 Å gemessen, wohingegen in *sn*-3 Orientierung der geringste Abstand zwischen Substrat (C2) und L258 4,4 Å betrug (Abbildung 31).

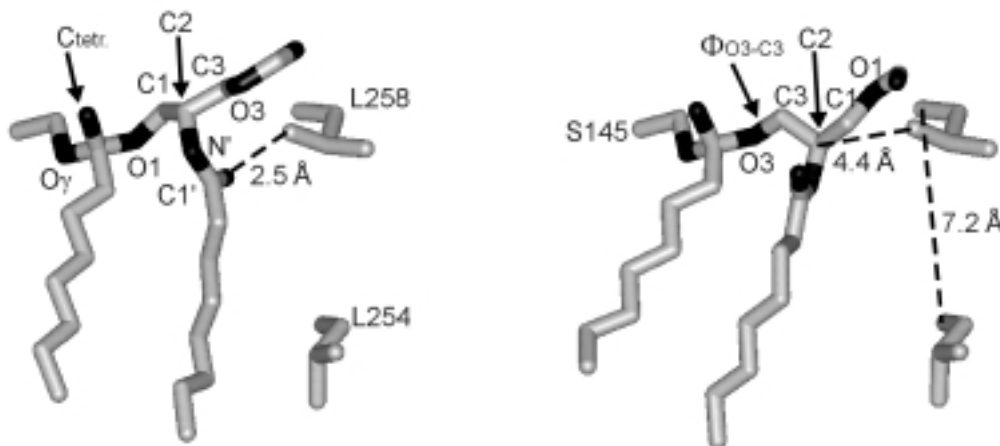


Abbildung 31: **Links:** Beispiel für die sterischen Wechselwirkungen zwischen dem *sn*-2 Substituenten nahe dem C2 des Glycerids und der Seitenkette von L258. Dargestellt ist die mittlere Struktur des Amid-Analogons in *sn*-1 Orientierung im *sn*-2 down Bindungsmodus. **Rechts:** Die mittlere Struktur des Amid-Analogons in *sn*-3 Orientierung im *sn*-2 down Bindungsmodus. Sterische Wechselwirkungen traten hauptsächlich zwischen dem prochiralen C2 des Glycerids und der Seitenkette des L258 auf. Definition des Torsionswinkels Φ_{O3-C3} . Kohlenstoffatome sind hellgrau, Heteroatome dunkelgrau hervorgehoben. C_{tetr.}: tetraedrisch koordiniertes Kohlenstoffatom; O_y: Sauerstoff des aktiven S145; O1, C1, C2, C3, O3: Atome des Glycerids; N', C1': Atome des *sn*-2 Substituenten im Amid-Analogen.

In *sn*-3 Orientierung zeigte die Bindung zwischen C2 und der funktionellen Gruppe des *sn*-2 Substituenten (C2-O' im Ether-, Benzylether- und Ester-Analogen, C2-N' im Amid-Analogen und C2-C1' im Phenyl-Analogen) zu den Aminosäuren des *hydrophobic dent*. In *sn*-1

Orientierung ist diese Bindung vom *hydrophobic dent* weg orientiert (Abbildung 31). Dies rührt von der entgegengesetzten Konfiguration am C2 des Glycerids her (Abbildung 12). Als Konsequenz aus den unterschiedlichen Orientierungen resultiert, daß in *sn*-1 Orientierung die Geometrie der *sn*-2 Substituenten von *flexiblen* und *starren* Substraten ähnlich ist, während in *sn*-3 orientierten Substraten Unterschiede in der Geometrie des *sn*-2 Substituenten auftreten. Die Geometrie der an die Lipase gebundenen Triacylglyceride und deren Analoga hängt demnach direkt von repulsiven sterischen Wechselwirkungen zwischen dem *sn*-2 Substituenten und überwiegend der Aminosäure 258 ab. Zur Identifizierung und Illustration dieser Unterschiede in der Substratgeometrie wurden sieben (für das Phenyl-Analogon nur fünf, da der Aromat planar ist) Torsionswinkel im Glycerid und *sn*-2 Substituenten gemessen und miteinander verglichen. Es konnte eine Korrelation zwischen der Geometrie des Substrats in *sn*-3 Orientierung und der Flexibilität der funktionellen Gruppe des *sn*-2 Substituenten festgestellt werden, die durch den Torsionswinkel Φ_{O3-C3} zwischen dem hydrolysierten Ester-Sauerstoff O3 und C3 des Glycerids beschrieben werden kann (Abbildung 31). So gilt für die stereoselektive Hydrolyse von Triacylglyceriden und deren Analoga durch ROL: für *flexible* Substrate liegt der Wert des Torsionswinkels Φ_{O3-C3} zwischen 160° und 170° , während er für *starre* Substrate Φ_{O3-C3} ca. 120° beträgt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Stereopräferenzen von Wildtyp-ROL, ROL-Mutanten L258X (X=A,S,F) und ROL-Doppelmutanten L258F/L254Y (Y=A,V,F) bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga.

ROL	spezifische Aktivität ^{a,b} [U/mg] für Triolein	Φ_{O3-C3} [°]	vorhergesagte Stereopräferenz	experimentell ermittelte Stereopräferenz	ee-Wert ^c [%]	E-Wert ^d
Wildtyp						
Ether-Analogon		164	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	61 (± 2)	4
Benzylether-Analogon		160	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	50 (± 2)	3
Ester-Analogon	7770 (± 93)	170	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	19 (± 5)	1
Amid-Analogon		117	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	63 (± 6)	5
Phenyl-Analogon		118	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	77 (± 3)	8
L258A						
Ether-Analogon		n.b. ^d	n.b. ^d	<i>sn</i> -1	50 (± 5)	3
Ester-Analog	7370 (± 577)	157	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	16 (± 4)	1
Amid-Analogon		127	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	52 (± 4)	3
Phenyl-Analogon		170	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	68 (± 5)	5
L258S						

Ether-Analogon		n.b. ^d	n.b. ^d	<i>sn</i> -1	65 (± 4)	5
Ester-Analogon	4420 (± 154)	165	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	14 (± 3)	1
Amid-Analogon		143	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	60 (± 3)	4
Phenyl-Analogon		164	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	53 (± 2)	3
L258F						
Ether-Analogon		n.b. ^d	n.b. ^d	<i>sn</i> -1	63 (± 5)	5
Ester-Analogon	5770 (±134)	155	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	23 (± 3)	2
Amid-Analogon		110	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	86 (± 5)	14
Phenyl-Analogon		96	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	91 (± 2)	22
L258F/L254A						
Ether-Analogon		n.b. ^d	n.b. ^d	<i>sn</i> -1	63 (± 3)	5
Ester-Analogon	4710 (± 183)	165	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	22 (± 3)	2
Amid-Analogon		131	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	78 (± 4)	8
Phenyl-Analogon		113	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	89 (± 2)	18
L258F/L254V						
Ether-Analogon		n.b. ^d	n.b. ^d	<i>sn</i> -1	62 (± 1)	4
Ester-Analogon	5820 (± 142)	153	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	26 (± 3)	2
Amid-Analogon		120	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	88 (± 4)	16
Phenyl-Analogon		107	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	88 (± 4)	16
L258F/L254F						
Ether-Analogon		167	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	58 (± 4)	4
Ester-Analogon	4730 (± 170)	141	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	5 (± 2)	1
Amid-Analogon		143	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	89 (± 3)	18
Phenyl-Analogon		96	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	92 (± 3)	25

^a Durchschnittswert ± Standardabweichung (n = 3); ^b Die spezifischen Aktivitäten wurden für Triolein gemessen. Es handelt sich hierbei um eine Standardprozedur. Für andere Triacylglycerid Analoga wurden die Aktivitäten qualitativ durch Dünnschichtchromatographie bestimmt, mit der Wildtyp-ROL als Referenz. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Triolein festgestellt. Die spezifischen Aktivitäten der Wildtyp-ROL und der ROL-Mutanten variieren aufgrund unterschiedlicher Reaktionsbedingungen und Löslichkeiten der Substrate (Messungen wurden durchgeführt von der Arbeitsgruppe Spener, Münster).

^c $ee = \frac{[A] - [B]}{[A] + [B]} \times 100$, für [A] > [B] (n = 12; Messungen wurden durchgeführt von der Arbeitsgruppe Paltauf,

Graz); ^d $E = \frac{\ln(1 - c(1 + ee_p))}{\ln(1 - c(1 - ee_p))}$, wenn der Umsatz $c < 10\%$; ^d n.b.: nicht bestimmt.

Flexible Substrate werden von Wildtyp-ROL bevorzugt in *sn*-1 hydrolysiert, *starre* Substrate in *sn*-3. Der Torsionswinkel Φ_{O3-C3} erlaubt eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Substratklassen und die Vorhersage der Stereopräferenz von Wildtyp-ROL bei der Umsetzung von Triacylglyceriden und Analoga. $\Phi_{O3-C3} > 150^\circ$ korreliert mit *sn*-1, $\Phi_{O3-C3} < 150^\circ$ mit *sn*-3 Stereopräferenz.

sn-2 up Bindungsmodus

Im Verlauf der molekulardynamischen Simulationen verließ die nicht-hydrolysierte *sn-3(1)* Fettsäurekette in allen untersuchten ROL-Substrat Komplexen den *hydrophobic dent*. Die Bindung im *sn-2 up* Modus war demnach nicht stabil, obwohl attraktive hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der nicht-hydrolysierten *sn-3(1)* Fettsäurekette und dem *hydrophobic dent* eine Anlagerung der Fettsäurekette in dieses Strukturelement erwarten ließen. Aus dieser Beobachtung wurde abgeleitet, daß die Bindung eines Triacylglycerids bzw. Analogons in die Bindungstasche der ROL bevorzugt im *sn-2 down* Bindungsmodus erfolgt. Weitergehende molekulardynamische Simulationen von Komplexen der ROL-Mutanten, ROL-Doppelmutanten sowie RML mit Triacylglyceriden und Analoga wurden daher nur noch unter Berücksichtigung des *sn-2 down* Bindungsmodus durchgeführt.

4.2.2 EINFLUß DER SUBSTRATBINDUNGSSTELLE AUF DIE STEREOSELEKTIVITÄT

Mutationen ROL-L258X (X=A,S,F)

Zur Veränderung der Stereoselektivität von ROL bei der Umsetzung von Triacylglyceriden und Analoga wurde L258 durch das kleine Alanin, das kleine und polare Serin sowie das sperrige Phenylalanin ersetzt (von der Arbeitsgruppe Spener, Münster, durchgeführte experimentelle Arbeiten). Es wurde erwartet, daß der Austausch dieser Aminosäure die Bindungsgeometrie im Substrat verändert. Dieser Effekt sollte am stärksten ausgeprägt sein für *starre* Triacylglycerid Analoga (Amid- und Phenyl-Analogen). Drei Substrate wurden molekulardynamisch untersucht (Ester-, Amid- und Phenyl-Analogen). Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefaßt. Die Werte für den Torsionswinkel $\Phi_{O_3-C_3}$ für das Ester-Analogen waren ähnlich denen bei der Bindung an den Wildtyp: 157°, 165° und 155° für ROL-L258A, ROL-L258S und ROL-L258F. Für das Amid-Analogen waren die Werte für $\Phi_{O_3-C_3}$ in allen drei Fällen kleiner als 150°, d.h. 127° (ROL-L258A), 143° (ROL-L258S) und 110° (ROL-L258F). Im Gegensatz hierzu unterschieden sich die Werte für den Torsionswinkel $\Phi_{O_3-C_3}$ für das Phenyl-Analogen im Komplex mit ROL-Mutanten von denen im Wildtyp beträchtlich. Während für ROL-L258A und ROL-L258S $\Phi_{O_3-C_3}$ mit 170° und 164° deutlich über 150° lag, verringerte sich der Wert von $\Phi_{O_3-C_3}$ für ROL-L258F auf 96° (Tabelle 15).

Mutationen ROL-L258F/L254Y (Y=A,V,F)

In einem weiterführenden Schritt wurde der Einfluß weiterer Aminosäuren des *hydrophobic dent* auf die Stereoselektivität von ROL bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und deren Analoga untersucht (Abbildung 31). Dabei wurde zusätzlich zu L258 die Aminosäure L254 ausgetauscht, welche einen C α -C α -Abstand von 7,2 Å zu L258 aufweist und repulsiv mit den C3'- und C4'-Atomen einer *sn*-2 Fettsäurekette wechselwirken kann. Es wurden Doppelmutanten generiert, in denen L258 durch Phenylalanin und L254 durch Alanin, Valin bzw. Phenylalanin ausgetauscht wurden (von der Arbeitsgruppe Spener, Münster, durchgeführte experimentelle Arbeiten). Molekulardynamische Simulationen dieser ROL-Mutanten erfolgten im Komplex mit dem Ester-, Amid- und Phenyl-Analogen. Zusätzlich wurde für ROL-L258F/L254F das Ether-Analogen mit untersucht.

Die Torsionswinkel $\Phi_{O_3-C_3}$ der *starren* Substrate waren alle kleiner als 150°. Für das Amid-Analogen ergaben sich für $\Phi_{O_3-C_3}$ 131° (ROL-L258F/L254A), 120° (ROL-L258F/L254V) und 143° (ROL-L258F/L254F), wobei für das Phenyl-Analogen $\Phi_{O_3-C_3}$ zu 113° (ROL-L258F/L254A), 107° (ROL-L258F/L254V) und 96° (ROL-L258F/L254F) bestimmt wurde. Das *flexible* Ester-Analogen wies für ROL-L258F/L254A und ROL-L258F/L254V Werte für $\Phi_{O_3-C_3}$ größer 150° auf (165° und 153°), für ROL-L258F/L254F fiel $\Phi_{O_3-C_3}$ jedoch auf 143°. Der Wert des Torsionswinkels $\Phi_{O_3-C_3}$ für das Ether-Analogen im Komplex mit ROL-L258F/L254F war mit 167° hingegen nahezu unverändert im Vergleich zum ROL-Wildtyp Komplex.

4.2.3 ANWENDUNG DES MODELLS AUF *RHIZOMUCOR MIEHEI* LIPASE

RML gehört wie ROL zu den Lipasen aus *Mucorales*. Beide Enzyme weisen Sequenz- (Abbildung 26) und Struktur-Homologie auf (Abbildung 32). Trotz dieser ausgeprägten Ähnlichkeiten hydrolysieren beide Lipasen Triacylglyceride und Analoga mit unterschiedlicher Stereoselektivität und -präferenz. ROL und RML spalten beide *flexible* Triacylglyceride und Analoga bevorzugt in *sn*-1. *Starre* Triacylglycerid Analoga hingegen werden von ROL *sn*-3 (Tabelle 15), von RML *sn*-1 stereoselektiv umgesetzt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Stereoselektivitäten von RML bei der hydrolytischen Esterspaltung von Triacylglyceriden und Analoga. Für *flexible* und *starre* Substrate korrelieren *molecular modeling* und experimentelle Ergebnisse in Lipasen aus *Mucorales*. Wie für ROL, zeigt auch

in RML der Torsionswinkel $\Phi_{O_3-C_3}$ die Stereopräferenz an. $\Phi_{O_3-C_3} > 150^\circ$: Hydrolyse erfolgt bevorzugt in *sn*-1, $\Phi_{O_3-C_3} < 150^\circ$: Hydrolyse erfolgt bevorzugt in *sn*-3.

RML	$\Phi_{O_3-C_3} [^\circ]$	vorhergesagte Stereopräferenz	experimentell bestimmte Stereopräferenz	ee-Wert [%] ^a	E-Wert ^b
Ether-Analogon	163	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	69 (± 4)	6
Ester-Analogon	169	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	73 (± 3)	7
Amid-Analogon	166	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	56 (± 2)	4
Phenyl-Analogon	173	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	68 (± 2)	6

^a $ee = \frac{[A] - [B]}{[A] + [B]} \times 100$ (von der Arbeitsgruppe Paltauf, Graz, durchgeführte Messungen). ^b

$$E = \frac{\ln(1 - c(1 + ee_p))}{\ln(1 - c(1 - ee_p))}, \text{ bestimmt bei einem Umsatz von } c = 10\% .$$

In RML unterscheiden sich Stereopräferenz und Stereoselektivität bei der Hydrolyse von *flexiblen* und *starren* Triacylglyceriden und deren Analoga kaum (Tabelle 16). Die *flexiblen* Ether- und Ester-Analoga werden mit E = 6 bzw. 7 umgesetzt (69 % und 73 % ee *sn*-1), die *starren* Amid- und Phenyl-Analoga mit E = 4 bzw. 6 (56 % bzw. 68 % ee *sn*-1).

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben sind ROL und RML sequenzhomolog und darüber hinaus in ihrer Struktur sehr ähnlich. Die direkt mit dem Substrat in Kontakt tretenden Aminosäuren der katalytischen Triade, des *hydrophobic crevice* und des *hydrophobic dent* unterscheiden sich in beiden Lipasen lediglich in fünf Positionen (Abbildung 26). Der die zu hydrolysierende Fettsäurekette bindende *hydrophobic crevice* variiert zwischen ROL und RML in vier Aminosäuren (ROL: T83, A89, I93 und V209; RML: S82, W88, L92 und L208), der den *sn*-2 Substituenten beherbergende *hydrophobic dent* nur in einer (ROL: L254; RML: V254). Die zum *hydrophobic crevice* gehörende, jedoch im *lid* der Lipasen sitzende Aminosäure A89 (ROL) bzw. W88 (RML) ist gleichfalls dem *sn*-2 Substituenten direkt benachbart.

Auch in den RML-Substrat Komplexen lagerte sich der Teil des *sn*-2 Substituenten, der dem C2 des Glycerids benachbart ist, in den *His gap*, die Spalte zwischen den Seitenketten des katalytisch aktiven H257 und der L258 (Abbildung 32). Aufgrund der unterschiedlichen Konfiguration am C2, zeigt die funktionelle Gruppe des *sn*-2 Substituenten in *sn*-1 Orientierung in den *His gap* hinein und interagiert sterisch mit L258, welches, wie in der ROL, die hauptsächliche abstoßende Wechselwirkung mit dem *sn*-2 Substituenten eingeht. In *sn*-3 Orientierung zeigt die funktionelle Gruppe des *sn*-2 Substituenten in die entgegengesetzte Richtung, wodurch sich der sterische Einfluß des L258 auf das Substrat verringert (Abbildung 31).

L258 ist in Lipasen aus *Mucorales* konserviert (Abbildung 26). Daraus folgt, daß die unterschiedlichen Stereoselektivitäten von ROL und RML für *starre* Triacylglycerid Analoga

nicht allein von den Wechselwirkungen des Substrats mit L258 herrühren können. G266 sitzt auf einem kurzen aus drei Aminosäuren bestehenden *loop* (*G-elbow*), der sich in unmittelbarer Nähe zum prochiralen C2 eines gebundenen Triacylglycerids bzw. Analogons befindet (Abbildung 32). G266 wird C- und N-terminal von nicht-homologen Resten umgeben (ROL: E265 und S267; RML: T265 und L267). Dieser Unterschied ist Ursache für die veränderte Position des *G-elbow loops* in den Bindungstaschen von ROL und RML (Abstand $C\alpha_{G266,ROL}-C\alpha_{G266,RML} = 1,3 \text{ \AA}$), hervorgerufen durch die Fähigkeit des T265 in RML, eine H-Brücken Bindung von der Hydroxylgruppe seiner Seitenkette zum N δ des Imidazolrings in H143 auszubilden. E265 in ROL besitzt diese Eigenschaft nicht. H143 (in RML; H144 in ROL) ist der N-terminale Nachbar des aktiven Serins und damit Teil des hoch konservierten GX SXG-Pentapeptid-Motivs. Der C-Terminus beider Lipasen wird durch eine Disulfidbrücke zwischen C268 und C29 fixiert, d.h. der Einfluß der Aminosäure 267 auf die Position des G266 ist marginal.

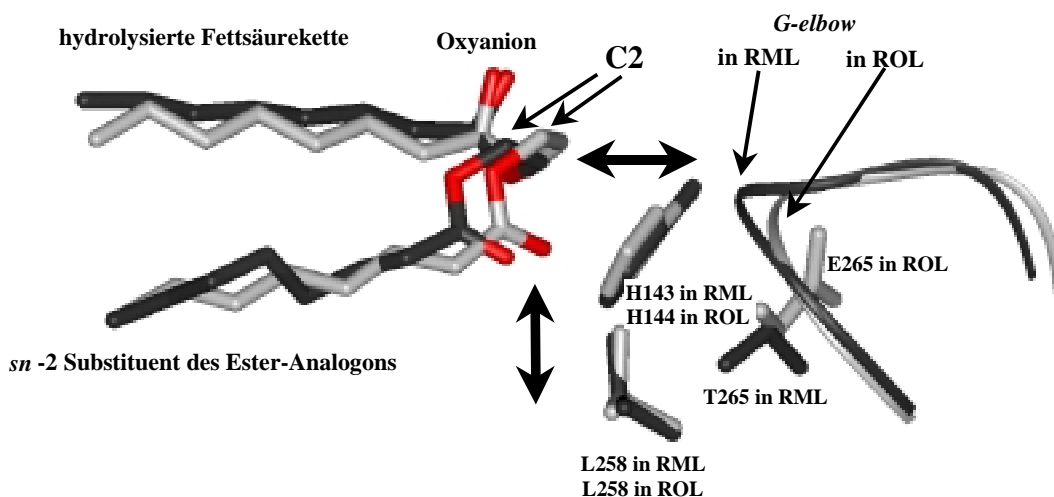


Abbildung 32: Das Ester-Analogon in *sn*-1 Orientierung im Komplex mit ROL (hellgrau) und RML (dunkelgrau). Von den Aminosäuren der Lipasen sind nur die Seitenketten dargestellt. Die Position des G266 variiert in beiden Lipasen (Abstand $C\alpha_{G266,ROL}-C\alpha_{G266,RML} = 1,3 \text{ \AA}$). Dies rührt von der unterschiedlichen Lage der Aminosäuren E265 (ROL) und T265 (RML) her (horizontaler Pfeil). Aus diesem Grund bindet in ROL das Substrat tiefer in die Bindungstasche als in RML (Abstand $C2_{ROL}-C2_{RML} = 0,9 \text{ \AA}$) und die sterischen Wechselwirkungen zwischen dem *sn*-2 Substituenten und L258 sind in ROL stärker ausgeprägt als in RML (vertikaler Pfeil).

Die aus diesen Unterschieden der Substratbindung herrührenden unterschiedlichen Stereoselektivitäten werden durch den Torsionswinkel $\Phi_{O_3-C_3}$ beschrieben. Alle untersuchten Triacylglyceride und Analoga werden durch RML bevorzugt in *sn*-1 hydrolysiert (von der Arbeitsgruppe Paltauf, Graz, durchgeführte experimentelle Arbeiten). In allen Fällen korrelierte das experimentelle Ergebnis mit den Resultaten des *molecular modeling*. So war der Wert des Torsionswinkels $\Phi_{O_3-C_3}$ für das Ether-Analogon 163° , das Ester-Analogon 169° , das Amid-Analogon 166° und das Phenyl-Analogon 173° .

4.2.4 ANWENDUNG DES MODELLS AUF *PSEUDOMONAS CEPACIA* LIPASE

Im Gegensatz zu den Lipasen aus *Mucorales* weist die PCL drei Bindungsregionen auf, an die Substituenten eines Substrats binden können. Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, besteht die Bindungstasche der PCL einerseits aus dem *hydrophobic crevice*, der die zu hydrolysierende Fettsäurekette bindet. Dagegen ist die Alkoholbindungstasche bei PCL zweigeteilt: in den *hydrophobic dent* und die *cavity* (Abbildung 28). Die Bindung eines Triacylglycerids oder Analogons kann bei der PCL, wie schon bei der ROL, theoretisch in zwei Bindungsmodi erfolgen: in *sn*-2 *down* und *sn*-2 *up* (Abbildung 12). Der *hydrophobic dent* der PCL wird aus nur vier Aminosäuren aufgebaut, die *cavity* dagegen aus elf. Für die Bindung eines Triacylglycerids oder Analogons stellt sich im Fall der PCL prinzipiell die Frage, ob die Bindung einer Fettsäurekette an einen kleinen, dafür eindeutig hydrophoben Bereich (*hydrophobic dent*) oder an einen großen, dafür gemischt polar-unpolaren Bereich (*cavity*) bevorzugt wird. Um diese Frage beantworten zu können, wurden alle PCL-Substrat Komplexe in sowohl *sn*-1 und *sn*-3 Orientierung wie auch im *sn*-2 *down* und *sn*-2 *up* Bindungsmodus untersucht. Die verwendeten Substrate waren, wie im Fall der RML, das Ether-, Ester-, Amid- und Phenyl-Analogon.

Wildtyp-PCL hydrolysiert alle vier untersuchten Substrate bevorzugt in *sn*-1 (Tabelle 17). Dabei wechselwirkte die funktionelle Gruppe des *sn*-2 Substituenten sowohl in *sn*-2 *down* als auch in *sn*-2 *up* repulsiv mit L287, welches dem katalytisch aktiven H286 C-terminal benachbart ist und mit diesem den *His gap* bildet. In *sn*-2 *down* bindet die funktionelle Gruppe des *sn*-2 Substituenten in den *His gap*. Im *sn*-2 *up* Bindungsmodus bindet die nicht-hydrolysierte Fettsäurekette in den *hydrophobic dent*. In diesem Bindungsmodus ist die funktionelle Gruppe um eine Methylengruppe weiter aus der Bindungstasche orientiert als im *sn*-2 *down* Modus. Eine abstoßende sterische Wechselwirkung mit den Aminosäuren des

His gap wurde nicht beobachtet. Die *sn*-2 Substituenten der Triacylglyceride und Analoga orientierten sich im *sn*-2 *up* Bindungsmodus zwischen T18 des *lids* und L287 und interagierten sterisch mit diesen Resten.

Auch für die PCL gibt es eine Korrelation zwischen dem Wert des Torsionswinkels Φ_{O3-C3} und der Stereopräferenz. Im Unterschied zu den Lipasen aus *Mucorales* (150°) ist der empirische Schwellenwert, der eine Unterscheidung zwischen *sn*-1 und *sn*-3 Stereopräferenz zulässt, bei PCL 140° . So wird das Ether-Analogon mit einem E-Wert $E = 9$ (78 % ee *sn*-1; $\Phi_{O3-C3} = 155^\circ$), das Ester-Analogon mit $E = 9$ (77 % ee *sn*-1; $\Phi_{O3-C3} = 160^\circ$), das Amid-Analogon mit $E = 2$ (36 % ee *sn*-1; $\Phi_{O3-C3} = 147^\circ$) und das Phenyl-Analogon mit $E = 3$ (44 % ee *sn*-1; $\Phi_{O3-C3} = 143^\circ$) stereoselektiv hydrolysiert (Tabelle 17).

Die molekulardynamischen Simulationen der in *sn*-2 *up* gebundenen Substrate im Komplex mit Wildtyp-PCL ergaben ein Ergebnis vergleichbar den entsprechenden Untersuchungen mit ROL. Die in den *hydrophobic dent* orientierten nicht-hydrolysierten *sn*-1(3) Fettsäureketten waren im Verlauf der molekulardynamischen Simulation nicht imstande, die Bindung an dieses Strukturelement der PCL aufrecht zu erhalten. Wie in ROL war keine Bindung an den *hydrophobic dent* erkennbar. Hingegen banden alle *sn*-2 Substituenten im *sn*-2 *up* Bindungsmodus an die *cavity*.

Tabelle 17: Stereoselektivitäten von PCL bei der hydrolytischen Esterspaltung von Triacylglyceriden und Analoga. *Molecular modeling* und experimentelle Ergebnisse korrelieren für sowohl *flexible* als auch *starre* Substrate. Wie für die Lipasen aus *Mucorales*, ist auch in PCL der Torsionswinkel Φ_{O3-C3} ein Maß für die Stereopräferenz. $\Phi_{O3-C3} > 140^\circ$: Hydrolyse erfolgt bevorzugt in *sn*-1, $\Phi_{O3-C3} < 140^\circ$: Hydrolyse erfolgt bevorzugt in *sn*-3.

PCL	Φ_{O3-C3} [°]	vorhergesagte Stereopräferenz	experimentell ermittelte Stereopräferenz	ee-Wert ^a [%]	E-Wert ^b
Wildtyp					
Ether-Analogon	155	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	78 (± 5)	9
Ester-Analogon	160	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	77 (± 4)	9
Amid-Analogon	147	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	36 (± 9)	2
Phenyl-Analogon	143	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	44 (± 3)	3
L258F					
Ester-Analogon	139	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	55	4
Amid-Analogon	141	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	40	4
Phenyl-Analogon	122	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -3	85	14

^a $ee = \frac{[A] - [B]}{[A] + [B]} \times 100$ (von der Arbeitsgruppe Paltauf, Graz, durchgeführte Messungen). ^b

$$E = \frac{\ln(1 - c(1 + ee_p))}{\ln(1 - c(1 - ee_p))}, \text{ bestimmt bei einem Umsatz von } c = 10\% .$$

4.2.5 MODIFIKATION DER SUBSTRAT-BINDUNGSTASCHE FÜR *PSEUDOMONAS CEPACIA* LIPASE

Molecular modeling

Da Wildtyp-PCL sowohl *flexible* als auch *starre* Triacylglyceride und Analoga bevorzugt in *sn*-1 hydrolysiert und mit L287 die am intensivsten repulsiv mit dem *sn*-2 Substituenten wechselwirkende Aminosäure identifiziert werden konnte, wurde versucht, durch den Austausch des unpolaren Leucins durch das sperrige und unpolare Phenylalanin, die Stereoselektivität für *starre* Triacylglycerid Analoga in Richtung *sn*-3 zu verschieben. Die Auswertung der mittleren Strukturen der molekulardynamischen Simulationen ergaben, daß für das *flexible* Ester- sowie das *starre* Amid-Analogon keine signifikante Änderung der Stereoselektivität zu erwarten war. Dies deckt sich mit den experimentellen Ergebnissen (Tabelle 17). Die Werte des Torsionswinkels Φ_{O3-C3} waren 139° (Ester-Analogon) und 141° (Amid-Analogon). Für den Komplex aus PCL-L287F und dem Phenyl-Analogon fiel der Wert des Torsionswinkels Φ_{O3-C3} drastisch auf 122° im Vergleich zu 143° im Komplex mit Wildtyp-PCL ab (Tabelle 17). Dieser Trend konnte schon durch die Betrachtung der

Trajektorie der molekulardynamischen Simulationen erwartet werden, in der eine deutlich stärkere abstoßende sterische Wechselwirkung zwischen F287 und dem Aromaten in *sn*-2 beobachtet werden konnte.

Molekulargenetik

Zur Verifizierung der *molecular modeling* Ergebnisse wurde durch zielgerichtete Mutagenese eine Punktmutation in das Gen der PCL eingeführt. So erfolgte der Austausch der Pyrimidinbase Cytosin durch Thymin in Position 2931 im Plasmid pT-LipHp (Abbildung 33).

Wildtyp-PCL

```

282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292
  C   K   W   N   H   L   D   E   I   N   Q
tgc aag tgg aac cat ctc gac gag atc aac cag

```

L287F-Mutante

```

282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292
  C   K   W   N   H   F   D   E   I   N   Q
tgc aag tgg aac cat ttc gac gag atc aac cag

```

Abbildung 33: Ausschnitt aus den Aminosäure- und Nucleotidsequenzen der Wildtyp-PCL (oben) und L287F-Mutante (unten). Die Numerierung (jeweils obere Zeile) entspricht der Aminosäuresequenz (mittlere Zeile). In der unteren Zeile findet sich die Nucleotidsequenz. Das katalytisch aktive H286 ist rot, die modifizierte Aminosäure 287 blau (in Wildtyp-PCL) bzw. grün (in der L287F-Mutante) hervorgehoben.

Der Austausch einer Base im ansonsten unveränderten Plasmid pT-LipHp (Quyen *et al.* 1999) erfolgte nach dem "QuikChange"-Protokoll. Die verwendeten Primer L287F *forward* und L287F *reverse* (siehe Kapitel 8.3) führten die Mutation an die gewünschte Stelle ein. Der Einbau der Mutation wurde durch vollständige Sequenzierung des Lipasegens sowohl in 5'-3'- als auch in 3'-5'-Richtung überprüft (siehe Kapitel 8.4). Die Sequenzierung bewies nicht nur den Einbau der Mutation an der vorgesehenen Stelle, sondern zeigte darüber hinaus, daß das Gen der PCL an keiner weiteren Stelle modifiziert worden war. Das mutierte Plasmid wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und überexprimiert. Die anschließende Fermentation der modifizierten PCL erfolgte analog Quyen *et al.* (Quyen 1998). Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,8 bis 1,0 wurde die Expression durch Erhöhen der Fermenter-Temperatur von 30°C auf 42°C induziert. Nach 4 Std. Induktion wurde die Expression gestoppt. Wildtyp-PCL und die

PCL-Mutante wurden aus den Einschlußkörpern isoliert und nach einer von Quyen und Mitarbeitern entwickelten Umfaltungsprozedur in aktiver Form gewonnen (Quyen *et al.* 1999). Die hydrolytische Aktivität der umgefalteten Lipasen wurde durch den pNPP-Test bestimmt.

Charakterisierung der Expressionsprodukte der Wildtyp-PCL und der PCL-Mutante L287F

Die Auftrennung der Zellysate nach der Fermentation der Wildtyp-PCL und der PCL-Mutante L287F durch SDS-Gelelektrophorese zeigte, daß bei der Fermentation von Wildtyp-PCL und L287F-Mutante vergleichbar viel Protein exprimiert wurde (Abbildung 34).

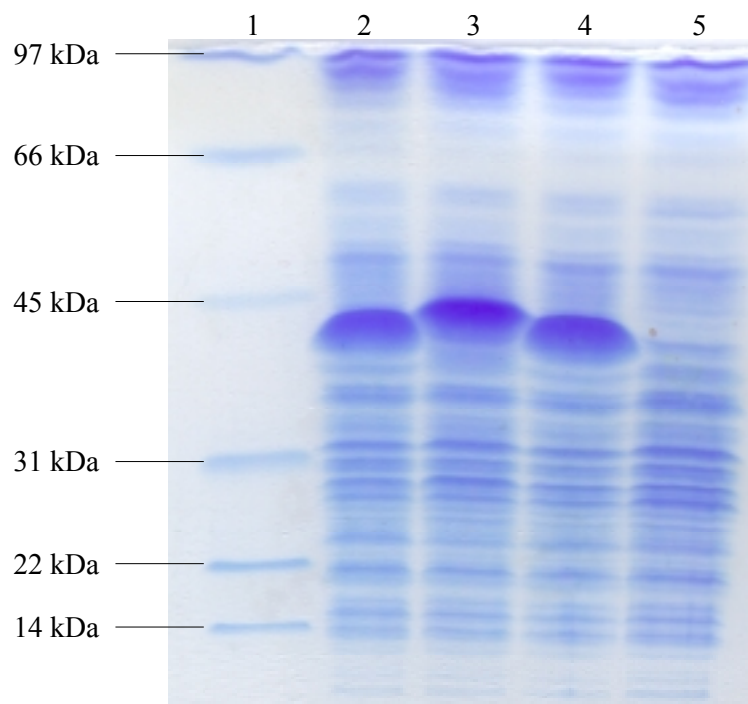


Abbildung 34: SDS-Gel der fermentierten und transformierten *E. coli* DH5 α Zellen unter Kontrolle des λ P_L-Promotors. Alle Zellysate wurden erhalten nach 4 Std. Induktion bei 42°C und anschließendem Aufschluß mit 8 M Harnstoff-Lösung. Spur 1 zeigt den SDS-Standard, Spur 2 das Zellysat des PCL-Wildtyps pT-LipHp, Spur 3 das Zellysat des Helferproteins pT-ompA Δ 70Hp, Spur 4 das Zellysat der PCL-Mutante pT-LipHpL287F und Spur 5 das Zellysat der nicht-transformierten *E. coli* DH5 α -Zellen.

Die Messung der Aktivitäten von Wildtyp-PCL und L287F-Mutante erfolgte durch den photometrischen Nachweis der hydrolytischen Aktivität nach der Spaltung von *p*-Nitrophenylpalmitat. Beide Lipasen spalteten *p*-Nitrophenylpalmitat mit vergleichbarer Aktivität. Tabelle 18 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Aktivitäten pro Gramm Biofeuchtmasse. Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach folgender Gleichung:

$$U \left[\frac{1}{ml} \right] = \frac{\Delta E \times V_{Test}}{t \times \epsilon \times d \times V_{Probe}} \times 1000$$

ΔE : Unterschied der Extinktion von Probe und Blindprobe. Steigung der Kurve im linearen Bereich bei Durchführung der Kinetikmessung.

V_{Test} : Testvolumen, 1 ml

t : Testdauer

ϵ : Extinktionskoeffizient von DMSO, 16000 [$l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$]

d : Schichtdicke der Testküvette, 1 cm

V_{Probe} : Probenvolumen

Tabelle 18: Aktivität der Wildtyp-PCL und der L287F-Mutante bei der Hydrolyse von pNPP bei 37°C.

Lipase	Aktivität pNPP-Test [U/g]
Wildtyp-PCL	3800
L287F-Mutante	1500

4.2.6 ANWENDUNG DES MODELLS FÜR *CANDIDA RUGOSA* LIPASE

Um das Modell zur Vorhersage der Stereopräferenz von Lipasen bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga auf andere Lipasen zu erweitern, waren vor allem experimentelle Daten notwendig. Diese lagen für CRL sowohl für das Ester- als auch für das Phenyl-Analogon vor (Rogalska *et al.* 1993; Stadler *et al.* 1995). Beide Substrate werden von CRL bevorzugt in *sn*-1 gespalten. Das Ester-Analogon wird dabei mit einem E-Wert $E = 2$ (24 % ee *sn*-1), das Phenyl-Analogon mit $E = 3$ (43 % ee *sn*-1) umgesetzt (Tabelle 19). Die Durchführung von molekulardynamischen Simulationen und deren Auswertung ergab, daß auch für CRL der Torsionswinkel Φ_{O3-C3} zur Stereopräferenz korreliert. Für den Komplex des Ester-Analogons mit CRL wurde Φ_{O3-C3} zu 171°, für das Phenyl-Analogon zu 153° bestimmt (Tabelle 19).

Tabelle 19: Stereoselektivitäten von CRL bei der hydrolytischen Esterspaltung von Triacylglyceriden und Analoga. *Molecular modeling* und experimentelle Ergebnisse korrelieren für das *flexible* Ester- als auch für das *starre* Phenyl-Analogon. Auch in CRL zeigt der Torsionswinkel Φ_{O3-C3} die Stereopräferenz an. $\Phi_{O3-C3} > 150^\circ$: Hydrolyse erfolgt bevorzugt in *sn*-1.

CRL	Φ_{O3-C3} [°]	vorhergesagte Stereopräferenz	experimentell ermittelte Stereopräferenz	ee-Wert ^{a,b} [%]	E-Wert ^c
Ester-Analogon	171	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	24	2
Phenyl-Analogon	153	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -1	43	3

^a $ee = \frac{[A] - [B]}{[A] + [B]} \times 100$. ^b ee-Werte entnommen aus Stadler *et al.* für Trioctanoin und 1,3-Dioctanoyl-2-O-

deoxyphenyl (Stadler *et al.* 1995). ^c $E = \frac{\ln(1 - c(1 + ee_p))}{\ln(1 - c(1 - ee_p))}$, bestimmt bei einem Umsatz von $c = 10\%$.

Im *sn*-2 *down* Bindungsmodus lagern sich in beiden Orientierungen sowohl das Ester- als auch das Phenyl-Analogon an den *hydrophobic dent* an. Die Bindung der Substrate in *sn*-1 Orientierung erfolgt jedoch ohne abstoßende sterische Wechselwirkung zwischen dem *sn*-2 Substituenten und F344, während die entsprechend in *sn*-3 Orientierung gebundenen Substrate deutlich mit der Seitenkette des F344 interagieren. Für das Ester-Analogon orientierte sich die nicht-hydrolysierte *sn*-3(1) Fettsäurekette in die *cavity*, für das Phenyl-Analogon war dies nicht der Fall. Die dem katalytisch aktiven H449 C-terminal benachbarte Aminosäure ist S450, welche keinen Kontakt zum *sn*-2 Substituenten oder dem Glycerid C2 besitzt. Die Rolle des mit dem *sn*-2 Substituenten wechselwirkenden Restes übernimmt in CRL das F344, das mit dem katalytisch aktiven H449 den *His gap* bildet.

Im *sn*-2 *up* Bindungsmodus banden beide Substrate in *sn*-1 Orientierung mit ihrer nicht-hydrolysierten *sn*-3 Fettsäurekette an den *hydrophobic dent* und mit dem *sn*-2 Substituenten an die *cavity*. Die in *sn*-3 Orientierung gebundenen lagerten die nicht-hydrolysierte *sn*-1 Fettsäurekette nicht an den *hydrophobic dent* an, obwohl die *sn*-2 Substituenten, wie in den entsprechenden *sn*-1 orientierten Substraten, in die *cavity* ausgerichtet waren.

4.2.7 ANWENDUNG DES MODELLS FÜR *CANDIDA ANTARCTICA* LIPASE B

Für die CAL B liegen lediglich experimentelle Ergebnisse zur Umsetzung des Ester-Analogons vor (Rogalska *et al.* 1993). Die Lipase setzt das Triacylglycerid mit einem E-Wert von $E > 100$ (100 % ee, *sn*-3) eindeutig *sn*-3 stereoselektiv um. CAL B ist demnach die einzige der untersuchten Lipasen, die ein *flexibles* Triacylglycerid bevorzugt in *sn*-3 spaltet.

Diese experimentelle Beobachtung wurde durch die Ergebnisse des *molecular modelings* gestützt. Der Wert des Torsionswinkels Φ_{O3-C3} ergab sich zu 106° (Tabelle 20).

Tabelle 20: Stereoselektivität von CAL B bei der hydrolytischen Esterspaltung von Trioctanoin. *Molecular modeling* und experimentelle Ergebnisse korrelieren. Auch in CAL B zeigt der Torsionswinkel Φ_{O3-C3} die Stereopräferenz an. $\Phi_{O3-C3} < 150^\circ$: Hydrolyse erfolgt bevorzugt in *sn-3*.

CAL B	Φ_{O3-C3} [°]	vorhergesagte Stereopräferenz	experimentell ermittelte Stereopräferenz	ee-Wert ^{a,b} [%]	E-Wert ^c
Ester-Analogon	106	<i>sn-3</i>	<i>sn-3</i>	100	> 100

^a $ee = \frac{[A] - [B]}{[A] + [B]} \times 100$. ^b ee-Wert entnommen aus Rogalska *et al.* für Trioctanoin (Rogalska *et al.* 1993). ^c

$$E = \frac{\ln(1 - c(1 + ee_p))}{\ln(1 - c(1 - ee_p))}, \text{ bestimmt bei einem Umsatz von } c = 5\%.$$

Die sehr flache Bindungstasche der CAL B bietet dem untersuchten Trioctanoin nicht die Möglichkeit zur Bindung an ausgedehnte hydrophobe Bereiche. Einzige Ausnahme ist der *hydrophobic crevice*, der die zu spaltende *sn-1(3)* Fettsäure bindet. Im *sn-2 down* Bindungsmodus wechselwirkt der *sn-2* Substituent des Trioctanoin in *sn-1* Orientierung repulsiv mit I189. Diese Interaktion konnte für das entsprechende *sn-3* orientierte Substrat nicht beobachtet werden. I189 bildet gemeinsam mit H224 den *His gap*. Die dem aktiven H224 C-terminal benachbarte Aminosäure ist A225, welche jedoch keinen Kontakt zum Substrat besitzt.

Im *sn-2 up* Bindungsmodus traten derartige Wechselwirkungen für die nicht-hydrolysierte *sn-3* (*sn-1* Orientierung, *sn-2 up* Bindungsmodus), nicht aber für die *sn-1* Fettsäurekette (*sn-3* Orientierung, *sn-2 up* Bindungsmodus) auf. In beiden Orientierungen und Bindungsmodi lagerten sich die zur *cavity* orientierten Substituenten an diese an.

4.3 STEREOSELEKTIVITÄT VON LIPASEN IN DER HYDROLYSE VON ESTERN PRIMÄRER ALKOHOLE

An PCL, welche außer PPL die einzige Lipase ist, die primäre Alkoholsubstrate mit nennenswerter Enantioselektivität umsetzt (Bornscheuer und Kazlauskas 1999), wurde die Stereoselektivität in der Hydrolyse von Estern anderer primärer Alkohole untersucht. Die *molecular modeling* Untersuchungen beschränkten sich auf acht Substrate, die in zwei

Substratklassen eingeteilt werden konnten. Substrate der Klasse 1 weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit untereinander auf, besitzen jedoch völlig unterschiedlich ausgeprägte Enantioselektivitäten und -präferenzen. Dabei unterscheiden sie sich in ihrer Struktur deutlich von den Triacylglyceriden und deren Analoga, die mit langen hydrophoben Fettsäureketten an hydrophobe Bereiche der Lipase binden können. Die Substrate der Klasse 2 sind geschützte Triacylglyceride, die sich in der Größe ihrer Schutzgruppen unterscheiden. Experimentelle Untersuchungen ergaben, daß die Enantioselektivität von PCL für diese Substratklasse nur gering ist (Gaziola *et al.* 1996).

4.3.1 PRIMÄRE ALKOHOLSUBSTRATE DER KLASSE 1

Die Bindung der Substrate der Klasse 1 in die Bindungstasche von PCL erfolgte analog den Untersuchungen von Weissfloch und Kazlauskas (Abbildung 11; Weissfloch und Kazlauskas 1995). Der kleinere Substituent am Stereozentrum wurde in die BTM orientiert, der größere Substituent in die BTL. Mit Ausnahme der Verbindung **9** werden alle untersuchten Substrate der Klasse 1 bevorzugt in (*S*)-Konfiguration umgesetzt (Tabelle 21).

Eine einfache Korrelation zwischen der Substratgeometrie und der Enantiopräferenz, wie sie für Triacylglyceride und Analoge existiert (Torsionswinkel Φ_{O3-C3}), konnte für primäre Alkoholsubstrate nicht gefunden werden (Abbildung 35).

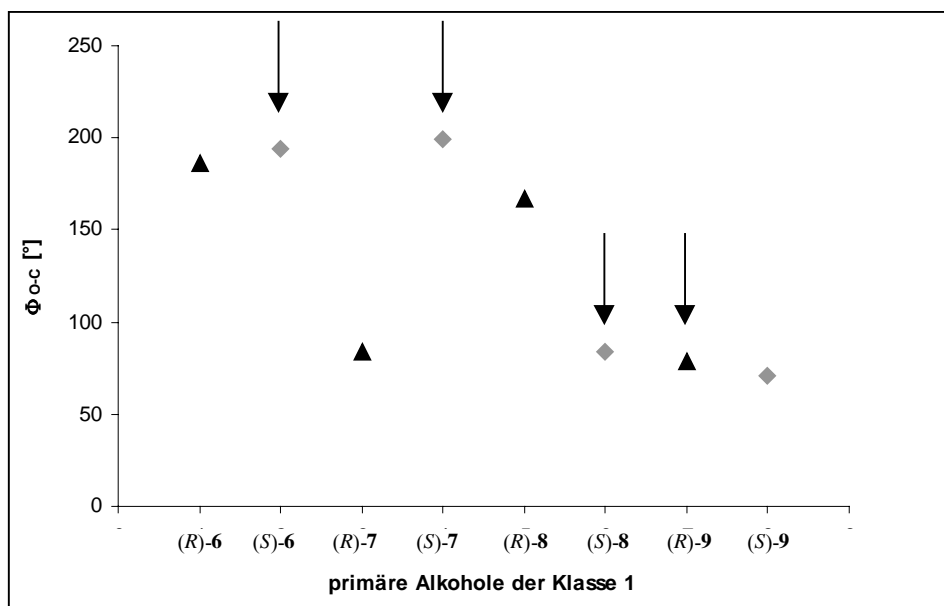
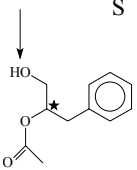
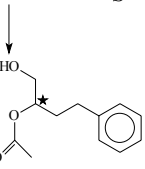
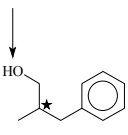
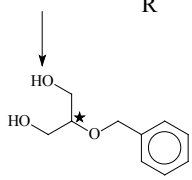


Abbildung 35: Werte für die Torsionswinkel Φ_{O-C} in (*R*)- und (*S*)-Enantiomeren der primären Alkohole der Klasse 1 analog dem Torsionswinkel $\Phi_{O_3-C_3}$ in Triacylglyceriden und Analoga. Eine Korrelation von Substratgeometrie und Enantiopräferenz ist nicht vorhanden. ▲, (*R*)-Enantiomer; ◆, (*S*)-Enantiomer. Die bevorzugt umgesetzten Substrate sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Tabelle 21: Experimentelle Daten und *molecular modeling* Ergebnisse für die Umsetzung der primären Alkoholsubstrate der Klasse 1 durch PCL. In Spalte 1 finden sich die Substratnummer und die Strukturformel der untersuchten Alkoholsubstrate. Die Enantioselektivität und das bevorzugt umgesetzte Enantiomer sind in Spalte 2 aufgetragen. In Spalte 3 stehen die Ergebnisse der *score* Bewertungsfunktion für Bindungsaffinitäten (Wang *et al.* 1998). Die Spalten 4 bis 6 geben die Analyse der Trajektorien der molekulardynamischen Simulationen und die Analyse der mittleren Struktur der PCL-Substrat Komplexe wider. Spalte 4 gibt die relevanten H-Brücken Bindungen zwischen Enzym und Substrat an. Spalte 5 beschreibt die Lage der Substituenten in der Bindungstasche. Spalte 6 gibt Auskunft über die Wechselwirkungen zwischen Substrat und dem Imidazolring des katalytisch aktiven H286. Die herausragenden Merkmale der Analyse der *molecular modeling* Untersuchungen sind **fett** hervorgehoben.

Klasse 1	E-Wert	score	H-Brücken <i>molecular modeling</i>	Lage in der Bindungstasche	Position H286
6	>100	5,02	ϵ -NH (H286) \rightarrow O γ (S87), O	M in cavity	
			NH (Q88), NH (L17) \rightarrow Oxyanion γ -NH (H86) \rightarrow OH (Y29)	L in hydrophobic dent	✓
	S	-17,04	ϵ -NH (H286) \rightarrow O γ (S87), O	M in BTM	
			NH (Q88), NH (L17) \rightarrow Oxyanion γ -NH (H86) \rightarrow OH (Y29) HO (T18) \rightarrow C=O (OAc)	L in cavity	✓
7	4-7	5,50	ϵ -NH (H286) \rightarrow O γ (S87), O	M in cavity	
			NH (Q88), NH (L17) \rightarrow Oxyanion OH (Y29) \rightarrow C=O (L17)	L in hydrophobic dent	✓
	S	-19,56	ϵ -NH (H286) \rightarrow O γ (S87), O	M in BTM	
			NH (Q88), NH (L17) \rightarrow Oxyanion γ -NH (H86) \rightarrow OH (Y29) HO (T18) \rightarrow C=O (OAc)	L in hydrophobic dent	✓
8	20	5,29	ϵ-NH (H286) \rightarrow Oγ(S87)	M in BTM	H286 um ca. 40°
			NH (Q88), NH (L17) \rightarrow Oxyanion γ -NH (H86) \rightarrow OH (Y29) HO (T18) \rightarrow C=O (L17)	L in hydrophobic dent	verdreht
	R	-1,21	ϵ -NH (H286) \rightarrow O γ (S87), O	M in cavity	
			NH (Q88), NH (L17) \rightarrow Oxyanion γ -NH (H86) \rightarrow OH (Y29) HO (T18) \rightarrow C=O (L17)	L in hydrophobic dent	✓
9	20-28	4,18	ϵ-NH (H286) \rightarrow Oγ(S87)	M in cavity	H286 um ca. 40°
			NH (Q88), NH (L17), HO (Substrat) \rightarrow Oxyanion γ -NH (H86) \rightarrow OH (Y29)	L in hydrophobic dent	verdreht
	R	-4,76	ϵ-NH (H286) \rightarrow Oγ(S87)	M in BTM	
			NH (Q88), NH (L17) \rightarrow Oxyanion γ -NH (H86) \rightarrow OH (Y29) OH (Substrat) \rightarrow HO (Y29)	L in hydrophobic dent	H286 um ca. 40° verdreht

Lage der Substrate in der Bindungstasche

Die visuelle Analyse der molekulardynamischen Simulationen der PCL-Substrat Komplexe mit den Essigsäureestern der (*R*)- und (*S*)-Enantiomere der primären Alkohole ergab für alle untersuchten (*R*)-Enantiomere eine deutlich intensivere repulsive sterische Wechselwirkung mit der Lipase als für die entsprechenden (*S*)-Enantiomere. Die Bindung der primären Alkoholsubstrate wird durch einige Reste der Bindungstasche, der katalytischen Triade und des *oxyanion holes* begrenzt. Zusätzlich bilden Y29, H86 und I290 die sogenannte *wall*, die eine tiefere Anlagerung des Substrats in die Bindungstasche verhindert. Die Bindung der

primären Alkohol-Substrate erfolgte daher immer gleich tief in die PCL. Die Ausrichtung des gesamten Substrats ist demnach abhängig von der Größe des mittleren Substituenten **M**. Die Verbindungen **8** und **9**, mit den kleineren Methyl- und Hydroxymethylsubstituenten, orientierten sich tiefer in die Bindungstasche, während Verbindungen **6** und **7**, deren mittlerer Substituent **M** eine Acetylgruppe ist, weniger tief an die Lipase anlagern konnten.

Analyse der Trajektorien der molekulardynamischen Simulationen

Hauptsächliche abstoßende Wechselwirkungen traten zwischen dem mittelgroßen Substituenten **M** (**6** und **7**: Acetyl-, **8**: Methyl- und **18**: Hydroxymethylrest) und den Aminosäuren der BTM (L17, H86 und L287) sowie der Seitenkette des katalytisch aktiven H286 auf. Alle untersuchten großen Substituenten **L** der (*R*)-Enantiomere interagierten gleichfalls repulsiv mit Resten der Bindungstasche.

2-O-Acetyl-3-phenyl-propen-1,2-diol, 6

Verbindung **6** interagiert mit L248, T251, V266, H286 und L287 des *hydrophobic dent*, wobei sich der große Substituent gegen Ende der molekulardynamischen Simulation in die Nähe von F119, V123, L167 und V266 ausrichtete und mit diesen Resten repulsiv wechselwirkte (Abbildung 36). Eine andere Position von **L** in der Bindungstasche schien nicht stabil zu sein. Zu Beginn der molekulardynamischen Untersuchungen interagiert das Substrat intensiv mit H286, wobei der Imidazolring vorübergehend aus seiner für die Katalysereaktion relevanten Position ausgelenkt wurde. Das (*S*)-Enantiomer unterschied sich nicht nur durch die weniger intensiven Wechselwirkungen mit PCL von der (*R*)-Form. Die Acetylgruppe des (*S*)-Enantiomers war darüber hinaus in der Lage, eine zusätzliche H-Brücken Bindung mit der Hydroxylgruppe des T18 auszubilden.

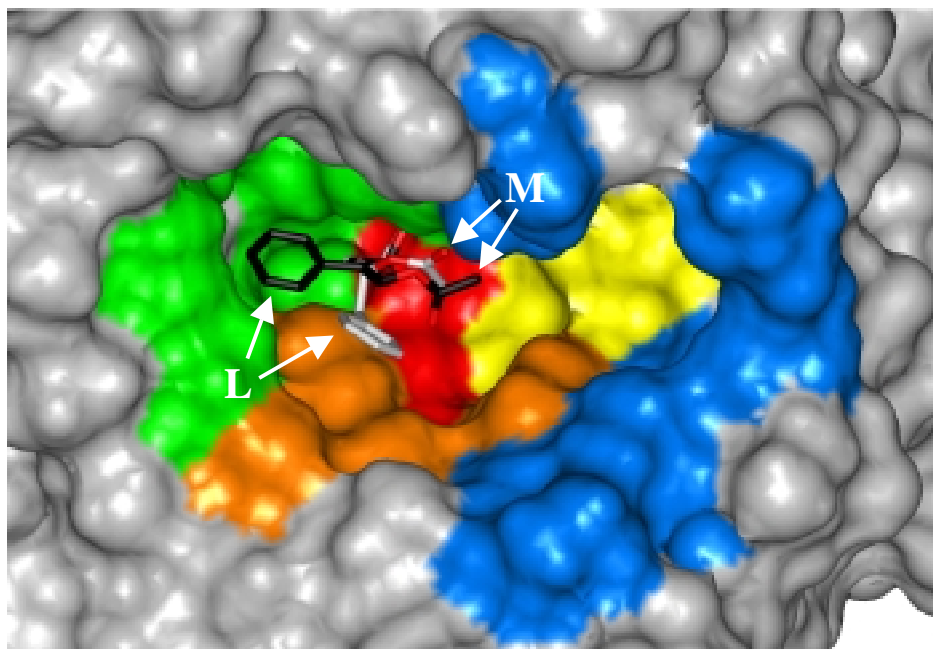


Abbildung 36: Lage der mittleren Strukturen des (*R*)- (schwarz) und (*S*)-Enantiomers (grau) der Verbindung **6** in der Bindungstasche der PCL. Während der große Substituent **L** ausreichend Raum besaß ((*R*)-Enantiomer: *hydrophobic dent*; orange; (*S*)-Enantiomer: *cavity*; blau), wechselwirkte **M** sterisch mit den Aminosäuren der *wall* (gelb). Dabei kam nach Ablauf der molekulardynamischen Simulation **M** in der *cavity* ((*R*)-Enantiomer) bzw. der BTM ((*S*)-Enantiomer) zu liegen.

2-O-Acetyl-4-phenyl-butan-1,2-diol, 7

Das (*R*)-Enantiomer der Verbindung **7** zeigte gleichfalls heftige abstoßende sterische Wechselwirkungen des Acetylrestes **M** mit Y29 und L287 sowie von **L** mit F119, L248 und V266. Wie für **6** wurde auch für **7** die Lage der Seitenkette des H286 im Verlauf der molekulardynamischen Simulation temporär beeinflusst. In der mittleren Struktur des (*R*)- bzw. (*S*)-Enantiomers ordneten sich die großen Substituenten **L** ähnlich im *hydrophobic dent* an, während **M** in (*S*)-Form an die BTM band, in (*R*)-Form jedoch an die *cavity* (Abbildung 37). Auch im Komplex von PCL mit **7** trat eine zusätzliche H-Brücken Bindung vom T18 zur Acetylgruppe des (*S*)-Enantiomers auf, während in der (*R*)-Form die H-Brücke vom γ -NH (H86) zur Hydroxylgruppe des Y29 nicht ausgebildet wurde und statt dessen durch eine H-Brücken Bindung vom OH des Y29 zur Carbonylgruppe des L17 ersetzt wurde.

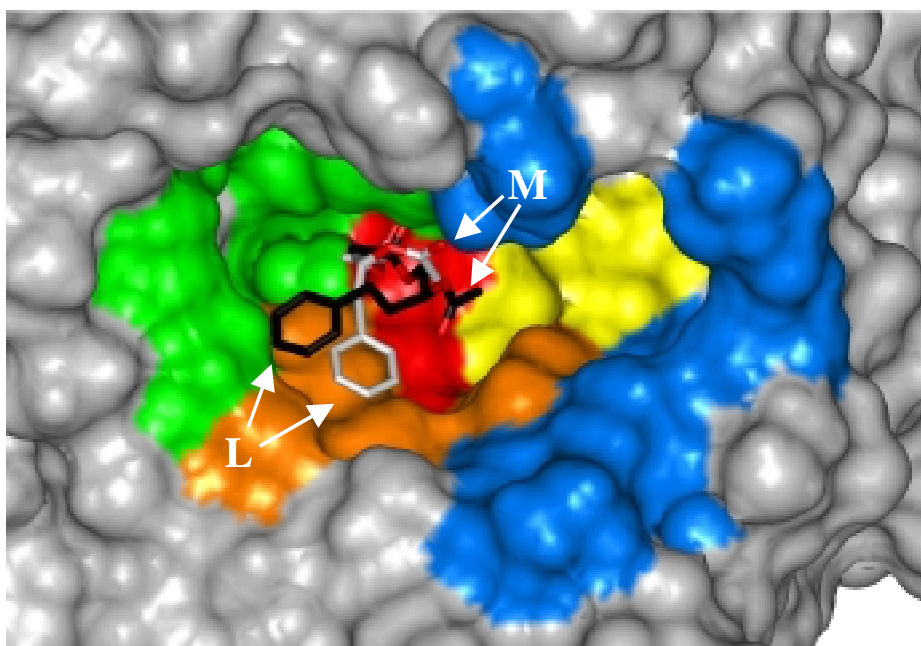


Abbildung 37: Lage der mittleren Strukturen des (*R*)- (schwarz) und (*S*)-Enantiomers (grau) der Verbindung **7** in der Bindungstasche der PCL. Während wie für **6** der große Substituent **L** ausreichend Raum besaß ((*R*)- und (*S*)-Enantiomer: *hydrophobic dent*; orange), wechselwirkte **M** sterisch mit den Aminosäuren der *wall* (gelb). Dabei kam nach Ablauf der molekulardynamischen Simulation **M** in der *cavity* (blau; (*R*)-Enantiomer) bzw. der BTM ((*S*)-Enantiomer) zu liegen.

2-Methyl-3-phenyl-propan-1-ol, 8

Die Analyse der Trajektorie von **8** mit PCL ergab eine starke repulsive Wechselwirkung der Lipase mit dem (*R*)- und eine schwache Interaktion mit dem (*S*)-Enantiomer. Dabei traten für die (*R*)-Form Wechselwirkungen mit Aminosäuren der ganzen Bindungstasche auf. Bezeichnend hierfür war das Wegklappen des aktiven Histidins und die erschwerte Ausbildung der für die Katalyse notwendigen H-Brücke zum Substrat. Beide Enantiomere banden mit **L** an den *hydrophobic dent*, mit **M** an die BTM ((*R*)-Enantiomer) bzw. die *cavity* ((*S*)-Enantiomer; Abbildung 38). Für beide Enantiomere kam es zur Abstoßung der polaren Seitenkette des T18 und zur Ausbildung einer H-Brücken Bindung zum Carbonylsauerstoff des L17.

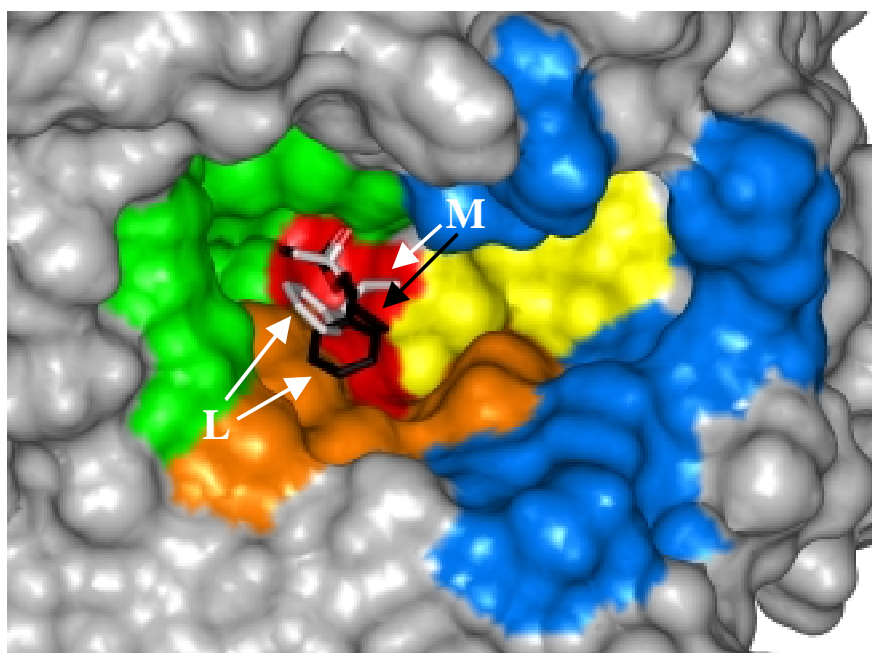


Abbildung 38: Lage der mittleren Strukturen des (*R*)- (schwarz) und (*S*)-Enantiomers (grau) der Verbindung **8** in der Bindungstasche der PCL. Der große Substituent **L** orientierte sich in beiden Enantiomeren in den *hydrophobic dent* (orange), der mittelgroße Substituent **M** kam nach Ablauf der molekulardynamischen Simulation in der BTM ((*R*)-Enantiomer) bzw. der *cavity* (blau; (*S*)-Enantiomer) zu liegen. Die Seitenkette des katalytisch aktiven H286 klappte im Verlauf der molekulardynamischen Simulation im weniger bevorzugt umgesetzten (*R*)-Enantiomer weg. Das katalytisch relevante H-Brücken Netzwerk brach zusammen.

2-O-Benzylglycerin, **9**

Die molekulardynamischen Untersuchungen unterschieden sich für beide Enantiomere von **9** und auch im Vergleich zu denen entsprechenden Enantiomere der Substrate **6**, **7** und **8**. Verbindung **9** ist das Diglycerid Analoge von **2**. Das (*R*)-Enantiomer band **M** in den *hydrophobic dent* und **L** in die *cavity*. Dies entspricht einer Triacylglycerid-analogen Orientierung des Substrats in der Bindungstasche (Abbildung 39). Im PCL-Komplex mit der (*S*)-Form orientierte sich die Hydroxymethylgruppe zur BTM, und der Benzylethersubstituent in den *hydrophobic dent*. In beiden Enantiomeren kam es zur Auslenkung des H286 aus seiner katalytisch aktiven Position und damit zu einer eingeschränkten Ausbildung der katalytisch relevanten H-Brücken Bindungen. Zusätzlich bildete das (*S*)-Enantiomer eine H-Brücke von **M** zum Oxyanion aus. Tabelle 21 gibt eine Übersicht über die beobachteten Wechselwirkungen zwischen PCL und Substrat.

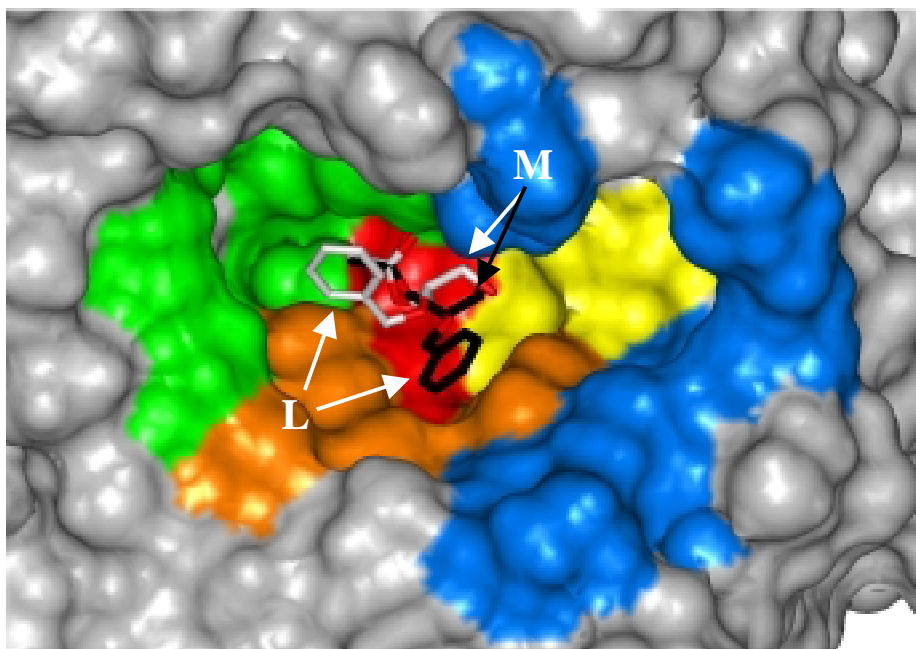


Abbildung 39: Lage der mittleren Strukturen des (*R*)- (schwarz) und (*S*)-Enantiomers (grau) der Verbindung **9** in der Bindungstasche der PCL. Der große Substituent **L** orientierte sich im Komplex mit dem (*R*)- und (*S*)-Enantiomer in den *hydrophobic den* (orange), der mittelgroße Substituent **M** in die *cavity* (blau; (*R*)-Enantiomer) bzw. die BTM ((*S*)-Enantiomer). Die Seitenkette des katalytisch aktiven H286 klappte im Verlauf der molekulardynamischen Simulation bei beiden Enantiomeren weg. Das katalytisch relevante H-Brücken Netzwerk brach zusammen.

Berechnung der Bindungsaffinität mit score

Eine einfache Korrelation von Bindungsgeometrie und Enantiopräferenz, wie für Triacylglyceride und Analoga, fand sich für die Substrate der Klasse 1 nicht. Zur Auswertung mußten daher komplexere Methoden herangezogen werden. Ein Versuch zur Analyse der mittleren Strukturen der PCL-Substrat Komplexe erfolgte mit *score*, einem Programm zur Berechnung der Bindungsaffinität eines Substrats an ein Enzym (Wang *et al.* 1998). Je größer der durch *score* ermittelte Wert, um so besser bindet das Substrat an die Lipase. Tabelle 21 zeigt, daß die *score*-Werte für (*R*)- und (*S*)-Enantiomere dem experimentellen Befund entgegengesetzt sind. Lediglich für **9** fand sich eine Korrelation zum experimentellen Ergebnis. Auch eine Auftrennung des Gesamtwertes in Einzelbeiträge (siehe Kapitel 3.7.5) führte zu keiner Korrelation (Daten nicht dargestellt).

Analyse der H-Brücken Bindungen in der Bindungstasche

Molecular modeling Untersuchungen von PCL mit primären Alkoholsubstraten der Klasse 1 ergaben, daß die (*R*)-Enantiomere hauptsächlich mit H286 interagierten. Diese repulsive

Wechselwirkung bewirkte eine zumindest vorübergehende Auslenkung der H286-Seitenkette aus der für die Katalysereaktion essentiellen Position, was zu einer nur teilweisen Ausbildung der notwendigen H-Brücken Bindungen im katalytischen Zentrum führte.

Die Bindung der Substituenten **M** und **L** in die Bindungstasche der PCL hatte jedoch keinen Einfluß auf die Enantiopräferenz der Lipase. Im Fall der Umsetzung von **9** wurde das den (*S*)-Enantiomeren der Verbindungen **6** bis **8** analoge Enantiomer von der Lipase umgesetzt, d.h. durch die Etherbindung am Stereozentrum ändert sich zwar die Konfiguration (aus (*R*) wird (*S*) und umgekehrt), die Lage des bevorzugt umgesetzten Substrats in der Bindungstasche bleibt jedoch nahezu unverändert.

4.3.2 PRIMÄRE ALKOHOLSUBSTRATE DER KLASSE 2

Die Bindung der Substrate der Klasse 2 in die Bindungstasche von PCL erfolgte analog der Bindung der Triacylglyceride und deren Analoga. Die hydrolysierte Fettsäurekette wurde in den *hydrophobic crevice* orientiert (siehe Kapitel 4.2.4), die Schutzgruppen in den *hydrophobic dent*. Die BTM blieb unbesetzt (Abbildung 40).

Experimentelle Untersuchungen von Gaziola *et al.* ergaben, daß diese Substrate von der PCL ohne nennenswerte Enantioselektivität umgesetzt werden (Gaziola *et al.* 1996). Die Analyse der molekulardynamischen Untersuchungen zeigte, daß beide Enantiomere der geschützten Triacylglyceride kaum mit der Lipase wechselwirkten. Die sterisch anspruchsvollen Teile der Schutzgruppen orientierten sich ohne nennenswerten Kontakt zur Lipase weit aus der Bindungstasche heraus. Selbst sperrige Schutzgruppen treffen dort nicht mit der Lipase zusammen (Abbildung 40).

Die Substrate besaßen große Bewegungsfreiheit in der Bindungstasche der PCL und wechselwirkten praktisch überhaupt nicht mit Aminosäuren der Bindungstasche. Hydrophobe Kontakte, wie bei den Triacylglyceriden, wurden trotz einer Ausrichtung der Schutzgruppen-Substituenten in den *hydrophobic dent* bzw. die *cavity* nicht beobachtet. Auch die Analyse der mittleren Strukturen durch *score* lieferte keine Möglichkeit, das bevorzugt umgesetzte Enantiomer vom weniger bevorzugten zu unterscheiden (Daten nicht dargestellt).

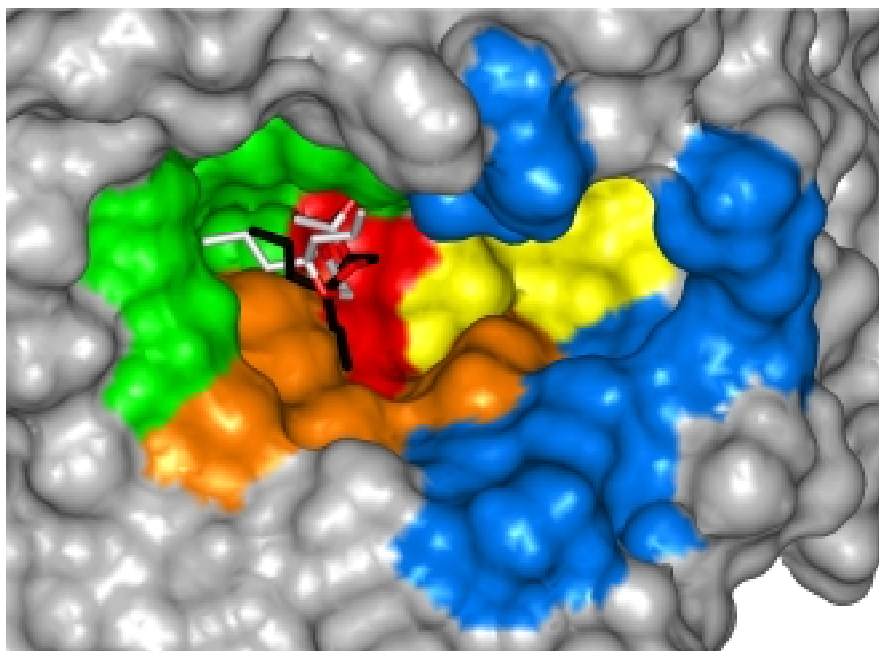


Abbildung 40: Die Lage der mittleren Strukturen des (*R*)- (schwarz) und (*S*)-Enantiomers (grau) der Verbindung **11** in der Bindungstasche der PCL. Diese Verbindung wird von PCL mit der höchsten Enantioselektivität aller untersuchten Klasse 2 Substrate umgesetzt ($E = 6$). Es konnten weder für diese noch für alle anderen primären Alkoholsubstrate der Klasse 2 repulsive sterische Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat beobachtet werden.

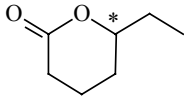
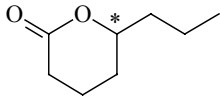
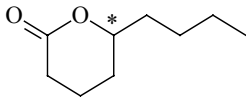
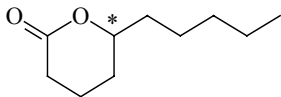
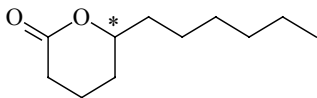
4.4 STEREOSELEKTIVITÄT VON LIPASEN IN DER HYDROLYSE VON γ - UND δ -LACTONEN

Computergestützte *molecular modeling* Methoden wurden eingesetzt, um die von Enzelberger *et al.* (Enzelberger *et al.* 1997) experimentell ermittelten Enantioselektivitäten von PCL bei der Hydrolyse von gesättigten γ - und δ -Lactonen in ihrer molekularen Ursache zu verstehen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, daß PCL sowohl bei der Umsetzung der γ - als auch der δ -Lactone bevorzugt das (*R*)-Enantiomer spaltet. Die Enantioselektivität von PCL bei der Hydrolyse des kurzkettigen δ -Hepta- und δ -Octalactons ist nur gering, während sie für das längerkettige δ -Nona-, δ -Deca- bzw. δ -Undecalacton deutlich ansteigt (Tabelle 22). Die γ -Lactone werden unabhängig von der Länge der aliphatischen Alkylkette am Stereozentrum mit nur geringer Enantioselektivität umgesetzt (Tabelle 23).

4.4.1 δ -LACTONE

Im Vorfeld der molekulardynamischen Simulationen wurden alle (*R*)-Enantiomere der δ -Lactone dergestalt in die Bindungstasche der PCL gebunden, daß ihre aliphatische Alkylkette in die *cavity* orientiert war. Abstoßende sterische oder elektrostatische Wechselwirkungen während der molekulardynamischen Simulation konnten nicht beobachtet werden. Produktive H-Brücken Bindungen traten zwischen den Aminosäuren L17 und Q88 des *oxyanion holes*, N ϵ 2 des katalytisch aktiven H286 und O γ des aktiven S87, C γ des D264 der katalytischen Triade sowie O1 des Lactons auf. Der Abstand des Imidazolrings von H286 in einem aktiven PCL-Substrat Komplex wurde bestimmt zu 3,2 Å (mit einer Toleranz von $\pm 0,1$ Å) für den Abstand N ϵ 2 (H286) - O γ (S87), 2,6 Å ($\pm 0,1$ Å) für den Abstand N ϵ 2 (H286) - O1 (Substrat) und 5,4 Å ($\pm 0,1$ Å) für den Abstand N ϵ 2 (H286) - C γ (D264). Die Position des H286 Imidazols konnte durch den sogenannten (*R*)_{His}- bzw. (*S*)_{His}-Wert charakterisiert werden (Tabelle 22). Für die entsprechenden PCL- δ -Lacton Komplexe wurde gefunden, daß ein (*R*)_{His}- bzw. (*S*)_{His}-Wert von 0,10 Å eine vom System tolerierbare Verschiebung der Seitenkette des H286 darstellt, wohingegen (*R*)_{His}- bzw. (*S*)_{His}-Werte $> 0,10$ Å einen Zusammenbruch zumindest von Teilen der essentiellen H-Brücken-Bindungen anzeigen. Die (*R*)_{His}-Werte für alle (*R*)- δ -Enantiomere bewegten sich zwischen 0 Å und 0,08 Å (Tabelle 22).

Tabelle 22: Die Strukturen der (*R*)- und (*S*)- δ -Lactone, ihre Geometrie im Komplex mit PCL sowie die experimentell bestimmten E-Werte (Enzelberger *et al.* 1997). Sterische und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Substrat und Lipase wirken sich auf die Lage des Substrats in der Bindungstasche des Enzyms aus. Diese Änderungen können durch Messung des Abstandes des N ϵ 2 des Imidazolrings im katalytisch aktiven H286 zum O γ des aktiven S87 (N ϵ 2-O γ), zum O1 des Lactonrings (N ϵ 2-O1) und zum C γ des D264 der katalytischen Triade (N ϵ 2-C γ) quantifiziert werden. Die Toleranz für eine Verschiebung des Imidazolrings von H286 - ohne daß das katalytisch relevante H-Brücken Netzwerk zusammenbricht - wurde zu einem (*R*)_{His}- bzw. (*S*)_{His}-Wert $\leq 0,10$ Å definiert. Im Fall der (*R*)-Enantiomere bleibt die Seitenkette des H286 im Verlauf der molekulardynamischen Simulation vom Substrat nahezu unbeeinflusst, während in den meisten Komplexen mit den entsprechenden (*S*)-Enantiomeren der Imidazolring aus seiner bevorzugten Lage gedrängt wurde. (*S*1)- δ -Heptalacton und (*S*2)- δ -Octalacton beeinflussten H286 nicht.

Substrat	Enantiomer	Nε2-Oγ	Nε2-O1	Nε2-Cγ	(R) _{His} (S) _{His}	E ¹
δ-Heptalacton	(R)	3.2 Å	2.6 Å	5.5 Å	0.06 Å	2
	(S1)	3.3 Å	2.5 Å	5.4 Å	0.08 Å	
	(S2)	3.0 Å	2.9 Å	5.0 Å	0.31 Å	
δ-Octalacton	(R)	3.2 Å	2.6 Å	5.4 Å	0.00 Å	4
	(S1)	3.2 Å	3.0 Å	5.0 Å	0.33 Å	
	(S2)	3.3 Å	2.5 Å	5.4 Å	0.08 Å	
δ-Nonalacton	(R)	3.2 Å	2.7 Å	5.4 Å	0.06 Å	45
	(S1)	4.4 Å	4.4 Å	4.1 Å	1.46 Å	
	(S2)	3.0 Å	3.0 Å	5.6 Å	0.28 Å	
δ-Decalacton	(R)	3.3 Å	2.6 Å	5.5 Å	0.08 Å	>100
	(S1)	3.0 Å	2.8 Å	5.0 Å	0.28 Å	
	(S2)	3.0 Å	2.8 Å	5.0 Å	0.28 Å	
δ-Undecalacton	(R)	3.3 Å	2.7 Å	5.4 Å	0.08 Å	>100
	(S1)	3.5 Å	2.4 Å	5.6 Å	0.24 Å	
	(S2)	3.0 Å	2.8 Å	5.0 Å	0.28 Å	

¹ Enzelberger *et al.* (Enzelberger *et al.* 1997)

Im Fall der entsprechenden (*S*)-δ-Lactone traten im Verlauf der molekulardynamischen Simulationen sowohl sterische Hinderung als auch elektrostatische Abstoßungen zwischen der Alkylkette des Lactons und den Aminosäuren der PCL-Bindungstasche auf. Die (*S1*)-δ-Lactone, deren Bindung an die Lipase analog der der (*R*)-Enantiomere erfolgt war, blieben

entweder in der *cavity* ((*SI*)- δ -Hepta- und (*SI*)- δ -Decalacton) oder orientierten sich in den *hydrophobic dent* ((*SI*)- δ -Octa-, (*SI*)- δ -Nona- und (*SI*)- δ -Undecalacton). Die Alkylketten der (*SI*)-Enantiomere interagierten mit den Resten der *cavity* und L287 im *hydrophobic dent*. Mit Ausnahme des (*SI*)- δ -Heptalactons beeinflussten alle (*SI*)-Enantiomere die Position der Seitenkette des H286 signifikant, so daß die tolerierbare Abweichung von 0,10 Å deutlich überschritten wurde. Die $(S)_{\text{His}}$ -Werte für (*SI*)- δ -Octa-, (*SI*)- δ -Nona-, (*SI*)- δ -Deca- und (*SI*)- δ -Undecalacton wurden zu 0,33 Å, 1,46 Å, 0,28 Å bzw. 0,24 Å berechnet (Tabelle 22). Die (*SI*)- δ -Hepta- und (*SI*)- δ -Decalactone wirkten auf die Lage des Y29 und zwangen die Seitenkette des Tyrosins vom Substrat weg in Richtung des Zentrums der Lipase. Die polare Hydroxylgruppe des Y29 wurde von der unpolaren Alkylkette des Substrats hin zu H86 weggestoßen, das gleichfalls verschoben wurde (Abbildung 41). Als Sonderfall kann die Lage des H286 im PCL-(*SI*)- δ -Heptalacton Komplex betrachtet werden. Obwohl der Imidazolring des H286 während der molekulardynamischen Simulation nahezu unbeeinflusst in seiner Position erhalten blieb ($(S)_{\text{His}} = 0,08 \text{ \AA}$), beeinflusste das Substrat dennoch die Lage der Aminosäuren der Bindungstasche. So veränderte sich die Position des H86, das höchstwahrscheinlich die Lage des aktiven H286 stabilisiert (Beer *et al.* 1996). Im Fall der Komplexe von PCL und (*SI*)- δ -Octa-, (*SI*)- δ -Nona- und (*SI*)- δ -Undecalacton orientierten sich die aliphatischen Alkylketten in den *hydrophobic dent*. Die Lage des Y29 blieb unbeeinflusst.

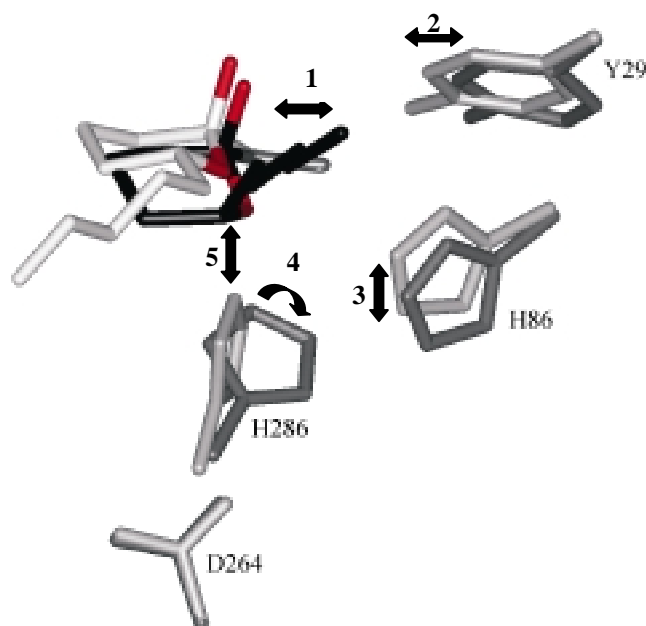


Abbildung 41: Die überlagerten mittleren Strukturen der PCL-Komplexe mit (*R*)- δ - (grau) und (*S*)- δ -Decalacton (schwarz). Die Aminosäuren des Komplexes mit dem (*R*)-Enantiomer sind hellgrau, die des (*S*)-Enantiomer Komplexes dunkelgrau hervorgehoben.

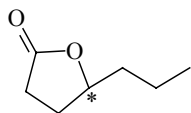
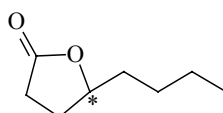
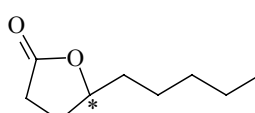
Die unpolare Alkylkette des (*S*)-Enantiomers wechselwirkte mit der polaren Seitenkette des Y29 (1). Dies führte zu Auslenkung des Y29 (2), wobei die polare Hydroxylgruppe in Richtung des H86 zeigte. Diese Veränderung der lokalen Geometrie und Elektrostatik der Bindungstasche beeinflusste die Lage des H86 (3), welches der C-terminale Nachbar des aktiven S87 ist und mit hoher Wahrscheinlichkeit die Lage des aktiven H286 in der Bindungstasche stabilisiert (Beer *et al.* 1996). Die Verschiebung des H86 hatte zur Folge, daß H286 nicht mehr länger von H86 stabilisiert werden konnte. Das katalytisch aktive H286 wurde gleichfalls aus seiner bevorzugten Orientierung verschoben (4). Zusätzlich beeinflussten Wechselwirkungen zwischen der Alkylkette und Y29 die Lage des Stereozentrums im Lactonring, der deshalb in Richtung des Imidazolrings des H286 gedrückt wurde und dessen Verschiebung weiter verstärkte (5).

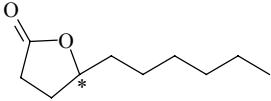
Die (*S*)- δ -Lactone, die ausgehend von einer anderen Startstruktur molekulardynamisch untersucht wurden, orientierten ihre Alkylketten immer in die *cavity*. Sterische und elektrostatische Interaktionen zwischen Substrat und in der Hauptsache Y29 zwangen das Tyrosin, seine Hydroxylgruppe in Richtung des H86 auszurichten. Dies löste eine "Kaskade" aus, in deren Verlauf nicht nur die Seitenkette des H86 sondern auch die des katalytisch aktiven H286 ausgelenkt wurde (Tabelle 22). Zusätzlich stießen die Lactonringe der Substrate gegen den Imidazolring des H286 und verstärkten damit dessen Verschiebung. Die (*S*)_{His}-Werte wurden zu 0,31 Å ((*S*)- δ -Heptalacton) und 0,28 Å (*S*)- δ -Nona-, (*S*)- δ -Deca- und (*S*)- δ -Undecalacton) bestimmt. Für (*S*)- δ -Octalacton blieb H286 nahezu unbeeinflusst. Der entsprechende (*S*)_{His}-Wert wurde zu 0,08 Å berechnet (Tabelle 22).

4.4.2 γ -LACTONE

In den PCL- γ -Lacton Komplexen orientierten, mit Ausnahme des (*R*)- γ -Undecalactons (*cavity*), alle (*R*)- und (*S*)-Enantiomere ihre Alkylketten in den *hydrophobic dent*. Die Substrate wechselwirkten kaum mit der Lipase. Es traten lediglich abstoßende sterische Interaktionen mit L287 auf. Je länger der aliphatische Alkylrest, desto intensiver die Repulsion mit L287. Die Position des H286 wurde durch die γ -Lactone nicht beeinflusst (Tabelle 23 und Abbildung 42). Für das (*R*)- γ -Decalacton wies die Alkylkette jedoch weiter in Richtung *hydrophobic dent* als für die entsprechenden δ -Lactone. Dadurch verringerte sich die Abstoßung zwischen Substrat und Lipase.

Tabelle 23: Die Strukturen der (*R*)- und (*S*)- γ -Lactone, ihre Geometrie im Komplex mit PCL sowie die experimentell bestimmten E-Werte (Enzelberger *et al.* 1997). Sterische und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Substrat und Lipase wirkten sich auf die Lage des Substrats in der Bindungstasche des Enzyms aus. Diese Änderungen konnten durch Messung des Abstandes des N ϵ 2 des Imidazolrings im katalytisch aktiven H286 zum O γ des aktiven S87 (N ϵ 2-O γ), zum O1 des Lactonrings (N ϵ 2-O1) und zum C γ des D264 der katalytischen Triade (N ϵ 2-C γ) quantifiziert werden. Die Toleranz für eine Verschiebung des Imidazolrings von H286 - ohne daß das katalytisch relevante H-Brücken Netzwerk zusammenbricht - wurde zu einem (*R*)_{His}- bzw. (*S*)_{His}-Wert $\leq 0,10$ Å definiert. Beide Enantiomere beeinflussten die Position des Imidazolrings des katalytisch aktiven H286 kaum.

Substrate	Enantiomer	N ϵ 2-O γ	N ϵ 2-O1	N ϵ 2-C γ	(<i>R</i>) _{His} (<i>S</i>) _{His}	E ¹
	(<i>R</i>)	3.3 Å	2.6 Å	5.5 Å	0.08 Å	4
	(<i>S</i>)	3.0 Å	2.8 Å	5.5 Å	0.17 Å	
	(<i>R</i>)	3.1 Å	2.7 Å	5.4 Å	0.08 Å	11
	(<i>S</i>)	3.1 Å	2.9 Å	5.5 Å	0.19 Å	
	(<i>R</i>)	3.3 Å	2.6 Å	5.4 Å	0.06 Å	9
	(<i>S</i>)	3.2 Å	2.7 Å	5.6 Å	0.13 Å	

γ -Decalacton	(<i>R</i>)	3.2 Å	2.7 Å	5.5 Å	0.08 Å	8
	(<i>S</i>)	3.4 Å	2.4 Å	5.5 Å	0.17 Å	

¹ Enzelberger *et al.* (Enzelberger *et al.* 1997)

Wie im Fall der δ -Lactone wurden auch für die γ -Lactone die vom System tolerierbaren (*R*)_{His}- bzw. (*S*)_{His}-Abweichungen zu 0,10 Å für einen aktiven PCL-Substrat Komplex definiert. Die relative Lage des H286 im Vergleich zu S87, D264 und dem Lactonring war gleich der für PCL- δ -Lactone: 3,2 Å (mit einer Toleranz von $\pm 0,1$ Å) für den Abstand Ne2 (H286) - O γ (S87), 2,6 Å ($\pm 0,1$ Å) für den Abstand Ne2 (H286) - O1 (Substrat) und 5,4 Å ($\pm 0,1$ Å) für den Abstand Ne2 (H286) - C γ (D264). Die (*R*)_{His}-Werte für die (*R*)- γ -Lactone errechneten sich zu 0,06 Å ((*R*)- γ -Nonalacton) und 0,08 Å ((*R*)- γ -Hepta-, (*R*)- γ -Octa- und (*R*)- γ -Decalacton). Für die (*S*)- γ -Lactone wurden die (*S*)_{His}-Werte zu 0,13 Å ((*S*)- γ -Nonalacton), 0,17 Å ((*S*)- γ -Hepta- und (*S*)- γ -Decalacton) sowie 0,19 Å ((*S*)- γ -Octalacton) bestimmt (Tabelle 23).

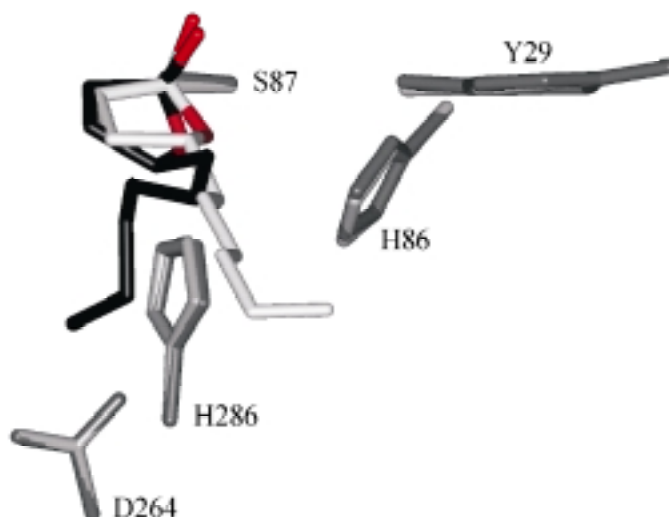


Abbildung 42: Die überlagerten mittleren Strukturen der PCL-Komplexe mit (*R*)- γ - (grau) und (*S*)- γ -Decalacton (schwarz). Die Aminosäuren des Komplexes mit dem (*R*)-Enantiomer sind hellgrau, die des (*S*)-Enantiomer-Komplexes dunkelgrau hervorgehoben. Beide Enantiomere binden ohne nennenswerte repulsive Wechselwirkungen an die Lipase.

4.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR *sn*-2 REGIOSELEKTIVEN HYDROLYSE VON STRUKTURIERTEN TRIACYLGLYCERIDEN DURCH LIPASEN

4.5.1 MOLECULAR MODELING

Molecular modeling Studien zur *sn*-2, in Konkurrenz zur *sn*-1(3) regioselektiven, Hydrolyse von Lipasen wurden an den ausschließlich *sn*-1(3) regioselektiven Lipasen ROL und PCL sowie der CRL durchgeführt, die lediglich 95 % *sn*-1(3) Regioselektivität aufweisen soll (Rogalska *et al.* 1993). Es sollte untersucht werden, ob Lipasen strukturelle Voraussetzungen für eine prinzipiell mögliche Hydrolyse in *sn*-2 besitzen. Als Substrat diente Trioctanoin. Die Spaltung des *sn*-2 Esters führt zu einem sekundären Alkohol, wohingegen die überwiegend auftretende *sn*-1(3) regioselektive Hydrolyse zu einem primären Alkohol führt.

ROL

Die zu spaltende *sn*-2 Fettsäurekette orientierte sich gleich der hydrolysierten Kette bei der Hydrolyse in *sn*-1(3) an den *hydrophobic crevice*. Eine der *sn*-1(3) Fettsäureketten orientierte sich analog der nicht-hydrolysierten *sn*-3(1)-Fettsäurekette bei der *sn*-1(3) regioselektiven Umsetzung. Die Anlagerung der anderen *sn*-3(1) Fettsäurekette an den *hydrophobic dent* fand nicht statt. Vielmehr richtete sich diese Kette entsprechend den nicht-hydrolysierten *sn*-3(1) Fettsäuren im *sn*-2 *up* Bindungsmodus aus. Die BTM wurde nicht besetzt (Abbildung 43). Wie bei der *sn*-1(3) regioselektiven Esterspaltung waren auch hier die Substituenten nicht klein genug, um an dieses Strukturelement zu binden. Die Auswertung der Trajektorie der molekulardynamischen Simulation ergab, daß nur moderate repulsive Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der Bindungstasche auftraten. Wechselwirkungen mit L258 hingegen waren visuell kaum zu erfassen.

Die Bindung des Substrats in die Bindungstasche der ROL wurde durch den *G-elbow* limitiert, der direkt auf drei Atome des Substrats einwirkte, C1(3), O1(3) sowie C3(1), und damit direkt die Geometrie des Triacylglycerids beeinflusste. Durch Messung der Torsionswinkel Φ_M und Φ_L ließen sich diese Einflüsse auf die Substratgeometrie direkt verfolgen (Tabelle 24). Der Wert von Φ_M wurde zu 212°, der von Φ_L zu 93° bestimmt.

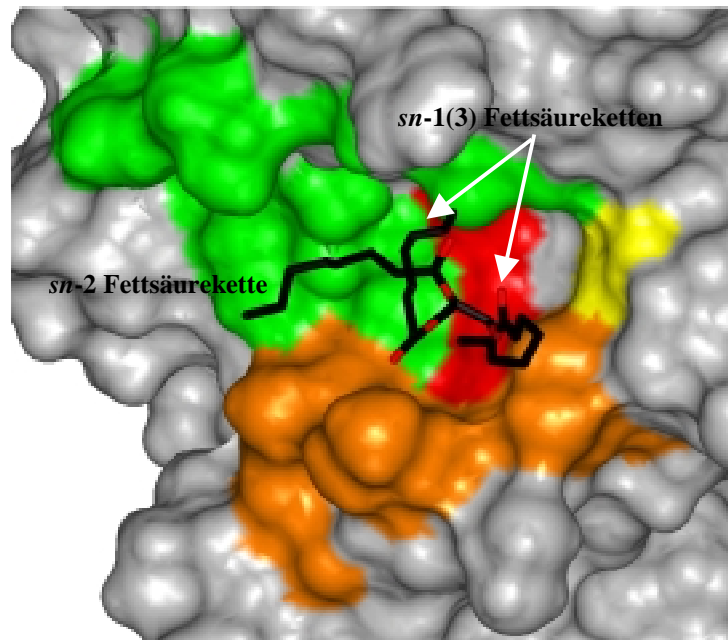


Abbildung 43: Mittlere Struktur des in *sn*-2 hydrolysierten Triacylglycerids in der Bindungstasche der ROL. Die gesplante *sn*-2 Fettsäurekette lagerte sich an den *hydrophobic crevice* (grün), eine der beiden nicht-hydrolysierten *sn*-1(3) Fettsäureketten orientierte sich in den *hydrophobic dent* (orange). Die BTM wurde aufgrund der Größe der dritten Fettsäurekette nicht besetzt. Die *sn*-3(1) Fettsäurekette orientierte sich aus der Bindungstasche heraus.

PCL

Molekulardynamische Simulationen ergaben, daß sich die *sn*-2 Fettsäurekette wie in ROL an den *hydrophobic crevice* anlagerte. Eine der nicht-hydrolysierten *sn*-1(3) Fettsäureketten orientierte sich in die *cavity*, die dritte in Richtung des *hydrophobic dent*, ohne direkt an diese Region zu binden (Abbildung 44). Wie schon beim ROL-Triooctanoin Komplex band auch in PCL kein Substituent in die BTM. Auch in PCL konnten für die dem aktiven Histidin N-terminal benachbarte Aminosäure L287 im Verlauf der molekulardynamischen Simulation nur geringe repulsive Wechselwirkungen mit dem Substrat identifiziert werden. Die Position des Triacylglycerids in der Bindungstasche der Lipase wurde analog den Untersuchungen zur Stereoselektivität durch die Aminosäuren der *wall* (Y29, H86 und I290) begrenzt, die auf die Substratome C2, C1(3) und O1(3) einwirkten. Die durch diese Interaktionen beeinflusste Substratgeometrie korrelierte wie für ROL mit den Torsionswinkeln Φ_M und Φ_L (169° bzw. 49° , Tabelle 24).

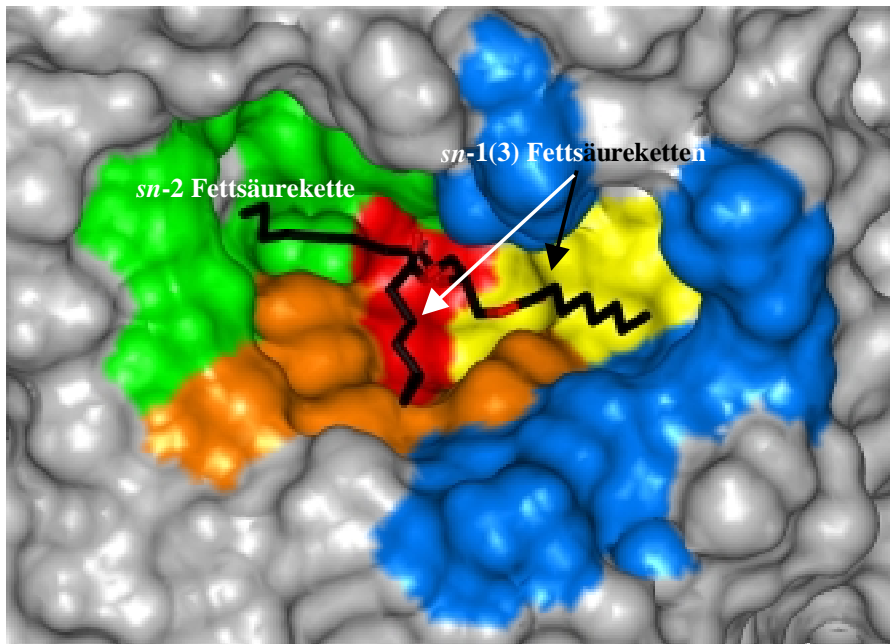


Abbildung 44: Mittlere Struktur des in *sn-2* hydrolysierten Triacylglycerids in der Bindungstasche der PCL. Die gespaltene *sn-2* Fettsäurekette lagerte sich wie im Komplex mit der ROL an den *hydrophobic crevice* (grün) an. Eine der beiden nicht-hydrolysierten *sn-1(3)* Fettsäureketten orientierte sich in den *hydrophobic dent* (orange), die *sn-3(1)* Fettsäurekette in die *cavity* (blau). Wie schon in den molekulardynamischen Untersuchungen zur Stereoselektivität beobachtet (siehe Kapitel 4.2.4), begrenzte auch hier die *wall* (gelb) ein tieferes Einlagern des Substrats in die Bindungstasche.

CRL

Die hydrolysierte *sn-2* Fettsäurekette orientierte sich in den *hydrophobic tunnel*, die beiden nicht-hydrolysierten *sn-1* und *sn-3* Fettsäureketten in die *cavity* bzw. in Teile des *hydrophobic dent*, wobei schwache repulsive Interaktionen mit F344 auftraten. Die Seitenketten der Aminosäuren F133, E208 und I453 begrenzten in CRL die Tiefe der Substratbindung in das Enzym. Allerdings ließen sie eine tiefere Bindung des Substrats in die Bindungstasche zu als entsprechende Reste der ausschließlich *sn-1(3)* regioselektiven Lipasen (Abbildung 45). Deutlich wurde diese unterschiedliche Bindung durch die entsprechenden Werte der Torsionswinkel Φ_L und Φ_M (149° bzw. 268°), die sich um ca. 50° von den Werten der anderen Lipase-Substrat Komplexe unterschieden (Tabelle 24).

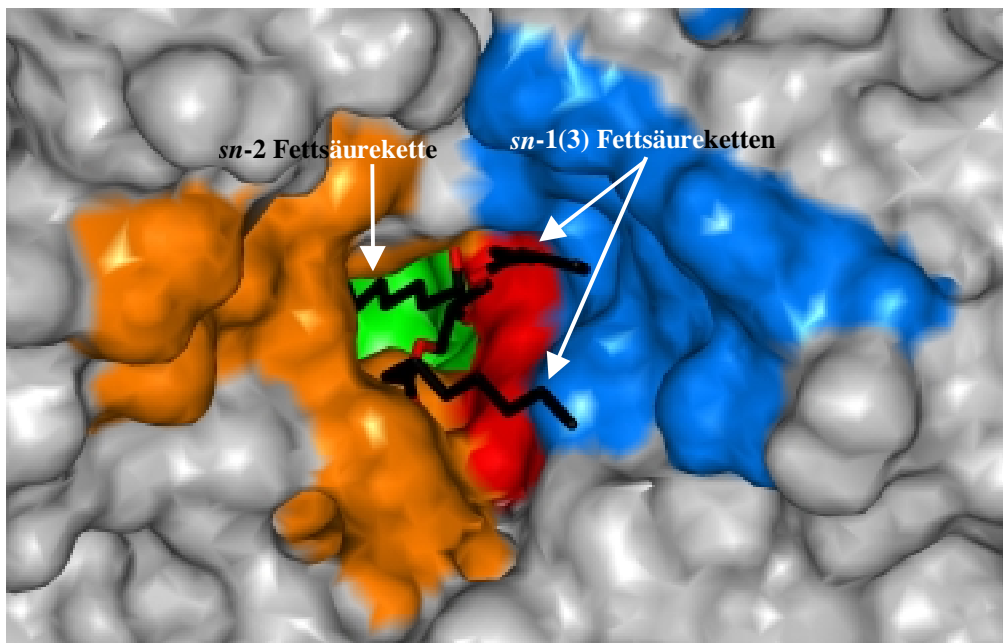


Abbildung 45: Mittlere Struktur des in *sn*-2 hydrolysierten Triacylglycerids in der Bindungstasche der CRL. Die gesplante *sn*-2 Fettsäurekette lagerte sich in den *hydrophobic tunnel* (grün) ein. Die beiden nicht-hydrolysierten *sn*-1(3) Fettsäureketten orientierten sich in den *hydrophobic dent* (orange) bzw. in die *cavity* (blau). Die zur *cavity* ausgerichtete Fettsäurekette konnte, im Gegensatz zu ROL und PCL, in CRL tiefer in die Bindungstasche eingelagert werden, was sich in den Werten für die Torsionswinkel Φ_M und Φ_L bemerkbar machte (Tabelle 24).

CAL B

Die Analyse der mittleren Struktur des CAL B-Substrat Komplexes zeigte, daß sich alle drei Fettsäureketten ähnlich denen bei der *sn*-1(3) regioselektiven Esterspaltung an die Lipase anlagerten. Die Aminosäure I290 blieb im Verlauf der molekulardynamischen Simulation unbeeinflusst. Durch diese Ausrichtung des Substrats trat auch in CAL B keine Bindung in die BTM auf (Abbildung 46). Vielmehr wurde auch hier eine tiefere Bindung in die Bindungstasche durch W104, L278 und A282 verhindert, die intensiv auf die Atome C2 und C1(3) des Glycerids einwirkten. Die Werte der Torsionswinkel Φ_M und Φ_L zeigten die resultierende Geometrieänderung im Substrat an (209° bzw. 87°, Tabelle 24).

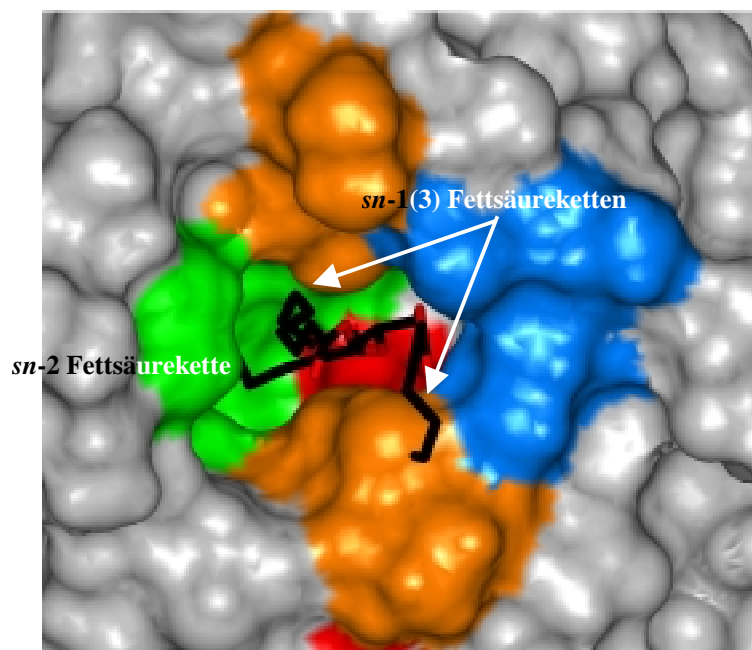


Abbildung 46: Mittlere Struktur des in *sn*-2 hydrolysierten Triacylglycerids in der Bindungstasche der CAL B. Die gespaltene *sn*-2 Fettsäurekette lagerte sich in den *hydrophobic crevice* (grün) ein. Die beiden nicht-hydrolysierten *sn*-1(3) Fettsäureketten orientierten sich in den *hydrophobic dent* (orange) bzw. in die *cavity* (blau).

Die geometrische Analyse der mittleren Strukturen der ROL-, PCL-, CRL- und CAL B-Komplexe lieferte eine Korrelation zwischen der experimentell beobachteten *sn*-2 Regioselektivität und der Geometrie des Trioctanoins (Tabelle 24). In CRL war das Substrat in der Lage, weniger repressiv an die Lipase zu binden, was sich direkt auf die Substratgeometrie auswirkte. Indikator hierfür sind die beiden Torsionswinkel Φ_M und Φ_L , um die O2-C2-Bindung.

Tabelle 24: Vergleich der regioselektiven Hydrolyse der *sn*-2 Fettsäurekette durch Rogalska *et al.* und *molecular modeling* Ergebnisse.

Lipase	experimentell bestimmte <i>sn</i> -2 Regioselektivität [%] ¹	durch <i>molecular modeling</i> vorhergesagte <i>sn</i> -2 Regioselektivität	Φ_L [°] ²	Φ_M [°] ³
CAL-B	0	nein	87	209
CRL	5	ja	149	268
PCL ⁴	0	nein	49	169
ROL ⁵	0	nein	93	212

¹ (Rogalska *et al.* 1993). ² Φ_L : Torsionswinkel um die Bindung C_{tetr.}-O2-C2-C1(3). ³ Φ_M : Torsionswinkel um die Bindung C_{tetr.}-O2-C2-C3(1). ⁴ Experimentelle Untersuchungen wurden mit *Pseudomonas species* Lipase durchgeführt, die homolog zu PCL ist. ⁵ Experimentelle Untersuchungen wurden mit *Rhizopus arrhizus* Lipase durchgeführt, die später zu ROL reklassifiziert wurde (Haas und Joerger 1995).

4.5.2 BOKATALYTISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die durchgeführten biokatalytischen Untersuchungen sollten klären, ob es sich bei dem in der Literatur beschriebenen Phänomen um eine Esterhydrolyse in Position *sn*-2 oder um eine unselektive Spaltung der *sn*-1(3) Fettsäure mit anschließender Acylwanderung von *sn*-2 nach *sn*-1(3) handelt. Dabei wurden die ausschließlich *sn*-1(3) regioselektive RDL, die nach Rogalska und Mitarbeitern zu nur 95 % *sn*-1(3) regioselektive CRL (Rogalska *et al.* 1993) sowie die stark *sn*-2 regioselektive CAL A verwendet. Tabelle 25 gibt einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der Untersuchungen. Für die Umsetzung von OPO mit RDL konnte keine Reaktion beobachtet werden.

Tabelle 25: Überblick über den zeitlichen Verlauf der Substrat-Spaltung in Position *sn*-2.

Lipase	27 Stunden	150 Stunden
RDL ¹	keine Reaktion	keine Reaktion
CRL ²	keine Reaktion	0,07 % <i>sn</i> -2
CAL A ¹	9,0 % <i>sn</i> -2	n.b. ³

¹ OPO-Spaltung. ² POP-Spaltung. ³ n.b.: nicht bestimmt.

Die Untersuchungen mit CAL A zeigten, daß das Enzym schon nach relativ kurzer Zeit Palmitinsäure freisetzte, d.h. daß Substrat in *sn*-2 regioselektiv gespalten wird (Abbildung 47). Die Fläche unter dem Peak des 1-Monooleins entspricht 9,0 % der Gesamtpeakfläche.

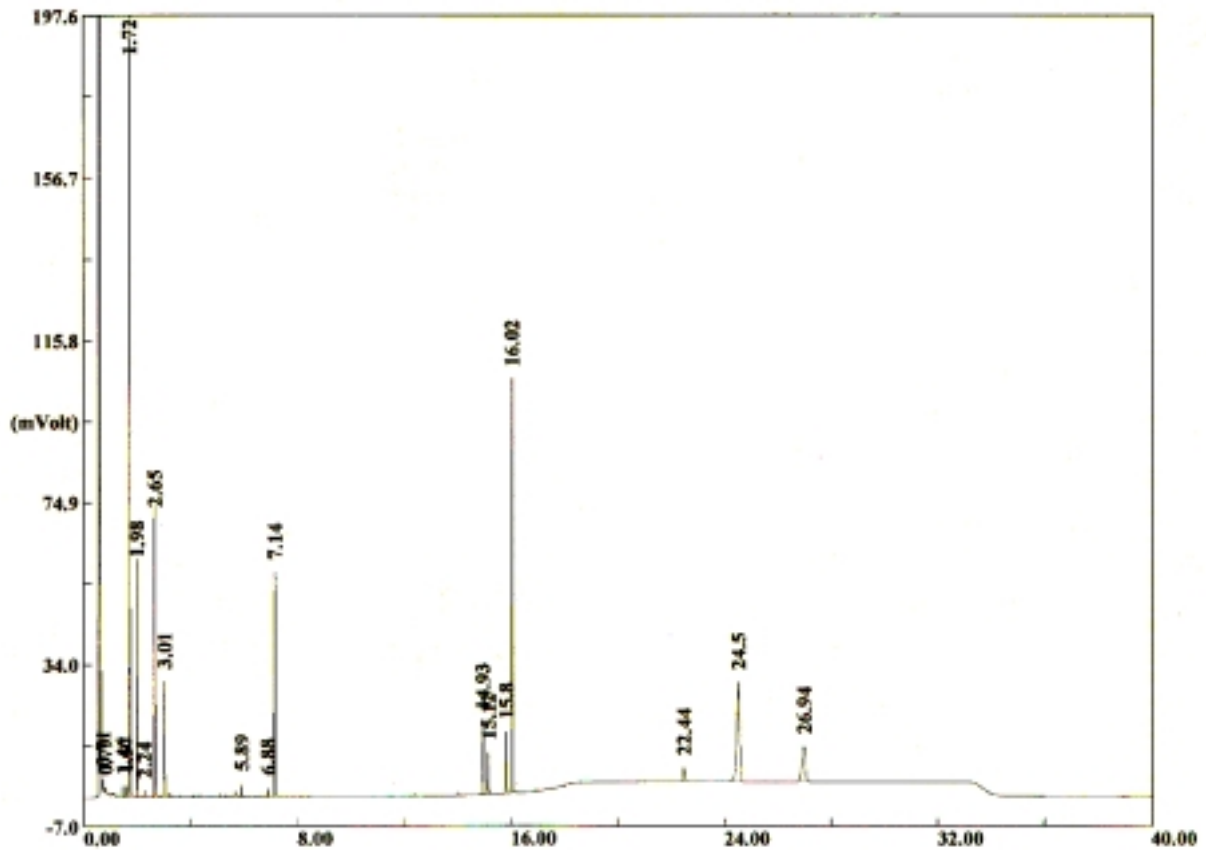


Abbildung 47: Gaschromatogramm der Reaktion von auf EP100 immobilisierter CAL A mit OPO in Aceton bei 60°C. Durch Silylierung mit MSHFBA kann zwischen *sn*-1(3) und *sn*-2 Monoglyceriden unterschieden werden. Nach 1,72 min: Palmitinsäureethylester; 1,98 min: Palmitinsäure; 2,65 min: Ölsäureethylester; 3,01 min: Ölsäure; 7,14 min: 1-Monoolein; 16,02 min: Diolein; 22,44 min: PPO; 24,5 min: OPO; 26,94 min: OOO.

Im Fall der CRL konnte unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine eindeutig *sn*-2 regioselektive Reaktion beobachtet werden (Abbildung 48). Das Chromatogramm zeigt bei 7,42 min einen schwachen Peak, der dem 1-Monopalmitoylglycerid entsprechen könnte. Die Peakfläche entspricht 0,07 % möglichem *sn*-2 Produkt. Eine eindeutige Aussage über die *sn*-2 regioselektive Spaltung von POP durch CRL kann auf dieser Grundlage nicht getroffen werden.

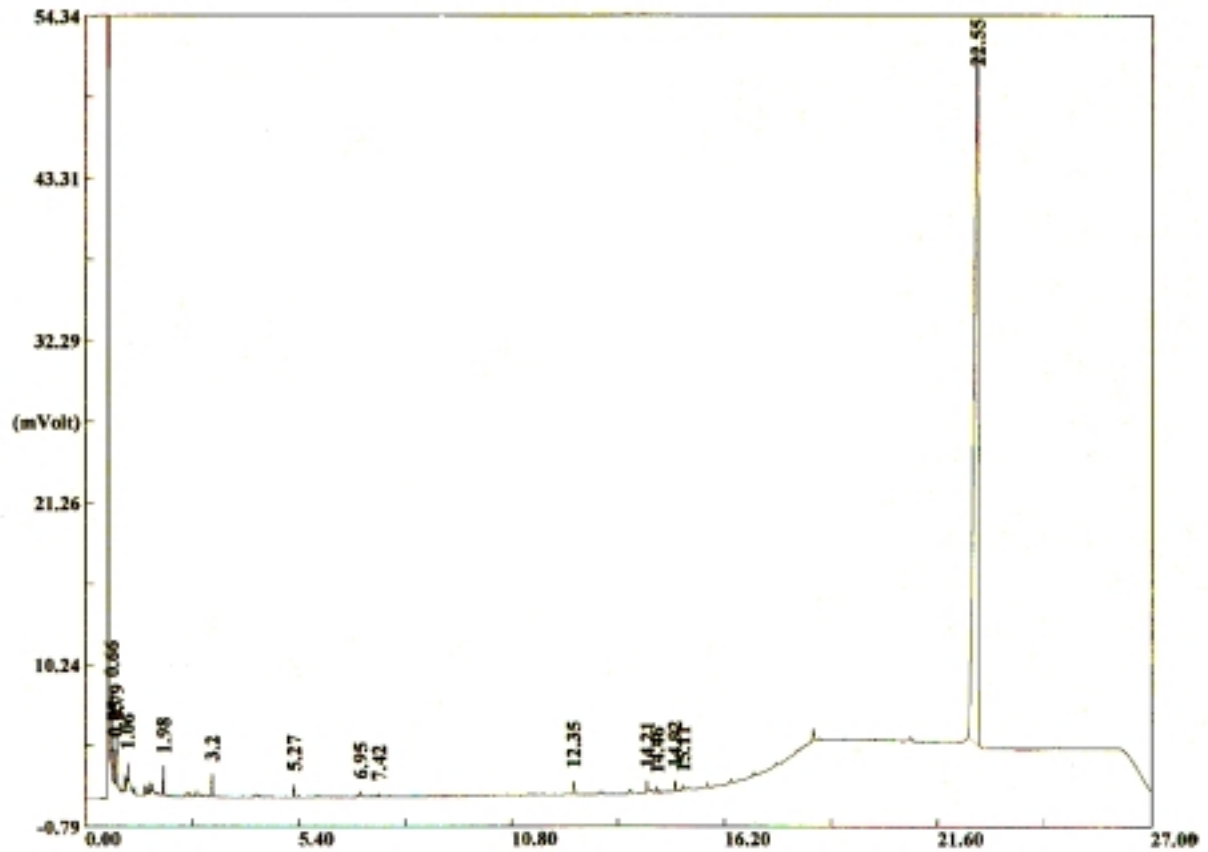


Abbildung 48: Gaschromatogramme der Reaktionen von auf EP100 immobilisierter CRL mit POP in Aceton bei 60°C. Durch Silylierung mit MSHFBA kann zwischen *sn*-1(3) und *sn*-2 Monoglyceriden unterschieden werden. Nach 1,98 min: Palmitinsäureethylester; 3,2 min: Palmitinsäure; 7,42 min: 1-Monopalmitoylglycerid; 14,21-15,11 min: verschiedene Diglyceride; 22,55 min: POP.

5. DISKUSSION

5.1 GÜLTIGKEIT DES MODELLS ZUR BESCHREIBUNG UND VORHERSAGE DER STEREOSELEKTIVITÄT VON LIPASEN

Zentrales Ziel dieser Arbeit war, die molekularen Ursachen der Stereoselektivität von Lipasen in der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga zu identifizieren und zu verstehen. Durch diese Arbeit konnte ein Modell entwickelt werden, welches für alle untersuchten mikrobiellen Lipasen eine Vorhersage der Stereoselektivität erlaubt, den Einfluß von Modifikationen an Substrat und Protein vorhersagt sowie gezielt Substrat- und *Protein Engineering* ermöglicht.

5.1.1 STEREOSELEKTIVITÄT VON LIPASEN BEI DER HYDROLYSE VON TRIACYLGLYCERIDEN UND ANALOGA

Die Stereoselektivität von mikrobiellen Lipasen bei der hydrolytischen Ester-Spaltung ist durch drei Faktoren beeinflussbar:

- 1) die chemische Struktur des *sn*-2 Substituenten
- 2) die Modifikation der Substrat-Bindungstasche
- 3) Äußere Einflußgrößen

Chemische Struktur des sn-2 Substituenten

Die chemische Struktur des *sn*-2 Substituenten von Triacylglyceriden und deren Analoga beeinflusst die Stereoselektivität der Lipase-katalysierten Hydrolyse (Stadler *et al.* 1995; Kovac *et al.* 1996). Schon in früheren Arbeiten wurde angenommen, daß der *sn*-2 Substituent mit dem *hydrophobic dent* der ROL interagiert (Haalck *et al.* 1997; Holzwarth *et al.* 1997).

Die Auswahl der fünf Substrate erfolgte nach den Kriterien Raumerfüllung und Flexibilität des *sn*-2 Substituenten, was auf die chemische Natur der funktionellen Gruppen am Glycerid C2 zurückzuführen ist. Ziel dieser Untersuchungen war es, den Teil des Substrats zu identifizieren, der entscheidend zum Phänomen der Stereoselektivität beiträgt. Drei *flexible* Substrate mit einer O'-C1' Einfachbindung wurden mit zwei *starren* Substraten verglichen, die in der funktionellen Gruppe am C2 eine Bindungsordnung größer eins aufweisen. Das Ether-Analogon stellte das kleinste und flexibelste der untersuchten Substrate dar. Tauscht man die Ether- durch eine Ester-Gruppe aus, so erhöht sich der sterische Anspruch der

funktionellen Gruppe des *sn*-2 Substituenten, deren Flexibilität bleibt jedoch erhalten. Das Benzylether-Analogon ist nahe dem Glycerid C2 mit dem Octylether-Analogon identisch, es weist jedoch eine deutlich größere Raumerfüllung am C2' auf, welches 3,3 Å vom C2 entfernt liegt. Im Gegensatz dazu ist die Amidgruppe des Amid-Analogons nur unwesentlich größer als die Ester-Gruppe. Sie ist jedoch aufgrund ihres partiellen Doppelbindungscharakters starr. Der sterisch anspruchsvollste und rigideste *sn*-2 Substituent ist der Phenylring des Phenyl-Analogons.

Modifikation der Substrat-Bindungstasche

Größe und Polarität der Bindungstasche der Lipase aus *Rhizopus oryzae* wurden systematisch durch *Protein Engineering* verändert und für die resultierenden Mutanten deren stereoselektive Hydrolyse untersucht. Die Mutationen wurden in zwei verschiedenen Positionen im *hydrophobic dent* eingeführt: L258 und L254. L258 wechselwirkte mit der funktionellen Gruppe des *sn*-2 Substituenten nahe dem Glycerid C2, während L254 Interaktionen mit C3' und C4' des *sn*-2 Substituenten aufwies.

Die Vorhersagen des *molecular modeling* in Verbindung mit den experimentellen Daten zeigen einen generellen Trend auf (Tabelle 15). Ist die Bindungstasche der ROL groß und das Substrat *flexibel*, erfolgt die Hydrolyse bevorzugt in *sn*-1, mit einem maximalen Enantiomerenüberschuß von 65 % ee (E = 5) für die ROL-L258S und das Ether-Analogon. Verringert sich die Größe der ROL-Bindungstasche oder besitzt das eingesetzte Substrat einen rigiden *sn*-2 Substituenten verschiebt sich die Stereoselektivität von ROL in Richtung *sn*-3. Die höchste *sn*-3 Stereoselektivität (92 % ee; E = 25) wurde für die ROL-L258F/L254F Doppelmutante bei der Umsetzung des Phenyl-Analogons ermittelt. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der sterische Anspruch des *sn*-2 Substituenten die Stereoselektivität von ROL bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und deren Analoga beeinflusst (Octylether-versus Benzylether-Analogon, Tabelle 15). Die entscheidende Einflußgröße ist jedoch die Flexibilität des *sn*-2 Substituenten am Glycerid C2.

Äußere Einflußgrößen

Die Stereoselektivität von Lipasen hat jedoch nicht nur Ursachen in der Wechselwirkung von Enzym und Substrat, sondern hängt zusätzlich von äußeren Einflüssen wie der Temperatur, dem Immobilisat, und dem verwendeten Lösungsmittel ab (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Durch entsprechende Wahl der Reaktionsbedingungen ist demnach eine Abweichung

der in dieser Arbeit postulierten Regel möglich. Allerdings ist die resultierende Stereopräferenz mit den heute bekannten Methoden nicht vorhersehbar.

5.1.2 MODELL ZUR BESCHREIBUNG DER STEREOPRÄFERENZ VON ROL IN DER HYDROLYSE VON TRIACYLGLYCERIDEN UND ANALOGA

In dem in dieser Arbeit etablierten Modell wird von der Annahme ausgegangen, daß die hydrolysierte Fettsäurekette an den *hydrophobic crevice* bindet, wohingegen sich der *sn-2* Substituent an den *hydrophobic dent* anlagert. Um den Katalyseprozeß überhaupt zu ermöglichen, muß die Geometrie der katalytisch wirksamen Aminosäuren und der tetraedrischen Zwischenstufe der gespaltenen Ester-Gruppe hoch konserviert sein, d.h. die Ausrichtung der Seitenkette des katalytisch aktiven Histidins und die Lage der gespaltenen C-O-Bindung des Substrats sind vorgegeben. Erfolgt die Anlagerung des Substrats an die Lipase, so orientiert sich die funktionelle Gruppe des *sn-2* Substituenten in den *His gap* zwischen dem aktiven H257 und dem L258 des *hydrophobic dent*. Das Auftreten sterischer Wechselwirkungen des Substrats mit L258 der Lipase, wie durch das Modell vorausgesagt, wurde experimentell durch die Messung der spezifischen Aktivitäten von Wildtyp-ROL und ROL-Mutanten bestätigt. So bleibt die Aktivität der Lipase durch den Austausch des sterisch anspruchsvollen L258 durch das kleinere Alanin praktisch erhalten. Im Gegensatz dazu verringert sich die spezifische Aktivität der Lipase für Triolein beim Einsatz der ROL-L258S- und ROL-L258F-Mutanten um ca. 40% (Tabelle 15).

His gap

Die Anlagerung des *sn-2* Substituenten in den *His gap* verringert die Zahl der Rotationsfreiheitsgrade. Flexible und kleine funktionelle Gruppen können sich besser an dieses Strukturelement anlagern als starre und große. Die molekulardynamische Untersuchung der Stereoselektivität erfolgte unter Berücksichtigung der beiden möglichen Orientierungen des Substrats in die Bindungstasche (*sn-1* bzw. *sn-3* Orientierung, Abbildung 12). Aufgrund der entgegengesetzten Konfiguration am Glycerid C2 unterscheidet sich die Position der funktionellen Gruppe des *sn-2* Substituenten im *His gap* in *sn-1* und *sn-3* Orientierung. Die durchgeführten molekulardynamischen Untersuchungen erwiesen sich als geeignet, um die Auswirkungen dieser Einschränkungen auf die Geometrie eines gebundenen Substrats erkennen zu können. In *sn-3* Orientierung lagerten sich die funktionellen Gruppen der *flexiblen* Triacylglyceride und deren Analoga tief im *His gap* an, während sich *starre*

Substrate zu dessen Oberfläche hin orientierten. Diese Änderung in der Substratgeometrie ist anschaulich durch einen Torsionswinkel zu beschreiben: $\Phi_{O_3-C_3}$. Für alle untersuchten Substrate korrelieren die durch *molecular modeling* generierten Stereopräferenzen mit den durch das Experiment bestimmten (Tabelle 15). $\Phi_{O_3-C_3} > 150^\circ$ korrespondiert mit *sn-1*, $\Phi_{O_3-C_3} < 150^\circ$ mit *sn-3* Stereopräferenz.

Substrate mit starren *sn-2* Substituenten, die durch L258 zurückgestoßen werden, werden bevorzugt in *sn-3* hydrolysiert, *flexible* Substrate in *sn-1*. Als Hybrids substrat und daher Sonderfall diene das Benzylether-Analogon. Obwohl es eine große Phenylgruppe in *sn-2* besitzt, ist die funktionelle Gruppe ein Ether. Die Stereoselektivität der Wildtyp-ROL für dieses Substrat folgte eindeutig der des Octylether-Analogons, wodurch das Modell zum Verständnis der molekularen Grundlagen der Stereoselektivität von ROL weiter gestützt wurde.

Modifikation der Substratbindungstasche in ROL

Um dieses Modell weitergehend zu überprüfen, wurde die Größe der ROL-Bindungstasche verändert, indem L258 durch Alanin, Serin und Phenylalanin ausgetauscht wurde.

Die spezifischen Aktivitäten der mutierten Lipasen waren geringer als die des Wildtyps, aber hoch genug um anzuzeigen, daß Aminosäure 258 zwar eine entscheidende Rolle für die Stereoselektivität der Lipase, nicht aber für deren Aktivität spielt (Tabelle 15). Dies ist beachtenswert, da durch diese Mutationen die spezifische Aktivität der Enzyme um weniger als 45 % sank. Wie durch das Modell erwartet, führte die Vergrößerung der Bindungstasche zu einer Verringerung der sterischen Wechselwirkungen mit *starren* Triacylglycerid Analoga. Der *sn-2* Substituent konnte sich nun besser in den vergrößerten *His gap* anlagern, mit der Konsequenz, daß sich die Stereoselektivität der ROL-Mutanten in Richtung *sn-1* verschob. Dieser Effekt war am stärksten ausgeprägt für das sperrige und *starre* Phenyl-Analogon. Für dieses Substrat wurde eine Umkehr der Stereopräferenz von *sn-3* nach *sn-1* gefunden. Für das gleichfalls *starre* jedoch weniger sperrige Amid-Analogon und das in seiner Größe dem Amid-Analogon vergleichbare aber *flexible* Ester-Analogon änderten sich weder die Substratgeometrie noch die Stereoselektivitäten deutlich. Alle untersuchten Substrate wurden durch ROL-L258A und ROL-L258S mit vergleichbaren Enantiomerenüberschüssen umgesetzt. Dies beweist, daß die für die Stereoselektivität verantwortlichen repulsiven Wechselwirkungen sterischer Natur sind und polare Wechselwirkungen auf die Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga keinen nennenswerten Einfluß haben.

Die Verkleinerung der Bindungstasche von ROL durch Mutation von L258 zu Phenylalanin hatte einen dramatischen Effekt auf die Geometrie des gebundenen Substrats sowie die Stereoselektivität. *Starre* Substrate richteten sich vom *His gap* weg aus. Daraus resultiert eine deutliche Vergrößerung der *sn-3* Stereoselektivität. *Flexible* Triacylglyceride und Analoga hingegen passen noch immer gut in den *His gap*. Es konnten nur geringe Änderungen der Stereoselektivität nachgewiesen werden.

Einfluß weiter vom Stereozentrum entfernter Aminosäuren auf die Stereoselektivität von ROL

Um den Einfluß einer weiter vom Glycerid C2 entfernt liegenden Aminosäure auf die Stereoselektivität von ROL zu untersuchen, wurde zusätzlich zur Mutation L258F, L254 durch Alanin, Valin bzw. Phenylalanin ersetzt. L254 ist Teil des *hydrophobic dent* und kontaktiert die *sn-2* Alkylkette oder den Phenylring in C3'-C4' (Abbildung 31). Die Doppelmutanten ROL-L258F/L254A und ROL-L258F/L254V erhöhten lediglich in einem Fall die Stereoselektivität im Vergleich zur ROL-L258F Einfachmutante (Amid-Analogen: L258F E = 14; L258F/L254V E = 16), für das Phenyl-Analogen verringerte sich der E-Wert deutlich und für die *flexiblen* Substrate blieb die Stereoselektivität unverändert erhalten. Die Doppelmutante ROL-L258F/L254F wurde realisiert, um die sterische Abstoßung des *sn-2* Substituenten durch den *hydrophobic dent* weiter zu erhöhen. Das Ester-Analogen wird durch diese Mutante nahezu unspezifisch, mit geringer *sn-3* Stereoselektivität umgesetzt (5 % ee, *sn-3*), während die Ergebnisse des *molecular modeling* eine Umkehr der Stereopräferenz von *sn-1* nach *sn-3* postulierten. Die Stereoselektivität für das kleinere, *flexible* Octylether-Analogen blieb unverändert, für die *starren* Substrate wurde die *sn-3* Stereoselektivität weiter verstärkt (Tabelle 15).

Andere Modelle zur Beschreibung der Stereoselektivität

Der C-terminale Nachbar des katalytisch aktiven Histidins, in ROL L258, wurde bereits in Arbeiten über andere Lipasen als wichtig für die Substratspezifität und -selektivität von sekundären Alkoholsubstraten erachtet (Kazlauskas 1994; Kazlauskas 1995). Hirose und Mitarbeiter (Hirose *et al.* 1995) zeigten, daß dieser Rest die Stereoselektivität bei der Umsetzung eines sekundären Alkohols durch PCL beeinflusst. Darüber hinaus spielt diese Aminosäure eine Schlüsselrolle bei der hydrolytischen Aktivität von Lipasen bei der Reaktion mit Phospholipiden (van Kampen *et al.* 1998).

Eine von Weissfloch und Kazlauskas eingeführte empirische Regel zur Beschreibung der Enantiopräferenz für primäre Alkoholsubstrate scheiterte bislang an drei bedeutenden Einschränkungen (Weissfloch und Kazlauskas 1995):

- 1) Es wurden nur Reaktionen mit PCL untersucht
- 2) Die primären Alkohol-Substrate dürfen keinen Sauerstoff benachbart zum Stereozentrum besitzen
- 3) Substrate, die den Punkten 1) und 2) gehorchten, wurden durch diese Regel lediglich zu 89 % richtig beschrieben.

Triacylglyceride und Analoga unterscheiden sich von diesen Substraten dadurch, daß sie ein Sauerstoffatom am Stereozentrum besitzen und aufgrund ihrer langen hydrophoben Fettsäureketten sehr viel größer sind, als die von Weissfloch und Kazlauskas untersuchten Substrate. Ein empirisches Modell zur Klärung der Stereoselektivität von ROL bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga wurde bereits 1997 von Holzwarth *et al.* und Haalck *et al.* vorgeschlagen (Haalck *et al.* 1997; Holzwarth *et al.* 1997). Diese Arbeiten lieferten einen Beitrag zur Verfeinerung und Verbesserung des Modells, auch durch Einführung des Torsionswinkels $\Phi_{O_3-C_3}$.

5.1.3 ERWEITERUNG DES MODELLS AUF RML

Obwohl ROL und RML homolog sind, unterscheidet sich die Stereoselektivität bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga deutlich. Die Stereoselektivität von ROL hängt dabei stark von der chemischen Struktur und Größe des *sn*-2 Substituenten ab. *Flexible* Substrate (Ether- und Ester-Analoga) werden bevorzugt in *sn*-1 hydrolysiert, die *starren* Amid- und Phenyl-Analoga in *sn*-3. Im Gegensatz dazu spaltet RML alle vier Substrate bevorzugt in *sn*-1. Unterschiedliche Stereoselektivitäten homologer Lipasen bei der Spaltung von Triacylglyceriden und Analoga sind auch für *Pseudomonas* Lipasen bekannt (Rogalska *et al.* 1993; Stadler *et al.* 1995).

Sequentielle und strukturelle Verwandtschaft der Lipasen aus Mucorales

Bis heute wurde keine durch Röntgenstrukturanalyse aufgelöste Raumstruktur der ROL in offener Konformation veröffentlicht. Von RML hingegen existieren zwei öffentlich zugängliche Strukturen in der Protein Datenbank (Brzozowski *et al.* 1991; Derewenda *et al.* 1992). ROL und RML sind sequenzhomolog. 70% der Aminosäuren beider Lipasen sind entweder identisch oder weisen ähnliche Eigenschaften, z.B. Polarität, auf. Diese Ähnlichkeit

ist ausreichend, um ein Strukturmodell der ROL auf Grundlage der experimentell bestimmten Raumstruktur der RML zu erstellen. Um Vergleiche des stereoselektiven Verhaltens auf molekularer Ebene zwischen dem ROL-Strukturmodell und der experimentellen Struktur der RML anstellen zu können, mußte im Vorfeld geklärt werden, wie stark sich ROL und RML in ihrer 3D-Struktur unterscheiden. Für diesen Vergleich war die Röntgenstruktur der halbgeöffneten RDL 1tic (Derewenda *et al.* 1994) (später reklassifiziert zu ROL (Haas und Joerger 1995)) von essentieller Bedeutung. Aus diesem Vergleich konnten folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

- 1) Die Öffnung des Lids beeinflusst die Lage der relevanten Aminosäuren in der Bindungstasche der Lipase nicht.
- 2) Darüber hinaus beeinflusst die Bindung eines Substrats die Struktur der Lipase nur sehr wenig.

Diese Annahme wurde durch Untersuchungen zur Kristallstruktur von PCL gestützt (Lang und Dijkstra 1998), die ergaben, daß die Bindung eines Triacylglycerid-analogen Phosphonat-Inhibitors die Struktur der Lipase in nicht nennenswerter Weise beeinflusst.

His gap

In ROL ergaben *molecular modeling* Untersuchungen, daß der *sn*-2 Substituent des Substrats in den *His gap* bindet. Dabei tritt die funktionelle Gruppe des *sn*-2 Substituenten direkt mit L258 in Kontakt. Die dabei auftretenden Wechselwirkungen zwischen dem *sn*-2 Substituenten und Aminosäure 258 sind zum überwiegenden Teil sterischer Natur und lassen eine Unterscheidung zwischen *sn*-1 und *sn*-3 Stereopräferenz zu. Nach diesem Modell ist es möglich, die Stereoselektivität durch die Starrheit des *sn*-2 Substituenten und/oder die Größe der Aminosäure 258 zu modifizieren. Das *His gap* Motiv ist jedoch in Lipasen aus *Mucorales* konserviert. Dies gilt auch für die Reste des *hydrophobic dent*, mit Ausnahme der Aminosäure 254 (in ROL Leucin, in RML Valin). Untersuchungen zur Stereoselektivität von ROL ergaben jedoch, daß der Austausch des L254 durch Valin keine signifikanten Auswirkungen auf die Stereoselektivität der ROL bewirkt. Daraus läßt sich folgern, daß für die unterschiedliche Stereoselektivitäten von ROL und RML bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga weitere Wechselwirkungen von Belang sein müssen.

Lid

A89 in ROL ist Teil des *lids*. In RML entspricht dies W88. Die Kristallstruktur von RML zeigt eine räumliche Nähe von W88 zum *sn*-2 Substituenten, was einen sterischen Effekt auf

den *sn*-2 Substituenten ausüben könnte. Der Austausch von A89 in ROL durch Tryptophan hatte jedoch keinen Einfluß auf die Stereoselektivität der Lipase in der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga (F. Paltauf, persönliche Mitteilung). Ein Einfluß der Aminosäure 89 in ROL bzw. 88 in RML auf die Stereoselektivität ist demnach nicht wahrscheinlich. Das *lid* stellt ein in höchstem Maß flexibles Sekundärstrukturelement dar, das bei der Aktivierung der Lipase an einer Lipid-Wasser-Grenzschicht das katalytische Zentrum für den Substratzugang freigibt (Derewenda *et al.* 1994). Der Austausch von Aminosäuren im *lid* wurde an der zu ROL homologen *Humicola lanuginosa* Lipase durchgeführt (Martinelle *et al.* 1996). Ein Einfluß dieser Mutationen auf die Stereoselektivität von Triacylglyceriden und Analoga wurde bislang jedoch noch nicht untersucht.

G-elbow

Da alle anderen mit dem Substrat in Kontakt tretenden Aminosäuren in Lipasen aus *Mucorales* entweder konserviert sind oder nicht zur Stereoselektivität beitragen, wurden indirekte Effekte auf die Substratbindung mit berücksichtigt. Diese können von Aminosäuren herrühren, die nicht direkt das Substrat kontaktieren, sondern zu solchen Resten benachbart sind und sich in ROL und RML unterscheiden. G266 ist dem Glycerid C2 eines gebundenen Triacylglycerids oder Analogons direkt benachbart und liegt auf einem kurzen, drei Aminosäuren langen *loop*. In RML ist dieser *G-elbow loop* weiter in Richtung Substrat orientiert als in ROL. Beide dem G266 benachbarten Aminosäuren variieren in *Mucorales* Lipasen. Der C-terminal benachbarte Rest (L267 in RML, S267 in ROL) ist weit vom Substrat und der katalytischen Maschinerie entfernt. Zudem wird das C-terminale Ende in beiden Lipasen durch eine Disulfidbrücke zwischen C268 und C29 fixiert. Der Einfluß der Aminosäure 267 auf die Stereoselektivität ist demnach gering. Der N-terminale Nachbar (T265 in RML, E265 in ROL) hingegen wechselwirkte kaum attraktiv mit H143 (in RML, H144 in ROL). Beer und Mitarbeiter (Beer *et al.* 1996) postulierten, daß H144 in ROL entscheidend zur Positionierung des katalytisch aktiven H257 beiträgt. Der Austausch des E265 durch Aspartat resultierte in einem Zusammenbrechen der Geometrie des katalytischen Zentrums, wahrscheinlich aufgrund einer neu gebildeten H-Brücken Bindung zwischen H144 und D265. Zusätzlich verringerte die Positionierung der Seitenkette des D265 in unmittelbarer Nähe des H144 den dort vorhandenen Raum beträchtlich (Abbildung 32, vertikaler Pfeil), was sich negativ auf die Ausrichtung des H144 und damit auf H257 auswirken kann (siehe auch Kapitel 4.4 Stereoselektivität gegenüber γ - und δ -Lactonen). Das T265 in RML ist klein genug, um seine Seitenkette in Richtung des H143 auszurichten, eine Voraussetzung für das

Ausbilden der H-Brücken Bindung von der Hydroxygruppe des T265 zum N δ des Imidazolrings von H143. Dadurch kommt das T265 in RML näher am H143 zu liegen als E265 in ROL und damit ändert sich auch die Position des G266 in beiden Lipasen (Abbildung 32).

Die unterschiedlichen Positionen des *G-elbow* in Lipasen aus *Mucorales* resultieren demnach von Aminosäuren, die nicht direkt mit dem Substrat in Kontakt treten, die jedoch indirekt Einfluß auf die Bindung von Triacylglyceriden und Analoga in die Bindungstasche von ROL und RML nehmen können. In RML ist G266 weiter in die Bindungstasche ausgerichtet. Das Substrat bindet demnach weniger tief in die Bindungstasche (Abbildung 32, horizontaler Pfeil). Dies könnte eine Erklärung für die weniger intensiven sterischen Wechselwirkungen zwischen dem *sn*-2 Substituenten und L258 in RML sein. Daraus folgt, daß L258 in RML nicht zwischen *flexiblen* und *starren* Substraten unterscheidet, sondern beide Substrattypen mit ähnlicher Geometrie an die Lipase binden, woraus sich direkt die *sn*-1 Stereopräferenz von RML für alle untersuchten Triacylglyceride und Analoga ableiten läßt.

Modell für Lipasen aus Mucorales

Das für Wildtyp-ROL und ROL-Mutanten etablierte und für diese Lipasen ohne Einschränkung gültige Modell gilt gleichfalls für RML. Geometrieunterschiede zwischen einem gebundenen Substrat in *sn*-1 und *sn*-3 Orientierung entscheiden darüber, in welcher der beiden Orientierungen das Substrat bevorzugt hydrolysiert wird. Der Torsionswinkel $\Phi_{O_3-C_3}$ zeigt für ROL an, daß *flexible* und *starre* Substrate mit unterschiedlicher Konformation an die Lipase binden. Im Fall der RML binden *flexible* und *starre* Substrate mit ähnlicher Konformation, die Hydrolyse erfolgt bei gleicher Stereopräferenz. In den Lipasen aus *Mucorales* wurden zwei, die Stereoselektivität bestimmende Regionen identifiziert (*His gap* und *G-elbow loop*), mit denen dieses Verhalten erklärt werden kann.

5.1.4 ERWEITERUNG DES MODELLS ZUR VORHERSAGE DER STEREOPRÄFERENZ VON MIKROBIELLEN LIPASEN IN DER HYDROLYSE VON TRIACYLGLYCERIDEN UND ANALOGA

Sequenzhomologie in mikrobiellen Lipasen

Die in dieser Arbeit untersuchten mikrobiellen Lipasen ROL, RML, PCL, CRL und CAL B weisen signifikante Unterschiede in ihrer Länge und der Zusammensetzung ihrer Primärstruktur auf. Eine Übersicht über ein Sequenzalignment der fünf Lipasen findet sich im

Anhang (siehe Kapitel 8.1). Dabei fällt auf, daß sich die Lipasen derart voneinander unterscheiden, daß lediglich das katalytisch aktive Serin und die Reste des GX SXG-Pentapeptid-Motivs übereinandergelegt werden konnten. Obwohl in CAL B ein TX SXG-Motiv vorliegt, konnte diese Region mit ROL, RML und PCL überlagert werden. Für CRL konnte prinzipiell keine Überlagerung mit den anderen Lipasen erreicht werden.

Strukturhomologie der Bindungstaschen in mikrobiellen Lipasen

Trotz nur geringer Sequenzähnlichkeit unter den mikrobiellen Lipasen, weisen diese Enzyme deutliche strukturelle Homologien auf. Dies entspricht der von Holm und Sander gefundenen strukturellen Ähnlichkeit von Proteinen ohne entsprechende Sequenzhomologie (Holm und Sander 1993). Alle mikrobiellen Lipasen weisen, neben der katalytischen Triade und dem *oxyanion hole*, einen *hydrophobic crevice* (Bindestelle für den hydrolysierten Ester) und einen *hydrophobic dent* (Bindestelle für die *sn*-2 Fettsäurekette) auf. Mit Ausnahme der Lipasen aus *Mucorales*, ROL und RML, besitzen alle mikrobiellen Lipasen noch eine dritte Region, an die Teile des Substrats anlagern können, die sogenannte *cavity*. Die Abbildungen 27 bis 30 geben einen Überblick über die homologen Regionen der mikrobiellen Lipasen. Die außerdem abgebildeten Connolly-Oberflächen (Connolly 1983) zeigen deutlich, daß trotz funktionaler Homologie die Gestaltung der Bindungstaschen zwischen den Lipasen deutlich variiert.

Modell zur Stereoselektivität mikrobieller Lipasen in der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga

Wie für ROL und RML sind die molekularen Ursachen der Stereoselektivität von mikrobiellen Lipasen zum überwiegenden Teil sterischer Natur. Ein *His gap* Strukturelement aus katalytisch aktivem Histidin und C-terminal benachbartem Leucin, welches mit der funktionellen Gruppe des *sn*-2 Substituenten interagiert, findet sich in ROL, RML und PCL. Für CRL und CAL B sind die dem aktiven Histidin C-terminal benachbarten Aminosäuren, S450 bzw. A225, weit vom *sn*-2 Substituenten entfernt, wenngleich andere Reste in vergleichbarer Position zum Leucin sitzen (in CRL: F344; in CAL B: I189) und mit dem Substrat repulsiv sterisch wechselwirken können. Interaktionen zwischen dem *sn*-2 Substituenten eines Triacylglycerids bzw. Analogons und der Lipase finden hauptsächlich in unmittelbarer Nachbarschaft zum katalytisch aktiven Histidin statt, ohne dessen Aktivität signifikant einzuschränken. Dies hat voraussichtlich zwei Gründe. Erstens fixiert die katalytische Maschinerie das Substrat in der Bindungstasche, so daß sterische Einflußnahme

auf die Geometrie des Substrats wirkungsvoll und zielgerichtet erfolgen kann. Zweitens weisen Triacylglyceride und Analoga als Ester primärer Alkohole eine Methylengruppe zwischen Estersauerstoff und Stereozentrum auf, was eine Interaktion zwischen Lipase und Stereozentrum prinzipiell an einer Stelle ermöglicht, deren Modifikation keinen signifikanten Einfluß auf die katalytische Maschinerie hat.

Für alle mikrobiellen Lipasen besteht eine Korrelation zwischen Stereopräferenz und der Geometrie des Substrats in *sn*-3 Orientierung, dem Torsionswinkel Φ_{O3-C3} um die O3-C3 Einfachbindung. Mit Ausnahme der PCL gilt für alle mikrobiellen Lipasen ein Schwellenwert $\Phi_{O3-C3} = 150^\circ$ (PCL: $\Phi_{O3-C3} = 140^\circ$). Liegt der Wert darunter, erfolgt die Hydrolyse in *sn*-3, darüber bevorzugt in *sn*-1. Trotz deutlicher Unterschiede zwischen den Aminosäuresequenzen und Strukturen der Bindungstaschen, ist erstaunlich, daß neben einer katalytischen Maschinerie, bestehend aus katalytischer Triade und *oxyanion hole*, auch ein die Stereoselektivität mikrobieller Lipasen bestimmendes Strukturelement funktional konserviert ist. In den in dieser Arbeit untersuchten mikrobiellen Lipasen sind diese Reste Leucin (ROL, RML, PCL), Phenylalanin (CRL) bzw. Isoleucin (CAL B), d.h. unpolare und sterisch anspruchsvolle Aminosäuren.

Modifikation der Stereoselektivität von PCL durch positionsgerichtete Mutagenese

Um die Gültigkeit des erweiterten Modells zur Beschreibung und Vorhersage der molekularen Ursachen der Stereopräferenz von mikrobiellen Lipasen bei der hydrolytischen Esterspaltung von Triacylglyceriden und deren Analoga zu überprüfen, wurde, wie schon im Fall der ROL, gezielt eine Aminosäure der Bindungstasche ausgetauscht. Die Mutation erfolgte in Position 287 durch Austausch des dem katalytischen H286 C-terminal benachbarten Leucins durch Phenylalanin. Sowohl *molecular modeling* als auch experimentelle Untersuchungen zeigten, daß die Stereopräferenz der PCL-Mutante für das *starre* Phenyl-Analogon von *sn*-1 nach *sn*-3 verschoben werden konnte. Dies ist der einzige bekannte Fall einer Verschiebung der Stereopräferenz in dieser Richtung.

Die Mutation L287F wurde mit Hilfe des "Quik-Change"-Protokolls in das Gen der PCL eingeführt. Diese Methode hat den Vorteil, deutlich schneller als die von Quyen und Mitarbeitern entwickelte zu sein und darüber hinaus keine Probleme mit der Ligation aufzuweisen (Quyen *et al.* 1999). Die Umfaltungsprozedur der inaktiven Einschlußkörper zu aktivem Protein erfolgte basierend auf der Methodik von Quyen *et al.* (Quyen *et al.* 1999), wobei die erzielten Aktivitäten signifikant kleiner waren als in der Literatur beschrieben. Dies läßt sich höchstwahrscheinlich zurückführen auf nicht optimierte Fermentationsbedingungen

sowie eine noch nicht ausgereifte Umfaltungsmethodik, insbesondere bezüglich eines Verfahrens zum Zellaufschluß, der Dauer und Temperatur der Umfaltungsprozedur sowie der Verdünnung der Umfaltungslösung.

5.2 ESTER PRIMÄRER ALKOHOLE

Nachdem gezeigt werden konnte, daß das in dieser Arbeit entwickelte Modell zur Stereoselektivität von Triacylglyceriden und Analoga ohne Einschränkung für sowohl mikrobielle Wildtyp-Lipasen als auch durch den Austausch einzelner Aminosäuren modifizierte ROL- und PCL-Mutante gültig ist, wurde die entsprechende *molecular modeling* Methodik auf weitere primäre Alkoholsubstrate ausgedehnt.

Die Enantioselektivität von Lipasen bei der Umsetzung von primären Alkoholsubstraten unterscheidet sich in ihrer Komplexität deutlich von der für sekundäre Alkohole (siehe Kapitel 1.3.3 und 1.3.4). Basiert eine hohe Enantioselektivität bei sekundären Alkoholsubstraten in erster Linie auf einem ausgeprägten Größenunterschied der Substituenten am Stereozentrum (Laumen 1987; Roberts 1989; Xie *et al.* 1990; Burgess und Jennings 1991; Janssen *et al.* 1991; Kazlauskas *et al.* 1991; Kim und Cho 1992; Lutz *et al.* 1992; Naemura *et al.* 1993; Naemura *et al.* 1995; Orrenius *et al.* 1995; Naemura *et al.* 1996), ist dieser einfache Zusammenhang für primäre Alkoholsubstrate nicht mehr gültig (Weissfloch und Kazlauskas 1995).

Die Auswahl der Klasse 1 Substrate erfolgte nach folgenden Kriterien. Es mußten

- 1) veröffentlichte experimentelle Daten zur Enantioselektivität vorliegen,
- 2) sich die Substrate strukturell signifikant von Triacylglyceriden und deren Analoga abheben und
- 3) die Substrate trotzdem untereinander ähnliche Strukturen aufweisen, jedoch deutlich unterschiedliche Enantioselektivitäten und -präferenzen besitzen.

Die Verbindungen **6** bis **9** sind kleiner als Triacylglyceride und besitzen Substituenten unterschiedlicher Größen und Polarität am Stereozentrum. Dadurch können sie keine ausgeprägten attraktiven hydrophoben Wechselwirkungen mit der Lipase eingehen.

Ziel dieser Untersuchungen war zu überprüfen, ob das Modell für Triacylglyceride und Analoga auch auf diese strukturell nur wenig verwandten primären Alkoholsubstrate der Klasse 1 übertragbar ist, d.h. ob die Enantioselektivität allein von der primären Alkoholgruppe herrührt oder ob die Substituenten **M** und **L** am Stereozentrum gleichfalls Einfluß ausüben.

Mit Ausnahme von Verbindung **9** wird von allen Klasse 1 Substraten bevorzugt das (*S*)-Enantiomer hydrolysiert. Für Verbindung **6**, deren großer Substituent **L** einen Benzyl-, der mittelgroße Substituent **M** einen Acetoxyrest darstellen, wurde eine Enantioselektivität von $E > 100$ bestimmt (Egri *et al.* 1996). Ein im Vergleich zu **6** voluminöserer Substituent **L** in Verbindung **7** führte zu einer nur noch geringfügigen Enantioselektivität ($E = 4-7$) (Egri *et al.* 1996). Die Struktur von Verbindung **8** unterscheidet sich von **6** durch den Austausch von **M**, des Acetoxyrestes durch eine Methylgruppe. Das Substrat wird mit noch moderater Enantioselektivität ($E = 20$) hydrolysiert (Egri *et al.* 1996). In Verbindung **9** wurde der große Benzoyloxyrest **L** über einen Sauerstoff an das Stereozentrum gebunden (siehe Kapitel 1.3.4). **M** war eine Hydroxymethylgruppe. Die Enantioselektivität wurde für **9** zu $E = 20-28$ bestimmt (Terao *et al.* 1988), wobei PCL bevorzugt das (*R*)-Enantiomer umsetzt.

Eine Unterscheidung der Klasse 1 Substrate nach (*R*)- und (*S*)-Enantiomeren erwies sich die Auswertung der *molecular modeling* Studien als nicht geeignet. Durch die Konventionen der chemischen Nomenklatur ändert sich bei gleicher Lage der Substituenten die Konfigurationsbezeichnung von (*R*) bei den Substraten **6** bis **8** zu (*S*) bei **9**. Die Orientierung der Substituenten **M** und **L** bleibt jedoch unbeeinflusst.

Die Substrate der Klasse 2 wurden ausgewählt, weil sie strukturell zwischen den Triacylglyceriden und deren Analoga und den Klasse 1 Substraten eingestuft werden können. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten *molecular modeling* Untersuchungen sollte überprüft werden, ob das Modell für Triacylglyceride und Analoga zur Beschreibung der nur in geringem Maße vorhandenen Enantioselektivität der Klasse 2 Substrate (Gaziola *et al.* 1996) angewendet werden kann.

Die Analyse der MD-Simulationen ergab, daß eine einfache Korrelation zwischen Enantiopräferenz und Substratgeometrie der Komplexe aus PCL mit primären Alkoholsubstraten analog der für Triacylglyceride und Analoga (Torsionswinkel $\Phi_{O_3-C_3}$) nicht gefunden werden konnte. Auch die Analyse der Bindungsaffinität unter Verwendung der *score*-Software lieferte keine verwertbaren Ergebnisse. Die Auswertung der molekulardynamischen Simulationen erfolgte daher unter Berücksichtigung mehrerer Einflußgrößen, die bislang nicht zu einer Bewertungsfunktion zusammengefaßt werden konnten. Um die Enantioselektivität für das (*R*)- bzw. (*S*)-Enantiomer der Klasse 1 Substrate verstehen und gegebenenfalls vorhersagen zu können, wurden vier potentielle Faktoren untersucht:

- 1) Visuelle Analyse der Trajektorie, wobei das Hauptaugenmerk auf das Verhalten des Substrats in der Bindungstasche der Lipase gerichtet war
- 2) Im Verlauf der molekulardynamischen Simulation ausgebildeten H-Brücken Bindungen zwischen Lipase und Substrat
- 3) Lage der Substituenten **M** und **L** des Substrats in der PCL-Bindungstasche
- 4) Lage der Seitenkette des katalytisch aktiven H286

5.2.1 VISUELLE ANALYSE DER TRAJEKTORIE

Die Analyse des Verhaltens der Substrate in der PCL-Bindungstasche läßt einen Trend erkennen. Für die Verbindungen **6** bis **8** wechselwirkte das bevorzugt umgesetzte (*S*)-Enantiomer deutlich weniger repulsiv mit der Lipase als das (*R*)-Enantiomer. Weniger stark ausgeprägte abstoßende Wechselwirkungen zwischen Substrat und Enzym zeigten für **6** bis **8** das bevorzugt umgesetzte Enantiomer an. Für Verbindung **9** zeigte das weniger bevorzugt hydrolysierte (*S*)-Enantiomer gleichfalls weniger intensive repulsive Interaktionen mit dem Enzym. Allerdings beeinflussten für **9** weitere Einflußgrößen die Enantiopräferenz (siehe unten: Position H286).

5.2.2 H-BRÜCKEN BINDUNGEN

Mit entscheidend für die Unterscheidung von bevorzugt umgesetztem und weniger bevorzugt umgesetztem Substrat ist die Ausbildung von H-Brücken Bindungen zwischen Enzym und Substrat. So fungieren die Acetylgruppen der (*S*)-Enantiomere der Verbindungen **6** und **7** als Akzeptoren für eine H-Brücken Bindung von der Hydroxylgruppe der T18-Seitenkette. Verbindung **8** besitzt weder H-Brücken Donoren noch Akzeptoren in **M**, weshalb für diese Verbindung keine zusätzlichen H-Brücken Bindungen zwischen Lipase und Substrat beobachtet werden konnten. Dagegen bildete (*S*)-**9** eine H-Brücken Bindung von der Hydroxymethylgruppe des mittleren Substituenten **M** zur Hydroxylgruppe des Y29 aus.

Die Ausbildung einer zusätzliche H-Brücken Bindung von **M** zu Aminosäuren der PCL-Bindungstasche kann als Indiz für eine bevorzugte Hydrolyse der (*S*)-Enantiomere von **6** und **7** dienen. Da **8** zur Ausbildung einer solchen jedoch prinzipiell nicht in der Lage ist, bzw. von **9** trotz des Auftretens einer entsprechenden Wechselwirkung bevorzugt die (*R*)-Form

gespalten wird, kann dieses Kriterium lediglich als zusätzlicher Aspekt, nicht jedoch als entscheiden für die Enantiopräferenz angesehen werden.

Die Ausbildung nur einer essentiellen H-Brücken Bindung von H286 zu O₇ des S87 konnte in allen drei auftretenden Fällen ((*R*)-**8**, (*R*)-**9**, (*S*)-**9**) auf das Wegklappen des aktiven H286 aus seiner katalytisch aktiven Position zurückgeführt werden (siehe Kapitel 5.2.4).

5.2.3 LAGE DER SUBSTITUENTEN IN DER BINDUNGSTASCHE

Die Lage der Substituenten in der Bindungstasche gibt bei Kenntnis der Startstruktur indirekt Aufschluß über die Interaktionen, die im Verlauf einer molekulardynamischen Simulation zwischen Lipase und Substrat auftreten können, ist jedoch für eine Vorhersage der Enantiopräferenz völlig ungeeignet. Der mittelgroße Substituent **M** konnte je nach Enantiomer und Größe in die BTM oder die *cavity* orientiert sein. Der große Substituent **L** richtete sich in aller Regel in den *hydrophobic dent* aus, in einem Fall, (*S*)-**8**, jedoch auch in die *cavity*.

5.2.4 POSITION DES KATALYTISCH AKTIVEN H286

Für alle untersuchten Komplexe der PCL mit den (*R*)-Enantiomeren der Substrate erfolgte eine zumindest vorübergehende Auslenkung des Imidazolrings des katalytisch aktiven H286 aus seiner für die Katalysereaktion relevanten Lage. Lediglich in einem Fall, Verbindung **9**, wurde die Seitenkette des H286 durch abstoßende Interaktion mit einem (*S*)-Enantiomer ausgelenkt. Verbindung **9** ist auch das einzige Substrat der Klasse 1, von welchem bevorzugt das (*R*)-Enantiomer umgesetzt wird. Die Position des katalytisch aktiven H286 kann als Kriterium für die Unterscheidung von bevorzugt und weniger bevorzugt hydrolysierten Klasse 1 Substraten herangezogen werden. Dabei ist zu beachten, daß hierfür nicht allein die Analyse der mittleren Strukturen ausreicht, sondern vielmehr auch die Trajektorien verfolgt werden müssen (siehe Kapitel 5.2.1).

Von den vier untersuchten Faktoren mit potentiell Einfluß auf die Enantioselektivität kann lediglich die Lage der Substituenten **M** und **L** in der PCL-Bindungstasche für die Analyse eindeutig vernachlässigt werden, wohingegen zusätzliche H-Brücken Bindungen zwischen Lipase und Substrat einen möglicherweise schwachen Einfluß ausüben können. Dagegen ist die Analyse der mittleren Strukturen sowie der Trajektorien der MD-Simulationen beider

Enantiomere hinsichtlich der repulsiven sterischen Wechselwirkungen zwischen **M** und **L** sowie den Aminosäuren der PCL-Bindungstasche, insbesondere der Seitenkette des aktiven H287, für die Unterscheidung der Enantiomere essentiell.

5.2.5 KOMPLEXITÄT DES PHÄNOMENS DER ENANTIOPRÄFERENZ PRIMÄRER ALKOHOLSUBSTRATE

Molecular modeling Studien ergaben, daß die Aminosäuren der *wall* (Abbildung 28) limitierend auf die Bindung von Substraten in die Bindungstasche wirken. Diese Reste begrenzen den Zugang zur PCL-Bindungstasche. Abhängig von Volumen und chemischer Struktur der Substrate kann das Stereozentrum näher oder weiter entfernt von der *wall* liegen. Das "Einpassen" des Substrats erfolgt somit individuell.

Daraus ergeben sich weitreichende Konsequenzen sowohl für die Umsetzung von primären im Vergleich zu sekundären Alkoholsubstraten als auch für primäre Alkoholsubstrate der Klasse 1 untereinander. Primäre Alkohole besitzen im Gegensatz zu sekundären eine Methylengruppe zwischen dem Estersauerstoff und dem Stereozentrum (Abbildung 11). Aus der freien Drehbarkeit der C-O bzw. C-C Einfachbindungen an der Methylengruppe resultiert eine größere Zahl an Rotations- und Schwingungsfreiheitsgraden, welche es dem primären Alkoholsubstrat ermöglichen, sich den strukturellen Gegebenheiten der PCL-Bindungstasche anzupassen. Für sekundäre Alkoholsubstrate ist dies so nicht möglich, weshalb allein aufgrund des Größenunterschieds von **M** und **L** die experimentell beobachtete Diskriminierung (Kazlauskas *et al.* 1991) zwischen bevorzugtem und weniger bevorzugtem Enantiomer ermöglicht sein könnte. Andererseits könnte die Flexibilität der primären Alkoholsubstrate ein entscheidender Grund für die überwiegend geringe Enantioselektivität von Lipasen bei der Umsetzung dieser Substrate sein.

Die strukturelle Flexibilität der primären Alkoholreste nahe dem Stereozentrum ist sehr wahrscheinlich mitentscheidend für die Komplexität der Enantioselektivität. So beeinflussen Größe und chemische Struktur von **M** die Tiefe der Substratbindung in die Bindungstasche beträchtlich, wengleich *molecular modeling* Untersuchungen keinen direkten Einfluß der Lage der Substituenten am Stereozentrum auf die Enantioselektivität vermuten lassen. Vielmehr beeinflussen Größe und Flexibilität von **L** (Verbindungen **6**, **7** und **9**) sowie abstoßende sterische Wechselwirkungen mit dem Imidazolring des H286 die Enantioselektivität. Die Zusammenführung dieser Beobachtungen aus dem *molecular*

modeling mit einer größeren Zahl experimenteller Daten zu einer Bewertungsfunktion ist Ziel weitergehender Untersuchungen.

5.2.6 MODELL FÜR PRIMÄRE ALKOHOLSUBSTRATE IM VERGLEICH ZUM KAZLAUSKAS-MODELL FÜR SEKUNDÄRE ALKOHOLSUBSTRATE

Das von Kazlauskas *et al.* (Kazlauskas *et al.* 1991) entwickelte Modell zum molekularen Verständnis der Enantiopräferenz sekundärer Alkoholsubstrate basiert ausschließlich auf dem Größenunterschied der Substituenten am Stereozentrum. Je größer dieser Unterschied, desto ausgeprägter die Stereopräferenz (Kazlauskas *et al.* 1991; Gupta und Kazlauskas 1993; Rotticci *et al.* 1997). Dabei orientiert sich der mittelgroße Substituent **M** am Stereozentrum in die BTM, der große Substituent **L** in die BTL. Das Substrat hat, aufgrund der direkten Nachbarschaft des Stereozentrums zum Estersauerstoff und damit zum katalytisch aktiven Histidin, nur eine begrenzte Anzahl von Rotations- und Schwingungsfreiheitsgraden zur produktiven Bindung an die Lipase zur Verfügung.

Die Entwicklung eines Modells für primäre Alkoholsubstrate scheiterte bislang an der Unmöglichkeit, allein aufgrund der Sterik der Substituenten eine Korrelation zur Enantiopräferenz abzuleiten (Weissfloch und Kazlauskas 1995). Die größere Zahl an Rotations- und Schwingungsfreiheitsgraden in primären Alkoholen und die damit verbundene Flexibilität lassen sterische Faktoren in den Hintergrund treten - oder zumindest nicht mehr direkt zur Enantiopräferenz in Beziehung setzen. So spielen bei primären Alkoholsubstraten auch die chemischen Eigenschaften des Substrats und daraus resultierend die chemischen Wechselwirkungen (polar-polar, unpolar-unpolar, polar-unpolar, unpolar-polar) zwischen Lipase und Substrat eine Rolle.

Für einen Sonderfall der primären Alkoholsubstrate (Triacylglyceride und Analoga) sind die zur Verfügung stehenden Freiheitsgrade des Substrats bei der produktiven Bindung an die Lipase eingeschränkt. Die *sn*-1(3) und *sn*-2 Fettsäureketten sind zu voluminös, um sich in die BTM zu orientieren. Beide Substituenten am Stereozentrum binden in die BTL, bestehend aus *hydrophobic dent* und *cavity*. Dort werden sie durch attraktive hydrophobe Wechselwirkungen in ihrer Lage stabilisiert. Auch für primäre Alkoholsubstrate der Klasse 2, die geschützte Triacylglyceride darstellen (Gaziola *et al.* 1996), konnte keine Bindung an die BTM beobachtet werden. Vielmehr orientierte sich das Glycerid direkt an die *wall*, während die Schutzgruppe in die BTL ausgerichtet wurde, ohne, wegen der Größe der BTL, mit diesen Aminosäuren in Wechselwirkung zu treten. Die Substrate der Klasse 2 sind durch den

Ringschluß in ihrer Geometrie stark eingeschränkt, ihre sterisch anspruchsvollen Reste zeigen von den Aminosäuren der PCL-Bindungstasche weg (Abbildung 40). Das für Triacylglyceride und Analoga entwickelte Modell (siehe Kapitel 4.2) zum molekularen Verständnis und zur gezielten Vorhersage der Stereopräferenz ist für geschützte Triacylglyceride nicht mehr gültig. Aufgrund mangelnder, sowohl repulsiver als auch attraktiver, Wechselwirkungen mit der Lipase kann nicht mehr zwischen den Enantiomeren unterschieden werden.

Das von Weissfloch und Kazlauskas (Weissfloch und Kazlauskas 1995) postulierte Modell zur Vorhersage der Enantiopräferenz von PCL bei der Umsetzung primärer Alkoholsubstrate gilt nur unter Berücksichtigung einiger Einschränkungen. Für Substrate, die keinen Sauerstoff in unmittelbarer Nachbarschaft zum Stereozentrum besitzen, konnten die Autoren in 89 % der untersuchten Fälle die Enantiopräferenz korrekt vorhersagen. Dabei wurden zwei Bindungshypothesen diskutiert (Abbildung 11). Sowohl Weissfloch und Kazlauskas (Weissfloch und Kazlauskas 1995) als auch Tuomi und Mitarbeiter (Tuomi und Kazlauskas 1999) postulierten für primäre Alkoholsubstrate eine Bindung an die Lipase analog den sekundären Alkoholen, Hypothese 1 (Abbildung 11, mitte), und weniger einen Bindungsmodus analog dem der Triacylglyceride und Analoga, Hypothese 2 (Abbildung 11, rechts).

Die Substratbindung erfolgt nach Hypothese 1 mit den Liganden **M** und **L** in die BTM bzw. BTL orientiert, wobei die Methylengruppe zwischen Estersauerstoff und Stereozentrum zu einem Knick im Substrat führt. Dieser ist notwendig, um eine produktive Bindung an die Lipase zu gewährleisten. In der Konsequenz ändert sich die Ausrichtung des mittelgroßen Substituenten **M** in die BTM, die sich nach Weissfloch und Kazlauskas in einer weniger begünstigten Umsetzung primärer im Vergleich zu sekundären Alkoholsubstraten niederschlägt (Abbildung 10; Weissfloch und Kazlauskas 1995).

Das Vergrößern des Größenunterschieds der Liganden **M** und **L**, analog dem Modell für sekundäre Alkoholsubstrate (Kazlauskas *et al.* 1991), führte bei primären Alkoholsubstraten zu sowohl Vergrößerung, Verkleinerung oder einer gänzlich unbeeinflussten Enantioselektivität (Weissfloch und Kazlauskas 1995). Weissfloch und Kazlauskas postulierten zusätzlich zur Sterik der Liganden einen Einfluß auf die Konformation der Substituenten entlang der C1-C2 Bindung im Substrat. Eine Unterscheidung des bevorzugt umgesetzten Enantiomers vom weniger bevorzugt umgesetzten wäre demnach durch die Analyse der entweder zueinander ekliptisch oder gestaffelt stehenden Substituenten möglich. Jedoch liegen bislang keine experimentellen Kenntnisse über die Lage der primären Alkoholsubstrate in der Bindungstasche der PCL vor (Weissfloch und Kazlauskas 1995).

Die postulierte eingeschränkte Flexibilität der C1-C2 Bindung widerspricht der für Triacylglyceride und Analoga gefundenen Größe, dem Torsionswinkel $\Phi_{O_3-C_3}$ um die O-C Bindung im *sn*-3 orientierten Substrat.

Ausgehend vom tetraedrisch koordinierten Carboxylkohlenstoff der hydrolysierten Säure liegt die von Weissfloch und Kazlauskas diskutierte C1-C2 Bindung um ca. 1,5 Å weiter in der BTL als die O-C Bindung in Triacylglyceriden und deren Analoga (Abbildung 49).

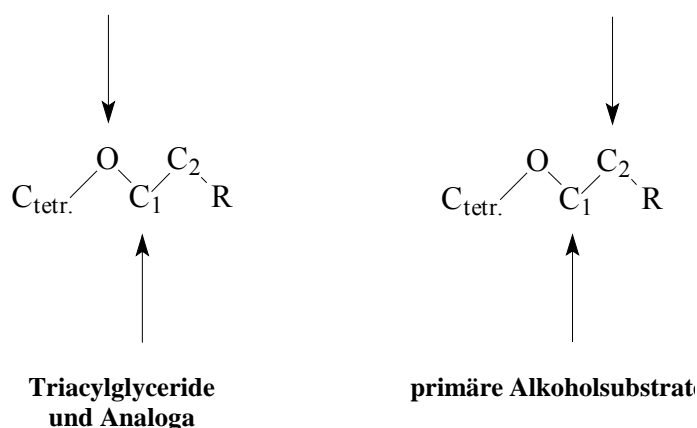


Abbildung 49: Die für die Enantioselektivität von primären Alkoholsubstraten entscheidenden Bindungen im Substrat. **Links:** Für den Sonderfall der primären Alkoholsubstrate, Triacylglyceride und Analoga, konnte im Rahmen dieser Arbeit die Geometrie des Substrats, der Torsionswinkel um die O-C Bindung, zur Stereopräferenz korreliert werden. **Rechts:** Von Weissfloch und Kazlauskas für primäre Alkoholsubstrate diskutierte und für die Enantioselektivität mitverantwortliche C1-C2 Bindung (Weissfloch und Kazlauskas 1995).

Die in dieser Arbeit durchgeführte geometrische Analyse der C1-C2 Bindung lieferte keine Korrelation zur Enantiopräferenz der PCL bei der Hydrolyse primärer Alkoholsubstrate.

Die Beschränkung der Regel von Weissfloch und Kazlauskas auf primäre Alkohole ohne Sauerstoff am Stereozentrum führten die Autoren darauf zurück, daß Sauerstoff lediglich eine *gauche*- und keine ekliptische bzw. gestaffelte Orientierung stabilisiert (Weissfloch und Kazlauskas 1995). Durch die im Rahmen dieser Arbeit für Verbindung **9** durchgeführten *molecular modeling* Untersuchungen konnte die These von Weissfloch und Kazlauskas weder bestätigt noch widerlegt werden. Eingehende Untersuchungen hierzu setzen jedoch das Vorhandensein weiterer experimenteller Daten ähnlicher Substrate voraus, wie sie z.B. die Klasse 1 Substrate darstellen.

Nach den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgt die Bindung eines primären Alkoholsubstrats in erster Linie nach Hypothese 2 (Weissfloch und Kazlauskas 1995; Tuomi und Kazlauskas 1999) analog den Triacylglyceriden und deren Analoga (Abbildung 11, rechts). Wird der mittelgroße Substituent **M** klein genug, um in die BTM zu passen, kann die

Bindung des Substrats zusätzlich nach Hypothese 1 erfolgen, welche von sowohl Weissfloch und Kazlauskas als auch Tuomi und Mitarbeitern als der bevorzugte Bindungsmodus für primäre Alkoholsubstrate diskutiert wurde (Weissfloch und Kazlauskas 1995; Tuomi und Kazlauskas 1999). Triacylglyceride und ihre Analoga stellen demnach den "Normalfall" der Substratbindung an die Lipase dar, während andere primäre Alkoholsubstrate eine große Anzahl von Ausnahmefällen repräsentieren würden.

5.3 γ - UND δ -LACTONE

Die Untersuchungen zur Enantioselektivität von PCL bei der Umsetzung von γ - und δ -Lactonen mit Methoden des *molecular modeling* wurden unter Verwendung der Kristallstruktur der offenen Konformation der PCL durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden mit den experimentellen Ergebnissen von Enzelberger *et al.* für Umsetzungen der entsprechenden Lactone mit *Pseudomonas* species Lipase (KWI 51), PSpL, verglichen (Enzelberger *et al.* 1997). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von PCL (Jorgensen *et al.* 1991) und PSpL (Iizumi *et al.* 1991; Sugihara *et al.* 1994) ergab, daß beide Lipasen homolog zueinander sind, mit 93 % gleichen und weiteren 6 % ähnlichen Resten. Aus dieser Homologie läßt sich ableiten, daß ein Vergleich der Ergebnisse des *molecular modeling* mit den experimentellen Daten von Enzelberger und Mitarbeitern sinnvoll und legitim ist.

Die Bindungstasche der PCL besteht aus drei, meist hydrophoben Regionen, an die das Substrat binden kann: der *hydrophobic crevice* bindet die zu hydrolysierende Fettsäurekette, der *hydrophobic dent* und alternativ die *cavity* den Alkoholrest. Schon Schrag und Mitarbeiter (Schrag *et al.* 1997) identifizierten eine "*boomerang-shaped*" Spalte, die das aktive Zentrum der PCL umgibt und die als Substrat-Bindungstasche fungiert. Diese Spalte wird durch die Aminosäuren 17-29 gebildet und ist durch drei α -Helices, bestehend aus den Aminosäuren 118-127, 134-150 und 243-256, begrenzt. Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Substratbindungstasche der PCL ergab, daß zusätzlich zu den von Schrag gefundenen Aminosäuren L287, I290, Q292 und L293 am Aufbau der Alkoholbindungstasche beteiligt sind. Diese Aminosäuren liegen auf einem 22 Aminosäuren langen *loop*.

Die ursprünglich für die Untersuchung der Stereoselektivität von ROL bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga entwickelte *molecular modeling* Prozedur wurde auf eine sich völlig von den Fetten und Fett-Analoga unterscheidende Substratklasse angewendet: γ - und δ -Lactone, die durch PCL gespalten werden. γ - und δ -Lactone gehören zu den sekundären

Alkoholsubstraten. Dennoch gehorchen sie nicht der Regel für sekundäre Alkohole, da das Stereozentrum der Lactone eine andere Lage in der Bindungstasche einnimmt (Abbildung 50). Acyclische Ester nehmen eine *syn* Konformation entlang der Carbonyl C-Alkohol O-Bindung ein. Untersuchungen der Kristallstruktur ergaben, daß diese Konformation im aktiven Zentrum erhalten bleibt. Der Lactonring hingegen zwingt der Carbonyl C-Alkohol O-Bindung eine *anti* Konformation auf. Daraus resultiert eine von acyclischen Estern sich unterscheidende Lage des Stereozentrums (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Das Stereozentrum liegt dann in der BTL, der Bindungstasche für den großen Substituenten (Abbildung 10). Lactone stellen demnach einen Sonderfall der sekundären Alkoholsubstrate dar. Ihre Enantioselektivität läßt sich nicht aufgrund einer einfachen Unterscheidung zweier Liganden bestimmen, sondern muß Wechselwirkungen während der Umsetzung mit einbeziehen.

Die Freiheitsgrade der Rotation und Schwingung eines Lactons sind gegenüber gewöhnlichen sekundären Alkoholsubstraten signifikant eingeschränkt. Der Ring und die aliphatische Alkylkette bedingen eine "Pseudo"-Triacylglyceridstruktur mit vergleichbarer Bindung an die Lipase. So besetzen auch Lactone die BTM nicht.

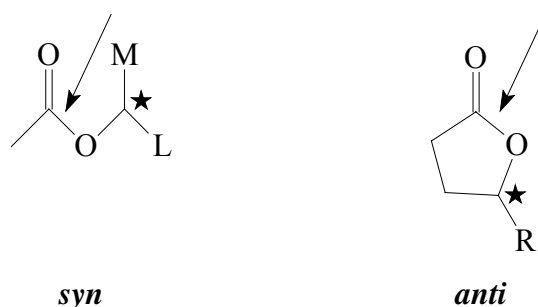


Abbildung 50: Bevorzugte Konformation eines Carbonylsauerstoffs am Stereozentrum. **Links:** die bevorzugte Konformation entlang der C-O-Bindung plaziert den Carbonylsauerstoff und das Stereozentrum *syn* zueinander. **Rechts:** Der Lactonring benötigt eine *anti* Orientierung des Carbonylsauerstoffs zum Stereozentrum (Bornscheuer und Kazlauskas 1999).

Enzelberger und Mitarbeiter (Enzelberger *et al.* 1997) fanden, daß die zur PCL homologe PSpL sowohl von γ - als auch δ -Lactonen bevorzugt das (*R*)-Enantiomer hydrolysiert. *Molecular modeling* Ergebnisse zeigten auf, daß die Enantiopräferenz der PCL für (*R*)-Lactone sehr wahrscheinlich auf sterische und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den aliphatischen Alkylketten der (*S*)-Enantiomere und Y29 zurückzuführen ist. Diese Interaktionen konnten bei der Bindung der (*R*)-Enantiomere nicht beobachtet werden.

Die Intensität dieser Wechselwirkungen variierte für γ - und δ -Lactone und für Lacton-Substrate mit unterschiedlicher Länge der Alkylkette.

Die intensivsten Wechselwirkungen zwischen Substrat und Lipase wurden in den Komplexen von PCL mit δ -Lactonen beobachtet. Für die (*S1*)- δ -Hepta-, (*S1*)- δ -Deca- und alle (*S2*)- δ -Lactone zwangen die Alkylketten der Substrate die polare Hydroxylgruppe des Y29, sich vom Substrat weg auszurichten, was eine "Kaskade" auslöste (Abbildung 41). Die Hydroxylgruppe des Y29 orientierte sich zum H86 hin, welches der C-terminale Nachbar des katalytisch aktiven S87 ist. Das entsprechende H144 in ROL ist höchstwahrscheinlich an der Stabilisierung des aktiven H257 beteiligt (Beer *et al.* 1996). Die Verschiebung der H86-Seitenkette resultierte daher in einem Zusammenbrechen des stabilisierenden Effekts von H86 auf H286 in PCL. Die daraus folgende Verschiebung der H286-Seitenkette kann leicht verfolgt werden, in dem seine relative Lage in der Bindungstasche zu den unbeeinflussten Atomen O γ (S87), C γ (D264) und O1 (Lactonring) gemessen bzw. der (*R*)_{His}- bzw. (*S*)_{His}-Wert der Verschiebung berechnet wird.

Für die Komplexe von PCL mit (*S1*)- δ -Octa-, (*S1*)- δ -Nona- und (*S1*)- δ -Undecalacton konnte diese Kaskade lokaler Geometrieänderungen nicht beobachtet werden, da die Alkylketten dieser Substrate sich im Verlauf der molekulardynamischen Simulationen in Richtung des *hydrophobic dent* orientierten. Diese Ausrichtung des aliphatischen Substituenten führte zu einem unvorteilhaften Knick in der ansonsten all-*trans* orientierten Alkylkette. Jedoch wurde die Lage des aktiven H286 im selben Maße beeinflusst, wie durch die in die *cavity* bindenden Substrate.

Die Konfiguration am Stereozentrum des Lactonrings hatte zusätzlichen Einfluß auf die relative Lage der H286-Seitenkette in den PCL- δ -Lacton Komplexen. Für die untersuchten (*S*)-Enantiomere beeinflussten Wechselwirkungen zwischen dem Substrat und Y29 die Lage des Lactonrings, der im Zuge der beschriebenen Interaktionen auf das Imidazol des H286 gedrückt wurde. Dies verstärkte die Destabilisierung des aktiven Histidins. Alle (*S*)- δ -Enantiomere beeinflussten die Position der H286-Seitenkette, was durch die entsprechenden (*R*)_{His}- und (*S*)_{His}-Werte quantifiziert werden konnte (Tabelle 22). Dagegen beeinflussten die unterschiedlichen Startstrukturen, (*S1*) und (*S2*), das *molecular modeling* Ergebnis kaum.

Enzelberger *et al.* diskutierten bereits den Einfluß der Ringgröße auf die Enantioselektivität, verbunden mit der rigideren Konformation des Sechsrings in δ -Lactonen (Enzelberger *et al.* 1997). Die Ergebnisse der molekulardynamischen Untersuchungen stützen diese Vermutung. In den PCL- δ -Lacton Komplexen ist der Ring in direktem Kontakt zu H286. Dies gilt nicht für die entsprechenden Komplexe der γ -Lactone (Abbildung 42). Die Enantiopräferenz von

PCL bei der hydrolytischen Spaltung der δ -Lactone vergrößert sich, ausgehend von schlechten E-Werten ($E = 2$ und 4) bei der Umsetzung des δ -Hepta- und δ -Octalactons, zu einem moderaten E-Wert ($E = 45$) für das δ -Nonalacton bis hin zu hohen E-Werten ($E > 100$) für das δ -Deca- bzw. δ -Undecalacton (Tabelle 22). Dagegen ist der Enantiomerenüberschuß von PCL bei der Hydrolyse der entsprechenden γ -Lactone blieb von der Kettenlänge des Alkylsubstituenten nahezu unbeeinflusst (Tabelle 23).

Die kurzkettigen δ -Octa- und δ -Nonalactone waren in der Lage, zwei alternative Positionen in der PCL-Bindungstasche einzunehmen. Das (*S1*)- δ -Heptalacton, welches im Vorfeld der molekulardynamischen Simulation ähnlich dem (*R*)-Enantiomer an die Lipase gebunden wurde, sowie das (*S2*)- δ -Octalacton banden dergestalt an die Lipase, daß die Lage des aktiven H286 kaum beeinflußt wurde (Tabelle 22). Beide Bindungsalternativen für kurzkettige (*S*)- δ -Lactone bieten dem Substrat die Möglichkeit, nur geringe repulsive sterische Wechselwirkungen mit H286 einzugehen, was eine Erklärung für die geringe Enantioselektivität der PCL bei der Umsetzung mit diesen Substraten sein könnte. Im Fall der PCL- γ -Lacton Komplexe wechselwirkten weder die (*R*)- noch die (*S*)-Enantiomere nennenswert mit dem katalytisch aktiven Histidin, was die geringen E-Werte für diese Substrate erklären könnte. Abbildung 51 faßt diese Beobachtungen zusammen.

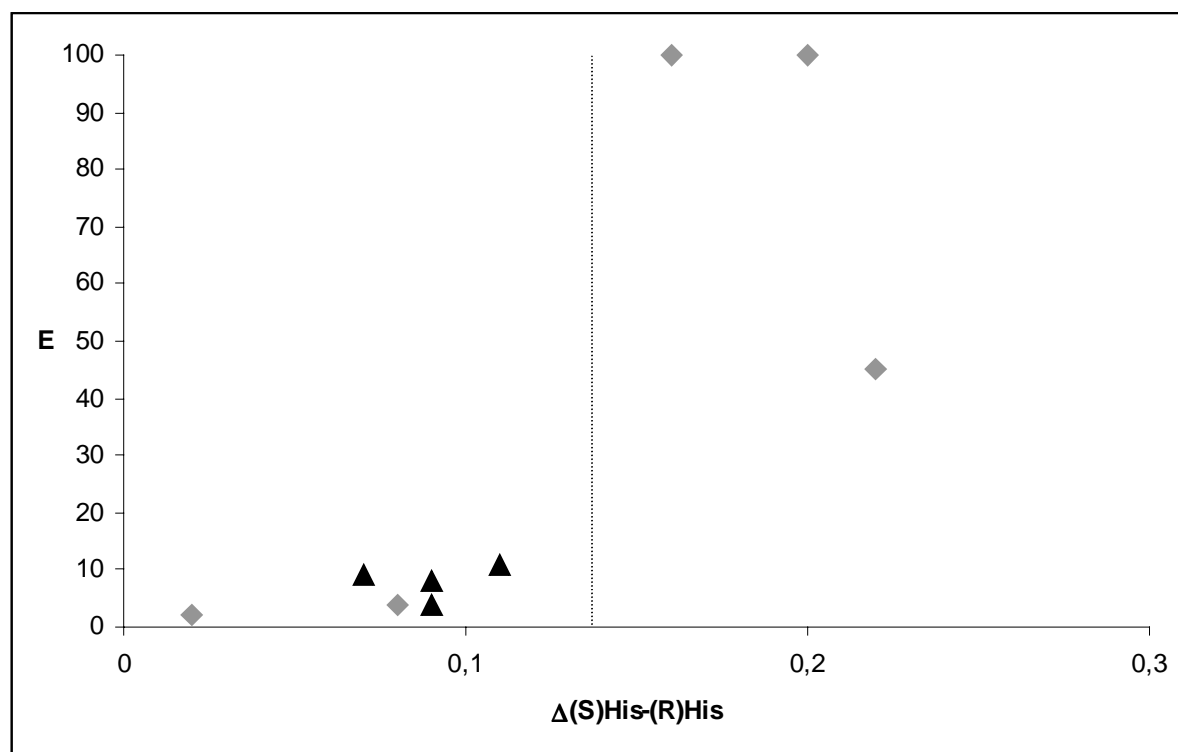


Abbildung 51: Korrelation zwischen experimentell bestimmten E- und $\Delta(S)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$ -Werten. Die $\Delta(S)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$ -Werte wurden aus der Differenz der $(S)_{\text{His}}$ -Werte der (S) - und der $(R)_{\text{His}}$ -Werte der (R) -Enantiomere berechnet. Im Fall der δ -Lactone wurde der kleinere $\Delta(S)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$ -Wert ausgewählt (entweder $\Delta(S1)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$ oder $\Delta(S2)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$): für δ -Hepta- und δ -Undecalacton $\Delta(S1)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$, für δ -Octa- und δ -Nonalacton $\Delta(S2)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$. Für δ -Decalacton waren beide $\Delta(S)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$ -Werte gleich. δ -Lactone sind durch eine graue Raute (\blacklozenge), γ -Lactone durch ein schwarzes Dreieck (\blacktriangle) hervorgehoben. Die gepunktete Linie unterscheidet zwischen Substraten, die mit moderater bis hoher (rechts) und geringer (links) Enantioselektivität hydrolysiert werden.

Eine Korrelation zwischen der Verschiebung des H286 und den experimentell bestimmten E-Werten konnte gefunden werden. Ein $\Delta(S)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$ -Wert (Differenz zwischen $(S)_{\text{His}}$ - und $(R)_{\text{His}}$) konnte berechnet werden, der eine von den Ergebnissen des *molecular modeling* unabhängige vergleichbare Größe für einen gegebenen PCL-Substrat Komplex darstellt. Von den entsprechenden Werten für die $(S1)$ - und $(S2)$ -Enantiomere der δ -Lactone wurde der kleinere $\Delta(S)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$ -Wert ausgewählt. Das bedeutet, daß in diesen Fällen das besser bindende Enantiomer zur Berechnung des $\Delta(S)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$ -Wertes herangezogen wurde. Eine Auftragung der $\Delta(S)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$ - gegen die entsprechenden E-Werte ermöglichte eine Trennung von γ - und δ -Lactonen, die entweder mit nur schlechter oder mittlerer bis sehr guter Enantioselektivität hydrolysiert werden. Ein $\Delta(S)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$ -Wert $< 0,12 \text{ \AA}$ korrespondiert mit schlechter, $\Delta(S)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}} > 0,15 \text{ \AA}$ mit moderater bis sehr guter Enantioselektivität. Die in

dieser Arbeit vorgestellte Methode ist somit geeignet, um halbquantitativ die Enantioselektivität von γ - und δ -Lactonen bei der Hydrolyse durch PCL zu beschreiben, wobei mit dem $\Delta(S)_{\text{His}}-(R)_{\text{His}}$ -Wert eine Größe existiert, für die die experimentell ermittelten Enantioselektivitäten zu den Ergebnissen des *molecular modeling* korrelieren.

5.4 SN-2 REGIOSELEKTIVITÄT VERSUS ACYLWANDERUNG

Die Frage ob Lipasen prinzipiell in der Lage sind, Triacylglyceride in Position *sn*-2 zu spalten oder ob es sich bei den bislang in der Literatur beschriebenen Beobachtungen einer potentiellen *sn*-2 regioselektiven Esterspaltung lediglich um Produkte einer unspezifischen Hydrolyse mit anschließender Acylwanderung von *sn*-2 nach *sn*-1(3) handelt, ist eine der grundlegenden Problematiken der Lipase-katalysierten Biotransformation von Triacylglyceriden.

Rogalska und Mitarbeiter (Rogalska *et al.* 1993) untersuchten die Regio- und Stereoselektivität von 26 Lipasen bei der Hydrolyse von Trioctanoin und Triolein. Dabei wurde für die in wässrigem Medium durchgeführte Esterspaltung von Trioctanoin durch CAL A 68,3 %, für GCL bis zu 25,5 %, für *Penicillium simplicissimum* Lipase 11,1 % und für CRL 4,6 % Deacylierung an *sn*-2 gefunden. Die Autoren schlossen unter den von ihnen gewählten Reaktionsbedingungen Acylwanderung von *sn*-2 nach *sn*-1(3) aus. Allerdings wurden die Messungen von Rogalska *et al.* in wässriger Lösung durchgeführt, welche für *Candida parapsilosis* Lipase als die Acylwanderung begünstigend identifiziert wurde (Briand *et al.* 1995). Briand *et al.* widersprachen damit einer früheren Arbeit von Riaublanc *et al.*, die in wässrigem Medium für die selbe Lipase *sn*-2 regioselektive Esterspaltung postulierten (Riaublanc *et al.* 1993).

Von den vier Lipasen (CAL A, GCL, *Penicillium simplicissimum* Lipase sowie CRL), für die Rogalska *et al.* *sn*-2 regioselektive Esterspaltung postulierten liegt lediglich von CRL eine experimentell bestimmte 3D-Struktur der offenen Konformation vor (Cygler *et al.* 1994). Für die in dieser Arbeit durchgeführten *molecular modeling* Studien zur *sn*-2 regioselektiven Fettspaltung wurden, mit Ausnahme der RML, alle bislang untersuchten mikrobiellen Lipasen (ROL, PCL, CRL und CAL B) verwendet. Die für die Stereoselektivität mikrobieller Lipasen entwickelte *molecular modeling* Methodik wurde auf die Untersuchungen zur Regioselektivität angewendet. Es sollte geklärt werden, ob regioselektive Esterspaltung in Triacylglyceriden aufgrund der Substratbindung bzw. der Struktur der Bindungstasche der

Lipase prinzipiell möglich ist und ob diese strukturellen Unterschiede eine Einteilung in wenig (CRL) und ausschließlich *sn*-1(3) regioselektive Lipasen (ROL, PCL, CAL B) erlaubt. Für CRL ist, im Gegensatz zu ROL, PCL und CAL B der Zugang zur Bindungstasche nicht durch eine *wall* bzw. *G-elbow loop* beschränkt. Das Fettmolekül kann demnach in CRL tiefer in Richtung des Kerns der Lipase binden. Dadurch steht dem Triacylglycerid ein weitaus größerer Raum zwischen katalytisch aktivem Histidin und den Aminosäuren der Bindungstasche zur Verfügung, was sich in einer sich deutlich von den Komplexen mit ROL, PCL und CAL B unterscheidenden Substratgeometrie niederschlägt. In der Konsequenz unterscheiden sich die Werte für die Torsionswinkel Φ_M und Φ_L für CRL um ca. 50° von denen für die anderen Lipasen (Tabelle 24). Sollte sich diese Beobachtung für weitere *sn*-2 regioselektiv spaltende Lipasen bestätigen (bei entsprechend vorhandenen experimentell bestimmten 3D-Strukturen), stünde mit diesen Torsionswinkeln eine einfache geometrische Größe zur Verfügung, durch die, analog zum Torsionswinkel $\Phi_{O_3-C_3}$, eine Korrelation zwischen Substratgeometrie und *sn*-2 Regioselektivität herzustellen wäre.

Da in der Literatur widersprüchlich über das Phänomen der *sn*-2 regioselektiven Hydrolyse von Triacylglyceriden berichtet wurde (Riaublanc *et al.* 1993; Rogalska *et al.* 1993; Briand *et al.* 1995), wurden in dieser Arbeit experimentelle Rahmenbedingungen geschaffen, unter denen Acylwanderung ausgeschlossen werden konnte (Millqvist *et al.* 1994; Fureby *et al.* 1996). Es sollte für die stark *sn*-2 regioselektive CAL A, die nur in geringem Maße *sn*-2 regioselektive CRL sowie die ausschließlich *sn*-1(3) regioselektive RDL (identisch mit ROL (Haas und Joerger 1995)) praktisch untersucht werden, ob unter den gewählten Bedingungen *sn*-2 regioselektive Hydrolyse auftreten kann. Zur eindeutigen Unterscheidung der Reaktionsprodukte wurden strukturierte Triacylglyceride (OPO und POP) eingesetzt, die zu den entsprechenden 1- bzw. 2-Monoglyceriden reagierten. Durch die spezielle Behandlung des Reaktionsansatzes mit MSHFBA im Vorfeld der GC-Analytik, d.h. Silylierung aller Hydroxyl- und Carboxylgruppen, konnte eine ausreichende Trennung der Monoglyceride erreicht und eine zuverlässige Analyse mittels Gaschromatographie erzielt werden (Schmid *et al.* 1999).

Die Ergebnisse für CAL A zeigen, daß es prinzipiell möglich ist, Triacylglyceride in *sn*-2 zu spalten. Für RDL konnte keine, für CRL eine nur sehr langsam ablaufende Reaktion beobachtet werden. Dies lag für CRL vermutlich daran, daß die Lipase für kurze und mittellange Fettsäuren spezifisch ist, d.h. langkettige Fettsäuren wie in POP kaum umgesetzt werden. Zudem wird CRL durch das verwendete Lösungsmittel zumindest teilweise inaktiviert. Daraus resultieren nur schwache Peaks im Gaschromatogramm, die sich nur wenig

vom Hintergrundrauschen abheben (Abbildung 48). Allerdings kann unter modifizierten Reaktionsbedingungen und unter Verwendung kürzerkettiger Triacylglyceride eine verbesserte Reaktivität erwartet werden, die es erlauben sollte, eine eindeutige Aussage hinsichtlich der *sn*-2 regioselektiven Esterspaltung von CRL zu treffen. Auf RDL wirkte das gewählte Lösungsmittelsystem gleichfalls inaktivierend, obwohl die Lipase OPO prinzipiell umsetzen kann (U. Schmid, persönliche Mitteilung). Auch für RDL sollten weitergehende Untersuchungen zur Entwicklung geeigneter Reaktionsbedingungen im Mittelpunkt stehen.

6. AUSBLICK

Durch diese Arbeit konnten die molekularen Ursachen der Stereoselektivität von mikrobiellen Lipasen bei der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Analoga identifiziert und durch eine einfache geometrische Größe (Torsionswinkel $\Phi_{O_3-C_3}$) beschrieben werden. Eine Erweiterung des bestehenden Modells auf weitere mikrobielle, pankreatische und gastrische Lipasen auch geringerer Sequenzähnlichkeit erscheint aussichtsreich. Als problematisch könnte sich hierbei die noch immer unzureichende Anzahl von 3D-Strukturen der Lipasen in offener Form erweisen. Sollten entsprechende Kristall- oder NMR-Strukturen in absehbarer Zeit nicht zur Verfügung stehen, müßte auf Strukturmodelle zurückgegriffen werden, was wiederum eine hinreichende Homologie zu einer Vorlage voraussetzt.

Dies ist auch der limitierende Faktor für weitergehende Untersuchungen zur *sn*-2 Regioselektivität. Von den in der Literatur beschriebenen Lipasen, die Triacylglyceride *sn*-2 regioselektiv hydrolysieren können, sollte noch mindestens eine weitere 3D-Struktur vorliegen. Davon unabhängig können die Reaktionsbedingungen für die experimentellen Studien für CRL und RDL optimiert werden.

Für die Untersuchungen zur Enantioselektivität von PCL bei der Hydrolyse von primären Alkoholsubstraten sollte das Erstellen einer Bewertungsfunktion im Mittelpunkt stehen, mit der die Enantiopräferenz qualitativ oder semi-quantitativ vorhergesagt werden könnte. Bei Vorliegen weiterer experimenteller Daten könnte z.B. durch Methoden der linearen Regression eine entsprechende Funktion entwickelt werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Alberghina, L., Schmid, R. D. und Verger, R., Eds. (1991). Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering. GBF Monographs. Weinheim, VCH.
- Andreoli, P. M., Cox, M. M. J., Farin, F. und Wohlfahrt, S. (1989). Molecular cloning and expression of genes encoding lipolytic enzymes. Eur. Pat. Appl. EP.
- Aoyama, S., Yoshida, N. und Inouye, S. (1988). "Cloning, sequencing and expression of the lipase gene from *Pseudomonas fragi* IFO-12049 in *E. coli*." FEBS Lett **242**(1): 36-40.
- Bairoch, A. und Apweiler, R. (1997). "The SWISS-PROT protein sequence database: its relevance to human molecular medical research." J. Mol. Mod. **75**: 312-316.
- Bairoch, A. und Apweiler, R. (1999). "The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1999." Nucleic Acids Res. **27**: 49-54.
- Balkenhohl, F., Ditrich, K., Hauer, B. und Ladner, W. (1997). "Optically active amines via lipase-catalyzed methoxyacetylation." J. Prakt. Chem. **339**: 381-384.
- Barrett, A. J. (1995). "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 2: corrections and additions (1994)." Eur J Biochem **232**(1): 1-6.
- Barrett, A. J. (1996). "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 3: corrections and additions (1995)." Eur J Biochem **237**(1): 1-5.
- Barrett, A. J. (1997). "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions (1997)." Eur J Biochem **250**(1): 1-6.
- Batenburg, A. M., Egmond, M. R., Frenken, L. G. J. und Verrips, C. T. (1991). Lipases with improved stability and enzymatic detergent compositions. Eur. Pat. Appl. EP, Unilever PLC, UK; Unilever N. V.
- Beer, H. D., Wohlfahrt, G., McCarthy, J. E. G., Schomburg, D. und Schmid, R. D. (1996). "Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants." Protein Eng. **9**(6): 507-517.
- Beer, H. D., Wohlfahrt, G., Schmid, R. D. und McCarthy, J. E. (1996). "The folding and activity of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a prosequence." Biochem J. **319**: 351-359.
- Belev, T. N., Singh, M. und McCarthy, J. E. (1991). "A fully modular vector system for the optimization of gene expression in *Escherichia coli*." Plasmid **26**(2): 147-150.
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer Jr., E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. und Tasumi, M. (1977). "The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures." J. Mol. Biol. **112**: 525-542.
- Berry, D. R. und Paterson, A. (1990). Enzymes in the food industry. Enzyme Chemistry. C. J. Suckling. London, Chapman and Hall: 306-351.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res. **7**(6): 1513-1523.

- Boland, W., Frössl, C. und Lorenz, M. (1991). "Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis." Synthesis **12**: 1049-1072.
- Borgstrom, B. und Brockman, H. L. (1984). Lipases. New York, Elsevier Science Publishing Co.
- Bornscheuer, U. T. und Kazlauskas, R. J. (1999). Hydrolases in Organic Synthesis - Regio- and Stereoselective Biotransformations. Weinheim, Wiley-VCH.
- Bott, R., Shield, J. W. und Poulou, A. J. (1994). Protein engineering of lipases. Lipases. P. Wolley und S. B. Petersen: 337-354.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L. und Menge, U. (1990). "A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase." Nature **343**: 767-770.
- Briand, D., Dubreucq, E. und Galzy, P. (1995). "Functioning and regioselectivity of the lipase of *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice in aqueous medium." Eur. J. Biochem. **228**: 169-175.
- Brocca, S., Schmidt-Dannert, C., Lotti, M., Alberghina, L. und Schmid, R. D. (1998). "Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase." Protein Sci **7**(6): 1415-1422.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Høge-Jensen, B., Patkar, S. A. und Thim, L. (1991). "A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex [see comments]." Nature **351**(6326): 491-494.
- Burgess, K. und Jennings, L. D. (1991). "Enantioselective esterifications of unsaturated alcohols mediated by a lipase prepared from *Pseudomonas* sp." J. Am. Chem. Soc. **113**: 6129-6139.
- Carter, P. und Wells, J. (1988). "Dissecting the catalytic triad of a serine protease." Nature **322**(6164): 564-568.
- Cheetham, P. S. J. (1993). "The use of biotransformations for the production of flavors and fragrances." Trends Biotechnol. **11**: 478-488.
- Chen, C. S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G. und Sih, C. J. (1982). "Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers." J. Am. Chem. Soc. **104**: 7294-7299.
- Chen, C. S., Wu, S. H., Girdaukas, G. und Sih, C. J. (1987). "Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. Enzyme-catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems." J. Am. Chem. Soc. **109**: 2812-2817.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H. (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**(7): 2172-2175.
- Chung, G. H., Lee, P. Y., Yoo, O. J. und Rhee, J. S. (1991). "Overexpression of a thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* in *Escherichia coli*." Appl. Microbial. Biotechnol. **35**: 237-241.
- Clark, M., Cramer, R. D., III. und van Opdenbosch, N. (1989). "Validation of the general purpose TRIPOS 5.2 force field." J. Comp. Chem. **10**(8): 982-1012.
- Coleman, M. H. und Macrae, A. R. (1977). Rearrangement of fatty acid esters in fat reaction reactants. German Pat. Appl. Deutschland, Unilever N.V.

- Connolly, M. L. (1983). "Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids." Science **221**: 709-713.
- Cygler, M., Grochulski, P., Kazlauskas, R. J., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Rubin, B., Serreqi, A. N. und Gupta, A. K. (1994). "A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases." J. Am. Chem. Soc. **116**(8): 3180-3186.
- Cygler, M., Schrag, J. D., Sussman, J. L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M. K. und Doctor, B. P. (1993). "Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins." Protein Sci. **2**(3): 366-382.
- Dalbadie-McFarland, G., Cohen, L. W., Riggs, A. D., Morin, C., Itakura, K. und Richards, J. H. (1982). "Oligonucleotide-directed mutagenesis as a general and powerful method for studies of protein function." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**(21): 6409-6413.
- Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M. und Derewenda, Z. S. (1992). "Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase." Biochemistry **31**(5): 1532-1541.
- Derewenda, U., Swenson, L., Wei, Y., Green, R., Kobos, P. M., Joerger, R., Haas, M. J. und Derewenda, Z. S. (1994). "Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*." J. Lipid Res. **35**(3): 524-534.
- Derewenda, Z. S., Derewenda, U. und Dodson, G. G. (1992). "The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution." J. Mol. Biol. **227**(3): 818-839.
- Derewenda, Z. S. und Sharp, A. M. (1993). "News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases." Trends Biochim. Sci. **18**(Jan): 20-25.
- Dewar, M. J. S. und Thiel, W. (1977). "Ground states of molecules.39. MNDO results for molecules containing hydrogen, carbon, nitrogen and oxygen." J. Am. Chem. Soc. **99**: 4899-4907.
- Dewar, M. J. S. und Thiel, W. (1977). "Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximation and parameters." J. Am. Chem. Soc. **99**: 4907-4917.
- Dodson, G. und Wlodawer, A. (1998). "Catalytic triads and their relatives." Trends Biochem. Sci. **23**: 347-352.
- Egri, G., Baitzgacs, E. und Pope, L. (1996). "Kinetic resolution of 2-acylated-1,2-diols by lipase-catalyzed enantiomer selective acylation." Tetrahedron: Asymmetry **7**: 1437-1448.
- Enzelberger, M. M., Bornscheuer, U. T., Gatfield, I. und Schmid, R. D. (1997). "Lipase-catalysed resolution of γ - and δ -lactones." J. Biotechnol. **56**(2): 129-133.
- Faber, K. (1997). Biotransformations in organic chemistry. Heidelberg, Berlin, Springer-Verlag.
- Freeman, M., Baehler, C. und Spotts, S. (1990). "Automated laser-fluorescence sequencing." Biotechnology (N.Y.) **8**(2): 147-148.
- Frenken, L. G. J., Egmond, M. R., Batenburg, A. M. und Verrips, C. T. (1993). "Pseudomonas glumae lipase: increased proteolytic stability by protein engineering." Protein Eng. **6**(6): 637-642.

- Fureby, A. M., Virto, C., Adlercreutz, P. und Mattiasson, B. (1996). "Acyl group migrations in 2-monoolein." Biocatal. Biotransform. **14**(2): 89-111.
- Gasteiger, J. und Marsili, M. (1980). "Iterative partial equalization of orbital electronegativity - rapid access to atomic charges." Tetrahedron **36**: 3219-3288.
- Gaziola, L., Bornscheuer, U. und Schmid, R. D. (1996). "A rapid and effective separation of enantiomers of glycerol derivatives by gas chromatography and their lipase-catalyzed biotransformation." Enantiomer **1**(1): 49-54.
- Gelin, B. R. und Karplus, M. (1979). "Side-chain torsional potentials: effect of dipeptide, protein, and solvent environment." Biochemistry **18**(7): 1256-1268.
- Gilbert, E. J., Cornish, A. und Jones, C. W. (1991). "Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2." J. Gen. Microbiol. **137**: 2223-2229.
- Gilbert, J. E. (1993). "Pseudomonas lipases: Biochemical properties and molecular cloning." Enzyme Microb. Technol. **15**(August): 634-645.
- Goodford, P. J. (1985). "A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules." J. Med. Chem. **28**: 849-857.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B. und Cygler, M. (1993). "Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase." J. Biol. Chem. **268**(17): 12843-12847.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D. und Cygler, M. (1994). "Two conformational states of *Candida rugosa* lipase." Protein Sci. **3**(1): 82-91.
- Gupta, A. K. und Kazlauskas, R. J. (1993). "Substrate modification to increase the enantioselectivity of hydrolases. A route to optically-active cyclic allylic alcohols." Tetrahedron: Asymmetry **4**(5): 879-888.
- Haalck, L., Paltauf, F., Pleiss, J., Schmid, R. D., Spener, F. und Stadler, P. (1997). "Stereoselectivity of lipase from *Rhizopus oryzae* towards triacylglycerols and analogs: computer aided modeling and experimental validation." Methods in Enzymology: Lipases **284**: 353-376.
- Haas, M. J. und Joerger, R. D. (1995). Lipases of the Genera *Rhizopus* and *Rhizomucor*: Versatile Catalysts in Nature and the Laboratory. Food Biotechnology - Microorganisms. Y. H. Hui und G. G. Khachatourians, VCH: 549-588.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J. Mol. Biol. **166**: 557-580.
- Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M. D., Cortopassi, G. und Galas, D. J. (1989). "A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction." Nucleic Acids Res. **17**(16): 6545-6551.
- Hirose, Y., Kariya, K., Nakanishi, Y., Kurono, Y. und Achiwa, K. (1995). "Inversion of enantioselectivity in hydrolysis of 1,4-dihydropyridines by point mutation of lipase PS." Tetrahedron Lett. **36**(7): 1063-1066.
- Hoegh, I., Patkar, S., Halkier, T. und Hansen, M. T. (1995). "Two lipases from *Candida antarctica* - cloning and expression in *Aspergillus oryzae*." Can. J. Botan. **73**: S869-S875.
- Holm, L. und Sander, C. (1993). "Structural alignment of globins, phycocyanins and colicin A." FEBS Lett **315**(3): 301-306.

- Holmquist, M., Martinelle, M., Berglund, P., Clausen, I. G., Patkar, S., Svendsen, A. und Hult, K. (1993). "Lipases from *Rhizomucor miehei* and *Humicola lanuginosa*: modification of the lid covering the active site alters enantioselectivity." J. Protein Chem. **12**(6): 749-757.
- Holmquist, M., Norin, M. und Hult, K. (1993). "The role of arginines in stabilizing the active open-lid conformation of *Rhizomucor miehei* lipase." Lipids **28**(8): 721-726.
- Holzwarth, H.-C., Pleiss, J. und Schmid, R. D. (1997). "Computer aided modelling of *Rhizopus oryzae* lipase catalyzed stereoselective hydrolysis of triglycerides." J. Mol. Catal. B: Enzym. **3**: 73-82.
- Hom, S. S. M. und Mielenz, J. R. (1991). *Pseudomonas* lipase gen, vectors for the expression thereof, production of the lipase by transformed microorganisms and uses for this enzyme. EP, Henkel Research Corp. (US).
- Hom, S. S. M., Scott, E. M., Atchison, R. E., Picataggio, S. und Mielenz, J. R. (1991). "Characterization and over-expression of a cloned *Pseudomonas* lipase gene." GBF Monogr. **16**: 267-270.
- Huge-Jensen, B., Andreasen, F., Christensen, T., Christensen, M., Thim, L. und Boel, E. (1989). "*Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is processed and secreted from transformed *Aspergillus oryzae*." Lipids **24**(9): 781-785.
- Huge-Jensen, B., Galluzzo, D. R. und Jensen, R. G. (1987). "Partial Purification and Characterization of Free and Immobilized Lipases from *Mucor miehei*." Lipids **22**(8): 559-560.
- Ihara, F., Kageyama, Y., Hirata, M., Nihira, T. und Yamada, Y. (1991). "Purification, characterization, and molecular cloning of lactonizing lipase from *Pseudomonas* species." J. Biol. Chem. **266**: 18135-18140.
- Ihara, F., Okamoto, I., Nihira, T. und Yamada, Y. (1992). "Requirement in trans of the downstream *limL* gene for activation of lactonizing lipase from *Pseudomonas* sp. 109." J. Ferment. Bioeng. **73**(5): 337-342.
- Iizumi, T., Nakamura, K., Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y. und Fukase, T. (1991). "Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase and its activator genes from *Pseudomonas* sp. KWI-56." Agric. Biol. Chem. **55**(9): 2349-2357.
- Jaeger, K.-E., Adrian, F.-J., Meyer, H. E., Hancock, R. E. W. und Winkler, U. K. (1992). "Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* is an amphiphilic protein." Biochim. Biophys. Acta **1120**: 315-321.
- Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Charles, v. H., Margreet Colson und Misset, O. (1994). "Bacterial lipases." FEMS Microbiol. Rev. **15**(1): 29-63.
- Jandacek, R., Whiteside, J. A., Holcombe, B. N., Volpenheim, R. A. und Taulbee, J. D. (1987). "The rapid hydrolysis and efficient absorption of triglycerides with octanoic acid in the 1 and 3 positions and long-chain fatty acid in the 2 position." Am. J. Clin. Nutr. **45**: 940-945.
- Janssen, A. J. M., van der Padt, A. und Zwanenburg, B. (1991). "Resolution of secondary alcohols by enzyme-catalyzed transesterification in alkyl carboxylates as the solvent." Tetrahedron **47**: 7645-7662.
- Jensen, R. G., Galuzzo, D. R. und Bush, V. J. (1990). "Selectivity is an important characteristic of lipases (acylglycerol hydrolases)." Biocatalysis **3**: 307-316.

- Johnson, L. A., Beacham, I. R., MacRae, I. C. und Free, M. L. (1992). "Degradation of triglycerides by a pseudomonad isolated from milk: molecular analysis of a lipase-encoding gene and its expression in *Escherichia coli*." Appl Environ Microbiol **58**(5): 1776-1779.
- Jorgensen, S., Skov, K. und Diderichsen, B. (1991). "Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes." J. Bacteriol. **173**(2): 559-567.
- Kabsch, W. und Sander, C. (1983). "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features." Biopolymers **22**: 2577-2637.
- Kazlauskas, R. J. (1994). "Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties." Trends Biotechnol. **12**(11): 464-72.
- Kazlauskas, R. J. (1995). "Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties. Erratum." Trends Biotechnol. **13**: 285.
- Kazlauskas, R. J. und Bornscheuer, U. T. (1998). Biotransformations with lipases. Biotechnology. H.-J. Rehm. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, Wiley-VCH. **8a**.
- Kazlauskas, R. J., Weissfloch, A. N. E., Rappaport, A. T. und Cuccia, L. A. (1991). "A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*." J. Org. Chem. **56**(8): 2656-65.
- Kim, M. J. und Cho, H. (1992). "Pseudomonas lipases as catalysts in organic synthesis: specificity of lipoprotein lipase." J. Chem. Soc., Chem. Commun.(19): 1411-1413.
- King, D. M. und Padley, F. B. (1990). Milk fat substitutes. EU, Unilever plc.
- Kohno, M., Funatsu, J., Mikami, B., Kugimiya, W., Matsuo, T. und Morita, Y. (1996). "The crystal structure of lipase II from *Rhizopus niveus* at 2.2 Å resolution." J Biochem (Tokyo) **120**(3): 505-510.
- Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D. und Schmid, R. D. (1991). "Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data." J. Bacteriol. **173**(15): 4836-4841.
- Kovac, A., Stadler, P., Haalck, L., Spener, F. und Paltauf, F. (1996). "Hydrolysis and esterification of acylglycerols and analogs in aqueous medium catalyzed by microbial lipases." Biochim. Biophys. Acta **1301**(1-2): 57-66.
- Kugimiya, W., Otani, Y., Hashimoto, Y. und Takagi, Y. (1986). "Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from *pseudomonas fragi*." Biochem. Biophys. Res. Commun. **141**: 143-147.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-685.
- Lang, D. A. und Dijkstra, B. W. (1998). "Structural investigations of the regio- and enantioselectivity of lipases." Chem. Phys. Lipids **93**: 115-122.
- Laumen, K. E. (1987). Esterhydrolasen - Anwendung in der organischen Synthese: chirale Bausteine aus Estern prochiraler und racemischer Alkohole. Doktorarbeit, Bergische Universität Wuppertal.

- Lotti, M., Grandori, R., Fusetti, F., Longhi, S., Brocca, S., Tramontano, A. und Alberghina, L. (1993). "Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences." Gene **124**: 45-55.
- Luria, S. E., Adams, J. N. und Ting, R. C. (1960). "Transduction of lactose utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transduction phage particle." Virology **12**: 348-390.
- Lutz, D., Huffer, M., Gerlach, D. und Schreier, P. (1992). Carboxylester-lipase mediated reactions. Flavor Precursors: Thermal and Enzymatic Conversions. R. Teranishi, G. R. Takeoka und M. Guentert. Washington D.C., American Chemical Society: 32-45.
- Martinelle, M., Holmquist, H., Clausen, I. G., Patkar, S., Svendsen, A. und Hult, K. (1996). "The role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase." Protein Engineering **9**(6): 519-524.
- Martinez, C., Geus, P. d., Lauwerexs, M., Matthyssens, G. und Cambillau, C. (1992). "Fusarium solani cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent." Nature **356**: 615-618.
- Martinez, C., Nicolas, A., Tilbeurgh, H. v., Egloff, M. P., Cudrey, C., Verger, R. und Cambillau, C. (1994). "Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole." Biochemistry **33**(1): 83-89.
- Matsuo, T., Sawamura, N., Hashimoto, Y. und Hashida, W. (1981). The enzyme and method for enzymatic transesterification of lipid. Eur. Pat. Appl. EP, Fuji Oil Co., Japan.
- Millqvist, A., Adlercreutz, P. und Mattiasson, B. (1994). "Lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides for the preparation of 2-monoglycerides." Enzyme Microb. Technol. **16**(12): 1042-1047.
- Monecke, P., Friedemann, R., Naumann, S. und Csuk, R. (1998). "Molecular modelling studies on the catalytic mechanism of *Candida rugosa* lipase." J. Mol. Model. **4**: 395-404.
- Morgenstern, B., Werner, T. und Dress, A. W. M. (1996). "Multiple DNA and protein sequence alignment based on segment-to-segment comparison." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**: 12098-12103.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **51**(Pt 1): 263-273.
- Naemura, K., Fukuda, R., Murata, M., Konishi, M., Hirose, K. und Tobe, Y. (1995). "Lipase YS-catalyzed enantioselective acylation of alcohols: a predictive active site model for lipase YS to identify which enantiomer of an alcohol reacts faster in this acylation." Tetrahedron: Asymm. **6**(9): 2385-2394.
- Naemura, K., Ida, H. und Fukuda, R. (1993). "Lipase YS-catalyzed enantioselective transesterification of alcohols of bicarbocyclic compounds." Bull. Chem. Soc. Jpn. **66**: 573-577.
- Naemura, K., Murata, M., Tanaka, R., Yano, M., Hirose, K. und Tobe, Y. (1996). "Enantioselective acylation of primary and secondary alcohols catalyzed by lipase QL from *Alcaligenes* sp.: a predictive active site model for lipase QL to identify which enantiomer of an alcohol reacts faster in this acylation." Tetrahedron: Asymmetry **7**(11): 3285-3294.

- Nakanishi, J., Kurono, Y., Koide, Y. und Beppu, T. (1989). Recombinant manufacture of *Pseudomonas cepacia* lipase using a *Pseudomonas* host. Eur. Pat. Appl. EP, Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Japan.
- Nakanishi, Y., Watanabe, H., Washizu, K., Narahashi, Y. und Kurono, Y. (1991). "Cloning, sequencing and regulation of the lipase gene from *Pseudomonas* sp. M-12-33." GBF Monogr. (Lipases) **16**: 263-266.
- Nishioka, T., Chihara-Siomi, M., Yoshikawa, K. und Inagaki, M. (1991). "Lipase from *Pseudomonas* sp.: reactions, cloning, and amino acid sequence analysis." GBF Monogr. (Lipases) **16**: 253-262.
- Novo-Nordisk (1998). Annual Report 1998. Bagsvaerd, Novo Nordisk A/S.
- Novo-Nordisk (1998). "LipoPrime™ works faster." BioTimes **3**(9).
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G. und Goldman, A. (1992). "The α/β hydrolase fold." Protein Engineering **5**(3): 197-211.
- Orrenius, C., Oehrner, N., Rotticci, D., Mattson, A., Hult, K. und Norin, T. (1995). "Candida antarctica lipase B catalyzed kinetic resolutions: substrate structure requirements for the preparation of enantiomerically enriched secondary alcohols." Tetrahedron: Asymmetry **6**(5): 1217-1220.
- Peters, G. H., Olsen, O. H., Svendsen, A. und Wade, R. C. (1996). "Theoretical investigation of the dynamics of the active site lid in Rhizomucor miehei Lipase." Biophys. J. **71**(1): 119-129.
- Peters, G. H., Toxvaerd, S., Olsen, O. H. und Svendsen, A. (1997). "Computational studies of the activation of lipases and the effect of a hydrophobic environment." Protein Eng. **10**(2): 137-147.
- Pleiss, J. (1990). Gleichgewichtsdynamik und Konformationsübergänge helikaler Peptide. Eine moleküldynamische Untersuchung. Doktorarbeit, Universität Tübingen.
- Pleiss, J., Fischer, M. und Schmid, R. D. (1998). "Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site." Chem. Phys. Lipids **93**: 67-80.
- Pleiss, J., Fischer, M. und Schmid, R. D. (1999). "Lipase Engineering Database." Manuskript in Bearbeitung.
- Powell, M. J. D. (1977). "Restart Procedures for the Conjugate Gradient Method." Mathematical Programming **12**: 241-254.
- Press, W. H., Flannery, B. P., Teukolsky, S. A. und Vetterling, W. T. (1988). Numerical recipes in C. The art of scientific programming. Cambridge, Cambridge University Press: 312-327.
- Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A. und Baumeister, K. (1987). "A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides." Science **238**(4825): 336-341.
- Prompers, J. J., Groenewegen, A., Van Schaik, R. C., Pepermans, H. A. und Hilbers, C. W. (1997). "¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignments of *Fusarium solani pisi* cutinase and preliminary features of the structure in solution." Protein Sci. **6**: 2375-2384.

- Quinlan, P. und Moore, S. (1993). "Modification of triglycerides by lipases: Process technology and its application to the production of nutritionally improved fats." INFORM **4**: 580-585.
- Quyen, D. T. (1998). Recombinant lipase from *Pseudomonas cepacia*: high-level expression in *Escherichia coli* and protein engineering. Doktorarbeit Fakultät Biologie. Stuttgart, Universität Stuttgart.
- Quyen, D. T., Schmidt-Dannert, C. und Schmid, R. D. (1999). "High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid *in vitro* refolding." Appl Environ Microbiol **65**(2): 787-794.
- Ransac, S., Carrière, F., Rogalska, E., Verger, R. und Marguet, F. (1996). The kinetics, specificities and structural features of lipases. Molecular Dynamics of Biomembranes. J. A. F. op den Kamp. Heidelberg, Berlin, Springer-Verlag. **H96**: 254-304.
- Riaublanc, A., Ratomahenina, R., Galzy, P. und Nicolas, M. (1993). "Peculiar properties of lipase from *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice." J. Am. Oil Chem. Soc. **70**: 497-500.
- Righetti, P. G. und Drysdale, J. W. (1974). "Isoelectric focusing in gels." J. Chromatogr. **98**(2): 271-321.
- Roberts, S. M. (1989). "Use of enzymes as catalysts to promote key transformations in organic synthesis." Philos. Trans. R. Soc. London B **324**: 577-587.
- Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F. und Verger, R. (1993). "Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases." Chirality **5**(1): 24-30.
- Rotticci, D., Orrenius, C., Hult, K. und Norin, T. (1997). "Enantiomerically enriched bifunctional sec-alcohols prepared by *Candida antarctica* lipase B catalysis. Evidence of non-steric interactions." Tetrahedron: Asymmetry **8**(3): 359-362.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**(12): 5463-5467.
- Sarda, L. und Desnuelle, P. (1958). "Action de la lipase pancréatique sur les esters en emulsion." Biochim. Biophys. Acta **30**: 513-521.
- Scheib, H. (1997). Molekuldynamische Simulationen und Proteindesign. Diplomarbeit Institut für Technische Biochemie. Stuttgart, Universität Stuttgart.
- Schmid, R. D. und Verger, R. (1998). "Lipases: interfacial enzymes with attractive applications." Angew. Chem. Int. Ed. **37**: 1608-1633.
- Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., McNeill, G. P. und Schmid, R. D. (1999). "Highly-selective synthesis of 1,3-oleyl-2-palmitoyl-glycerol by lipase catalysis." Biotechnol. Bioeng. **64**(8): 678-684.
- Schrag, J. D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D. A., Burgdorf, T., Schmid, H.-J., Hecht, R., Schomburg, D., Rydel, T., Oliver, J., Strickland, L., Dunaway, M., Larson, S. und McPherson, A. (1997). "The open conformation of a *Pseudomonas* Lipase." Structure **5**(2): 187-202.
- Schrag, J. D., Li, Y., Wu, S. und Cygler, M. (1991). "Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*." Nature (London) **351**(6329): 761-764.

- Sheldon, R. A. (1996). Large-scale enzymatic conversions in non-aqueous media. Enzymatic reactions in organic media. A. M. P. Koskinen und A. M. Klivanov. London, Chapman and Hall: 266-307.
- Sidman, K. E., George, D. G., Barker, W. C. und Hunt, L. T. (1988). "The protein identification resource (PIR)." Nucleic Acids Res. **16**(5): 1869-1871.
- Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Menge, U. und Schmid, R. D. (1997). "Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase." J. Am. Oil Chem. Soc. **74**(4): 427-433.
- Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T. und Schmid, R. D. (1998). "Two-step enzymatic reaction for the synthesis of pure structured triglycerides." J. Am. Oil Chem. Soc. **75**: 703-710.
- Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Schmid, U. und Schmid, R. D. (1998). "Synthesis of structured triglycerides by lipase catalysis." Fett/Lipid **100**: 156-160.
- Stadler, P., Kovac, A., Haalck, L., Spener, F. und Paltauf, F. (1995). "Stereoselectivity of microbial lipases. The substitution at position sn-2 of triacylglycerol analogs influences the stereoselectivity of different microbial lipases." Eur. J. Biochem. **227**(1/2): 335-343.
- Stewart, J. J. P. (1989). "Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method." J. Comp. Chem. **10**: 209-220.
- Stewart, J. J. P. (1989). "Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications." J. Comp. Chem. **10**: 221-264.
- Sugihara, A., Shimada, Y., Nagao, T., Iizumi, T., Nakamura, K., Fukase, T. und Tominaga, Y. (1994). "Purification and characterization of a carboxylesterase from *Pseudomonas* sp. KWI-56." Biosci., Biotechnol., Biochem. **58**(4): 752-755.
- sybyl6.1 (1994). Command manual. St. Louis, Tripos, Inc.
- Tan, Y. und Miller, K. J. (1992). "Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52." Appl. Environm. Microbiol. **58**: 1402-1407.
- Terao, Y., Tsuji, K. und Achiwa, K. (1988). "Highly-efficient lipase-catalyzed asymmetric synthesis of chiral glycerol derivatives leading to practical synthesis of (S)-propanolol." Tetrahedron Lett. **29**: 5173-5176.
- Tilbeurgh, H. v., Egloff, M. P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. und Cambillau, C. (1993). "Interfacial activation of lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by x-ray crystallography." Nature **362**: 814-820.
- Tipton, K. F. (1994). "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement: corrections and additions." Eur J Biochem **223**(1): 1-5.
- Tuomi, W. V. und Kazlauskas, R. J. (1999). "Molecular basis for enantioselectivity of lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols. Modeling, kinetics and chemical modification of Tyr29 to increase or decrease enantioselectivity." J. Org. Chem.: im Druck.
- Uppenberg, J., Ohrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T. und Jones, T. A. (1995). "Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols." Biochemistry **34**: 16838-16851.

- van Gunsteren, W. F. und Berendsen, H. J. C. (1987). Groningen molecular simulation (GROMOS) Library Manual. Groningen, biosmos.
- van Gunsteren, W. F. und Berendsen, H. J. C. (1990). "Computer simulation of molecular dynamics." Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **29**: 992-1023.
- van Gunsteren, W. F. und Berendsen, H. J. C. (1990). "Moleküldynamik-Computersimulationen: Methodik, Anwendungen und Perspektiven in der Chemie." Angew. Chemie **102**: 1020-1055.
- van Kampen, M. D., Simons, J.-W. F. A., Dekker, N., Egmond, M. R. und Verheij, H. M. (1998). "The phospholipase activity of *Staphylococcus hyicus* lipase strongly depends on a single Ser to Val mutation." Chem Phys Lipids **93**(1-2): 39-45.
- Vasel, B., Hecht, H. J., Schmid, R. D. und Schomburg, D. (1993). "3D- structures of the lipase from *Rhizomucor miehei* at different temperatures and computer modelling of a complex of the lipase with tri-laurylglycerol." J. Biotechnol. **28**(1): 99-115.
- Verger, R. (1997). "'Interfacial activation" of lipases: facts and artefacts." Trends Biotechnol. **15**: 32-38.
- Vulfson, E. N. (1994). Industrial applications of lipases. Lipases, Their Structure, Biochemistry and Application. P. Woolley und S. B. Petersen. Cambridge, Cambridge University Press: 271-288.
- Wang, R., Liu, L., Lai, L. und Tang, Y. (1998). "SCORE: A new empirical method for estimating the binding affinity of a protein-ligand complex." J. Mol. Model. **4**: 379-394.
- Weber, H. K., Stecher, H. und Faber, K. (1995). Some properties of commercially available crude lipase preparations. Preparative biotransformations. S. M. Roberts. New York, Wiley: 5-21.
- Weiner, S. J., Kollman, P. A., Case, D. A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G., Jr., S. P. und Weiner, P. (1984). "A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins." J. Am. Chem. Soc. **106**: 765-784.
- Weissfloch, A. N. E. und Kazlauskas, R. J. (1995). "Enantioselectivity of Lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols." J. Org. Chem. **60**(21): 6959-6969.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A. und Hunziker, W. (1990). "Structure of human pancreatic lipase." Nature **343**: 771-774.
- Winkler, U. K. und Stuckmann, M. (1979). "Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*." J. Bacteriol. **138**: 665-670.
- Wohlfarth, S., Hoessche, C., Strunk, C. und Winkler, U. (1992). "Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." J. Gen. Microbiol. **138**: 1325-1335.
- Xie, Z. F., Suemune, H. und Sakai, K. (1990). "Stereochemical observation on the enantioselective hydrolysis using *Pseudomonas fluorescens* lipase." Tetrahedron: Asymmetry **1**(6): 395-402.

8. ANHANG

8.1 SEQUENZALIGNMENT ROL, RML, PCL, CRL, CAL B

Alignment der Proteinsequenzen der mikrobiellen Lipasen aus *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa* sowie der Lipase B aus *Candida antarctica*. Das Sequenzalignment wurde generiert mit *dialign2* (Morgenstern *et al.* 1996). Alle Einstellungen wurden wie vorgegeben übernommen. Regionen mit Großbuchstaben wurden überlagert, Regionen mit Kleinbuchstaben nicht. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind blau, die des GXSXG-Pentapeptid-Motivs grün und die entsprechenden Reste der CAL B rot hervorgehoben.

Überlagerte Sequenzen	Länge	katalytische Triade				
=====	=====	=====				
1) ROL	269	S145	D204	H257		
2) RML	268	S144	D203	H257		
3) PCL	320	S87	D264	H286		
4) CRL	534	S209	E341	H449		
5) CALB	317	S105	D187	H224		
ROL	1	sdgGKVVAAT	TAQIQEFTKY	AGIAATAYCR	SVVPGNKWDC	VQCqkwvp--
RML	1	id-GGIRAAT	SQEINELTY	TTLSANSYCR	TVIPGATWDC	IHC-----
PCL	1	adny-----	-----	---AATRY--	-----P	IIL-----
CRL	1	a-----	-PT-----	ATLANGDTIT	GLNaiineaf	lgipfaeppv
CALB	1	lpsgsdpafs	qPK-----	SVLDAGLTCQ	GASPSSVskP	ILL-----
ROL	49	-----	-----	-----	-----DGKI	ITTFISLLSD
RML	43	-----	-----	-----	--DATEDLKI	IKTWSTLIYD
PCL	14	-----VH	G-----	-----	-----	-----
CRL	34	gnlrfkdpVP	YSGSLDGQKF	TSygpSCmq	npEGTYEENL	PKAALDLVMQ
CALB	37	-----VP	GTGTTGPQSF	DS-----	-----	-----
ROL	63	TNGYVLRSDK	QKTIYLVFRG	TNSFRSaITD	IVFNF-----	SDYKPVKGAK
RML	61	TNAMVARGDS	EKTIYIVFRG	SSSIRNWIAD	LTFVP-----	VSYPPVSGTK
PCL	17	-----	-----	-----	-----	-----LTGTD
CRL	84	SKVFEAVSPS	SEDCLTInvv	rppgTkaga-	-----	-----
CALB	51	-----	-----	-----NWIpI	stqlgytpcw	ISPPP-----
ROL	108	VHAGFLSSYE	QVVNDYFpv-	-----	-----	-----VQ
RML	106	VHKGFLDSYG	EVQNE-LVAT	-----	-----	-----VL
PCL	22	KYAGVLEYWY	GIQED-Lqqr	gatvyvanls	gfqsddgpng	rgeqllyVK
CRL	113	-----	-----	-----	-----	-----
CALB	71	----FMLNDT	QVNTEYMVNA	-----	-----	-----IT

ROL	129	EQLTAHPTYK	VIVTGHSLGG	AQALLA----	-----	-----
RML	127	DQFKQYPSYK	VAVTGHSLGG	ATALLC----	-----	-----
PCL	71	TVLAATGATK	VNLVGHSQGG	LTSRYVAAVA	PDLVA-----	-----
CRL	113	-----N	LPVMLWIFGG	GFEVGGTSTF	Ppaqmitksi	amgkpiihvs
CALB	89	ALYAGSGNNK	LPVLTWSQGG	LVAQWGLTFF	PSIRS-----	-----
ROL	155	-----	-----	-----	-----	-----
RML	153	-----	-----	-----	-----	-----
PCL	106	-----	-----	-----	-----	-----
CRL	154	vnyrvsswgf	lagdeikaeg	sanaglkdqr	lgmqvwadni	aafggdptkv
CALB	124	-----	-----	-----	-----	-----
ROL	155	-----	-----	-----	-----	-----
RML	153	-----	-----	-----	-----	-----
PCL	106	-----	-----	-----	-----	-----
CRL	204	tifgesagsm	svmchilwnd	gdntykgkpl	fragimqsga	mvpsdavdgi
CALB	124	-----	-----	-----	-----	-----
ROL	155	-----	-----GMD	LYQREprLSP	KNLSIFTVGG	PRVGNPTFAY
RML	153	-----	-----ALD	LYQREEGLSS	SNLFLYTQGG	PRVGDPAFAN
PCL	106	-----	-----	-----	---SVTTIGT	PHRGSe-FAD
CRL	254	ygneifdlla	snagcgsASD	KLACLRGVSS	DTLEDATNNT	P-----
CALB	124	-----	-----	-----	---KVdrлма	fapd-----
ROL	188	YVeS-----	-----	-----	-----	-----
RML	186	YVvS-----	-----	-----	-----	-----
PCL	122	FVqGVLAYDP	TGLSSTVI--	-----	---AAFVNV	FGILTSSSNN
CRL	295	---GFLAYSS	LRLSylprpd	gvnitddmya	lvreGKYANI	PVIIGDQNDE
CALB	135	-----YKG	TVLAGPLD--	-----	---ALAVSA	PSVWQQTGS
ROL	192	-----	-----	-----	-----	-----
RML	190	-----	-----	-----	-----	-----
PCL	156	TNQDALAALK	TLTTAQAATY	nqnypsaglg	a-----	PGSCQTGAPT
CRL	342	GTFFGTSSLN	VTTDAQAREY	fkqsfvhasd	aeidtlmtay	PGDITQGSPP
CALB	162	ALTTALRNAG	GLTqivpttn	-----	-----	-----
ROL	192	-----	-----	-----	-----	-----TG
RML	190	-----	-----	-----	-----	-----TG
PCL	197	ETvggnthlL	YSWAGTAIQP	TISv-----	-----	-----
CRL	392	DTgilnaltp	qfkrisavlg	dlgftlarry	flnhytggtk	ysflskqlSG
CALB	182	-----L	YSATDEIVQP	QVSnspldss	ylfngkn---	-----

ROL	194	IPFQRTVHKR	DIVPHVPPQS	FGFLHPGVES	WIKSGTSN-V	QIC-----T
RML	192	IPYRRTVNER	DIVPHLPPAA	FGFLHAGEEY	WitdnspetV	QVC-----T
PCL	221	-----	-----	-----PGVt-	-----	-----GATDT
CRL	442	LPVLGTFHNS	DIVfqdyllg	sgsliynnaf	iaf-----	-----
CALB	210	VQAQAVCGPL	FVIDHAGSLT	SQFSYVVGRS	ALRSTTGQ-A	RsadyGITDC
ROL	237	SEIETKDCSN	SIVPFTSILD	HLSYFDINEG	SCl-----	-----
RML	236	SDLETSDCSN	SIVPFTSVLD	HLSYFGINTG	LcT-----	-----
PCL	230	STIPLVDPAN	ALDPSTLALF	GTGTVMVNRG	SGQNDGVVSK	CSALYgqvls
CRL	475	-----AT	DLDPNTAGLL	VKWPEYTSSS	QSGNNLMMIN	ALGLYtgkdn
CALB	259	NPLPANDLTP	EQKVAAAALL	APAAAAIVAG	PKQNcepdIm	pyarpfavgk
ROL	270	-----	-----	-----	-----	-
RML	269	-----	-----	-----	-----	-
PCL	280	tsykwnhlde	inqllgvrga	naedpvavir	thanrlklag	v
CRL	517	frtagydalF	snppsffv--	-----	-----	-
CALB	309	rtcsgivtp-	-----	-----	-----	-

8.2 NUCLEINSÄURE- UND AMINOSÄURESEQUENZ DES PLASMIDS pT-LIPHP MIT DEM GEN DER *PSEUDOMONAS CEPACIA* LIPASE ATCC21808

Das Gen der PCL ist blau eingefärbt, die Reste der katalytische Triade rot und L287 grün hervorgehoben.

1	cccgggcat	tttatgaata	tacaaataat	tggagccaac	ctgcaatcga	tgacgcgcc
	R A I L - I Y K - L E P T C N R - R A					
61	tgtagcggcg	cattaagcgc	ggcgggtgtg	gtggttacgc	gcagcgtgac	cgctacactt
	L - R R I K R G G C G G Y A Q R D R Y T					
121	gccagcgccc	tagcgcggcg	tcctttogct	ttcttccctt	cctttctcgc	cacgttcgcc
	C Q R P S A R S F R F L P F L S R H V R					
181	ggctttcccc	gtcaagctct	aaatcggggg	ctccctttag	ggttccgatt	tagtgcttta
	R L S P S S S K S G A P F R V P I - C F					
241	cggcacctcg	acccccaaaa	acttgattag	ggtgatgggt	cacgtagtgg	gccatcgccc
	T A P R P Q K T - L G - W F T - W A I A					
301	tgatagacgg	tttttcgccc	tttgacgttg	gagtccacgt	tctttaatag	tggactcttg
	L I D G F S P F D V G V H V L - - W T L					
361	ttccaaactg	gaacaacact	caaccctatc	tcggctctatt	cttttgattt	ataagggatt
	V P N W N N T Q P Y L G L F F - F I R D					
421	ttgccgattt	cggcctattg	gttaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	taacgcgaat
	F A D F G L L V K K - A D L T K I - R E					

481 tttaacaaaa tattaacgct tacaatttaa atatttgctt atacaatctt cctgtttttg
F - Q N I N A Y N L N I C L Y N L P V F

541 gggcttttct gattatcaac cggggtgggt accgagcgcg gccgcagggtg atgattatca
G A F L I I N R G G Y R A R P Q V M I I

601 gccagcagag aattaaggaa aacagacagg tttattgagc gcttatcttt ccctttattt
S Q Q R I K E N R Q V Y - A L I F P F I

661 ttgctgcggt aagtcgcata aaaaccattc ttcataattc aatccattta ctatgttatg
F A A V S R I K T I L H N S I H L L C Y

721 ttctgagggg agtgaaaatt cccctaattc gatgaagatt cttgctcaat tgttatcagc
V L R G V K I P L I R - R F L L N C Y Q

781 tatgcccga ccagaacacc ttgccgatca gccaaacgtc tcttcaggcc actgactagc
L C A D Q N T L P I S Q T S L Q A T D -

841 gataactttc cccacaacgg aacaactctc attgcatggg atcattgggt actgtgggtt
R - L S P Q R N N S H C M G S L G T V G

901 tagtggttgt aaaaacacct gaccgctatc cctgatcagt ttcttgaagg taaactcatc
L V V V K T P D R Y P - S V S - R - T H

961 acccccaagt ctggctatgc agaaatcacc tggctcaaca gcctgctcag ggtcaacgag
H P Q V W L C R N H L A Q Q P A Q G Q R

1021 aattaacatt ccgtcaggaa agcttggctt ggagcctggt ggtgcggtca tggattacc
E L T F R Q E S L A W S L L V R S W N Y

1081 ttcaacctca agccagaatg cagaatcact ggcttttttg gttgtgctta cccatctctc
L Q P Q A R M Q N H W L F W L C L P I S

1141 cgcacacct ttggtaaagg ttctaagctt aggtgagaac atccctgcct gaacatgaga
P H H L W - R F - A - V R T S L P E H E

1201 aaaaacaggg tactcatact cacttctaag tgacggctgc atactaacgg cttcatacat
K K Q G T H T H F - V T A A Y - P L H T

1261 ctcgtagatt tctctggcga ttgaagggt aaattcttca acgctaactt tgagaatttt
S R R F L W R L K G - I L Q R - L - E F

1321 tgtaagcaat gcggcggtat aagcatttaa tgcattgatg ccattaaata aagcaccaac
L - A M R R Y K H L M H - C H - I K H Q

1381 gcctgactgc cccatcccca tcttgtctgc gacagattcc tgggataagc caagtctatt
R L T A P S P S C L R Q I P G I S Q V H

1441 tttctttttt tcataaattg ctttaaggcg acgtgcgtcc tcaagctgct cttgtgttaa
F S F F H K L L - G D V R P Q A A L V L

1501 tggtttcttt tttgtgctca tacgttaaatt ctatcaccgc aagggataaa tatctaacac
M V S F L C S Y V K S I T A R D K Y L T

1561 cgtgcgtggt gactatttta cctctggcgg tgataatggt tgcattgact aaggagggtg
P C V L T I L P L A V I M V A C T K E V

1621 tatggaacaa cgcataaccc tgaaagatta tgcaatgcgc tttgggcaaa ccaagacagc
V W N N A - P - K I M Q C A L G K P R Q

1681 taaagatcaa gaatgttgat cttcagtggt tcgcctgtct gttttgcacc ggaatttttg
L K I K N V D L Q C F A C L F C T G I F

1741 agttctgccc tttatcgccc ggggatctct cacctaccaa acaatgcccc cctgcaaaaa
E F C R L S P G D L S P T K Q C P P A K

1801 ataaattcat ataaaaaaca tacagataac catctgcggt gataaattat ctctggcggt
N K F I - K T Y R - P S A V I N Y L W R

1861 gttgacataa ataccactgg cgggtgatact gagcacatca gcaggacgca ctgaccacca
C - H K Y H W R - Y - A H Q Q D A L T T

1921 tgaagggtgac gctcttaaaa attaagccct gaagaagggc agcattcaaa gcagaaggct
M K V T L L K I K P - R R A A F K A E G

1981 ttgggggtg gataacgaaa cgaagcattg gcgcctcgag taatttacca acactactac
F G V C D T K R S I G A S S N L P T L L

2041 gttttaactg aaacaaactg gagactcata tggccgacaa ctacgcggcg acgcggtatc
R F N - N K L E T H M A D N Y A A T R Y

2101 cgatcattct cgtgcacggg ctcacgggca ccgacaaata cgcagggtg ctcgagtact
P I I L V H G L T G T D K Y A G V L E Y

2161 ggtacgggat ccaggaggac ctgcagcagc gtggcgcgac cgtctatgtc gctaacctgt
W Y G I Q E D L Q Q R G A T V Y V A N L

2221 cgggcttcca gagcgacgac ggcccgaacg ggcgcggcga acagttgctg gcctacgtga
S G F Q S D D G P N G R G E Q L L A Y V

2281 agacggtgct cgccgcgacg ggggcgacca aggtcaacct cgtcggccac agccaggggc
K T V L A A T G A T K V N L V G H S Q G

2341 ggctgacgtc gcgctatgtc ggggcccgtg ccgccgatct ggtcgcgctg gtgacgacga
G L T S R Y V A A V A P D L V A S V T T

2401 tcggcacgcc gcacgcgggc tccgagttcg ccgacttcgt gcagggcgctg ctgcgctacg
I G T P H R G S E F A D F V Q G V L A Y

2461 atccgaccgg gctgctgctg acggtgatcg ccgcgttcgt caatgtgttc ggaatcctca
D P T G L S S T V I A A F V N V F G I L

2521 cgagcagcag caacaacacg aaccaggacg cgctcgcggc gctgaagacg ctgacgaccg
T S S S N N T N Q D A L A A L K T L T T

2581 cgcaggccgc cacgtacaac cagaactacc ctagcgcggg cctcggcgcg ccgggcagtt
A Q A A T Y N Q N Y P S A G L G A P G S

2641 gccagaccgg cgcgccgacg gaaaccgctg gcggcaaacac gcacctgctg tattcgtggg
C Q T G A P T E T V G G N T H L L Y S W

2701 ccggcacggc gatccagccg acgatctccg tggctggcgt cacgggtgctg acggatacga
A G T A I Q P T I S V F G V T G A T D T

2761 gcaccattcc gctcgtcgat ccggcgaacg agctcgacct gtcgacgctc gcgctgttcg
S T I P L V D P A N E L D P S T L A L F

2821 gcaccggcac ggtgatggtc aaccgcgggt cgggccagaa cgacgggggtc gtgctgaagt
G T G T V M V N R G S G Q N D G V V S K

2881 gcagcgcgct gtacggccag gtgctgagca cgagctgcaa gtggaacat ctcgacgaga
C S A L Y G Q V L S T S C K W N H L D E

2941 tcaaccagtt gctcggcgtg cgcggcgcga atgcggaaga tccggctcgcg gtgatccgca
I N Q L L G V R G A N A E D P V A V I R

3001 cgc~~atg~~c~~gaa~~ c~~gg~~g~~ct~~g~~aa~~g c~~tc~~g~~cg~~g~~gg~~g~~cg~~ t~~gt~~g~~at~~c~~gat~~ g~~ac~~g~~gc~~a~~c~~a~~cg~~t g~~aa~~g~~gg~~c~~gc~~g~~c~~
T H A N R L K L A G V - S M T A R E G R

3061 c~~g~~c~~cc~~g~~ct~~g~~gc~~ g~~cg~~g~~t~~g~~cg~~ct g~~tg~~g~~t~~ct~~ac~~g g~~tg~~tc~~gt~~g~~gg~~ g~~ct~~g~~gc~~g~~gg~~c~~g~~ at~~c~~g~~cc~~g~~gg~~c~~g~~
A P L A R C A V V Y G V V G L A A I A G

3121 t~~cg~~cg~~at~~g~~tg~~ g~~ag~~c~~gg~~t~~g~~cg g~~gat~~g~~gc~~a~~tc~~ g~~cg~~g~~g~~a~~c~~g~~gg~~ c~~ac~~g~~gc~~c~~gg~~c g~~ag~~tt~~g~~c~~cg~~
V A M W S G A G W H R G T G T A G E L P

3181 a~~c~~g~~cg~~g~~c~~a~~gc~~ g~~gc~~a~~gg~~c~~gg~~g g~~cg~~g~~ct~~g~~cc~~g c~~acc~~g~~cc~~c~~g~~a g~~gcc~~g~~ct~~ct~~g~~ c~~cg~~g~~c~~g~~ag~~ca
D A A A A G G A A A A P P Q A A L P A S

3241 c~~g~~g~~g~~c~~ct~~g~~cc~~ g~~tc~~g~~tc~~g~~ct~~g g~~cc~~g~~g~~ct~~cca~~ g~~tg~~g~~cg~~cc~~cg~~ g~~ct~~g~~cc~~g~~ctc~~ g~~at~~g~~cc~~g~~gg~~c~~g~~
T G L P S S L A G S S A P R L P L D A G

3301 g~~cc~~a~~t~~ct~~tg~~c g~~aa~~g~~tc~~g~~cg~~c g~~cg~~g~~t~~g~~cg~~g at~~tt~~ct~~tc~~g~~a~~ ct~~act~~g~~ct~~g acc~~g~~c~~gc~~a~~ga~~
G H L A K S R A V R D F F D Y C L T A Q

3361 g~~tg~~a~~cc~~t~~g~~ag c~~g~~g~~g~~cc~~cg~~g c~~tc~~g~~at~~g~~cg~~t t~~cg~~tc~~gt~~a~~cg~~ cc~~ag~~a~~tc~~g~~cc~~ g~~cg~~c~~ag~~ct~~cg~~
S D L S A A A L D A F V V R Q I A A Q L

3421 a~~c~~g~~gc~~a~~c~~g~~gt~~ c~~g~~c~~g~~c~~ag~~g~~cc~~ g~~ag~~g~~cg~~ct~~cg~~ a~~c~~g~~t~~ct~~gg~~ca c~~cg~~g~~t~~a~~cc~~g~~c~~ g~~cg~~t~~at~~ct~~cg~~
D G T V A Q A E A L D V W H R Y R A Y L

3481 a~~c~~g~~cg~~ct~~cg~~c g~~aa~~g~~tt~~g~~cg~~c g~~at~~g~~cc~~g~~gg~~c g~~cg~~tc~~g~~a~~ca~~a g~~t~~cc~~g~~a~~cc~~t~~g~~ g~~gt~~g~~cg~~ct~~gc~~
D A L A K L R D A G A V D K S D L G A L

3541 a~~g~~ct~~cg~~g~~ct~~ c~~g~~a~~cc~~a~~gc~~g~~c~~ g~~cg~~tc~~g~~a~~tc~~g c~~gt~~a~~cc~~g~~ca~~c g~~ct~~c~~g~~g~~cg~~a~~c~~ t~~gg~~a~~g~~cc~~ag~~c
Q L A L D Q R A S I A Y R T L G D W S Q

3601 c~~g~~t~~tt~~tt~~tc~~g~~g~~ c~~g~~g~~g~~a~~g~~c~~ag~~ t~~gg~~g~~g~~g~~g~~a~~gc~~ g~~ct~~a~~c~~g~~at~~ct c~~g~~c~~g~~c~~g~~a~~ct~~g a~~ag~~a~~tc~~g~~cg~~c
P F F G A E Q W R Q R Y D L A R L K I A

3661 a~~g~~g~~at~~c~~gt~~a~~c~~ g~~ct~~g~~a~~c~~gg~~a~~t~~ g~~cg~~c~~a~~g~~aa~~g~~g~~ c~~cg~~a~~g~~c~~gg~~ct c~~g~~c~~g~~g~~cg~~ctt g~~ag~~c~~ag~~c~~a~~
Q D R T L T D A Q K A E R L A A L E Q Q

3721 t~~g~~cc~~ag~~cc~~ga~~ c~~g~~a~~ac~~g~~cg~~g~~c~~g g~~cg~~c~~ag~~c~~ag~~c g~~gg~~tc~~g~~a~~cca~~ g~~c~~a~~g~~c~~g~~g~~g~~cc g~~cg~~a~~tc~~g~~acc~~
M P A D E R A A Q Q R V D Q Q R A A I D

3781 g~~g~~a~~tc~~g~~cg~~ca a~~ct~~g~~c~~a~~g~~a~~ag~~ a~~gc~~g~~g~~c~~g~~ca c~~g~~cc~~cg~~a~~tc~~g g~~at~~g~~cg~~c~~g~~c~~g~~ c~~aa~~ct~~g~~a~~c~~g~~c~~
R I A Q L Q K S G A T P D A M R A Q L T

3841 a~~g~~a~~gc~~ct~~cg~~g c~~cc~~g~~g~~a~~ag~~cc g~~cc~~g~~cg~~g~~cg~~g t~~cg~~g~~cg~~a~~g~~a~~t~~ g~~c~~a~~g~~c~~ag~~g~~ac~~ g~~ac~~g~~ca~~t~~cg~~t
Q T L G P E A A A R V A Q M Q Q D D A S

3901 g~~gc~~a~~g~~a~~g~~cc~~g~~ ct~~ac~~g~~cg~~g~~ac~~ tat~~g~~g~~cg~~a~~cg~~c a~~gc~~g~~t~~g~~cg~~g~~a~~ g~~at~~c~~g~~a~~g~~t~~cg~~ g~~cc~~g~~g~~c~~ct~~g~~t~~
W Q S R Y A D Y A T Q R A E I E S A G L

3961 c~~g~~cc~~g~~c~~ag~~ga t~~cg~~g~~ac~~g~~cc~~ c~~ag~~a~~tc~~g~~cc~~g c~~att~~g~~cg~~g~~ca~~ g~~cg~~c~~ac~~g~~ttc~~ a~~c~~g~~aa~~a~~ccc~~g
S P Q D R D A Q I A A L R Q R T F T K P

4021 g~~cg~~a~~ag~~c~~g~~gt g~~cg~~g~~g~~c~~gg~~ca t~~cg~~ct~~cg~~a~~tc~~ g~~cg~~g~~cg~~g~~gg~~ c~~ag~~c~~g~~c~~g~~c~~ag~~ t~~g~~a~~c~~g~~cg~~g~~g~~c
G E A V R A A S L D R G A G S A Q - R G

4081 g~~gc~~g~~cg~~ct~~gc~~ g~~cg~~t~~g~~a~~cc~~g~~g~~ cc~~ct~~a~~t~~g~~cc~~g c~~gc~~g~~cg~~t~~gat~~ g~~tg~~cc~~cg~~g~~ga~~ a~~g~~a~~t~~g~~tt~~g~~ct~~
R R A A R D R P Y A A R V M C R G R C C

4141 c~~g~~a~~t~~g~~gt~~a~~tt~~ c~~g~~c~~g~~a~~g~~c~~gt~~g t~~cg~~a~~ac~~g~~cg~~g g~~ccc~~g~~at~~g~~cc~~ t~~tc~~g~~t~~g~~cg~~g a~~c~~g~~c~~a~~c~~g~~ca~~t
S M V F A S V S N A G P M P S C A T H A

4201 a~~acc~~g~~ag~~c~~ag~~ c~~agg~~cc~~g~~g~~cg~~c c~~g~~a~~g~~c~~g~~g~~gt~~g c~~ct~~g~~g~~c~~g~~g~~ct~~ g~~tag~~t~~ag~~ct~~g~~ g~~tg~~a~~g~~c~~g~~g~~g~~c
- P S S R P R R A V S W R L - - L V S G

4261 gcacgatcac gcccgcgctcg aacgcactct gcgtgaccgc gcgatcgctcg caggcgctcgg
R T I T P A S N A L C V T A R S S Q A S

4321 gcaggccgag caccaggtgc aggccggcct cgctcgcccat cacggggcagc gtgtcgccga
G R P S T R C R P A S S P I T G S V S P

4381 agcgcgcgcy aatcgcgctcg atcatcagtt gccggcgctc gccgtacagc gtgvcgatcc
K R A R I A S I I S C R R S P Y S V R I

4441 gcctgacgtg cgaagtcagg tgaccgtcca tgatgaattc tgagtaggta agtcgacaat
R L T C E V R - P S M M N S E - V S R Q

4501 cgcgtctaga gcccgacgcy ctgggctacg tcttgctggc gttcgccaaa caaatttcaa
S R L E P D A L G Y V L L A F A K Q I S

4561 cagtttcagc ggagtgagaa tagaaaggaa caactaaagg aattgcgaat aataattttt
T V S A E - E - K G T T K G I A N N N F

4621 ttttccgttg aaaatctcca aaaaaaagg ctccaaaagg agcctttaat tgtatcggtt
F F R - K S P K K K A P K G A F N C I G

4681 tadcagcttg ctttcgaggt gaattttctta aacagcttga taccgatagt tgcgccgaca
L S A C F R G E F L K Q L D T D S C A D

4741 atgacaacaa ccatcgccca cgcataaccg atatattcgg cgacgcgagg ctggatggcc
N D N N H R P R I T D I F G D A R L D G

4801 ttccccatta tgattcttct cgcttccggc tctagacccc ggcgccgccc tataccttgt
L P H Y D S S R F R L - T P A P P Y T L

4861 ctgcctcccc gcgttgcgct gcgggtgcatg gagccggggc acctcgacct gaatggaagc
S A S P R C V A V H G A G P P R P E W K

4921 cggcggcacc tcgctaaccg attcaccact ccaagaattg gagccaatca attcttgcyg
P A A P R - R I H H S K N W S Q S I L A

4981 agaactgtga atgcgcaaac caacccttgg cagaacatat ccatcgcgctc cgccatctcc
E N C E C A N Q P L A E H I H R V R H L

5041 agcagccgca cgcggcgcat ctcggtgccc tcgvcgcttt cggatgatgac ggtgaaaacc
Q Q P H A A H L G C L A R F G D D G E N

5101 tctgacacat gcagctcccc gagacgggtca cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca
L - H M Q L P E T V T A C L - A D A G S

5161 gacaagcccc tcagggcgcy tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggcgca gccatgacc
R Q A R Q G A S A G V G G C R G A A M T

5221 agtcacgtag cgatagcggg gtgtatactg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt
Q S R S D S G V Y T G L T M R H Q S R L

5281 actgagagtg caccatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca
Y - E C T M R C E I P H R C V R R K Y R

5341 tcaggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctcgc ctcggctcgtt cggctgcggc
I R R S S A S S L T D S L R S V V R L R

5401 gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg
R A V S A H S K A V I R L S T E S G D N

5461 caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgct
A G K N M - A K G Q Q K A R N R K K A A

5521 tgctggcggtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa
L L A F F H R L R P P D E H H K N R R S

5581 gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct
S Q R W R N P T G L - R Y Q A F P P G S

5641 ccctcgtgcy ctctcctggt cgcaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc
S L V R S P V P T L P L T G Y L S A F L

5701 cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtagg
P S G S V A L S H S S R C R Y L S S V -

5761 tcggttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgcac cgctgcgcct
V V R S K L G C V H E P P V Q P D R C A

5821 tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag
L S G N Y R L E S N P V R H D L S P L A

5881 cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga
A A T G N R I S R A R Y V G G A T E F L

5941 agtgggtggc taactacggc tacaactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga
K W W P N Y G Y T R R T V F G I C A L L

6001 agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacia accaccgctg
K P V T F G K R V G S S - S G K Q T T A

6061 gtagcgggtg tttttttggt tgcaagcagc agattacgcy cagaaaaaaaa ggatctcaag
G S G G F F V C K Q Q I T R R K K G S Q

6121 aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaaac tcacgttaag
E D P L I F S T G S D A Q W N E N S R -

6181 ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaat
G I L V M R L S K R I F T - I L L N - K

6241 gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaactta agctgacagt taccaatgct
- S F K S I - S I Y E - T - A D S Y Q C

6301 taatcagtgga ggcacctatc tcagcgatct gtctatctcg ttcattccata gttgcctgac
L I S E A P I S A I C L F R S S I V A -

6361 tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa
L P V V - I T T I R E G L P S G P S A A

6421 tgataccgcy agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg
M I P R D P R S P A P D L S A I N Q P A

6481 gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt
G R A E R R S G P A T L S A S I Q S I N

6541 gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca
C C R E A R V S S S P V N S L R N V V A

6601 ttgctgcagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt
I A A G I V V S R S S F G M A S F S S G

6661 cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatggttgcy caaaaaagcy gttagctcct
S Q R S R R V T - S P M L C K K A V S S

6721 tcggtcctcc gatcgttgctc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg
F G P P I V V R S K L A A V L S L M V M

6781 cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg
 A A L H N S L T V M P S V R C F S V T G

6841 agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg
 E Y S T K S F - E - C M R R P S C S C P

6901 cgtcaacacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa
 A S T R D N T A P H S R T L K V L I I G

6961 aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt
 K R S S G R K L S R I L P L L R S S S M

7021 aaccactcg tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt
 - P T R A P N - S S A S F T F T S V S G

7081 gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaaat aagggcgaca cggaaatggt
 - A K T G R Q N A A K K G I R A T R K C

7141 gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca
 - I L I L F L F Q Y Y - S I Y Q G Y C L

7201 tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgacat
 M S G Y I F E C I - K N K Q I G V P R T

7261 ttccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata
 F P R K V P P D V - E T I I I M T L T Y

7321 aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc ttcaag
 K N R R I T R P F R L Q

8.3 SEQUENZEN DER VERWENDETEN MUTAGENESE-PRIMER

L287F forward

5'-agc tgc aag tgg aac cat ttc gac gag atc aac cag ttg ctc-3'

L287F revers

5'-gag caa ctg gtt gat ctc gtc gaa atg gtt cca ctt gca gct-3'

8.4 SEQUENZEN DER VERWENDETEN SEQUENZIERPRIMER

L287F-1 forward

5'-gca gga cgc act gac cac c-3'

L287F-2 forward

5'-gcg gcg acg cgt tat ccg-3'

L287F-3 forward

5'-gct ggc cta cgt gaa gac gg-3'

L287F-4 forward

5'-gct cgc gta cga tcc gac cg-3'

L287F-5 revers

5'-gcc tgc cgc tgc cgc gtc cgg-3'

L287F-1 revers

5'-cga act cgg agc cgc gat gc-3'

L287F-2 revers

5'-cgt cgg cgc gcc ggt ctg gc-3'

L287F-3 revers

5'-cca tca ccg tgc cgg tgc cg-3'

L287F-4 revers

5'-ccc ttc acg tgc cgt cat cg-3'

LEBENS LAUF

Angaben zur Person:

Name: Holger Scheib
Geburtsdatum/-ort: 13. Januar 1969 in Backnang
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1976 - 1979: Grundschule in der Plaisir in Backnang
1979 - 1988: Gymnasium in der Taus in Backnang
11. Mai 1988: Allgemeine Hochschulreife

Grundwehrdienst:

Oktober 1988 - Dezember 1989 3./81 Gebirgsartillerie Bataillon in Kempten im Allgäu
2./82 Gebirgsraketenartillerie Bataillon in Landsberg am Lech

Wissenschaftliche Ausbildung:

1989 - 1997 Studium der Chemie an den Universitäten Stuttgart und Cincinnati, OH, USA
Juli 1992 Diplomvorprüfung, Universität Stuttgart
August 1994 Master of Science, University of Cincinnati, OH, USA
Februar 1996 Diplomhauptprüfung
Februar 1996 - Januar 1997 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Rolf D. Schmid über "Molekulardynamische Simulationen und Protein Design"