

Untersuchung von Lipasen - Elektrostatik, Selektivität und Einfluss von Lösungsmitteln auf Struktur und Dynamik

VON DER FAKULTÄT CHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART
ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE EINES DOKTORS DER
NATURWISSENSCHAFTEN (Dr. rer. nat.) GENEHMIGTE DISSERTATION

VORGELEGT VON
PETER TRODLER
AUS WAIBLINGEN

HAUPTBERICHTER: PROF. DR. ROLF D. SCHMID
MITBERICHTER: PROF. DR. DIETER H. WOLF

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG:
22.04.2008

INSTITUT FÜR TECHNISCHE BIOCHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART
2008

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Stuttgart, den 10.10.2008

Peter Trodler

„Es ist nicht genug zu wissen, man muß es auch anwenden.
Es ist nicht genug zu wollen, man muß es auch tun.“

Johann Wolfgang von Goethe, 1749-1832

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid, MBA für die freundliche Aufnahme an seinem Institut und die Möglichkeit, meine Arbeit unter ausgezeichneten Arbeitsbedingungen durchführen zu können. Ich bedanke mich für die Freiheit in der Forschung und seine Unterstützung bei der Gestaltung meiner Auslandsaufenthalte. Während der Promotion hatte ich die Gelegenheit, Dinge weit über die wissenschaftliche Arbeit hinaus zu lernen.

Bei Herrn Apl. Prof. Dr. Jürgen Pleiss bedanke ich mich für die Überlassung und Betreuung des Promotionsthemas, die ständige Diskussionsbereitschaft und die bei der Bearbeitung des Themas überlassene Freiheit.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter H. Wolf möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Koreferates und bei Herrn Prof. Dr. H. Bertagnolli für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Für hilfreiche Diskussionen danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Biokatalyse und Genetik. Insbesondere möchte ich Dr. Monika Rusnak für die Betreuung im Labor und die Erstellung von Mutanten und Dr. Steffen Maurer für die freundschaftliche Zusammenarbeit danken. Bei Danni Liu bedanke ich mich für die Mitarbeit im Labor.

Bei Jens Nieveler bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Aufreinigung von Proteinen und bei Sven Richter für die Durchführung von Fermentationen.

Den Kollegen aus der Arbeitsgruppe Bioinformatik gilt mein besonderer Dank für die stets kollegiale und hilfsbereite Zusammenarbeit während der gemeinsamen Zeit am Institut und für das mehr als angenehme Arbeitsklima. Die vielen gemeinsamen Unternehmungen und Erlebnisse werden unvergessen bleiben, insbesondere die immer sehr geselligen Sitzungen des Ältestenrates mit Dr. Fabian Bös, Dr. Michael Knoll, Dr. Stephan Tatzel und Dipl. Biol. (t.o.) Alexander

Steudle. Bei Dr. Markus Fischer möchte ich mich zudem für seine fachliche Unterstützung im Bereich Lipasen bedanken.

Dem Land Baden-Württemberg danke ich für das Stipendium im Bereich „*Systemsbiologie and Biosystems Engineering*“ und für den damit verbundenen Auslandsaufenthalt in Shanghai/China. Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) danke ich für das Stipendium im Rahmen des Programms VIGONI.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Ingeborg und Heinz Trodler die mich im Studium und während der Doktorarbeit unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	13
2	Abstract	20
3	Einleitung	24
3.1	Bio-Katalysatoren	24
3.2	Die Enzymklasse der Lipasen	25
3.2.1	Struktur der Lipasen	28
3.2.2	Grenzflächenaktivierung von Lipasen	33
3.2.3	Der Katalyse-Mechanismus der Veresterung	36
3.2.4	Molekulare Grundlagen der Enantioselektivität	38
3.2.5	Verwendete Lipasen	40
3.3	Enzyme in organischen Lösungsmitteln	48
3.4	Die Theorie molekulardynamischer Methoden	52
3.4.1	Theoretische Grundlagen	52
3.4.2	Kraftfeld (force-field)	55
3.5	Aufreinigung von Lipasen	61
3.6	Elektrostatistisches Potential	63
3.7	Optimierung enzymkatalysierter Reaktionen	65
3.8	Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch <i>Candida antarctica</i> Lipase B	67
3.9	Einordnung in „Weiße Biotechnologie“	69
4	Ergebnisse	71
4.1	Das Verhalten von <i>Candida antarctica</i> Lipase B in verschiedenen Lösungsmitteln	71
4.1.1	Die Struktur von CALB	71

4.1.2	Die Flexibilität von CALB	75
4.1.3	Die Oberfläche von CALB	80
4.1.4	Wasser an der Oberfläche von CALB	82
4.2	Untersuchung der Grenzflächenaktivierung durch langzeit Simulationen von <i>Burkholderia cepacia</i> Lipase	89
4.2.1	Simulationen der geschlossenen Konformation in Wasser	91
4.2.2	Simulation der geschlossenen Konformation in Toluol	94
4.2.3	Simulation der offenen Konformation in Wasser	102
4.2.4	Simulation der offenen Konformation in Toluol	103
4.3	Rationales Design einer neuen einstufigen Aufreinigungsmethode für <i>Candida antarctica</i> Lipase B durch IEC	110
4.3.1	Expression von <i>Candida antarctica</i> Lipase B in <i>Pichia pastoris</i>	110
4.3.2	Berechnung der Titrationskurve und des elektrostatischen Potentials bei verschiedenen pH Werten	113
4.3.3	Das elektrostatische Potential von CALB	115
4.3.4	Experimentelle Bestimmung des pI und der Titrationskurve	116
4.3.5	Aufreinigung von CALB durch IEC	117
4.3.6	Einfluss von Temperatur und pH Wert auf die Stabilität von CALB	121
4.3.7	Bindung von CALB auf HIC Säulen	123
4.4	Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch <i>Candida antarctica</i> Lipase B	124
4.4.1	Molekulare Modellierung	125
4.4.2	Experimentelle Untersuchung von WT und Mutanten	128
5	Diskussion	132
5.1	Das Verhalten von <i>Candida antarctica</i> Lipase B in verschiedenen Lösungsmitteln	132
5.1.1	Die Struktur von CALB	132
5.1.2	Die Flexibilität von CALB	133
5.1.3	Die Oberfläche von CALB	135

5.1.4	Wasser an der Oberfläche von CALB	136
5.2	Untersuchung der Grenzflächenaktivierung durch langzeit Simulationen von <i>Burkholderia cepacia</i> Lipase	140
5.2.1	Simulationen der geschlossenen Konformation in Wasser	141
5.2.2	Simulation der geschlossenen Konformation in Toluol	141
5.2.3	Simulation der offenen Konformation in Wasser	144
5.2.4	Simulation der offenen Konformation in Toluol	145
5.3	Rationales Design einer neuen einstufigen Aufreinigungsmethode für <i>Candida antarctica</i> Lipase B durch IEC	146
5.3.1	Erklärung des speziellen pH Profils von CALB	147
5.3.2	Analyse der Lipase Engineering Database	149
5.3.3	Anwendung auf andere Enzyme	150
5.4	Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch <i>Candida antarctica</i> Lipase B	151
6	Material und Methoden	154
6.1	Chemikalien, Geräte und Software	154
6.2	Biochemische Methoden	160
6.2.1	Kultivierung von Mikroorganismen	160
6.2.2	Expression von CALB in <i>Pichia pastoris</i>	160
6.2.3	Chemische Methoden	162
6.2.4	Analytische Methoden	169
6.3	Bioinformatische Methoden	170
7	Anhang	179
7.1	Anhang I Parameter der Lösungsmittelmodelle	179
7.2	Anhang II: Simulation der Lösungsmittelmodelle	183
7.3	Anhang III Physikalische Daten der Lösungsmittelmodelle	185
7.4	Anhang IV Alignment der Sequenz von BCL mit der Sequenz von BGL	186

7.5	Anhang V Sequenz der Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>	187
7.6	Anhang VI Parameter von hpca im Übergangszustand	188
8	Literatur	192

Abkürzungen

1hpc	R-2-Hydroxypropylcarbammat
2hpc	S-2-Hydroxypropylcarbammat
3hpc	R-1-Hydroxypropylcarbammat
4hpc	S-1-Hydroxypropylcarbammat
1hpca	R-2-Methacryl-propylcarbammat
2hpca	S-2-Methacryl-propylcarbammat
3hpca	R-1-Methacryl-propylcarbammat
4hpca	S-1-Methacryl-propylcarbammat
AIEC	Anionen-Austausch Chromatographie
AS	Aminosäure
BCL	<i>Burkholderia cepacia</i> Lipase
BGL	<i>Burkholderia glumae</i> Lipase
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BSL	<i>Bacillus subtilis</i> Lipase
C	Konzentration in mol/l
CALB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CALB _{com}	Kommerzielle CALB, Chirazyme L-2, Iyo
CALB _{rec}	CALB aus der Expression in <i>Pichia pastoris</i>
CIEC	Kationen-Austausch Chromatographie
CVL	<i>Chromobacterium viscosum</i> Lipase
CRL	<i>Candida rugosa</i> Lipase
D	Debye
Da	Dalton
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
ϵ	Dielektrizitätskonstante
E	Enantioselektivität
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	Enantiomerenüberschuß
E _{kin}	kinetische Energie
E _{pot}	potentielle Energie
ETC	experimentelle Titrationskurve
FSC	<i>Fusarium solani</i> Cutinase
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HIC	Hydrophobe-Interaktions Chromatographie

hpc	Hydroxypropylcarbamat Regio- und Stereoisomere
hpca	Methacryl-propylcarbamat Regio- und Stereoisomere
IEC	Ionen-Austausch Chromatographie
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LED	<i>Lipase Engineering Database</i>
LMW	<i>low molecular weight marker</i>
m	Meter
M	Molar [mol/l]
m/v	Masse pro Volumen
MD	molekulardynamisch
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBE	Poisson-Boltzmann Gleichung
PCL	<i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase
pI	isoelektrischer Punkt
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
RML	<i>Rhizomucor miehei</i> Lipase
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SASA	<i>Solvent Accessible Surface Area</i>
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
u	Unit (internationale Einheit) [mmol/min]
V	Volt
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
λ	Wellenlänge in nm

Aminosäuren

A/Ala	Alanin
C/Cys	Cystein
D/Asp	Asparaginsäure
E/Glu	Glutaminsäure
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

1 Zusammenfassung

Lipasen (EC 3.1.1.3) gehören zu den Enzymen mit dem größten Potential für industrielle Anwendungen und ihr Marktanteil erhöht sich jährlich. Ihre Funktion in der Natur besteht im hydrolytischen Abbau von Triglyceriden zu freien Fettsäuren. Sie katalysieren reversibel die Hydrolyse von Esterbindungen synthetischer Substrate und deren Veresterung. Lipasen sind Biokatalysatoren mit einer hohen Selektivität, einem breiten Substratspektrum und sie katalysieren Reaktionen unter milden Bedingungen. Diese besonderen Eigenschaften machen sie interessant für die Forschung und in der Anwendung in organischen Synthesen. Ein besonderes Merkmal der meisten Lipasen ist die Grenzflächenaktivierung an einer hydrophoben Grenzschicht. Die meisten Lipasen haben eine Schleife an der Oberfläche des Proteins, ein *lid* genannter Deckel. Das *lid* ist ein bewegliches Strukturelement und verschließt den Zugang zum aktiven Zentrum. Die Grenzflächenaktivierung ist verbunden mit einem Konformationsübergang an der hydrophoben Grenzschicht von der geschlossenen zur offenen Konformation. In der nicht aktiven, geschlossenen Form der Lipase blockiert das *lid* aus α -Helices den Zugang zum katalytischen Zentrum der Lipase. Bei Kontakt an eine hydrophobe Grenzfläche wird das *lid* durch eine Konformationsänderung der Lipase geöffnet und erlaubt dem Substrat den Zugang zum aktiven Zentrum. Während früher ausschließlich in wässrigem Medium gearbeitet wurde nahm das Interesse an Lipasen als Biokatalysatoren in den letzten Jahren zu, da Lipasen auch in organischem Lösungsmittel Reaktionen effektiv katalysieren können. Die Eigenschaften von Lipasen ändern sich beim Wechsel des Lösungsmittels und ermöglichen enzymkatalysierte Synthesen vieler Verbindungen in organischen Lösungsmitteln die in Wasser nicht durchführbar sind. Lipasen können in organischen Lösungsmitteln eine höhere Temperaturstabilität, eine verbesserte Selektivität oder Aktivität haben. Enzyme sind in organischen Lösungsmitteln weiterhin aktiv, da sie ihre Konformation aus Wasser weitgehend behalten. In organischem Lösungsmittel brauchen Enzyme allerdings geringe Mengen an Wasser, um ihre Flexibilität und damit ihre biologische Funktion zu erhalten, und katalytische aktiv zu sein. In dieser Arbeit wurde der Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Struktur, die Dynamik und

an die Proteinoberfläche gebundenes Wasser von Lipasen durch MD Simulationen untersucht. Der Vorteil dieser MD Simulationen zu bisherigen theoretischen Untersuchungen von Lipasen in organischem Lösungsmittel liegt zum einen in der Verwendung expliziter Lösungsmittelmodelle und zum anderen in den verwendeten multiplen MD Simulationen. Durch explizite Lösungsmittelmodelle können Wechselwirkungen von Wassermolekülen mit der Proteinoberfläche und der Austausch von Wassermolekülen untersucht werden. Durch multiple MD Simulationen kann der Konformationsraum verlässlicher untersucht werden.

Candida antarctica Lipase B (CALB) ist die wichtigste Lipase in der industriellen Anwendung in der organischen Synthese in Wasser und in organischen Lösungsmitteln. Im Gegensatz zu den meisten anderen Lipasen hat CALB kein *lid* das den Eingang zum Aktiven Zentrum verschließt und zeigt keine Grenzflächenaktivierung. CALB ist in organischem Lösungsmittel stabil und kann Reaktionen bei höheren Temperaturen katalysieren. Die hohe Aktivität und Enantioselektivität in der Hydrolyse in Wasser und in der Veresterung im organischen Lösungsmittel machen CALB zu einem idealen Katalysator in der chemischen Synthese. Durch MD Simulationen sollte das Verhalten von CALB in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht werden. Die Struktur und die Flexibilität von CALB in Wasser und den organischen Lösungsmitteln Methanol, Chloroform, Isopentan, Cyclohexan und Toluol wurde durch jeweils drei Simulationen des gleichen Systems über 2 ns untersucht. Die Struktur war in allen Simulationen stabil und zeigte keine signifikanten Unterschiede in verschiedenen Lösungsmitteln und zur Kristallstruktur. Die Gesamtoberfläche nahm in Wasser im Vergleich zur Kristallstruktur durch die Zunahme der hydrophilen Oberfläche zu, im Vergleich zu anderen Lipasen war der Einfluss auf die Oberfläche aber gering. Das umgebende Lösungsmittel hatte einen großen Einfluss auf die Flexibilität von CALB. Die Flexibilität war besonders in Wasser und in geringerem Ausmaß in Methanol höher als in den unpolaren Lösungsmitteln Toluol, Cyclohexan, Isopentan und Chloroform. Besonders hohe Flexibilität zeigte CALB in Wasser am Eingang zum aktiven Zentrum. Die Flexibilität korrelierte mit der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels, bei einer höheren Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels nahm die Flexibilität zu. Alle Aminosäuren zeigten die größte Flexibilität in Wasser, das Ausmaß des Rückgangs der Flexibilität in unpolaren organischen Lösungsmitteln hing jedoch vom Typ der Aminosäure ab. Eine geringere Abnahme der Flexibilität im

Vergleich mit Wasser wurde für unpolare Aminosäuren, eine höhere Abnahme bei geladenen und polaren Aminosäuren beobachtet. Wechselwirkungen des Lösungsmittels mit dem Protein und die Verteilung von Wasser an der Oberfläche wurden untersucht. In den Simulationen in Wasser wurden während der Simulation über 2 ns alle Wassermoleküle an der Oberfläche durch Wassermoleküle des Lösungsmittels ausgetauscht. In unpolaren organischen Lösungsmitteln war der Austausch wesentlich langsamer. Das aktive Zentrum war für alle verwendeten Lösungsmittel zugänglich. Ähnlich wie die Korrelation der Dielektrizitätskonstante zur Flexibilität korrelierte auch die Menge an geringer beweglichen Wassermolekülen mit der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels. Bei kleineren Dielektrizitätskonstanten des Lösungsmittels nahm die Zahl der an die Oberfläche gebundenen Wassermoleküle zu. Durch die größere Zahl an langsam ausgetauschten Wassermolekülen an der Oberfläche bildete sich ein umspannendes Wassernetzwerk. An die Proteinoberfläche gebundene Wassermoleküle wurden hier durch weitere Wassermoleküle die selber keine Bindung ans Protein haben überbrückt. In Wasser und in Methanol konnte ein solches umspannendes Wassernetzwerk nicht beobachtet werden. In Methanol wurden Wassermoleküle von der Oberfläche gestrippt und durch Methanolköle aus dem Lösungsmittel ersetzt. Der Grund der verringerten Flexibilität von CALB in unpolaren Lösungsmitteln war die geringere Beweglichkeit von Wassermolekülen an der Oberfläche und der damit verbundene langsamere Austausch von Wassermolekülen. Die Tatsache, dass alle Aminosäuren ihre höchste Flexibilität in den Simulationen von CALB in Wasser zeigten, kann auf einen globalen Einfluss des Lösungsmittels auf CALB zurückgeführt werden. Der Einfluss der organischen Lösungsmittel ist nicht nur auf die Wechselwirkung des Proteins mit dem Lösungsmittel, sondern auch auf den Austausch der Wassermoleküle und das entstehende Wassernetzwerk zurückzuführen.

Als weiteres System wurde *Burkholderia cepacia* Lipase (BCL) in MD Simulationen untersucht. Diese Lipase hat im Vergleich zu CALB ein *lid* und zeigt Grenzflächenaktivierung an einer hydrophoben Grenzschicht an der das *lid* geöffnet ist. Der Vorgang des Konformationsübergangs wurde in dieser Arbeit untersucht. Trotz der bekannten Struktur der offenen und geschlossenen Konformation vieler Lipasen ist der Mechanismus der Aktivierung und die damit verbundene Öffnung des *lids* nicht bekannt. Die Untersuchung von

Konformationsänderungen von Enzymen ist eine große Herausforderung, denn sie ist im Experiment oft nicht zugänglich. MD Simulationen können Einblick in den Vorgang der Grenzflächenaktivierung geben und die Bewegung des *lids* erklären. Zur Untersuchung der Grenzflächenaktivierung wurden jeweils drei MD Simulationen der offenen und geschlossenen Konformation von BCL in Wasser und Toluol über 30 ns durchgeführt. Da eine Kristallstruktur der geschlossenen Konformation von BCL noch nicht existierte wurde ein Homologiemodell dieser Konformation erstellt. Die durch das Lösungsmittel induzierte *lid*-Öffnung in Toluol und das Schließen in Wasser war in mehreren durchgeführten Simulationen des gleichen Systems reproduzierbar. In der geschlossenen Konformation von BCL in Wasser konnte die Öffnung des *lids* nicht beobachtet werden, da die geschlossene Konformation hier thermodynamisch bevorzugt ist. In Simulationen von geschlossenem BCL in Toluol wurde die Öffnung des *lids* beobachtet. Das *lid* bewegt sich um 24 Å von der geschlossenen zur offenen Konformation und ermöglichte den Zugang zum aktiven Zentrum. Der Oberflächenanteil der hydrophoben Aminosäuren nahm während der *lid*-Bewegung um 1100 Å² zu. Eine Barriere die eine vollständige Öffnung des *lids* verhinderte wurde identifiziert. Die vollständige Öffnung des *lids* wurde in der Simulation durch Helix α6 blockiert und verhinderte die weitere Bewegung von Helix α5 zur vollständig geöffneten Konformation. In der Simulation von offenem BCL in Wasser wurde wie erwartet eine Schließbewegung des *lids* beobachtet. Im Vergleich zum nahezu vollständigen Öffnen der geschlossenen Konformation in Toluol, konnte der vollständige Schließvorgang von offenem BCL in Wasser, trotz einer für Simulationen großen Bewegung, nicht beobachtet werden. Durch Wechsel des Lösungsmittels konnte gezeigt werden, dass der Vorgang der *lid*-Bewegung reversibel ist. In der Simulation der offenen Kristallstruktur in Toluol blieb das *lid* wie erwartet geöffnet, zeigte allerdings am Ende eine etwas weitere Öffnung als zu Beginn der Simulation. Kristallkontakte zwischen dem hydrophoben *β-hairpin loop* zur Helix α4 des *lids*, die eine vollständig geöffnete Konformation in der Kristallstruktur verhindern, wurden identifiziert. Der *β-hairpin loop* und das *lid* waren sehr flexible Elemente in allen Simulationen. Der *β-hairpin loop* bewegte sich in allen Simulationen in Wasser weg vom aktiven Zentrum, während er in Toluol keine Bewegung in eine bestimmte Richtung zeigte. Langreichweitige Effekte durch das Lösungsmittel waren für die *lid*-

Öffnung verantwortlich. Der *loop* zwischen Helix $\alpha 4$ and $\alpha 5$ mit TYR129 zeigt die erste Bewegung bei der jeweiligen Konformationsänderung.

Neben der theoretischen Untersuchung der Struktur und Dynamik von Lipasen in verschiedenen Lösungsmitteln, unter Verwendung eines breiten Spektrums bioinformatischer Methoden, wurden theoretische Untersuchungen auch mit der Arbeit im Labor verknüpft. Das rationale Design einer neuen einstufigen Aufreinigungsmethode für *Candida antarctica* Lipase B und die Optimierung von CALB in der Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten standen hier im Vordergrund. Viele Lipasen sind kommerziell immobilisiert auf verschiedenen Trägern oder lyophilisiert, als oft mit anderen Proteinen verunreinigtes Produkt, erhältlich. Für eine industrielle Anwendung ist die technische Reinheit von Enzymen meist ausreichend, aber für die Charakterisierung von WT und Mutanten kann eine Aufreinigung notwendig sein. Im Allgemeinen können Lipasen durch Ionen-Austausch Chromatographie aufgereinigt werden. CALB konnte jedoch in einer bisherigen Aufreinigungsmethode nicht auf Säulen in der Ionen-Austausch Chromatographie oder der Hydrophoben-Interaktions Chromatographie unter den verwendeten Bedingungen gebunden werden. CALB diente deshalb als Beispiel eines rationalen Designs einer Aufreinigungsmethode. Es sollte die Frage geklärt werden warum die Aufreinigung von CALB im Vergleich zu anderen Lipasen so schwierig ist. Dazu wurde CALB nach den elektrostatischen Eigenschaften charakterisiert und Aufreinigungsbedingungen vorhergesagt. Bei der elektrostatischen Charakterisierung von CALB wurde ein breiter isoelektrischer Bereich von pH 5 bis 8 an Stelle eines isoelektrischen Punkts gefunden. Es gibt zwei Gründe für den ungewöhnlich breiten, berechneten isoelektrischen Bereich. Zum einen hat CALB die gleiche Anzahl an positiv und negativ geladenen Aminosäuren bei pH 7. Zum anderen ist in der Struktur von CALB lediglich ein His mit einer großen pKa-Verschiebung enthalten und es gibt keine protonierbaren Seitenketten mit einem pKa-Wert im Bereich von 4.9 bis 8.0. Eine einstufige Aufreinigungsmethode durch Ionen-Austausch Chromatographie für CALB mit Bindung bei pH 3, knapp unterhalb des isoelektrischen Bereichs, wurde entwickelt. CALB zeigte hohe Stabilität bei diesem pH-Wert. Eine Analyse der *Lipase Engineering Database* ergab, dass es neben CALB mit einer Mutante der *Fusarium solani* Cutinase noch eine weitere α/β -Hydrolase mit einem breiten isoelektrischen Bereich gibt. Die Entwicklung effizienter Aufreinigungsmethoden basiert noch immer auf dem Ausprobieren

verschiedener experimenteller Bedingungen, was insbesondere für Proteine mit ungewöhnlichen Eigenschaften schwierig und Zeit aufwendig sein kann. Durch Modellierung biochemischer Eigenschaften kann der Parameterraum zur Ermittlung der besten Aufreinigungsbedingungen im Experiment eingegrenzt werden. Diese Methode des rationalen Designs einer Aufreinigungsmethode kann auch zur Entwicklung von Aufreinigungsmethoden anderer Proteine verwendet werden, da experimentelle Bedingungen durch eine nicht besonders zeitaufwendige theoretische Analyse gefunden werden können.

Lipasen katalysieren zahlreiche enantioselektive Synthesen unterschiedlicher Substratklassen. CALB nimmt hierbei eine wichtige Stellung auf Grund der hohen Enantioselektivität und Aktivität gegenüber einem großen Bereich unterschiedlicher Substrate ein. So zeigte CALB auch Aktivität in der Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten. Die Acylierung hat eine große Bedeutung in der Einführung von Vernetzungs-Funktionalität in Verbindungen. Traditionell werden chemische Prozesse zur Herstellung von acylierten Estern bei hohen Temperaturen verwendet, die aber gleichzeitig zur teilweisen Polymerisierung der acrylischen Doppelbindungen führen. In Acylierungen in enzymatischen Verfahren mit mildereren Reaktionsbedingungen kann dies verhindert werden. Die biotechnologischen Verfahren sind energiesparend und nachhaltiger als herkömmliche Syntheseverfahren, oft sogar kostengünstiger und verbessern die Qualität der Produkte. Die Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch CALB sollte für einen biotechnologischen Prozess zur Herstellung der Monomere, die chemisch säurekatalysiert nur schwer zugänglich sind, optimiert werden. Da Hydroxypropylcarbamate synthesebedingt aus zwei Regioisomeren besteht, von dem eines ein Enantiomer enthält, welches von nativem CALB kaum acyliert wird, bestand die Notwendigkeit, eine unselektivere Mutante zu entwickeln um einen vollständigen Umsatz zu erreichen. Die herkömmliche Methode Biokatalysatoren zu verbessern war die Reaktionsbedingungen zu optimieren ohne das Enzym selber zu verändern. In dieser Arbeit wurden einerseits die Reaktionsbedingungen, durch die Immobilisierung von CALB, optimiert, andererseits wurden die spezifischen Eigenschaften durch positionsgerichtete Mutagenese unter Verwendung bioinformatischer Ansätze verbessert. Die Methode des rationalen Designs wurde zur Erhöhung der Aktivität der Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch CALB verwendet und durch Molekulare Modellierung wurden Mutationen für höhere Aktivität vorgeschlagen. Das S-

Enantiomer des sekundären Alkohols wurde als schlecht umgesetztes Substrat in der enzymkatalysierten Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten identifiziert. Der Carbamat-Rest hat hier in der Bindetasche von CALB nicht ausreichend Platz und kann deshalb nur sehr schlecht im produktiven Übergangszustand gebunden werden. Die Bindetasche wurde durch Verkleinern der Seitenketten an der Position 278 vergrößert. Die zur Vergrößerung der Bindetasche des sekundären Alkohols vorgeschlagenen Mutanten L278V und L278F und insbesondere Mutante L278A waren in der Hydrolyse von Tributyrin aktiver als der WT. Die Mutanten L278A und L278V erwiesen sich auch in der Acylierung der Hydroxypropylcarbamate aktiver als der WT. Die Aktivität von CALB wurde in der Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten mit Methylacrylat durch Einsatz der Mutante L278A erhöht. L278A zeigte 95 % Umsatz nach 6 Stunden Reaktionszeit, dies war eine erhebliche Verbesserung im Vergleich zum WT, der nach 24 Stunden Reaktionszeit nur 84 % Umsatz zeigte. Die Mutante L278A war weniger selektiv als der WT. Das Verfahren zur Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch CALB L278A wurde bereits im 100 kg Maßstab bei BASF durchgeführt und als Europäisches Patent angemeldet (AE 20070139 - NEW CALB Muteins and their use).

2 Abstract

Lipases (EC 3.1.1.3) are of great interest in research and as biocatalysts. They are efficient catalysts for hydrolysis in water and esterification in organic solvents. Lipases are high selective catalysts for a wide variety of chiral compounds and for the kinetic resolution of racemic mixtures of secondary alcohols in hydrolysis and esterification. They have been shown to be useful enzymes catalyzing a great number of different reactions in water and organic solvents under mild conditions. The defining characteristic of most lipases is the interfacial activation at a lipid interface or in organic solvents. Most lipases consist of a surface loop, a so called lid, covering the active site and making it accessible for substrates. The conformational change of the lid occurs during interfacial activation induced by a hydrophobic interface or organic solvent, responsible for the enhancement of the activity. It has been shown that many enzymes retain activity in organic solvents and have interesting catalytic properties such as high thermostability and altered stereoselectivity. As compared to water, organic solvents offer new possibilities in biocatalysis. In organic solvents, enzyme-catalyzed esterifications become feasible, and can be efficiently used due to the high solubility of hydrophobic substrates.

Candida antarctica lipase B (CALB) is one of the most widely used lipases in biocatalysis in many industrial applications, because of its high enantioselectivity and wide range of substrates. CALB is stable in organic solvents without significant loss of activity and catalyzes reactions also at higher temperatures. In contrast to many other lipases CALB has no lid covering the entrance to the active site and shows no interfacial activation. Molecular dynamics simulations of enzymes in different solvents are a valuable tool to investigate the effect on the structure and dynamics of enzymes. The influence of organic solvents on structure and dynamics of proteins has been investigated. Multiple molecular dynamics simulations of CALB in water and in the organic solvents methanol, chloroform, isopentane, cyclohexane und toluene has been carried out. Interactions of the solvents with the protein and the distribution of water molecules at the protein surface were examined. The simulated structures were independent of the solvent and had a low deviation from the crystal structure.

However, the hydrophilic surface of CALB in non-polar solvents decreased in comparison to water. There is a large influence on the flexibility depending on the dielectric constant of the solvent, with a high flexibility in water and a low flexibility in organic solvents. With decreasing dielectric constant, the number of surface bound water molecules significantly increased and a spanning water network with an increasing size was formed. The reduced flexibility of CALB in organic solvents is caused by less mobile and slowly exchanging water molecules at the protein-surface. The influence of organic solvent is not only the influence on the protein, but also the influence of the water molecules and their interactions with the enzyme.

Burkholderia cepacia lipase (BCL) has a lid and shows interfacial activation. Interfacial activation is linked to the conformational change from closed to the open form, but is not accessible in experiment. The interfacial activation was examined by multiple molecular dynamics simulations over 30 ns of closed and opened BCL in water and toluene to investigate the influence on structure and flexibility. A homology model of the closed conformation of BCL was generated. BCL was stable in simulations in water and toluene. The β -hairpin loop and the lid were highly flexible elements in all simulations. In simulations of closed BCL in water no opening of the lid was observed. In simulations of closed BCL in toluene the lid was opening 24 Å making access to the active site. The hydrophobic surface was increasing by 1100 Å². An energetic barrier was identified preventing the opening to the completely open conformation. In simulations of open BCL in water the lid was slightly closing. The movement of the lid was reversible by changing the solvent. Further opening of the lid compared to the crystal structure was observed in simulations of open BCL in toluene. The fully open conformation in the crystal structure was prevented by crystal contacts between the β -hairpin loop and the helices α 4 and α 5 in the lid. The conformation of BCL can be altered by controlling the solvent conditions. The solvent induced lid opening in toluene and closing in water was reproducible in several simulations. Theoretical investigations were also combined with experimental work in this study. The rational design of a new one-step purification strategy of CALB and the optimization of CALB in the acrylation of hydroxypropylcarbamates were the main interests.

In most commercial preparations lipases are immobilized on different carriers or they are lyophilized as crude products that often contain different amounts of

impurities. Although for many industrial processes crude enzyme preparations are sufficient, a general purification strategy for lipases is desirable for biochemical characterization of the wild type or mutants to prevent side reactions in the biocatalytic process. Generally lipases can be purified by ion-exchange chromatography or by additional chromatographic steps. However, CALB has been shown not to bind to any chromatographic material at the used conditions. In this case study CALB was characterized by its electrostatic properties by electrostatic calculations. A fast and efficient one-step method for purification of CALB by ion-exchange chromatography was developed by rational design. The electrostatic properties of the enzyme were calculated and validated by isoelectric focusing and measurement of the titration curve. CALB shows an unusual pH profile with a broad isoelectric region from pH 4 to 8. CALB can be bound on a cation-exchange chromatography column at pH 3 and was purified to homogeneity without significant loss of activity. The broad isoelectric region of CALB is unique as compared to almost all other α/β -hydrolases which have a well-defined isoelectric point. A search in the Lipase Engineering Database resulted in only one further α/β -hydrolase, the *Fusarium solani* cutinase, which also has a broad isoelectric region. The rational design of a purification strategy is also useful for other enzymes and can reduce experimental efforts.

CALB is a highly versatile catalyst with activity towards a wide range of substrates. Acrylation is a practical way of introducing cross-linking functionality to a target compound. Traditional chemical processes were used for producing acrylate esters at high temperatures frequently leading to polymerization of acrylic double bonds. CALB can also catalyze acrylation of hydroxypropylcarbamates, which is an attractive alternative to chemical processes. Enzymatic processes conducted at moderate temperature might be beneficial in acrylation reactions, saving energy and improving purity and product quality. In this case the reaction mixtures consisted of a mixture of primary and secondary hydroxypropylcarbamates which were not fully converted. By molecular modeling positions for mutations reaching higher activity were identified. The slowly reacting substrate in the enzyme-catalyzed acrylation of hydroxypropylcarbamates was identified by molecular modeling. The S-enantiomer of the secondary alcohol was identified as the bottleneck in this reaction. Position L278 was identified by docking to be a key position for increasing the activity of CALB. Thus it was suggested to increase the volume of

the binding pocket by substitution of Leu by Ala at position 278. Enzyme engineering was done, introducing single mutations by site directed mutagenesis, whereby enzyme mutants with high activity and low selectivity were identified. Substitution of Leu by Ala at position 278 had a drastic effect on the hydrolysis activity of tributyrine. Also in the acrylation the mutant L278A showed higher activity compared to the wild type.

3 Einleitung

3.1 Bio-Katalysatoren

Seit alters her werden biokatalytische Prozesse zur Produktion fermentierter Nahrungs- und Genussmittel eingesetzt. Im Zuge der fortschreitenden Erforschung und Kommerzialisierung dieser Prozesse hat sich eine Vielzahl von neuen Anwendungsmöglichkeiten ergeben. Dabei wurde schon früh die Bedeutung der Lipasen in unterschiedlichen Industriesektoren erkannt. Heute finden Lipasen breite Verwendung als Zusatz in Waschmitteln, bei der Lipid-Modifikation oder auch bei der Käseherstellung. Die ersten biotechnologischen Verfahren dienten der Herstellung von alkoholischen Getränken, Käse und Brot. Die moderne Biotechnologie begann jedoch erst im späten 19. Jahrhundert. Die Natur hat in den Enzymen einen effektiven und selektiven Katalysator entwickelt. Gerade diese Eigenschaften machen Enzyme für den Einsatz in der Industrie auch so interessant. Es wurde früh erkannt, dass Enzyme nicht nur in lebenden Organismen Reaktionen katalysieren, sondern auch als gereinigtes Enzym in der Industrie als Biokatalysator verwendet werden können.

Enzyme sind äußerst effiziente und hochselektive chirale Katalysatoren, die eine Vielzahl chemischer und biochemischer Umsetzungen unter milden Bedingungen beschleunigen oder überhaupt erst durch die Erniedrigung der Aktivierungsenergie ermöglichen. Der chirale Aufbau der Enzyme, durch L-Aminosäuren als chirale Bausteine der Proteine, wird häufig zur Enantiomerentrennung in der enzymatischen kinetischen Racematspaltung ausgenutzt. Hierbei bindet das Enantiomer mit der bevorzugten Konfiguration an ein passendes katalytisches Zentrum und wird vorrangig umgesetzt. Die Bindung der Substrate an Enzyme wurde bereits 1894 von Fischer *et al.* mit Hilfe des Schlüssel-Schloß-Prinzips erklärt. Biokatalysatoren spielen in der organischen Synthese eine immer größere Rolle [1]. Gegenüber klassischen organischen Syntheseverfahren, die entweder die Verwendung hochreaktiver Reagenzien oder energetisch sehr aufwendiger Reaktionsbedingungen wie hohe Temperaturen bzw. Drücke erfordern, bieten sich durch den Einsatz von Biokatalysatoren häufig Vorteile.

3.2 Die Enzymklasse der Lipasen

Lipasen (E.C. 3.1.1.3) [2] gehören zur Familie der Serin-Hydrolasen und sind in Eukaryonten und Prokaryonten weit verbreitet. Sie kommen als zelluläre und extrazelluläre Enzyme in allen Zelltypen und Organismen vor und sind essentieller Bestandteil des Fettstoffwechsels. So findet man eine Reihe von Lipasen im Verdauungstrakt von Säugetieren. Ihre natürlichen Substrate sind Triglyceride, die neben den Kohlenhydraten zu den wichtigsten Speicherstoffen in der Natur zählen. Ihre Funktion besteht im hydrolytischen Abbau von Triglyceriden zu freien Fettsäuren und Mono- bzw. Diglyceriden. Sie sind von großem Interesse in der Forschung und in der Anwendung als Biokatalysator. Lipasen gehören zu den Biokatalysatoren die am Häufigsten in organischen Reaktionen unter milden Reaktionsbedingungen [3] [4] [5]. Die Kombination aus häufig geringer Substratspezifität, hoher Stereo- und Regioselektivität, sowie hoher Enzymstabilität in organischen Lösungsmitteln machen Lipasen zu einem äußerst nützlichen Werkzeug in der organischen Synthese. Gleichzeitig haben Lipasen ein relativ weites Substratspektrum und sind nicht auf die Spaltung von Triglyceriden beschränkt, sondern sie katalysieren auch reversibel die Hydrolyse von Esterbindungen synthetischer Substrate und katalysieren auch deren Veresterung bzw. Umesterung [6].

Die Vorteile der enzymatischen gegenüber der chemischen Katalyse in der regio- und stereoselektiven Synthese enantiomerenreiner Verbindungen sind der Einsatz unter milden Reaktionsbedingungen, Lipasen sind bereits bei 30 bis 40°C aktiv, bei gleichzeitiger Reduzierung unerwünschter Nebenreaktionen. Viele Lipasen sind auch in organischen Lösungsmitteln stabil und aktiv, wodurch sich weitere Einsatzmöglichkeiten ergeben. Besonders bewährt haben sich Lipasen im Aufbau optisch aktiver Substanzen durch kinetische Racematspaltung oder stereospezifische Synthese. Mit Hilfe der Fähigkeit zur stereospezifischen Katalyse der Lipasen können optisch reine Produkte hergestellt werden, die synthetisch nicht oder nur mit sehr hohem Aufwand, unter Durchführung zahlreicher Synthesestufen, hergestellt werden können. Die Mehrzahl von Pharmazeutika und Chemikalien, die ein oder mehrere chirale Zentren enthalten, werden als racemische Gemische verkauft. Lipasen können auf Grund ihrer Spezifität in Verfahren eingesetzt werden, die nur zu dem gewünschten Enantiomer führen. Durch Lipasen katalysierte Reaktionsschritte, insbesondere in

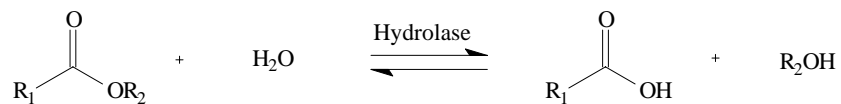
organischen Lösungsmitteln, werden in Syntheserouten eingebaut, um optisch reine Enantiomere zu erhalten. Ein wichtiger Faktor für die Wirtschaftlichkeit durch Lipasen katalysierter Racematspaltungen ist die Rückgewinnung des ungewünschten Enantiomers, welches durch chemische oder enzymatische Reaktion racemisiert wird und somit als Edukt wieder zur Verfügung steht [7].

Lipasen bieten viele Vorteile im Vergleich zu anderen Biokatalysatoren. Lipasen arbeiten unabhängig von Cofaktoren, eine aufwendige und kostenintensive Regeneration von Cofaktoren entfällt somit. Einige Lipasen zeigen eine hohe Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln. Da viele Substrate in Wasser nicht oder nur schlecht löslich sind, macht erst der Einsatz organischer Lösungsmitteln eine Umsetzung möglich. Die hohe Lagerstabilität dieser Biokatalysatoren ist ein Grund, weshalb bereits eine große Anzahl von Enzymen dieser Klasse kommerziell erhältlich ist. Durch Lipasen katalysierte Reaktionen können im Vergleich zu chemischen Prozessen, die bei hohen Drücken und Temperaturen durchgeführt werden, bei normalem Druck am Temperaturoptimum des Enzyms durchgeführt werden. Durch die milden Reaktionsbedingungen ergibt sich eine Energieersparnis und durch die höhere Selektivität eine vereinfachte Aufarbeitung der Produkte.

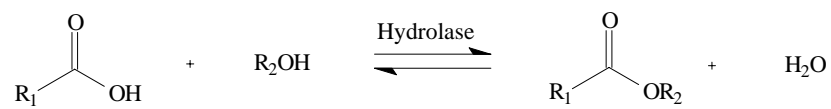
Ein wichtiges Anwendungsgebiet von Lipasen ist der Zusatz in Waschmitteln. Hier werden sie zusammen mit anderen mikrobiellen Enzymen (Proteasen, Amylasen, Cellulasen) zum Erreichen gleicher Waschleistung bei niedrigerer Temperatur und besserer Umweltverträglichkeit seit den sechziger Jahren eingesetzt. Eine ökonomisch bedeutende Anwendung finden Lipasen auf dem Gebiet der organischen Synthese. Lipasen gehören zu den Enzymen mit dem größten Potential für industrielle Anwendungen und ihr Marktanteil erhöht sich jährlich. Trotz dieses großen Anwendungspotentials von Lipasen sowohl in traditionellen Bereichen, wie der Lebensmittelindustrie, als auch in modernen, wie der Herstellung von Feinchemikalien und Pharmazeutika, wird eine Anwendung in großem Maßstab in der Industrie vor allem durch die hohen Kosten der Enzyme, die teilweise geringe Stabilität mancher Enzyme und durch die oft noch nicht optimierten Reaktionsbedingungen erschwert. In den letzten Jahren wurden jedoch zum einen durch geeignete Expressionssysteme die Kosten gesenkt und zum anderen verspricht die Anwendung des rationalen Designs eine Verbesserung der Stabilität von Lipasen [8], Aktivität [9] und Spezifität [10].

Lipasen werden nicht nur in der Hydrolyse von Esterbindungen, sondern auch in der Veresterung, der Umkehrreaktion der Hydrolyse, eingesetzt (Abbildung 1). Bei der Umesterung werden die bei der Hydrolyse eines Esters entstehenden Alkohole zweier Ester ausgetauscht. Der Austausch hängt dabei sowohl von den Konzentrationen der Stoffe als auch der Substratspezifität der Lipase ab [11]. In einem System mit niedrigem Wassergehalt kann eine Lipase die Esterverknüpfungen von freien Carbonsäuren und Alkoholen katalysieren. Die Veresterung ist dazu leichter steuerbar als die Hydrolyse, da durch stetiges Entfernen des Endprodukts eine vollständige Umsetzung erreicht werden kann.

1. Hydrolyse

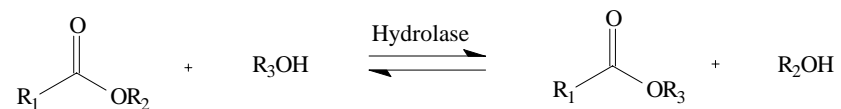


2. Veresterung

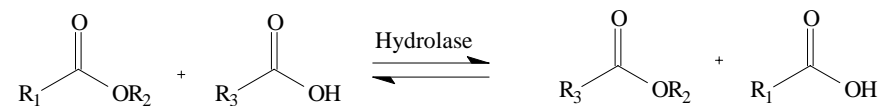


3. Umesterung

Alkoholyse



Acidolyse



4. Interesterifikation

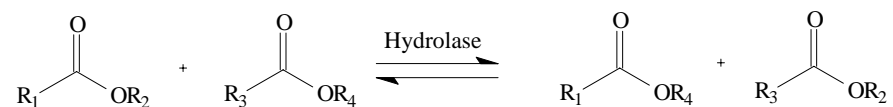


Abbildung 1 Von Lipasen und Carboxylesterasen katalysierte Reaktionen

3.2.1 Struktur der Lipasen

3.2.1.1 Der α/β -Hydrolase fold

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Kristallstrukturen von Lipasen aufgelöst [12,13] [14] [15]. Lipasen haben einen gemeinsamen *fold*, den α/β -Hydrolase *fold* [16] [17]. Dieses Strukturelement besteht aus acht nahezu parallel angeordneten β -Faltblättern, dessen β -Stränge in kanonischer Anordnung, mit einer antiparallelen Anordnung des zweiten Faltblattes, von sechs α -Helices im Zentrum der Hydrolase umgeben sind (Abbildung 2). Die β -Faltblätter 3-8 sind durch α -Helices verbunden. Trotz kleineren Abweichungen bei einigen α/β -Hydrolasen bleibt die zentrale Topologie dieser Struktur stets erhalten. Auf Grund der diesen Enzymen gemeinsamen Eigenschaft, sie katalysieren die Hydrolyse von Esterbindungen, wird das gemeinsame Faltungsmuster als α/β -Hydrolase *fold* bezeichnet. Alle Lipasen mit bekannter Proteinstruktur entsprechen dem ursprünglich beschriebenen Faltungsmuster der α/β -Hydrolasen, jedoch existieren auch Variationen. α/β -Hydrolasen zeigen im *fold* keine Sequenzähnlichkeit sind aber im Lauf der Evolution auf gemeinsame Vorfahren zurückzuführen [14]. α/β -Hydrolasen sind eine der größten Familien von strukturell verwandten Enzymen, die ein breites Spektrum an chemischen Reaktionen katalysieren und dabei eine Vielzahl verschiedenster Substrate umsetzen [18]. Mitglieder dieser Familie sind unter anderem Esterasen (E.C. 3.1.1), Acetylcholinesterasen (E.C. 3.1.1.7), Cutinasen (E.C. 3.1.1.74), Carboxylesterasen (E.C. 3.1.1.1), Arylesterasen (E.C. 3.1.1.2), Cholinesterasen (E.C. 3.1.1.8), Thioesterasen (E.C. 3.1.2.14) und Epoxidhydrolasen (E.C. 3.3.2.3).

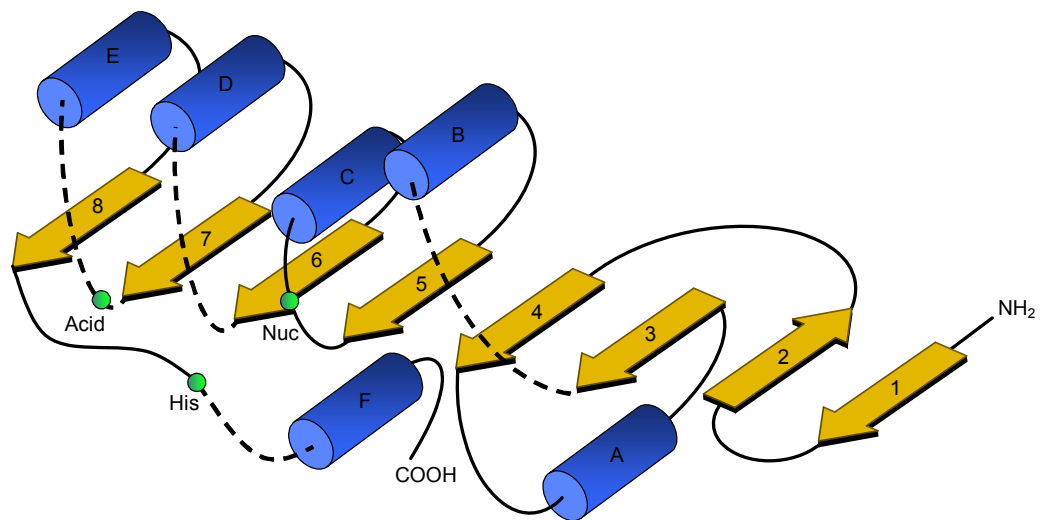


Abbildung 2 Schematische Darstellung des α/β -Hydrolase *fold*s. α -Helices sind als blaue Zylinder (A-F) dargestellt, β -Faltblätter sind als gelbe Pfeile (1-8). Die gestrichelten Linien deuten variable Bereiche an. Der *nucleophilic elbow* ist zwischen β -Faltblatt 5 und α -Helix C angedeutet. Die Positionen der Aminosäuren der katalytischen Triade sind als grüne Punkte dargestellt.

3.2.1.2 Die katalytische Triade

Hydrolyasen die dem Strukturtyp der α/β -Hydrolase *fold* angehören besitzen drei katalytisch essentielle Aminosäuren, Ser, His und Asp [19]. Das Substrat wird im aktiven Zentrum durch die drei Aminosäuren der katalytischen Triade katalytisch umgesetzt. Nicht nur die Anordnung dieser drei Aminosäuren im Protein, sondern auch deren Orientierung in der dreidimensionalen Proteinstruktur ist in allen bekannten Lipasen gleich. Die relative Position dieser katalytisch aktiven Aminosäuren zu den zentralen Sekundärstrukturelementen ist vorgegeben (Abbildung 3). Die abgewinkelte Struktur mit der nukleophilen Aminosäure Ser im Zentrum führt zu einer optimalen Ausrichtung des Nukleophils, das somit sowohl für das katalytische His als auch für das Substrat frei zugänglich ist. Zudem wird der intermediär gebildete tetrahedrale Übergangszustand bei einer Umsetzung, ein ionisches Intermediat der Hydrolyse, optimal durch Aminosäuren der *oxyanion*-Bindetasche stabilisiert.

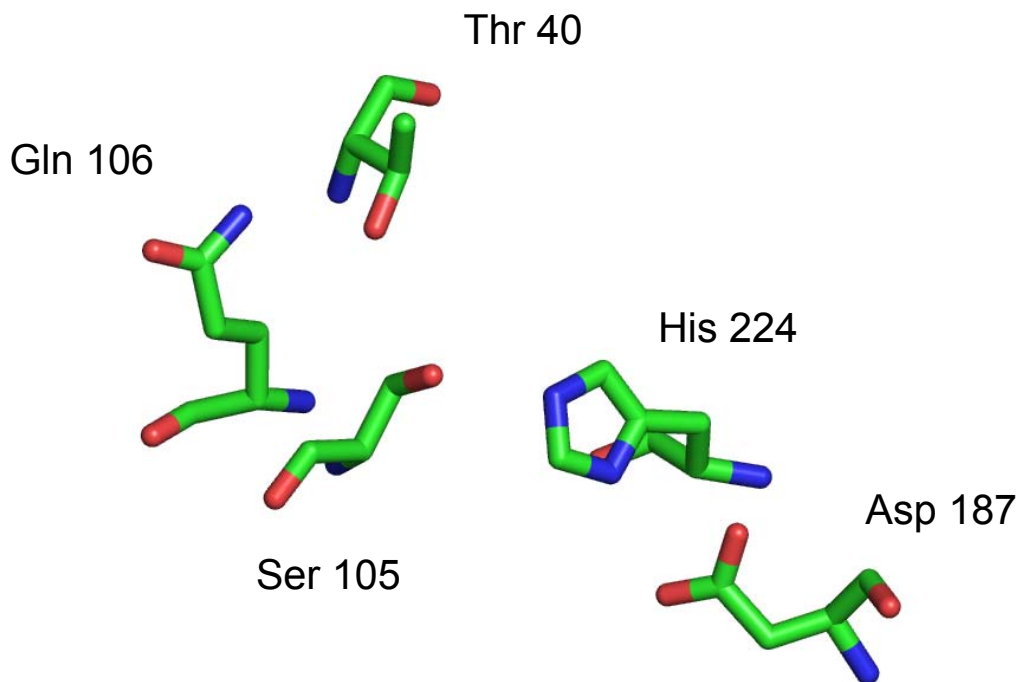


Abbildung 3 Anordnung der katalytischen Triade in CALB mit Ser105, His224, Asp187 und dem *oxyanion hole* aus Gln106 und Thr40.

Die Position der katalytischen aziden Aminosäure Asp/Glu befindet sich im Prototypen des α/β -Hydrolase *fold* nach dem siebten β -Faltblatt [17] und ist in der dreidimensionalen Struktur so ausgerichtet, dass eine Wasserstoff-Brückenbindung zum katalytischen His ausgebildet und Elektronendichte abgezogen werden kann. Die topologische Position der aziden Aminosäure ist jedoch variabel. Die letzte der drei Aminosäuren, das aktive His, der katalytischen Triade befindet sich in einem *loop* nach dem achten β -Faltblatt, wobei Länge und Konformation des *loops* variabel ist.

Das katalytisch bedeutende *oxyanion hole* wird von den Amid-Gruppen zweier Aminosäuren des Protein *backbone* gebildet. Eine dieser beiden Aminosäuren befindet sich in der Sequenz direkt hinter dem katalytischen Ser, die Position der zweiten Aminosäure befindet sich am Ende des dritten β -Faltblatts [20]. Diese dienen zur Stabilisierung der im Mechanismus der Katalyse gebildeten ionischen Zwischenstufen des ersten und zweiten tetrahedralen Intermediats (Abbildung 4). Die zusätzlichen Helices spielen häufig eine Rolle bei der Bindung des

Substrates. Die katalytische Säure ist in einem *loop* nach dem β -Faltblatt 7 lokalisiert. Die Stabilisierung der Säureseitenkette durch Wasserstoffbrücken variiert abhängig davon, ob es sich um ein Asp oder ein Glu handelt [17] [21]. In beiden Fällen nimmt ein Sauerstoffatom der Carboxylgruppe eine ähnliche Position ein und bildet eine Wasserstoffbrücke zu einem Stickstoffatom des Imidazolrings des His aus. Das katalytische His befindet sich in einem *loop* nach dem β -Faltblatt 8. Die Länge und Konformation dieses *loops* ist variabel. Das katalytische Nukleophil kann ein Ser, Asp oder Cys sein und Gly an den Positionen Nukleophil-2 und Nukleophil+2 kann durch andere, kleine Aminosäuren wie Alanin oder Serin ausgetauscht werden [22].

3.2.1.3 Der nucleophilic elbow

Das katalytische Nukleophil befindet sich in dem hoch konservierten Motiv GX SXG (S = Nukleophil). Dieses häufig als Konsensus-Sequenz beschriebene Motiv ist jedoch nicht in allen α/β -Hydrolasen vollständig erhalten [17]. Das konservierte Motiv GX SXG bildet stets einen exponierten *loop* zwischen β -Faltblatt 5 und α -Helix B, den sogenannten *nucleophilic elbow* (Abbildung 2). Die katalytisch aktiven Aminosäuren sind an C-terminalen Enden der β -Faltblätter lokalisiert. Das Pentapeptid um das katalytische Nukleophil bildet einen engen *loop* und zwingt das Nukleophil zu ungewöhnlichen *backbone* Torsionswinkel ϕ und ψ von -50° und -130° . Dieser *nucleophilic elbow* ist das am besten konservierte Element des α/β -Hydrolase *folds*. Die sterischen Einschränkungen zur Ausbildung der Windung bedingen kleine oder keine Seitenketten an den Positionen Nukleophil-2 und Nukleophil+2 und in den meisten Fällen sind diese Positionen daher durch Gly besetzt. Die Aminosäure an Position Nukleophil+3 muss ebenfalls eine kleine Seitenkette besitzen, um sterische Wechselwirkungen mit β -Faltblatt 4 zu vermeiden.

3.2.1.4 Das oxyanion hole

Eine wichtige Komponente des katalytischen Mechanismus der Hydrolasen ist das *oxyanion hole* [23]. Das *oxyanion hole* (Abbildung 3) der Lipasen besteht aus zwei Aminosäuren die über ihre *backbone* Amidwasserstoffe oder die Hydroxylgruppe einer Seitenkette das Substrat in seinem Übergangszustand, das

eine partiell negative Ladung trägt, stabilisieren [23]. Eine Aminosäure befindet sich im strukturell konservierten *nucleophilic elbow* und folgt direkt dem katalytisch aktiven Nukleophil. Daraus ergibt sich die Konsequenz, dass die Orientierung der *backbone* Amidbindung dieser Aminosäure in allen Lipasen identisch ist. Im Gegensatz dazu befindet sich die weitere *oxyanion hole* bildende Aminosäure in einem *loop* nach dem β -Faltblatt 3, der weder in der Sequenz noch in der Struktur konserviert ist. In Serin-Proteasen liegt dieses *oxyanion hole* auch im substratfreien Zustand in einer funktionellen Form vor, dies ist für viele Lipasen nicht der Fall. Für die meisten Lipasen ist zumindest eine der beiden *oxyanion hole* bildenden Aminosäuren auf einem der während der Aktivierung beweglichen *loop* lokalisiert. Dies führt dazu, dass sich das *oxyanion hole* der Lipasen nur in der offenen Form in einem funktionellen Zustand befindet.

Bei Serin-Hydrolasen können anhand der Proteinsequenz um das *oxyanion hole* zwei Klassen unterschieden werden. Im GX-Typ geht der Aminosäure des *oxyanion hole* immer ein Gly voraus, wobei X die Aminosäure des *oxyanion hole* darstellt. Die in dieser Arbeit untersuchten Lipasen BCL und CALB gehören beide zum GX-Typ. Im GGGX-Typ ist die *oxyanion hole* bildende Aminosäure im Vergleich zum GX-Typ um eine Position zum C-Terminus verschoben und wird durch ein Gly oder Ala gebildet. Dieser Aminosäure folgt eine konservierte hydrophobe Aminosäure X. Für die GX-Klasse wurde gezeigt, dass die Stabilisierung des *loops*, der die *oxyanion hole* bildende Aminosäure X trägt, über das Ankerkonzept bewerkstelligt wird [24]. Das Ankerkonzept beschreibt die Interaktion der Seitenkette der Aminosäure X mit mindestens einer Aminosäure, die als Anker bezeichnet wird. Diese Interaktion führt zur Fixierung der Aminosäure im *oxyanion hole* und zur aktiven Orientierung des Amids des *backbone*, das den Übergangszustand des Substrats stabilisiert. Bei BCL und CALB ist der Anker im Bereich zwischen dem β -Faltblatt 6 und der α -Helix D lokalisiert (Abbildung 2).

3.2.2 Grenzflächenaktivierung von Lipasen

Ein besonderes Merkmal der meisten Lipasen ist die Grenzflächenaktivierung an einer Lipidschicht oder in organischem Lösungsmittel. 1958 wurde bereits die lipolytische Aktivität der Lipasen untersucht und das Phänomen der so genannten Grenzflächenaktivierung beschrieben [25]. Dieses Phänomen beschreibt die Tatsache, dass die Aktivität einer Lipase in Gegenwart von Lipiden gesteigert wird. Es wurde postuliert, dass Lipasen durch die Adsorption an der Wasser-Lipid Grenzfläche aktiviert werden und dass diese Aktivierung mit einer Konformationsänderung des Enzyms in Verbindung steht [25] [26]. Lipasen zeigen sehr geringe Aktivität gegenüber einem in Wasser gelösten Substrat. Mit dem Anstieg der Substratkonzentration über dessen Löslichkeitsgrenze oder einer Hydrophoben Grenzschicht steigt die hydrolytische Aktivität jedoch rapide an. Durch die Bindung an eine hydrophobe Grenzschicht werden Lipasen katalytisch aktiv. Der Mechanismus der Grenzflächenaktivierung ist noch immer nicht vollständig geklärt, es wurde eine Konformationsänderung vorgeschlagen die für die Erhöhung der Aktivität an einer hydrophoben Grenzfläche verantwortlich ist [26] [27].

Eine strukturelle Besonderheit der meisten Lipasen ist eine Schleife an der Oberfläche des Proteins, ein *lid* genannter Deckel [28]. Die Grenzflächenaktivierung an der hydrophoben Grenzschicht ist verbunden mit einem Konformationsübergang des *lids* von der geschlossenen zur offenen Konformation (Abbildung 6). In der nicht aktiven, geschlossenen Form der Lipase blockiert das *lid* aus α -Helices den Zugang zur Substratbindestelle, dem katalytischen Zentrum der Lipase [28]. Bei Kontakt an eine hydrophobe Grenzfläche wird das *lid* durch eine Konformationsänderung der Lipase geöffnet und erlaubt dem Substrat den Zugang zum aktiven Zentrum. Wie Röntgenstrukturanalysen zeigten, scheint in Gegenwart einer Grenzfläche dieser Deckel im Zuge einer Konformationsänderung tatsächlich aufzuklappen und dem Substrat damit den Zugang zum aktiven Zentrum zu ermöglichen [29], erst beim Öffnen dieses Deckels entsteht eine große hydrophobe Fläche [30]. Die Proteinoberfläche der geschlossen Form der Lipasen ist wie für wasserlösliche Protein typisch überwiegend hydrophil. Die Konformationsänderung ändert auch die Eigenschaften der Oberfläche und exponiert einen hydrophoben *patch* [31]. Das Innere des *lids* ist hydrophob um die Anlagerung der Lipase an eine

hydrophobe Grenzschicht zu ermöglichen, das äußere des *lids* ist hydrophil. In wässriger Lösung ist die Öffnung des *lids* wegen des großen hydrophoben *patches* thermodynamisch nicht begünstigt. Bei Anwesenheit einer hydrophoben Grenzfläche kann die offene Konformation durch den hydrophoben *patch* stabilisiert werden. Diese Eigenschaften wurden für viele Lipasen beobachtet [28] [29] [32] [13] [33] [30] [34], allerdings gibt es auch Lipasen die keine Grenzflächenaktivierung zeigen, so zeigen weder die Lipase B aus *Candida antarctica* noch eine Lipase aus *Chromobacterium viscosum* eine Grenzflächenaktivierung [35] [36] [37] [38].

In der Lipase aus *Candida rugosa* besteht das *lid* aus einer einzelnen α -Helix aus 11 Aminosäuren. Es sind jedoch andere Beispiele bekannt, in denen zwei α -Helices das *lid* bilden [39] [33] [32]. Im Vergleich der Kristallstrukturen der offenen und geschlossenen Form von *Rhizomucor miehei* Lipase (RML) ist der Kern der beiden Konformationen identisch, die Strukturen unterscheiden sich lediglich in der Lage des *lids* [30]. Ein ähnlicher Mechanismus der Aktivierung wurde für RML [29], *Human pancreatic* Lipase [31] und *Candida rugosa* Lipase (CRL) [40] [32] abgeleitet.

3.2.2.1 Simulationen der Grenzflächenaktivierung

MD Simulationen wurden bereits zur Untersuchung der Aktivierung von Lipasen eingesetzt [41] [42] [43] [44]. MD Simulationen können Einblick in den Vorgang der Grenzflächenaktivierung geben, der Zeitrahmen dieser Bewegung wurde in früheren MD Simulationen von Lipasen allerdings nicht erreicht. Deshalb wurden Methoden wie *Essential Dynamics* [45], *Normal Mode Analysis* [46] und *Brownian Dynamics* (BD) Simulationen verwendet, in denen eine geringe Öffnung des *lids* beobachtet wurde. Kurze MD Simulationen der offenen Konformation von BCL in Wasser und im Vakuum [47] zeigten keine eindeutige Bewegung des *lids* und ein ähnliches Verhalten in Wasser und im Vakuum. Untersuchungen der Dynamik von BCL zeigten eine hohe Flexibilität des β -*hairpin loop* (AS 213-229) und des *lids* (AS 117-151) [47], aber im Zeitrahmen dieser Simulationen war die vollständige Bewegung des *lids* nicht zugänglich.

Der Vorgang des Konformationsübergangs von BCL wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Trotz der bekannten Struktur der offenen und geschlossenen Konformation vieler Lipasen ist der Mechanismus der Aktivierung und der damit

verbundenen Öffnung des *lids* nicht bekannt und eine vollständige Beschreibung fehlt noch immer. Der Vorgang der *lid*-Öffnung ist im Experiment bisher nicht zugänglich, kann aber in MD Simulationen untersucht werden. Die offene und geschlossene Konformation von Lipasen kann durch Röntgenbeugung aufgeklärt werden, Übergangszustände konnten bisher aber noch nicht erhalten werden [42]. Verschiedene Mechanismen der Aktivierung von Lipasen wurden bisher vorgeschlagen. Die „*substrate theory*“ führt die Öffnung des *lids* auf die Anwesenheit eines Substrats [48] [49], die „*enzyme theory*“ führt die Öffnung des *lids* auf die Anwesenheit einer hydrophoben Grenzschicht zurück [34]. Das Verhalten von BCL in verschiedenen Lösungsmitteln wurde durch MD Simulationen der offenen und geschlossenen Konformation in Wasser und Toluol untersucht. Es sollten Erkenntnisse über die Grenzflächenaktivierung und die damit verbundene Bewegung des *lids* und des *β -hairpin loops* gewonnen werden. Der Vorteil dieser Simulationen gegenüber vielen bisherigen Simulationen liegt in dem Einsatz von expliziten Lösungsmittelmodellen, da ein atomares Modell der Lösungsmittel in MD Simulationen besser mit den aus der Röntgenbeugung erhaltenen Daten übereinstimmt [50]. Die Simulationen wurden ohne die Verwendung von *restraints* oder der Anwendung von äußeren Kräften (*steered dynamics*) durchgeführt. Der Konformationsraum wurde durch die zeitliche Verlängerung der Simulationen [51] und durch multiple Simulationen des gleichen Systems genauer untersucht [52] [53]. Nach unserer Kenntnis sind dies die ersten MD Simulationen die eine nahezu vollständige Öffnung des *lids*, von der geschlossenen zur geöffneten Konformation, in explizitem organischem Lösungsmittel, ohne die Verwendung von *restraints*, zeigen.

3.2.3 Der Katalyse-Mechanismus der Veresterung

Der Mechanismus der durch Lipasen katalysierten Veresterungen ist mit dem der Serin-Proteasen vergleichbar [54] (Abbildung 4). Das Substrat gelangt ins katalytische Zentrum der Lipase und wird am Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe nukleophil durch das Seitenketten-Sauerstoffatom des katalytischen Serins angegriffen. Das Histidin abstrahiert ein Proton des Serins, dadurch steigt die Nukleophilie des Serins. Das Serin kann nun an den Kohlenstoff der Carbonylgruppe einer Carbonsäure angreifen, die bereits in der Bindungstasche über Van-der-Waals Wechselwirkungen gebunden ist. Das Substrat gelangt ins katalytische Zentrum der Lipase und wird am Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe nukleophil durch das Seitenketten-Sauerstoffatom des katalytischen Serins angegriffen (a). Das entstehende Oxyanion der ersten tetrahedralen Zwischenstufe (b) wird durch *backbone* Atome der beiden Aminosäuren stabilisiert, die das *oxyanion hole* bilden. Es bildet sich eine tetrahedrale Übergangsstufe aus der sich im zweiten Schritt durch Austritt eines Wassermoleküls ein Acyl-Enzymkomplex bilden kann. Der Zusammenbruch dieses Intermediates führt zur Abspaltung von Wasser aus der Bindungstasche (c), der Acylrest verbleibt am katalytischen Serin. Im Hydrolyseschritt greift nun der Alkohol als Nukleophil das Acylenzym, unter Ausbildung des zweiten tetrahedralen Intermediates (d), an. Dieser wird nun durch einen Alkohol, wiederum über eine tetrahedrale Stufe, in den Ester und das wieder freie Enzym gespalten (e). Zur Stabilisierung der tetrahedralen Übergangszustände tragen zwei Aminosäuren bei, die über Wasserstoffbrücken den partiell negativ geladenen Sauerstoff der Carboxylgruppe des Substratesters fixieren. Diese Wasserstoffbrücken gehen von den Amidprotonen zweier Aminosäuren aus, von denen eine sich in Nachbarschaft zum aktiven Serin und die andere sich auf einer der katalytischen Triade gegenüberliegenden Schleife des Enzyms befindet. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist der Zerfall des ersten tetrahedralen Intermediates (b) [55].

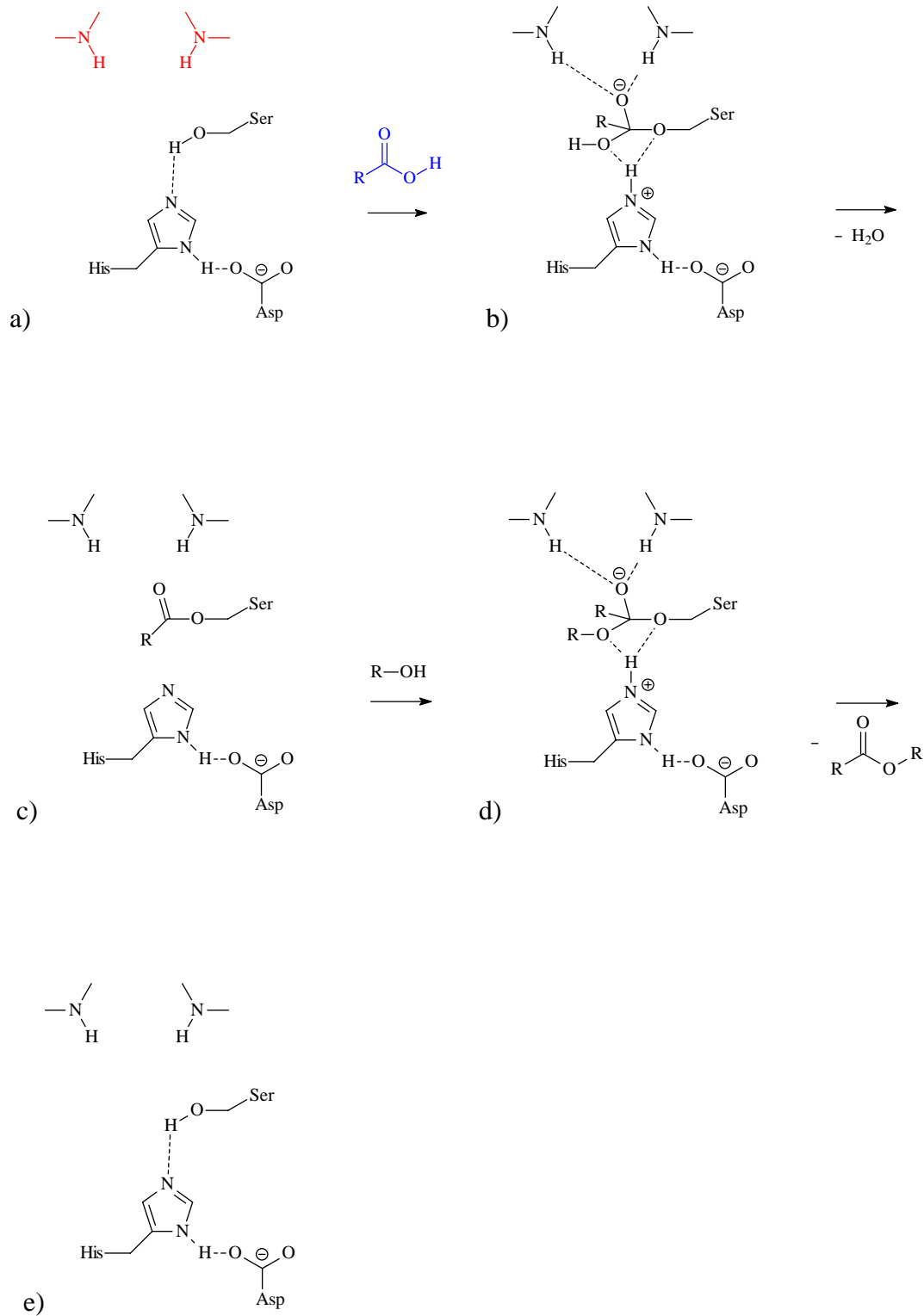


Abbildung 4 Der Mechanismus der Lipase katalysierten Veresterung:

a) Nukleophiler Angriff des Seitenketten-Sauerstoffs des aktivierten Serins auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrats (blau). Das katalytische Histidin überträgt ein Proton auf den abzuspaltenden OH-funktionalisierten Teil des Substrats. b) im verbleibenden Acylenzym ist die Säureseite über das Seitenketten-Sauerstoffatom des aktiven Serins verestert. Nukleophiler Angriff des Seitenketten-Sauerstoffs des aktivierten Serins auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrats. Das Oxyanion im ersten tetrahedralen Intermediat wird durch mindestens zwei Amid-Gruppen des Protein-

Rückgrats stabilisiert (rot). d) Ein aktivierter Alkohol greift das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Acylenzyms an. Das gebildete Oxyanion des zweiten tetrahedralen Intermediates wird analog zu b) stabilisiert. Das katalytische Histidin überträgt ein Proton zum Seitenketten-Sauerstoff des Serins und die Esterbindung zwischen Serin und Säureseite wird gebrochen. e) Die freie Carbonsäure verlässt das Enzym und regeneriert die Lipase.

3.2.4 Molekulare Grundlagen der Enantioselektivität

Bereits 1848 entdeckte Pasteur die optische Isomerie von Weinsäurekristallen und begründete so das Phänomen der Chiralität [56]. Während die Synthese von enantiomerenreinen Produkten durch chemische Trennung der racemischen Ausgangssubstanzen oft schwierig ist, zeigen Enzyme häufig die Eigenschaft, zwischen den Enantiomeren einer chiralen Verbindung unterscheiden zu können. Da sämtliche Enzyme aus L-Aminosäuren aufgebaut sind, bieten Enzyme generell eine homochirale Umgebung. Betrachtet man nun die Stereoisomere eines chiralen Substrats getrennt voneinander, so können sich die energetischen Eigenschaften der entstehenden Substrat-Enzymkomplexe durch die unterschiedlichen Wechselwirkungen des Enzyms mit den beiden enantiomerenreinen Substratisomeren unterscheiden. Der Unterschied in der freien Aktivierungsenergie, die zur Ausbildung der Enzym-Substrat Komplexe aufgebracht werden muss bestimmt den Grad der Enantioselektivität des Enzyms. Lipasen sind äußerst effiziente und hochselektive chirale Katalysatoren. Die Enantioselektivität kann durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei die Art des verwendeten Lösungsmittels, die Diffusionsraten an den Grenzschichten, die Wasseraktivität, die Temperatur, der Druck und die daraus resultierende Flexibilität des Enzyms. Zur qualitativen Bestimmung der Enantioselektivität von Lipasen gegenüber Alkoholen wurde ein empirisches Konzept erstellt [57] [58]. Die nahezu unveränderte Struktur, insbesondere des aktiven Zentrums, der Lipasen führt dazu, dass nur die Größenverhältnisse der Reste am Alkohol die Stereopräferenz verursachen.

3.2.4.1 Primäre Alkohole

Die Enantioselektivität von Lipasen gegenüber primären Alkoholen ist im Allgemeinen geringer als gegenüber sekundären Alkoholen. Für primäre Alkohole lässt sich die experimentell zu erwartende Stereopräferenz mittels einer empirischen Regel vorhersagen [59].

3.2.4.2 Sekundäre Alkohole

Die Umsetzung von sekundären Alkoholen zeigt im Allgemeinen eine höhere Enantioselektivität als die Umsetzung mit primären Alkoholen. Es konnte belegt werden, dass die Unterscheidung zwischen den Enantiomeren durch Lipasen zum großen Teil auf dem relativen Größenunterschied der beiden Substituenten basiert [58] [60]. Das Substrat gibt jedoch keine Information über die experimentell zu erwartende Stereoselektivität. Die Stereoselektivität basiert auf spezifischen Wechselwirkungen des Substrats mit der Lipase und geringen Konformationsänderungen in der Protein-Struktur [58]. Das schnell umgesetzte Enantiomer des sekundären Alkohols kann durch die Regel von Kazlauskas vorhergesagt werden [57] (Abbildung 5). Die Regel sagt allgemein das R-Enantiomer als das schnell umgesetzte Enantiomer voraus. Dieses empirische Gesetz wurde für CALB auf molekularer Ebene erklärt [61] [62].

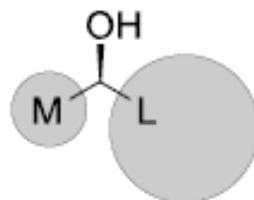


Abbildung 5 Empirische Regel zur Vorhersage der Stereopräferenz in durch Lipasen katalysierten Umsetzungen chiraler sekundärer Alkohole: *M* – mittlerer Substituent; *L* – großer Substituent. Der Ester des dargestellten Enantiomers reagiert schneller in durch Lipasen katalysierten Hydrolysen.

3.2.5 Verwendete Lipasen

3.2.5.1 Burkholderia cepacia Lipase

Burkholderia cepacia Lipase (BCL), früher *Pseudomonas cepacia* Lipase genannt, ist ein selektiver Katalysator für stereoselektive Reaktionen gegenüber einem breiten Spektrum von Substraten [63] für die kinetische Umsetzung racemischer Gemische von sekundären Alkoholen in der Hydrolyse in Wasser und der Veresterung in organischen Lösungsmitteln [3]. Die Kristallstruktur von BCL wurde ohne gebundenen Inhibitor in der geöffneten Konformation bestimmt [33], in der das aktive Zentrum für Substrate zugänglich ist. BCL ist den homologen Lipasen aus *Burkholderia glumae* (BGL) und *Chromobacterium viscosum* (CVL), die in der geschlossenen Konformation kristallisiert wurden, strukturell sehr ähnlich. BCL ist eine Serin-Hydrolase mit einer katalytischen Triade aus Ser, His und Asp [33] und hat das innerhalb der Familie der Lipasen konservierte GX SXG Motiv [33].

BCL zeigt eine Grenzflächenaktivierung in einer hydrophoben Umgebung die eine große Bewegung des *lids* umfasst [33], wobei der Zugang zum aktiven Zentrum durch die Konformationsänderung ermöglicht wird. In allen bekannten Kristallstrukturen liegt BCL in der geöffneten Konformation vor (Abbildung 6), eine hydrophobe Oberfläche wird durch die Bewegung des *lids* während der Grenzflächenaktivierung freigelegt. Die Aminosäuren 18-29 und 219-222 sind in allen bekannten Kristallstrukturen nur schlecht aufgelöst. BCL enthält ein gebundenes Calcium-Ion das in der Calcium-Bindetasche oktaedrisch durch fünf Sauerstoffatome, die Carbonyl-Sauerstoffatome von Gln292 und Val296, Sauerstoffatome der Seitenketten von Ser244, Asp242 und Asp288 und einem Wassermolekül, koordiniert ist [64]. Das Calcium-Ion hat auf die Struktur von BCL einen stabilisierenden Effekt [65] und ist notwendig zur katalytischen Aktivität von BCL [66]. Das *lid* besteht aus den Helices α_4 (AS 117-127) und α_5 (AS 134-151) [33] und liegt in der Kristallstruktur in der offenen Konformation vor. Bei der Grenzflächenaktivierung werden die Sekundärstrukturelemente des *lids* durch eine Bewegung umgelagert, durch die das aktive Zentrum zugänglich wird. Das zentrale β -Faltblatt im Kern stimmt mit den Faltblättern β_3 - β_8 des α/β -Hydrolase *fold* überein [17].

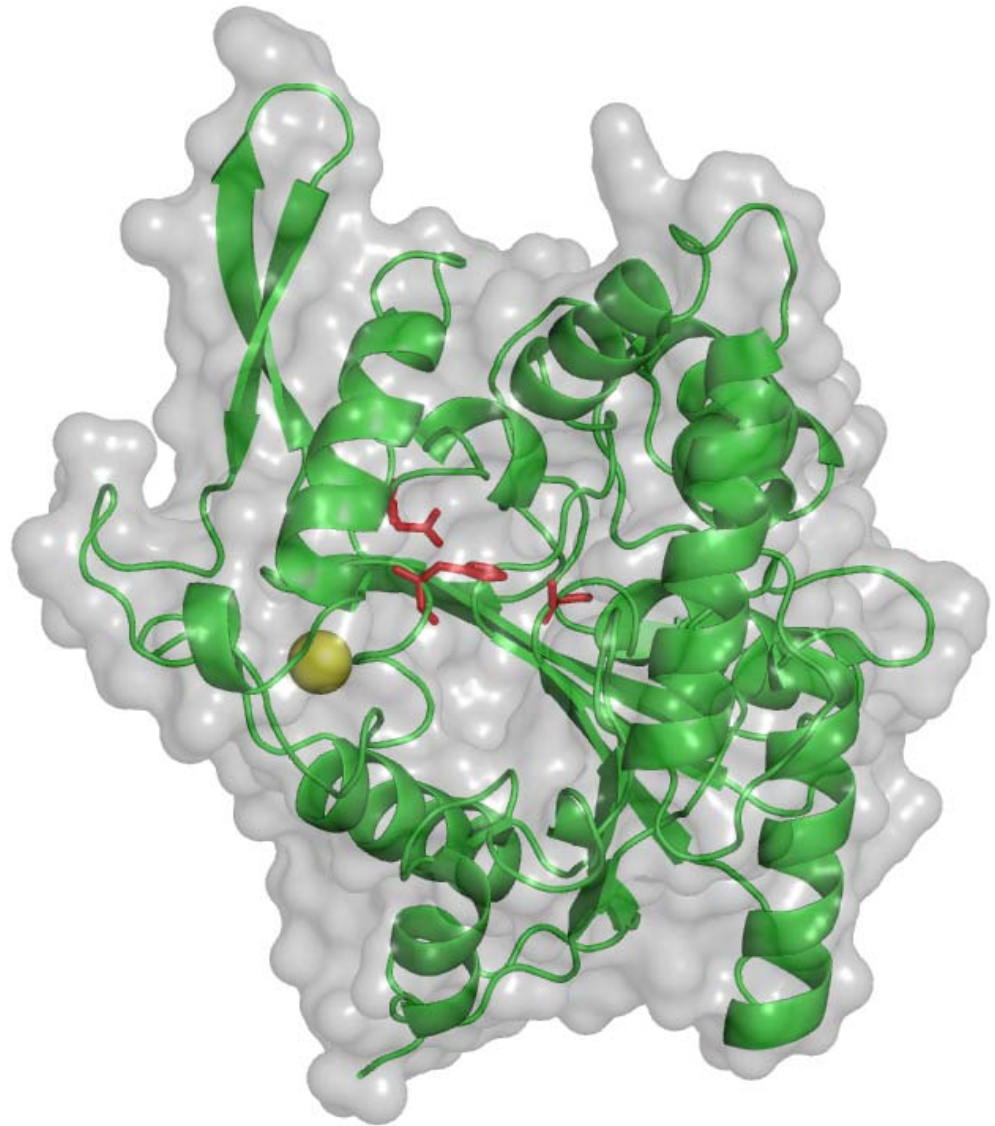


Abbildung 6 Struktur der *Pseudomonas cepacia* Lipase. Sekundärstrukturelemente sind grün, die katalytische Triade ist rot und das Calcium-Ion ist gelb gefärbt.

3.2.5.2 *Candida antarctica* Lipase B

Candida antarctica Lipase B (CALB) (EC 3.1.1.3) ist innerhalb der Lipasen die wichtigste Lipase für industrielle Anwendungen in der organischen Synthese in Wasser und in organischen Lösungsmitteln [67]. CALB gehört zur Familie der Serin-Hydrolasen mit einem α/β -Hydrolase *fold* und einer katalytischen Triade bestehend aus Ser105, His224 und Asp187 [12], das *oxyanion hole* wird in CALB durch Gly106 und Thr40 gebildet (Abbildung 3). CALB besteht aus 317 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 33 kDa. Die kristallographische

Strukturaufklärung von CALB offenbarte einige ungewöhnliche Charakteristika dieses Enzyms [68]. Der Enzymkern wird aus sieben parallelen β -Faltblättern gebildet, die von zehn α -Helices und zwei kleinen β -Faltblättern umgeben sind (Abbildung 7). In CALB ist das sonst in Lipasen konservierte GX SXG-Motiv [17] verändert zu TX SXG. Durch die in CALB vorhandene Sequenz TX SXG ist die Schleife des *nucleophilic elbow* weniger stark gebogen als bei anderen Lipasen [10]. Helices α 9 und α 10 bilden in CALB ein großes Strukturelement, das direkt über der Substratbindetasche positioniert ist und den Raum zur Bindung des Substrats erheblich einengt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Lipasen hat CALB kein *lid* das den Eingang zum aktiven Zentrum verschließt und keinen hydrophoben *patch* an der Oberfläche [12]. CALB zeigt im Vergleich zu den meisten Lipasen keine Grenzflächenaktivierung [38].

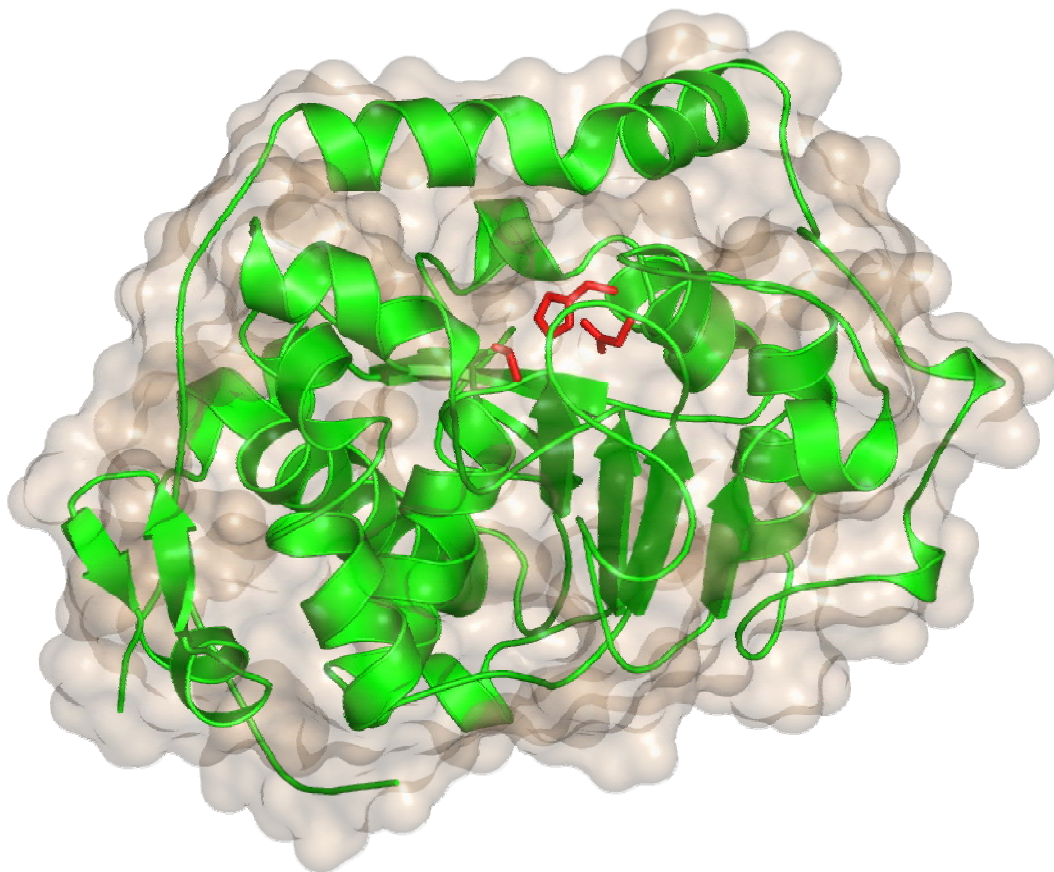


Abbildung 7 Struktur der *Candida antarctica* Lipase B. Sekundärstrukturelemente sind grün und die katalytische Triade ist rot gefärbt.

CALB ist ein nützliches Enzym mit hoher Enantioselektivität in der Hydrolyse in Wasser und der Veresterung in organischen Lösungsmitteln [67]. CALB akzeptiert ein breites Spektrum an Substraten [69] und ist stabil in organischem Lösungsmittel ohne erkennbaren Verlust von Aktivität. CALB kann Reaktionen bei höheren Temperaturen katalysieren [67] [70] [62] und wird deshalb oft industriell angewendet. Die hohe Enantioselektivität in der Hydrolyse in Wasser und der Veresterung im organischen Lösungsmittel machen CALB zu einem idealen Katalysator in der chemischen Umsetzung [71] [72] [67] [73].

3.2.5.3 Enantioselektivität von CALB

In kristallographischen Untersuchungen wurden Inhibitor-Lipase-Komplexe, analog zum ersten tetrahedralen Intermediat der Hydrolyse, untersucht. Diese Strukturen und der Mechanismus der durch Lipasen katalysierten Veresterung ermöglichten erstmals einen Einblick in die molekularen Grundlagen der Stereopräferenz. Die beobachtete Stereopräferenz wurde auf eine Wasserstoff-Brückenbindung des Protons am katalytischen Histidin (N_ϵ des Imidazolrings) zum Alkohol-Sauerstoffatom des Substrats zurückgeführt [16]. Diese Wasserstoff-Brücke ist im Komplex des schnell umgesetzten Enantiomers gut ausgebildet, wogegen sie im langsam umgesetzten Enantiomer nicht ausgebildet werden kann. Da diese Wasserstoff-Brückenbindung entscheidend am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion beteiligt ist, wurde die experimentell beobachtete Stereopräferenz auf die unterschiedliche Fähigkeit der Enantiomere zur Ausbildung dieser Wechselwirkung zurückgeführt. Das nukleophile Serin der katalytischen Triade bildet die kovalente Bindung zum Substrat aus und fixiert das Molekül in der Bindungstasche. Die beiden Aminosäuren des *oxyanion hole* stabilisieren das durch den nukleophilen Angriff entstehende Oxyanion des Carboxyl-Sauerstoffs mittels Wasserstoff-Brückenbindungen und geben hiermit die Orientierung des Substrats in der Bindestelle vor. Die Struktur von CALB legt hierbei die relative Konfiguration durch die Substituentengröße der Enantiomere fest. Beide Enantiomere werden umgesetzt, wenn auch mit unterschiedlichen Reaktionsraten. Beide Enantiomere müssen somit in einer produktiven, d.h. in einer katalytisch effizienten Konformation im katalytischen Zentrum der Lipase gebunden werden können.

Die Anordnung der Substrate die zur katalytischen Umsetzung führt wird als produktiver Bindungsmodus bezeichnet. Der produktive Bindungsmodus ist charakterisiert durch einen kurzen Abstand zwischen dem Wasserstoffatom H_N des katalytischen Histidins und dem Alkohol-Sauerstoffatom O_{Alkohol} des Substrats. Die Länge dieses Abstandes ist ein Maß für die Fähigkeit zur Ausbildung der katalytisch notwendigen Wasserstoff-Brückenbindung zwischen H_N und O_{Alkohol} . Die Umsetzung beider Enantiomere erfolgt ausschließlich aus diesem produktiven Bindungsmodus heraus. Die Enantioselektivität von CALB bei sekundären Alkoholen folgt weitgehend der von Kazlauskas *et al.* aufgestellten Regel [57].

Die hohe Enantioselektivität von CALB gegenüber sekundären Alkoholen wird durch die räumliche Beschaffenheit des aktiven Zentrums und verschiedene Bindungsweisen für die Enantiomere in der stereospezifischen Bindetasche erklärt. Das aktive Zentrum besteht aus einer kleinen Tasche, der so genannten stereospezifischen Bindetasche *hydrophobic dent* (AS Gly39, Thr42, Ser47, Trp104 und Ala225), für den mittleren Rest des sekundären Alkohols [68] [74] [71] und aus einer größeren Tasche *hydrophilic trench* (AS Leu140, Ala141, Leu144, Val154, Glu188, Ile189, Leu278, Ala281, Ile285 und Val286) [75], für den großen Rest des sekundären Alkohols, in der der sekundäre Alkohol jeweils einen Substituenten während der Katalyse orientieren muss (Abbildung 8). Die Säureseite des Esters bindet in einem sogenannten *hydrophobic crevice* Acylbindetasche (AS Thr40, Gln106, Asp134, Thr138, Gln157 und Val190).

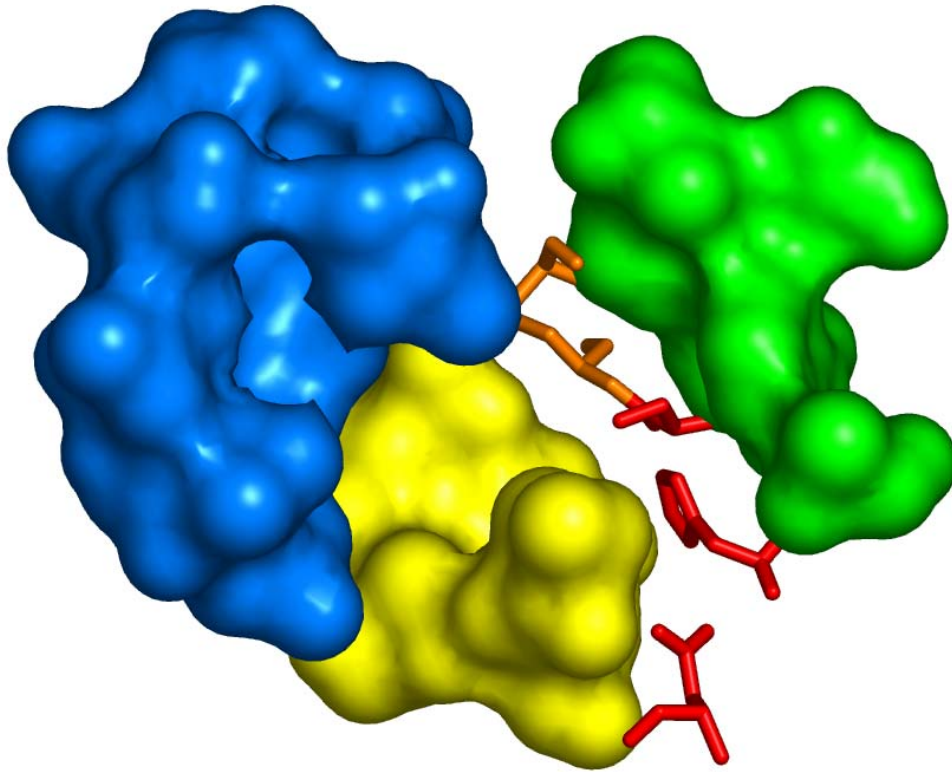


Abbildung 8 Übersicht der Bindetaschen in CALB. Die Bindetasche für den großen Rest des sekundären Alkohols *hydrophilic trench* ist blau, für den mittleren Rest des sekundären Alkohols *hydrophobic dent* ist grün und für die Säurebindetasche *hydrophobic crevice* ist gelb gefärbt. Die katalytische Triade (rot) und das *oxyanion hole* (orange).

Die Erklärung der außergewöhnlichen Stereoselektivität von CALB gegenüber sekundären Alkoholen wurde bereits durch *in silico* Modellierung von CALB untersucht [76] [10] [77] [78] [71], darunter waren auch Mutanten die erhöhte Aktivität und Thermostabilität zeigten [8] [79].

Der produktive Bindungsmodus

Im produktiven Bindungsmodus muss der Alkoholrest des langsam umgesetzten Enantiomers die entgegengesetzte Orientierung einnehmen wie der Alkoholrest im schnell umgesetzten Enantiomer. Das schnell umgesetzte Enantiomer des sekundären Alkohols orientiert seinen großen Substituenten entgegen dem Eingang zum aktiven Zentrum und seinem mittelgroßen Substituenten in der kleinen stereospezifischen Bindetasche am aktiven Zentrum (Abbildung 9). Das langsam umgesetzte Enantiomer orientiert seinen großen Substituenten in der stereospezifischen Bindetasche und den mittelgroßen Substituenten in Richtung des Eingangs des aktiven Zentrums [78] [71]. Der große Substituent kann räumlich nicht ohne sterische Hinderung in der stereospezifischen Bindetasche in dieser Bindungsweise untergebracht werden. Dies ist aber die einzige Konformation in der das langsam umgesetzte Enantiomer die für die Katalyse nötigen Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Der produktive Bindungsmodus ist charakterisiert durch einen kurzen Abstand zwischen dem Wasserstoffatom H_{NE} des katalytischen Histidins und dem Alkohol-Sauerstoffatom $O_{Alkohol}$ des Substrats. Die Länge dieses Abstandes ist ein Maß für die Fähigkeit zur Ausbildung der katalytisch essentiellen Wasserstoff-Brückenbindung zwischen H_{NE} und $O_{Alkohol}$ (Abbildung 9). Die Umsetzung beider Enantiomere erfolgt ausschließlich aus dem produktiven Bindungsmodus heraus.

Der nicht-produktive Bindungsmodus

Charakteristisch für den nicht-produktiven Bindungsmodus sind ein langer Abstand $d_{(H_{NE}-O_{Alkohol})}$. Die Fähigkeit zur Ausbildung der katalytisch essentiellen Wasserstoff-Brückenbindung ist nur erschwert möglich und verhindert einen effektiven Transfer des Protons im Übergangszustand im geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt. Eine Umsetzung beider Enantiomere aus dem nicht-produktiven Bindungsmodus findet nicht statt.

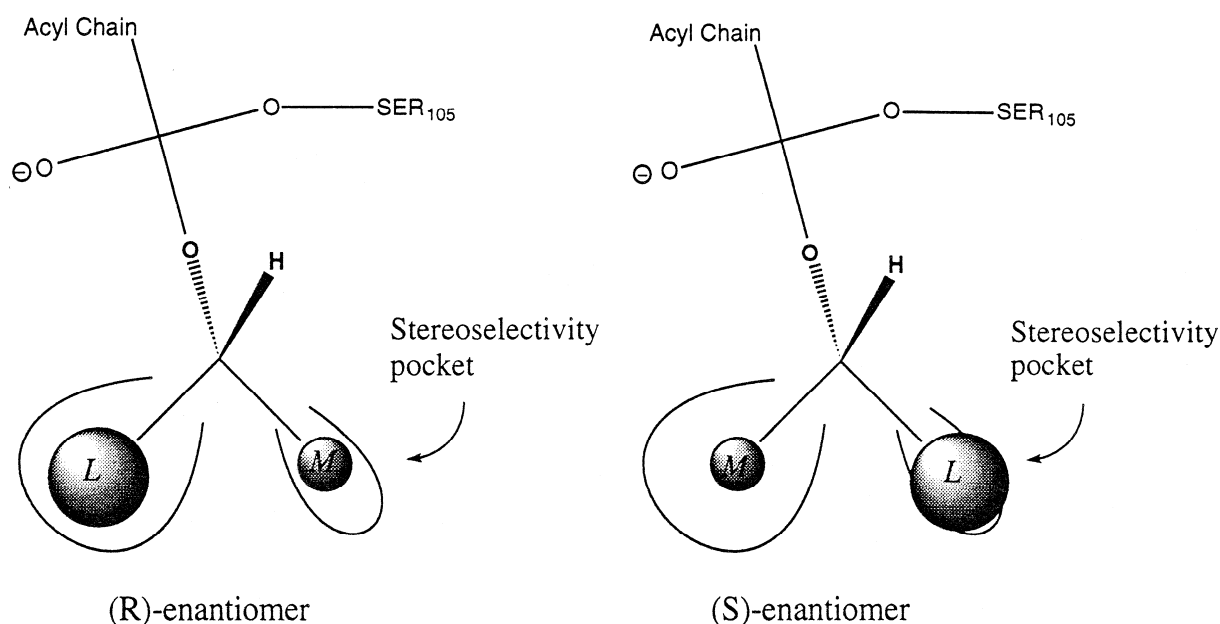


Abbildung 9 Schematische Darstellung der produktiven Bindungsmodi von CALB für die Enantiomere von sekundären Alkoholen [61].

Das schnell umgesetzte Enantiomer ist bevorzugt in einem produktiven und das langsam umgesetzte Enantiomere ist bevorzugt im nicht-produktiven Bindungsmodus im aktiven Zentrum gebunden. Anhand des geometrischen Parameters $d_{(\text{HNE}-\text{OAlkohol})}$ des langsam umgesetzten Enantiomers im produktiven Bindungsmodus kann eine Aussage über die Enantioselektivität getroffen werden. Ein kurzer Abstand, $d_{(\text{HNE}-\text{OAlkohol})} < 2.0 \text{ \AA}$, fördert demnach die Umsetzung langsam umgesetzter Enantiomere und resultiert in schlechten Enantioselektivitäten ($E < 20$) wohingegen ein langer Abstand, $d_{(\text{HNE}-\text{OAlkohol})} > 2.2 \text{ \AA}$, die Umsetzung unterbindet und zu hohen Enantioselektivitäten führt [80]. Punkt-Mutationen des Enzyms, die in den untersuchten tetrahedralen Intermediaten der Varianten zu einer Verkürzung dieses Abstandes führen, sollten experimentell in einer niedrigeren Enantioselektivität resultieren. Der Abstand $d_{(\text{HNE}-\text{OAlkohol})}$ für das schnell umgesetzte Enantiomer bleibt im Vergleich zum Wildtyp-Komplex nahezu unverändert.

3.3 Enzyme in organischen Lösungsmitteln

Bereits vor mehr als hundert Jahren wurde gezeigt, dass Enzyme auch in organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden können [55] [81]. Anfangs wurden mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel, in denen das Enzym gelöst wurde, eingesetzt. Solange ein gewisser Wasseranteil vorhanden war behielten die Enzyme ihre katalytische Aktivität. Das Interesse an Lipasen als Biokatalysatoren nahm in den letzten Jahren zu, da Lipasen auch in organischen Lösungsmitteln Reaktionen effektiv katalysieren können und zunehmend zum Einsatz kommen, während früher ausschließlich in wässrigem Medium gearbeitet wurde [82] [83].

Die Eigenschaften von Enzymen ändern sich stark beim Wechsel des Lösungsmittels [84] und ermöglichen die biotechnologische Synthese vieler Verbindungen und enzymkatalysierte Reaktionen in organischen Lösungsmitteln die in Wasser nicht durchführbar sind, indem das Gleichgewicht verschoben und die Veresterung gegenüber der Hydrolyse begünstigt wird [83]. Sind Substrate in wässrigen Lösungen nicht oder nur schlecht löslich, wird eine Umsetzung durch den Einsatz organischer Lösungsmittel häufig erst möglich. In organischem Lösungsmittel zeigen Lipasen mehrere interessante Eigenschaften. Sie können eine höhere Temperaturstabilität und eine höhere Selektivität oder Aktivität haben [85] [84] [86] [87] [71] [72] [67] [73]. Enzyme sind in organischen Lösungsmitteln weiterhin aktiv, da sie ihre Konformation aus Wasser, durch eine hohe kinetische Barriere beim Übergang von Wasser in organisches Lösungsmittel, weitgehend beibehalten [88]. Enzyme zeigen in organischem Lösungsmittel eine Reihe von Vorteilen, ihre katalytische Aktivität und auch die Enantioselektivität ist in organischen Lösungsmitteln jedoch geringer als in Wasser [89] [90] [91]. Die Eigenschaften eines Lösungsmittels können über verschiedene Parameter beschrieben werden. Eine häufige Anwendung findet hierbei der logP-Wert, der Verteilungskoeffizienten eines Lösungsmittels an einer Oktanol/Wasser-Schicht. Die Aktivität von Enzymen in organischen Lösungsmitteln wurde mit der Hydrophobizität des Lösungsmittels durch den logP korreliert [92] [93] [94] [20] [95] [96], wobei oft die höchste Aktivität bei hohem logP gefunden wurde. Die Ergebnisse der Untersuchungen waren hierbei allerdings widersprüchlich, da die Hydrophobizität des Lösungsmittels nicht immer mit der Aktivität von Enzymen korrelierte [97] und auch die Aktivität in

Lösungsmitteln mit gleichem logP stark unterschiedlich sein konnte [69]. Seit dem ersten Review über Enzyme in organischen Lösungsmitteln [98] gibt es bei der Erklärung der veränderten Eigenschaften nur begrenzten Fortschritt. Die geringere Aktivität in organischen Lösungsmitteln kann eine Konsequenz durch Beschränkungen durch Diffusion oder der geringeren Beweglichkeit und Flexibilität im Enzym sein [91] [99]. Die Gründe für die unterschiedliche Aktivität von Enzymen in organischen Lösungsmitteln sollen auf Grund der widersprüchlichen experimentellen Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit nicht diskutiert werden.

Eine bestimmte Menge an Wasser ist für die Funktion und Aktivität von Lipasen in organischen Lösungsmitteln notwendig [95]. Wasser dient hierbei als Schmierstoff für Proteine in organischem Lösungsmittel [82]. Unter wasserfreien Bedingungen können Proteine die Barriere vom gefalteten zum ungefalteten Zustand nicht überwinden, sie sind sehr starr und durch Wasserstoffbrücken und Salzbrücken kinetisch gehemmt. Dies erklärt auch, weshalb Lipasen in mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln weniger aktiv oder sogar inaktiv sind, weil gebundenes Wasser vom Rückgrat des Enzyms gelöst wird. Flexibilität ist für die katalytische Aktivität notwendig [83] [82] [100] [101]. Ein vollständig wasserfreies Enzym ist nicht katalytisch aktiv, eine geringe Wassermenge gebunden an die Oberfläche der Lipasen erhöht die Flexibilität, die für eine katalytische Aktivität nötig ist [102], Proteine in Mischungen aus Wasser und unpolaren organischen Lösungsmitteln denaturieren [103]. In organischen Lösungen ist die gebundene Wassermenge an der Enzymoberfläche wichtiger als die im Lösungsmittel gelöste Wassermenge. Aus biotechnologischer Sicht gibt es eine Reihe von Vorteilen beim Einsatz von Enzymen in organischen Lösungsmitteln. Neben der Gleichgewichtsverschiebung zur Bevorzugung der Veresterung gegenüber der Hydrolyse und der erhöhten Löslichkeit unpolarer Substrate und Produkte kann die Ausbeute durch leichtere Entfernung der Produkte während der Reaktion erhöht werden. Die Rückgewinnung der Enzyme durch Filtration ist erleichtert und es gibt weniger wasserabhängige Nebenreaktionen. Viele Lipasen zeigen in organischen Lösungsmitteln eine erhöhte Temperaturstabilität.

Kristallstrukturen erlauben allerdings nicht den dynamischen Charakter eines Proteins vorherzusagen [99]. Verschiedene experimentelle Methoden wurden verwendet, um die Dynamik von Enzymen zu untersuchen, dazu zählen NMR

[104], Mößbauer Spektroskopie, Neutronenbeugung [105] und Röntgenbeugung [106]. Die ersten theoretischen Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Verhalten von Proteinen im Kristall, im Vakuum und in wässriger Lösung [50] [107]. Der Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Struktur und die Dynamik von Lipasen wurde erstmals von Hult *et al.* untersucht [41]. In kurzen MD Simulationen von 25 ps war die Struktur in Wasser der Kristallstruktur ähnlicher als der Struktur aus Simulationen im Vakuum. MD Simulationen sind ein nützliches Werkzeug, die Struktur und die Dynamik von Proteinen zu untersuchen. Die meisten Simulationen von Proteinen verwenden ein Wassermolekül als Lösungsmittel. Dies ist verständlich, da die meisten biochemischen Prozesse in wässriger Lösung stattfinden. Organische Lösungsmittel finden jedoch in letzter Zeit immer häufiger als Medium für biochemische Prozesse Anwendung. Verschiedene MD Simulationen wurden bereits durchgeführt, um Einblicke in die Struktur und die Dynamik von Proteinen in organischen Lösungsmitteln zu erhalten [108] [109] [110] [41] [111] [44] [112] [113] [11] [114]. In vielen durchgeführten Simulationen wurde die hydrophobe Umgebung allerdings nicht explizit durch Lösungsmittelmoleküle gebildet sondern durch die Verwendung eines Kontinuum-Modells mit einer bestimmten Dielektrizitätskonstanten [43]. In Simulationen mit expliziten organischen Lösungsmitteln wurden eine rigide Struktur und eine verringerte Flexibilität im Vergleich zu Simulationen in Wasser beobachtet [47] [115] [116] [117] [41] [118]. Obwohl Lipasen bereits in organischen Lösungsmitteln untersucht wurden sind die dynamischen Eigenschaften noch nicht verstanden. Die Dynamik ist jedoch wichtig zum Verständnis der biologischen Funktion von Enzymen [119]. Die Wahl des Lösungsmittels hat einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität und Flexibilität der Lipasen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener polarer und unpolarer Lösungsmittel auf die Dynamik und die Struktur von CALB und auf an der Proteinoberfläche gebundenes Wasser durch MD Simulationen untersucht. Die Lösungsmittel wurden bei der gleichen Wasseraktivität verglichen, um Einflüsse verschiedener Mengen an Wasser auszuschließen. Unterschiedliche Wasseraktivitäten können Einfluss auf die Aktivität [120] [88] oder die Enantioselektivität [83] [71] haben. CALB wurde aus mehreren Gründen für diese Untersuchung ausgewählt. Die molekulare Struktur von CALB wurde bereits gründlich in verschiedenen Kristallstrukturen, unter unterschiedlichen Bedingungen, untersucht [12] [68],

CALB ist stabil und aktiv in organischen Lösungsmitteln und ist eine der wichtigsten Lipasen. Der Vorteil dieser Simulationen zu bisherigen theoretischen Untersuchungen von Lipasen in organischem Lösungsmittel liegt zum einen in der Verwendung expliziter Lösungsmittelmodelle, anstatt eines impliziten Lösungsmittelmodells das durch ein Kontinuum-Modell gegeben wird. Die Berücksichtigung eines atomaren Lösungsmittelmodells verbessert die Übereinstimmung mit der Kristallstruktur [50]. Die Verwendung von expliziten Lösungsmittelmodellen hat im Vergleich zu impliziten Lösungsmittelmodellen viele Vorteile. Wassermoleküle und Wechselwirkungen von Wassermolekülen mit der Proteinoberfläche, die Lage einzelner Wassermoleküle und deren Ausbildung von Wasserstoffbrücken und der Austausch von Wassermolekülen an der Proteinoberfläche werden im Kontinuum-Modell nicht berücksichtigt und können nicht untersucht werden. Zum anderen wurden die Simulationen über 2 ns bei unterschiedlicher Verteilung der Startgeschwindigkeit auf die Atome durchgeführt, um den Konformationsraum zu untersuchen, dabei untersucht jede Trajektorie einen unterschiedlichen Bereich des Konformationsraums.

3.4 Die Theorie molekulardynamischer Methoden

Die schnelle Entwicklung der Rechenleistung und der molekulardynamischen Methoden ermöglicht eine gute Einsicht in das Verständnis von Struktur und Dynamik von Proteinen. Auf Grundlage der durch die Röntgenbeugung bestimmten Strukturen, die in Datenbanken verfügbar sind, kann das Verhalten von Proteinen simuliert werden. Quantenmechanische Berechnungen großer Systeme benötigen mehr Rechenleistung als heute zur Verfügung steht. Anstelle der quantenmechanischen Berechnungen werden deshalb Kraftfeldmethoden eingesetzt, die auf den klassischen mechanischen Gesetzen beruhen. Die Parameter für das Kraftfeld beruhen auf experimentellen Daten und quantenmechanischen Berechnungen. Durch MD Simulationen können Strukturen und dynamische Eigenschaften von Proteinen in unterschiedlicher Umgebung untersucht werden. Die Kraftfelder von Weiner *et al.* [121] und Cornell *et al.* [122] haben sich zur Simulation von Enzymen in organischen Lösungsmitteln als geeignet erwiesen. Die einfache Einbindung von Parametern in die Kraftfelder ist nicht nur für gelöste Enzyme, sondern auch für das Lösungsmittel möglich.

3.4.1 Theoretische Grundlagen

Energieminimierungen beruhen auf iterativen Techniken, die die Atomkoordinaten solange variieren, bis ein lokales Minimum nahe den Startkoordinaten gefunden wird. Informationen über das globale Energieminimum des Systems können hieraus nicht gewonnen werden. Im Gegensatz zur MD Simulation, bei der ein globales Minimum berechnet wird, wird bei der Minimierung ein lokales Minimum berechnet. Minimierungsalgorithmen sind nur in der Lage, die Energie des Systems in jedem Schritt zu minimieren, d.h. Schritte, die zu einer Erhöhung der Energie führen, sind nicht möglich. Die Minimierung kann daher nur zum Auffinden des zur Startstruktur am nächsten gelegenen lokalen Minimums dienen (Abbildung 10).

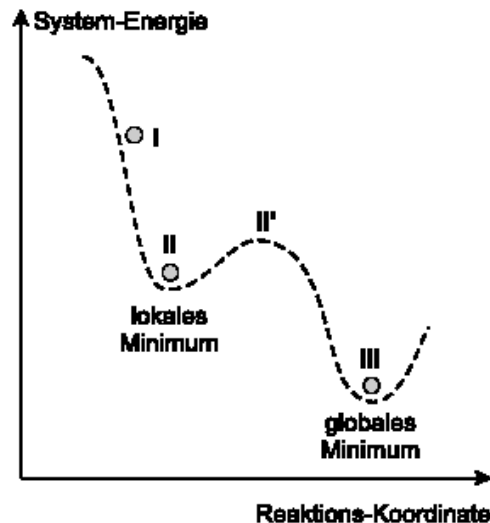


Abbildung 10 Energieminimierungen führen ein System von einem gegebenen Startpunkt (I) aus in das nächstliegende lokale Energieminimum (II). MD Simulationen hingegen können Energiebarrieren überwinden (II') und enden im globalen Energieminimum (III) des Systems.

Molekulardynamische Simulationen basieren auf der sukzessiven Generierung von Konfigurationen eines Vielteilchen-Systems durch Integration der Newtonschen Bewegungsgesetze (Isaac Newton, 1642-1727). Das Ergebnis liefert eine Trajektorie, die die zeitabhängigen Positionen, Geschwindigkeiten und Beschleunigungen aller im System befindlichen Partikel wiedergibt. Die Newtonschen Gesetze lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Galileisches Trägheitsgesetz

Jeder Körper verharrt im Zustand der Ruhe oder der gleichförmigen, geradlinigen Bewegung, solange die Vektorensumme der auf den Körper einwirkenden Kräfte Null ist.

Newtonsches Grundgesetz

In Newtons zweitem Gesetz ist eine Beziehung zwischen Nettokraft und Beschleunigung beschrieben:

$$F = ma \quad (1)$$

Der Impuls p ist definiert als Produkt von Masse m und Geschwindigkeit v und ist demnach gleichwertig mit:

$$F = \frac{dp}{dt} \quad (2)$$

Wechselwirkungsgesetz

Newtons drittes Gesetz fordert zusätzlich die Erhaltung des Impulses. Die Kraft, mit der die Umgebung auf einen Massenpunkt wirkt, entspricht stets einer gleich großen entgegengesetzt gerichteten Kraft, mit der der Massenpunkt zurück wirkt:

$$F_{\text{actio}} = -F_{\text{reactio}}$$

In einem abgeschlossenen System, auf das keinerlei äußere Kräfte einwirken, muss der Impuls daher konstant sein.

Die zeitabhängigen Positionen, die Trajektorie des Systems, ergibt sich aus der Lösung der Differentialgleichung, die aus dem zweiten Newtonschen Gesetz folgt:

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{xi}}{m_i} \quad (3)$$

Die Gleichung beschreibt die Bewegung eines Massepunktes m_i entlang einer Koordinate x_i mit einer Kraft F_{xi} . Die Bewegung eines Teilchens i mit der Masse m_i in der Richtung x_i , wenn entlang dieser Richtung eine Kraft F_{xi} wirkt. Sind diese Wechselwirkungen, sowie die Ausgangsposition der Atome bekannt, lässt sich über die Newtonsche Bewegungsgleichung die Position dieser Atome zu jedem beliebigen Zeitpunkt berechnen.

3.4.2 Kraftfeld (force-field)

Zur genauen Berechnung eines beliebigen Systems muss man auf quantenmechanische Methoden zurückgreifen. Diese sind allerdings für Systeme, die aus mehr als ein paar wenigen Atomen bestehen, in ihrem benötigten Rechenaufwand zu komplex für heutige Rechner. Zur schnellen Auswertung von Proteinsystemen sind selbst semi-empirische Methoden, die quantenmechanische Berechnungen und die Verwendung von empirischen Parametern berücksichtigen, nicht geeignet. Kraftfeld-Methoden vernachlässigen die Elektronenbewegung und die Wechselwirkungen der Elektronen. Die Energie eines Systems wird durch die Position der Atomkerne durch klassische Mechanik mit empirischen Parametern bestimmt. Die Atome eines Proteins oder eines Substrat-Komplexes unterliegen bestimmten Kräften, die sich in Form potentialabhängiger Wechselwirkungen ausdrücken lassen. Atome werden wie Teilchen in der klassischen Mechanik als geladene Massepunkte betrachtet, deshalb ist die Zuweisung von Ladungen eine wichtige Voraussetzung in der Kraftfeld-Methode. Durch die Lösung der Bewegungsgleichungen von Newton für ein molekulares System erhält man Trajektorien aller im System vorhandenen Atome. Die Trajektorien geben an wie sich die Lage und die Geschwindigkeit aller Atome im System im Laufe der Zeit ändert. Aus diesen Trajektorien kann eine Vielzahl von Eigenschaften berechnet werden.

Kraftfeld-Funktionen beschreiben, wie sich die Energie bei Wechselwirkung von sowohl bindenden als auch nicht-bindenden Atomen ändert. Die potentielle Energie ergibt sich aus der Summe der Einzelgleichungen des Kraftfelds [123]. Die Kräfte, die auf ein beliebiges Atom wirken, lassen sich in bindende und nicht-bindende Wechselwirkungen unterscheiden. Die potentielle Energie eines Kraftfelds wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$V_{\text{force-field}} = \sum_{\text{bonds}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{angles}} \frac{k_i}{2} (\Theta_i - \Theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torsion}} \frac{v_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma))$$

$$+ \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)$$

(4)

l : Abstand zwischen zwei Atomen
 l_0 : Gleichgewichtsabstand
 r_{ij} : Van-der-Waals-Radius
 n : Anzahl der Minima
 ω : Periodizität
 γ : Phasenverschiebung
 q : Ladung eines Atoms
 ϵ : Dielektrizitätskonstante
 A, B, k sind Konstanten

Die bindenden Kräfte werden beschrieben durch:

Bindungsabstand l :

$$E_r = \frac{1}{2} k_l (l - l_0)^2 \quad (5)$$

l : Bindungslänge
 l_0 : Bindungslänge im Gleichgewichtszustand
 k_l : Kraftkonstante

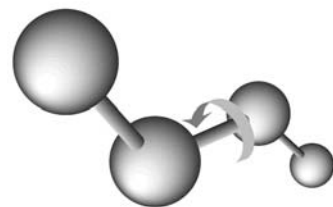
Bindungswinkel θ :

$$E_\theta = \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (6)$$

k_θ : Kraftkonstante
 θ : Bindungswinkel
 θ_0 : Bindungswinkel im Gleichgewicht

Torsionswinkel Φ :

$$E_\Phi = \frac{1}{2} (1 - \cos(n\omega - \gamma)) \quad (7)$$



k_ω : Kraftkonstante
 ω : Periodizität der Torsion
 γ : Phasenverschiebung

Zu den nicht-bindenden Wechselwirkungen tragen Van-der-Waals Wechselwirkungen und elektrostatische Wechselwirkungen bei:

1. Van-der-Waals Wechselwirkungen

Das Potential für nicht-bindende Wechselwirkungen zwischen zwei ungeladenen Atomen kann als Funktion des Kernabstand r ausgedrückt werden. Die Wechselwirkungen können in einen abstoßenden und einen anziehenden Term unterteilt werden, wobei die abstoßenden Wechselwirkungen mit abnehmendem Atomabstand exponentiell ansteigen. Van-der-Waals Wechselwirkungen entstehen durch die Elektronenwolke eines neutralen Atoms die um einen positiven Kern fluktuiert und dadurch partiell polarisiert werden kann. Die Fluktuation korreliert dadurch mit den Elektronenwolken benachbarter Atome und induziert Dipol-Dipol Wechselwirkungen. Die Summe dieser anziehenden und abstoßenden Terme und der dadurch beschriebenen anziehenden Wechselwirkung wird als Lennard-Jones-Potential bezeichnet (Abbildung 11), der erste Term beschreibt die Abstoßung, der zweite Term beschreibt die Anziehung:

(8)

$$V_{Lennard - Jones}(r) = 4\epsilon_0 \left(\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right)$$

ϵ_0 : Potentialtiefe (abhängig von der potentiellen Energie im Gleichgewicht)
 σ : Kollision Diameter, abhängig vom jeweiligen Atom
 r : Abstand zweier Atome

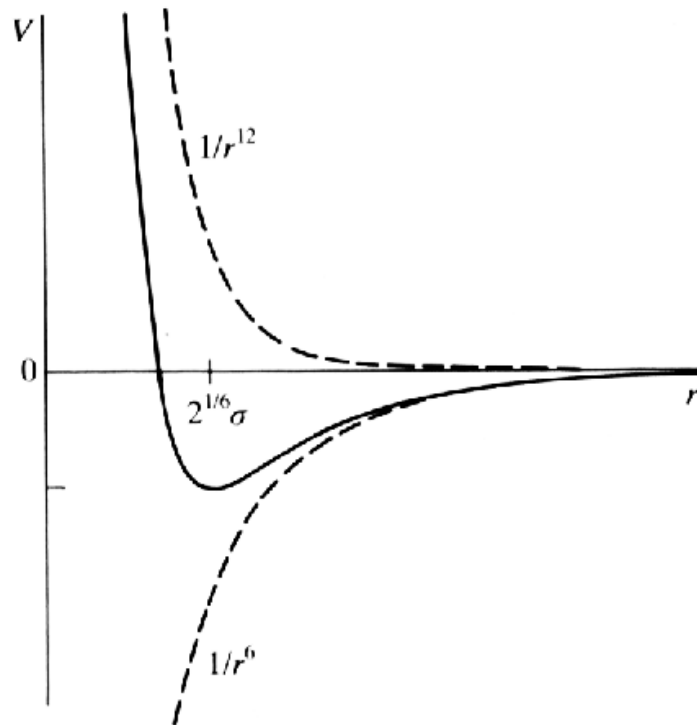


Abbildung 11 Graphische Darstellung des anziehenden $1/r^6$ und des abstoßenden Terms $1/r^{12}$ des Lennard-Jones Potential zur Beschreibung der Van-der-Waals Wechselwirkungen.

2. Elektrostatische Wechselwirkungen

Das Coulomb-Potential beschreibt die potentielle Energie von geladenen Atomen und damit die elektrostatischen Wechselwirkungen. Die Tatsache, dass elektronegativere Elemente Elektronen stärker anziehen, führt zu einer ungleichen Verteilung der Ladung über das Molekül. Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen zwei Ladungen q_i und q_j im Abstand r_{ij} wird durch das Gesetz von Coulomb beschrieben:

(9)

$$V(r) = \frac{q^i q^j}{4\pi\epsilon_0 r \epsilon(r_{ij})}$$

ϵ_0 : Dielektrizitätskonstante im Vakuum
 q : Partialladung der Atome
 r_{ij} : Abstand der Atomkerne

mit der abstandsabhängigen Dielektrizitätskonstante $\epsilon(r_{ij})$:

$$\varepsilon(r_{ij}) = A + \frac{B}{1 + ke^{-\lambda Br}} \quad (10)$$

ε_w = Dielektrizitätskonstante von Wasser
 A = - 8,5525, B=78,4 und k= 7,7839 sind empirische Parameter

Der zeitaufwendigste Teil einer Simulation ist die Berechnung der nicht-bindenden Wechselwirkungen. Durch sogenannte *cutoffs* wird die Anzahl der berechneten Wechselwirkungen reduziert, da Wechselwirkungen ab einem bestimmten Abstand nicht mehr berücksichtigt werden. Die Einführung eines *cutoffs* führt zu einer Diskontinuität des Potentialverlaufs und ist damit problematisch. Insbesondere für die elektrostatischen Wechselwirkungen, die umgekehrt proportional zur ersten Potenz des Abstandes sind und damit zu den weitreichenden Wechselwirkungen gehören, müssen besonders schonende *cutoffs* eingeführt werden.

In molekulardynamischen Simulationen werden die Systeme an ein äußeres Wärmebad gekoppelt, um die Temperatur eines Systems konstant zu halten. Die Kopplung drückt über eine Relaxationszeit aus, wie eng das System an ein externes Wärmebad gekoppelt ist. Durch eine enge Kopplung mit kurzer Relaxation kann das System leichter Energiebarrieren überwinden. Geringere Kopplung bringt eine verringerte Störanfälligkeit mit sich und es treten keine großen Fluktuationen der kinetischen Energie auf. Ein langsames Aufheizen des Systems ist wichtig, um lokale Energiebarrieren möglichst gleichmäßig überwinden zu können, schnelles Aufheizen hat zur Folge, dass in lokalen Bereichen sehr hohe Energien auftreten, die zur Zerstörung des Systems führen können. Die Temperaturänderung ergibt sich proportional zu der Differenz der Temperatur zwischen Wärmebad und System:

$$DT(t)/dt = \tau_T^{-1} [T_{bad} - T(t)] \quad (11)$$

τ_T ist die Kopplungskonstante, die bestimmt wie eng das System an das Wärmebad gekoppelt wird

In gleicher Weise wird der Druck konstant gehalten:

$$dT(t)/dt = \tau_p^{-1}[p_{bad} - p(t)] \quad (12)$$

τ_p ist die Kopplungskonstante, die bestimmt wie eng das System an das Wärmebad gekoppelt wird

Bei Start einer molekulardynamischen Simulation müssen eine Startkonformation des Systems sowie Startgeschwindigkeiten der Atome vorgegeben werden. Geschwindigkeiten können aus der Maxwell-Boltzmann Verteilung unter Berücksichtigung entsprechender Temperaturen entnommen werden:

$$p(v_{ix}) = \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T}\right)^{\frac{1}{2}} \exp\left[-\frac{m_i v_{ix}^2}{2k_B T}\right] \quad (13)$$

Die Maxwell-Boltzmann Verteilung gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Atom i der Masse m_i die Geschwindigkeit v_{ix} in Richtung x zur Temperatur besitzt. Die Startgeschwindigkeiten werden so angepasst, dass der Gesamtimpuls des Systems Null beträgt. Verschiedene Kraftfelder unterscheiden sich in der Gewichtung der einzelnen Kraftfeldbeiträge durch die Verwendung unterschiedlicher Parameter.

3.5 Aufreinigung von Lipasen

Viele Lipasen sind kommerziell zu niedrigen Preisen als unverarbeitetes, oft mit anderen Proteinen verunreinigtes, Produkt erhältlich. CALB wird immobilisiert auf verschiedenen Trägern oder lyophilisiert verkauft (Chirazyme L-2, Roche und Novozyme 435, Novozymes). Für eine industrielle Anwendung ist die technische Reinheit meistens ausreichend, aber besonders für die Charakterisierung von Enzymen und deren Mutanten, ist eine Aufreinigung von Vorteil. Der Expressionslevel verschiedener Mutanten und auch die Menge verunreinigender Proteine, die Nebenreaktionen katalysieren können, sind unterschiedlich und erschweren eine Charakterisierung. Die Aufreinigung der meisten Lipasen ist mit Ionen-Austausch Chromatographie (IEC) durch eine spezifische Bindung auf Ionen-Austauscher Säulen möglich [16] oder es werden IEC Schritte als Teilschritte der Aufreinigung verwendet [124]. Auch für CALB wurde bereits eine Aufreinigungsmethode veröffentlicht [125] und in mehreren Studien angewendet [75] [71] [126]. Das bisher verwendete Aufreinigungsverfahren für CALB besteht aus mehreren Aufreinigungsschritten, bestehend aus Dialyse, Ionen-Austausch Chromatographie und Hydrophober-Interaktions Chromatographie, auf jeweils unterschiedlichen Säulen. Im Vergleich zu anderen Lipasen war es jedoch nicht möglich CALB spezifisch auf AIEC- oder CIEC-Säulen oder Hydrophober-Interaktions Chromatographie Säulen, unter den verwendeten Bedingungen, zu binden. Die Aufreinigung von CALB war nur durch Bindung verunreinigender Proteine möglich. Nach allen Aufreinigungsschritten blieb CALB, als weitgehend einziges Protein, am Ende im Durchfluss der nicht gebundenen Fraktion übrig. Eine Aufreinigungsmethode in der CALB spezifisch gebunden wurde ist bisher noch nicht veröffentlicht.

Das rationale Design einer einstufigen Aufreinigungsmethode für kommerziell erhältliches CALB ($CALB_{com}$) und der in *P. pastoris* in den Überstand exprimierten CALB ($CALB_{rec}$) wird beschrieben. CALB wurde in dieser Studie als Beispiel für das rationale Design einer Aufreinigungsmethode ausgewählt, da CALB eine der industriell wichtigsten Lipasen ist und bisher in einer bestehenden Aufreinigungsmethode nicht auf IEC Säulen gebunden werden konnte [125]. Es sollte zum einen die Frage geklärt werden warum die Aufreinigung von CALB im Vergleich zu anderen Lipasen schwierig ist und zum anderen sollte eine neue Aufreinigungsmethode entwickelt werden, bei der CALB spezifisch auf IEC Säulen

gebunden werden kann. Zur Entwicklung einer neuen Aufreinigungsmethode wurde CALB theoretisch, durch Berechnung des elektrostatischen Potentials und der pKa-Werte aller titrierbaren Seitenketten, und experimentell, durch Isoelektrische Fokussierung (IEF) und die elektrophoretische Titrationskurve (ETC), charakterisiert. Die besonderen Eigenschaften und das Verhalten von CALB werden durch das elektrostatische Potential und die Hydrophobizität erklärt. Die Charakterisierung von CALB zeigte, dass die Aufreinigung auf Grund des elektrostatischen Potentials und der ungewöhnlichen Titrationskurve eine Herausforderung ist. Die theoretischen Berechnungen der Titrationskurve wurden experimentell validiert und basierend auf diesen Ergebnissen eine einstufige Aufreinigungsmethode für CALB_{com} und CALB_{rec} durch IEC entwickelt. Es wurden Bedingungen vorhergesagt, bei denen CALB auf IEC Säulen binden sollte.

Die Modellierung der elektrostatischen Eigenschaften und der Oberflächeneigenschaften soll gezielte Experimente zur Aufreinigung von CALB ermöglichen und den experimentellen Zeitaufwand minimieren. Die Methode des rationalen Designs einer Aufreinigungsmethode dieser Studie kann auch zur Entwicklung von Aufreinigungsmethoden anderer Proteine verwendet werden, da experimentelle Bedingungen durch eine nicht besonders zeitaufwendige theoretische Analyse gefunden werden können.

3.6 Elektrostatisches Potential

Die Oberfläche von Proteinen wird charakterisiert durch die Verteilung von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren und die Verteilung von geladenen und ungeladenen Aminosäuren, die Kräfte sind vorwiegend elektrostatischer Natur. Die Elektrostatik von Proteinen ist sowohl wichtig für die Wechselwirkung von Proteinen untereinander als auch die Wechselwirkungen innerhalb eines Proteins. Zur Betrachtung von Proteinen bei verschiedenen pH Werten werden elektrostatische Berechnungen verwendet, um Protonierungszustände einzelner Seitenketten zu berechnen. Diese Protonierungszustände können erheblich von der Standardprotonierung abweichen, da pKa-Werte sensitiv zur elektrostatischen Umgebung sind. Die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels und die Ionenstärke der Lösung haben einen weiteren Einfluss auf das elektrostatische Potential eines Proteins. Die Modellierung des elektrostatischen Potentials wurde in mehreren Reviews beschrieben [19] [127] [128] [129]. In der klassischen Elektrostatik werden Materialien als dielektrisch homogen betrachtet die durch elektrische Ladungen polarisiert werden können. In diesem Kontinuum-Modell wird eine dielektrische Konstante benutzt, an Stelle von expliziten Ladungen eines Atoms. Das einfachste Modell wird hier durch das Gesetz von Coulomb beschrieben, wo die elektrostatische Energie zwischen zwei Ladungen i und j gegeben ist durch:

$$G_{ij} = \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (14)$$

und das Potential eines Atoms i durch die Ladung des Atoms j durch:

$$\phi_i = \frac{q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (15)$$

q_j = Ladung des Atoms j
 ϵ = Dielektrizitätskonstante
 r_{ij} = Abstand zwischen Atomen i und j

Dieses Model ist nur gültig für ein unbegrenztes Medium mit einer einheitlichen Dielektrizitätskonstante, dies ist aber bei Anwendung auf Makromoleküle nicht der Fall. Makromoleküle wie zum Beispiel Proteine haben niedrige Dielektrizitätskonstanten da unter anderem die polaren Gruppen durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden und sich nicht im äußeren elektrostatischen Feld ausrichten können. Ein Protein in Wasser mit $\epsilon=80$ ist ein System mit unterschiedlichem dielektrischem Medium. Während ein System eines Proteins in organischem Medium mit $\epsilon=2-20$ ein wesentlich homogeneres dielektrisches Medium bildet. Dieser Unterschied wird im elektrostatischen Modell durch die Verwendung der Poisson-Boltzmann Gleichung (PBE) berücksichtigt. In der PBE werden Lösungsmitelegenschaften als Durchschnittswerte in einem Kontinuum beschrieben, die Eigenschaften des Makromoleküls werden im Atomdetail beschrieben. Das elektrostatische Potential ($\phi(r)$) wird mittels der Poisson-Boltzmann Gleichung berechnet:

$$\nabla \epsilon(r) \nabla \phi(r) = -4\pi\rho(r) \quad (16)$$

Die Verteilung der Ionen wird in der PBE in folgender Form berücksichtigt:

$$\nabla \epsilon(r) \nabla \phi(r) - \kappa^2 \sinh[\phi(r)] = -4\pi\rho(r) \quad (17)$$

$$\text{mit } \kappa^2 = \frac{\kappa'^2}{\epsilon} = 8\pi q^2 I / ekT \quad (18)$$

ϵ = Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels
 = elektrostatisches Potential in kT/e
 I = Ionenstärke
 k = Boltzmann Konstante
 T = absolute Temperatur
 l = Debye-Hückel Länge
 q = Ladung eines Protons
 $\rho(r)$ = die Ladungsdichte im Abstand r

Die linearisierte PBE lautet damit:

$$\nabla \varepsilon(r) \nabla \phi(r) - \kappa' \phi(r) = -4\pi\rho(r) \quad (19)$$

Die Entwicklung der Poisson-Boltzmann Methode zur Berechnung genauer elektrostatischer Felder in und um Makromoleküle ermöglichte die pH abhängige Berechnung der Elektrostatik [130]. Um die pKa-Verschiebung mittels der Kontinuum-Elektrostatik zu erhalten, muss die elektrostatische freie Energie ΔG der protonierten und unprotonierten Form der protonierbaren Seitenketten berechnet werden, wobei das elektrostatische Potential an der Position der Ladung α ist:

$$\Delta G = \frac{1}{2} \sum_{\alpha} q_{\alpha} \phi(r_{\alpha}) \quad (20)$$

3.7 Optimierung enzymkatalysierter Reaktionen

In den seltensten Fällen wird ein Enzym auf Anhieb allen im Prozess gestellten Anforderungen genügen. Ein Enzym kann unzureichend hinsichtlich der Aktivität, Enantioselektivität oder der Substratspezifität sein. Im Extremfall existiert kein Enzym oder ist kein Enzym bekannt, das eine gewünschte Reaktion katalysiert. Die Verbesserung der Leistung von biokatalytischen Prozessen ist eine komplexe Aufgabe, die viele Schritte beinhaltet. Zur Optimierung von Biokatalysatoren und der entsprechenden Prozesse stehen verschiedene Techniken der organischen Chemie, der Bioverfahrenstechnik und der Biochemie zur Verfügung. Die herkömmliche Methode Biokatalysatoren zu verbessern war die Reaktionsbedingungen zu optimieren ohne das Enzym selber zu verändern. Die Aktivität des Enzyms aber auch die Stabilität können hierdurch durch die Wahl des Lösungsmittels oder Immobilisierung verbessert werden. Möglichkeiten zur Optimierung eines enzymkatalysierten Prozesses und der Reaktionsbedingungen

umfassen die Optimierung der Substrate durch Racemisierung und Schutzgruppen [4] [131], die Optimierung der Medien durch Änderung des pH Werts, der Ionenstärke oder durch organische Additive [132], der Temperatur [133], des Lösungsmittels [134] und der Wasseraktivität [135], die eine wichtige Rolle für Stabilität und Aktivität [95] [136] spielt. Die Verwendung organischer Lösungsmittel bietet weitere Vorteile in der Prozessführung. Neben der verbesserten Löslichkeit von hydrophoben Substraten können die Reaktionsprodukte leichter isoliert und das unlösliche Enzym aus dem Reaktionsansatz zurück gewonnen werden. Durch Variation der Reaktionsbedingungen und des eingesetzten Substrats kann auch die Form des Biokatalysators selbst den Anforderungen des Prozesses gemäß variiert werden. Vor allem zwei Methoden, die Immobilisierung und das sogenannte *imprinting* [137], konnten in der Vergangenheit die Enantioselektivität verschiedener Enzyme verbessern. Die Immobilisierung von Biokatalysatoren wurde ursprünglich eingesetzt, um die Wiedergewinnung der Enzyme aus dem Reaktionsansatz zu vereinfachen, oft resultiert daraus auch eine gesteigerte Thermostabilität [138].

Neben dem Ansatz neue Enzyme für eine bestimmte biotechnologische Problemstellung zu gewinnen, nahm die Verbesserung vorhandener Enzyme durch molekularbiologische Methoden in den letzten Jahren einen immer größeren Stellenwert ein. Hierbei gibt es im Wesentlichen zwei unterschiedliche Ansätze, die gerichtete Evolution oder das rationale Design:

1. Die **gerichtete Evolution** beruht auf der zufälligen Mutagenese eines Enzyms und dem anschließenden Screening großer Enzymbibliotheken. Genaue Kenntnisse über Struktur und Mechanismus sind dabei nicht notwendig. Voraussetzung ist jedoch ein an die Problemstellung angepasstes Screeningsystem, welches die Durchmusterung auch großer Mutantenbibliotheken erlaubt.

2. Durch **rationales Design** können spezifische Mutationen in das Enzym eingebracht werden, die im Sinne der Problemstellung aussichtsreich erscheinen. Diese Vorhersagen aussichtsreicher Mutationen werden *in silico* durch Methoden der molekularen Modellierung getroffen. Bei diesem Ansatz werden eine oder wenige Aminosäuren verändert, von denen erwartet wird bestimmte Eigenschaften des Enzyms zu verbessern. Diese werden durch *site-directed*

Mutagenese verändert um die gewünschten Mutanten zu erhalten. Beim rationalen Design wird mittels bioinformatischer *in silico* Methoden versucht, Vorhersagen darüber zu machen, welche Veränderungen der Primärstruktur eines Enzyms zu einer Verbesserung der katalytischen Eigenschaften führen. Neben der Kenntnis der Aminosäuresequenz sind hierfür auch eine genaue Kenntnis der Struktur des Enzyms und der mechanistischen und dynamischen Vorgänge während der Katalysereaktion nötig.

3.8 Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch *Candida antarctica* Lipase B

Das Acrylat des Hydroxypropylcarbamats ist klassisch-chemisch säurekatalysiert nur schwer zugänglich, insbesondere ist es nicht möglich ein farbloses Produkt zu erhalten. Acylierung hat eine große Bedeutung in der Einführung von Quervernetzungs- Funktionalität in Verbindungen. Eine niedrige Farbzahl ist aber für eine potentielle Anwendung als Reaktivvernetzer im Klarlackbereich unabdingbar. Traditionell werden chemische Prozesse zur Herstellung von acylierten Estern bei hohen Temperaturen verwendet, die aber gleichzeitig zur teilweisen Polymerisierung der acrylischen Doppelbindungen führen. Zur Vermeidung der ungewollten Polymerisierung werden Inhibitoren und Säurekatalysatoren zugesetzt die eine Reaktion bei 80 bis 100°C erlauben [140]. Aus diesem Grund wurde eine enzymkatalysierte Route entwickelt, die unter milden Bedingungen ein nahezu farbloses Produkt liefert und die chemische Herstellung der Monomere ersetzen soll. Der Einsatz von Lipasen in Acylierungen wurde bereits in der Literatur beschrieben. In der ersten durch Lipasen katalysierten Acylierung wurde eine Lipase aus *Chromobacterium viscosum* verwendet [141]. In nachfolgenden Arbeiten wurde CALB (Novozym 435) in der Umesterung von Methylacrylat [142] oder in der direkten Veresterung von Acrylsäure [143] eingesetzt. Das industrielle Interesse der Acylierung kann an zahlreichen Patenten durch die chemische Industrie, wie beispielsweise BASF gesehen werden.

Hydroxypropylcarbamate besteht synthesebedingt aus zwei Regioisomeren (Abbildung 12), einem Gemisch aus sekundären und primären Hydroxypropylcarbamaten. Da in der durch native CALB katalysierten Reaktion

kein vollständiger Umsatz erreicht wurde, bestand die Notwendigkeit, eine optimierte Mutante zu entwickeln. Die Methode des rationalen Designs wurde zur Verbesserung der Katalyse der Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch CALB verwendet. Durch molekulare Modellierung wurden Positionen zur Erstellung neuer Mutanten identifiziert. Diese sollten die Aktivität von CALB in der Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten erhöhen, bei gleichzeitiger verringerten Selektivität, um eine vollständige Umsetzung der Substrate zu erreichen. Das Produkt der Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten ist bereits kommerziell erhältlich und wird als Monomer zur Herstellung von Schutzlacken, zum Beispiel in der Fahrzeugindustrie, eingesetzt. Der bisher chemische Prozess zur Herstellung der Monomere sollte durch einen biotechnologischen Prozess unter Verwendung von CALB ersetzt werden.

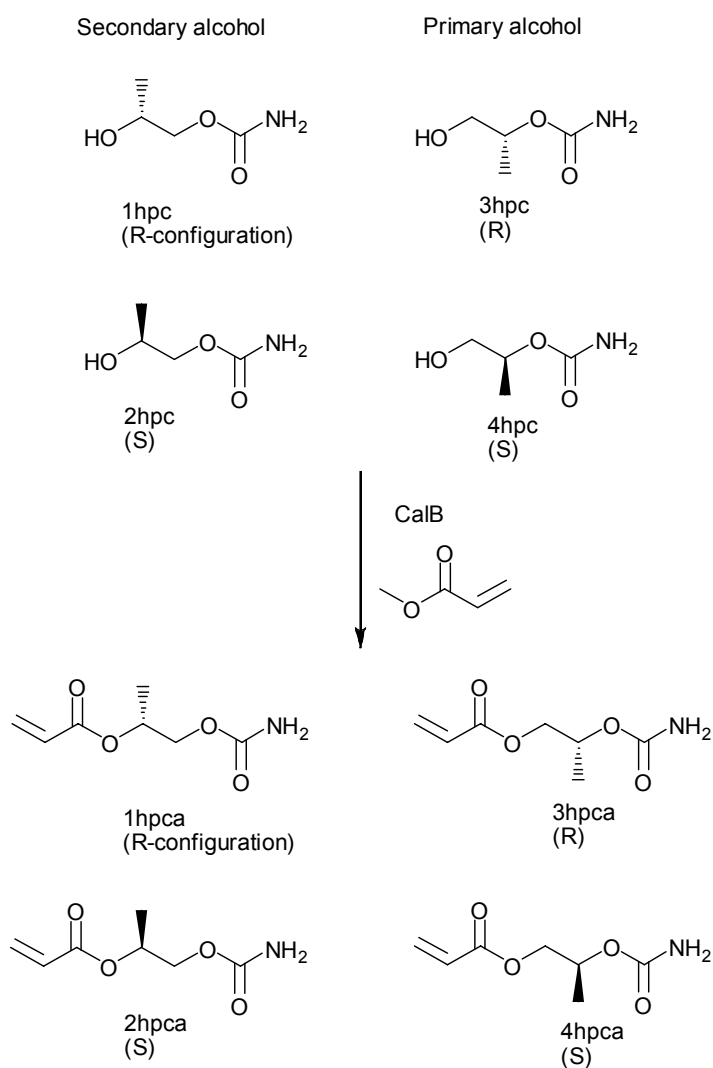


Abbildung 12 Umesterung von Hydroxypropylcarbamaten mit Methylacrylat durch CALB.

Die Punktmutanten wurden durch *site-directed* Mutagenese eingeführt und anschließend in dem Expressionssystem *Pichia pastoris* exprimiert. Die in *P. pastoris* exprimierten Mutanten von CALB wurden hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber der Hydrolyse von Tributyrin und der Aktivität in der Umesterung von hpc mit Methylacrylat charakterisiert. Weiterhin wurden die Reaktionsbedingungen unter Verwendung der hier beschriebenen Mutanten optimiert. *P. pastoris* gehört zu den erfolgreichen biologischen Standardsystemen zur heterologen Expression rekombinanter Proteine. Die Beliebtheit dieser Hefe basiert auf mehreren Faktoren. Zum einen ist *P. pastoris* als einzelliger Organismus leicht zu verändern und kann auch in großem Maßstab produziert werden, andererseits verfügt *P. pastoris* als Eukaryot über die Fähigkeit zu posttranslatorischen Modifikationen. Viele Proteine, die in bakteriellen Systemen als inaktive *inclusion bodies* produziert wurden, konnten hier funktionell exprimiert werden. *P. pastoris* erlaubt sowohl eine intrazelluläre, als auch eine sekretorische heterologe Expression. Da die Hefe selbst nur sehr geringe Mengen an eigenen Proteinen sekretiert und auch im Kultivierungsmedium im Idealfall nur geringe Proteinmengen vorhanden sind, stellt das sekretierte heterologe Protein die überwiegende Menge der Proteine im Medium dar [139].

3.9 Einordnung in die „Weiße Biotechnologie“

Die Untersuchung von Lipasen in dieser Arbeit kann in den Rahmen der Weißen Biotechnologie eingeordnet werden. Unter Weißer Biotechnologie verstehen wir die industrielle Produktion von organischen Grund- und Feinchemikalien mit Hilfe optimierter Enzyme, Zellen oder Mikroorganismen. In der Weißen Biotechnologie sollen die Werkzeuge der Natur in der industriellen Produktion und Synthese genutzt werden. Die Anwendungsmöglichkeiten der Weißen Biotechnologie sind durch die Vielfalt der Synthesemöglichkeiten der Natur fast unbegrenzt. Sowohl neue nachhaltige Produktionsmöglichkeiten bestehender Produkte, als auch vollkommen neue Produktgruppen können mit den Methoden der Weißen Biotechnologie entwickelt werden.

Da viele der biotechnologischen Verfahren mildere Reaktionsbedingungen erfordern, sind die Herstellungsprozesse oft umweltfreundlicher, kostengünstiger und nachhaltiger als herkömmliche Syntheseverfahren. Weiße Biotechnologie

wird die chemische Industrie maßgeblich beeinflussen. Aktuell werden nach Untersuchungen des Beratungsunternehmens McKinsey schätzungsweise 5 % (2007) der chemischen Produkte durch biotechnische Verfahren hergestellt. Es wird geschätzt, dass der Anteil chemischer Produkte, bereits 2010 zu 20 % auf die Nutzung Weißer Biotechnologie zurückzuführen sein wird. In vielen Bereichen Industrieller Produktion und Verarbeitung werden Verfahren und Produkte der Weißen Biotechnologie bereits heute mit großem Erfolg eingesetzt. Dazu gehört die Herstellung von enzymhaltigen Waschmitteln, Antibiotika, Vitamine, Hormone und Bioethanol. Die biotechnologische Herstellung von Bausteinen und Polymeren für die Kunststoff- und Polymerindustrie ist ein weiteres zukunftssträchtiges Innovationsfeld biokatalytischer Verfahren, oft handelt es sich bei den Produkten um Grundchemikalien und Zwischenprodukte der chemischen Industrie. Der Biotechnologie kommt eine besondere Bedeutung bei der Etablierung einer nachhaltigen Wirtschaftsweise zu. Die Nutzung moderner biotechnologischer Methoden für industrielle Produktionsprozesse gewinnt immer weiter an Bedeutung. Dazu tragen insbesondere die weitreichenden technologischen Durchbrüche auf dem Gebiet der Biotransformation, der Fermentation und des Metabolic Engineering bei. Einen kleinen Beitrag dazu sollen auch die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit leisten, in der durch theoretische Untersuchungen von Lipasen in organischen Lösungsmitteln und deren praktischen Anwendung zum Verständnis dieser Systeme beigetragen wird. Die Arbeit umfasste sowohl die theoretische Untersuchung mit dem Einsatz eines breiten Spektrums bioinformatischer Methoden zur Untersuchung der Struktur und Dynamik von Lipasen in organischen Lösungsmitteln, als auch die praktische Anwendung im Labor die sich mit der Aufreinigung von CALB und der Optimierung von CALB in der Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten beschäftigte.

4 Ergebnisse

4.1 Das Verhalten von *Candida antarctica* Lipase B in verschiedenen Lösungsmitteln

4.1.1 Die Struktur von CALB

Es wurden insgesamt 18 MD Simulationen über jeweils 2 ns in den Lösungsmitteln Wasser (WAT), Methanol (MET), Chloroform (CL3), Isopentan (ISO), Cyclohexan (CHE) und Toluol (TOL) durchgeführt, dabei wurde jedes System dreimal simuliert.

Die Abweichungen RMSD der CALB *backbone* Atome während der Simulation in Wasser nahmen während der ersten ns zu Beginn der Simulation im Vergleich zur Kristallstruktur allmählich zu und waren nach der Equilibrierung im Bereich von 0.7 bis 0.9 Å (Abbildung 13). Die Simulationen von CALB in Wasser waren nach der Simulation über 1 ns im Gleichgewicht wie im Verlauf des RMSD zu sehen ist, CALB war stabil und zeigte keine signifikanten Änderungen der Konformation. Die Simulationen im polaren Lösungsmittel Methanol verhielten sich ähnlich wie die Simulationen in Wasser. Die Abweichung der CALB *backbone* Atome während der Simulation in Methanol zur Kristallstruktur waren im Bereich von 0.7 bis 0.9 Å (Abbildung 14) und die Simulationen waren nach 1 ns im Gleichgewicht. Die Abweichung der *backbone* Atome von CALB zur Kristallstruktur in den verwendeten unpolaren organischen Lösungsmitteln CL3, ISO, TOL und CHE lag im Bereich von 0.6 bis 0.8 Å (Abbildung 15). Die Simulationen in organischen Lösungsmitteln erreichten den Gleichgewichtszustand nach 500 ps. Die Simulationen von CALB in unpolaren Lösungsmitteln waren damit schneller im Gleichgewicht als die Simulationen in Wasser oder dem polaren Lösungsmittel Methanol, und zeigten eine geringere Flexibilität der Konformationen im Vergleich zu Simulationen in Wasser. Es gab keine signifikanten Unterschiede in den Konformationen in verschiedenen Lösungsmitteln, die untereinander einen RMSD zwischen 0.4 bis 0.8 Å zeigten.

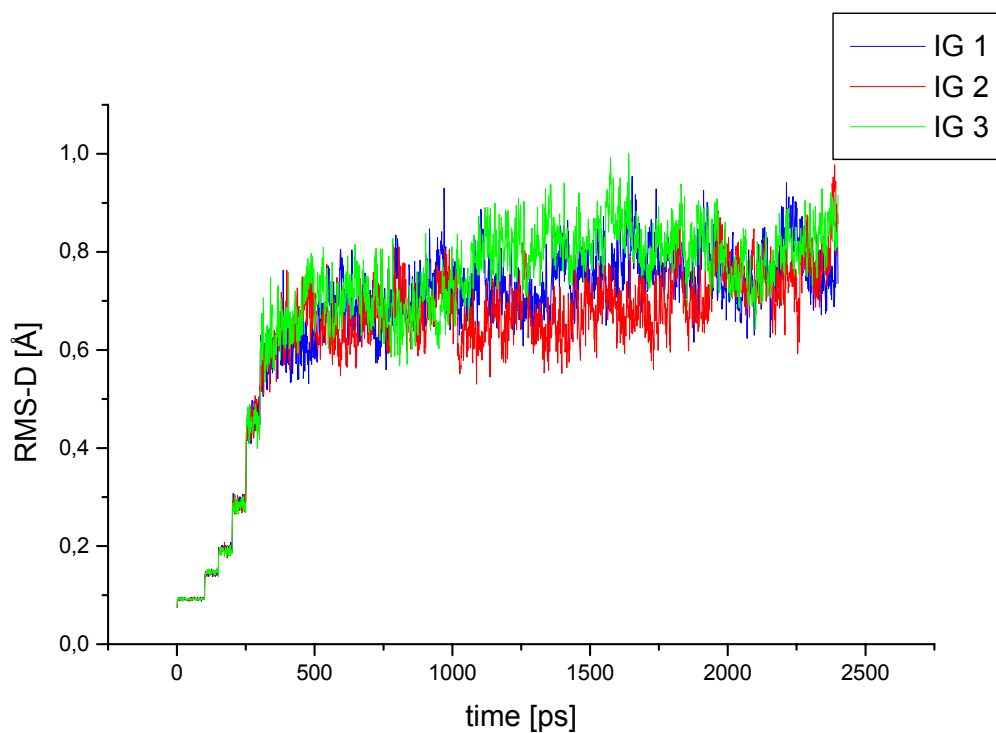


Abbildung 13 Abweichung RMSD der *backbone* Atome von CALB von der Kristallstruktur während der drei Simulationen (IG 1-3) in Wasser über 2 ns als Funktion der Zeit.

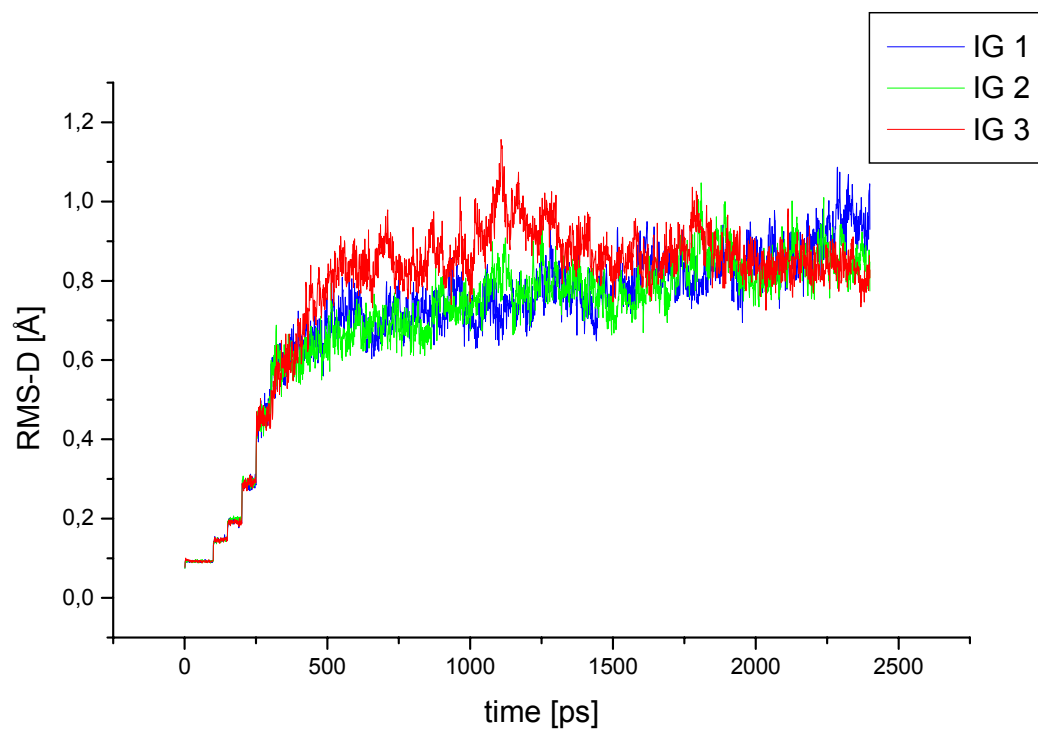


Abbildung 14 Abweichung RMSD der *backbone* Atome von CALB von der Kristallstruktur während der drei Simulationen (IG 1-3) in Methanol über 2 ns als Funktion der Zeit.

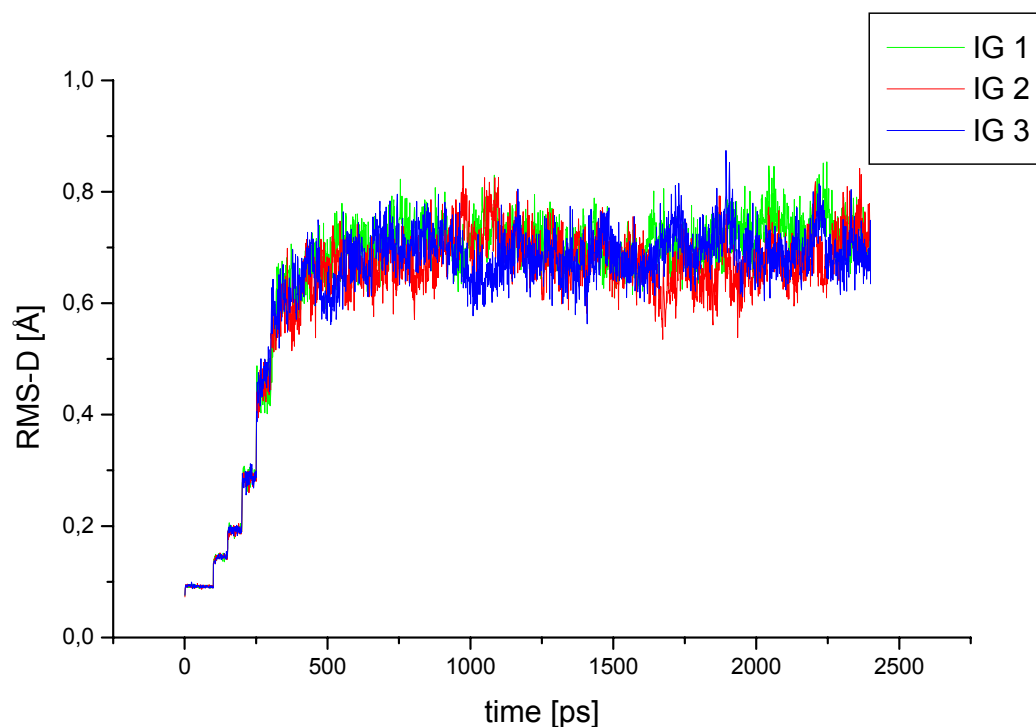


Abbildung 15 Abweichung RMSD der *backbone* Atome von CALB von der Kristallstruktur während der drei Simulationen (IG 1-3) in Toluol über 2 ns als Funktion der Zeit.

Im 2D-RMSD, bei dem die mittlere quadratische Abweichung jeder Konformation zu allen anderen Konformationen einer Simulation gezeigt wird, war CALB am Ende der Simulationen in einem stabilen Konformationsraum (Abbildung 16), der 2D-RMSD ist als Beispiel für die Simulationen in WAT und CHE abgebildet. Im Vergleich mit dem 2D-RMSD aus unpolaren organischen Lösungsmitteln war der Konformationsraum der stabilen Konformation in Simulationen nach Equilibrierung in Wasser größer als in unpolaren organischen Lösungsmitteln. Das Gleichgewicht stellte sich in organischen Lösungsmitteln schneller ein als in Wasser, wie im 2D-RMSD von CHE (Abbildung 17) durch den grünen Bereich der stabilen Konformation nach Erreichen des Gleichgewichts zu erkennen ist.

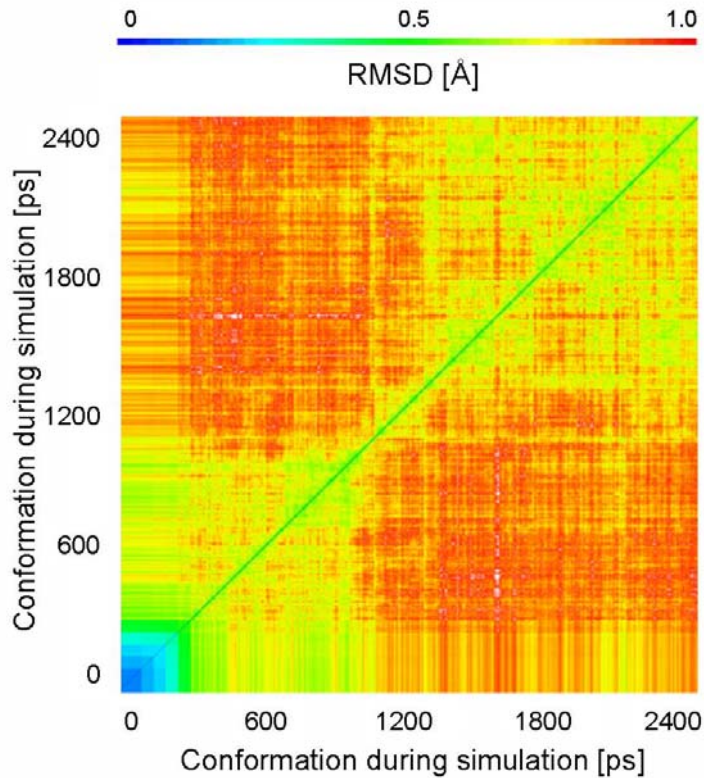


Abbildung 16 2D-RMSD von CALB *backbone* Atomen in der Simulation in Wasser. Im 2D-RMSD wird die mittlere quadratische Abweichung jeder Konformation zu allen anderen Konformationen einer Simulation berechnet.

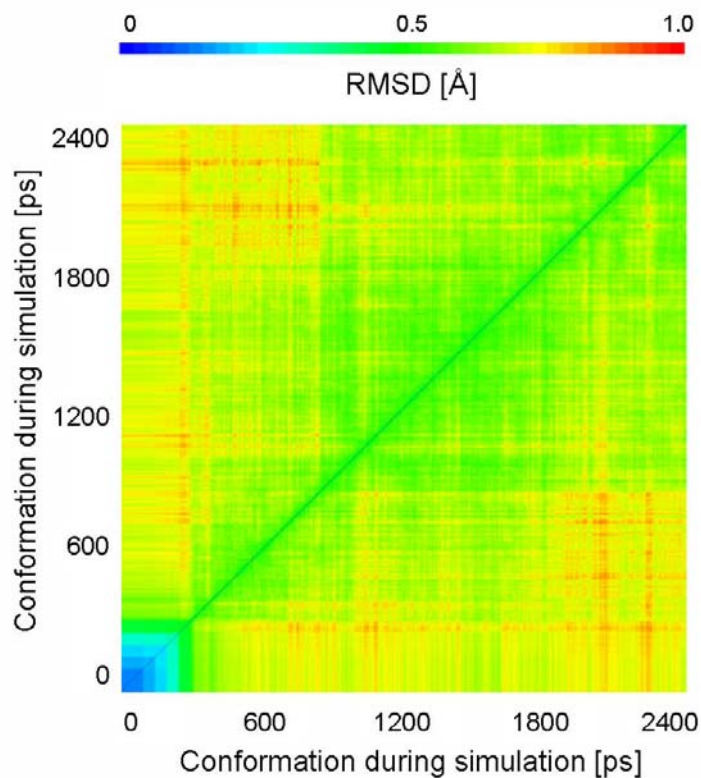


Abbildung 17 2D-RMS von CALB *backbone* Atomen in der Simulation in Cyclohexan

4.1.2 Die Flexibilität von CALB

Zur Bestimmung der Flexibilität von CALB in verschiedenen Lösungsmitteln wurden die B-Faktoren pro Aminosäure aus den Simulationen berechnet. Die berechneten B-Faktoren sind ein Zeichen für die Flexibilität des simulierten Systems. In allen Lösungsmitteln war die Flexibilität im Kern von CALB mit dem aktiven Zentrum (AS 105/187/224) geringer als die Flexibilität an der Oberfläche, auch zeigten die Seitenketten eine größere Flexibilität als die *backbone* Atome. Es gab große Unterschiede in der Flexibilität zwischen verschiedenen Lösungsmitteln, besonders in WAT und in geringerem Ausmaß in MET war die gesamte Flexibilität höher als in den unpolaren Lösungsmitteln TOL, CHE, ISO und CL3 (Tabelle 1). Die aufsummierte Flexibilität aller Aminosäuren von CALB aus den Simulationen in verschiedenen Lösungsmitteln ist jeweils der Durchschnitt aus drei Simulationen des jeweiligen Systems. Innerhalb der Gruppe der unpolaren organischen Lösungsmittel gab es auch Unterschiede in der Flexibilität. Die Gesamt-Flexibilität von CALB, aus der Summe aller B-Faktoren, in organischen Lösungsmitteln nimmt in der Reihenfolge MET, ISO, CL3, TOL und CHE ab (Tabelle 1).

Tabelle 1 Summe der B-Faktoren aller Aminosäuren in CALB aus den Simulationen in verschiedenen Lösungsmitteln:

CALB in Lösungsmittel	Summe B-Faktoren
Wasser	5267 ± 396
Methanol	4385 ± 122
Isopentan	4013 ± 78
Chloroform	3648 ± 215
Toluol	3318 ± 103
Cyclohexan	3216 ± 80

Die B-Faktoren variierten in Abhängigkeit von der Position und des Typs der Aminosäure. Die Bereiche in CALB die eine höhere Flexibilität aufwiesen waren in allen verwendeten Lösungsmitteln gleich, aber das Ausmaß der höheren Flexibilität war unterschiedlich in Abhängigkeit des Lösungsmittels (Abbildung 18 und 19). CALB zeigte in Wasser in allen Bereichen der Struktur die höchste Flexibilität. Das Ausmaß der niedrigeren Flexibilität in organischen Lösungsmitteln hängt vom Bereich im Protein und von den Eigenschaften der Aminosäuren ab. Besonders hohe Flexibilität in Wasser im Vergleich zu organischen Lösungsmitteln wurde am Eingang zum aktiven Zentrum, an der kurzen α -Helix (AS 139-150) und der langen α -Helix (AS 266-289) und an drei *loops* an der Oberfläche (AS 26-30; 92-97; 215-222) beobachtet (Abbildung 20), während die Flexibilität des Kerns in allen Lösungsmittel vergleichbar war.

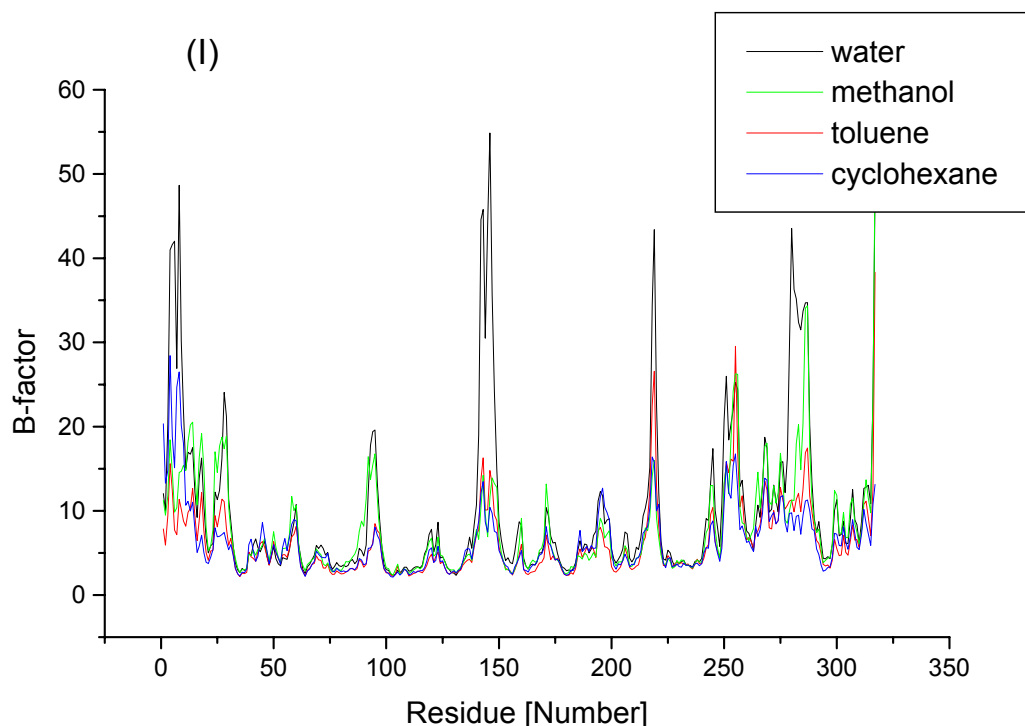


Abbildung 18 B-Faktoren pro Aminosäure der Simulationen in Wasser (schwarz), dem polaren Lösungsmittel Methanol (grün) und den unpolaren Lösungsmitteln Toluol (rot) und Cyclohexan (blau).

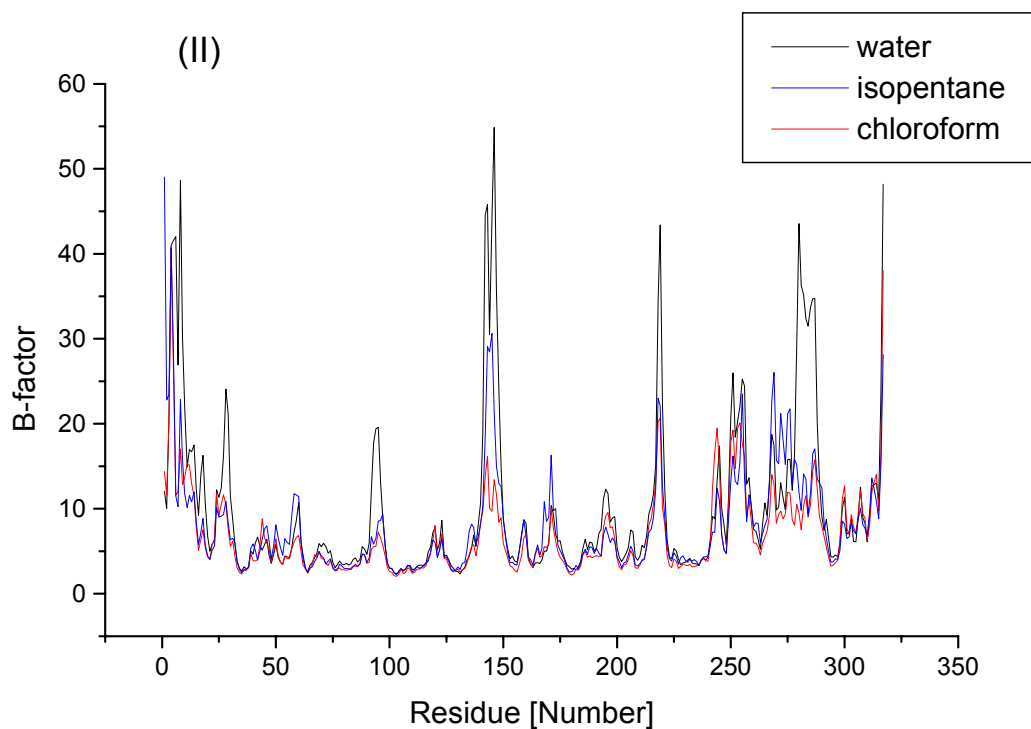


Abbildung 19 B-Faktoren pro Aminosäure der Simulationen in Wasser (schwarz) und den unpolaren organischen Lösungsmitteln Chloroform (rot) und Isopentan (blau).

In allen Lösungsmitteln hatte CALB ähnlich hohe Flexibilität im Kern und im Bereich der Aminosäuren 249-262 an der Oberfläche. Die Bindungstasche für den mittleren Rest des sekundären Alkohols (AS 39, 42, 47, 104, 225) und die Säurebindungstasche (AS 40, 106, 134, 138, 157, 190) zeigten eine recht geringe Flexibilität. Der größte Unterschied war in der großen Bindetaschen des sekundären Alkohols zu beobachten (AS 140, 141, 144, 154, 188, 189, 278, 281, 285, 286), die in Wasser am Eingang zum aktiven Zentrum hohe B-Faktoren zeigte. Die Abnahme der Flexibilität in unpolaren Lösungsmitteln CL3, CHE, ISO und TOL, die als eine Gruppe betrachtet werden können, wurde mit der Flexibilität in Wasser verglichen. Jeder Aminosäure Typ hatte in Wasser die höchste Flexibilität, dies spricht für einen Einfluss der Lösungsmittel auf das Protein als Ganzes. Das Ausmaß des Rückgangs der Flexibilität in unpolaren organischen Lösungsmitteln hängt jedoch vom Typ der Aminosäure ab. Eine geringere Abnahme der Flexibilität im Vergleich zu Wasser wurde für die Aminosäuren Y 74 %, W 98 %, Q 76 %, I 80 %, T 82 %, F 80 %, L 81 % und V 73 % beobachtet, mit Angabe der jeweiligen prozentualen Flexibilität im

Verhältnis zur Simulation in Wasser. Eine höhere Abnahme der Flexibilität im Vergleich zu Wasser wurde für die Aminosäuren R 55 %, N 62 %, E 56 %, A 54 % und D 44 % beobachtet. Aminosäuren mit einer niedrigen Abnahme der Flexibilität in unpolaren organischen Lösungsmitteln waren vorwiegend unpolare und aromatische Aminosäuren. Die höchste Abnahme der Flexibilität in unpolaren organischen Lösungsmitteln wurde für geladene und polare Aminosäuren beobachtet.

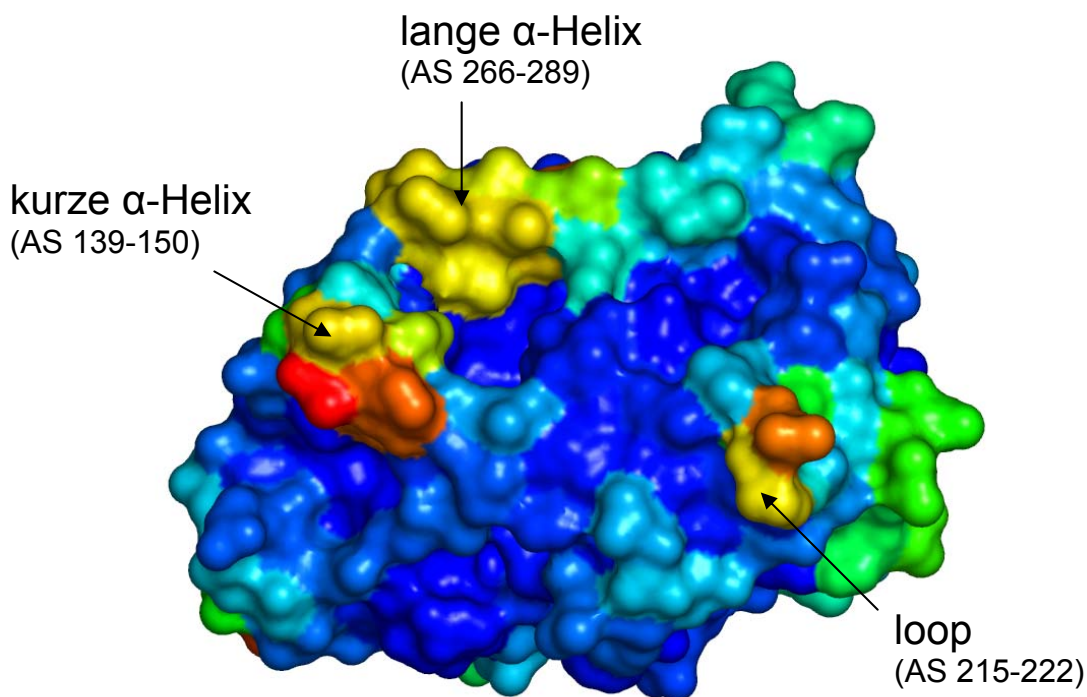


Abbildung 20 Oberfläche von CALB gefärbt nach der Flexibilität der *backbone* Atome der Simulationen in Wasser, die Flexibilität nimmt in der Reihenfolge blau-grün-gelb-rot zu.

Die Flexibilität korrelierte mit dem $\log P$, dem Verteilungskoeffizient an einer Wasser-Oktanol Grenzschicht, und der Dielektrizitätskonstante der Lösungsmittel (Abbildung 21). Bei einem höheren $\log P$ des Lösungsmittels nahm die Flexibilität von CALB ab und bei einer höheren Dielektrizitätskonstante nahm die Flexibilität zu.

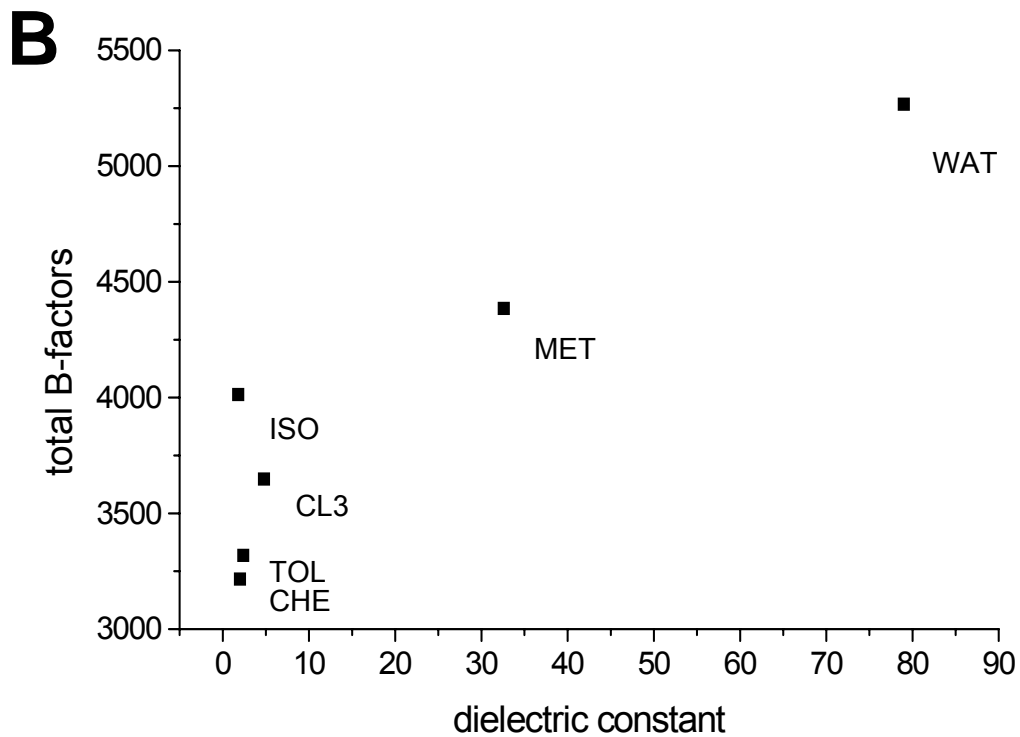
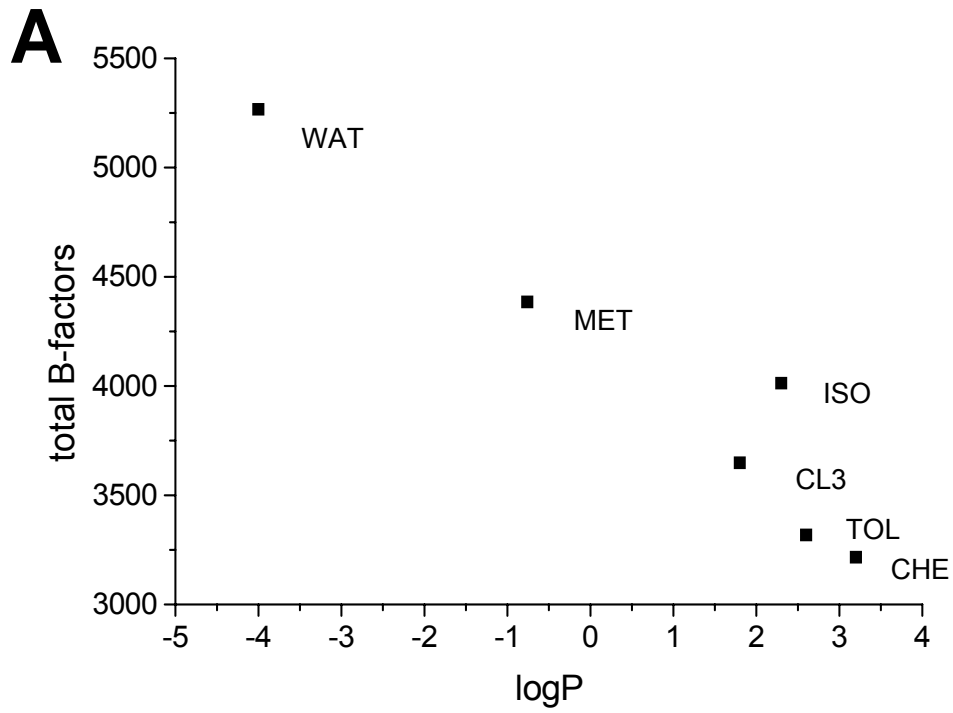


Abbildung 21 Korrelation der Flexibilität in den Simulationen von CALB mit dem logP (A) und der Dielektrizitätskonstante (B) des Lösungsmittels.

Die Simulationen von CALB in Isopentan passten als einziges Lösungsmittel nicht in die beobachtete Korrelation der anderen Lösungsmittel zu logP und den Dielektrizitätskonstanten und sollen später diskutiert werden.

4.1.3 Die Oberfläche von CALB

Die für Lösungsmittel zugängliche Oberfläche SASA war nach den Simulationen über 2 ns in WAT um 600 \AA^2 größer als die der anfänglich eingesetzten Kristallstruktur und um $350\text{-}650 \text{ \AA}^2$ größer als nach den Simulationen in unpolaren organischen Lösungsmitteln (Tabelle 2). Innerhalb der Gruppe der unpolaren organischen Lösungsmittel war die Oberfläche vergleichbar mit der Oberfläche der Kristallstruktur. Neben der Größe der Oberfläche hatten die umgebenden Lösungsmittel auch einen Einfluss auf die Hydrophobizität der Oberfläche von CALB. Der hydrophile und der hydrophobe Oberflächenanteil war in der Kristallstruktur in etwa gleich groß (Tabelle 2) und über die Gesamtoberfläche verteilt ohne eindeutige *patches* zu bilden (Abbildung 22). Der hydrophile Oberflächenanteil der Kristallstruktur lag bei 6071 \AA^2 , was in etwa der Hälfte der Gesamtoberfläche von 12043 \AA^2 entspricht. Die Gesamtoberfläche nahm in WAT im Vergleich zur Kristallstruktur durch die Zunahme der hydrophilen Oberfläche um 600 \AA^2 zu. In Simulationen in unpolaren organischen Lösungsmitteln war die Oberfläche um 450 bis 650 \AA^2 kleiner als in den Simulationen in Wasser und vergleichbar mit der Oberfläche der Kristallstruktur. In Simulationen in unpolaren Lösungsmitteln nahm die hydrophile Oberfläche im Vergleich zur Kristallstruktur geringfügig um 200 \AA^2 ab, während die hydrophobe Oberfläche dagegen um 400 \AA^2 zunahm. Die hydrophile Oberfläche war nach den Simulationen in WAT um 600 bis 700 \AA^2 größer als in den Simulationen in unpolaren Lösungsmitteln, die hydrophobe Oberfläche in unpolaren Lösungsmitteln nahm dagegen nur geringfügig um 50 - 200 \AA^2 zu (Tabelle 2).

Tabelle 2 Gesamtoberfläche und hydrophile Oberfläche von CALB in der Kristallstruktur und nach den Simulationen in verschiedenen Lösungsmitteln (Durchschnitt aus 9 stabilen Konformationen aus jeder Simulation):

Lösungsmittel	Gesamtoberfläche [Å ²]	hydrophile Oberfläche [Å ²]
Kristallstruktur	12043	6071
Wasser	12659	6410
Methanol	12564	6069
Chloroform	12281	5828
Isopentan	12157	5858
Toluol	12115	5838
Cyclohexan	12014	5710

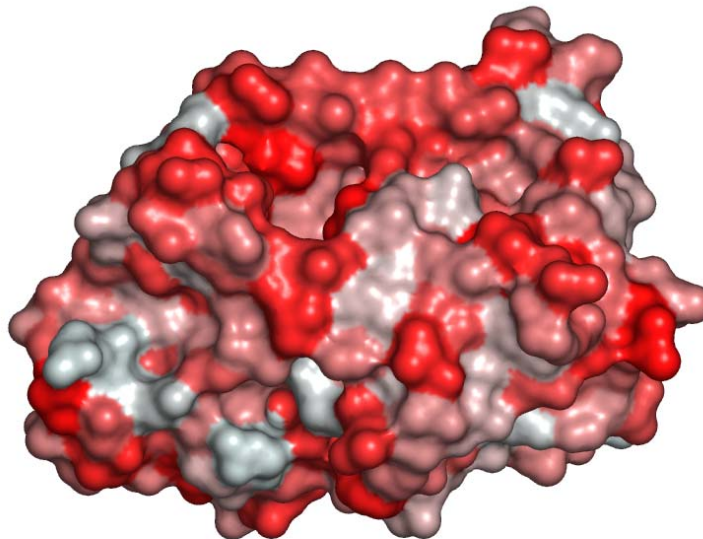


Abbildung 22 Die Oberfläche von CALB gefärbt nach Hydrophobizität, hydrophobe Bereiche (rot), hydrophile Bereiche (weiß).

Im Vergleich mit anderen Lipasen wie BCL (siehe später) war der Einfluss auf die Oberfläche von CALB in den verschiedenen Lösungsmitteln gering. Die kompaktere Oberfläche in unpolaren Lösungsmitteln ist einer der möglichen Gründe für die höhere Stabilität von CALB in organischen Lösungsmitteln.

4.1.4 Wasser an der Oberfläche von CALB

Innerhalb von CALB gab es neun eingeschlossene Wassermoleküle die in nahezu unveränderter Lage während den Simulationen in Wasser und in organischen Lösungsmitteln blieben. Diese Wassermoleküle waren auch bereits in der Kristallstruktur beschrieben [12]. Der Austausch und die Beweglichkeit von Wassermolekülen an der Oberfläche von CALB waren von dem verwendeten Lösungsmittel abhängig. In den Simulationen in WAT wurden alle Wassermoleküle während der Simulation über 2 ns an der Oberfläche durch Wassermoleküle des Lösungsmittels oder andere Wassermoleküle der Oberfläche ausgetauscht. In unpolaren organischen Lösungsmitteln war der Austausch wesentlich langsamer und die Wassermoleküle waren in Abhängigkeit des Lösungsmittels weniger flexibel (Abbildung 23). Die durchschnittliche Zahl der Wassermoleküle mit geringem B-Faktor als 40, als Zeichen für die Flexibilität der Wassermoleküle, waren in den Simulationen an der Oberfläche und innerhalb von CALB durchschnittlich 13 ± 2 in WAT, 26 ± 2 in MET, 31 ± 10 in ISO, 50 ± 12 in CL3, 63 ± 8 in TOL und 103 ± 6 in CHE, von den insgesamt 286 Wassermolekülen die in der Kristallstruktur enthalten waren. Die Anzahl der langsam ausgetauschten Wassermoleküle nahm mit zunehmender Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels ab (Abbildung 23).

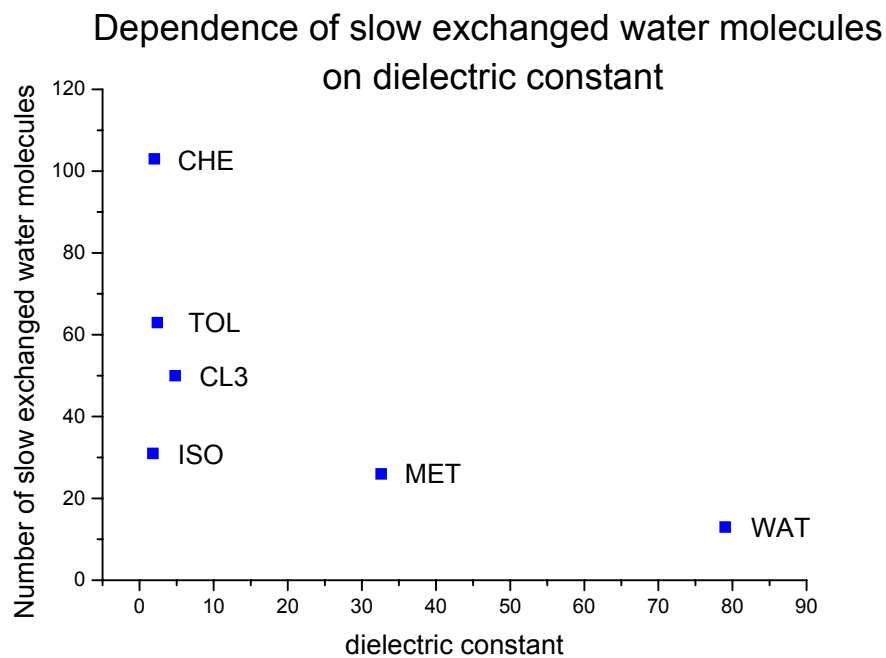


Abbildung 23 Korrelation der Anzahl langsam ausgetauschter Wassermoleküle an der Oberfläche von CALB mit der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels.

In WAT wurden die Wassermoleküle von der Oberfläche gestrippt und schnell durch Wassermoleküle aus dem Lösungsmittel ersetzt (Abbildung 24), während in unpolaren organischen Lösungsmitteln die Wassermoleküle langsamer von der Oberfläche gestrippt wurden und nicht so beweglich waren. In MET wurden Wassermoleküle wie in den Simulationen in WAT von der Oberfläche gestrippt und durch Methanolmoleküle aus dem Lösungsmittel ersetzt. In unpolaren organischen Lösungsmitteln waren mehr Wassermoleküle mit geringer Beweglichkeit an der Oberfläche von CALB. In Wasser war der schnelle Austausch mit Wassermolekülen des Lösungsmittels durch die hohe Konzentration an Wassermolekülen viel leichter möglich.

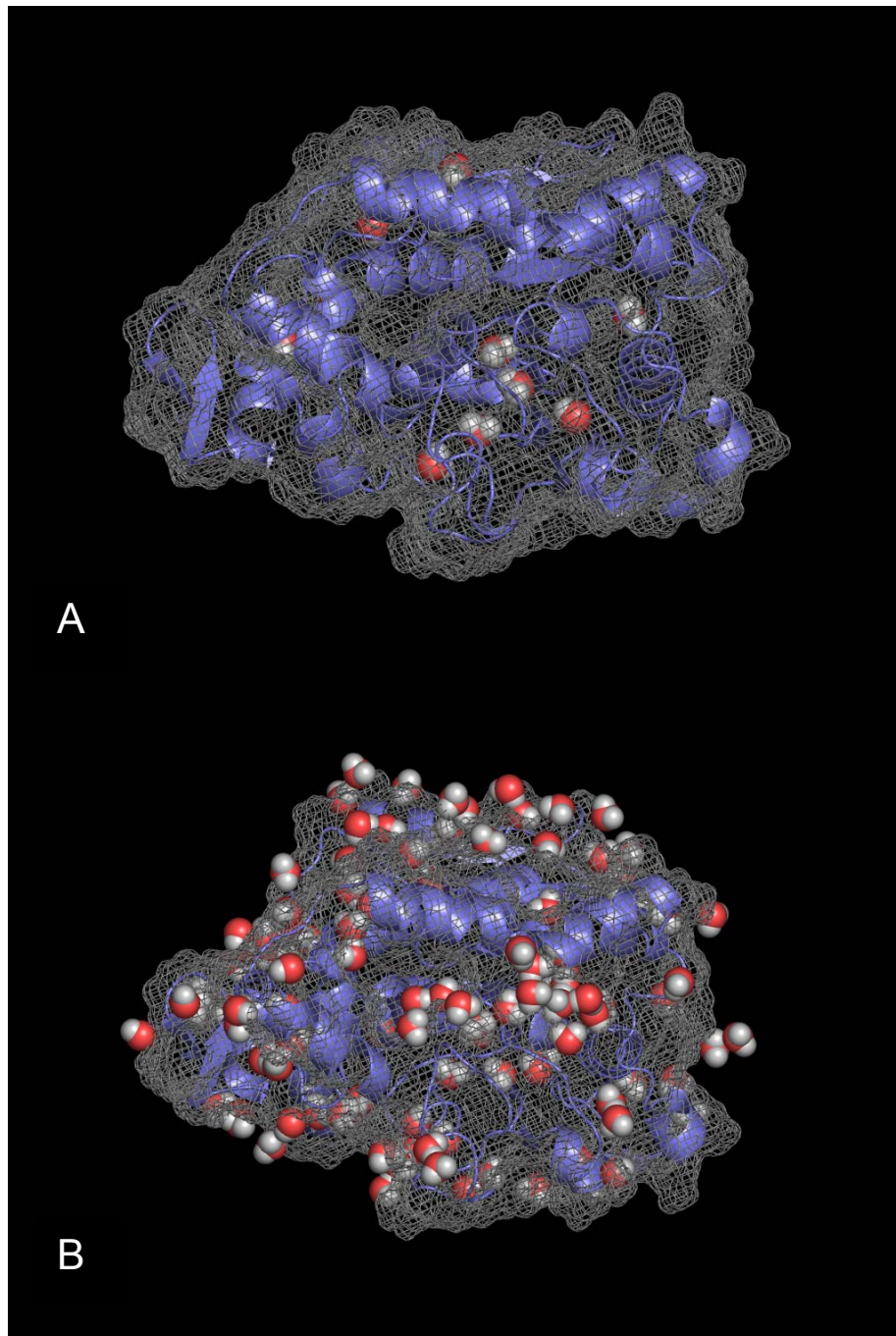


Abbildung 24 Aufenthalt der gering beweglichen Wassermoleküle (Darstellung als rote und weiße Kugeln) während der Simulation an der Oberfläche und innerhalb von CALB in Wasser (A) und in Cyclohexan (B).

Das aktive Zentrum war für alle verwendeten Lösungsmittel zugänglich. Visuelle Betrachtung zeigte, dass auch organische Lösungsmittelmoleküle ins aktive Zentrum diffundieren und im Zeitrahmen der Simulation auch wieder verlassen können. Während den Simulationen waren im Durchschnitt ein Toluol- (neben 5 Wassermolekülen), ein Cyclohexan- (neben 6 Wassermolekülen), ein Isopentan-

(neben 6 Wassermolekülen), ein Chloroform- (neben 5 Wassermolekülen) und 5 Methanol-Moleküle (neben 2 Wassermolekülen) im aktiven Zentrum. Durch unpolare Lösungsmittelmoleküle wurde kein Wasser im aktiven Zentrum verdrängt, Methanol als polares Lösungsmittel konnte im Durchschnitt vier Wassermoleküle im aktiven Zentrum ersetzen. Auf der Oberfläche von CALB gibt es keine größeren hydrophilen *patches* (Abbildung 22), deshalb waren Wassermoleküle über die gesamte Oberfläche von CALB verteilt. Das Wassernetzwerk der wenig beweglichen und langsam ausgetauschten Wassermoleküle war flexibel, deshalb änderten sich die besetzten Bindungsstellen der Wassermoleküle in verschiedenen Simulationen des gleichen Systems. In WAT und in MET, in denen die Wassermoleküle beweglicher waren, konnte ein solches umspannendes Wassernetzwerk nicht beobachtet werden. In Simulationen in unpolaren organischen Lösungsmitteln gab es solch ein umspannendes Wassernetzwerk, das sich über die gesamte Oberfläche von CALB erstreckte. Das Ausmaß der umspannenden Wassernetzwerke korrelierte mit der Anzahl der langsam ausgetauschten Wassermoleküle. In CHE war das Wassernetzwerk stärker ausgeprägt als in CL3. In CHE bestand das umspannende Wassernetzwerk aus 103 Wassermolekülen (Abbildung 25) die an die Oberfläche des Proteins gebunden waren und durch weitere Wassermoleküle überbrückt wurden. Neben den entstandenen Wasserclustern gab es zusätzlich einzelne gering bewegliche Wassermoleküle an der Oberfläche. Die beobachteten Wassernetzwerke waren in jeder Simulation des gleichen Systems unterschiedlich, das Ausmaß der Bildung dieses Wassernetzwerks war allerdings vergleichbar. Durch die geringere Anzahl der weniger beweglichen Wassermoleküle an der Oberfläche von CALB in TOL, ISO, und CL3, nimmt das Ausmaß des umspannenden Wassernetzwerks mit abnehmendem logP ab. Ein solches umspannendes Wassernetzwerk konnte in den Simulationen in MET und WAT deshalb nicht beobachtet werden. Die Anzahl der Cluster hing, wie die Anzahl der langsam ausgetauschten Wassermoleküle, vom Lösungsmittel ab. In Lösungsmitteln mit niedrigen Dielektrizitätskonstanten waren die Zahl gering beweglicher Wassermoleküle und die Zahl der Wassermoleküle in Wasserclustern erhöht. In den Simulationen von CALB in CHE wurden acht Cluster beobachtet (Abbildung 25). Zwei typische Cluster sollen den Aufbau dieser Cluster verdeutlichen.

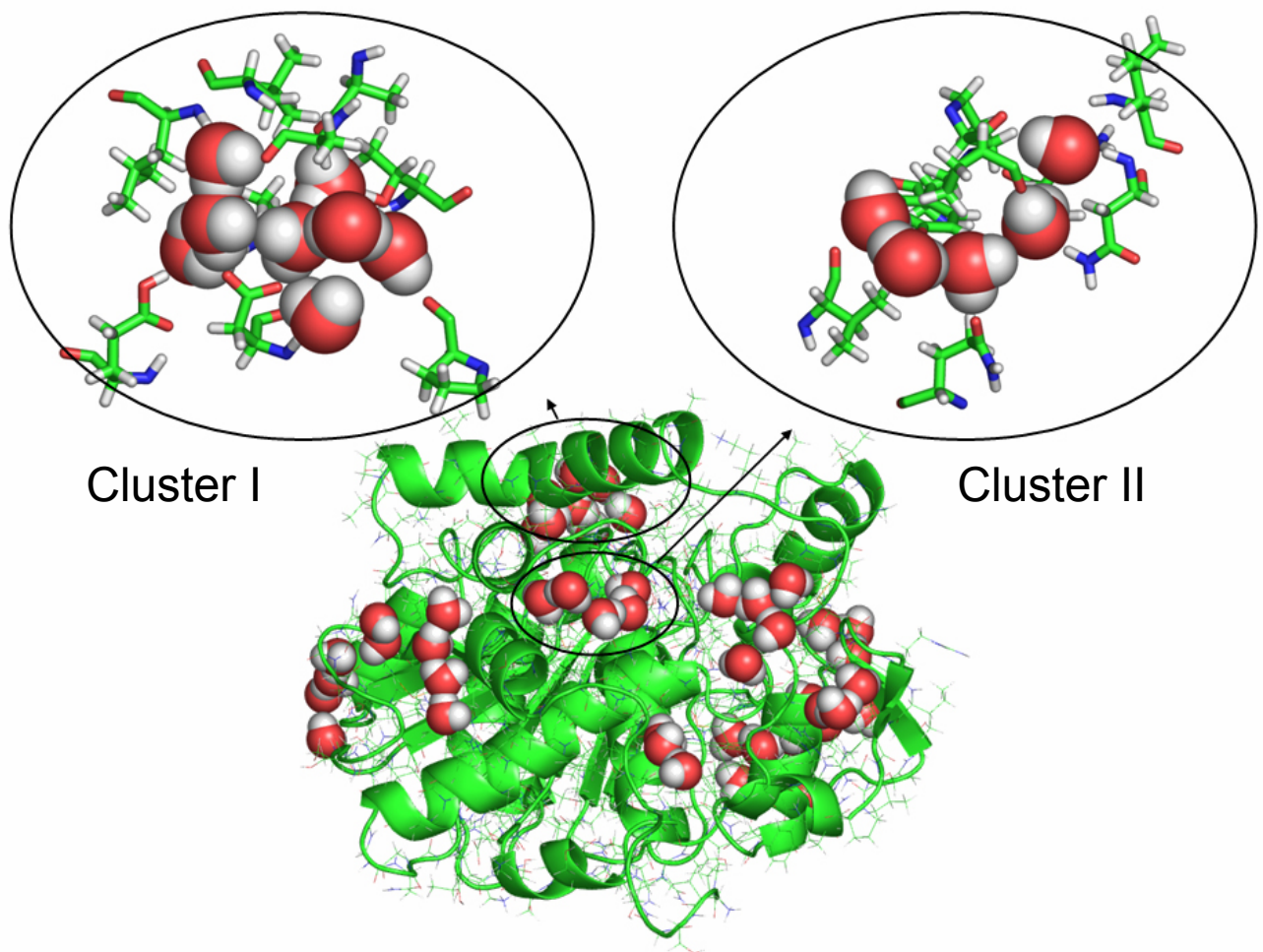


Abbildung 25 Wassercluster an der Oberfläche von CALB in der Simulation in Cyclohexan und die ausgewählten repräsentativen Cluster I und II.

Cluster I (Abbildung 26) bestand aus 8 Wassermolekülen. In diesem Cluster waren 5 Wassermoleküle an das Protein gebunden und verankerten die Cluster durch polare und geladene Gruppen von Seitenketten und *backbone*, drei weitere Wassermoleküle überbrückten diese gebundenen Wassermoleküle, waren aber selber nicht direkt ans Protein gebunden (Tabelle 3). In Cluster I waren die Wassermoleküle 2, 4 und 7 überbrückende Wassermoleküle und hatten keine Bindung zum Protein.

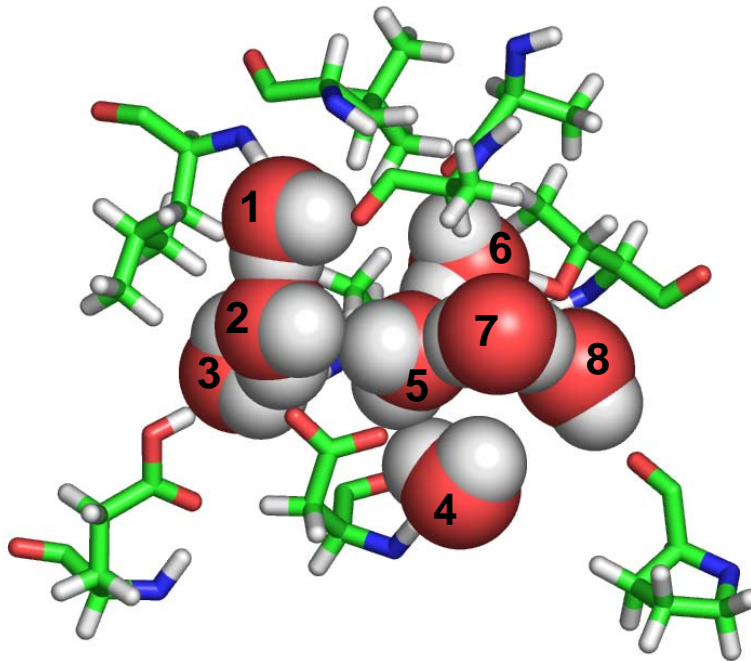


Abbildung 26 Räumliche Struktur des Wasserclusters I in der Simulation von CALB in Cyclohexan, Wassermoleküle sind als rote und weiße Kugeln dargestellt.

Tabelle 3 Koordination der Wassermoleküle des Cluster I:

Wassermolekül	Bindung 1	Bindung 2	Bindung 3	Bindung 4
1	Glu188 Seitenkette	Asp223 Seitenkette	Ala225 <i>backbone</i>	Wasser 2
2		Wasser 1	Wasser 3	Wasser 4
3	Leu278 <i>backbone</i>	Leu277 <i>backbone</i>	Ala275 <i>backbone</i>	Wasser 2
4	Wasser 3	Wasser 5	Wasser 7	Wasser 8
5	Thr229 Seitenkette	Ala274 <i>backbone</i>	Wasser 4	Wasser 6
6	Pro260 <i>backbone</i>	Wasser 5	Wasser 7	
7	Wasser 4	Wasser 5	Wasser 6	Wasser 8
8	Asp223 <i>backbone</i>	Asp223 Seitenkette	Wasser 6	Wasser 7

Cluster II (Abbildung 27) bestand aus 5 Wassermolekülen. 4 Wassermoleküle waren an die Proteinoberfläche gebunden und durch ein weiteres Wassermolekül 2 verbunden, dieses Wassermolekül, hatte selbst keine Bindung an die Proteinoberfläche (Tabelle 4).

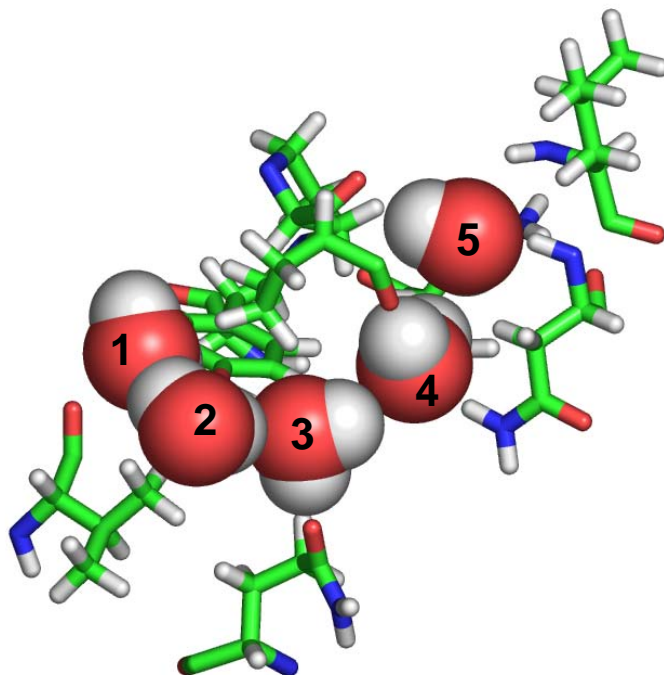


Abbildung 27 Räumliche Struktur des Wasserclusters II in der Simulation von CALB in Cyclohexan, Wassermoleküle sind als rote und weiße Kugeln dargestellt.

Tabelle 4 Koordination der Wassermoleküle des Cluster II:

Wassermolekül	Bindung 1	Bindung 2	Bindung 3	Bindung 4
1	Val15 <i>backbone</i>	Tyr82 Seitenkette	Wasser 2	
2	Wasser 1	Wasser 3		
3	Gln11 Seitenkette	Tyr82 Seitenkette	Wasser 2	Wasser 4
4	Asn74 Seitenkette	Pro69 <i>backbone</i>	Wasser 3	Wasser 5
5	Pro68 <i>backbone</i>	Asn74 <i>backbone</i>	Asn74 Seitenkette	Wasser 4

Durch die hohe Mobilität der Wassermoleküle war es schwierig die komplette Struktur des Netzwerks über das Protein, das sich zeitlich änderte, darzustellen. Die Wassercluster in CHE (Abbildung 25) zeigen eine Momentaufnahme dieses Wassernetzwerks.

4.2 Untersuchung der Grenzflächenaktivierung durch langzeit Simulationen von *Burkholderia cepacia* Lipase

Von *Burkholderia cepacia* Lipase (BCL) gibt es bereits mehrere aufgeklärte Kristallstrukturen. Die bekannten Kristallstrukturen (2LIP, 3LIP, 4LIP, 5LIP, 1HQD, 1OIL, 1YS1 und 1YS2) [33] [144] [145] [39] [146] unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Konformation. Die vorhandenen Kristallstrukturen von BCL unterscheiden sich in ihrem RMSD für die *backbone* Atome im Bereich von 0.2 bis 0.5 Å, alle Kristallstrukturen stellen die offene Konformation von BCL dar. Das erstellte Homologiemodell (Abbildung 28) der geschlossenen Konformation von BCL unterschied sich von der offenen Kristallstruktur in der Lage des *lids* (AS 129-168), da im Gegensatz zur Kristallstruktur das *lid* im Homologiemodell geschlossen war. Geringere Unterschiede gab es weiterhin in der Lage des β -*hairpin loop* (AS 218-223) und in kleinen *loops* (AS 50-59 und AS 17-27), der RMSD des Homologiemodells zur Kristallstruktur 3LIP betrug 1.0 Å.

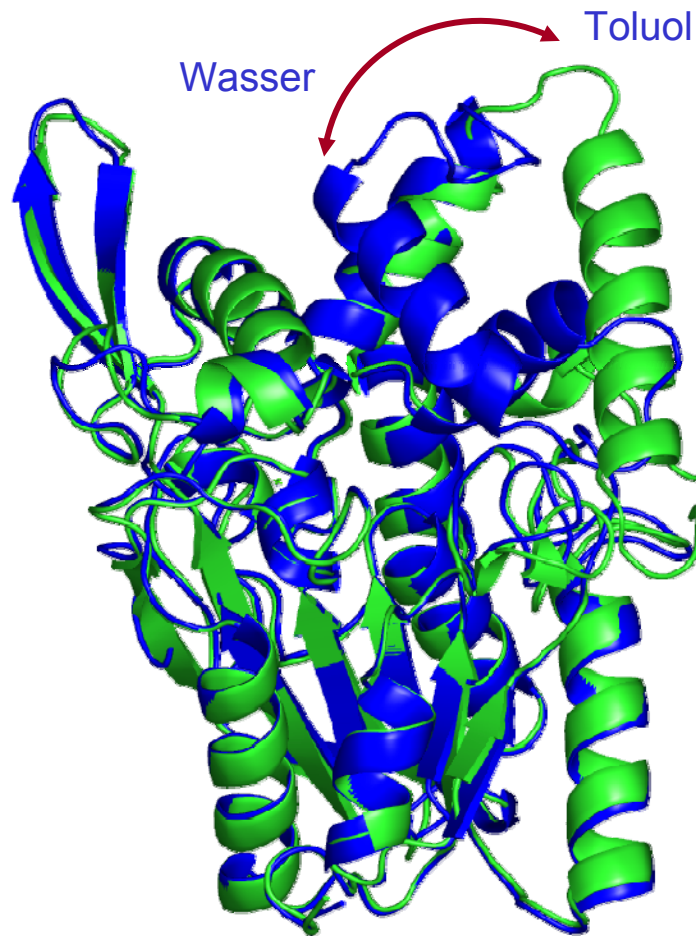


Abbildung 28 Offene Kristallstruktur 3LIP von BCL (grün) und Homologiemodell von BCL in der geschlossenen Konformation (blau).

In allen zwölf durchgeführten Simulationen erhielt man am Ende der Simulationen equilibrierte Konformationen die sich durch einen konstanten RMSD auszeichneten. Die Simulationen unter Verwendung verschiedener Startbedingungen des gleichen Systems zeigten Unterschiede im Durchlaufen des Konformationsraums, waren aber reproduzierbar und zeigten letztendlich die gleichen Konformationsänderungen. Der RMSD von *backbone* Atomen von geschlossenem und offenem BCL in Wasser und Toluol während der Simulation von 30 ns im Vergleich zur Startstruktur unterschied sich je nach System. Der RMSD der geschlossenen Konformation von BCL in Wasser betrug 2.7 Å und in Toluol 3.1 Å. Der RMSD der offenen Konformation von BCL in Wasser betrug 2.1 Å und in Toluol 1.7 Å. Das Calcium-Ion verließ die Calcium-Bindetasche in einer Simulation nach 26 ns in der geschlossenen Konformation von BCL in Wasser. Die Calcium-Bindestelle war in den anderen Simulationen stabil, dieser

stabilisierende Bereich in BCL zeigte eine geringe Flexibilität im Vergleich mit dem *lid* oder dem β -*hairpin loop*.

Der β -*hairpin loop* (AS 218-223) war ein sehr flexibles Element in BCL und zeigte Unterschiede in der Bewegung in Wasser und Toluol. In den Simulationen von offenem und geschlossenem BCL in Toluol blieb die Lage des β -*hairpin loop*, trotz der hohen Flexibilität, weitgehend unverändert zur Startstruktur. In den Simulationen von offenem und geschlossenem BCL in Wasser bewegte sich β -*hairpin loop* meistens vom aktiven Zentrum weg. Es gab geringe Unterschiede in den verschiedenen Simulationen der gleichen Systeme, das Gesamtverhalten von BCL in diesen Simulationen war aber gleich.

4.2.1 Simulationen der geschlossenen Konformation in Wasser

In Simulationen in Wasser war die geschlossene Konformation wie erwartet bevorzugt, eine Öffnung des *lids* konnte nicht beobachtet werden und BCL blieb in der geschlossenen Konformation (Abbildung 29). Der RMSD der geschlossenen Konformation von BCL während der Simulation in Wasser über 30 ns von der Startstruktur war mit 2.7 Å allerdings recht hoch.

Die geschlossene Konformation in Wasser zeigte in mehreren Bereichen eine Deformation. Der Kern war sehr stabil, eine Deformation war hauptsächlich an *loops* der Oberfläche, besonders am β -*hairpin loop* und dem *loop* zwischen den Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ im *lid* zu beobachten, Sekundärstrukturelemente blieben weitgehend konserviert. Im Vergleich zu den anderen Simulationen scheint das Homologiemodell in der geschlossenen Konformation von BCL in Wasser nicht gut an das Lösungsmittel angepasst zu sein. Die Öffnung des *lids* konnte nicht beobachtet werden, im Gegensatz dazu nahm der Abstand des *lids* in geschlossenem BCL von AS 250 C _{α} zu AS 138 C _{α} während der Simulation in Wasser, von 6.4 Å auf 5.9 Å, um weitere 0.5 Å ab. Der *loop* zwischen Helix $\alpha 4$ und $\alpha 5$ im *lid* von BCL bewegte sich ebenfalls in Richtung der geschlossenen Konformation. Dies wurde durch den Abstand von AS 132 C _{α} im *loop* zwischen Helix $\alpha 4$ und Helix $\alpha 5$ von der offenen Kristallstruktur zur simulierten Struktur von 5.7 Å deutlich. Die Lage von Helix $\alpha 5$ war unverändert, während Helix $\alpha 4$ in Richtung des N-terminus eine geringe Bewegung der AS 115-130 von 5 Å zeigte und in Richtung C-Terminus unverändert blieb.

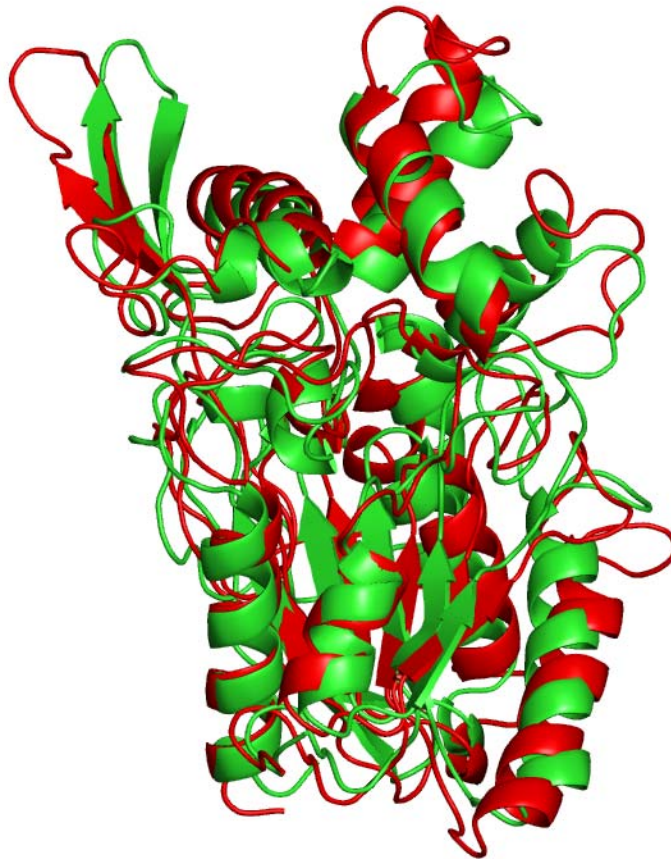


Abbildung 29 Geschlossene Konformation von BCL nach der Simulation von 30 ns in Wasser (rot) im Vergleich mit der geschlossenen Kristallstruktur (grün).

Die B-Faktoren, als Maß für die Flexibilität von geschlossenem BCL, gemittelt über alle Simulationen des gleichen Systems, wurden für die Simulationen in Wasser dargestellt (Abbildung 30). Die Flexibilität von geschlossenem BCL in Wasser war doppelt so hoch, wie die Flexibilität der offenen Konformation in Toluol. Flexible Bereiche von geschlossenem BCL in Wasser waren vorwiegend *loops* an der Oberfläche, während die meisten Sekundärstrukturelemente weniger flexibel waren. Die Helices α_6 und α_7 unterhalb des *lids* (AS 146-189) waren in der Simulation von geschlossenem BCL in Wasser zusätzlich flexibel. In den Simulationen von geschlossenem BCL und der Kristallstruktur der offenen Konformation waren das *lid* und der β -*hairpin loop* sehr flexible Bereiche. Die Flexibilität war jedoch in allen Bereichen der Struktur in den Simulationen höher als in der Kristallstruktur. Phe221 zwischen den beiden Faltblättern des β -*hairpin loop* zeigte hierbei die höchste Flexibilität aller Aminosäuren. In geschlossenem

BCL unterschied sich die Flexibilität in manchen Bereichen von der geöffneten Kristallstruktur von BCL, stärker flexible Bereiche waren vorwiegend der *loop* (AS 49-60) und die Helix α_7 (AS 169-179) an der Oberfläche, Sekundärstrukturelemente waren weniger flexibel.

In manchen Bereichen der simulierten Struktur gab es eine hohe Abweichung von der Startstruktur, diese zeigten besonders der stark flexible β -*hairpin loop*, das *lid* durch die Bewegung und weitere kleinere *loops* an der Oberfläche (AS 48-61, AS 152-166, AS 170-184, AS 184-193 und AS 228-240). Der β -*hairpin loop* (AS 218-223) war ein flexibles Element in BCL und bewegte sich während der Simulation um maximal 9.6 Å (der Durchschnitt der Simulationen betrug 7.6 Å) weg vom aktiven Zentrum und vom *lid*.

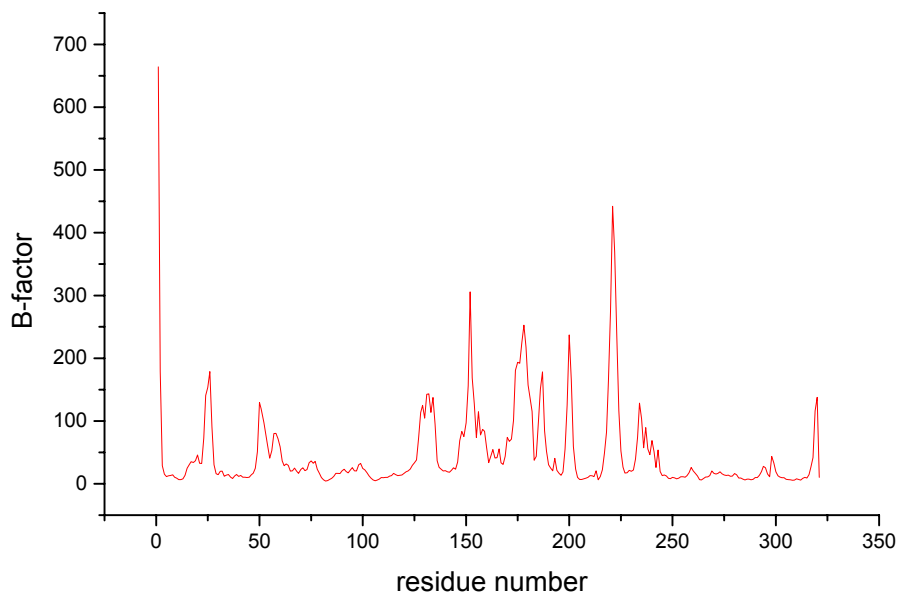


Abbildung 30 Flexibilität der Aminosäuren der geschlossenen Konformation von BCL in Wasser gemittelt über die letzten 20 ns der Simulationen.

In der geschlossenen Konformation in Wasser wurde die Wasserstoffbrücke zwischen Asp130 und Thr132/Ser135/Thr136, die in der offenen Konformation in Toluol vorhanden war, teilweise gebrochen und Bindungen ergaben sich zu Wassermolekülen des Lösungsmittels. In der Kristallstruktur und dem erstellten Homologiemodell bildete Asp130 nur schlecht Wasserstoffbrücken zu Thr132/Ser135/Thr136 und wurde schlecht koordiniert.

4.2.2 Simulation der geschlossenen Konformation in Toluol

Das erstellte Homologiemodell der geschlossenen Konformation von BCL wurde in der Simulation als Startstruktur verwendet. Das Homologiemodell zeigte keinen signifikanten Unterschied zum Kern der offenen Kristallstruktur (Abbildung 28). Unterschiede gab es, abgesehen von der offenen und geschlossenen Konformation des *lids*, in der Lage des flexiblen β -*hairpin loop* und kleinerer *loops* an der Oberfläche. Der RMSD von geschlossenem BCL während der Simulation von 30 ns in Toluol zeigte mit 3.1 Å eine große Abweichung von der Startstruktur. In der Simulation von geschlossenem BCL in Toluol nahm der RMSD innerhalb der ersten 19 ns kontinuierlich zu, bis zu einem RMSD der *backbone* Atome von der Startstruktur von 2.6 Å. Nach 19 ns gab es einen Sprung um 0.5 Å. In den restlichen 11 ns der Simulation blieb der RMSD nahezu unverändert (Abbildung 31).

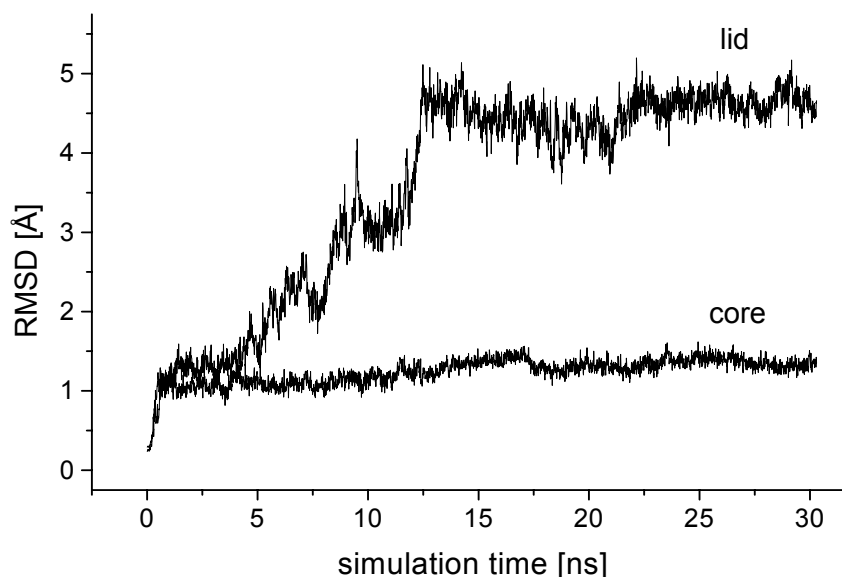


Abbildung 31 RMSD der geschlossenen Konformation von BCL von der Startstruktur während der Simulation in Toluol.

Die Gesamtenergie des Systems nahm während der Simulation nach der *restraint* Phase um 150 kcal/mol durch die Anpassung von BCL an das umgebende Lösungsmittel ab (Abbildung 32).

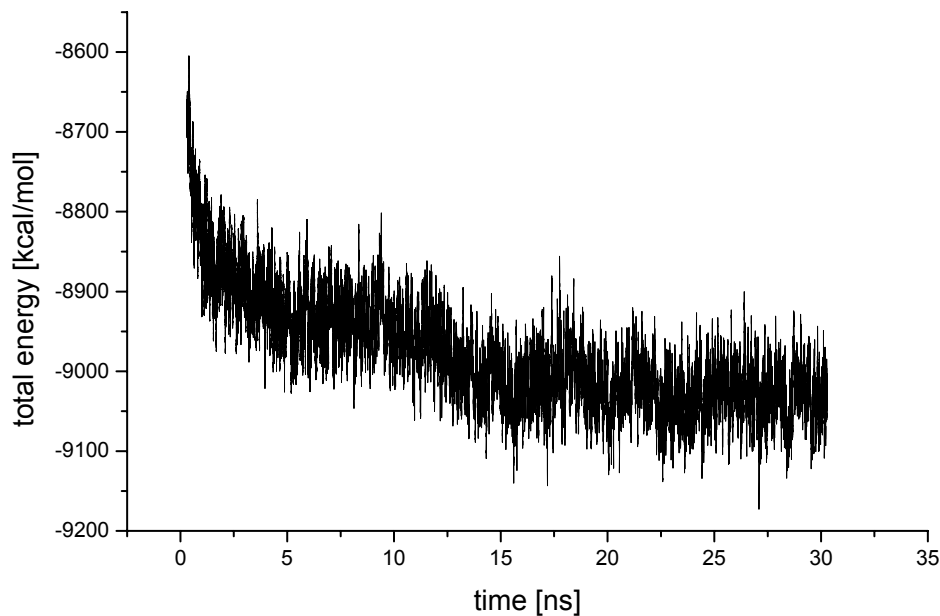


Abbildung 32 Verlauf der Gesamtenergie der geschlossenen Konformation von BCL in Toluol während der Simulation von 30 ns.

In Übereinstimmung mit dem Verlauf der *lid*-Öffnung war BCL nach dem Öffnen des *lids* durch eine einheitliche Konformation gekennzeichnet, ersichtlich durch den grünen Bereich in den letzten 8 ns der Simulation im 2DRMS (Abbildung 33), bei dem jede Konformation mit allen anderen Konformationen der Simulation verglichen wurde. Die ersten 12 ns zeichneten sich durch eine starke Veränderung der Konformation durch die Bewegung des *lids* aus, während der weiteren Simulation war das *lid* weitgehend geöffnet und damit die Konformationen untereinander ähnlicher. Nach 22 ns konnte keine weitere Öffnung des *lids* beobachtet werden.

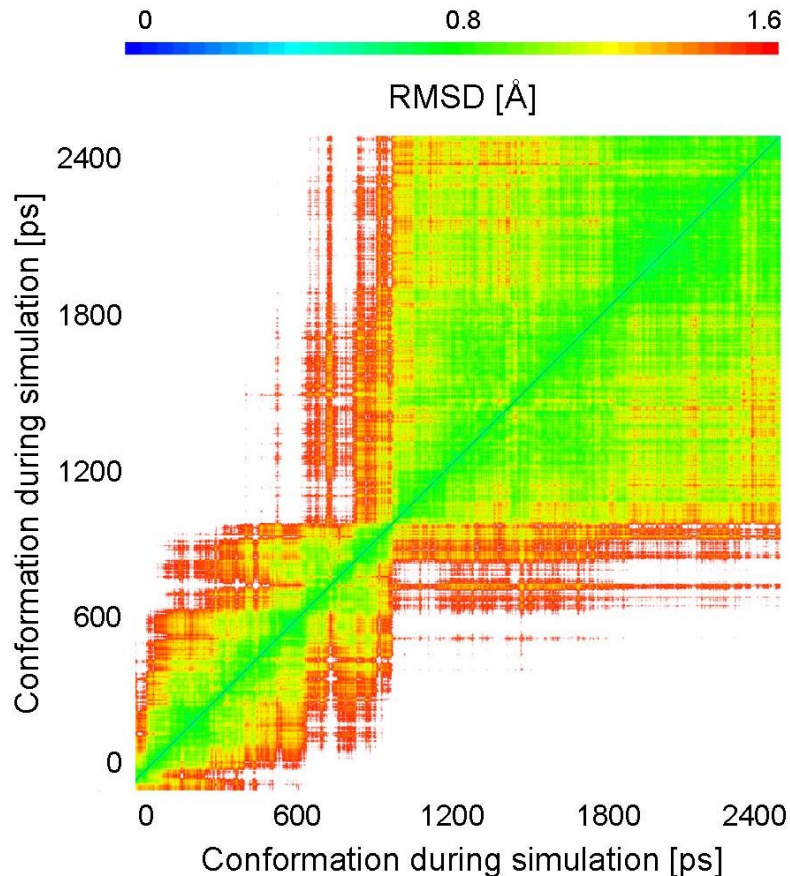


Abbildung 33 2D-RMSD der Öffnung der geschlossenen Konformation von BCL in Toluol während der Simulation über 30 ns. Im 2D-RMSD wird die mittlere quadratische Abweichung jeder Konformation zu allen anderen Konformationen einer Simulation berechnet.

Die Bewegung des *lids* von der geschlossenen zur offenen Konformation während der Simulation in Toluol wurde von AS 250 C_α zu AS 138 C_α gemessen (Abbildung 34), das *lid* bewegte sich um 24 Å. Der Abstand während der Bewegung des *lids* korrelierte mit dem Verlauf des RMSD (Abbildung 31). Das *lid* bewegte sich durch den Einfluss des Lösungsmittels, die Öffnung des *lids* war ohne ein gebundenes Substrat möglich. Dies ist nach unserer Kenntnis die größte Bewegung eines *lids* die bisher in MD Simulationen beobachtet wurde. Die Bewegung des *lids* war in den ersten 12 ns der Simulation schnell, die folgende Bewegung im Bereich von 12 bis 22 ns wesentlich langsamer, bis schließlich eine Barriere erreicht wurde. Der Vorgang der *lid*-Öffnung umfasste die Bewegung der Helix α5, der *loop* zwischen Helix α4 und α5 wurde dazu gestreckt. Es konnte keine Entfaltung von Sekundärstrukturelementen während der Bewegung des *lids* beobachtet werden. Das *lid* öffnet sich in allen Simulationen von geschlossenem BCL in Toluol. Der

Vorgang der *lid*-Öffnung ist auf der angehängten CD (bcl_lidbewegung.avi) zu sehen.

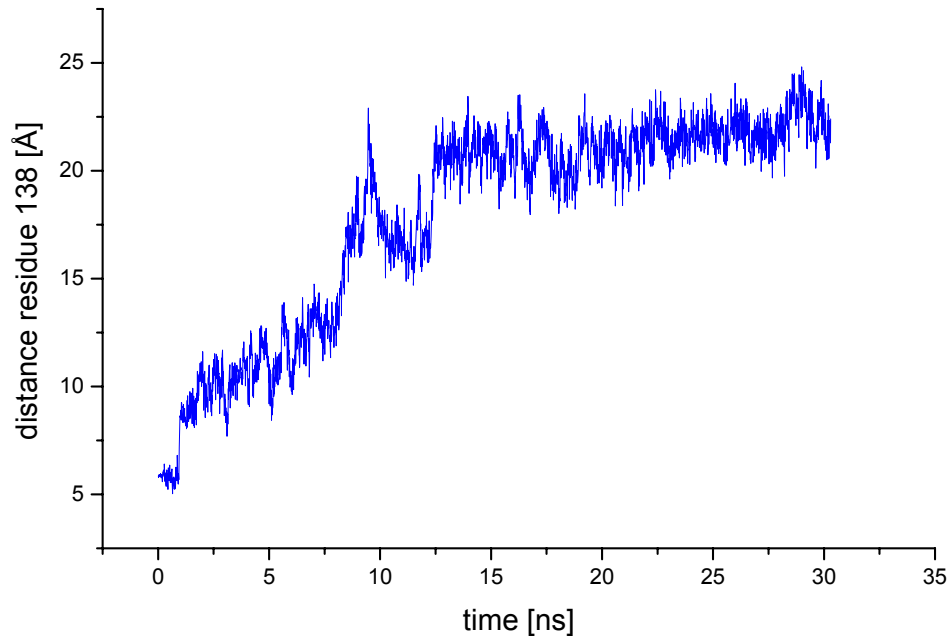
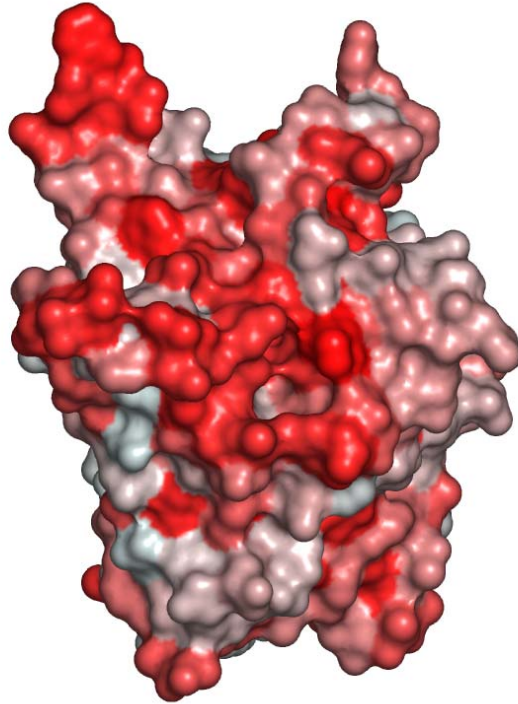


Abbildung 34 Bewegung des *lids* während der Simulation der geschlossenen Konformation von BCL in Toluol über 30 ns, der Abstand wurde zwischen AS 250 C_α und AS 138 C_α gemessen.

Die Oberfläche der geöffneten Kristallstruktur von BCL ist 300 \AA^2 größer als die Oberfläche des geschlossenen Homologiemodells von BCL, die Oberfläche der Kristallstruktur beträgt 13309 \AA^2 und die des geschlossenen Homologiemodells 12978 \AA^2 , der Oberflächenanteil der hydrophoben Aminosäuren ist in der offenen Kristallstruktur 1100 \AA^2 größer. Der Verlauf der Änderung der hydrophoben Oberfläche wurde während den Simulationen verfolgt (Abbildung 36). In der geschlossenen Konformation war die Oberfläche hydrophober als in der geschlossenen Konformation, die Zunahme der hydrophoben Oberfläche kam vorwiegend durch die Eigenschaften des *lids*. In der geschlossenen Konformation (Abbildung 35) war das *lid* an seiner äußeren Seite hydrophil, während der Bewegung zur geöffneten Konformation wurde die hydrophobe Innenseite des *lids* dem organischen Lösungsmittel exponiert (Abbildung 36). Das *lid* wurde hierbei durch die hydrophoben Wechselwirkungen stabilisiert.

A



B

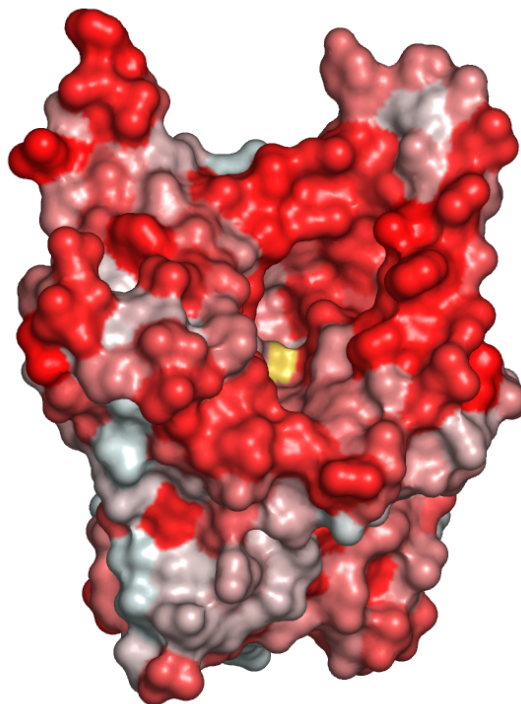


Abbildung 35 Oberfläche der geschlossenen (A) und offenen (B) Konformation von BCL gefärbt nach Hydrophobizität (hydrophobe AS sind rot gefärbt, hydrophile AS sind weiß gefärbt).

In den ersten 12 ns der Simulation nahm die hydrophobe Oberfläche durch die schnelle Öffnung des *lids*, in Korrelation mit der Öffnung des *lids*, stark zu (Abbildung 36). Anschließend nahm der hydrophobe Oberflächenanteil bis zum Ende der Simulation langsamer zu. Am Ende der Simulation hatte der hydrophobe Oberflächenanteil im Vergleich zur Startstruktur um 1100 \AA^2 zugenommen. Weiträumige Effekte durch das Lösungsmittel sind für die *lid*-Öffnung verantwortlich.

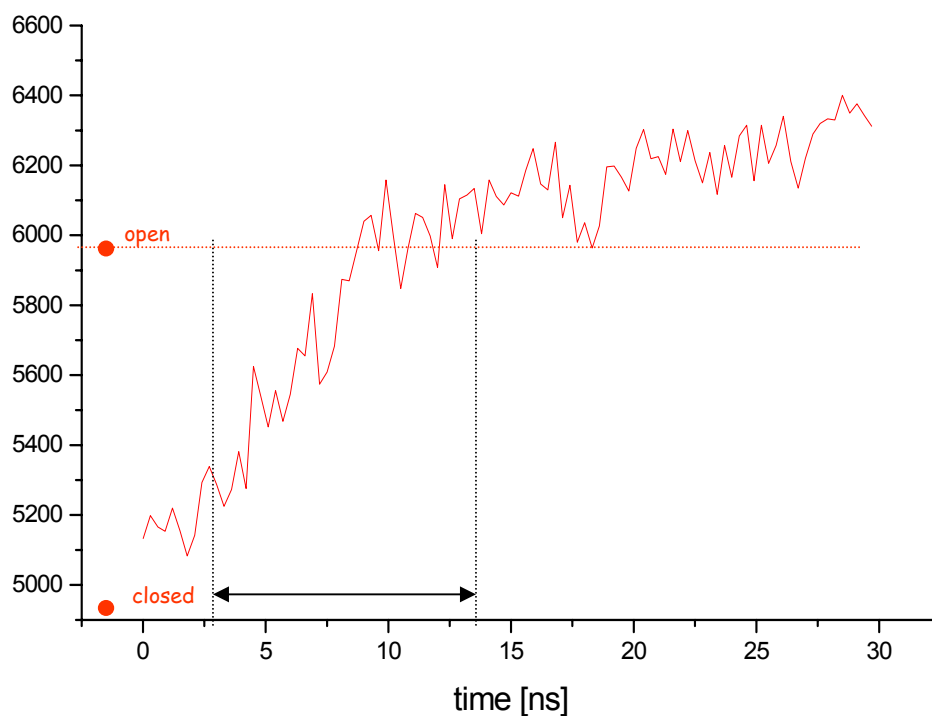


Abbildung 36 Zunahme der hydrophoben Oberfläche von geschlossenem BCL während der Simulation in Toluol über 30 ns.

Die Grenzflächenaktivierung von BCL schloss die Umlagerung der Helix $\alpha 5$ des *lids* und des *loops* zwischen Helix $\alpha 4$ und $\alpha 5$ ein (Abbildung 37), die Sekundärstrukturelemente blieben während der Umlagerung erhalten. Es gibt drei Gelenke die bei der Umlagerung notwendig sind, dazu gehören der *loop* zwischen Helix $\alpha 4$ und $\alpha 5$ (AS 129-133), der *loop* zwischen Helix $\alpha 5$ and $\alpha 6$ (AS 152-159) und Leu167. Der *loop* zwischen Helix $\alpha 4$ und $\alpha 5$ wird gestreckt, um die Bewegung der Helix $\alpha 5$ zu ermöglichen. Der β -*hairpin loop* (AS 218-223) war ein sehr flexibles Element in BCL, zeigte aber in Simulationen in Toluol, im Gegensatz zu den Simulationen in Wasser, keine gerichtete Bewegung in eine bestimmte Richtung.

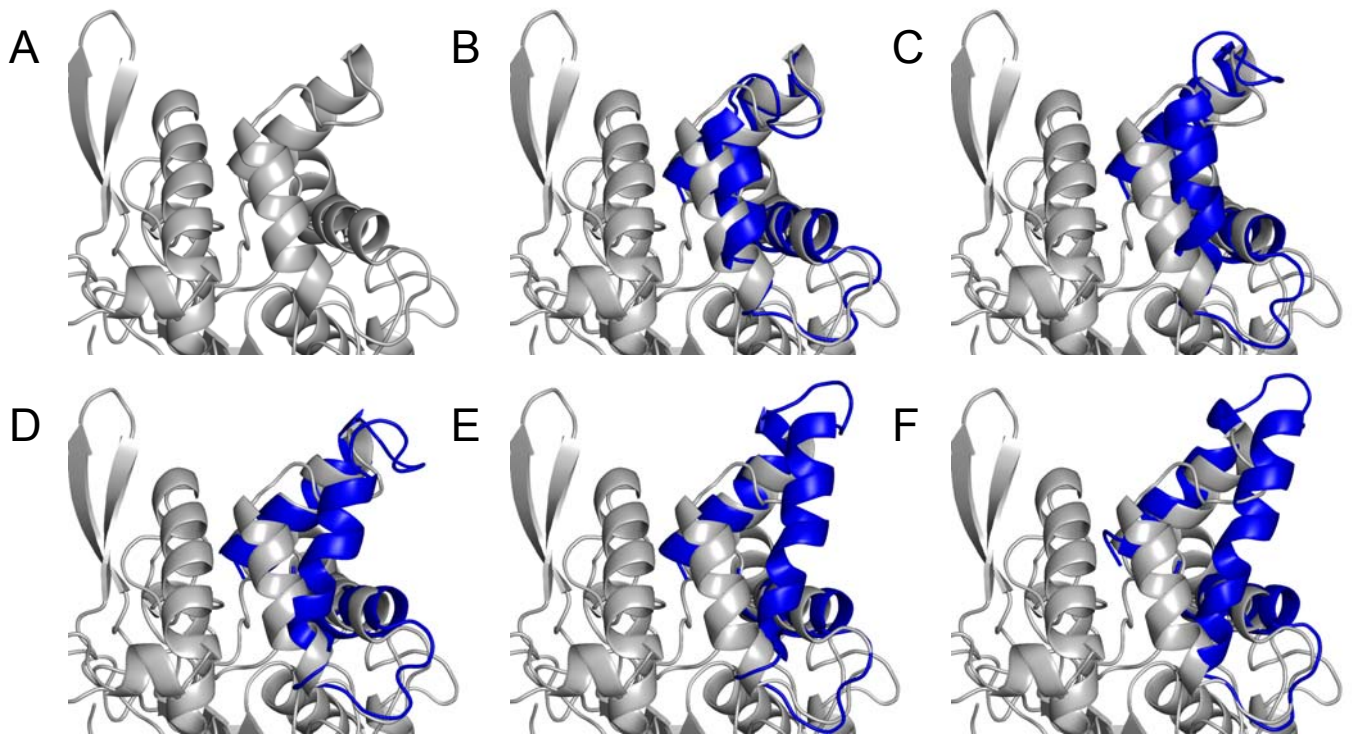


Abbildung 37 Konformationen des *lids* aus der Simulation von geschlossenem BCL in Toluol, zu Beginn der Simulation (A) und nach 3 ns (B), 7 ns (C), 10 ns (D), 17 ns (E) und 30 ns (F).

Das Asp130 des *loops* zwischen Helix $\alpha 5$ und $\alpha 6$ bildete eine Wasserstoffbrücke zu Thr132 und Ser135 und gegen Ende der Öffnung auch zu Ser136, diese Wasserstoffbrücken war während der kompletten Öffnung des *lids*, mehr oder weniger stark ausgeprägt, vorhanden. Das gut koordinierte Asp130 schien die offene Konformation zu stabilisieren, dies war in Wasser durch die mögliche Koordination mit Wassermolekülen aus dem Lösungsmittel nicht möglich. Im erstellten Homologiemodell war diese Wasserstoffbrücke durch die räumliche Orientierung der Seitenketten, nicht vorhanden, die Wasserstoffbrücke wurde aber auch während der Simulation von der geschlossenen zur offenen Konformation gebildet. In der Simulation wurde außerdem eine Salzbrücke zwischen Asp121 und Arg258 gebildet. Diese Salzbrücke am Gelenk des *lids* war in allen erhältlichen Kristallstrukturen von BCL und im erstellten Homologiemodell nicht vorhanden, wurde aber in allen simulierten Strukturen von der geschlossenen zur offenen Konformation von BCL in Wasser und Toluol gebildet und verhinderte eine starke Bewegung von Helix $\alpha 4$ in diesem Bereich. Die vollständige Öffnung des *lids* wurde in der Simulation durch Helix $\alpha 6$ blockiert

und verhinderte die weitere Bewegung von Helix $\alpha 5$ zur vollständig geöffneten Konformation (Abbildung 38). Die Aminosäuren Thr156, Asn157, Gln158 und Asp159 der Helix $\alpha 6$ waren an der Blockierung des *lids* beteiligt und müssten die Sekundärstruktur auflösen, um eine Weiterbewegung des *lids* zu ermöglichen. In der Kristallstruktur war die Helix $\alpha 6$ genau um diese Aminosäuren kürzer als im erstellten Homologiemodell, das auf der Lipase aus *Burkholderia glumae* als *template* beruhte und ebenfalls die verlängerte Helix zeigte.

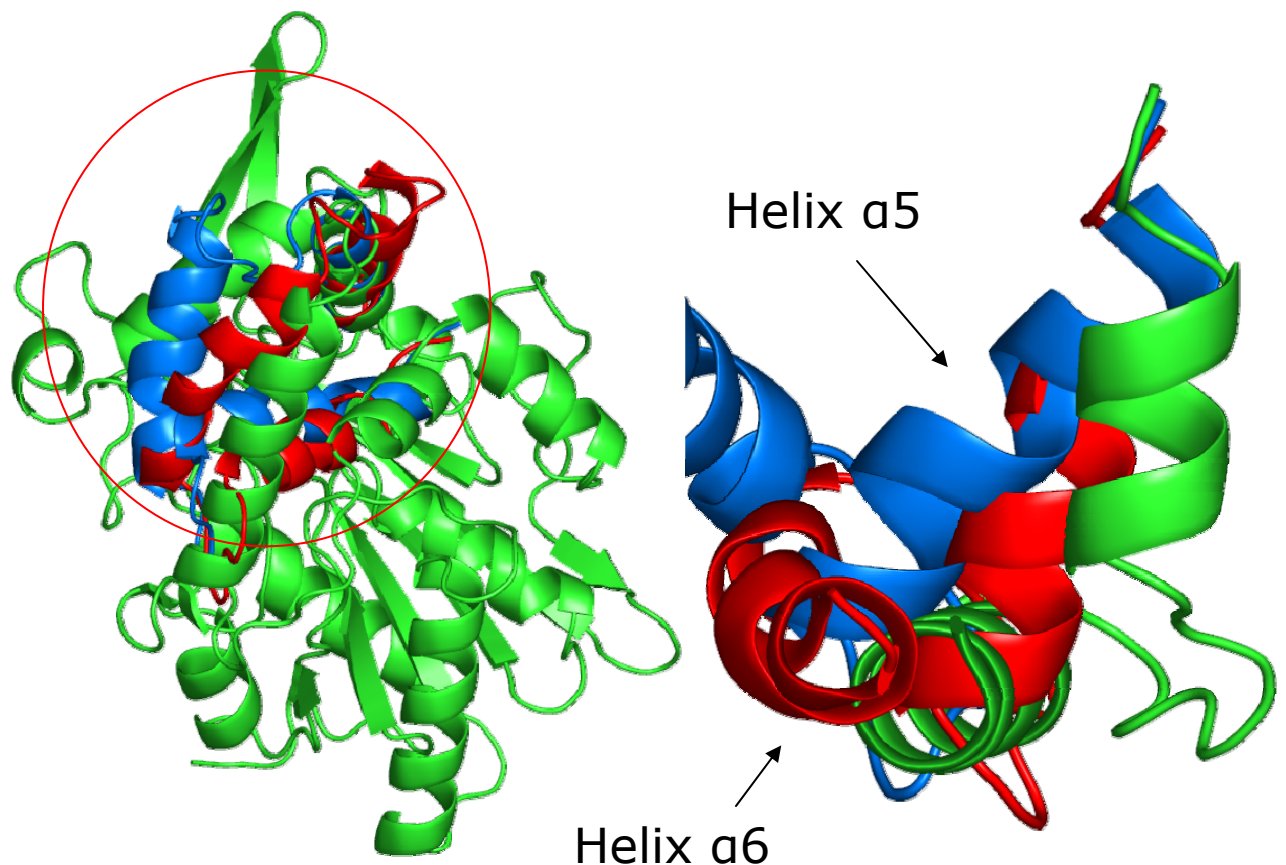


Abbildung 38 Die vollständige Öffnung des *lids* durch die Bewegung von Helix $\alpha 5$ wurde in der Simulation von Helix $\alpha 6$ blockiert, geschlossenes Homologiemodell (blau) geöffnete Kristallstruktur (grün) und Konformation nach 30 ns Simulation (rot).

4.2.3 Simulation der offenen Konformation in Wasser

In Simulationen von offenem BCL in Wasser wurde wie erwartet ein geringfügiges Schließen des *lids* beobachtet. Der RMSD der offenen Konformation zur Startstruktur von BCL in Wasser betrug 2.1 Å. Der Abstand von AS 250 C_α zu AS 138 C_α nahm in der Simulation von 24.4 Å auf 18.6 Å ab, das *lid* schloss sich damit um weitere 5.8 Å. Der Abstand von AS 132 C_α im *loop* zwischen Helix α4 und Helix α5 von der offenen Kristallstruktur zur simulierten Struktur betrug am Ende der Simulation 12.3 Å und zeigte damit ebenfalls eine deutliche Schließbewegung an. Im Vergleich zum nahezu vollständigen Öffnen der geschlossenen Konformation in Toluol, konnte der vollständige Schließvorgang von offenem BCL in Wasser, trotz einer für Simulation großen Bewegung, nicht beobachtet werden. Der *β-hairpin loop* war in offenem BCL in Wasser ein sehr flexibles Element und bewegte sich um maximal 7.2 Å (im Durchschnitt der Simulationen um 5.3 Å) weg vom aktiven Zentrum und vom *lid*.

Die Reversibilität des Vorgangs der *lid*-Öffnung wurde in weiteren Simulationen durch Wechsel des Lösungsmittels nach dem Öffnen in Toluol zu Wasser untersucht. Mehrere Konformationen aus der Öffnung des *lids* in Toluol innerhalb der Simulationszeit von 6 bis 30 ns wurden als Startkonformation ausgewählt. In allen Simulationen konnte nach dem Wechsel des Lösungsmittels ein unterschiedlich starkes Schließen des *lids*, der zuvor in Toluol geöffnete Konformationen, beobachtet werden (Tabelle 5). Im Gegensatz dazu öffnete sich das *lid* in den weitergeführten Simulationen in Toluol. In Abhängigkeit von der gewählten Konformation aus den Simulationen in Toluol schloss sich das *lid* zwischen 1.2 und 8.8 Å, gemessen durch den Abstand zwischen AS 250 C_α und AS 138 C_α. Die Bewegung kam wie auch schon bei der Öffnung des *lids* durch Helix α5 zustande, Helix α9 (AS 242-259) auf der entgegengesetzten Seite des *lids* bewegte sich nicht. Der Vorgang der *lid*-Öffnung von der geschlossenen Konformation in Toluol war in der Simulation und im Experiment reversibel.

Tabelle 5 Schließbewegung des *lids* von BCL nach Wechsel des Lösungsmittels von Toluol zu Wasser, gemessen durch den Abstand von AS 250 C_α zu AS 138 C_α. Die Startkonformationen wurden aus der Simulation von geschlossenem BCL in Toluol nach verschiedenen Zeitschritten gewählt. Die Simulationen wurden jeweils über 3 ns durchgeführt:

Konformation von BCL aus Toluol nach [ns]	6.7	10	13.3	16.7	20	23.3	26.7	30
Abstand vor der Simulation in Wasser [Å]	11.7	18	17.9	20.3	18.9	22.1	21.6	22.2
Abstand nach der Simulation in Wasser [Å]	8.9	14	12	11.9	17.7	15.9	16.3	15.4
Änderung des Abstands [Å]	2.8	4	5.9	8.4	1.2	6.2	5.3	8.8

In der Simulation von offenem BCL in Wasser war Asp130 durch Seitenketten oder *backbone* Atome nicht gut koordiniert, wie es bereits in der Simulation von geschlossenem BCL oder in der Kristallstruktur beobachtet wurde.

4.2.4 Simulation der offenen Konformation in Toluol

In einer hydrophoben Umgebung ist die offene Konformation von BCL bevorzugt, da das *lid* in der offenen Konformation durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird. In der Simulation der offenen Kristallstruktur in Toluol blieb das *lid* wie nach 30 ns erwartet geöffnet, zeigte allerdings am Ende der Simulation eine etwas stärkere Öffnung als in der Kristallstruktur (Abbildung 39). Der RMSD der offenen Konformation von BCL in Toluol betrug 1.7 Å im Vergleich zur Kristallstruktur. Der Abstand von AS 250 C_α zu AS 138 C_α, um den sich das *lid* weiter von der Kristallstruktur öffnete, nahm um 3 Å, von 24.3 Å auf 27.3 Å, zu. Der Abstand von AS 132 im *loop* des *lids* von der Kristallstruktur zur simulierten Struktur betrug 10.7 Å. Während der weiteren Öffnung des *lids* nahm die hydrophobe Oberfläche erneut um 80 Å² zu.

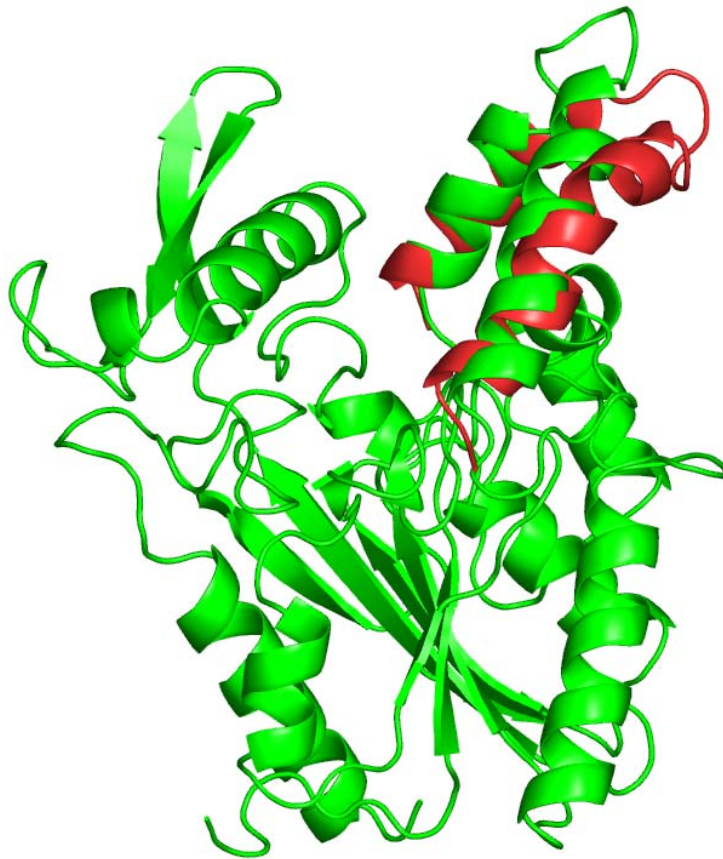


Abbildung 39 Weitere Öffnung der offenen Kristallstruktur von BCL (grün) in der Simulation in Toluol (rot)

Die Untersuchung der Kristallstruktur von BCL ergab, dass Kristallkontakte zwischen dem hydrophoben β -hairpin loop (AS 213-229) mit seinen zwei antiparallelen β -Faltblättern zur Helix α 4 des lids (AS 118-127) und Helix α 9 (AS 243-256) des nächsten Monomers mit jeweils hydrophoben Bereichen vorhanden sind (Abbildung), Helix α 5 zeigt Kristallkontakte zu seinem Äquivalent des nächsten Monomers. Der Abstand zwischen zwei Monomeren im Kristall zwischen dem β -hairpin loop und lid betrug mindestens 2.6 Å. Die Kristallkontakte können einen stabilisierenden Effekt auf die offene Konformation des lids haben und in der Kristallstruktur das vollständige Öffnen des lids, wie es in den Simulationen zu sehen war, verhindern. In der Kristallstruktur der geschlossenen Konformation von BGL, das als *template* zur Erstellung des Homologiemodells von geschlossenem BCL diente, gab es keine Kristallkontakte zwischen lid und β -hairpin loop.

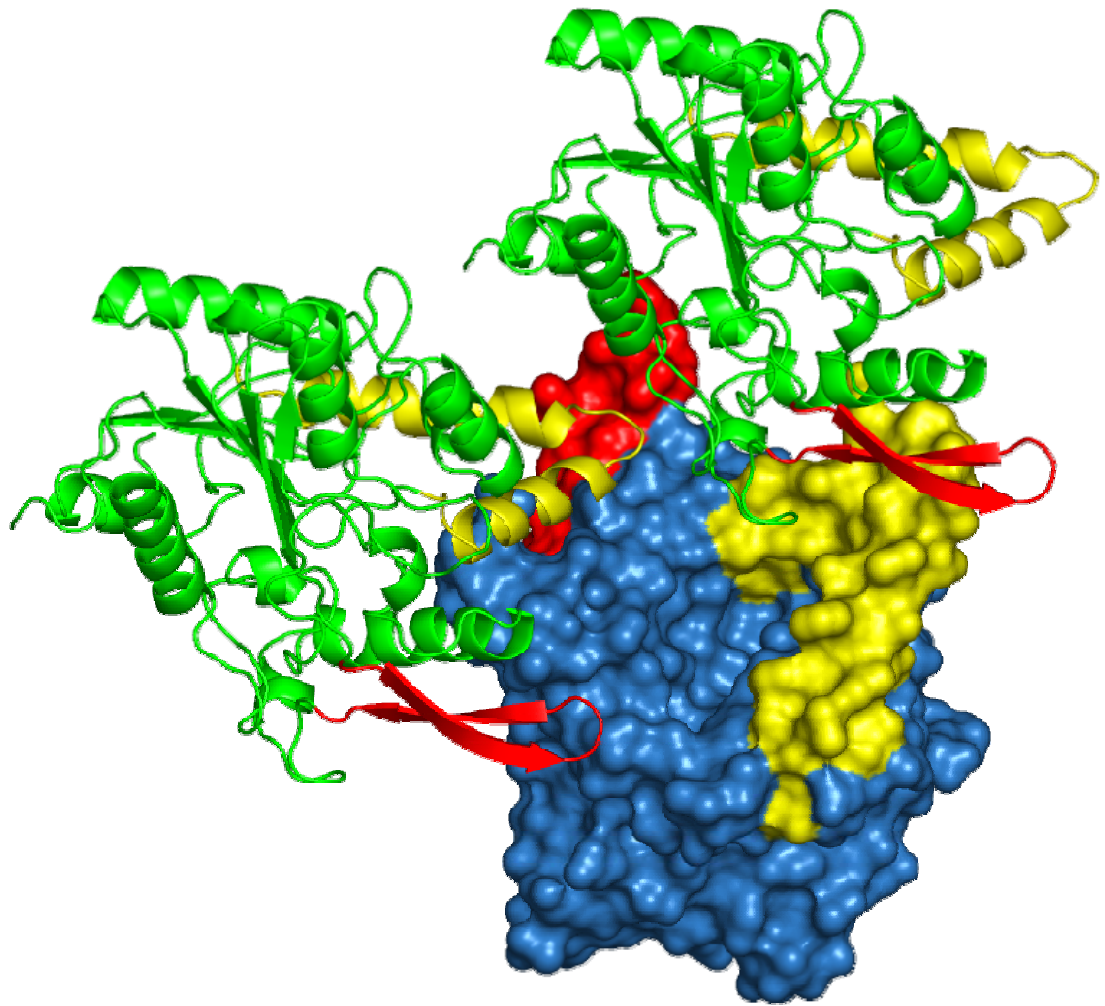


Abbildung 40 Kristallkontakte in der Kristallstruktur von BCL, β -hairpin loop (gelb) und lid (rot) bilden Kristallkontakte zum nächsten Monomer.

Das elektrostatische Potential von BCL wurde auf der Oberfläche abgebildet (Abbildung 41). Das lid hat bei pH 7 eine negative Ladung von -3 und der β -hairpin loop ist schwach positiv geladen. Das positive elektrostatische Potential wird durch die Lage des β -hairpin loop in der Struktur noch verstärkt (Abbildung 42). Die Wechselwirkung zwischen dem negativen Potential am lid und dem positiven Potential des β -hairpin loop führen zu den beobachteten Kristallkontakten dieser Region, das lid und der β -hairpin loop können sich gegenseitig stabilisieren.

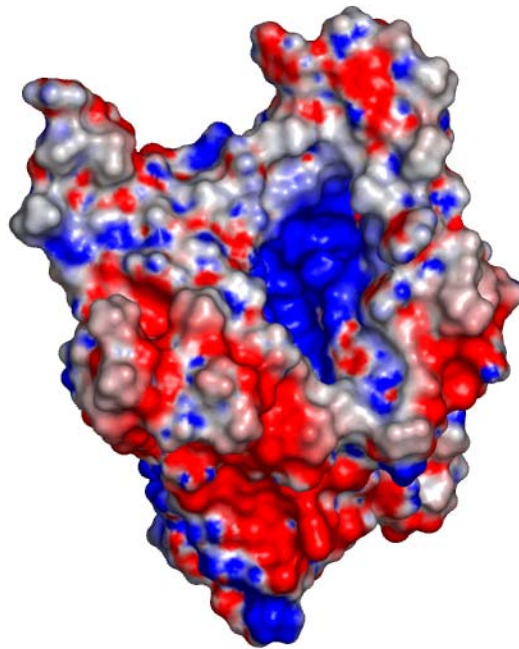


Abbildung 41 Die Oberfläche von BCL gefärbt nach elektrostatischem Potential bei ± 1 kT/e (negatives Potential rot, positives Potential blau gefärbt).

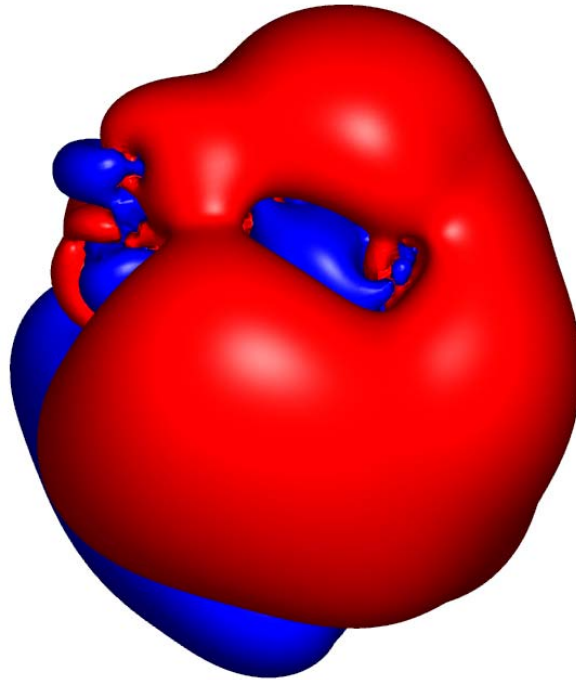


Abbildung 42 *Isosurfaces* des elektrostatischen Potentials von BCL bei 0.05 kT/e (blau) und - 0.05 kT/e (rot). Die Lage von BCL ist identisch mit der in Abbildung 41.

Die B-Faktoren der Aminosäuren aus der Simulation von offenem BCL in Toluol gemittelt über verschiedene Startbedingungen wurden berechnet (Abbildung 43). Besonders flexible Bereiche waren das *lid* mit den Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ (AS 125-139), der β -*hairpin loop* mit den Faltblättern $\beta 3$ und $\beta 4$ (AS 218-223) und ein weiterer *loop* an der Oberfläche (AS 198-203). Bereiche, die in der Kristallstruktur durch zwischenmolekulare Kristallkontakte stabilisiert werden, waren in Lösung besonders beweglich (Abbildung 44). Phe221 zwischen den beiden Faltblättern im β -*hairpin loop* zeigte die höchste Flexibilität aller Aminosäuren in BCL. Die Flexibilität aus den Simulationen stimmte mit der Flexibilität in der Kristallstruktur [33] gut überein. Die Bereiche mit höherer Flexibilität waren in der Simulation und in der Kristallstruktur nahezu gleich, die B-Faktoren zeigten in ihrer Höhe allerdings Unterschiede zur Kristallstruktur. Die Flexibilität der Simulationen von geschlossenem BCL in Wasser war ungefähr doppelt so hoch wie die der Simulation von offenem BCL in Toluol, obwohl beide die in dem jeweiligen Lösungsmittel günstigere Konformation darstellen. Die

allgemein geringere Flexibilität in organischen Lösungsmitteln wurde in dieser Arbeit auch schon für CALB beobachtet (Tabelle 1).

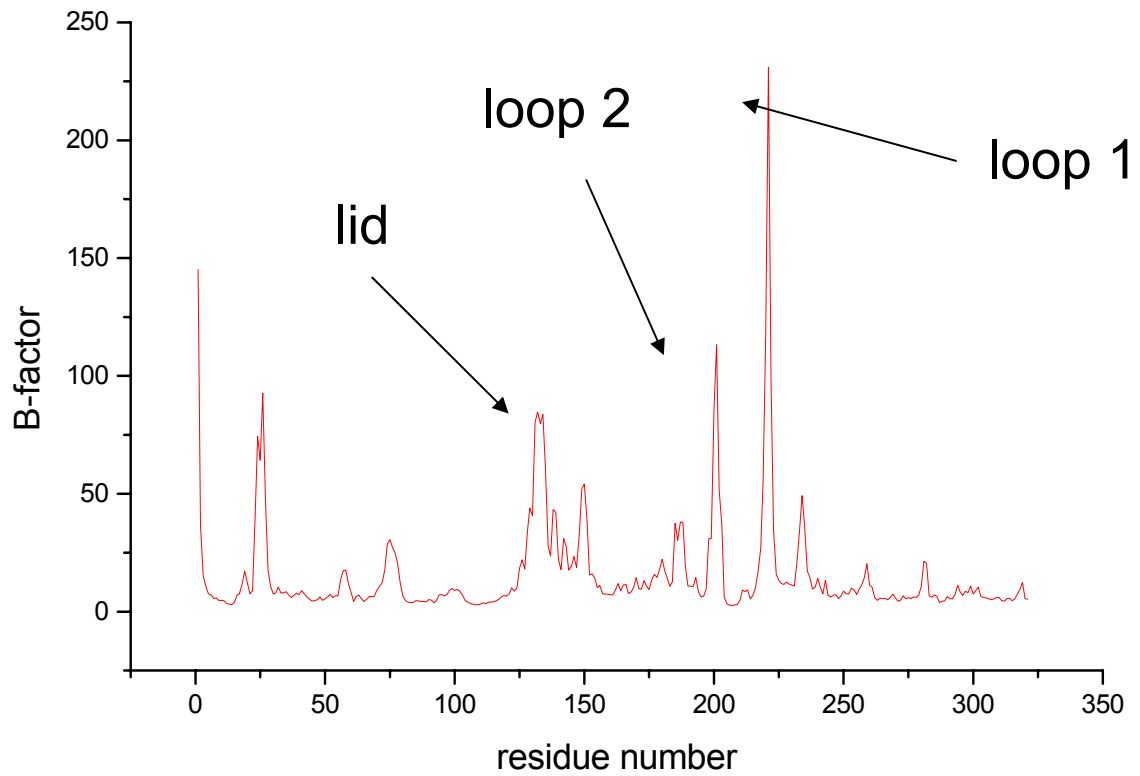


Abbildung 43 Flexibilität der offenen Konformation von BCL in Toluol berechnet pro Aminosäure über 20 ns der Simulation.

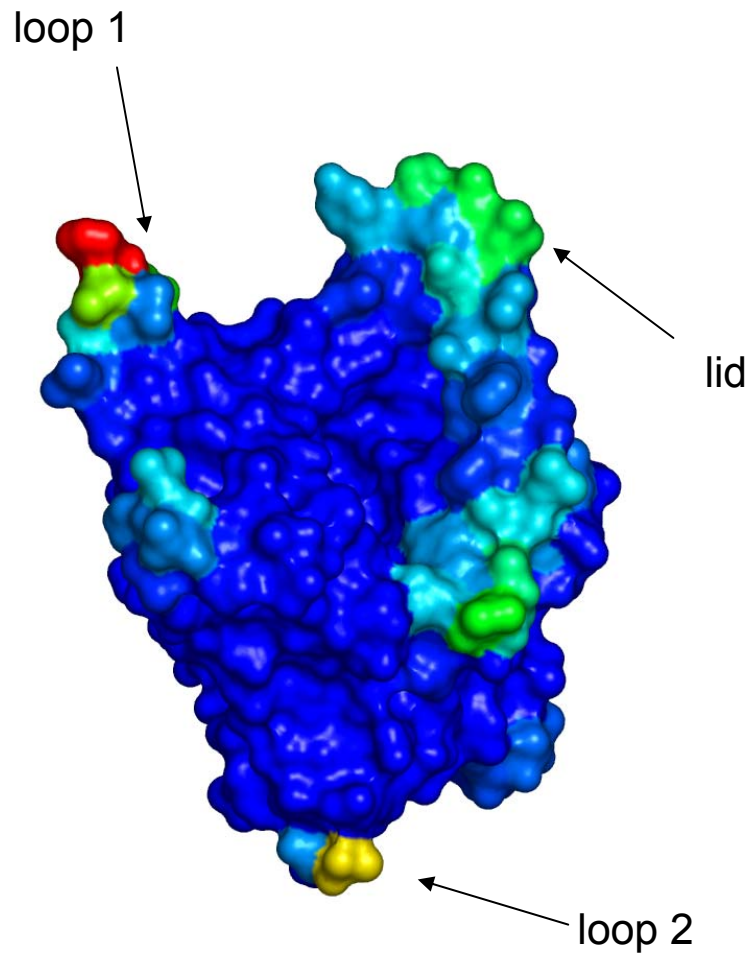


Abbildung 44 Die Oberfläche von BCL gefärbt nach der Flexibilität der offenen Konformation in Toluol (die Flexibilität nimmt von blau über grün, gelb nach rot zu).

Der β -hairpin loop ist in Toluol flexibel, zeigt aber keine gerichtete Bewegung, im Gegensatz zu den Simulationen in Wasser. Innerhalb des loops zwischen Helix $\alpha 5$ und $\alpha 6$ ist Asp130 durch die Bildung von Wasserstoffbrücken durch Seitenketten und backbone Atomen von Thr132/Ser135/Thr136 gut koordiniert.

4.3 Rationales Design einer neuen einstufigen Aufreinigungsmethode für *Candida antarctica* Lipase B durch IEC

4.3.1 Expression von *Candida antarctica* Lipase B in *Pichia pastoris*

Neben der theoretischen Untersuchung der Struktur und der Dynamik von Lipasen in verschiedenen Lösungsmitteln wurden theoretische Untersuchungen auch zur praktischen Problemlösung, bei der Aufreinigung von CALB und zur Optimierung der Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch CALB, verwendet. Die Aufreinigung von CALB war schwierig, da CALB bei Standardbedingungen nicht auf Säulen in der Ionen-Austausch Chromatographie und der Hydrophoben-Interaktions Chromatographie gebunden werden konnte. Die Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch CALB sollte für einen biotechnologischen Prozess zur Herstellung der Monomere, die chemisch säurekatalysiert nur schwer zugänglich sind, optimiert werden.

Um ausreichende Proteinmengen von CALB zu erhalten wurde CALB in *P. pastoris* exprimiert. Die Expression von CALB in *P. pastoris* wurde sowohl im Schüttelkolbenmaßstab als auch im Fermentationsmaßstab durchgeführt. Das Gen der Lipase B aus *Candida antarctica* war bereits im Vorfeld der vorliegenden Arbeit kloniert worden [147]. Zur Expression von CALB in *P. pastoris* wurde der Vektor pPICZaA verwendet. Die Wachstums- und Expressionsbedingungen sind im Handbuch des pPICZaA Vektors (Invitrogen, Paisley, UK) beschrieben. Die Kultur wurde mit durch Monika Rusnak erstellten Glycerolstocks des WT und der Mutanten, vorgeschlagen durch rationales Design dieser Arbeit, angeimpft.

4.3.1.1 Expression von *Candida antarctica* Lipase B im Schüttelkolben

Nach sechs Tagen Expression wurden die Zellen durch Zentrifugieren vom Überstand getrennt. Der Überstand enthielt über 50 % CALB. Kleinere Peptide, vorwiegend aus dem Nährmedium, wurden durch Ultrafiltration mit einer

VivaSpin (VivaScience, 10kDa MWCO) entfernt. Die Expression der Lipasen wurde mittels SDS-PAGE der Kulturüberstände überprüft (Abbildung 45).

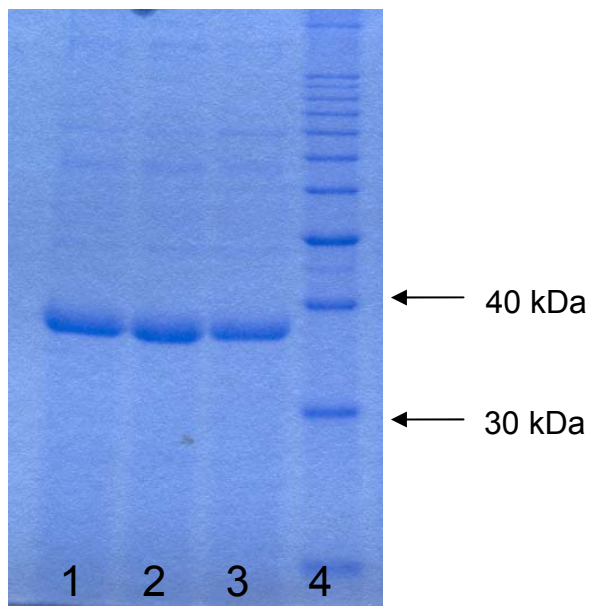


Abbildung 45 SDS-PAGE der Expression von CALB in *P. pastoris* im Schüttelkolben

Spur 1-3 Kulturüberstände nach der Expression von CALB unter Verwendung drei unterschiedlicher Glycerolstocks
 Spur 4 Gibco 10 kDa Proteinmarker

Nach Induktion mit Methanol war in der SDS-PAGE eine deutliche Bande von exprimiertem CALB zu erkennen, das theoretisches Molekulargewicht 33 kDa war durch Glykosylierung auf ungefähr 37 kDa erhöht [12]. CALB zeigte nach der Expression eine hohe Aktivität in der Hydrolyse von Tributyrin von 595,9 U/mg.

Tabelle 6 Übersicht über die Ausbeute der CALB Expression im Schüttelkolben:

OD ₆₀₀	~ 50
Aktivität [U/ml]	36.5
spezifische Aktivität [U/mg]	596

4.3.1.2 Fermentation von *Candida antarctica* Lipase B

Zur Steigerung der Proteinausbeute wurde eine Fermentation von CALB im 5 l Maßstab durchgeführt. Bei einer Aktivität zum Zeitpunkt der Ernte von 879 U/ml Fermentationsüberstand betrug die optische Dichte OD₆₀₀ 171. Das Verhältnis der Aktivität zur optischen Dichte und somit zur Biomasse konnte im Vergleich zur Expression im Schüttelkolben wesentlich erhöht werden (Tabelle 7). Gleichzeitig wurde die spezifische Aktivität von 596 U/mg auf 1953 U/mg erhöht. Die Biofeuchtmasse betrug 112 mg/ml und die Biotrockenmasse 29 mg/ml. Der Fermentationsüberstand wurde mit Hilfe eines *cross-flow* Filtersystems (10 kDa Membran) aufkonzentriert, in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 umgepuffert und bei 8°C gelagert. Die Gesamtproteinausbeute der Fermentation lag bei 0,45 g/l (Tabelle 7).

Tabelle 7 Übersicht über die Ausbeute der Fermentation von CALB. 1 U der Aktivität ist definiert als Umsatz von 1 µMol Tributyrin pro Minute:

	Fermentationsüberstand nach Ernte	Fermentationsüberstand nach Konzentration
Volumen [ml]	3600	850
Proteingehalt [mg/ml]	0,45	1,45
Gesamtprotein [mg]	1620	1230
Aktivität [U/ml]	879	4611
Aktivität gesamt [U]	3 160 000	3 910 000
spezifische Aktivität [U/mg]	1953	3176

4.3.2 Berechnung der Titrationskurve und des elektrostatischen Potentials bei verschiedenen pH Werten

Zur Entwicklung einer Aufreinigungsmethode von CALB wurde die Titrationskurve berechnet (Abbildung 46). In der berechneten Titrationskurve ist CALB bei niedrigen pH Werten bis zu einem pH Wert von 5 positiv geladen. Von pH 5 bis 8 ist CALB weitgehend neutral und zeigt einen flachen Verlauf im ungeladenen Bereich, es gibt keine Änderung im Protonierungszustand. Bei pH Werten größer als 8 ist CALB negativ, mit zunehmender negativer Ladung bei steigenden pH Werten, geladen. Der theoretische pI liegt bei 6.0. Bei pH 7 gibt es in CALB insgesamt 38 geladene Seitenketten, einschließlich des C- und N-Terminus. Die pKa-Werte der 18 negativ geladenen Seitenketten von 14 Asp liegen bei 2.4 bis 4.7 und der 4 Glu bei 3.2 bis 4.9. Die pKa-Werte der 18 positiv geladenen Seitenketten der 9 Lys liegen bei 10.4 bis 11.4 und der 8 Arg bei 11.8 bis 12.7, die des katalytischen His224 bei einem pKa-Wert von 8. Der N- und C-Terminus haben pKa-Werte von 8.4 und 3.4. Die pKa-Werte befinden sich also insgesamt im Bereich von 12.7 bis 8.0 und von 4.9 bis 2.4, es gibt damit keine protonierbaren Seitenketten mit einem pKa-Wert im Bereich von 4.9 bis 8.0.

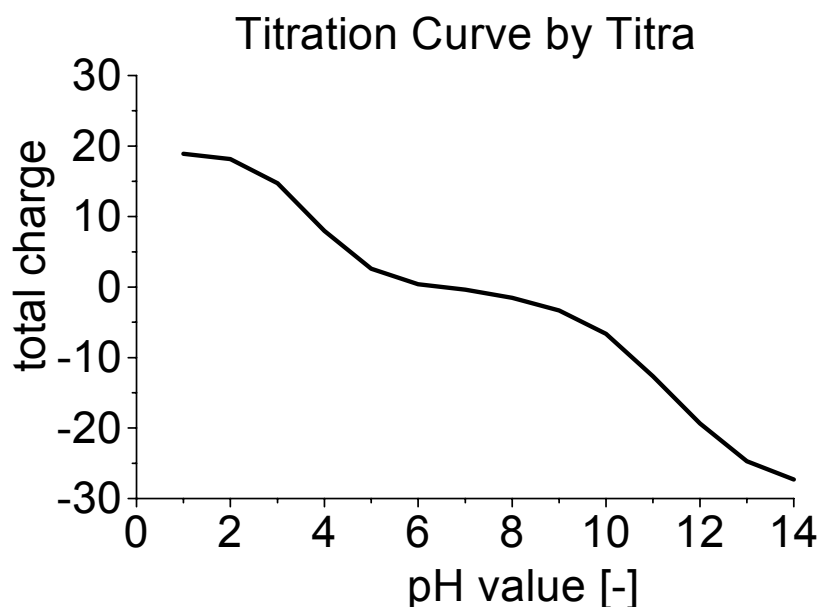


Abbildung 46 Berechnete Titrationskurve von CALB mit TITRA aus der Kristallstruktur 1TCA.

In der Struktur von CALB ist lediglich ein His enthalten. Dieses His befindet sich in der katalytischen Triade, im inneren des Proteins, und hat eine pKa-Verschiebung aufgrund seiner elektrostatischen Umgebung von 1.7, vom intrinsischen pKa von 6.3 zu einem pKa von 8. Diese pKa-Verschiebung des einzigen His in CALB und die gleiche Anzahl von positiv und negativ geladenen Aminosäuren bei pH 7 sind der Grund für den berechneten, ungewöhnlich breiten isoelektrischen Bereich. Aufgrund des Verlaufs der Titrationskurve sollte die Aufreinigung von CALB durch IEC in diesem isoelektrischen Bereich nicht möglich sein.

Die Titrationskurven wurden neben der Kristallstruktur auch für neun Konformationen aus der MD Simulation von CALB in Wasser berechnet. Die pKa-Werte unterscheiden sich besonders durch die Orientierung der Seitenketten [148] und damit auch von der Konformation des Proteins, da CALB aber keine signifikanten Änderungen in der Struktur zeigte (Abbildung 13) waren die Titrationskurven nahezu identisch (Abbildung 47).

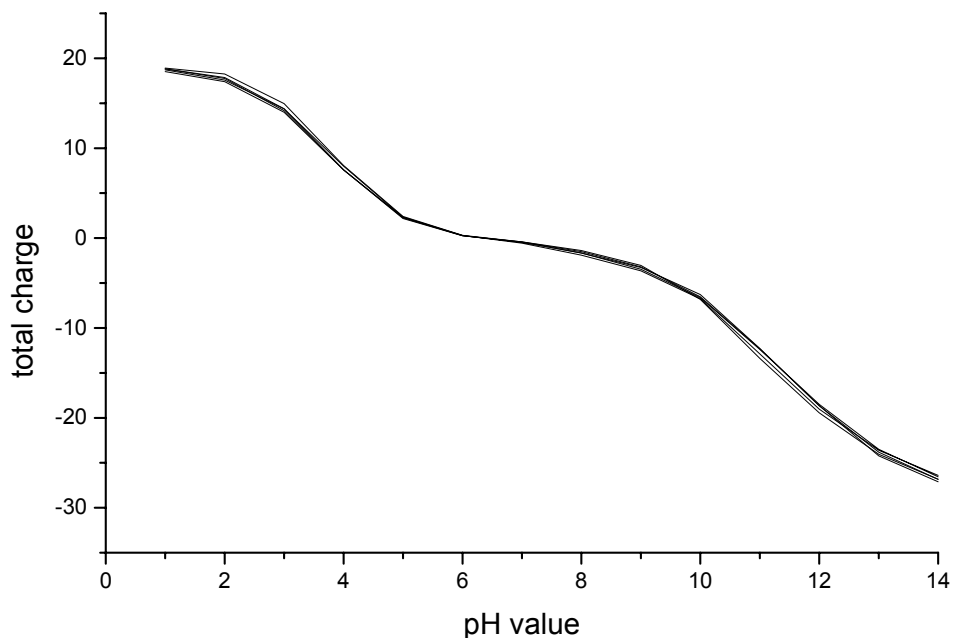


Abbildung 47 Berechnete Titrationskurve von CALB aus mehreren Konformationen der MD Simulation in Wasser.

4.3.3 Das elektrostatische Potential von CALB

Das durch DELPHI berechnete elektrostatische Potential von CALB zeigte keine größeren Unterschiede im pH Bereich zwischen 5 und 8. In diesem pH Bereich gab es nur einen Protonierungszustand der sich änderte. Bei pH 3 war das elektrostatische Potential an der Oberfläche und auch im aktiven Zentrum vorwiegend positiv und deutete auf eine gute Bindung an Kationen-Austauscher Säulen hin (Abbildung 48). Von pH 3 bis 8 änderte sich das elektrostatische Potential an der Oberfläche von CALB langsam. Von pH 3 bis 5 nahmen Bereiche mit negativem Potential auf der Oberfläche zu. Am isoelektrischen Bereich waren die Ladungen über die Oberfläche von CALB verteilt, hoben sich aber in der Gesamtladung auf. Durch die Ladungsverteilung von CALB bei pH 7 wird kein Dipol gebildet, durch den eine Bindung an Ionen-Austauscher Säulen, trotz neutraler Gesamtladung, auch möglich wäre. Von pH 8 an war CALB und auch das aktive Zentrum vorwiegend negativ geladen (Abbildung 48). Von der Berechnung des elektrostatischen Potentials kann erwartet werden, dass CALB nicht auf Kationen-Austauscher Säulen von pH 5 bis 8 binden kann.

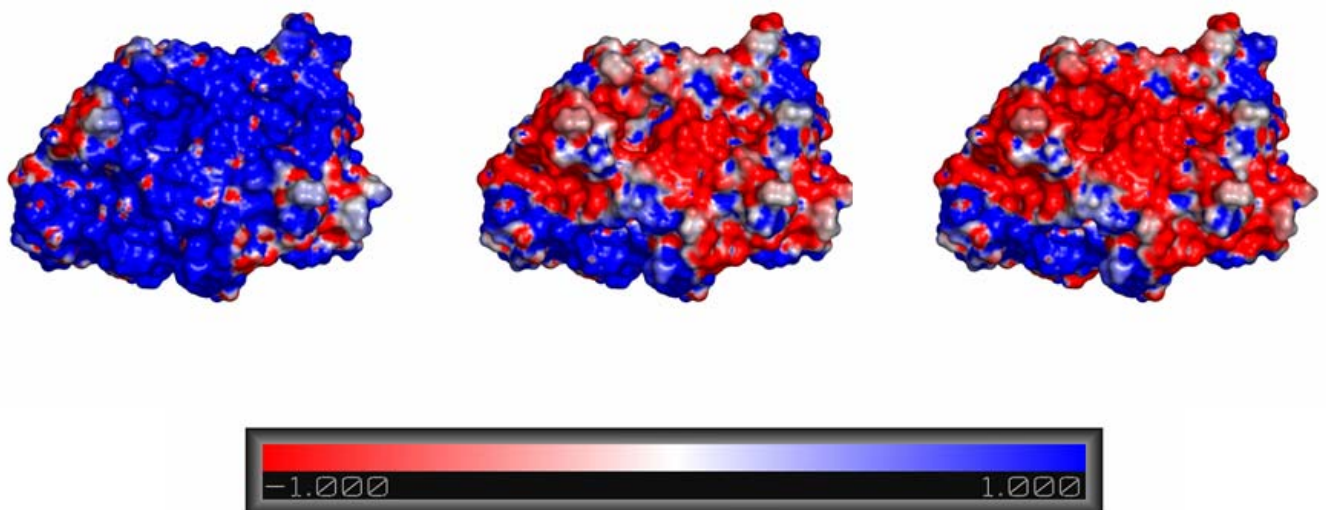


Abbildung 48 Die Oberfläche von CALB gefärbt nach elektrostatischem Potential bei den pH Werten 3, 7 und 10, negatives Potential (rot) und positives Potential (blau).

4.3.4 Experimentelle Bestimmung des pI und der Titrationskurve

Der isoelektrische Punkt (pI) und die elektroforetische Titrationskurve (ETC) wurden unter Verwendung des Phast-Systems [Amersham Pharmacia Biotech] bestimmt und die berechnete Titrationskurve dadurch evaluiert. Bei der experimentellen Bestimmung des pI fokussierten die Proben bei unterschiedlichen Startpunkten auf dem Gel im elektrischen Feld nicht zu einem einzigen pI, deshalb konnte der pI experimentell nicht festgelegt werden. Die Probe wurde bei pH 5, 6 und 7 auf das Gel aufgetragen und ergab jeweils einen pI von 5, 6 und 7, woraus gefolgert wurde, dass CALB bei all diesen pH Werten neutral war und deshalb, wie auch schon bei der theoretischen Untersuchung, keine Fokussierung zu einem einheitlichen pI zeigte. Der Bereich in dem CALB nicht geladen ist wurde durch die ETC bestimmt. Wie schon durch den isoelektrischen Bereich aus der Berechnung gezeigt wurde hatte CALB auch in der ETC einen isoelektrischen Bereich an Stelle eines einzigen lokalen pI. Die ETC zeigte einen isoelektrischen Bereich von ungefähr pH 4 bis 8, in dem CALB ungeladen ist, mit einer starken Zunahme der Ladungen oberhalb und unterhalb dieses Bereichs (Abbildung 49). Bei pH Werten unterhalb dieses isoelektrischen Bereichs nahmen die positiven Ladungen und darüber die negativen Ladungen zu. Dieser breite, isoelektrisch neutrale Bereich zwischen pH 4 und 8 hat zwei Konsequenzen. Auf der einen Seite kann der pI nicht präzise bestimmt werden, da der theoretisch berechnete pI von 6.0 innerhalb des isoelektrischen Bereichs liegt. Auf der anderen Seite sollte innerhalb des isoelektrischen Bereichs von 4 bis 8 keine Bindung auf Ionen-Austauscher Säulen möglich sein. Eine Bindung auf Kationen-Austauscher Säulen wurde bei pH Werten unterhalb von pH 4 erwartet.

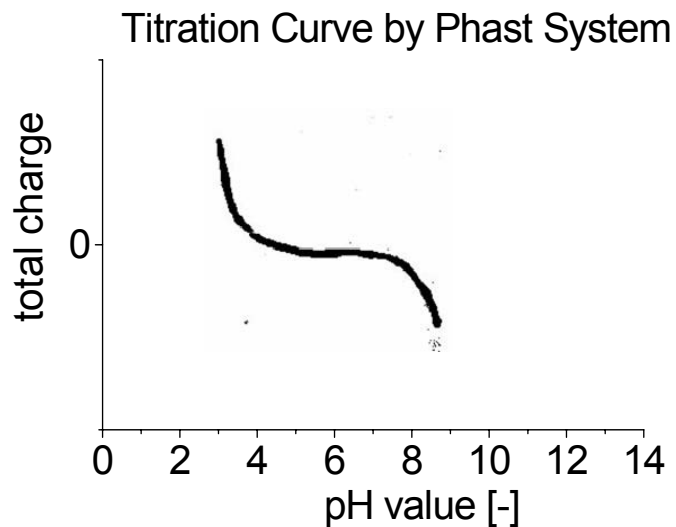


Abbildung 49 Experimentell bestimmte elektrophoretische Titrationskurve von CALB_{com}.

Der Verlauf der ETC von CALB_{com} und CALB_{rec} war identisch (Daten nicht explizit gezeigt). Die geringeren Unterschiede zwischen der theoretischen und der experimentellen Titrationskurve sollen später diskutiert werden. Die elektrostatische Charakterisierung zeigte, dass eine einfache Aufreinigung aufgrund der ungewöhnlichen Eigenschaften von CALB eine Herausforderung ist. Aus den Erkenntnissen der elektrostatischen Charakterisierung wurde eine einstufige Aufreinigungsmethode für CALB entwickelt.

4.3.5 Aufreinigung von CALB durch IEC

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von CALB auf Ionen-Austausch Matrizen wurde eine Probenlösung auf eine Anionen-Austausch Matrix (Resource Q) und eine Kationen-Austausch Matrix (Resource S) bei verschiedenen pH Werten aufgetragen. Mehrere IEC Säulen wurden getestet, um die beste Säule für die Aufreinigung zu ermitteln. Auf allen verwendeten IEC Säulen war keine Bindung von CALB und damit auch keine Aufreinigung von pH 3.5 bis 8 möglich. Auf Anionen-Austausch Matrizen konnte zwischen pH 4 und 9 ebenfalls keine Bindung von CALB beobachtet werden, CALB wurde jeweils im Durchfluss gefunden. Im Gegensatz dazu konnte CALB bei pH 3 an Kationen-Austausch Matrizen gebunden werden. Im Elutionsmuster wurde CALB_{com} bei pH 4 bis 3.5 ausschließlich im Durchfluss gefunden (Abbildung 50). Bei pH 3.3 zeigte CALB_{com}

bereits eine schwache Bindung an die Matrix, aber es wurde auch weiterhin Aktivität im Durchfluss gefunden. Die vollständige Bindung von CALB_{com} war erst bei pH 3 an die Matrix möglich (Abbildung 50). Durch Erhöhung des pH Wertes auf pH 5.5 wurde CALB_{com} von der Säule eluiert. Ausgehend von diesen experimentellen Untersuchungen wurde der untere Punkt des isoelektrischen Bereichs auf pH 3.3 bestimmt. CALB_{com} und CALB_{rec} zeigten das gleiche Verhalten bei der Aufreinigung, die Aufreinigung war somit sowohl für CALB_{com} als auch für CALB_{rec} möglich. Die aufgereinigte Lipase war homogen wie auf dem SDS-PAGE zu sehen ist (Abbildung 51 und 52), das Molekulargewicht wurde durch SDS-PAGE auf 37 kDa, in Übereinstimmung mit Literaturangaben [12], bestimmt.

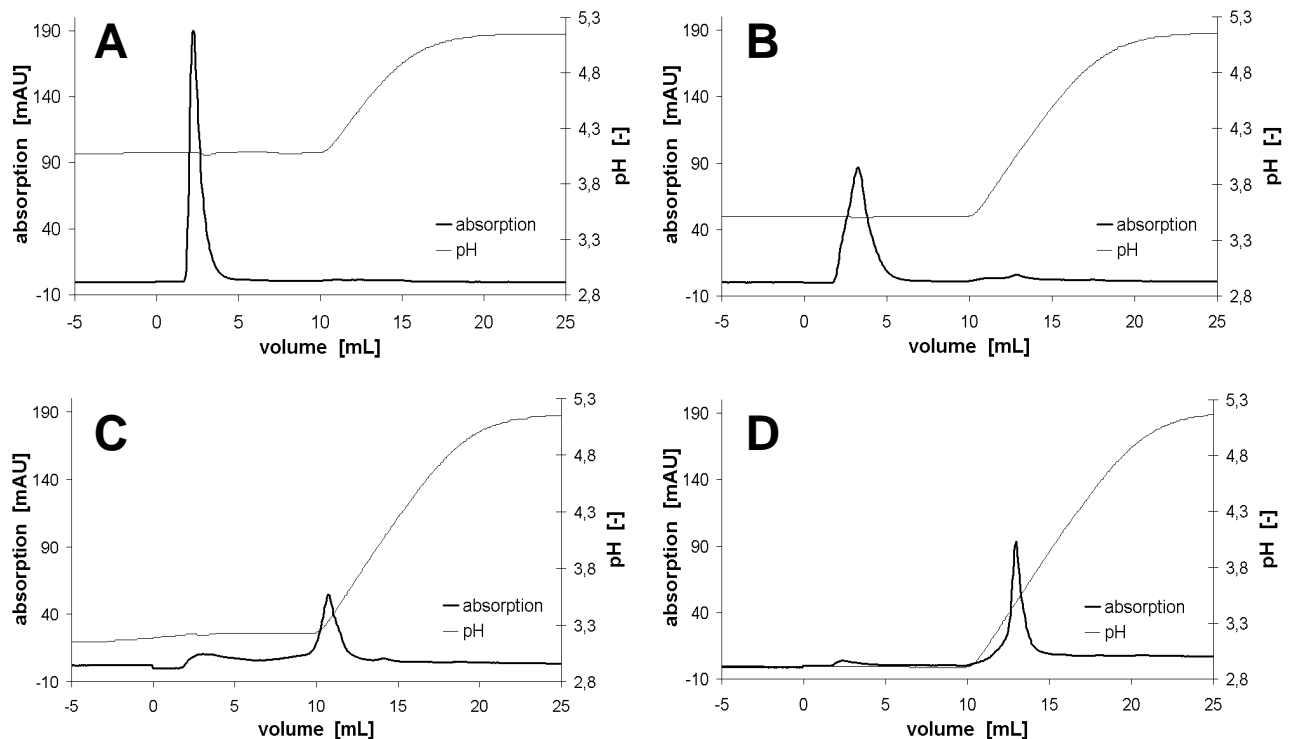


Abbildung 50 Elutionsmuster der Ionen-Austausch Chromatographie von CALB_{com} bei den pH Werten a) pH 4.0 b) pH 3.5 c) pH 3.3 d) pH 3.0.

Zur Bestimmung der Reinheit von CALB_{rec} und CALB_{com} nach der Aufreinigung wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Aufgereinigtes CALB war nahezu homogen, wie anhand der einzelnen Proteinbande auf der SDS-PAGE zu erkennen ist. Im Vergleich mit CALB_{rec} (Abbildung 52) enthielt CALB_{com} (Abbildung 51) vor der Aufreinigung mehr Verunreinigungen. Die Ausbeute nach Aufreinigung von CALB_{rec} war 53 % bei einem Aufreinigungsfaktor von 1.5 (Tabelle 8). Die spezifische Aktivität erhöhte sich von 13.5 U/mg in der Kultur auf 19.8 U/mg des aufgereinigten Enzyms. Der Aufreinigungsfaktor für CALB_{com} war mit 2.4 wesentlich höher, CALB_{com} enthielt eine größere Menge an verunreinigenden Proteinen vor der Aufreinigung. CALB_{rec} wurde ins Expressionsmedium sekretiert und von den zellulären Proteinen getrennt, aufgrund der hohen Reinheit von CALB_{rec} im Überstand der Fermentation ist der Aufreinigungsfaktor gering.

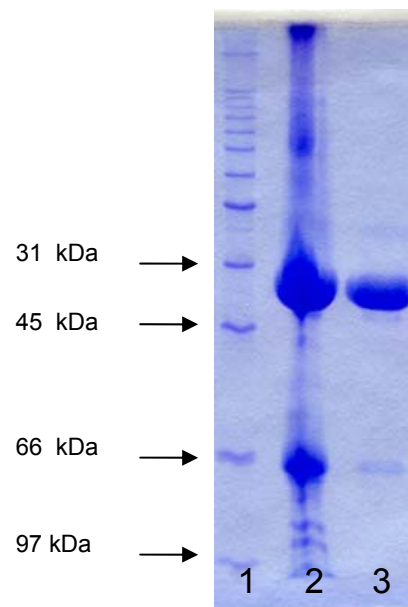


Abbildung 51 SDS-PAGE von CALB_{com} vor und nach der Aufreinigung

Bahn 1	LMW (Roth)
Bahn 2	CALB _{com}
Bahn 3	CALB _{com} , aufgereinigt

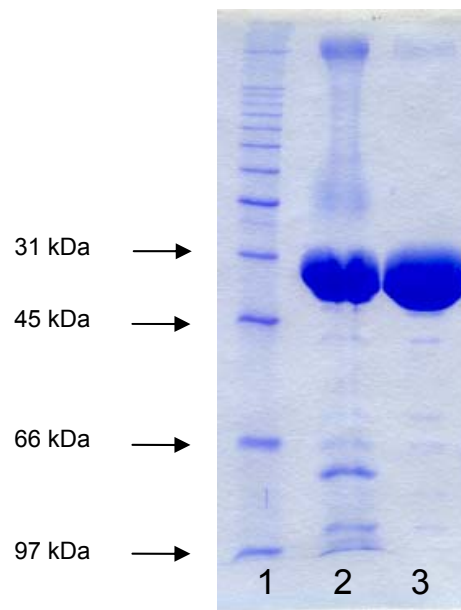


Abbildung 52 SDS-PAGE von CALB_{rec} vor und nach der Aufreinigung

Bahn 1 LMW (Roth)

Bahn 2 Überstand aus der Expression von CALB_{rec} in *P. pastoris*

Bahn 3 CALB_{rec,r} aufgereinigt

Tabelle 8 Aufreinigungsschritte von CALB_{rec}:

Schritt	Gesamtaktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigungsfaktor
Kulturüberstand	74000	13,5	100	1,0
Cross-flow Filtration	53000	15,9	72	1,2
IEC auf Source 15S	39000	19,8	53	1,5

4.3.6 Einfluss von Temperatur und pH Wert auf die Stabilität von CALB

Der Einfluss des pH Wertes auf die Stabilität von CALB_{rec} wurde durch die Messung der Aktivität nach Inkubation über 4 h, 24 h, 72 h und 144 h bei verschiedenen pH Werten und den Temperaturen 4 und 20°C untersucht. CALB war bei pH 3 bis 6 bei 4 und 20°C über die gemessene Zeit stabil und im Vergleich mit den Aktivitäten vor Inkubation ohne signifikanten Verlust an Aktivität über 144 h (Abbildung 53). Nach 144 h Inkubation bei pH 3 lag die verbleibende Aktivität, relativ zur Aktivität vor Inkubation, bei 88 % bei 4°C und bei 80 % bei 20°C. Die Temperatur hatte hier nur einen geringen Einfluss auf die Stabilität von CALB_{rec}, die Stabilität bei 4 und 20°C war vergleichbar. Bei pH Werten unter pH 3 nahm die Stabilität, gemessen durch die Abnahme der Aktivität, nach 4 h allerdings stark ab, die Stabilität war bei 20°C niedriger als bei 4°C. Die restliche Aktivität lag nach 4 h bei 4°C bei 63 % und bei 20°C bei 45 %, nach 72 h Inkubation bei 4°C bei 21 % und bei 20°C bei 2 % (Abbildung 53). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Stabilität von CALB_{rec} und CALB_{com}.

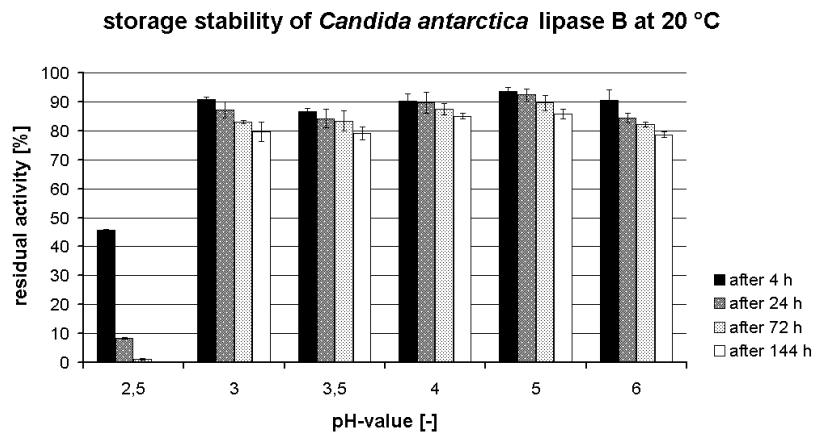
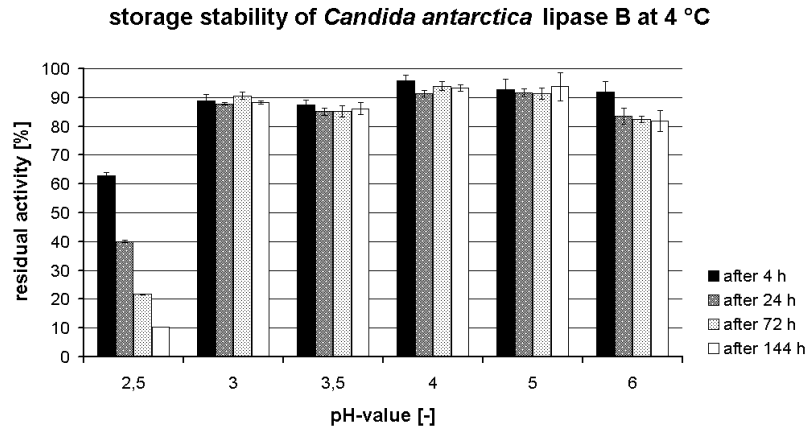


Abbildung 53 Messung der Stabilität von CALB durch die verbleibende Aktivität bei a) 4°C b) 20°C nach 4, 24, 72 und 144 h Inkubation bei pH 2.5 bis 6.

4.3.7 Bindung von CALB auf HIC Säulen

Die Bindung von CALB auf die verwendeten HIC Säulen war nicht möglich. Zur Erklärung der Eigenschaften von CALB wurde die Oberfläche mit DSSP [149] berechnet und nach Hydrophobizität gefärbt [150] (Abbildung). Die Gesamtoberfläche von CALB beträgt 12043 \AA^2 . Der hydrophile Bereich der Oberfläche beträgt 6071 \AA^2 und der hydrophobe Bereich der Oberfläche 5972 \AA^2 . Die Oberfläche besteht somit aus gleichen Anteilen hydrophober und hydrophiler Bereiche. Es gibt keine hydrophoben und hydrophilen *patches* auf der Oberfläche von CALB, die eine Bindung von CALB auf HIC Säulen erklären könnten (Abbildung 54). Durch die Verteilung und den Anteil der hydrophoben und hydrophilen Bereiche auf der Oberfläche sollte die Aufreinigung durch HIC nicht möglich sein.

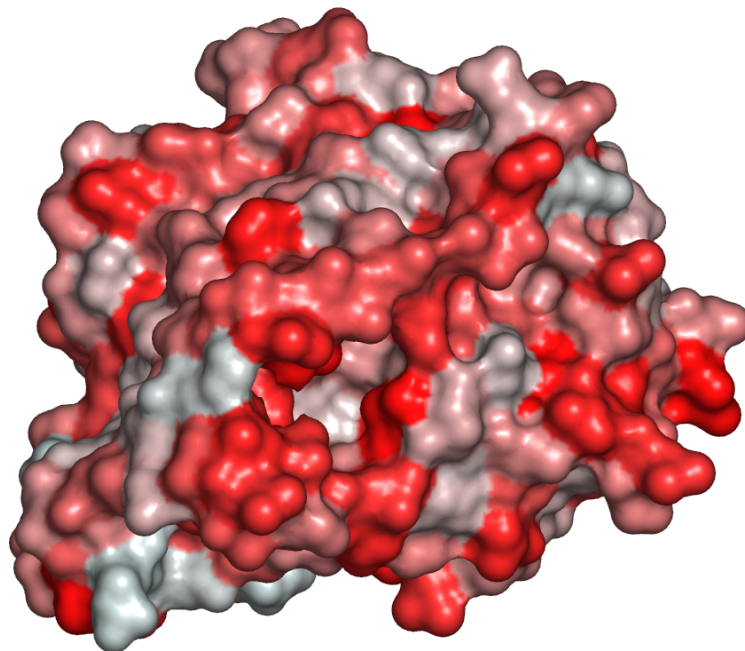


Abbildung 54 Die Oberfläche von CALB gefärbt nach Hydrophobizität, hydrophobe Bereiche (rot), hydrophile Bereiche (weiß).

4.4 Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch *Candida antarctica* Lipase B

Bereits beim Screening bekannter Enzyme nach ihrer Aktivität in der Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch BASF zeigte CALB unter den getesteten α/β -Hydrolasen die höchste Aktivität. Durch Modifikation sollte CALB deshalb am ehesten eine den industriellen Ansprüchen genügende Aktivität gegenüber den Substraten (einem Gemisch aus 1hpc, 2hpc, 3hpc und 4hpc) zeigen können. Ziel des Projektes war es die Aktivität von CALB in der Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten zu erhöhen. Während der kommerzielle WT von CALB (Chirazyme L-2, Iyo) keinen vollständigen Umsatz in dieser Reaktion zeigte, sollte ein nahezu vollständiger Umsatz durch Optimierung der Lipase in möglichst kurzer Zeit erreicht werden. Als Strategie wurde hier die Methode des rationalen Designs gewählt, es sollten durch Methoden der molekularen Modellierung vielversprechende Positionen identifiziert und durch zielgerichtete Mutagenese verwirklicht werden. Für die Expression der Mutanten bot sich das bereits am Institut für Technische Biochemie etablierte *P. pastoris* Expressionssystem an. Zur Untersuchung der Mutanten auf ihre Aktivität hinsichtlich der Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten, musste CALB jedoch gereinigt in lyophilisierter oder immobilisierter Form vorliegen, da im Reaktionsansatz enthaltenes Wasser die Umsetzung empfindlich stören würde und in deshalb in nahezu wasserfreien Systemen gearbeitet werden muss. Neben der Identifizierung geeigneter Mutanten waren daher auch eine effiziente Aufreinigungsmethode von CALB (siehe oben) und ein geeigneter Träger des Katalysators in der Reaktion von entscheidendem Interesse. Da CALB lediglich durch Immobilisierung auf MP1000 Aktivität gegenüber den Substraten zeigte war diese Präparation die Methode der Wahl.

4.4.1 Molekulare Modellierung

Die umgesetzten Enantiomerenpaare des primären (3hpc und 4hpc) und sekundären Alkohols (1hpc und 2hpc) wurden durch molekulare Modellierung untersucht, da in der Reaktion kein vollständiger Umsatz erreicht wurde. Dazu wurden alle Substrate, unter Verwendung des kovalent gebundenen Übergangszustands im produktiven Bindungsmodus, in die Bindungstasche gedockt und die Lage in der Bindungstasche analysiert (Abbildung 55). Das am schlechtesten umgesetzte Substrat in der enzymkatalysierten Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten wurde über den höchsten Docking-Wert unter Berücksichtigung aller produktiven Bindungsmodi identifiziert (Tabelle 9). Das S-Enantiomer des sekundären Alkohols (2hpc) sollte demnach das in dieser Reaktion am schlechtesten umgesetzte Substrat sein. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der gebräuchlichen stereochemischen Vorhersage für Reaktionen sekundärer Alkohole die von CALB katalysiert werden, nach der das R-Enantiomer das bevorzugte Enantiomer ist [57].

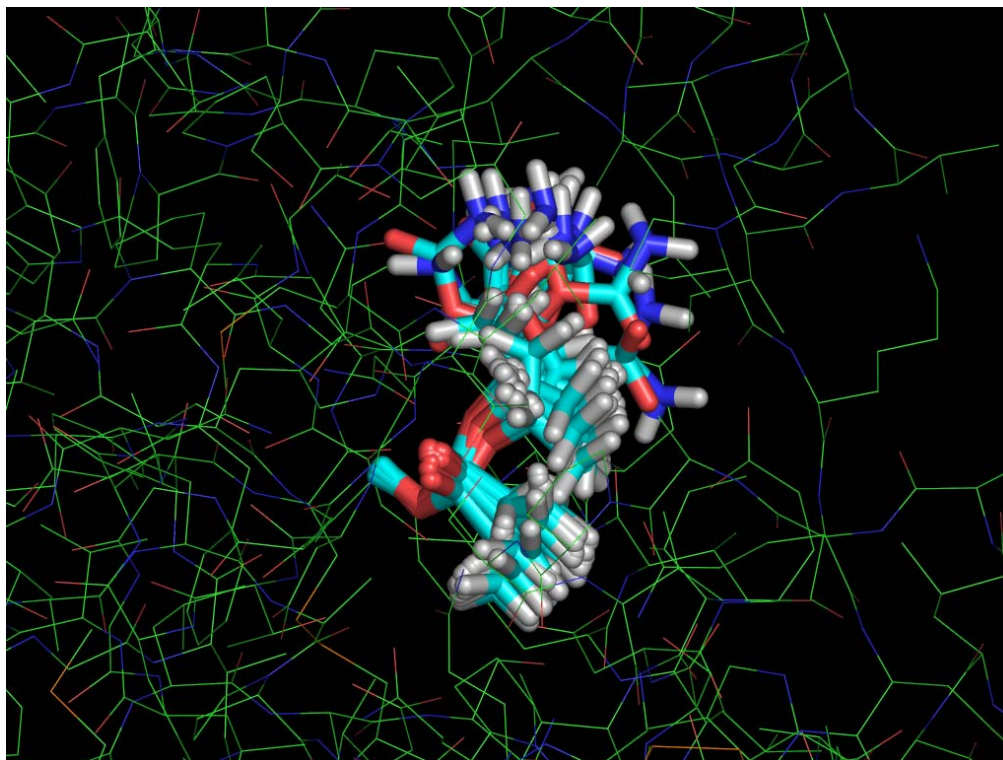


Abbildung 55 Durch Docking mit FlexX erhaltenen Konformationen im produktiven Bindungsmodus von 2hpc im Übergangszustand im aktiven Zentrum von CALB.

Tabelle 9 Docking-Werte und Anzahl gefundener Konformationen im produktiven Bindungsmodus von 1hpca, 2hpca, 3hpca und 4hpca im CALB WT:

Substrate	Anzahl der Konformationen	Docking-Wert
1hpca	79	-3,89
2hpca	37	-3,47
3hpca	58	-4,69
4hpca	42	-4,65

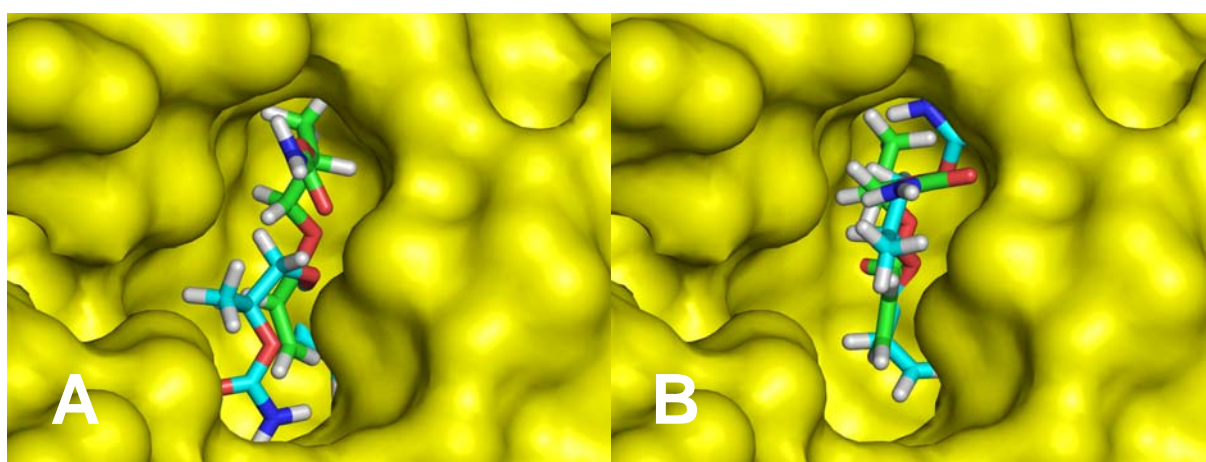


Abbildung 56 Orientierung (A) der Enantiomere des primären Alkohols (3hpca und 4hpca) und (B) der Enantiomere des sekundären Alkohols (1hpca und 2hpca) in der Bindungstasche von CALB WT. Die R-Enantiomere sind jeweils blau und die S-Enantiomere grün gefärbt.

Der Carbamat-Rest von 2hpc im Übergangszustand hat nicht ausreichend Platz in der stereospezifischen Bindetasche von CALB und kann deshalb nur sehr schlecht im produktiven Übergangszustand, der für die Umsetzung nötig ist, gebunden werden (Abbildung 56). Mit Hilfe des rationalen Designs wurden Mutationen zur Vergrößerung der Bindetasche vorgeschlagen, um Platz für den Carbamat-Rest des S-Enantiomers des sekundären Alkohols (2hpca) zu schaffen. Zur Erhöhung der Aktivität von CALB in dieser Reaktion wurde die Position L278 als Schlüsselposition identifiziert. Die Bindetasche wurde durch Verkleinern der Seitenkette an Position 278, durch Mutation von Leu zu Ala, Phe, Tyr und Val, vergrößert (Abbildung 57).

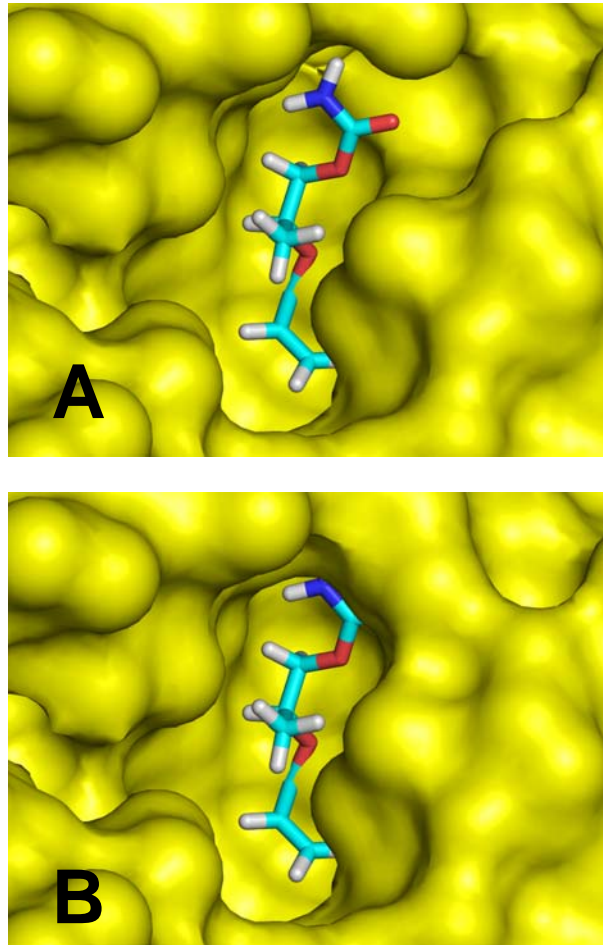


Abbildung 57 Orientierung des langsam umgesetzten S-Enantiomers des sekundären Alkohols (2hpc) im CALB WT (A) und in der vorgeschlagenen Mutante L278A (B).

Die Auswirkung der Mutation L278A wurde theoretisch durch MD Simulationen untersucht. Nach kurzen MD Simulationen von 600 ps wurde der Abstand $d_{(\text{HNE2-OAlkohol})}$ zwischen dem Wasserstoffatom des katalytischen His und dem Sauerstoffatom des Alkohols als geometrischer Parameter zur Vorhersage der Aktivität verwendet [60]. Das Substrat 2hpc wurde hier, wie schon bereits im Docking, durch den längsten Abstand $d_{(\text{HNE2-OAlkohol})}$ von 2.1 Å der eingesetzten Enantiomere, als das langsam umgesetzte Enantiomer identifiziert (Tabelle 10). Der Abstand $d_{(\text{HNE2-OAlkohol})}$ von 2hpc im Übergangszustand von L278A war jedoch kürzer als im der von 2.4 Å im WT, die Mutante L278A sollte aufgrund des kürzeren Abstands $d_{(\text{HNE2-OAlkohol})}$ eine höhere Aktivität in der Acylierung von 2hpc im Vergleich zum WT zeigen.

Tabelle 10 Abstand $d_{(\text{H}_{\text{NE}2}-\text{O}_{\text{Alkohol}})}$ von 1hpca, 2hpca, 3hpca und 4hpca zum katalytischen His im produktiven Bindungsmodus in WT und L278A:

Übergangszustand	$d(\text{H}_{\text{NE}2}-\text{O}_{\text{Alkohol}})$
1hpca in WT	2,1
1hpca in L278A	2,0
2hpca in WT	2,4
2hpca in L278A	2,1
3hpca in WT	2,0
4hpca in WT	1,9

4.4.2 Experimentelle Untersuchung von WT und Mutanten

Die Mutationen Ala, Phe, Tyr und Val an Position L278 wurden durch zielgerichtete Mutagenese eingeführt, um die Aktivität der verschiedenen CALB Mutanten zu messen und zu vergleichen. Alle Mutanten konnten erfolgreich in *P. pastoris* exprimiert werden. Die Aktivität der Mutanten wurde in der Hydrolyse von Tributyrin, einer Standardaktivitätsbestimmung von Lipasen, mittels pH-Stat bei 30°C und pH 7.5 gemessen. Das Ergebnis des Aktivitätstest gegenüber der Hydrolyse von Tributyrin zeigte, dass neben dem WT auch alle Mutanten hydrolytisch aktiv waren und die Mutanten L278A, L278V und L278F eine gegenüber dem WT erhöhte Aktivität aufwiesen (Tabelle 11). Die größte Aktivität in der Hydrolyse von Tributyrin zeigte die Mutante L278A, mit einer 6-fach erhöhten Aktivität im Vergleich zum WT.

Tabelle 11 Aktivität von CALB WT und verschiedener CALB Mutanten in der Hydrolyse von Tributyrin:

CALB Variante	WT	L278A	L278V	L278Y	L278F
Aktivität in der Hydrolyse von Tributyrin [U/mg]	740	4390	1700	710	2630

Nach dem erfolgreichen Test der Mutanten in der Hydrolyse von Tributyrin wurde die Aktivität von WT und Mutanten in der Umesterung von hpc mit Acrylsäuremethylester verglichen. Dazu wurden der WT und die Mutanten von CALB auf MP1000 immobilisiert. Die Immobilisierung war notwendig, da CALB nach der Lyophilisierung in der Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten keine messbare Umsetzung zeigte. Nach der Immobilisierung war jedoch bereits der WT in der Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten aktiv. Als beste Mutante erwies sich wieder L278A. L278A zeigte 97 % Umsatz nach 6 Stunden Reaktionszeit (Abbildung 59). Dies war eine erhebliche Verbesserung im Vergleich zum WT, der nach 3 Stunden Reaktionszeit 43 % Umsatz und nach 24 Stunden Reaktionszeit nur 84 % Umsatz zeigte (Abbildung 58). Mit der Mutanten L278A konnte nach 72 h ein Umsatz von 98 % erreicht werden. Ebenfalls besser als der WT war die Mutante L278V mit 90 % Umsatz nach 24 Stunden (Tabelle 12). Der Wildtyp und die Mutanten zeigten in der Acrylierung von hpc eine geringere Aktivität als in der Hydrolyse von Tributyrin. Die Reaktionsrate der Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten nahm im Verlauf der Reaktion auch mit der verbesserten Mutante L278A ab, die Aktivität war jedoch im Vergleich zum WT erhöht worden. Über die Enantioselektivität in der Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten konnte keine Aussage gemacht werden, da keine Trennung der Enantiomerenpaare unter den verwendeten GC Bedingungen möglich war. Die Selektivität der Mutanten schien weniger stark ausgeprägt zu sein als die des Wildtyps.

Tabelle 12 Umsatz in der Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch CALB WT und Mutanten:

CALB Variante	WT	L278A	L278V	L278Y	L278F
Umsatz nach 3 h Reaktionszeit [%]	43	62	52	20	25
Umsatz nach 6 bzw. 24 h Reaktionszeit [%]	84 nach 24h	95 nach 6h	90 nach 24h	80 nach 24h	82 nach 24h

Durch weitere Untersuchungen von Danni Liu zeigte sich, dass die vorgeschlagene Mutante L278A eine Abnahme der Enantioselektivität bewirkte. Zur Bestimmung der Enantioselektivität wurde die Hydrolyse von Phenylethylpropionat durchgeführt. Die Mutante L278A zeigte im Vergleich zum WT mit $E > 300$ eine verringerte Enantioselektivität, war aber mit einem $E = 60$ immer noch vergleichsweise selektiv. Durch die verringerte Enantioselektivität der Mutante L278A wurde auch 2hpc besser umgesetzt. Die allgemein höhere Aktivität war aber auf die bessere Umsetzung aller beteiligten Enantiomere zurückzuführen. Der Reaktionszeit abhängige Abfall der Reaktionsrate resultierte aus der, im Vergleich zu den anderen Enantiomeren, niedrigeren Aktivität gegenüber dem S-Enantiomer des sekundären Alkohols (2hpca), wie bereits durch Modellierung gezeigt werden konnte.

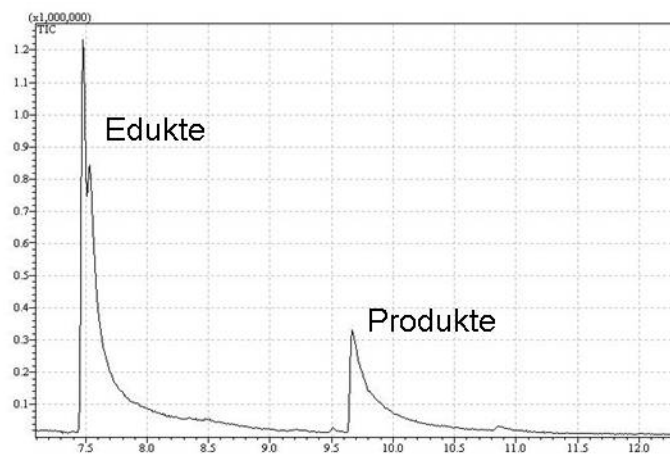


Abbildung 58 Gaschromatogramm der Acrylierung von Hydroxypropylcarbamate mit CALB WT. Nach 3 Stunden Reaktionszeit betrug der Umsatz 43 %.

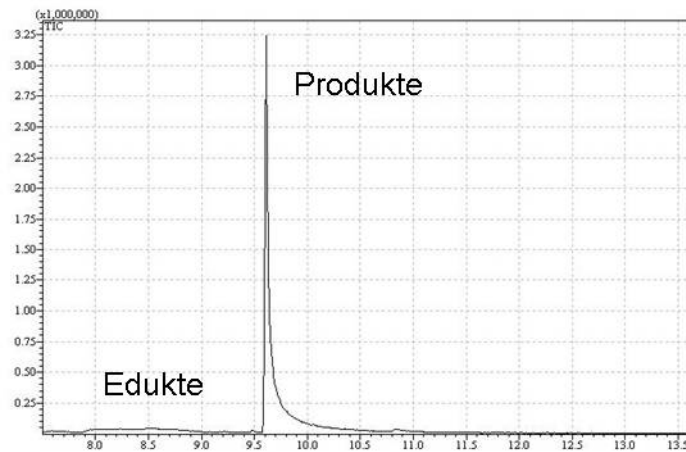


Abbildung 59 Gaschromatogramm der Acylierung von Hydroxypropylcarbammat mit der CALB Mutanten L278A. Nach 6 Stunden Reaktionszeit betrug der Umsatz 97 %.

Der immobilisierte CALB WT und die Mutante L278A zeigten eine hohe Stabilität unter den verwendeten Bedingungen, was durch einen erneuten Einsatz des Immobilisats gezeigt werden konnte (Daten nicht explizit gezeigt).

5 Diskussion

5.1 Das Verhalten von *Candida antarctica* Lipase B in verschiedenen Lösungsmitteln

Die Eigenschaften und das Verhalten von Enzymen werden durch das umgebende Lösungsmittel beeinflusst. Durch MD Simulationen sollte das Verhalten von CALB in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht und erklärt werden. Es wurden jeweils drei Simulationen jedes Protein-Lösungsmittel Systems mit unterschiedlicher Verteilung der Startgeschwindigkeiten auf die Atome, an Stelle einer einzigen Simulation, durchgeführt, um den Konformationsraum zu vergrößern. Mehrere kurze Trajektorien sind hierbei ergiebiger als eine lange Trajektorie [151] [152] [153].

5.1.1 Die Struktur von CALB

Die Struktur von CALB war in allen Simulationen unter den verwendeten Bedingungen stabil und erwies sich deshalb als geeignetes System den Einfluss verschiedener Lösungsmittel zu untersuchen. Es wurden bereits mehrere Kristallstrukturen von CALB unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen oder mit gebundenem Inhibitor bestimmt [12] [68]. Diese Kristallstrukturen waren sich untereinander sehr ähnlich, die geringen Unterschiede im RMSD dieser Kristallstrukturen waren im Bereich von 0.2 bis 0.3 Å. In den Simulationen von CALB in verschiedenen Lösungsmitteln gab es mit einem RMSD untereinander von 0.4 bis 0.8 keine signifikanten Konformationsänderungen. Die experimentellen Daten der konservierten Kristallstrukturen konnten in den Simulationen wiedergegeben werden. Die geringe Konformationsänderung ist auch darauf zurückzuführen, dass CALB kein *lid* hat und keine Grenzflächenaktivierung mit einer größeren Konformationsänderung in einer hydrophoben Umgebung zeigt [38]. In Kristallstrukturen konnten lediglich Unterschiede in der Lage der Seitenketten beobachtet werden wie sie auch in den Simulationen durch die hohe Flexibilität der Seitenketten zu sehen waren.

Proteine in organischen Lösungsmitteln sind nahezu nicht von den Strukturen die in Wasser bestimmt wurden unterscheidbar, was auch in experimentellen Untersuchungen von Subtilisin [154], Chymotrypsin [155] [156] [157] und Lysozym [158] gezeigt wurde. Die Struktur von Subtilisin war in Wasser, Octan und THF identisch [159]. Röntgenstrukturen von Subtilisin in Acetonitril, Chloroform und Dioxan zeigten, dass die Kristallstrukturen identisch mit der Struktur in Wasser sind, die Unterschiede waren vergleichbar mit den Unterschieden aus unabhängig voneinander bestimmten Strukturen in Wasser [160] [161]. Auch in bisherigen Simulationen zeigten Strukturen anderer Proteine keine signifikanten Unterschiede in verschiedenen Lösungsmitteln [111] [11] [118]. Die Sekundärstruktur von CALB blieb in Simulationen in verschiedenen Lösungsmitteln erhalten, dies wurde auch durch Circular Dichroism Messungen gezeigt, in denen sich die Sekundärstruktur von CALB beim Wechsel von Wasser zu organischem Lösungsmittel nur unwesentlich änderte [162]. Im Unterschied zu Enzymen in nahezu reinen organischen Lösungsmitteln oder Wasser, wie in diesen Simulationen verwendet, denaturieren Proteine in Mischungen von organischen Lösungsmitteln mit Wasser allerdings [103] [163]. Studien haben gezeigt, dass Proteine in einer Vielzahl von Konformationen mit nahezu gleicher Energie auftreten können [164]. Der Konformationsraum von CALB ist recht klein, besonders in organischen Lösungsmitteln existiert CALB in einer geringeren Anzahl verschiedener Konformationen. Es wird angenommen, dass die Stabilität der Struktur von Proteinen in organischen Lösungsmitteln aus einer kinetischen Barriere resultiert, die eine Entfaltung der nativen Struktur verhindert [82]. Die Starrheit der Konformation in organischen Lösungsmitteln kann zu einer höheren Stabilität in organischen Lösungsmitteln führen, die Gründe dafür werden später diskutiert.

5.1.2 Die Flexibilität von CALB

Auf der einen Seite ist die Flexibilität von Enzymen wichtig für ihre Funktion, auf der anderen Seite kann ihre Flexibilität allerdings zur Instabilität und zur partiellen Entfaltung führen [101]. Die Flexibilität aus den Simulationen von CALB korrelierte gut mit der Flexibilität der Kristallstrukturen [12]. Die Flexibilität war in den Simulationen von CALB im aktiven Zentrum und im Kern geringer als an der Oberfläche, wie bereits experimentell auch für andere Enzyme gezeigt

wurde [165] [Zhang 1999]. CALB war in organischen Lösungsmitteln weniger flexibel als in Wasser. Diese veränderte Flexibilität ist im Einklang mit experimentellen Daten die durch Time-Resolved Fluorescence Anisotropy in organischen Lösungsmitteln für Chymotrypsin und Subtilisin erhalten wurden [158]. Messungen durch ESR zeigten, dass Proteine in organischem Lösungsmittel starrer sind als in Wasser, diese Starrheit verhindert die Entfaltung und Inaktivierung in organischem Lösungsmittel [109]. Bei der Messung der Dynamik von CALB durch Dielectric Relaxation Spectroscopy wurden Unterschiede im Zeitraum des Relaxationsprozesses in Wasser und DMSO beobachtet [166]. Der Relaxationsprozess war in DMSO langsamer als in Wasser, was auf eine höhere Flexibilität in Wasser hindeutet. Es gab nicht nur Unterschiede der Flexibilität zwischen Wasser und organischen Lösungsmitteln, sondern auch innerhalb der Gruppe der organischen Lösungsmittel. Die Dynamik von Proteinen in organischen Lösungsmitteln und in Wasser wurde durch *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR) in einem Bereich der Dielektrizitätskonstanten von 1.9 bis 78 untersucht [167] [168]. Die Flexibilität von Proteinen nahm in Lösungsmitteln mit niedriger Dielektrizitätskonstante ab, wie es auch in den durchgeführten Simulationen beobachtet wurde. Eine verringerte Flexibilität wurde auch in Simulationen in expliziten organischen Lösungsmitteln im Vergleich zu Simulationen in Wasser von Lipasen [41] [43] [47] und Subtilisin [110] [118] beobachtet, während keine Unterschiede zwischen Simulationen in Wasser und organischen Lösungsmitteln von Subtilisin gesehen wurden [169]. Die Flexibilität von CALB war bei größeren Dielektrizitätskonstanten des Lösungsmittels auch in unseren Simulationen höher. Ähnlich wie die Korrelation der Dielektrizitätskonstante und des logP mit der Flexibilität korrelierte auch die Menge an geringer beweglichen Wassermolekülen mit dem logP des Lösungsmittels. Bei einem höheren logP nahm die Menge der geringer beweglichen Wassermoleküle ab. In Isopentan war die Flexibilität wie erwartet höher als in Toluol oder Cyclohexan, die Höhe der Flexibilität passte allerdings nicht in die Korrelation mit der Dielektrizitätskonstante. Im Gegensatz zu den anderen verwendeten Lösungsmitteln hat Isopentan mehrere innere Freiheitsgrade und kann in verschiedenen Konformeren vorliegen. Die inneren Freiheitsgrade wurden jedoch in den aus starren Molekülen bestehenden Lösungsmittelmodellen nicht berücksichtigt und sollten bei Isopentan im Vergleich zu den anderen verwendeten Lösungsmitteln einen größeren Einfluss

haben. Aus den Simulationen konnte neben der Korrelation der Flexibilität zur Dielektrizitätskonstante und des logP keine weitere Korrelation zu physikalischen Parametern gefunden werden. Die Flexibilität von CALB in verschiedenen Lösungsmitteln kann deshalb auf einen Parameter des Lösungsmittels zurückgeführt werden. Es wurde bereits über eine Korrelation der Flexibilität mit der Größe der organischen Lösungsmittelmoleküle berichtet [170], die aber in unseren Simulationen nicht beobachtet werden konnte. Die Tatsache, dass alle Aminosäuren ihre höchste Flexibilität in den Simulationen von CALB in Wasser zeigten lässt auf einen globalen Einfluss des Lösungsmittels auf CALB schließen. Der Grund für die geringere Flexibilität von CALB in organischen Lösungsmitteln scheint unter anderem die geringere Beweglichkeit von Wassermolekülen an der Oberfläche zu sein, die zur Flexibilität des Enzyms führen kann. Durch höhere Beweglichkeit von Wassermolekülen, die zu einem häufigeren Austausch von Wassermolekülen an der Oberfläche führt, wird die Flexibilität angeregt. Polare organische Lösungsmittel können dadurch die Stabilität und die Aktivität von Enzymen verringern [171]. Die Geschwindigkeiten enzymatischer Reaktionen sind in organischen Lösungsmitteln um etwa fünf Größenordnungen geringer als Reaktionen in Wasser [167]. Ein Grund hierfür könnte neben der Löslichkeit und der Konzentration der Substrate, den Aktivierungsenergien und der Diffusion auch die veränderte Flexibilität sein.

5.1.3 Die Oberfläche von CALB

Der Einfluss von organischen Lösungsmitteln wirkt sich auf das gesamte Protein aus, allerdings können Lösungsmittel mit bestimmten Aminosäuren der Oberfläche verstärkt wechselwirken. In den Simulationen in Wasser war die Oberfläche im Vergleich zur Kristallstruktur vergrößert. Die Gesamtoberfläche von CALB nach der Simulation in WAT war um 600 \AA^2 größer als in unpolaren organischen Lösungsmitteln. Durch die kleinere Oberfläche in organischen Lösungsmitteln im Vergleich zu Wasser kann die Stabilität von Proteinen erhöht werden [113] [172]. Der hydrophile Oberflächenanteil nahm um 600 \AA^2 im Vergleich der Simulationen in WAT zu den Simulationen in CHE ab, während die hydrophobe Oberfläche nur geringfügig um 50 \AA^2 zunahm. Die Zunahme der Gesamtoberfläche auf die Zunahme des hydrophilen Oberflächenanteils zurückzuführen. Die Beobachtung einer größeren Oberfläche in Wasser wurde

bereits auch für Chymotrypsin gemacht [113]. Die Veränderungen der Oberfläche hingen von den Oberflächeneigenschaften des Proteins mit unterschiedlichen hydrophilen und hydrophoben Anteilen ab. In CALB sind die hydrophoben und hydrophilen Oberflächenanteile ähnlich groß und deshalb ist der Einfluss der Lösungsmittel auf die Gesamtoberfläche eher gering. In den Simulationen konnten dem organischen Lösungsmittel ausgesetzte polare Aminosäuren mit geordneten Wassermolekülen an der Oberfläche wechselwirken und dadurch stabilisiert werden, deshalb nahm die hydrophile Oberfläche in organischen Lösungsmitteln nicht wie erwartet ab. Als Mechanismus, der zu einer Zunahme der Oberfläche in Wasser und polaren Lösungsmitteln führt, wurde vorgeschlagen [108], dass sich geladene und polare Seitenketten vom Protein ins Lösungsmittel bewegen, die intramolekulare Wechselwirkung des Proteins verringern, die vorwiegend durch Wasserstoffbrücken und Salzbrücken gebildet werden und für die Starrheit der Proteine mit verantwortlich sind.

5.1.4 Wasser an der Oberfläche von CALB

Die Hydratation von CALB wurde in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Es gibt im Allgemeinen vier Arten von Wassermolekülen in Systemen von Proteinen in organischen Lösungsmitteln. Neben den Wassermolekülen als Lösungsmittel oder gelöst in anderen Lösungsmitteln und den im Protein eingeschlossenen Wassermolekülen gibt es „*inside class*“ Wassermoleküle, die an die Oberfläche des Proteins gebunden sind. Diese Wassermoleküle spielen eine wichtige Rolle zur Erhaltung der aktiven Konformation in organischen Lösungsmitteln durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk. Weiterhin gibt es noch Wassermoleküle der „*contact class*“, diese sind schwach ans Protein gebunden und können schnell durch andere Wassermoleküle ausgetauscht werden [173]. Es ist bekannt, dass sich die Beweglichkeit und die Struktur von Wasser in der Nähe der Proteinoberfläche vom umgebenden Lösungsmittel unterscheiden. Dies wurde durch Röntgenbeugung [174] [175], NMR Untersuchungen [176] und durch theoretische Untersuchungen [177] gezeigt. Das Wasser an der Oberfläche ist dynamisch und Wassermoleküle an der Oberfläche können schnell durch Wassermoleküle des Lösungsmittels ausgetauscht werden. In organischen Lösungsmitteln ist die Menge von gelöstem Wasser im Lösungsmittel sehr gering und deshalb auch die Wahrscheinlichkeit für den Austausch von gebundenem,

strukturiertem Wasser an der Proteinoberfläche viel geringer als in Wasser. Die Anzahl von gering beweglichen Wassermolekülen an der Oberfläche von CALB hing in den Simulationen von der Art des umgebenden Mediums ab, unpolare organische Lösungsmittel entzogen der Proteinoberfläche nur wenige Wassermoleküle, während polare Lösungsmittel Wassermoleküle der Oberfläche viel stärker entzogen. Diese Beobachtung wurde auch im Experiment gemacht werden [91]. In Korrelation zu den Simulationen, in denen eine größere Anzahl von gering beweglichen Wassermolekülen an der Oberfläche von CALB bei höheren logP Werten gefunden wurde, führte eine zunehmende Hydrophobizität von Alkoholen als Lösungsmittel zu einer geringeren Anzahl von Wassermolekülen mit hohen B-Faktoren und damit einem langsameren Wasseraustausch an der Oberfläche, wie am Beispiel von Lysozym durch Röntgenbeugung gezeigt wurde [178]. In Simulationen von CALB in unpolaren organischen Lösungsmitteln blieben die meisten Wassermoleküle an der Oberfläche, während mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels Wassermoleküle der Oberfläche entzogen wurden. Im Unterschied zu unpolaren organischen Lösungsmitteln wurde das entzogene Wasser in den Simulationen in Methanol nicht durch neues Wasser, sondern durch Methanol ersetzt und Wasser der Oberfläche nahezu vollständig entzogen. Das Strippen von Wassermolekülen von der Oberfläche durch polare Lösungsmittel wurde auch im Experiment [167] und in Simulationen [179] gezeigt. Die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels korrelierte in EPR Untersuchungen und in MD Simulationen mit dem Entzug von Wassermolekülen von der Proteinoberfläche, mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels wurde auch Wasser in Chymotrypsin und Subtilisin stärker der Proteinoberfläche entzogen [167] [169].

Die Desorption von Wasser war nicht abhängig von der Art des Proteins sondern von der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels [180], wobei polare Lösungsmittel wie in den Simulationen zum höchsten Grad der Desorption führten. In Wasser ist gebundenes und freies Wasser an der Proteinoberfläche in einem dynamischen Gleichgewicht ist und die Verweilzeit von Wassermolekülen an der Proteinoberfläche zwischen 10 und 100 ps beträgt [181]. In Übereinstimmung mit diesen experimentellen Daten konnten wir während der Simulation über 2 ns in Wasser keine Wassermoleküle erkennen, die sich über die gesamte Simulationszeit an der gleichen Stelle der Oberfläche aufhielten. Trotz der niedrigeren Viskosität und höheren Fluidität, führen unpolare

organische Lösungsmittel aber zu einer verringerten Flexibilität der Proteine im Vergleich zu Wasser. Dieser Widerspruch kann durch den eingeschränkten Wasseraustausch an der Oberfläche erklärt werden, der auch zu einem umspannenden Wassernetzwerk und damit Einfrieren des Proteins führt. Durch den langsameren Austausch der Wassermoleküle entsteht ein umspannendes Wassernetzwerk an der Oberfläche, wodurch hydrophile und auch hydrophobe Aminosäuren geringere Flexibilität in unpolaren Lösungsmitteln zeigen, wie in den Simulationen gezeigt werden konnte. Die erhöhte Flexibilität in Wasser kann durch den schnellen Austausch von Wassermolekülen an der Oberfläche hervorgerufen werden, Wassermoleküle an der Oberfläche von CALB in organischen Lösungsmitteln werden wesentlich langsamer ausgetauscht, sind damit durch das entstehende Wassernetzwerk besser eingefroren als in Wasser. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Flexibilität von Proteinen mit einer größeren Menge an Wasser ebenfalls zunimmt [11]. Polare Gruppen bilden über Wasserstoffbrücken direkte Wechselwirkungen mit Wassermolekülen, während unpolare Gruppen die Wechselwirkungen zwischen einzelnen Wassermolekülen, begünstigen. Das Fehlen von polaren Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken führt zu verstärkter Wechselwirkung zwischen Wassermolekülen und kann in den Simulationen durch zusätzliche überbrückende Wassermoleküle gesehen werden. Die überbrückenden Wassermoleküle haben keine Bindung zum Protein sondern werden durch an die Proteinoberfläche gebundene Wassermoleküle stabilisiert. Durch die Stabilisierung von hydrophilen Gruppen und die Bildung eines flexiblen Wassernetzwerks, werden auch hydrophobe Gruppen stabilisiert. Deshalb gab es keine Verbindung zwischen der Dichte der Hydrationshülle und den chemischen Eigenschaften von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren und die Verweilzeit an hydrophoben und polaren Aminosäuren war vergleichbar [182]. Bei der Verteilung der Wassermoleküle auf der Proteinoberfläche wurde bei anderen Proteinen ebenfalls kein klarer Trend zwischen hydrophilen und hydrophoben Bereichen beobachtet [173] und es konnte keine klare Aussage über den Einfluss von Aminosäuren mit verschiedenen Eigenschaften auf die Beweglichkeit der umgebenden Lösungsmittelmoleküle gemacht werden [183]. Das Konzept der hydrophoben Hydratation und das Einfrieren von Wasser zu Wasserclustern um eine hydrophobe Oberfläche, wurde bereits vorgeschlagen [184]. In den Simulationen konnte dieses Wassernetzwerk erkannt und das

Einfrieren von Wassermolekülen an der Oberfläche, durch einen langsamen Austausch mit dem Lösungsmittel, erklärt werden. Untersuchungen der Hydrationshülle von Proteinen durch Röntgenbeugung zeigten, dass eine Schicht von Wassermolekülen um das Protein geordnet war. Ein umspannendes Wassernetzwerk aus mehreren kleineren Clustern, wurde wie in unseren Simulationen auch durch *Percolation Transition* von Lysozym beobachtet, in Simulationen [11] [118] und im Experiment [174] beobachtet. Hier begünstigten unpolare Lösungsmittel die Bildung von Wasserclustern. Die Anzahl der Cluster hing auch in unseren Simulationen vom Lösungsmittel ab, besonders in Cyclohexan und Toluol wurden Cluster an der Oberfläche beobachtet, die mit der Anzahl der langsam ausgetauschten Wassermoleküle korrelierten. Die Anordnung der Cluster war allerdings zeitabhängig. In Übereinstimmung mit unseren Simulationen, bestanden die Wassercluster in einer Cutinase aus 2 bis 8 Wassermolekülen in Abhängigkeit vom Lösungsmittel bei einer Hydratationsmenge von 15 % (w/w) [118]. In der Kristallstruktur von CALB bestand der größte Cluster aus 14 Wassermolekülen mit einem B-Faktor kleiner als 40 \AA^2 . Das Wassernetzwerk von CALB war flexibel, die Cluster unterschieden sich in verschiedenen Simulationen des gleichen Systems. Neben den Wasserclustern gab es weitere einzelne Wassermoleküle mit eingeschränkter Beweglichkeit, zwischen den lokalisierten Wasserclustern und den einzelnen Wassermolekülen formte sich das Wassernetzwerk. Die Beobachtung von gering beweglichen Wassermolekülen und des Wassernetzwerks aus den Simulationen sind von der Wahl des B-Faktors abhängig, so können bei einem höheren *cutoff* mehr gering bewegliche Wassermoleküle beobachtet werden, die dann auch zu einem stärker ausgeprägten Wassernetzwerk führen. Die meisten irreversiblen Vorgänge der Inaktivierung von Enzymen bei erhöhter Temperatur werden durch Wasser begünstigt. Aus den Simulationen kann gefolgert werden, dass schnell ausgetauschtes Wasser an der Oberfläche durch den Vorgang des Austauschs zu hoher Flexibilität führt und damit zu geringerer Stabilität in Wasser. Die erhöhte Thermostabilität von Lipasen in organischen Lösungsmitteln im Vergleich zu Wasser ist bekannt [82] und kann damit erklärt werden.

Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die verringerte Flexibilität von CALB in unpolaren Lösungsmitteln nicht nur eine Konsequenz der Wechselwirkung zwischen dem organischen Lösungsmittel und dem Enzym,

sondern auch der Wechselwirkung mit dem ans Enzym gebundene Wasser und seinem Austausch an der Oberfläche ist.

5.2 Untersuchung der Grenzflächenaktivierung durch langzeit Simulationen von *Burkholderia cepacia* Lipase

Eine auffallende Eigenschaft der meisten Lipasen ist die Grenzflächenaktivierung an einer hydrophoben Grenzschicht oder in organischen Lösungsmitteln. Die Grenzflächenaktivierung von Lipasen ist verbunden mit einer beträchtlichen Konformationsänderung des *lids*. Die Untersuchung von Konformationsänderungen und Übergangszuständen von Enzymen ist eine große Herausforderung, da sie meistens im Experiment nicht zugänglich ist. Dies gilt insbesondere für Lipasen mit einem beweglichen *lid*, die nur in der offenen oder geschlossenen Konformation durch Röntgenbeugung aufgelöst werden können. Die Konformationsänderung des *lids* wurde in den durchgeführten MD Simulationen untersucht. Der Vorteil dieser Simulationen gegenüber früheren ist zum einen die Verwendung von expliziten Lösungsmittelmodellen und zum anderen der längere Zeitraum der Simulationen über 30 ns. Es wurde bereits gezeigt, dass die Verwendung von expliziten Lösungsmitteln in MD Simulationen die Übereinstimmung mit Daten aus der Röntgenstrukturanalyse verbessert [50]. Die Simulationen wurden ohne Verwendung von *restraints* oder externen Kräften durchgeführt, da lediglich der Einfluss des Lösungsmittels die Veränderung der Konformationen bewirken sollte. Der Konformationsraum konnte durch Ausdehnung der Simulationen auf längere Zeiträume [51] und durch mehrere Simulationen [52] [53] [153] besser untersucht werden. Mehrfache Simulationen des gleichen Systems mit unterschiedlicher Verteilung der Startgeschwindigkeiten auf die Atome verbessert das Durchsuchen des Konformationsraums. Viele kurze Trajektorien sind geeignet lokalisierte Bereiche mit kleineren Konformationsänderungen zu untersuchen [152], großräumige Konformationsänderungen sind dagegen nur in langen Simulationen zugänglich. Die Ausweitung der Simulationen auf längere Zeiträume war durch die erwartete Konformationsänderung des *lids* und mögliche Energiebarrieren deren Überschreitung längere Zeit braucht [153] notwendig. Die einzelnen

Simulationen des gleichen Systems zeigten Unterschiede im Durchlaufen des Konformationsraums, resultierten aber in der gleichen Veränderung der Struktur, die Ergebnisse waren reproduzierbar. In Toluol blieb die geöffnete Konformation jeweils geöffnet und die geschlossene öffnete sich, in Wasser blieb die geschlossene Konformation jeweils geschlossen und die offene zeigte eine Schließbewegung. Die hier beobachteten Konformationsänderungen der durchgeführten Simulationen zeigen, dass die Methode zur Untersuchung der Struktur und Dynamik von Lipasen in verschiedenen Lösungsmitteln geeignet ist.

5.2.1 Simulationen der geschlossenen Konformation in Wasser

Die geschlossene Konformation von BCL in Wasser blieb wie erwartet in der hydrophoben Umgebung geschlossen. Der beobachtete hohe RMSD in den Simulationen von geschlossenem BCL in Wasser war einerseits auf die weitere Schließbewegung des *lids* und die Bewegung des β -*hairpin loop*, andererseits auch auf mehrere bewegliche *loops* an der Oberfläche zurückzuführen. Diese labile Konformation von Lipasen in der geschlossenen Konformation in Abwesenheit einer hydrophoben Grenzschicht wurde bereits auch im Experiment beobachtet. Das *lid* der geschlossenen Lipase aus *Thermomyces lanuginosa* (TLL) war in Wasser sehr ungeordnet [186] und im Falle der Lipase aus *Rhizopus delemar* wurden verschiedene Konformationen des *lids* beobachtet [187]. Bei der geschlossenen Konformation von BCL handelte es sich zudem um ein Homologiemodell und strukturelle Veränderungen können auch auf Artefakte des Homologiemodells zurückzuführen sein.

5.2.2 Simulation der geschlossenen Konformation in Toluol

In den Simulationen von geschlossenem BCL in Toluol konnte die Öffnung des *lids* beobachtet werden. Das *lid* von BCL öffnete sich von der anfänglich geschlossenen Konformation während der Simulation in Toluol um 24 Å. Eine Bewegung des *lids* wurde auch schon in kurzen 200 ps Simulationen von RML beobachtet [41], hier öffnete sich das *lid* in Methyl-hexanoate geringfügig,

während das *lid* in Wasser geschlossen blieb. Die beobachtete räumliche Ausdehnung der Bewegung des *lids* von BCL in unseren Simulationen ist viel größer als die Bewegung in Simulationen von RML [44] [188] oder TLL [189], das *lid* in diesen Lipasen ist allerdings ähnlich konstruiert [190]. Eine Öffnung des *lids* um 10 Å an einer hydrophoben Grenzschicht wurde auch in Simulationen von geschlossener CRL beobachtet [116]. Die Bewegung des *lids* in RML ist eine einfache *body hinge-type* Bewegung einer einzelnen Helix, das *lid* bewegte sich im Experiment um 7 Å [29] und 12 Å [30] [34]. In *Brownian dynamics* Simulationen von RML wurde die Öffnung des *lids* in 100 ns Simulationen in einer Umgebung einer niedrigen Dielektrizitätskonstante gezeigt [43], die Aktivierung dieser Lipase wurde durch eine hydrophobe Umgebung erhöht, die Öffnung des *lids* konnte in Wasser über 900 ns nicht beobachtet werden. Der Zeitraum dieser Simulationen ist allerdings nicht mit denen von molekulardynamischen Simulationen vergleichbar. Durch die Erhöhung der Dielektrizitätskonstante des unpolaren Lösungsmittels wurde auch die nötige Zeit der *lid*-Öffnung stark erhöht [43]. Der Kontakt von CRL mit einer hydrophoben Oberfläche beschleunigte im Experiment den Konformationsübergang [191], der auch in unseren Simulationen in Toluol viel schneller war. In einer Simulation von RML über 1 ns in explizitem Lösungsmittel konnte eine hohe Beweglichkeit des *lids* durch *Essential Dynamics* beobachtet werden [188], es wurde auf eine Bewegung des *lids* geschlossen die eine partielle Öffnung des *lids* zeigt. Diese Bewegung die üblicherweise im Zeitraum von mehreren Nanosekunden vor sich gehen sind in MD Simulationen nur sehr aufwendig zu untersuchen, da die Bewegung von *loops* normalerweise im Zeitraum von 10^{-9} bis 10^{-10} s stattfindet [192] [193]. In Simulationen der offenen Konformation von TLL über 12 ns in Wasser bewegte sich das *lid* geringfügig in Richtung der geschlossenen Konformation [189], die aber innerhalb der Simulationszeiten nicht erreicht werden konnte. Der Verlauf der Simulation ließ vermuten, dass es sich bei der Grenzflächenaktivierung des *lids* um einen mehrstufigen Prozess handelt bei dem es mehrere Übergangszustände gibt, bevor die vollständig geöffnete Konformation erhalten wird. Ein mehrstufiger Prozess während der Öffnung des *lids* konnte auch in Simulationen von BCL gesehen werden. Eine Energiebarriere wurde identifiziert, durch die eine vollständige Öffnung des *lids* verhindert wurde. Die Bewegung von Helix $\alpha 5$ war sterisch durch Helix $\alpha 6$ gehindert, eine Entfaltung der Aminosäuren (Thr156, Asn157, Gln158 and Asp159) der Helix $\alpha 6$ wäre notwendig, um die

Weiterbewegung des *lids* zur vollständig geöffneten Konformation zu ermöglichen. Die Entfaltung der Helix α_6 konnte in den 30 ns der Simulation nicht beobachtet werden. Die in den Simulationen identifizierte Barriere kann jedoch auch ein Artefakt des erstellten Homologiemodells sein. Die Helix α_6 ist, genau wie im verwendeten *template* der geschlossenen Kristallstruktur von BGL [64], länger als in der geöffneten Kristallstruktur. Eine korrelierte Bewegung eines *loops* mit dem *lid* wurde für *Pseudomonas aeruginosa* Lipase (PAL) vorgeschlagen. In einer Simulation von PAL über 10 ns wurde die Bewegung des *loops* durch die Aktivierung des *lids* ausgelöst [194]. Dieser *loop* war sehr flexibel und bewegte sich ebenso wie das *lid* um 5 Å. In den Simulationen von BCL konnte eine korrelierte Bewegung des β -*hairpin loop* mit der Bewegung des *lids* nicht beobachtet werden und scheint für eine Bewegung des *lids* auch nicht notwendig zu sein, allerdings ist der β -*hairpin loop* auch in BCL sehr flexibel.

Unterschiedliche Mechanismen der Grenzflächenaktivierung wurden bisher vorgeschlagen. Die „*substrate theory*“ besagt, dass Veränderungen in der Konformation des *lids* von der Anwesenheit eines Substrats abhängen [48] [49] und die „*enzyme theory*“ besagt, dass Konformationsänderungen des *lids* durch auf die Adsorption an eine hydrophobe Grenzschicht zurückzuführen sind [34], vergleichbar mit dem Einfluss von unpolaren organischen Lösungsmitteln. Die Öffnung des *lids* war in Simulationen von BCL ohne die Anwesenheit eines gebundenen Substrats möglich und wurde in Übereinstimmung mit der *enzyme theory* alleine durch eine hydrophobe Umgebung hervorgerufen. Die durch Lösungsmittel induzierte Öffnung des *lids* der *Human pancreatic* Lipase wurde experimentell auch ohne anwesendes Substrat beobachtet [195]. Hydrophobe Lösungsmittel begünstigen die Öffnung des *lids*, und scheinen auch stabilisierend auf die geöffnete Konformation zu wirken, die thermodynamisch begünstigt ist. Dies war einerseits an der Konformationsänderung und durch die Zunahme der hydrophoben Oberfläche während der Simulation zu sehen, andererseits durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Stabilisierung der negativen Ladung von Asp130 durch Koordination anderer Seitenketten des *lids*. Die Stabilisierung war in der geschlossenen Konformation räumlich nicht möglich.

Die Eigenschaften der Oberfläche von offenem BCL unterschieden sich deutlich von denen der geschlossenen Konformation. Die Bewegung des *lids* öffnete nicht nur den Zugang zum aktiven Zentrum, sondern exponierte auch eine große hydrophobe Oberfläche. In RML führte die Konformationsänderung während der

Aktivierung zu einer Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche um etwa 700 \AA^2 [30], gleichzeitig wurde ein Teil der zuvor exponierten hydrophilen Oberfläche verdeckt, die Abnahme der hydrophilen Oberfläche betrug hierbei etwa 450 \AA^2 . Eine deutlich größere Zunahme der hydrophoben Oberfläche von 1000 \AA^2 , vergleichbar mit der Zunahme in den Simulationen von BCL, wurde im Fall der Lipase aus *Candida rugosa* [15] und der *Human pancreatic* Lipase beschrieben [31].

5.2.3 Simulation der offenen Konformation in Wasser

In den Simulationen der geöffneten Konformation von BCL konnte eine große Bewegung von 12 \AA in Richtung der geschlossenen Konformation beobachtet werden. Die vollständige Schließbewegung des *lids* konnte im Zeitraum der Simulation nicht beobachtet werden, dazu müssten die Simulationszeiten eventuell verlängert werden. Kurze Simulationen der geöffneten Konformation von BCL in Wasser und im Vakuum wurden bereits veröffentlicht [47]. In diesen Simulationen wurde, genau wie in den hier vorliegenden Simulationen, eine hohe Flexibilität im *lid* und β -*hairpin loop* festgestellt. Die hohe Flexibilität des *lids* und des β -*hairpin loop* aus der Simulation und eine *Essential Dynamics* Analyse wurden als Bewegung in Richtung der geschlossenen Konformation gedeutet, eine eindeutige Schließbewegung jedoch nicht beobachtet werden. Auf Grund der hohen Flexibilität wurde gefolgert, dass die offene Konformation von BCL in Wasser instabil ist und zum Schließen des *lids* führt. In unseren Simulationen von BCL war die Öffnung des *lids* in Toluol schneller als das Schließen in Wasser. Die offene und geschlossene Konformation der *Candida rugosa* Lipase (CRL) konnte bereits getrennt isoliert werden [191]. Die Umwandlung der offenen zur geschlossenen Konformation von CRL in Wasser in Abwesenheit einer hydrophoben Grenzschicht war sehr langsam, während die Öffnung in hydrophober Umgebung sehr viel schneller vor sich ging und den Konformationsübergang begünstigte. Die Trennung der beiden Konformationen wurde dadurch ermöglicht, ein Übergangszustand zwischen der geschlossenen und der offenen Konformation konnte nicht isoliert werden. In ähnlicher Weise hatte die geschlossene Konformation von RML in einem Medium mit niedriger Dielektrizitätskonstante eine große Neigung die Konformation zu

ändern, während die offene Konformation in Wasser nur eine geringe Neigung zu einem Übergang in die geschlossene Konformation zeigte [30] [187] [46].

Der *loop* zwischen Helix $\alpha 4$ und Helix $\alpha 5$ mit Tyr129 des *lids* zeigte eine stärker ausgeprägte Bewegung als das komplette *lid*. Wie in allen anderen simulierten Systemen von BCL bewegte sich der *loop* zwischen Helix $\alpha 4$ und Helix $\alpha 5$ zuerst, bevor eine Bewegung der Helix $\alpha 5$ zu erkennen war und scheint eine Art Initiator der Öffnung und des Schließens des *lids* zu sein. Tyr129 zeigt dabei in Abhängigkeit des Lösungsmittels wie ein Schalter in eine andere Richtung. Dieses Verhalten von Tyr129 ist ähnlich zu dem bereits beobachteten Verhalten von Arg im *lid* von TLL [42].

5.2.4 Simulation der offenen Konformation in Toluol

Die Struktur der geöffneten Konformation von BCL in Toluol ist nach der Simulation etwas weiter geöffnet als die offene Konformation der Kristallstruktur. Dieses Verhalten wurde bereits auch schon für RML in *Brownian Dynamics* Simulationen beobachtet [43]. In MD Simulationen von RML an einer hydrophoben Grenzschicht, öffnete sich das *lid* ebenfalls stärker als in der Kristallstruktur [196]. Die weiter geöffnete Konformation aus der Simulation im Vergleich zur Kristallstruktur kann mehrere Ursachen haben. Die Kristallstruktur repräsentiert möglicherweise nicht die vollständig geöffnete Konformation durch vorhandene Kristallkontakte oder der Einfluss des verwendeten Lösungsmittels unterscheidet sich vom Einfluss des Lösungsmittels bei der Kristallisierung. Die Kristallstrukturen der veröffentlichten Strukturen von BCL [39] [33] [144] [145] [146] waren, auch unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen, mit einem RMSD von 0.2 bis 0.5 Å untereinander, nahezu identisch. Die Konformation des *lids* und die Lage des β -*hairpin loops* ist in allen Strukturen gleich. Es konnten die gleichen Kristallkontakte im Bereich des *lids* und des β -*hairpin loop*, wie schon in der Kristallstruktur 3LIP, beobachtet werden. Kristallkontakte sind bei der Interpretation von Simulationen von Bedeutung. Während den Simulationen können sich Artefakte aus der Kristallstruktur auflösen und man erhält eine Konformation die näher der tatsächlichen freien Konformation in Lösung ist [199]. Unterschiede der Struktur von Proteinen im Kristall und in Lösung wurden bereits für andere Proteine gezeigt [197], die Wechselwirkungen im Kristall stabilisieren eine der vielen möglichen Konformationen, eine bestimmte

Konformation im Kristall kann aus energetischen Gründen durch die Wechselwirkung mit anderen Monomeren bevorzugt sein [198]. Die Flexibilität aus den Simulationen stimmt gut mit der Flexibilität aus der Kristallstruktur überein, die Flexibilität des *lids* und des *β -hairpin loop* sind hier auch hier viel höher als die Flexibilität in anderen Bereichen der Struktur.

5.3 Rationales Design einer neuen einstufigen Aufreinigungsmethode für *Candida antarctica* Lipase B durch IEC

Ionen-Austausch Chromatographie (IEC) ist eine günstige, schnelle und häufig verwendete Methode zur Aufreinigung von Proteinen [124]. Viele Lipasen können neben IEC auch recht einfach durch HIC aufgereinigt werden, da sie hydrophobe *patches* auf der Oberfläche besitzen [124]. Die Entwicklung einer effizienten Aufreinigungsmethode basiert allerdings noch immer auf dem Ausprobieren verschiedener experimenteller Bedingungen, was insbesondere für Proteine mit ungewöhnlichen Eigenschaften schwierig und Zeit aufwendig sein kann. So existiert für CALB kein Protokoll mit Bedingungen, bei denen das Protein auf IEC Säulen bindet. Durch Modellierung elektrostatischer Eigenschaften kann der Parameterraum, zur Ermittlung der besten Aufreinigungsbedingungen im Experiment, eingegrenzt werden und erlaubt gezielte Experimente. Durch die theoretische Charakterisierung können die Art der Aufreinigung und Bedingungen, wie pH-Werte in der Aufreinigung mittels IEC, eingegrenzt werden. Die elektrostatischen Eigenschaften von CALB konnten verlässlich vorhergesagt werden, wie im Vergleich mit der experimentellen Titrationskurve gezeigt werden konnte. Nach der Charakterisierung von CALB durch Elektrostatik und Hydrophobizität konnten die Beobachtungen der bisherigen Aufreinigungsmethode [125] erklärt werden. Es wurden Bedingungen gefunden, bei denen die Bindung auf IEC Säulen möglich war. Ein neues einstufiges Verfahren zur Aufreinigung von CALB durch IEC wurde basierend auf dem rationalen Design entwickelt. Diese neue Aufreinigungsmethode ist weniger aufwendig als die bisher verwendete Aufreinigungsmethode von CALB [125], in der mehrere Aufreinigungsschritte zu denen die Dialyse, HIC und IEC, jeweils auf verschiedenen Säulen, gehören. Die Trennung von CALB war nur durch die

Bindung der verunreinigenden Proteine möglich, CALB selber konnte nicht auf eine der Säulen gebunden werden. In der vorgestellten einstufigen Aufreinigungsmethode ist nur noch ein Aufreinigungsschritt durch CIEC notwendig und CALB kann spezifisch auf die Säule gebunden werden. Dies war durch die Erniedrigung des pH Werts auf pH 3 möglich. Da CALB bei diesem pH Wert im Gegensatz zu vielen anderen Lipasen noch stabil ist, kann die entwickelte Aufreinigungsmethode verwendet werden. Allerdings gibt es nur einen sehr engen pH Bereich in dem die Aufreinigung durchgeführt werden kann, da CALB unter pH 3 recht schnell instabil und über pH 3 neutral ist und nicht auf IEC Säulen bindet. Die Eigenschaften von CALB, mit seinem breiten isoelektrischen Bereich, sind im Vergleich mit anderen Lipasen ungewöhnlich. Die meisten Lipasen, unter anderem *Burkholderia cepacia* Lipase [33], *Pseudomonas fluorescence* Lipase [200] und *Candida rugosa* Lipase [201] zeigen einen schmalen isoelektrischen Bereich, der als isoelektrischer Punkt zu sehen ist. Die Vorteile dieser neuen Methode zur Aufreinigung von CALB liegen darin, dass CALB spezifisch auf die Säule gebunden werden kann und die Methode weniger zeitaufwendig ist.

5.3.1 Erklärung des speziellen pH Profils von CALB

Um das elektrostatische Verhalten und die Eigenschaften zu erklären, die CALB im Vergleich zu anderen Lipasen so besonders machen, wurden die Protonierungszustände und die Titrationskurve theoretisch und experimentell untersucht. Die berechnete Titrationskurve sollte einen Anhaltspunkt geben, welche Bedingungen für eine Aufreinigungsmethode verwendet werden könnten und weshalb es bei der bisherigen Methode [125] nicht möglich war CALB spezifisch zu binden. Das Ergebnis zeigte einen breiten pH Bereich in dem CALB nicht oder nur sehr gering geladen war und in dem sich die Protonierungszustände und damit der Gesamtladung sich nicht änderte.

Die berechnete und experimentell bestimmte Titrationskurve zeigten einen ähnlichen Verlauf mit einem breiten isoelektrischen Bereich, allerdings ist der isoelektrische Bereich etwas verschoben. Die experimentelle Titrationskurve hatte einen isoelektrischen Bereich zwischen pH 4 bis 8 im Vergleich zur berechneten Titrationskurve im Bereich von pH 5 bis 9. Die Tatsache, dass die Aufreinigung erst etwas unterhalb des bestimmten isoelektrischen Bereichs

möglich war ist einerseits auf die nicht ganz genaue Berechnung der Titrationskurve zurückzuführen, andererseits könnte eine einzige Ladung zur Bindung von CALB auf die Säule nicht ausreichend sein. Unterschiede in der berechneten und gemessenen Titrationskurve von CALB sind auf Vereinfachungen bei der Berechnung der pKa-Verschiebung titrierbarer Seitenketten zurückzuführen. Die pKa-Verschiebung einer titrierbaren Seitenkette hängt stark von der nächsten Umgebung im Protein und der Lage der Seitenkette ab. Da in der Kristallstruktur nur eine der möglichen Konformationen berücksichtigt wurde kann sich die pKa-Verschiebung des flexiblen Proteins in Lösung durchaus von dem der Kristallstruktur unterscheiden. Neben der elektrostatischen Wechselwirkung hängt eine Bindung auf der Säule noch von weiteren Faktoren, wie der Hydrophobizität und der Geometrie und Flexibilität der Oberfläche der Säule ab, die hier nicht berücksichtigt wurden. Die berechneten pH Werte unterhalb von pH 3 und oberhalb von pH 11 waren nur theoretisch, da CALB in diesen pH Bereichen nicht mehr als stabil betrachtet werden kann. Die experimentelle Titrationskurve wurde im Bereich von pH 3 bis 9 gemessen, an den Rändern des Gels ist die Titrationskurve, durch eine schlechtere Fokussierung des pH Gradienten, nicht mehr verlässlich.

Wie gezeigt wurde ist CALB eine Lipase mit besonderen Eigenschaften im Vergleich zu den meisten anderen Lipasen. CALB hat keinen definierten pI, wie in der Literatur mit 6.0 angegeben [125] [12], sondern einen isoelektrischen Bereich, der durch einen sehr flachen Verlauf durch den theoretischen isoelektrischen Punkt zustande kommt. Für den besonderen Verlauf der Titrationskurve gibt es zwei Gründe:

1. Der breite Bereich ohne Änderung der Protonierung ist am isoelektrischen Punkt, an dem CALB ungeladen ist. Die Anzahl der negativ geladenen Aminosäuren Asp und Glu und der positiv geladenen Aminosäuren Lys, Arg und His der katalytischen Triade bei pH 7 ist gleich.
2. CALB hat keinen pKa-Wert der titrierbaren Seitenketten im Bereich von 5 bis 8, und damit einen breiten Bereich, in dem es keine Änderung der Gesamtladung gibt. CALB hat keine His an der Oberfläche was einen pKa-Wert innerhalb dieses Bereichs hätte. Das einzige His ist im aktiven

Zentrum und hat eine pKa-Verschiebung um 1.7, von einem intrinsischen pKa-Wert von 6.3 auf 8.0.

pKa-Verschiebungen des His in dieser Größenordnung werden normalerweise in der katalytischen Triade beobachtet, da His durch Glu oder Asp stabilisiert wird [202] [203] [204] [205] [206]. Im Vergleich dazu haben die meisten anderen Lipasen mehrere His an der Oberfläche ohne eine größere pKa-Verschiebung. Die Kombination dieser beiden Eigenschaften führte zu den besonderen elektrostatischen Eigenschaften von CALB.

5.3.2 Analyse der Lipase Engineering Database

Die *Lipase Engineering Database* (LED) [Fischer 2003] wurde durch Sequenzanalyse ausgewertet, um andere Lipasen oder α/β -Hydrolasen mit einem besonderen pH Profil, ähnlich dem von CALB, zu finden. In der LED sind über 5400 α/β -Hydrolasen enthalten. Die Anzahl der His und die Anzahl der positiv (Lys und Arg) und negativ (Asp und Glu) geladenen Aminosäuren wurde anhand der Sequenzen ausgelesen. Enthaltene Fragmente der α/β -Hydrolasen in der LED wurden in dieser Analyse nicht berücksichtigt. Es gab viele α/β -Hydrolasen mit einer der oben genannten Eigenschaften. Innerhalb der über 5400 α/β -Hydrolasen der LED wurde jedoch nur eine weitere α/β -Hydrolase mit einem ähnlich breiten isoelektrischen Bereich gefunden. Es handelte sich dabei um eine Mutante der *Fusarium solani* Cutinase (FSC) [207] mit einem His in der katalytischen Triade und einer gleichen Anzahl von positiv und negativ geladenen Aminosäuren. Die berechnete Titrationskurve zeigte, dass der isoelektrische Bereich der FSC von pH 5 bis 10 um eine Einheit im Vergleich zu CALB verschoben ist und nicht ganz so flach verläuft. Diese Verschiebung des isoelektrischen Bereichs zu höheren pH Werten kommt durch ein umgekehrtes Verhältnis von Lys zu Arg im Vergleich zu CALB. Die Mutante der *Fusarium solani* Cutinase konnte bei pH 4.7 durch CEIC aufgereinigt werden [208], knapp unterhalb des berechneten isoelektrischen Bereichs, wie auch bei der entwickelten Aufreinigungsmethode von CALB. Es gab keine weiteren α/β -Hydrolasen in der LED mit einem breiten isoelektrischen Bereich, andere Lipasen wie *Pseudomonas cepacia* Lipase [33] oder *Candida rugosa* Lipase [201] haben einen engen isoelektrischen Bereich und damit einen gut definierten pI. Die

Protonierung des His und Asp im aktiven Zentrum von Lipasen ist eine bisher noch nicht vollständig geklärte Frage. Ein zusätzliches Proton kann entweder an His oder an Asp gebunden sein [202], die Rolle von Asp ist hierbei das protonierte His der katalytischen Triade zu stabilisieren [Edmond 1999]. In *Bacillus lentus* Subtilisin wurde festgestellt, dass dieses Proton von His und Asp geteilt wird [209] [210]. Die Wasserstoffbrücke zwischen His und Asp ist eine *low-barrier* Wasserstoffbrücke (LBHB). Die Abstände sind nicht vereinbar mit einer einfachen Ionenbindung zwischen His und Asp [204], der kurze Abstand zwischen His und Asp ist in vielen Strukturen ersichtlich [211].

5.3.3 Anwendung auf andere Enzyme

Die Vorgehensweise dieser einfachen und nicht zeitaufwendigen theoretischen Analyse dieser Studie kann allgemein zur Vorhersage von experimentellen Aufreinigungsbedingungen von Enzymen verwendet werden. Die Kombination aus rationalem Design und gezielten Experimenten kann den Aufwand minimieren, Bedingungen für die Aufreinigung von Proteinen zu finden. Die Vorhersage von Aufreinigungsbedingungen war, wie für FSC gezeigt, auch für andere Proteine mit einer bekannten Kristallstruktur möglich. Die Kombination aus rationalem Design und gezielter experimenteller Untersuchung kann den Aufwand, nützliche Aufreinigungsbedingungen zu finden, reduzieren. Interessant wäre die Vorhersage von Bedingungen zur Aufreinigung mittels IEC von Proteinen ohne bekannte Kristallstruktur. Die Vorhersage ist jedoch empfindlich abhängig von der Qualität des dazu notwendigen Homologiemodells, da sequenzbasierte Vorhersagen der Titrationskurven ungenauer sind. Die Verschiebung der pKa-Werte, und damit die Protonierungen, hängen dabei nicht nur von den *backbone* Atomen, sondern ganz wesentlich von der Lage der Seitenketten ab. Die Vorhersage von Aufreinigungsbedingungen sollte deshalb nur für gute Homologiemodelle möglich sein.

5.4 Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch *Candida antarctica* Lipase B

Bei Enzymen die in einer Reaktion keine katalytische Aktivität zeigen ist es unwahrscheinlich, dass durch einzelne Mutationen eine Reaktion in ausreichendem Maß katalysiert wird. Der WT von CALB zeigte in ersten Vorversuchen eine ausreichende Aktivität in der Acrylierung von Hydroxypropylcarbamaten, dass eine erfolgreiche Optimierung für industrielle Ansprüche aussichtsreich erschien. CALB hat sich bereits in der stereoselektiven Synthese gegenüber einer Vielzahl chiraler sekundärer Alkohole bewährt [72] [71] [67], kann jedoch aufgrund seiner oft hohen Aktivität auch eingesetzt werden, um einen vollständigen Umsatz eines Gemischs von Enantiomeren zu erreichen. Dabei ist es allerdings oft notwendig die Eigenschaften, hinsichtlich der speziellen Problemstellung, zu verbessern. So ging es bei der Optimierung der Reaktion im vorliegenden Fall nicht darum die Enantioselektivität zu erhöhen, sondern die Enantioselektivität zu erniedrigen und die Gesamtaktivität zu erhöhen. Die Edukte (1hpc, 2hpc, 3hpc und 4hpc) sollten in möglichst kurzer Reaktionszeit vollständig umgesetzt werden. Um nun die Aktivität von CALB gegenüber eines bestimmten Substrats zu erniedrigen, stehen aus experimenteller Sicht zum einen klassische Methoden wie die Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Verfügung, zum anderen lassen sich spezifische Eigenschaften auch durch Methoden der gerichteten Evolution verändern. Die Verbesserung der Eigenschaften kann hierbei über einen rationalen Ansatz, durch positionsgerichtete Mutagenese, über Zufallsmutagenese oder eine Kombination beider Methoden erfolgen. Die positionsgerichtete Mutagenese erfordert die dreidimensionale Struktur des Enzyms zur Auswahl der zu mutierenden Positionen im Enzym. Der große Nachteil dieses Ansatzes ist der extrem hohe Zeitbedarf, da für jede Mutante die Mutation in das entsprechende Gen eingeführt werden muss, das Protein im Anschluss in ausreichender Menge exprimiert und gereinigt werden muss, um dann die biochemischen Eigenschaften bestimmen zu können. In dieser Arbeit wurden einerseits die Reaktionsbedingungen, durch die Immobilisierung von CALB, optimiert, andererseits wurden die spezifischen Eigenschaften durch die positionsgerichtete Mutagenese unter Verwendung bioinformatischer Ansätze verbessert. Die strukturelle Ursache der hohen Enantioselektivität von CALB gegenüber

sekundären Alkoholen ist zwar in der Theorie verstanden [71] [61] und die Bindungstaschen im aktiven Zentrum von CALB wurden bereits identifiziert [68], allerdings konnten bis heute keine Mutanten aus Ansätzen des rationalen Designs mit signifikant verbesserter Enantioselektivität generiert werden [75] [10]. Dies liegt im Wesentlichen an der bereits, im Vergleich mit anderen Lipasen, schon sehr hohen Aktivität und Stereoselektivität von CALB. Durch die räumlichen Beschaffenheit der stereospezifischen Bindetasche zeigt CALB eine hohe Enantioselektivität gegenüber sekundären Alkoholen [61] [71]. Während der Katalyse muss der Alkohol einen seiner Substituenten in dieser Bindetasche positionieren, um die Bildung der katalytisch notwendigen Wasserstoffbrücken zu ermöglichen. Die stereospezifische Bindetasche ist verhältnismäßig klein und kann nur Ethyl- oder kleinere Gruppen binden. Da die Größe der Bindungstasche stark durch *backbone* Atome beschränkt ist auch die Anzahl der möglichen Mutationen eingeschränkt. Durch die vorgeschlagenen Punktmutationen an der Position 278, basierend auf der molekularen Modellierung, wurde diese Bindetasche vergrößert. In der Literatur gab es schon Ansätze die Enantioselektivität von CALB gegenüber anderen Substraten zu erniedrigen [126] [73]. Die Position W104 in CALB zeigte sich hierbei als eine wichtige Position, durch deren Einfluss die Enantioselektivität von CALB verändert werden konnte. Die geringere Selektivität von Mutationen an Position W104 führte allerdings gleichzeitig zu einer erheblich verringerten Aktivität, weshalb diese Mutation für die Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten im Hinblick auf den industriellen Einsatz nicht verwendet werden konnte. Die Aktivität von CALB in der Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten mit Methylacrylat wurde in dieser Arbeit durch die Mutante L278A bis zur nahezu vollständigen Umsetzung erhöht. Auf Grund der unterschiedlichen Größe des Trägermaterials bei der Immobilisierung waren die Umsetzungen allerdings quantitativ nur eingeschränkt reproduzierbar. Versuche das Trägermaterial nach Größe zu trennen blieben erfolglos, stattdessen wurden zur Minimierung dieser Fehlerquelle größere Ansätze der Reaktionen gewählt. Eine Sequenzierung des aus genomischer DNA von *Candida antarctica* klonierten Gens von CALB zeigte auf Aminosäureebene zwei Abweichungen von der veröffentlichten Sequenz des WT [NCBI: CAA83122] (Abbildung 63). Eine Untersuchung der Positionen der veränderten Aminosäurereste T57A und A89T ergab, dass sich diese Reste an der Oberfläche, entfernt vom aktiven Zentrum des Enzyms, befanden und höchstwahrscheinlich nur geringen Einfluss auf die

Aktivität von CALB haben. Eine SDS-PAGE zur Kontrolle der Expression von CALB zeigte starke Proteinbanden im Bereich von 36-38 kDa (Abbildung). Die in *Pichia pastoris* exprimierte CALB zeigte damit ein Molekulargewicht von ungefähr 36 kDa, an Stelle des theoretischen Molekulargewichts von 33 kDa. Diese Abweichung konnte auf N-Glykosylierungen zurückgeführt werden [77].

Das Verfahren zur Acylierung von Hydroxypropylcarbamaten durch CALB L278A wurde bereits im 100 kg Maßstab bei BASF durchgeführt und als Europäisches Patent (AE 20070139 - NEW CALB Muteins and their use) angemeldet.

6 Material und Methoden

6.1 Chemikalien, Geräte und Software

6.1.1.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 13 Verwendete Chemikalien:

Chemikalien	Firma	Standort
MP 1000	Akzo	Deutschland
Sephadex™ G-50 Superfine	Amersham	Uppsala, Schweden
Molekularsieb 3 Å	BASF AG	Ludwigshafen, Deutschland
Hydroxypropylcarbammat (Carbalink)		
Hydroxypropylcarbammat-acrylsäureester		
BioRad Proteinassay Kit	BioRad Laboratories	Richmond, USA
SDS-PAGE Proteinstandard (LMW)		
Trypton	DIFCO Laboratories	Detroit, USA
Agar	Fluka Chemie	Buchs, Schweiz
Molecular Weight Marker 10kDa	GibcoBRL	Karlsruhe, Deutschland
Zeozin	Invitrogen	Leek, Niederlande
Ready-to-use-Coomassie	PIERCE Rockford	Illinois, USA
Formaldehyd 37 %	Riedel-de-Haen	Seelze, Deutschland
Glycerol		
Methanol		
Chirazyme L2, Iyo	Roche	Mannheim, Deutschland
Tween 20		
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Bacto-Pepton		
Agarose	Serva	Heidelberg, Deutschland
Antifoam Triton-X-100	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

Alle anderen verwendeten Chemikalien wurden bei Fluka (Buchs, Schweiz) oder Riedel-de-Haen (Seelze, Deutschland) erworben.

6.1.1.2 Stämme

Pichia pastoris X33	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
---------------------	------------	------------------------

6.1.1.3 Plasmide

pPICZaA	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
---------	------------	------------------------

6.1.1.4 Medien

Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) Medium

10 g/l	Hefeextrakt
20 g/l	Bacto Pepton
ad 800 ml H ₂ O autoklavieren	
Zugabe von 200 ml steriler Glukoselösung (100 g/l)	

PTM1-Spurensalzlösung

6 g	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
0.2 g	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
0.08 g	NaI
65 g	FeSO ₄ x 7 H ₂ O
3 g	MnSO ₄ x H ₂ O
0.2 g	Biotin
0.5 g	CoCl ₂
30 ml	6N H ₂ SO ₄
20 g	ZnCl
ad 1 l H ₂ O	

Buffered Glycerol-complex Medium for Yeast (BMGY)

10 g/l Hefeextrakt
20 g/l Bacto-Pepton
ad 800 ml H₂O autoklavieren
Zugabe von:
100 ml 1M Kaliumphosphatpuffer pH 6.0 (autoklaviert)
100 ml 10 % Glycerin (autoklaviert)
2 ml 0.02 % Biotin (sterilfiltriert)

Buffered Methanol-complex Medium for Yeast (BMMY)

10 g/l Hefeextrakt
20 g/l Bacto-Pepton
ad 900 ml H₂O autoklavieren
Zugabe von:
100 ml 1M Kaliumphosphatpuffer pH 6.0 (autoklaviert)
2 ml 0.02 % Biotin (sterilfiltriert)
5 ml Methanol

Zeozin-Stammlösung

100 mg/ml Zeozin in dH₂O, sterilfiltriert. Lagerung aliquotiert bei -20°C.

6.1.1.5 Verwendetes Verbrauchsmaterial

Tabelle 14 Verwendetes Verbrauchsmaterial:

Material	Firma	Standort
0.5, 1.5, 2.0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner	Nürtingen, Deutschland
15 + 50 ml Falcon		
Sterilfilter	Millipore	Molsheim, Frankreich
Ultrafiltrationsmembranen	Millipore	Bedford, USA
1,5 ml Messküvetten	Multimed	Kirchheim, Deutschland

6.1.1.6 Verwendete Geräte

Tabelle 15 Verwendete Geräte:

Gerät	Firma	Standort
Äkta Explorer	Amersham	Freiburg, Deutschland
PhastSystem Separation Unit		
Ultrospec 3000 Photometer		
Minigel-Twin G42	Biometra	Göttingen, Deutschland
SDS-PAGE Modell583	BioRad	München, Deutschland
Gel Dryer	BioRad	Hercules, USA
Sorvall RC-5B Zentrifuge	Du Pont Instruments	
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5415 R		
Zentrifuge 5810 R		
Concentrator 5301		
Thermomixer 5436		
Fisons GC Mega Series	Fisons Instruments	
Kryostat C1	Haake	
HA-Schüttelinkubator	Infors	Botmingen, Schweiz
Thermomixer		
5l-Fermenter		
IRIS process control system		
Impulsomat 614	Metrohm	Filderstadt, Deutschland
Dosimat 665		
pH Meter 620	Metrohm	Herisau, Schweiz
MC1 Research RC 210 Waage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
GC/MS-QP2010	Shimadzu	

6.1.1.7 Verwendete Software und Datenbanken

Tabelle 16 Verwendete Software und Datenbanken:

Datenbank/Programm	Verwendung	URL
T-Coffee	Sequenz-Alignment	tcoffee.vital-it.ch
NCBI	Allgemeine Sequenzrecherche	www.ncbi.nlm.nih.gov/
Clustal X	Sequenz-Alignment	bips.u-strasbg.fr/
SWISS-PROT	Proteinsequenzen	expasy.org/sprot/
Protein Data Base	Struktur-Daten	www.rcsb.org/pdb
BLAST	Suche homologer Sequenzen	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
FlexX	Docking	www.biosolveit.de/FlexX
Esp@cenet	Patentrecherche	gb.espacenet.com
LED	Datenbank α/β -Hydrolasen	www.led.uni-stuttgart.de
Pymol	Visualisierung	www.pymol.org
VMD	Visualisierung	www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/
SwissPDBViewer	Strukturbearbeitung	expasy.org/spdbv/
Gaussian98	<i>Ab initio</i> Berechnungen	www.gaussian.com/
AMBER	MD Simulationen	amber.scripps.edu/
Delphi	Elektrostatisches Potential	trantor.bioc.columbia.edu/delphi/
TITRA	pKa-Werte und Titrationskurven	
EMBL	Nukleotid-Sequenz Datenbank	www.ebi.ac.uk/embl/
WHAT IF	Kristallkontakte	swift.cmbi.kun.nl/whatif/
SWISS-MODELL	Homologiemodellierung	swissmodel.expasy.org

6.1.1.8 Eingesetzte Hardware

Sämtliche Simulationen wurden auf unserem BioCortex ("Biology by Computational Research Techniques and Experiments") Cluster durchgeführt. Es handelt sich um einen Linux-Cluster mit 128 Rechnern und insgesamt 256 Prozessoren.

6.2 Biochemische Methoden

6.2.1 Kultivierung von Mikroorganismen

6.2.1.1 Kultivierung von *Pichia pastoris*

Die Kultivierung von *P. pastoris* erfolgte in YPD Medium. Dazu wurden 10 ml YPD-Medium mit einer Kolonie einer Agarplatte inokuliert und bei 30°C und 180 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Selektion rekombinanter Zellen wurde Zeozin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Zur Stammhaltung wurde eine Hefekultur mit Glycerol im Verhältnis 1:1 versetzt und bei -80°C gelagert.

6.2.2 Expression von CALB in *Pichia pastoris*

P. pastoris hat sich als geeigneter Wirt für die Überexpression von aktivem CALB erwiesen. Der Vektor pPICZ α A, mit dem Gen aus CALB, wurde durch Elektroporation transformiert. CALB wurde in *P. pastoris* X-33 exprimiert [147].

6.2.2.1 Expression rekombinanter Lipasen in *P. pastoris* im Schüttelkolbenmaßstab

Die Expression von CALB in *P. pastoris* war bereits etabliert [77]. Die rekombinanten *P. pastoris* Zellen wurden bei 30°C und 180 rpm in 10 ml BMGY-Medium mit Zeozin bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 5-15 kultiviert. Zur Induktion wurde das Medium abzentrifugiert (5 min 2500 g 4°C) und die Zellen in 50 ml BMMY-Medium resuspendiert, wobei eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0.5 eingestellt wurde. Während der 6 Tage dauernden Expression wurde zur Aufrechterhaltung der Induktion alle 24 Stunden 100 % Methanol, bis zu einem Volumenanteil von 0.5 %, zugegeben. Nach abgeschlossener Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min 4000 rpm 4°C) und der Überstand zur Analyse eingesetzt. Die Expression von CALB in *P. pastoris* bietet den Vorteil, dass keine *inclusion bodies* gebildet werden und CALB in hoher Konzentration ins Medium sekretiert wird [77].

6.2.2.2 Expression rekombinanter CALB in *P. pastoris* im Fermentationsmaßstab

Die Expression von CALB fand in einer klassischen *fed-batch* Fermentation in *P. pastoris* statt. Die Kultur wurde mit der Expression aus dem Schüttelkolben angeimpft. Dabei wurde das entsprechende Volumen einer BMGY-Vorkultur mit Zeozin zum Animpfen der 5 l BMMY-Medium eingesetzt, wobei eine anfängliche OD_{600} von 0.5 verwendet wurde. Die Fermentation wurde im 5l-Fermenter (Infors, Bottmingen, Switzerland) mit 5 l BMMY-Medium 186.25 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 125 ml Methanol, 1ml Antifoam 286 und 1.25 % PTM1 trace salts [212] durchgeführt. Die Temperatur wurde bei 30°C und der pH-Wert durch Zugabe von NH_4OH (28 %) bzw. H_3PO_4 (10 %) konstant gehalten. Die Luftzufuhr betrug 15 L/min und die Rührergeschwindigkeit 650 rpm. Während der in der Kultur gelöste Sauerstoff und der pH-Wert permanent überwacht wurden, wurde die optische Dichte OD_{600} , die Gesamtproteinkonzentration und die Aktivität des Überstands stichprobenartig gemessen. Während der Fermentation wurde 1 ml Antifoam Triton-X-100 zugegeben. Zur Induktion und als Nährstoff wurde Methanol zugesetzt. Sobald die anfängliche Methanolkonzentration von 0.5 % (v/v) in der Kultur verbraucht war, angezeigt durch eine plötzliche Zunahme des gelösten Sauerstoffs durch das IRIS *process control system* (Infors, Bottmingen, Switzerland), wurden 25 ml 100 % Methanol mit 1.2 % (v/v) PTM1 automatisch zugefüttert. Der Impuls zur Methanolzugabe wurde dabei durch ein Ansteigen der relativen Sauerstoffkonzentration auf 40 % ausgelöst. Während der Expression wurde CALB in den Überstand ausgeschieden.

6.2.3 Chemische Methoden

6.2.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung des Proteingehalts wässriger Lösungen wurde photometrisch nach der Methode von Bradford mit dem Protein Assay Kit von Bio-Rad durchgeführt [213]. Diese Nachweismethode beruht auf der Bindung von Coomassie *brilliant blue* an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum der Lösung von 465 nm (ohne Protein) nach 595 nm (mit Protein) verschiebt. Die Zunahme der Absorption der Messlösung ist proportional zum Proteingehalt. Durch eine externe Kalibrierung mit BSA als Referenz lässt sich eine quantitative Aussage des Proteingehalts treffen. Zur Messung wurden 800 µl einer entsprechend verdünnten Proteinlösung mit 200 µl Bradford-Lösung gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Absorption bei 595 nm wurde in einer 1.5 ml Küvette am Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 Spektrophotometer gemessen.

6.2.3.2 Natrium-Dodecylsulfate-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese

Die Reinheit von Enzymen wurde durch Auftrennung der Proteine anhand einer Natrium-Dodecylsulfate Polyacrylamide-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ermittelt [214]. Durch SDS-PAGE können Proteine in analytischem oder präparativem Maßstab nach Größe aufgetrennt werden. Dabei wandern die Proteine unter dem Einfluss des angelegten elektrischen Feldes durch die Poren eines Polyacrylamid-Gels, wobei die Wanderungsrichtung und -geschwindigkeit von der Ladung der Proteine, der Porengröße des Gels und der angelegten Spannung abhängen. Die Auftrennung der Proteine im denaturierten Zustand erfolgt durch Bindung des Detergenz SDS, wobei die Proteine zur Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht proportional zu ihrer Größe negativ geladen und denaturiert werden.

Puffer und Lösungen

4x-Sammelgel-Puffer

12.1 g Tris
0.8 g SDS
dH₂O ad 200 ml
mit HCl auf pH 6.8 einstellen

4x-Trenngel-Puffer

36.5 g Tris
0.8 g SDS
dH₂O ad 200 ml
mit HCl auf pH 8.8 einstellen

Sammelgel (4 %)

0.52 ml Acrylamidlösung (30/0,8) 30 % (m/v)
1.00 ml 4x-Sammelgel-Puffer
2.47 ml dH₂O
4.00 µl TEMED
40 µl A APS 10 % (m/v)

Trenngel (12.5 %)

3.33 ml Acrylamidlösung (30/0.8) 30 % (m/v)
2 ml 4x-Trenngel-Puffer
2.67 ml dH₂O
4 µl TEMED
40 µl APS 10 % (m/v)

2x-SDS-Proben-Puffer

100 mM Tris
200 mM DTT
4 % SDS
0.2 % Bromphenolblau
20 % Glycerin
dH₂O ad 10 ml

Elektrophorese-Puffer (Laufpuffer)

6 g Tris
28.8 g Glycin
2 g SDS
dH₂O ad 2 l
mit HCl auf pH 8.3 einstellen

Fixierlösung

400 ml Methanol
100 ml Essigsäure
500 ml dH₂O

Coomassie-Färbelösung

2 g Coomassie Brilliant Blue R-250
42.5 ml Methanol
20 ml Eisessig
ad 1l H₂O

Herstellung des SDS-Gels und Durchführung der Elektrophorese:

Zunächst wird zwischen zwei Glasplatten luftblasenfrei die Trenngellösung bis ca. 2.5 cm unter den oberen Rand gegossen und mit ca. 200 µl Isobutanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels (20 min bei RT) wird Isobutanol abgegossen, die Sammelgellösung auf das mit dH₂O gespülte Trenngel gegossen und der Probenaschenkamm eingesetzt. Nach weiteren 20 min werden der Abstandshalter und der Probenaschenkamm vorsichtig entfernt und die Probenaschen gründlich mit H₂O gespült. Das so vorbereitete Gel wird zur Durchführung der Elektrophorese in die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Apparatur luftblasenfrei eingesetzt. Die Proteinproben werden vor dem Auftragen 1:1 mit 2x-SDS-Probenpuffer verdünnt, 5 min bei 95°C denaturiert und kurz zentrifugiert (2 min, 14000 rpm, 4°C). Als Molekulargewichtsstandard der Elektrophorese diente der Proteinstandard *Low Molecular Weight Marker*. Die Elektrophorese erfolgte zuerst für 10 min bei 10 mA, danach für 60 min bei 25 mA, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Das SDS-Gel wurde standardmäßig mit Coomassie Brilliant Blue (0,1 % (w/v), 30 % Methanol, 10 % Essigsäure) gefärbt. Nach 2-12 h Inkubation in der Färbelösung wurde in Entfärbelösung (30 % Methanol, 10 % Essigsäure) entfärbt, bis der Hintergrund

des Gels weitgehend farblos wurde. Die Nachweisgrenze für diese Färbemethode lag bei 0.3-1 µg/Bande. Zur Aufbewahrung wurde das Gel in einem BIO-RAD Gelrockner-583 2h bei 80°C getrocknet.

Tabelle 17 Zusammensetzung LMW Standard (Roth, Karlsruhe, Deutschland):

Protein	Molekulargewicht [kDa]
Phosphorylase B	97.4
Serum albumin	66.2
Ovalbumin	45.0
Carbonic anhydrase	31.0
Trypsin inhibitor	21.5
Lysozyme	14.0

6.2.3.3 Aktivitätsmessung durch *p*-Nitrophenyl-Acetat

Der Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die Aktivität und Stabilität von CALB wurde spektrophotometrisch bei Raumtemperatur bestimmt. Es wurde eine Lösung von 10 mM *p*-Nitrophenyl Acetat in Dimethylsulfoxid hergestellt und 100 µl dieser Lösung mit 850 µl 100 mM Tris/HCl (pH 8) gemischt. Der Assay wurde durch Zugabe von 50 µl Enzymlösung gestartet. Die Zunahme der Absorption wurde bei 412 nm an einem Ultrospec 3000 Photometer verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient für freigesetztes *p*-Nitrophenol war 15000 l/mol cm, wobei eine Einheit der Enzymaktivität als die Menge die 1 µmol *p*-Nitrophenol pro Minute freisetzt definiert ist. Alle Aktivitätsmessungen wurden dreimal durchgeführt. Zur Bestimmung der Lagerstabilität wurden 100 µg/ml CALB 8 Tage lang in verschiedenen Puffern inkubiert, 20 mM Natriumformiat (pH 2.5) und 20 mM Natriumacetat bei pH 3 bis pH 6, bei 4 und 20°C.

6.2.3.4 Aktivitätsbestimmung am pH-Stat

20 ml Tributyrin Emulsion (5 % Tributyrin, 2 % *Gum Arabicum* in Wasser) wurden im Ultra-Turrax homogenisiert. Nach der Homogenisierung wurde CaCl_2 zu einer Endkonzentration von 20 mM zugesetzt und der pH Wert auf 7.5 eingestellt. 50 μl des Überstands der Expression von CALB in *P. pastoris* wurden dazu gegeben. In der auf 22°C temperierten Reaktionskammer des pH-Stat wurden 20 ml der Emulsion vorgelegt, und nach Einstellen des pH-Werts die Lipase zugesetzt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 0.01 N NaOH konstant gehalten und der Verbrauch aufgezeichnet. Aus dem Verbrauch pro Zeiteinheit ließ sich die Aktivität berechnen, wobei eine Einheit (U) als die Menge Lipase definiert wurde, die ein μl Substrat in einer Minute freisetzt.

6.2.3.5 Immobilisierung von CALB

CALB wurde zur Erhöhung der Aktivität auf MP1000, einem Polypropylen-Träger, immobilisiert. Der Überstand der Expression wurde auf eine Proteinkonzentration von 3 mg/l in einem VivaSpin (VivaScience, 10kDa MWCO) konzentriert. Die Proteinkonzentration wurde durch die Methode nach Bradford [213] unter Verwendung des BioRad Kit nach der Anweisung des Herstellers bestimmt. MP1000 wurde mit Ethanol entfettet und anschließend in einem Verhältnis von 5 mg CALB (konzentriert auf 3 mg/ml) zu 500 mg MP1000 immobilisiert. Der konzentrierte Überstand wurde in 20 ml Puffer (5 ml Ethanol und 15 ml 50 mM Kaliumphosphat Puffer pH 6.5) verdünnt. Die Mischung wurde bei 4°C 36 Stunden lang gerührt. Der mit CALB immobilisierte Träger wurde durch Filtration getrennt und dreimal mit dem verwendeten Puffer gespült. Das Immobilisat wurde über Nacht im Vakuum getrocknet.

6.2.3.6 Acrylierung von Hydroxypropylcarbamate

Die Umesterung von Methylacrylat mit Hydroxypropylcarbamate wurde mit immobilisiertem CALB katalysiert. 500 µl Hydroxypropylcarbamate (Mischung der Enantiomerenpaare des primären und sekundären Alkohols im Verhältnis 1:1) wurden mit 12 ml Methylacrylat (134 mmol) und 20 mg auf MP1000 immobilisierter CALB in einem 25 ml Rundkolben bei 40°C umgesetzt. Während der Reaktion entstehendes Methanol wurde durch 3 g Molsieb aus der Reaktion entfernt, um das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte zu verschieben.

6.2.3.7 Aufreinigung von CALB durch Ionen-Austausch Chromatographie

Der Überstand der Zellkultur mit CALB wurde durch Zentrifugieren des Kulturansatzes bei 10.800 g für 15 min in einer Sorvall RC5C Plus Zentrifuge erhalten. Der Überstand wurde durch *cross-flow* Ultrafiltration mit einer Millipore Silikonmembran (Pall, Deutschland) von 10 kDa Porengröße 14.4-fach aufkonzentriert. CALB wurde aus dem Konzentrat durch CIEC aufgereinigt. Eine XK 16/20 Säule (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) befüllt mit 7 ml Source 15 S (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) wurde mit 10 mM Na-formate, 10 mM Na-citrate, 10 mM Na-acetate bei pH 3 equilibriert. Die Säule wurde mit einem Probevolumen von 2 ml des Konzentrats mit einer Flußrate von 5 ml/min beladen. Anschließend wurde die Säule mit dem dreifachen Säulenvolumen des Puffers gespült. CALB wurde mit dem fünffachen Säulenvolumen mit 10 mM Na-formate, 10 mM Na-citrate, 10 mM Na-acetate, pH 5.5 eluiert. Alle Chromatographie Experimente wurden unter Verwendung eines ÄKTA Explorer Chromatography Systems und der Software UNICORN 3.21 (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) bei Raumtemperatur (20°C) durchgeführt.

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von CALB auf Ionen-Austauscher Matrizen (Resource S (1 ml) und Resource Q (1 ml)) bei verschiedenen pH Werten wurden Kationen-Austauscher Säulen: Source 15S (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) und Anionen-Austauscher Säulen: Super Q650M (Tosoh), Source 15Q (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) verwendet. Die verwendeten Puffer waren 10 mM Na-formate, 10 mM Na-citrate,

10 mM Na-acetate, pH 3 und 10 mM Na-citrate, 10 mM Na-acetate, 10 mM MES (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid), pH 5.5, bzw. 20 mM 1-methyl-piperazine, 20 mM Bis-Tris, 10 mM Tris, pH 5.5 and 20 mM 1-methyl-piperazine, 20 mM Bis-Tris, 10 mM Tris, pH 9.5. Alle Schritte wurden bei einer Flussrate von 2 ml/min durchgeführt. Eine Lösung von 10 mg CALB pro ml mit dem jeweiligen Puffer diente als Probe. Es wurden jeweils 100 µl der Probenlösung auf die Säule aufgetragen. CALB_{com} und CALB_{rec} wurden in gleicher Weise aufgereinigt.

6.2.3.8 Aufreinigung von CALB durch Hydrophobe-Interaktions Chromatographie

Der durch *cross-flow* Ultrafiltration aufkonzentrierte Überstand sollte durch Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC) bei 4°C aufgereinigt werden. Die Säule wurde mit Startpuffer A (2 M (NH₄)₂SO₄ in 50 mM Tris/HCl pH 7) equilibriert. Die beladene Säule wurde mit Puffer B (50 mM Tris/HCl pH 7) gewaschen. CALB wurde durch eine abnehmende Ionenstärke mit einem linearen Gradient von 2 M bis 0 M (NH₄)₂SO₄ in 50 mM Tris/HCl pH 7 eluiert. Verschiedene Säulen von Tosoh Bioscience (Hexyl 650C, Ether 650M, PPG 600M) und von Amersham Bioscience (Octyl FF, Butyl FF, Phenyl FF) wurden verwendet.

6.2.3.9 Isoelektrische Fokussierung und elektrophoretische Titrationskurve

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) und die elektrophoretische Titrationskurve (ETC) wurden unter Verwendung des Phast-Systems gemessen. Bei der Messung des IEF und der ETC von CALB_{rec} und CALB_{com} wurden kommerzielle Polyacrylamid Gele PhastGel IEF 3-9 (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) mit einem pH-Gradienten von pH 3 bis 9 im Pharmacia Phast-System verwendet. Die Bestimmung des isoelektrischen Punkts (pI) und der Titrationskurve wurde wie im Handbuch (Pharmacia Separation Technique File No. 100 Phast System 80-1311-94) beschrieben durchgeführt. Nach der Fokussierung wurden die Gele mit dem Protein Assay Reagent Coomassie No. 23200 von PIERCE gefärbt. Bei der Messung des pI wurde das Isoelectric Focusing Calibration Kit High Range pI (pH 5-10.5) (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) mit Proteinen zur Kalibrierung als Referenzmarker

verwendet. 5 µl jeder Probe wurden auf den Probenkamm in der IEF und die maximal mögliche Beladung auf den Probenkamm mit einer Konzentration von 2µg/µl in der ETC aufgetragen.

6.2.4 Analytische Methoden

6.2.4.1 GC/MS-Analytik

Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) stellt eine Möglichkeit zur Auftrennung von Stoffgemischen dar, die bereits gasförmig vorliegen oder unzersetzt in die Gasphase gebracht werden können. Die innere Oberfläche der eigentlichen Trennsäule ist mit der stationären Phase bedeckt ist. Die mobile Phase besteht aus einem Gas. Unterschiedliche Trennleistungen der stationären Phase können durch Veränderungen der Phasenpolarität erreicht werden. Die Auftrennung der Bestandteile erfolgt entsprechend der Substanzaffinität zur stationären Phase. Die Substanzen lassen sich bezüglich Retentionszeit und Retentionsvolumen durch Ionisationsdetektoren charakterisieren.

Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein Verfahren zur Messung des Verhältnisses von Masse-Ladung m/q von Teilchen. Bei bekannter Ladung kann daraus die Masse der Teilchen ermittelt werden. Außerdem können Aussagen über das Vorhandensein und die Menge von Teilchen mit bekanntem Verhältnis von Masse-Ladung gemacht werden.

Der Verlauf der Reaktion der Umesterung von Hydroxypropylcarbamat mit Methylacrylat wurde durch GC/MS Messungen verfolgt. Die Proben wurden in einem GC/MS-QP2010 von Shimadzu mit einer 30 m FS-Supreme Säule (internal diameter 0.25 mm, film thickness 0.25 µM) mit Helium als Trägergas und einer linearen Flussgeschwindigkeit von 30 cm/s gemessen. Die Injektionstemperatur betrug 250°C mit einem Split von 100. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

1) 1 min bei 40°C 2) 40 to 250°C in 15°C pro min 3) 10 min bei 250°C 4) 250 bis 300°C mit 30°C pro min 5) 1 min bei 300°C.

Für das MS wurden folgende Einstellungen verwendet: Interface bei 270°C, ion source bei 200°C, MS-scan Frequenz (TIC-mode) 2 pro s.

Zur gaschromatographischen Auswertung wurden 10 µl der Probe in 1 ml Methylenchlorid 1:100 verdünnt, um eine Überladung der Säule zu vermeiden. Die Bestimmung der Standard-Retentionszeiten erfolgte durch Injektion von jeweils 2 µl der verdünnten Probe. Es war keine deutliche Trennung der Enantiomerenpaare von hpca unter den verwendeten Bedingungen möglich. Die Retentionszeiten der gemessenen Verbindungen waren für Acrylsäuremethylester 3.2 min, 1hpc und 2hpc 7.7 min, 3hpc und 4hpc 8.3 min und hpca 9.8 min.

6.3 Bioinformatische Methoden

6.3.1.1 Kristallstrukturen

Die Kristallstrukturen der offenen Konformation von *Burkholderia cepacia* Lipase (BCL), PDB Eintrag 3LIP, mit der Auflösung 2.0 Å durch Röntgenbeugung [144] und von *Candida antarctica* Lipase B (CALB), PDB Eintrag 1TCA, mit Auflösung 1.55 Å durch Röntgenbeugung [12], wurden der *Protein Data Bank* entnommen und als Startkoordinaten für die Simulationen verwendet.

Tabelle 18 Übersicht der verwendeten Kristallstrukturen:

Lipase	PDB Eintrag	Methode	Auflösung [Å]	Molekulargewicht [kDa]
<i>Burkholderia cepacia</i> Lipase	3LIP	X-Ray	2.0	33
<i>Burkholderia glumae</i> Lipase	1CVL	X-Ray	1.6	33
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	1TCA	X-Ray	1.55	33

Eine experimentell bestimmte Struktur der geschlossenen Konformation von BCL ist noch nicht bekannt, deshalb wurde ein Homologiemodell der geschlossenen Konformation von BCL für die durchgeführten Simulationen erstellt. Das Homologiemodell wurde unter Verwendung des Servers SWISS-MODEL generiert [215]. Als *template* wurde die geschlossene Konformation der homologen Lipase aus *Burkholderia glumae* (BGL), auch bekannt als *Chromobacterium viscosum* Lipase, PDB Eintrag 1CVL [64], verwendet. Die homologe Sequenz von BGL wurde aufgrund einer BLAST Suche nach homologen Proteinsequenzen als ähnlichstes Protein mit einer bekannten Kristallstruktur ausgewählt. BCL zeigt mehrere strukturelle Gemeinsamkeiten mit der homologen Lipase BGL, die in der geschlossenen Konformation kristallisiert wurde und eine hohe Sequenzidentität von 77 % zu BCL hat (Abbildung 62).

6.3.1.2 Multiples Sequenzalignment

Die vergleichende Sequenzanalyse ist eine der wichtigsten Methoden der modernen molekularen Biologie. Die ersten Analysen gehen auf die Arbeiten Zuckerkandls und Paulings zurück [216], aber erst durch Computer-Implementierungen [217] konnten wohl definierte Sequenzvergleiche erzielt werden. Multiple Sequenzalignments wurden mit dem Programm T-COFFEE Version 1.37 [218] [219] erzeugt.

6.3.1.3 Berechnung von pKa-Werten

Das Programm TITRA, basierend auf dem Tanford-Kirkwood Modell, wurde zur Berechnung der pKa-Werte und der Protonierungszustände der titrierbaren Seitenketten von Arg, Lys, Asp, Glu, His und des C- und N-terminus bei verschiedenen pH Werten verwendet [220]. Mit dem Programm acc_run [221] wurde die SASA jeder Aminosäure berechnet. Die pKa-Werte von titrierbaren Seitenketten im Protein können sich erheblich von den pKa-Werten der freien Aminosäuren unterscheiden. Die folgenden Parameter wurden in der Berechnung verwendet: innere Dielektrizitätskonstante $\epsilon=4.0$; Dielektrizitätskonstante der Umgebung $\epsilon=78.5$; Ionenstärke 0.145 mol/l; sphere radius 1.4 Å. Aus den erhaltenen pKa-Werten wurde die Titrationskurve von CALB berechnet. In organischen Lösungsmitteln wurde CALB unter der Annahme der *pH memory*

[222] [11], entsprechend der Protonierung aus der wässrigen Lösung in der das Enzym lyophilisiert wurde, protoniert [223] [82]. Der Mangel an Protonen in organischem Lösungsmittel verhindert die Änderung des Protonierungszustands.

6.3.1.4 Berechnung des elektrostatischen Potentials

Das elektrostatische Potential bei verschiedenen pH Werten wurde mit dem Programm DELPHI V.4, durch die Lösung der PBE, berechnet [224] [128] [225] [226]. Bei der Berechnung des elektrostatischen Potentials bei verschiedenen pH Werten wurden die zuvor in TITRA [220] berechneten Protonierungszustände berücksichtigt. Das elektrostatische Potential ist abhängig von den Atomladungen und Van-der-Waals Radien zur Beschreibung des Proteins und der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels. Ladungen und Radien der Atome wurden aus dem PARSE Parameterset übernommen [227]. In den Berechnungen in DELPHI wurden folgende Parameter verwendet: innere Dielektrizitätskonstante des Proteins $\epsilon=4$, äußere Dielektrizitätskonstante der Lösung für Wasser $\epsilon=78.5$, äußere Dielektrizitätskonstante für organisches Lösungsmittel $\epsilon=2$, solvent probe radius 1.4 \AA , Ionenstärke 0.145 mol/l . Das Kristallwasser wurde vor der Berechnung des elektrostatischen Potentials entfernt. Das berechnete elektrostatische Potential wurde mit dem Programm Pymol [228] zur Betrachtung der Ladungsverteilung auf der Oberfläche der Proteine abgebildet.

6.3.1.5 Parametrisierung von organischen Lösungsmittelmodellen und Substraten

Die Modelle der organischen Lösungsmittel CHE, ISO und TOL und die Substrate 1hpca, 2hpca, 3 hpca und 4 hpca im gebundenen Übergangszustand wurden mit *ab initio* Methoden in Gaussian98 [229] parametrisiert. Die optimierte Geometrie einzelner organischer Lösungsmittelmoleküle und der Substrate im Übergangszustand wurde *ab initio* in Gaussian98 mit der Hartree-Fock-Methode in der Gasphase unter Verwendung Basissatzes HF/6-31G* [230] durchgeführt. Aus dem elektrostatischen Potential der Moleküloberfläche wurden mit dem Programm RESP (*restrained electrostatic potential*) atomzentrierte Punktladungen berechnet [231]. Hierbei wurde jedem Atom eine Ladung zugeordnet und das quantenmechanisch berechnete Potential des Moleküls

wiedergegeben wird. Alle Parameter der hier beschriebenen Moleküle wurden soweit möglich von den bereits bestehenden Kraftfeldern [232] [122] übernommen oder sind explizit genannt (Tabelle 19 bis 23). Mit dem jeweiligen Lösungsmittel wurde eine Box erstellt die durch MD Simulationen in AMBER 7.0 equilibriert wurde, um die Dichte des Systems zu überprüfen (Abbildung 61). Die entwickelten Lösungsmittelmodelle wurden in den Simulationen als starr betrachtet. Die Parameter (Atomtypen, Partialladungen und Bindungslängen) der strukturoptimierten organischen Lösungsmittelmodelle von CHE, ISO und TOL sind im Anhang zusammengestellt. Die berechneten Dichten und Selbst-Diffusionskonstanten der Lösungsmittel der equilibrierten Boxen sind in guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten (Tabelle 26).

6.3.1.6 Docking

Um eine ideale Startkonformation der gebundenen Substrate im aktiven Zentrum der Proteine für MD Simulationen zu finden, wurden die Substrate mit FlexX [233] ins aktive Zentrum gedockt. Alle Substrate 1hpca, 2hpca, 3hpca und 4hpca wurden im tetrahedralen Übergangszustand, analog zur katalysierten Reaktion in CALB, unter Verwendung der Kristallstruktur 1TCA [12], kovalent an das Ser der katalytischen Triade gebunden (Abbildung). Das tetraetrische Kohlenstoffatom hat vier Substituenten, eine Alkyl-, eine Alkohol-Gruppe, ein negativ geladenes Sauerstoffatom (*oxyanion*) und den Sauerstoff O_{γ} mit dem Kohlenstoff C_{β} des katalytischen Serins. Das kovalente Docking wurde an den beiden Liganden O_{γ} und C_{β} des katalytischen Serins unter Verwendung von Standardparametern durchgeführt. Das zulässige *overlap volume* während des Dockings zwischen Ligand und Protein war 3.5 Å. Alle erhaltenen Konformationen des Liganden wurden auf die vier notwendigen Wasserstoffbrücken zur Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustands untersucht. Aus den Ergebnissen des Dockings wurde für jedes Substrat die Konformation mit den notwendigen Wasserstoffbrücken und dem niedrigsten Wert, da hier der Übergangszustand am Besten stabilisiert sein sollte, für den Protein-Ligand Komplex in der anschließenden Simulation ausgewählt.

6.3.1.7 Molekulardynamische Simulationen

Die MD Simulationen wurden unter Verwendung des Programmpakets Amber 7 [234] durchgeführt. Die simulierten Systeme wurden in dem Programm XLEAP aus AMBER 7.0 aufgebaut. Das Programm XLEAP liest die Informationen über Kraftfeld, Topologie und Atomkoordinaten der Struktur ein. In XLEAP wurden Wasserstoffatome aus den zuvor in TITRA berechneten Protonierungszuständen ergänzt, His wurde in der H_δ-Position protoniert. Die Systeme wurden mit Lösungsmitteln in einer Schicht von 14 Å in einer *truncated octahedral* Box solvatisiert, die Wassermoleküle der jeweiligen Kristallstruktur wurden beibehalten. In den Simulationen wurden unterschiedliche Lösungsmittelmodelle verwendet. Die Simulationen von CALB wurden in den expliziten Lösungsmittelmodellen TIP3 für Wasser [235] (WAT) und den organischen Lösungsmittelmodellen Chloroform [236] (CL3), Methanol [237] (MET) aus AMBER und den zusätzlich parametrisierten Lösungsmittelmodellen für Toluol (TOL), Cyclohexan (CHE) und Isopentan (ISO) mit 286 Wassermolekülen aus der Kristallstruktur durchgeführt, was einer Hydratation von 15.4 % (w/w) entsprach. Die Simulationen von CALB wurden über 2 ns durchgeführt. Die Simulationen von CALB mit Substraten im gebundenen Übergangszustand wurden in Wasser [235] über 2 ns durchgeführt. Die Startposition der Substrate wurde aus dem Docking in FlexX übernommen. BCL wurde in der offenen und geschlossenen Konformation jeweils in WAT und TOL über 30 ns simuliert (Abbildung 60). Um die Gesamtladung des Systems für die Simulationen zu neutralisieren wurden Na⁺-Ionen als Gegenionen zum Ladungsausgleich ergänzt. CALB war bereits neutral und deshalb waren auch keine Gegenionen zum Ladungsausgleich nötig. In den Simulationen von BCL wurden jeweils drei Na⁺-Ionen zum Ladungsausgleich ergänzt. Disulfidbrücken wurden nach den Informationen aus der Kristallstruktur geknüpft.

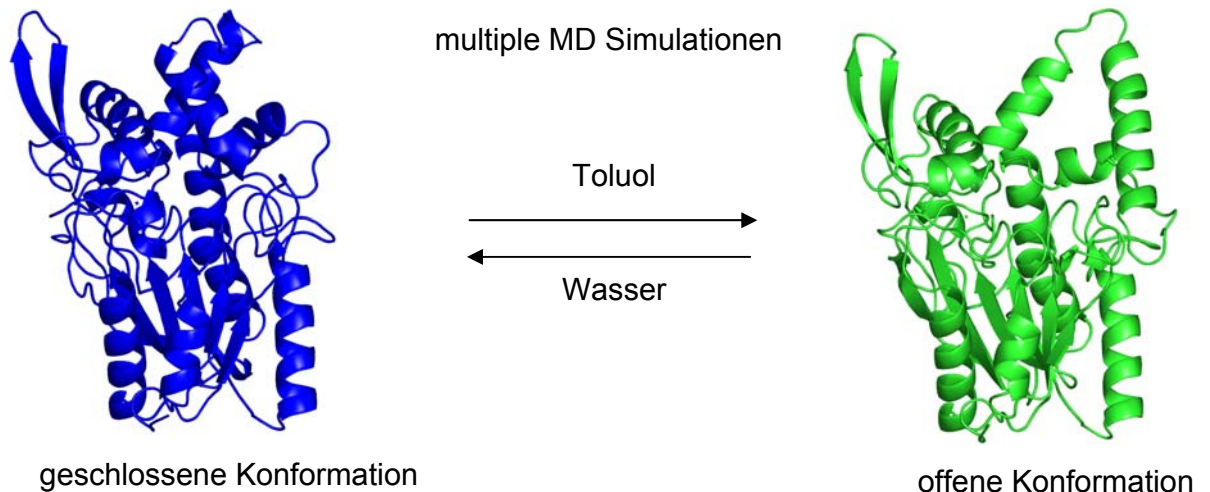


Abbildung 60 Durchgeführte Simulationen der Konformationsübergänge von BCL in Wasser und Toluol.

Das Programm SANDER aus AMBER 7.0 wurde für die Minimierungen und die anschließenden MD Simulationen verwendet. Das AMBER Kraftfeld ff99 [122] [121] wurde zur Beschreibung des Systems und parm99 Parameter [238] zur Beschreibung der Ca^{2+} -Ionen verwendet. Die Kristallstrukturen wurden durch 500 Schritte der *steepest descent* Methode und 50 Schritte der *conjugate gradient* Methode Energie minimiert, um das System zu relaxieren. Weitere Einstellungen für die Minimierung wurden, wie von der Software vorgegeben, übernommen. Nach der Minimierung wurde die Temperatur auf 300 K und der Druck auf 1 bar unter *restraint* Bedingungen eingestellt. Die Temperatur und der Druck des Systems wurden durch eine schwache Kopplung an ein äußeres Wärmebad mit einer Kopplungskonstante der Temperatur von 1.0 ps und einer Kopplungskonstante für den Druck von 1.2 ps eingestellt [239]. Die *restraint* Konstanten wurden alle 50000 Schritte von 10, 5, 1 auf 0.1 kcal/mol für die *backbone* Atome C, O und CA, unter Verwendung eines harmonischen Potentials, verringert. Die Simulationen wurden anschließend unter *non-restraint* Bedingungen ohne zusätzliche externe Kräfte und unter periodischen Randbedingungen mit Zeitschritten von 1 fs durchgeführt. Der SHAKE Algorithmus [240] wurde verwendet, um die Bindungslängen auf eine Toleranz von 0.000001 Å einzuschränken. Nicht-bindende Wechselwirkungen wurden bis zu einem cutoff von 10 Å berechnet. Die Temperatur von 300 K und ein Druck von 1 bar wurden während der Simulation konstant gehalten. Alle Systeme

wurden jeweils dreimal, mit einer unterschiedlichen Verteilung der anfänglichen Startgeschwindigkeiten auf die Atome nach einer Verteilung nach Maxwell, simuliert, um einen Einfluss dieser Startbedingungen auf die Struktur der Lipase im relaxierten Zustand ausschließen zu können und den Konformationsraum zu untersuchen. Jede Verteilung wurde durch einen Zufallsgenerator mit einem bestimmten Startwert erzeugt.

Parameter der Minimierung:

```
imin=1, maxcyc=500, ncyc=50,  
ntpr=10,
```

Parameter der *restraint* Phase:

```
ntx=1, iwrap=1, irect=0, imin=0,  
ntpr=100, ntwx=200, ntwr=100,  
nstlim=100000, dt=0.001, ntt=1,  
ntf=2, ntc=2, tol=0.0000001, ntb=2,  
ig=$IG, pres0=1.0, taup=0.3,  
ntr=1, cut=10.0, ntp=1,  
temp0=300.0, temp1=300.0, tautp=0.2,
```

```
10.0  
FIND  
* * * *  
SEARCH  
RES 1 321  
END  
END
```

```
imin=0, ntx=5, irect=1, ntpr=100, iwrap=1, ntwx=200, ntwr=100,  
ntc=2, tol=0.0000001, ntb=2, igb=0, ntp=1,  
taup=0.6, tautp=0.5,  
nstlim=50000, dt=0.001, ntr=1,  
temp0=300.0, ntt=1,  
pres0=1.0, cut=10.0, ntf=2,
```

```
10.0  
FIND  
CA * * *  
N * * *  
O * * *  
SEARCH  
RES 1 321  
END  
END
```

```
imin=0, ntx=5, irect=1, ntpr=100, iwrap=1, ntwx=200, ntwr=100,  
ntc=2, tol=0.0000001, ntb=2, igb=0, ntp=1,  
npscal=1, taup=0.6, tautp=0.5,  
nstlim=50000, dt=0.001, ntr=1,  
temp0=300.0, ntt=1,  
pres0=1.0, cut=10.0, ntf=2,
```



```
5
FIND
CA * * *
N * * *
O * * *
SEARCH
RES 1 321
END
END
```

```
imin=0, ntx=5, irect=1, ntp=100, iwrap=1, ntwx=200, ntwr=100,
ntc=2, tol=0.0000001, ntb=2, igb=0, ntp=1,
npscal=1, taup=1.0, tautp=0.8,
nstlim=50000, dt=0.001, ntr=1,
temp0=300.0, ntt=1,
pres0=1.0, cut=10.0, ntf=2,
```

```
1
FIND
CA * * *
N * * *
O * * *
SEARCH
RES 1 321
END
END
```

```
imin=0, ntx=5, irect=1, ntp=100, iwrap=1, ntwx=200, ntwr=100,
ntc=2, tol=0.0000001, ntb=2, igb=0, ntp=1,
npscal=1, taup=1.2, tautp=1.0,
nstlim=50000, dt=0.001, ntr=1,
temp0=300.0, ntt=1,
pres0=1.0, cut=10.0, ntf=2,
```

```
0.1
FIND
CA * * *
N * * *
O * * *
SEARCH
RES 1 321
END
END
```

Parameter der Simulation:

```
imin=0, ntx=5, irect=1, ntp=1000, iwrap=1, ntwx=1000, ntwr=1000,
ntc=2, tol=0.0000001, ntb=2, igb=0, ntp=1,
taup=1.2, tautp=1.0,
nstlim=300000, dt=0.001, ntr=0,
temp0=300.0, ntt=1,
pres0=1.0, cut=10.0, ntf=2,
```

6.3.1.8 Auswertung von MD Simulationen

Die erhaltenen Trajektorien wurden mit dem Programm PTRAJ aus AMBER 7.0 durch Überlagerung der *backbone* Atome jeder Konformation der Trajektorie auf die Startstruktur untersucht. Die Berechnung des RMSD der *backbone* Atome zwischen allen Konformationen der Trajektorie und der Startstruktur und des 2D-RMSD zwischen allen Konformationen als Funktion der Zeit wurde durchgeführt. B-Faktoren zur Untersuchung der Flexibilität und Abstände von Atomen wurden ebenfalls in PTRAJ analysiert. Durch Visualisierung der Trajektorie in VMD [241] und in Pymol 0.98 [228] konnten Strukturänderungen des Enzyms und Wechselwirkungen der Lösungsmittelmoleküle mit dem Enzym beobachtet werden.

6.3.1.9 Berechnung der Sekundärstruktur und Oberflächeneigenschaften

Kristalle und Kristallkontakte wurden im SWISS-PDB Viewer aufgebaut. Kristallkontakte wurden über das Webinterface von WHAT IF [242] über eine 5.0 Å Hülle von symmetriebezogenen Aminosäuren um das Protein, aus verschiedenen asymmetrischen Einheitszellen, analysiert. Die SASA und Sekundärstrukturelemente wurden mit DSSP [149] berechnet. Die Hydrophobizität der Oberfläche wurde nach der Skala von Eisenberg [150] gefärbt.

7 Anhang

7.1 Anhang I Parameter der Lösungsmittelmodelle

A) Cyclohexan:

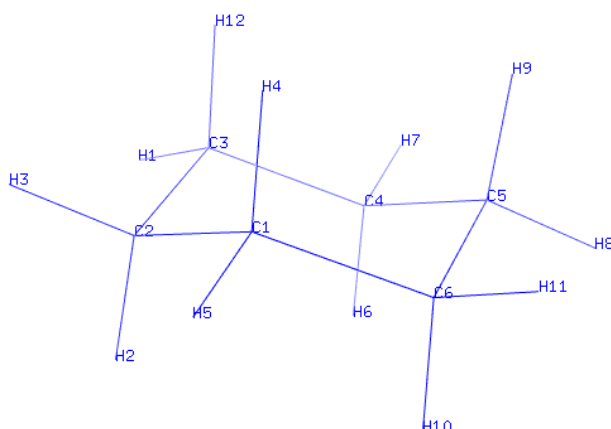


Tabelle 19 Atomnamen, Atomtypen und Partialladungen in Cyclohexan:

Atomname	AMBER Atomtyp	Partialladung
C1	CT	0.02395
H4	HC	-0.01198
H5	HC	-0.01198
C2	CT	0.02395
H2	HC	-0.01198
H3	HC	-0.01198
C3	CT	0.02395
H1	HC	-0.01198
H12	HC	-0.01198
C4	CT	0.02395
H6	HC	-0.01198
H7	HC	-0.01198
C5	CT	0.02395
H8	HC	-0.01198

H9	HC	-0.01198
C6	CT	0.02395
H10	HC	-0.01198
H11	HC	-0.01198

Tabelle 20 Bindungslängen in strukturoptimiertem Cyclohexan:

Bindung	Bindungslänge [Å]
C-C	1,53
C-H	1,09

B) Isopentan:

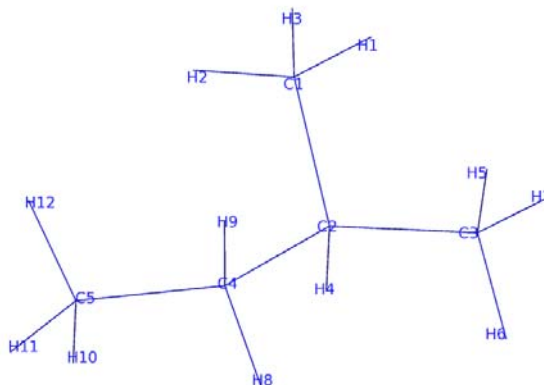


Tabelle 21 Atomnamen, Atomtypen und Partialladungen in Isopentan:

Atomname	AMBER Atomtyp	Partialladung
C1	CT	-0.447
H1	HC	0.102
H2	HC	0.102
H3	HC	0.102
C2	CT	0.380
H4	HC	-0.038
C3	CT	-0.447
H5	HC	0.102
H6	HC	0.102

H7	HC	0.102
C4	CT	-0.068
H8	HC	0.016
H9	HC	0.016
C5	CT	-0.102
H10	HC	0.026
H11	HC	0.026
H12	HC	0.026

Tabelle 22 Bindungslängen in strukturoptimiertem Isopentan:

Bindung	Bindungslänge [\AA]
C2-C4	1,54
C2-C1	1,53
C2-C3	1,53
C4-C5	1,53
C-H	1,09

C) Toluol:

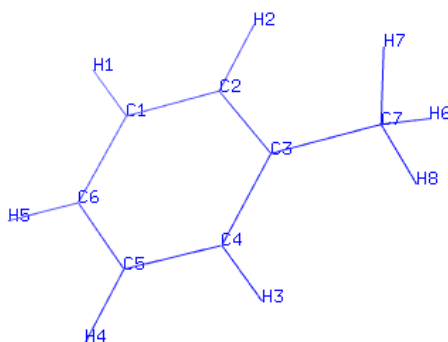


Tabelle 23 Atomnamen, Atomtypen und Partialladungen in Toluol:

Atomname	AMBER Atomtyp	Partialladung
C2	CA	-0.27587
H2	HA	0.15626
C1	CA	-0.11100
H1	HA	0.13753
C6	CA	-0.17752
H5	HA	0.14095
C5	CA	-0.11100
H4	HA	0.13753
C4	CA	-0.27587
H3	HA	0.15626
C3	CA	0.28974
C7	CT	-0.38897
H6	HC	0.10732
H7	HC	0.10732
H8	HC	0.10732

Tabelle 24 Bindungslängen in strukturoptimiertem Toluol:

Bindung	Bindungslänge [Å]
C3-C7	1,51
C7-H	1,09
C3-C2	1,39
C2-H2	1,08
C2-C1	1,39
C1-H1	1,08
C1-C6	1,38
C6-H6	1,08

7.2 Anhang II: Simulation der Lösungsmittelmodelle

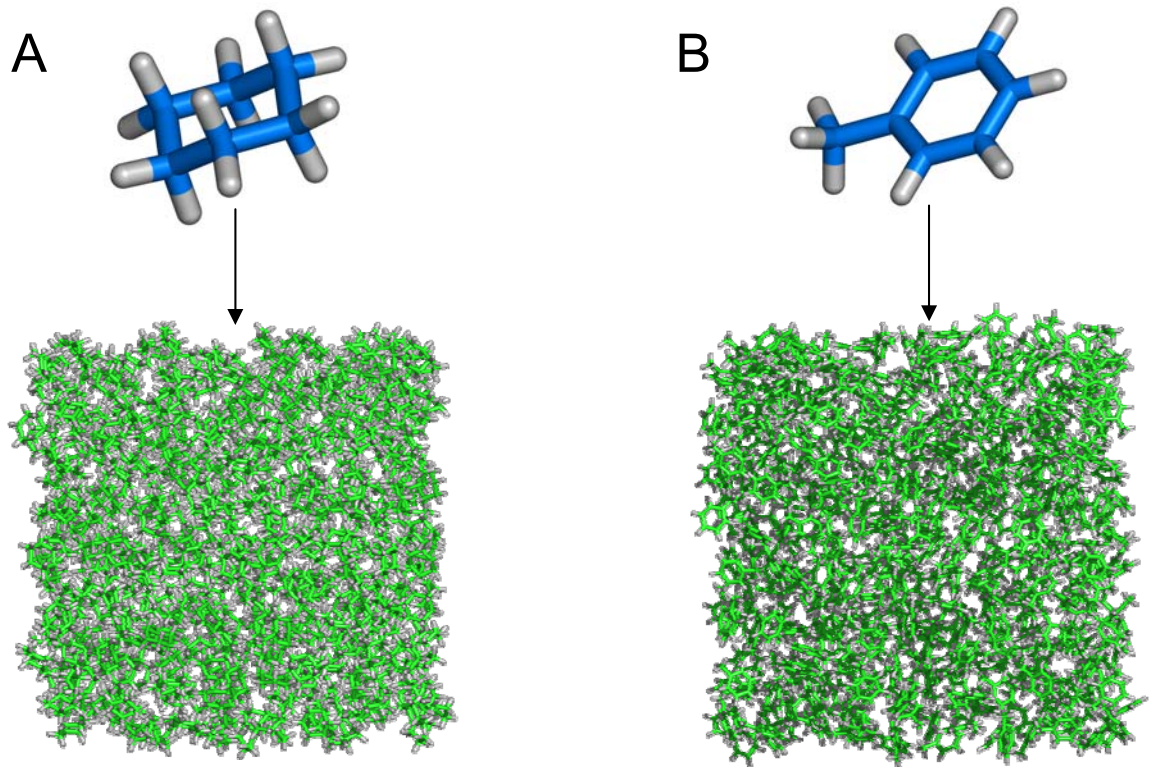


Abbildung 61 Einzelnes Lösungsmittelmolekül und durch MD Simulationen equilibrierte Lösungsmittelbox von Cyclohexan (A) und Toluol (B).

Nachdem die Ladungen und Parameter der Moleküle parametrisiert wurden, wurde in XLEAP aus AMBER 7.0 [234] für jedes Lösungsmittel eine Box aus Lösungsmittelmolekülen erstellt. Die Lösungsmittelbox wurde durch Solvatisieren eines Lösungsmoleküls mit sich selbst gebildet. Die Anzahl der Lösungsmittelmoleküle in einer solchen Box sind in (Tabelle 25) aufgeführt.

Tabelle 25 Anzahl der Moleküle in den simulierten Lösungsmittelboxen:

Lösungsmittel	Anzahl der Moleküle in der Lösungsmittelbox	Kantenlänge der Box nach Simulation [Å]
Cyclohexan	379	41,1
Isopentan	351	40,7
Toluol	436	46,4

Die Lösungsmittelboxen wurde über 500 Schritte *steepest descent* und 200 Schritte *conjugate gradient* in SANDER aus AMBER 7.0 [243] minimiert, um das System zu relaxieren. Nach der Minimierung wurden die Lösungsmittelboxen in AMBER 7.0 [243] mit dem *all-atom* Kraftfeld ff99 [122] equilibriert. Die Temperatur des Systems wurde durch den Algorithmus zur Temperaturkopplung nach Berendsen [239], unter Verwendung einer Temperaturkopplungskonstante von 0.8 ps, auf eine Temperatur von 300 K und der Druck, unter Verwendung einer Kopplungskonstante von 1.0 ps, auf 1 bar in einer Equilibrierungsphase von 30 ps eingestellt. Nach der Equilibrierung wurde eine MD Simulation des Lösungsmittels bei einer konstanten Temperatur von 300 K und einem konstanten Druck von 1 bar unter periodischen Randbedingungen durchgeführt. Die Lösungsmittelmoleküle wurden als starr betrachtet und alle Bindungen durch SHAKE [240] bei ihren vordefinierten Werten gehalten. Die Simulationen wurden über einen Zeitraum von 2 ns mit Zeitschritten von 1 fs durchgeführt. Zur Berechnung der weitreichenden nicht-bindenden Lennard-Jones-Wechselwirkungen und der Coulomb-Wechselwirkung wurde die Summation nach Ewald mit einem *cutoff* von 16 Å verwendet [244]. Weitere Einstellungen der MD Simulation wurden wie von der Software vorgegeben übernommen.

7.3 Anhang III Physikalische Daten der Lösungsmittelmodelle

Die Partialladungen der Lösungsmittelmoleküle wurden durch Berechnung der Dipolmomente überprüft. Alle berechneten Werte der Dichte und des Dipolmoments sind in der folgenden Tabelle mit experimentellen Daten zum Vergleich aufgeführt. Die berechneten Werte für die Dichte und das Dipolmoment stimmen gut mit den experimentellen Daten überein.

Tabelle 26 Übersicht über die berechneten und experimentell bestimmten Daten von Dichte und Dipolmoment der parametrisierten Lösungsmittel. Experimentelle Daten wurden der Datenbank www.sigmaaldrich.com entnommen:

Lösungsmittel	Dichte [g/cm ³]	Dichte Lit. [g/cm ³]	Dipolmoment [D]	Dipolmoment Lit. [D]
Cyclohexan	0,76	0,78	0,00	0,02
Isopentan	0,63	0,63	0,03	0,03
Toluol	0,84	0,86	0,27	0,37

Die Selbst-Diffusionskonstanten bei 300 K wurden aus den quadratisch gemittelten Autokorrelationsfunktionen der Lösungsmittel berechnet. Die Tendenz der Selbst-Diffusionskonstanten innerhalb der Lösungsmittelmodelle stimmt mit experimentellen Daten überein.

Tabelle 27 Berechnete Selbst-Diffusionskonstanten der parametrisierten Lösungsmittelmodelle im Vergleich zu experimentellen Daten [245]:

Lösungsmittel	Selbst-Diffusionskonstante [10 ⁻⁹ m ² /s]	Selbst-Diffusionskonstante Lit. [10 ⁻⁹ m ² /s]
Cyclohexan	1,0	1,4
Isopentan	3,1	4,0
Toluol	2,9	2,4

7.4 Anhang IV Alignment der Sequenz von BCL mit der Sequenz von BGL

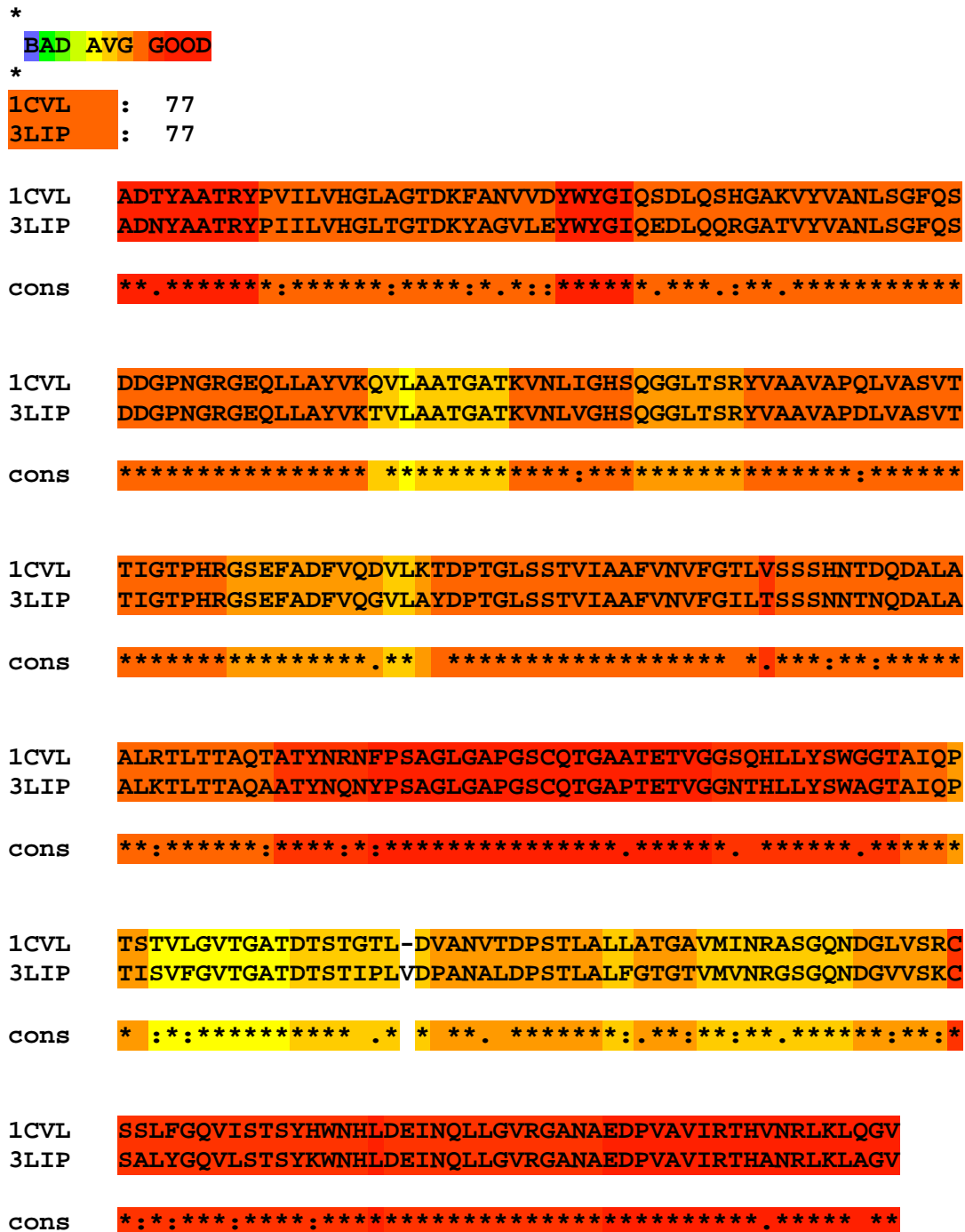


Abbildung 62 Mit T-COFFEE erstelltes Alignment der Sequenzen von BCL (3LIP) und BGL (1CVL), deren Struktur als *template* zur Erstellung des Homologiemodells der geschlossenen Konformation von BCL diene. Die Sequenzen aus BCL und BGL sind zu 77 % identisch.

7.5 Anhang V Sequenz der Lipase B aus *Candida antarctica*

Eine Sequenzierung des aus genomischer DNA von *Candida antarctica* klonierten Gens von CALB zeigte auf Aminosäureebene zwei Abweichungen von der veröffentlichten WT Sequenz [NCBI: CAA83122]. Eine Untersuchung der Positionen der veränderten Aminosäurereste T57A und A89T ergab, dass sich diese Reste an der Peripherie des Enzyms befanden und höchstwahrscheinlich nur geringen Einfluss auf die Faltung und die Aktivität der Lipase haben.

calb_ncbi	CTACCTTCCGGTTCGGACCTGCCTTTTCGCAGCCCAAGTCGGTGCTCGATGCGGGTCTG	60
calb_iso	L P S G S D P A F S Q P K S V L D A G L	20
calb_ncbi	ACCTGCCAGGGTGCTTCGCCATCCTCGGTCTCCAACCCATCCTTCTCGTCCCCGGAACC	120
calb_iso	T C Q G A S P S S V S K P I L L V P G T	40
calb_ncbi	GGCACCACAGGTCCACAGTCGTTTCGACTCGAACTGGATCCCCCTCTCAACGCAGTTGGGT	180
calb_iso	G T T G P Q S F D S N W I P L S A Q L G	60
calb_ncbi	TACACACCCTGCTGGATCTACCCCCGCCGTTTCATGCTCAACGACACCCAGGTCAACACG	240
calb_iso	Y T P C W I S P P P F M L N D T Q V N T	80
calb_ncbi	GAGTACATGGTCAACGCCATCACCCCGCTCTACGCTGGTTCGGGCAACAACAAGCTTCCC	300
calb_iso	E Y M V N A I T T L Y A G S G N N K L P	100
calb_ncbi	GTGCTTACCTGGTCCCAGGGTGGTCTGGTTGCACAGTGGGGTCTGACCTTCTTCCCCAGT	360
calb_iso	V L T W S Q G G L V A Q W G L T F F P S	120
calb_ncbi	ATCAGGTCCAAGGTCGATCGACTTATGGCCTTTGCGCCCGACTACAAGGGCACCCTCCTC	420
calb_iso	I R S K V D R L M A F A P D Y K G T V L	140
calb_ncbi	GCCGGCCCTCTCGATGCACTCGCGTTAGTGCACCTCCGTATGGCAGCAAACCACCGGT	480
calb_iso	A G P L D A L A V S A P S V W Q Q T T G	160
calb_ncbi	TCGGCACTCACCCGCACTCCGAAACGCAGGTGGTCTGACCCAGATCGTGCCACCACC	540
calb_iso	S A L T T A L R N A G G L T Q I V P T T	180
calb_ncbi	AACCTTACTCGGCGACCGACGAGATCGTTTCAGCCTCAGGTGTCCAACCTCGCCACTCGAC	600
calb_iso	N L Y S A T D E I V Q P Q V S N S P L D	200
calb_ncbi	TCATCCTACCTCTTCAACGGAAAGAACGTCCAGGCACAGGCCTGTGTGGGGCCGCTGTTC	660
calb_iso	S S Y L F N G K N V Q A Q A V C G P L F	220
calb_ncbi	GTCATCGACCATGCAGGCTCGCTCACCTCGCAGTTCTCCTACGTCGTCGGTTCGATCCGCC	720
calb_iso	V I D H A G S L T S Q F S Y V V G R S A	240
calb_ncbi	CTGCGCTCCACCACGGGCCAGGCTCGTAGTGCAGACTATGGCATTACGGACTGCAACCCT	780
calb_iso	L R S T T G Q A R S A D Y G I T D C N P	260
calb_ncbi	CTTCCCGCCAATGATCTGACTCCCAGCAAAGGTTCGCGCGGCTGCGCTCCTGGCGCCG	840
calb_iso	L P A N D L T P E Q K V A A A A L L A P	280

calb_ncbi	GCAGCTGCAGCCATCGTGGCGGGTCCAAAGCAGAAGCTGCGAGCCCGACCTCATGCCCTAC	900
calb_iso	GCGGCTGCAGCCATCGTGGCGGGTCCAAAGCAGAAGCTGCGAGCCCGACCTCATGCCCTAC	300
	A A A A I V A G P K Q N C E P D L M P Y	
calb_ncbi	GCCCGCCCTTTGCAGTAGGCAAAAGGACCTGCTCCGGCATCGTCACCCCTGA	954
calb_iso	GCCCGCCCTTTGCAGTAGGCAAAAGGACCTGCTCCGGCATCGTCACCCCTGA	317
	A R P F A V G K R T C S G I V T P -	

Abbildung 63 Mit T-COFFEE erstelltes Alignment der in der NCBI Datenbank veröffentlichten Sequenz von CALB (calb_ncbi) und der in dieser Arbeit verwendeten, rekombinanten Lipase aus CALB (calb_iso). Die Sequenz der CALB ist in blauer Schrift dargestellt. Die Positionen der veränderten Aminosäuren T57A und A89T sind jeweils rot markiert, die nicht zu einer Änderung auf Aminosäureebene führenden Unterschiede sind gelb unterlegt.

7.6 Anhang VI Parameter von hpca im Übergangszustand

A) Parameter von 1hpca und 2hpca nach Strukturoptimierung im Übergangszustand:

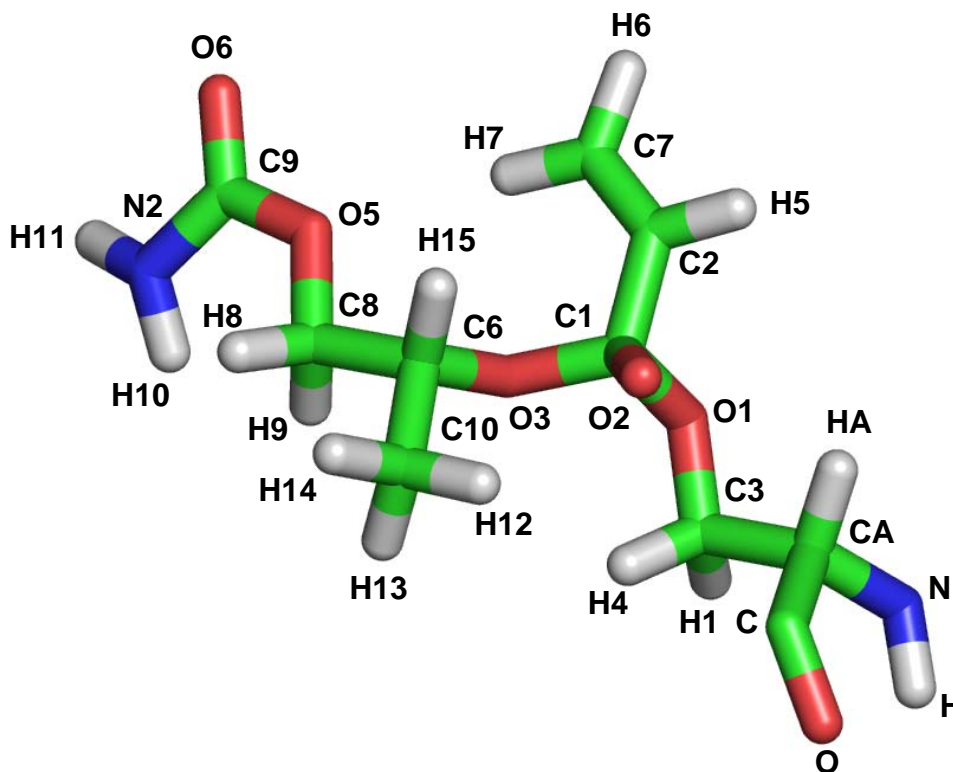


Abbildung 64 Strukturoptimierter Übergangszustand von 1hpca, gebunden an das Ser der katalytischen Triade von CALB.

Partialladungen der Atome:

O	-0.43
C	0.2378
CA	0.1122
N	-0.1091
H	0.1317
HA	0.0581
C3	0.0751
H1	0.058
H4	0.058
O1	-0.3495
C1	0.1672
O2	-0.8795
C2	-0.0452
H5	0.0618
C7	-0.0955
H6	0.0539
H7	0.0539
O3	-0.3463
C6	0.0831
C10	-0.036
H12	0.0254
H13	0.0254
H14	0.0254
H15	0.0616
C8	0.0849
H8	0.0591
H9	0.0591
O5	-0.2217
C9	0.3504
N2	-0.1164
H10	0.1294
H11	0.1294
O6	-0.4716

B) Parameter von 3hpca und 4hpca nach Strukturoptimierung im Übergangszustand:

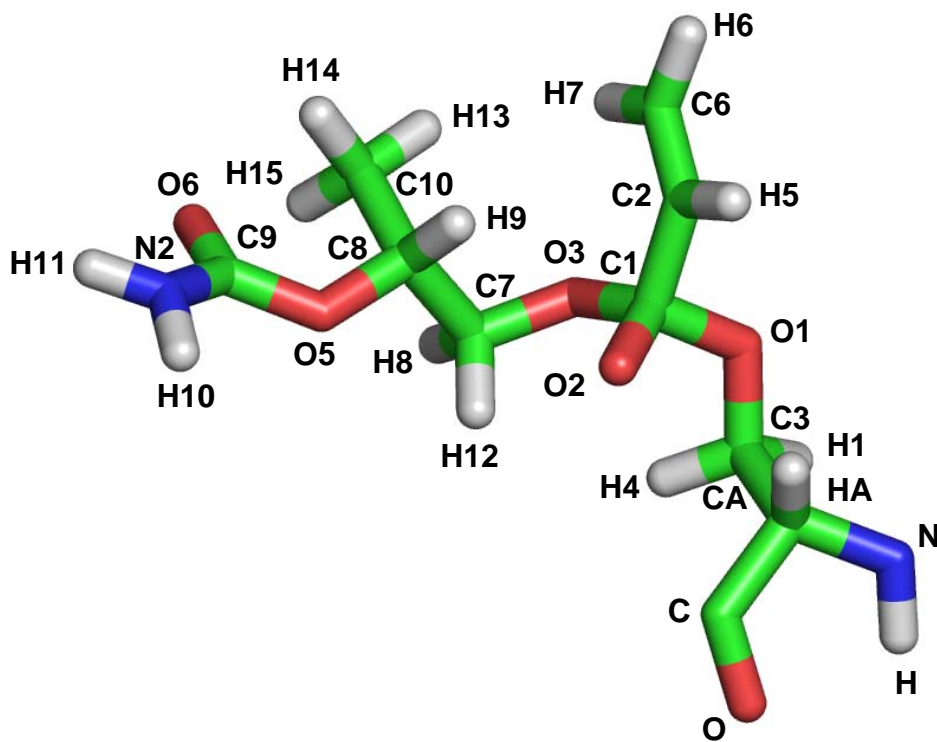


Abbildung 65 Strukturoptimierter Übergangszustand von 3hpca, gebunden an das Ser der katalytischen Triade von CALB.

Partialladungen der Atome:

O	-0.43
C	0.2378
CA	0.1122
N	-0.1091
H	0.1317
HA	0.0581
C3	0.0751
H1	0.058
H4	0.058
O1	-0.3495
C1	0.1669
O2	-0.8795
C2	-0.0452

H5	0.0618
C6	-0.0956
H6	0.0539
H7	0.0539
O3	-0.349
C7	0.0776
H8	0.0586
H12	0.0586
C8	0.0904
H9	0.0622
C10	-0.0355
H13	0.0254
H14	0.0254
H15	0.0254
O5	-0.2198
C9	0.3506
O6	-0.4709
N2	-0.1162
H10	0.1294
H11	0.1294

Ergänzende Kraftfeld Parameter für hpca:

BOND

O -CT	320.0	1.410
-------	-------	-------

ANGLE

N -C -OS	80.0	120.90
CM-CT-O	60.0	109.50
OS-CT-O	160.0	101.00
O -CT-OS	160.0	101.00

8 Literatur

- [1] A. Liese, Abstr Pap Am Chem S 219 (2000) U169.
- [2] K.F. Tipton, Eur. J. Biochem. 223 (1994) 1.
- [3] U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [4] K. Faber, Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag, Berlin, 1999.
- [5] R.D. Schmid, R. Verger, Angew Chem Int Edit 37 (1998) 1609.
- [6] S.H. Krishna, N.G. Karanth, Catal Rev 44 (2002) 499.
- [7] M.T. Reetz, K. Schimossek, Chimia 50 (1996) 668.
- [8] N.Y. Zhang, W.C. Suen, W. Windsor, L. Xiao, V. Madison, A. Zaks, Protein Engineering 16 (2003) 599.
- [9] M.C. Parker, S.A. Brown, L. Robertson, N.J. Turner, Chemical Communications (1998) 2247.
- [10] D. Rotticci, J.C. Rotticci-Mulder, S. Denman, T. Norin, K. Hult, Chembiochem 2 (2001) 766.
- [11] C.M. Soares, V.H. Teixeira, A.M. Baptista, Biophys J 84 (2003) 1628.
- [12] J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar, T.A. Jones, Structure 2 (1994) 293.
- [13] M.E. Noble, A. Cleasby, L.N. Johnson, M.R. Egmond, L.G. Frenken, FEBS Lett 331 (1993) 123.
- [14] M. Nardini, D.A. Lang, K. Liebeton, K.E. Jaeger, B.M. Dijkstra, Journal of Biological Chemistry 275 (2000) 31219.
- [15] P. Grochulski, Y. Li, J.D. Schrag, M. Cygler, Protein Science 3 (1994) 82.
- [16] J.D. Schrag, M. Cygler, Lipases, Part A 284 (1997) 85.
- [17] D.L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S.M. Franken, M. Harel, S.J. Remington, I. Silman, J. Schrag, J.L. Sussman, K.H.G. Verschueren, A. Goldman, Protein Engineering 5 (1992) 197.
- [18] M. Holmquist, Curr Protein Pept Sci 1 (2000) 209.
- [19] A. Warshel, G. Narayshabo, F. Sussman, J.K. Hwang, Biochemistry 28 (1989) 3629.

- [20] M. Reslow, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Appl Microbiol Biot* 26 (1987) 1.
- [21] J.D. Schrag, T. Vernet, L. Laramée, D.Y. Thomas, A. Recktenwald, M. Okoniewska, E. Ziomek, M. Cygler, *Protein Engineering* 8 (1995) 835.
- [22] D.M. Lawson, U. Derewenda, L. Serre, S. Ferri, R. Szittner, Y. Wei, E.A. Meighen, Z.S. Derewenda, *Biochemistry* 33 (1994) 9382.
- [23] J. Kraut, *Annual Review of Biochemistry* 46 (1977) 331.
- [24] M. Fischer, in, University of Stuttgart, 2005.
- [25] L. Sarda, P. Desnuelle, *Biochimica Et Biophysica Acta* 30 (1958) 513.
- [26] P. Desnuelle, L. Sarda, G. Ailhaud, *Biochimica Et Biophysica Acta* 37 (1960) 570.
- [27] R. Verger, *Methods Enzymol* 64 (1980) 340.
- [28] L. Brady, A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Hugejensen, L. Norskov, L. Thim, U. Menge, *Nature* 343 (1990) 767.
- [29] A.M. Brzozowski, U. Derewenda, Z.S. Derewenda, G.G. Dodson, D.M. Lawson, J.P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Hugejensen, S.A. Patkar, L. Thim, *Nature* 351 (1991) 491.
- [30] U. Derewenda, A.M. Brzozowski, D.M. Lawson, Z.S. Derewenda, *Biochemistry* 31 (1992) 1532.
- [31] H. Vantilbeurgh, M.P. Egloff, C. Martinez, N. Rugani, R. Verger, C. Cambillau, *Nature* 362 (1993) 814.
- [32] P. Grochulski, Y.G. Li, J.D. Schrag, F. Bouthillier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin, M. Cygler, *Journal of Biological Chemistry* 268 (1993) 12843.
- [33] J.D. Schrag, Y. Li, M. Cygler, D. Lang, T. Burgdorf, H.J. Hecht, R. Schmid, D. Schomburg, T.J. Rydel, J.D. Oliver, L.C. Strickland, C.M. Dunaway, S.B. Larson, J. Day, A. McPherson, *Structure* 5 (1997) 187.
- [34] Z.S. Derewenda, *Adv Protein Chem* 45 (1994) 1.
- [35] A. Hjorth, F. Carriere, C. Cudrey, H. Woldike, E. Boel, D.M. Lawson, F. Ferrato, C. Cambillau, G.G. Dodson, L. Thim, R. Verger, *Biochemistry* 32 (1993) 4702.
- [36] K. Thirstrup, R. Verger, F. Carriere, *Biochemistry* 33 (1994) 2748.
- [37] C. Martinez, P. Degeus, M. Lauwereys, G. Matthyssens, C. Cambillau, *Nature* 356 (1992) 615.

- [38] M. Martinelle, M. Holmquist, K. Hult, *Biochim Biophys Acta* 1258 (1995) 272.
- [39] K.K. Kim, H.K. Song, D.H. Shin, K.Y. Hwang, S.W. Suh, *Structure* 5 (1997) 173.
- [40] P. Grochulski, F. Bouthillier, R.J. Kazlauskas, A.N. Serreqi, J.D. Schrag, E. Ziomek, M. Cygler, *Biochemistry* 33 (1994) 3494.
- [41] M. Norin, F. Haeffner, K. Hult, O. Edholm, *Biophys J* 67 (1994) 548.
- [42] A.M. Brzozowski, H. Savage, C.S. Verma, J.P. Turkenburg, D.M. Lawson, A. Svendsen, S. Patkar, *Biochemistry* 39 (2000) 15071.
- [43] G.H. Peters, O.H. Olsen, A. Svendsen, R.C. Wade, *Biophysical Journal* 71 (1996) 119.
- [44] G.H. Peters, S. Toxvaerd, O.H. Olsen, A. Svendsen, *Protein Eng* 10 (1997) 137.
- [45] G.H. Peters, D.M.F. vanAalten, O. Edholm, S. Toxvaerd, R. Bywater, *Biophysical Journal* 71 (1996) 2245.
- [46] S. Jaaskelainen, C.S. Verma, R.E. Hubbard, P. Linko, L.S.D. Caves, *Protein Science* 7 (1998) 1359.
- [47] J. Lee, S.W. Suh, S. Shin, *J Biomol Struct Dyn* 18 (2000) 297.
- [48] T. Thuren, *FEBS Lett.* 229 (1988) 95.
- [49] H.L. Brockman, J.H. Law, F.J. Kezdy, *Journal of Biological Chemistry* 248 (1973) 4965.
- [50] W.F. van Gunsteren, M. Karplus, *Biochemistry* 21 (1982) 2259.
- [51] P.H. Hunenberger, A.E. Mark, W.F. van Gunsteren, *J Mol Biol* 252 (1995) 492.
- [52] A.E. Loccisano, O. Acevedo, J. DeChancie, B.G. Schulze, J.D. Evanseck, *J Mol Graph Model* 22 (2004) 369.
- [53] A.A. Gorfe, P. Ferrara, A. Caflisch, D.N. Marti, H.R. Bosshard, I. Jelesarov, *Proteins* 46 (2002) 41.
- [54] P. Carter, J.A. Wells, *Nature* 332 (1988) 564.
- [55] A.C. Hill, *J Chem Soc Chem Comm* 73 (1898) 634.
- [56] L. Pasteur, (1860).
- [57] R.J. Kazlauskas, A.N.E. Weissfloch, A.T. Rappaport, L.A. Cuccia, *Journal of Organic Chemistry* 56 (1991) 2656.

- [58] W.V. Tuomi, R.J. Kazlauskas, *J Org Chem* 64 (1999) 2638.
- [59] A.N.E. Weissfloch, R.J. Kazlauskas, *Journal of Organic Chemistry* 60 (1995) 6959.
- [60] T. Schulz, J. Pleiss, R.D. Schmid, *Protein Sci* 9 (2000) 1053.
- [61] F. Haeffner, T. Norin, K. Hult, *Biophysical Journal* 74 (1998) 1251.
- [62] F. Haeffner, T. Norin, *Chem. Pharm. Bull.* 47 (1999) 591.
- [63] R.J. Kazlauskas, H.K. Weber, *Current Opinion in Chemical Biology* 2 (1998) 121.
- [64] D. Lang, B. Hofmann, L. Haalck, H.J. Hecht, F. Spener, R.D. Schmid, D. Schomburg, *Journal of Molecular Biology* 259 (1996) 704.
- [65] A. Tanaka, H. Sugimoto, Y. Muta, T. Mizuno, K. Senoo, H. Obata, K. Inouye, *Biosci Biotech Bioch* 67 (2003) 207.
- [66] M. El Khattabi, P. Van Gelder, W. Bitter, J. Tommassen, *J Mol Catal B-Enzym* 22 (2003) 329.
- [67] E.M. Anderson, K.M. Larsson, O. Kirk, *Biocatal Biotransfor* 16 (1998) 181.
- [68] J. Uppenberg, N. Ohrner, M. Norin, K. Hult, G.J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T.A. Jones, *Biochemistry* 34 (1995) 16838.
- [69] P. Degn, W. Zimmermann, *Biotechnology and Bioengineering* 74 (2001) 483.
- [70] P. Degn, L.H. Pedersen, J.O. Duss, W. Zimmermann, *Biotechnology Letters* 21 (1999) 275.
- [71] D. Rotticci, F. Haeffner, C. Orrenius, T. Norin, K. Hult, *J of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5 (1998) 267.
- [72] O. Kirk, M. Würtz Christensen, *Organic Process Research & Development* 6 (2002) 446.
- [73] A. Magnusson, in *Department of Biochemistry, Royal Institute of Technology, Stockholm, 2005*, p. 54.
- [74] C. Orrenius, C. van Heusden, J. van Ruiten, P.L.A. Overbeeke, H. Kierkels, J.A. Duine, J.A. Jongejan, *Protein Engineering* 11 (1998) 1147.
- [75] S. Patkar, J. Vind, E. Kelstrup, M.W. Christensen, A. Svendsen, K. Borch, O. Kirk, *Chem Phys Lipids* 93 (1998) 95.
- [76] D. Rotticci, in *Department of Chemistry, Organic Chemistry, Royal institute of Technology, Stockholm, 2000*, p. 61.

- [77] J.C. Rotticci-Mulder, M. Gustavsson, M. Holmquist, K. Hult, M. Martinelle, *Protein Expression and Purification* 21 (2001) 386.
- [78] C. Orrenius, F. Haeffner, D. Rotticci, N. Ohrner, T. Norin, K. Hult, *Biocatal Biotransfor* 16 (1998) 1.
- [79] W.C. Suen, N.Y. Zhang, L. Xiao, V. Madison, A. Zaks, *Protein Engineering Design & Selection* 17 (2004) 133.
- [80] T. Schulz, R.D. Schmid, J. Pleiss, *J Mol Model* 7 (2001) 265.
- [81] J.H. Kastle, A.S. Loevenhart, *Journ. Amer. Chem. Soc.* 24 (1900) 491.
- [82] A. Zaks, A.M. Klibanov, *J Biol Chem* 263 (1988) 3194.
- [83] A. Zaks, A.M. Klibanov, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985) 3192.
- [84] A.M. Klibanov, *Nature* 409 (2001) 241.
- [85] C.R. Wescott, A.M. Klibanov, *Bba-Protein Struct M* 1206 (1994) 1.
- [86] A.J. Russell, A.M. Klibanov, *Biochem Soc T* 17 (1989) 1145.
- [87] M. Stahl, U. Jeppssonwistrand, M.O. Mansson, K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 9366.
- [88] A. Zaks, A.M. Klibanov, *J Biol Chem* 263 (1988) 8017.
- [89] H. Kitaguchi, P.A. Fitzpatrick, J.E. Huber, A.M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 3094.
- [90] T. Sakurai, A.L. Margolin, A.J. Russell, A.M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 7236.
- [91] A.M. Klibanov, *Trends Biotechnol* 15 (1997) 97.
- [92] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, *Chemical Reviews* 71 (1971) 525.
- [93] A. Ducret, M. Trani, R. Lortie, *Enzyme and Microbial Technology* 22 (1998) 212.
- [94] C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Biotechnology and Bioengineering* 30 (1987) 81.
- [95] R.H. Valivety, P.J. Halling, A.R. Macrae, *Biochimica Et Biophysica Acta* 1118 (1992) 218.
- [96] P.L.A. Overbeeke, B.C. Koops, H.M. Verheij, A.J. Slotboom, M.R. Egmond, J.A. Jongejan, J.J. Heijnen, *Biocatal Biotransfor* 18 (2000) 59.
- [97] Y.S. Lee, J.H. Hong, N.Y. Jeon, K. Won, B.T. Kim, *Organic Process Research & Development* 8 (2004) 948.

- [98] S.J. Singer, *Advances in Protein Chemistry* 17 (1962) 1.
- [99] G. Dodson, C.S. Verma, *Cellular and Molecular Life Sciences* 63 (2006) 207.
- [100] R. Huber, W.S. Bennett, Jr., *Biopolymers* 22 (1983) 261.
- [101] M. Karplus, G.A. Petsko, *Nature* 347 (1990) 631.
- [102] J.A. Rupley, E. Gratton, G. Careri, *Trends Biochem. Sci.* 8 (1983) 18.
- [103] K. Griebenow, A.M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 11695.
- [104] K. Wuthrich, *Science* 243 (1989) 45.
- [105] S. Cusack, J. Smith, J. Finney, B. Tidor, M. Karplus, *Journal of Molecular Biology* 202 (1988) 903.
- [106] D. Ringe, G.A. Petsko, *Prog Biophys Mol Bio* 45 (1985) 197.
- [107] J.A. McCammon, B.R. Gelin, M. Karplus, *Nature* 267 (1977) 585.
- [108] D.S. Hartsough, K.M. Merz, *J Am Chem Soc* 114 (1992) 10113.
- [109] R. Affleck, Z.F. Xu, V. Suzawa, K. Focht, D.S. Clark, J.S. Dordick, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 1100.
- [110] G. Colombo, G. Ottolina, G. Carrea, *Monatsh Chem* 131 (2000) 527.
- [111] G. Colombo, G. Carrea, *J Biotechnol* 96 (2002) 23.
- [112] S. Toba, D.S. Hartsough, K.M. Merz, *J Am Chem Soc* 118 (1996) 6490.
- [113] S. Toba, K.M. Merz, *J Am Chem Soc* 119 (1997) 9939.
- [114] C.L. Brooks, M. Karplus, *Journal of Molecular Biology* 208 (1989) 159.
- [115] B.A. Tejo, A.B. Salleh, J. Pleiss, *Journal of Molecular Modeling* 10 (2004) 358.
- [116] J.J. James, B.S. Lakshmi, A.S. Seshasayee, P. Gautam, *FEBS Lett* 581 (2007) 4377.
- [117] S.L. Cherukuvada, A.S.N. Seshasayee, K. Raghunathan, S. Anishetty, G. Pennathur, *PLOS computational biology* 1 (2005).
- [118] N.M. Micaelo, C.M. Soares, *Febs J* 274 (2007) 2424.
- [119] J.A. Mccammon, *Rep Prog Phys* 47 (1984) 1.
- [120] P.J. Halling, *Biotechnology and Bioengineering* 35 (1990) 691.

- [121] S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.A. Case, C.U. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta, P. Weiner, *J Am Chem Soc* 106 (1984) 765.
- [122] W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 5179.
- [123] A.R. Leach, *Molecular modeling – principles and applications*, Pearson Education Limited, 2001.
- [124] A.A. Palekar, P.T. Vasudevan, S. Yan, *Biocatal Biotransfor* 18 (2000) 177.
- [125] S.A. Patkar, F. Bjorking, M. Zundel, M. Schulein, A. Svendsen, H.P. Heldthansen, E. Gormsen, *Indian J Chem B* 32 (1993) 76.
- [126] A.O. Magnusson, J.C. Rotticci-Mulder, A. Santagostino, K. Hult, *Chembiochem* 6 (2005) 1051.
- [127] M.E. Davis, J.A. Mccammon, *Chemical Reviews* 90 (1990) 509.
- [128] K.A. Sharp, B. Honig, *J Phys Chem-Us* 94 (1990) 7684.
- [129] D. Bashford, M. Karplus, *J Phys Chem-Us* 95 (1991) 9556.
- [130] J. Antosiewicz, J.A. Mccammon, M.K. Gilson, *Journal of Molecular Biology* 238 (1994) 415.
- [131] K.W. Kim, B. Song, M.Y. Choi, M.J. Kim, *Org Lett* 3 (2001) 1507.
- [132] F. Theil, *Tetrahedron* 56 (2000) 2905.
- [133] K. Watanabe, T. Koshihara, Y. Yasufuku, T. Miyazawa, S. Ueji, *Bioorganic Chemistry* 29 (2001) 65.
- [134] G. Carrea, S. Riva, *Angew Chem Int Edit* 39 (2000) 2226.
- [135] P. Berglund, *Biomol Eng* 18 (2001) 13.
- [136] P.J. Halling, *Enzyme and Microbial Technology* 16 (1994) 178.
- [137] G. Fernandez-Lorente, M. Terreni, C. Mateo, A. Bastida, R. Fernandez-Lafuente, P. Dalmases, J. Hugueta, J.M. Guisan, *Enzyme and Microbial Technology* 28 (2001) 389.
- [138] C.P. Govardhan, A.L. Margolin, *Chemistry & Industry* (1995) 689.
- [139] J.F. Tschopp, P.F. Brust, J.M. Cregg, C.A. Stillman, T.R. Gingeras, *Nucleic Acids Res* 15 (1987) 3859.
- [140] H. Ohri, S. Emoto, *Tetrahedron Lett* (1975) 2765.
- [141] A.B. Hajjar, P.F. Nicks, C.J. Knowles, *Biotechnology Letters* 12 (1990) 825.

- [142] S. Warwel, G. Steinke, A. Rusch, M.R. Klaas, *Biotechnol. Tech.* 10 (1996) 283.
- [143] D.W. Park, S. Haam, I.S. Ahn, T.G. Lee, H.S. Kim, W.S. Kim, *Journal of Biotechnology* 107 (2004) 151.
- [144] D.A. Lang, M.L.M. Mannesse, G.H. De Haas, H.M. Verheij, B.W. Dijkstra, *European Journal of Biochemistry* 254 (1998) 333.
- [145] M. Luic, S. Tomic, I. Lescic, E. Ljubovic, D. Sepac, V. Sunjic, L. Vitale, W. Saenger, B. Kojic-Prodic, *European Journal of Biochemistry* 268 (2001) 3964.
- [146] A. Mezzetti, J.D. Schrag, C.S. Cheong, R.J. Kazlauskas, *Chem Biol* 12 (2005) 427.
- [147] M. Rusnak, in *Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart, Stuttgart, 2004*, p. 181.
- [148] P. Hudaky, A. Perczel, *J Phys Chem A* 108 (2004) 6195.
- [149] W. Kabsch, C. Sander, *Biopolymers* 22 (1983) 2577.
- [150] D. Eisenberg, E. Schwarz, M. Komarony, R. Wall, *J. Mol. Biol.* 179 (1984) 125.
- [151] P. Auffinger, S. Louisemay, E. Westhof, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 6720.
- [152] L.S.D. Caves, J.D. Evanseck, M. Karplus, *Protein Science* 7 (1998) 649.
- [153] G.A. Worth, F. Nardi, R.C. Wade, *Journal of Physical Chemistry B* 102 (1998) 6260.
- [154] J.L. Schmitke, L.J. Stern, A.M. Klibanov, *P Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 4250.
- [155] N.H. Yennawar, H.P. Yennawar, G.K. Farber, *Biochemistry* 33 (1994) 7326.
- [156] H.P. Yennawar, N.H. Yennawar, G.K. Farber, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 577.
- [157] K.N. Allen, C.R. Bellamacina, X.C. Ding, C.J. Jeffery, C. Mattos, G.A. Petsko, D. Ringe, *J Phys Chem-US* 100 (1996) 2605.
- [158] J. Broos, A.J.W.G. Visser, J.F.J. Engbersen, W. Verboom, A. vanHoek, D.N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 12657.
- [159] P.P. Wangikar, P.C. Michels, D.S. Clark, J.S. Dordick, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 70.

- [160] P.A. Fitzpatrick, A.C. Steinmetz, D. Ringe, A.M. Klibanov, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 8653.
- [161] P.A. Fitzpatrick, D. Ringe, A.M. Klibanov, *Biochem Biophys Res Commun* 198 (1994) 675.
- [162] R.W. McCabe, A. Rodger, A. Taylor, *Enzyme and Microbial Technology* 36 (2005) 70.
- [163] V. Vlachy, S. Lapanje, *Biopolymers* 17 (1978) 2041.
- [164] H. Frauenfelder, S.G. Sligar, P.G. Wolynes, *Science* 254 (1991) 1598.
- [165] Z. Yuan, J. Zhao, Z.X. Wang, *Protein Engineering* 16 (2003) 109.
- [166] J. Mijovic, Y. Bian, R.A. Gross, B. Chen, *Macromolecules* 38 (2005) 10812.
- [167] D.S. Clark, *Philos T Roy Soc B* 359 (2004) 1299.
- [168] R. Affleck, C.A. Haynes, D.S. Clark, *P Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 5167.
- [169] L. Yang, J.S. Dordick, S. Garde, *Biophysical Journal* 87 (2004) 812.
- [170] J. Ottosson, L. Fransson, J.W. King, K. Hult, *Biochim Biophys Acta* 1594 (2002) 325.
- [171] F.H. Arnold, *Faseb J* 7 (1993) 744.
- [172] D.S. Hartsough, K.M. Merz, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 6529.
- [173] M. Nakasako, *Philos T Roy Soc B* 359 (2004) 1191.
- [174] M.M. Teeter, *Annu Rev Biophys Bio* 20 (1991) 577.
- [175] F.T. Burling, W.I. Weis, K.M. Flaherty, A.T. Brunger, *Science* 271 (1996) 72.
- [176] R.M. Brunne, E. Liepinsh, G. Otting, K. Wuthrich, W.F. van Gunsteren, *Journal of Molecular Biology* 231 (1993) 1040.
- [177] T.M. Raschke, *Curr Opin Struc Biol* 16 (2006) 152.
- [178] A. Deshpande, S. Nimsadkar, S.C. Mande, *Acta Crystallogr D* 61 (2005) 1005.
- [179] P.L. Overbeeke, J.A. Jongejan, J.J. Heijnen, *Biotechnol Bioeng* 70 (2000) 278.
- [180] L.A.S. Gorman, J.S. Dordick, *Biotechnology and Bioengineering* 39 (1992) 392.
- [181] S.M. Bhattacharyya, Z.G. Wang, A.H. Zewail, *Journal of Physical Chemistry B* 107 (2003) 13218.

- [182] H. Kovacs, A.E. Mark, W.F. vanGunsteren, *Proteins* 27 (1997) 395.
- [183] V.A. Makarov, M. Feig, B.K. Andrews, B.M. Pettitt, *Biophysical Journal* 75 (1998) 150.
- [184] F. Franks, D. England, *Critical Reviews in Biochemistry* 3 (1975) 165.
- [185] J.L. Smith, P.W.R. Corfield, W.A. Hendrickson, B.W. Low, *Acta Crystallographica Section A* 44 (1988) 357.
- [186] Y. Cajal, A. Svendsen, V. Girona, S.A. Patkar, M.A. Alsina, *Biochemistry* 39 (2000) 413.
- [187] U. Derewenda, L. Swenson, Y.Y. Wei, R. Green, P.M. Kobos, R. Joerger, M.J. Haas, Z.S. Derewenda, *Journal of Lipid Research* 35 (1994) 524.
- [188] G.H. Peters, R.P. Bywater, *Protein Engineering* 12 (1999) 747.
- [189] M.O. Jensen, T.R. Jensen, K. Kjaer, T. Bjornholm, O.G. Mouritsen, G.H. Peters, *Biophysical Journal* 83 (2002) 98.
- [190] A. Jutila, K. Zhu, S.A. Patkar, J. Vind, A. Svendsen, P.K.J. Kinnunen, *Biophysical Journal* 78 (2000) 1634.
- [191] N.A. Turner, E.C. Needs, J.A. Khan, E.N. Vulfson, *Biotechnol Bioeng* 72 (2001) 108.
- [192] R.C. Wade, M.E. Davis, B.A. Luty, J.D. Madura, J.A. Mccammon, *Biophysical Journal* 64 (1993) 9.
- [193] J.C. Williams, A.E. Mcdermott, *Biochemistry* 34 (1995) 8309.
- [194] K. Gunasekaran, B.Y. Ma, R. Nussinov, *Journal of Molecular Biology* 332 (2003) 143.
- [195] N. Miled, A. De Caro, J. De Caro, R. Verger, *Bba-Protein Struct M* 1476 (2000) 165.
- [196] G.H. Peters, R.P. Bywater, *Biophysical Journal* 81 (2001) 3052.
- [197] W.F. van Gunsteren, H.J. Berendsen, J. Hermans, W.G. Hol, J.P. Postma, *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (1983) 4315.
- [198] A.A. Kossiakoff, M. Randal, J. Guenot, C. Eigenbrot, *Proteins* 14 (1992) 65.
- [199] A. Koumanov, A. Karshikoff, E.P. Friis, T.V. Borchert, *Journal of Physical Chemistry B* 105 (2001) 9339.
- [200] Y.S. Kim, H.B. Lee, K.D. Choi, S. Park, O.J. Yoo, *Biosci Biotech Bioch* 58 (1994) 111.
- [201] L. Alberghina, M. Lotti, *Methods Enzymol* 284 (1997) 246.

- [202] T. Ishida, S. Kato, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 7111.
- [203] J.B. Tobin, S.A. Whitt, C.S. Cassidy, P.A. Frey, *Biochemistry* 34 (1995) 6919.
- [204] C.S. Cassidy, J. Lin, P.A. Frey, *Biochemistry* 36 (1997) 4576.
- [205] D. Neidhart, Y.M. Wei, C. Cassidy, J. Lin, W.W. Cleland, P.A. Frey, *Biochemistry* 40 (2001) 2439.
- [206] H. Neuvonen, *Biochem J* 322 (1997) 351.
- [207] S.B. Petersen, P. Fojan, E.I. Petersen, M.T. Petersen, *J Biomed Biotechnol* 1 (2001) 62.
- [208] M. Lauwereys, P. De Geus, J. De Meutter, P. Stanssens, G. Matthyssens, in L. Alberghina (Editor), *GBF International Workshop, VCH, Braunschweig, Germany, 1990.*
- [209] P. Kuhn, M. Knapp, S.M. Soltis, G. Ganshaw, M. Thoene, R. Bott, *Biochemistry* 37 (1998) 13446.
- [210] G.R. Stranzl, K. Gruber, G. Steinkellner, K. Zangger, H. Schwab, C. Kratky, *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 3699.
- [211] M. Marquart, J. Walter, J. Deisenhofer, W. Bode, R. Huber, *Acta Crystallographica Section B-Structural Science* 39 (1983) 480.
- [212] J.M. Cregg, D.R. Higgins, *pichia protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998.
- [213] M.M. Bradford, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248.
- [214] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680.
- [215] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, *Bioinformatics* 22 (2006) 195.
- [216] E. Zuckerkandl, L. Pauling, *Journal of Theoretical Biology* 8 (1965) 357.
- [217] Needleman, Wunsch, *J Mol Biol* 48 (1970) 44.
- [218] C. Notredame, D.G. Higgins, J. Heringa, *Journal of Molecular Biology* 302 (2000) 205.
- [219] O. Poirot, E. O'Toole, C. Notredame, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 3503.
- [220] P.J. Martel, A. Baptista, S.B. Petersen, *Biotechnology Annual Review* 2 (1996) 315.
- [221] M. Teresa, N. Petersen, P. Martel, E.I. Petersen, F. Drablos, S.B. Petersen, *Lipases, Part A* 284 (1997) 130.

- [222] H.R. Costantino, K. Griebenow, R. Langer, A.M. Klibanov, *Biotechnology and Bioengineering* 53 (1997) 345.
- [223] P. Mishra, K. Griebenow, A.M. Klibanov, *Biotechnology and Bioengineering* 52 (1996) 609.
- [224] M.K. Gilson, K.A. Sharp, B.H. Honig, *Journal of Computational Chemistry* 9 (1988) 327.
- [225] W. Rocchia, E. Alexov, B. Honig, *Journal of Physical Chemistry B* 105 (2001) 6507.
- [226] W. Rocchia, S. Sridharan, A. Nicholls, E. Alexov, A. Chiabrera, B. Honig, *Journal of Computational Chemistry* 23 (2002) 128.
- [227] D. Sitkoff, K.A. Sharp, B. Honig, *J Phys Chem-Us* 98 (1994) 1978.
- [228] W.L. DeLano, in, DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA, 2002.
- [229] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A.M. Jr, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, in, *Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.*
- [230] Ditchfie.R, W.J. Hehre, J.A. Pople, *Journal of Chemical Physics* 54 (1971) 724.
- [231] C.I. Bayly, P. Cieplak, W.D. Cornell, P.A. Kollman, *J Phys Chem-Us* 97 (1993) 10269.
- [232] S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.T. Nguyen, D.A. Case, *Journal of Computational Chemistry* 7 (1986) 230.
- [233] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *Journal of Molecular Biology* 261 (1996) 470.
- [234] D.A. Case, T.E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K.M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R.J. Woods, *Journal of Computational Chemistry* 26 (2005) 1668.
- [235] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, *Journal of Chemical Physics* 79 (1983) 926.

- [236] W.L. Jorgensen, J.M. Briggs, M.L. Contreras, J Phys Chem-Us 94 (1990) 1683.
- [237] J.W. Caldwell, P.A. Kollman, J Phys Chem-Us 99 (1995) 6208.
- [238] R. Faller, H. Schmitz, O. Biermann, F. Muller-Plathe, Journal of Computational Chemistry 20 (1999) 1009.
- [239] H.J.C. Berendsen, J.P. Postma, W.F. van Gunsteren, A. DiNola, J.R. Haak, J Chem Phys 81 (1984) 3684.
- [240] J.P. Ryckaert, G. Ciccotti, H.J.C. Berendsen, J Comput Phys 23 (1977) 327.
- [241] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, J Mol Graphics 14 (1996) 33.
- [242] G. Vriend, J Mol Graphics 8 (1990) 52.
- [243] D.A. Case, AMBER 7, University of California, San Francisco, 2002.
- [244] T. Darden, L. Pedersen, Abstr Pap Am Chem S 212 (1996) 6.
- [245] D.R. Lide (D.R. Lide), D.R. Lides), CRC Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press, London, 2005.