

Molekulare Grundlagen der Stereoselektivität

Lipase-katalysierter Umsetzungen

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Tanja Schulz
aus Künzelsau

Hauptberichter: Prof. Dr. R. D. Schmid
Mitberichter: Prof. Dr. E. Roduner
Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2001

Institut für Technische Biochemie
2001

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

Stuttgart, den 05.01.2001

Danksagung

- Herrn Prof. Dr. R. D. Schmid danke ich für die Überlassung und Betreuung des Themas, seine Unterstützung und Gesprächsbereitschaft und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am ITB.
- Der Firma Aventis R&D danke ich für die finanzielle Förderung der Arbeit.
- Der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg danke ich für die finanzielle Förderung im Rahmen eines Promotions-Stipendiums.
- Jutta Schmitt und Volker Nödinger für die labortechnische Einweisung und die fachliche Hilfe.
- Francesca danke ich *for being a friend*.
- Ralf danke ich für die fachliche Unterstützung im Endspurt meiner Arbeit.
- Jürgen Pleiss danke ich für die Betreuung meiner Arbeit.
- Mein Dank gilt ebenso den Mitgliedern des Instituts für Technische Biochemie, die zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben und zur Mithilfe bereit waren.
- Bei meinen Eltern möchte ich mich für die Unterstützung während meines Studiums bedanken.
- Ein besonderes Dankeschön an **Kai-Uwe**.

Abkürzungen

A	Adenin
Ac	Acetyl
Ala	Alanin
ANL	<i>Aspergillus niger</i> Lipase
Amp	Ampicillin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c	stöchiometrische Konzentration in mol/l
C	Cytosin
CAL	<i>Candida antarctica</i> Lipase
CLL	<i>Candida lipolytica</i> Lipase
CRL	<i>Candida rugosa</i> Lipase
<i>C. rugosa</i>	<i>Candida rugosa</i>
Cys	Cystein
Da	Dalton
dNTP	3'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleosin-5'-triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	inhärente Enantioselektivität
EC	<i>Enzyme Commission</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ee	Enantiomerenüberschuß
ees	Enantiomerenüberschuß im Ausgangsmaterial
eep	Enantiomerenüberschuß im Produkt
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
h	Stunde
His	Histidin
HLL	<i>Humicola lanuginosa</i> Lipase
Ile	Isoleucin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Lurria Bertani-Medium
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Molar [moll]
Me	Methyl
mA	Milliampere
Met	Methionin
min	Minute
ml	Milliliter
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie

OD	optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
<i>p</i>	para
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>P. cepacia</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>
PCL	<i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase
PCR	Polymeraseskettenreaktion
PGL	<i>Pseudomonas glumae</i> Lipase
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
Phe	Phenylalanin
PPL	Porcine pancreatic Lipase
Pro	Prolin
(<i>R</i>)	(<i>R</i>)-Konfiguration
(<i>S</i>)	(<i>S</i>)-Konfiguration
SDS	Natriumdodecylsulfat
RML	<i>Rhizomucor miehei</i> Lipase
ROL	<i>Rhizomucor oryzae</i> Lipase
Ser	Serin
T	Thymin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Umsatz
Umin	Umdrehungen pro Minute
UV	Strahlung im ultravioletten Bereich

V	Volt
Val	Valin
%(vv)	Volumenprozent
Vol.	Volumen
% (wv)	Gewichtsprozent
W	Watt
λ	Wellenlänge in nm
z.B.	zum Beispiel

Summary

Lipases, e.g. the lipase from *Pseudomonas cepacia* (EC 3.1.1.3), represent popular and widely applied catalysts in organic synthesis for highly enantioselective kinetic resolution of racemic mixtures of secondary alcohols in hydrolysis, esterification and transesterification.

Stereopreference toward chiral secondary alcohols is determined predominantly by the substrate structure and has been reliably predicted by the structure of the secondary alcohol moiety. Stereoselectivity however depends on atomic details of interactions between substrate and lipase. Since the atomic details of factors which mediate enantioselectivity are largely obscure, there has been no general quantitative correlation between structure and enantioselectivity. The lacking of a method, which is able to predict experimentally accessible enantioselectivity reduces an extensive application of lipases and limits the potential of lipases as highly enantioselective catalysts in kinetic resolution. In this work enantioselectivity mediating factors of different lipases toward chiral secondary alcohols and structural analogs like amines were identified by applying molecular modelling studies, and a correlation between the molecular base and experimentally determined enantioselectivity is presented.

The mechanistic details of the catalytic reaction of serine hydrolases have been well investigated by quantum-chemical methods like *ab initio* and density functional theory, and by semiempirical methods. The reaction mechanism of ester hydrolysis starts with the formation of a Michaelis complex followed by a first transition state to the first tetrahedral intermediate, where the substrate is covalently linked to side chain oxygen O_γ of catalytic serine. The crucial hydrogen bonds from H_{N_ϵ} of catalytic histidine to serine O_γ and the oxygen of the alcohol moiety are formed. Transfer of H_{N_ϵ} to the oxygen of the alcohol moiety releases the alcohol and an acyl-enzyme complex is formed, which is then hydrolyzed by water to the second tetrahedral intermediate. Quantum-chemical methods identified the transition state that initiates the breakdown of the first tetrahedral intermediate as crucial reaction step.

Attempts to calculate enantioselectivity using force field methods have been made previously, e.g. calculations of energy differences using molecular dynamics and molecular mecha-

tics of substrate-lipase complexes have already been successfully used to predict stereopreference. However, the calculated values of potential energy differences between the diastereomeric substrate-lipase complexes did not correlate with experimental enantioselectivity. To circumvent the limitations of free energy and entropy calculations, this work combines a flexible docking based on structural information of inhibited lipases, e.g. from *P. cepacia* with a ranking strategy, which evaluates geometrical properties of the enzyme-substrate complexes and correlates them to experimentally determined enantioselectivity E .

Therefore, 30 secondary alcohols with published E values using *P. cepacia* lipase in hydrolysis or esterification reactions were selected. E values are ranging from low enantioselectivity ($E = 20$) to high enantioselectivity ($E = 100$). Only substrates consisting of C, H, N, O and halogen atoms were selected, since these atoms are most reliably parameterized in molecular dynamics force fields. As a further criterion, substrates varied over a broad range of size, shape and physico-chemical properties of substituents at the stereocenter: medium-sized substituents ranged from small, spherical and hydrophobic (e.g. $-\text{CH}_3$) to larger and more hydrophilic substituents (e.g. $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), large substituents were saturated and unsaturated aliphatic as well as aromatic substituents, including three rigid cyclic systems. Models of their octanoic acid esters mimicking the first tetrahedral intermediate were docked to the open conformation of *P. cepacia* lipase and molecular dynamics simulations were performed. Different binding pockets, appropriate to accommodate substituents at the stereo center of the alcohol moiety, were identified. The two enantiomers of 27 substrates bound preferentially in either of two binding modes: the fast-reacting enantiomer in a productive mode, the slow-reacting enantiomer in a non-productive mode. Non-productive mode of fast-reacting enantiomers was prohibited by repulsive interactions. For the slow-reacting enantiomers in the productive binding mode, the interactions with the substrate locate the active site histidine far away from its proper orientation, and the distance $d(\text{H}_{\text{N}\epsilon}-\text{O}_{\text{alc}})$ between histidine side chain and the alcohol oxygen increases. $d(\text{H}_{\text{N}\epsilon}-\text{O}_{\text{alc}})$ was correlated to experimentally observed enantioselectivity: in substrates for which *P. cepacia* lipase has high enantioselectivity ($E > 100$), $d(\text{H}_{\text{N}\epsilon}-\text{O}_{\text{alc}})$ is greater than 2.2 Å for slow-reacting enantiomers, thus preventing efficient catalysis of this enantiomer. In substrates of low enantioselectivity ($E < 20$), the distance $d(\text{H}_{\text{N}\epsilon}-\text{O}_{\text{alc}})$ is less than 2.0 Å, and slow- and fast-reacting enantiomers are catalyzed at similar rates. For substrates of medium enantioselectivity ($20 < E < 100$), $d(\text{H}_{\text{N}\epsilon}-\text{O}_{\text{alc}})$ is around 2.1 Å. This simple model, which is exclusively based on a structure-based scoring of a single geometrical parameter $d(\text{H}_{\text{N}\epsilon}-\text{O}_{\text{alc}})$, can be applied to pre-

dict enantioselectivity of *P. cepacia* lipase toward a broad range of secondary alcohols. The three outliers, which do not fit the model, show a common structural characteristic, a polar *para*-methoxy group. Due to unfavorable interactions while placing this polar substituent within one of the lipase binding pockets, the so called hydrophobic dent, in the productive as well as in the non-productive binding mode, differences in investigated binding modes and population of binding modes occur, which influence enantioselectivity. Therefore, outliers which do not fit the model, are also predictable.

This new structure-based model to predict enantioselectivity in lipase-catalyzed resolution toward secondary alcohols was further shown to be generally applicable to structural derivatives like amines. The preparation of enantiopure amines like alicyclic β -aminocarboxylic acids makes them attractive targets for various pharmaceutically important 1,3-heterocycles, e.g. cispentacin, the pentacyclic (1*R*,2*S*)-enantiomer of investigated β -aminocarboxylic acids, is a natural product isolated from the fermentation broths of *Streptomyces setonii* and *Bacillus cereus*, and it possesses effective antifungal properties against *Candida* strains. Therefore, ten alicyclic β -aminocarboxylic acids with published E values using *P. cepacia* lipase in acylation with various 2,2,2-trifluoroethyl esters were selected, models of their octanoic acid esters were docked to the open conformation of *P. cepacia* lipase, and molecular dynamics simulations were performed. Like for the secondary alcohols, the two enantiomers of β -aminocarboxylic acids bound preferentially in either of two binding modes. Again the distance $d(\text{H}_{\text{N}\epsilon}-\text{N}_{\text{amide}})$ of slow-reacting enantiomers correlated well with experimentally determined enantioselectivity: in investigated β -aminocarboxylic acids for which *P. cepacia* lipase has high enantioselectivity ($E > 87$), $d(\text{H}_{\text{N}\epsilon}-\text{N}_{\text{amide}})$ is greater than 2.3 Å for slow-reacting enantiomers, thus preventing efficient catalysis of this enantiomer. In substrates of low enantioselectivity ($E < 20$), the distance $d(\text{H}_{\text{N}\epsilon}-\text{N}_{\text{amide}})$ is less than 2.0 Å, and slow- and fast-reacting enantiomers are catalyzed at similar rates. This makes the structure-based method generally applicable in *P. cepacia* lipase-catalyzed resolution of secondary alcohols and structural analogs like amines.

The potential of the developed structure-based scoring method was further studied toward the *Candida rugosa* lipase catalyzed conversion of two secondary alcohols containing a neighbouring second stereo center in β -position to the OH-functionality of investigated substrates. Sterical interactions of the four stereo isomers of each substrate (*RR*, *SS*, *RS* and *SR*) with the

side chain of catalytic histidine led to different orientations of the imidazole. Since the distance between the imidazole and the substrate is crucial for catalysis to occur, the geometrical parameter – again the distance $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ between $\text{H}_{N\epsilon}$ of the imidazole side chain of catalytic histidine and the alcohol oxygen O_{alc} of the substrate – was identified, which reflects catalytic activity. The distance $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ correlates with the experimentally determined reactivity order in the enzymatic hydrolysis of the four stereo isomers: modelled distances $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ were short ($= 1.8 \text{ \AA}$) for *RR* stereo isomers, which were also experimentally found to be hydrolyzed most rapidly, distances $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ were about 2 \AA for *SS* and *SR* stereo isomers, which were converted at similar rates but at lower rate than *RR* stereo isomers, and finally, distances $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ for *SR* stereo isomers were greater than 4 \AA , in accordance with very slow conversion of *SR* stereo isomers. The distance $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ proved again to be appropriate to predict relative enantioselectivity in *C. rugosa* lipase-catalyzed resolution and further on it is an appropriate geometrical parameter to predict diastereoselectivity.

Based on the correlation between experimentally determined enantioselectivity and the distance $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$, *in silico* mutants were designed to experimentally increase enantioselectivity toward a selected substrate – *rac*-2-Octanol. *Rac*-2-Octanol is converted by the wildtype lipase from *P. cepacia* with $E = 4$. The *in silico* mutation Y29L increased the distance $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ for the slow-reacting enantiomer *S*-2-Octanol from 1.94 \AA (wildtype) to 2.65 \AA (Y29L); the distance for the fast-reacting enantiomer *R*-2-Octanol remained nearly constant (wildtype: 2.46 \AA , Y29L: 2.41 \AA). Experimental validation of the *in silico* results were performed. The single mutant Y29L, expressed in *E. coli*, showed an increased enantioselectivity from $E = 4$ to $E = 10$ in *n*-hexane.

The present work presents a simple and general model, which allows the classification of secondary alcohols and structural analogs in *P. cepacia* lipase catalyzed conversion into three categories of enantioselectivity: zones for low and high enantioselectivity, separated by a narrow twilight zone. The values of a single geometrical parameter, the distance $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ and $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{N}_{amide})$, respectively, served as an indicator for enantioselectivity and correlated well with experimentally determined enantioselectivity. The same is true for *C. rugosa* lipase catalyzed conversion of chiral secondary alcohols containing additionally a neighbouring stereo center to the OH-functionality of the alcohol moiety. Based on this study, it is possible to pre-

dict enantioselectivity of different lipases toward a broad range of substrates by performing molecular dynamics simulations and applying a structure-based scoring method. Further on a new and promising method – directed evolution *in silico* – is presented and experimentally validated. The structure-based scoring method appears to be a promising way to handle further enzyme-catalyzed conversions, e.g. the enantioselective ring opening of epoxides by epoxide hydrolases.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Lipasen	3
2.1	Vorkommen und Benennung von Lipasen	3
2.2	Anwendungen von Lipasen	3
2.3	Was macht ein Enzym zur Lipase?	5
2.4	α/β -Hydrolase Faltung	6
2.5	Die katalytische Triade	7
2.6	Der Katalyse-Mechanismus der Hydrolyse	9
2.7	Grenzflächenaktivierung	9
2.8	Substratbindestellen in Lipasen	12
2.9	Enantioselektive Lipase-katalysierte Reaktionen	14
2.9.1	Sekundäre Alkohole	14
2.9.2	Primäre Alkohole	18
2.9.3	Triglyceride	18
2.9.4	Analoga sekundärer Alkohole	19
2.10	Stereoselektivität	21
2.11	Aktivität	23
3	Zielsetzung	24

4 Die Theorie molekulardynamischer Methoden	25
4.1 Einleitung	25
4.2 Ein einfaches Modell	26
4.3 Kontinuierliche Potentiale	27
4.3.1 Algorithmen	27
4.3.2 Der Zeitschritt - δt	30
4.4 Einrichten molekulardynamischer Simulationen	31
4.5 Berechnung thermodynamischer Eigenschaften	33
5 Material und Methoden	34
5.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	34
5.2 Technische Geräte	36
5.3 Nährmedien, Puffer und Lösungen	37
5.3.1 Nährmedien	37
5.3.2 Puffer und Lösungen	37
5.3.3 Antibiotikum	39
5.4 Stämme und Plasmide	39
5.4.1 Bakterienstamm <i>E. coli</i> DH5 α	39
5.4.2 Das Plasmid pCYTEXP1	40
5.4.3 Das Plasmid pT-Lip-Hp	40
5.4.4 Das Plasmid pTompA Δ 70HpHis	40

5.5	Anzucht und Stammkultivierung	41
5.6	Molekulargenetische Techniken	42
5.6.1	Herstellung kompetenter Zellen	42
5.6.2	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen	42
5.6.3	Isolation der Plasmid-DNA	42
5.6.4	Positionsgerichtete Mutagenese	43
5.6.5	Restriktionsanalysen	44
5.6.6	Agarose-Gelelektrophorese	45
5.6.7	Vorbereitung zur DNA-Sequenzierung	45
5.7	Biochemische Methoden	46
5.7.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese - PAGE	46
5.7.2	Photometrischer Assay auf Lipase-Aktivität	47
5.8	Expression der rekombinanten <i>P. cepacia</i> Lipase und des Helferproteins aus <i>E. coli</i>	48
5.9	Zellaufschluß und Rückfaltung	49
5.10	Protein-Rückgewinnung	49
5.10.1	Cross-Flow Filtration	49
5.10.2	Ultra-Filtration	49
5.10.3	Lyophilisierung	50
5.11	Chemische Methoden	50
5.11.1	Gaschromatographie	50

5.11.2 GC-analytische Bestimmung der Produktverteilung	51
5.12 Eingesetzte Hardware	52
5.13 Eingesetzte Software und Online-Datenbanken	52
5.14 Lipasestrukturen	53
5.15 Charakteristika der Substrat-Bindestellen in Lipasen	54
5.16 Manuelles Docking der Substrate	55
5.17 Docking mit FlexX	58
5.18 Partialladungen des ersten tetrahedralen Intermediats	58
5.19 Energieminimierung	58
5.20 Molekulardynamische Simulationen	60
5.21 Auswertung der MD-Simulationen	61
5.21.1 Trajektorien	61
5.21.2 Mittlere Strukturen	62
5.21.3 Zuordnung der Bindungsmodi	62
5.21.4 Analytische Bewertung der berechneten Strukturen	63
6 Ergebnisse	64
6.1 Charakterisierung der Lipase-Bindestellen	64
6.1.1 Lipase aus <i>P.cepacia</i>	64
6.1.2 Lipase B aus <i>C. antarctica</i>	66
6.1.3 Lipase aus <i>C. rugosa</i>	69

6.2	Molekulare Grundlagen der Stereopräferenz	70
6.2.1	Anwendung auf die Lipase aus <i>P. cepacia</i>	70
6.2.2	Anwendung auf die Lipase aus <i>C. rugosa</i>	75
6.2.3	Anwendung auf die Lipase B aus <i>C. antarctica</i>	83
6.3	Molekulare Grundlagen der Stereoselektivität	85
6.3.1	Enantioselektivität in <i>P. cepacia</i> Lipase-katalysierten Umsetzungen chiraler sekundärer Alkohole	85
6.3.2	Stereoselektivität in <i>P. cepacia</i> Lipase-katalysierten Umsetzungen chiraler Amine	90
6.3.3	Stereoselektivität in <i>C. rugosa</i> Lipase-katalysierten Umsetzungen sekundärer Alkohole mit zwei benachbarten Stereozentren	92
6.4	Gerichtete Evolution <i>in silico</i> am Beispiel der Lipase aus <i>P. cepacia</i>	96
6.5	Überprüfung des Modells am Beispiel der Mutante Y29L	100
6.5.1	Bestimmung der Aktivität	100
6.6	Bestimmung der Enantioselektivität	101
7	Diskussion	103
7.1	Auswahl der Substrate	103
7.1.1	Substrate in <i>P. cepacia</i> Lipase-katalysierten Umsetzungen	103
7.1.2	Substrate in <i>C. antarctica</i> B Lipase-katalysierten Umsetzungen	104
7.1.3	Substrate in <i>C. rugosa</i> Lipase-katalysierten Umsetzungen	104
7.2	Der Katalyse-Mechanismus	104

7.2.1	Tetrahedrale Reaktionsintermediate und deren Übergangszustände . . .	105
7.2.2	Der manuelle Einbau der Substrate	106
7.3	Qualität der MD-Simulationen	107
7.3.1	Zeitliches Limit	107
7.3.2	Einschränkung der Freiheitsgrade	108
7.4	Experimentelle Befunde zur Stereopräferenz	108
7.5	Die Bewertung Enzym-katalysierter Reaktionen	109
7.5.1	Energie- oder strukturbasierte Bewertung?	110
7.5.2	Weitere Bewertungsmethoden	112
7.6	Effekte äußerer Einwirkungen	112
7.6.1	Solvens-Effekte	112
7.6.2	Temperatur-Effekte	114
7.7	Vergleich der Modelle zur Vorhersage der Stereopräferenz	115
7.7.1	Lipase aus <i>P. cepacia</i> und Lipase B aus <i>C. antarctica</i>	115
7.7.2	Lipase aus <i>C. rugosa</i>	117
7.7.3	Abweichungen in der Messung des Abstandes $d(H_{N\epsilon}-O_{alc})$	117
7.8	Mutanten-Design <i>in silico</i> unter Verwendung des theoretischen Modells	118
7.8.1	Das eingesetzte Struktur-Modell	118
7.8.2	Das optimale Solvens und die optimalen Reaktionsbedingungen	119
7.8.3	Die Fehlergröße in der experimentellen Bestimmung der Enantioselektivität	119

7.9 Ausblick 120

1 Einleitung

Enzyme sind äußerst effiziente und hochselektive chirale Katalysatoren, die eine Vielzahl chemischer und biochemischer Umsetzungen millionenfach beschleunigen oder überhaupt erst ermöglichen. Die Komplexität Enzym-katalysierter Reaktionen reicht hierbei von der einfachen Hydratisierung von Kohlendioxid bis zur Replikation eines kompletten Chromosoms.

Der chirale (*cheir*, griech.: Hand) Aufbau der Enzyme – bedingt durch die chiralen Bausteine der Polypeptide, die *L*-Aminosäuren (Abb. 1) – wird häufig zur Enantiomerendifferenzierung in der enzymatischen kinetischen Racematspaltung ausgenutzt. Hierbei bindet das Enantiomer mit der natürlich bevorzugten Konfiguration an ein passendes katalytisches Zentrum und wird vorrangig umgesetzt.

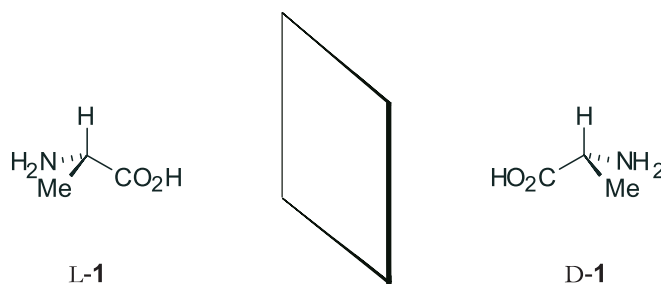


Abb. 1. Chiralität am Beispiel des Enantiomerenpaares der Aminosäure *L*- und *D*-1 Alanin.

In der präparativen organischen Chemie häufig genutzt und kommerziell erhältlich sind hydrolysierende (Esterasen, Lipasen, Peptidasen, Acylasen) bzw. reduzierende Enzyme (Dehydrogenasen). Bei Lipasen (Triacylglycerolhydrolasen, *EC* 3.1.1.3^[158]) handelt es sich um häufig vorkommende Hydrolasen, die die Hydrolyse von Acylglycerolen^[133] katalysieren (Abb. 2, S. 2). Lipasen spalten aber auch Esterbindungen synthetischer Substrate, so z.B. Esterbindungen sekundärer Alkohole, katalysieren aber auch deren Veresterungs- und Umesterungs-Reaktionen.

Die Kombination aus häufig geringer Substratspezifität, hoher Stereo- und Regioselektivität auch gegenüber synthetischen Substraten sowie hoher Enzymstabilität in organischen Lösungsmitteln machen Lipasen zu einem äußerst nützlichen Werkzeug in der organischen Synthese. Auch chemische Äquivalente der Lipasen sind bekannt, die eine effektive Racematspaltung

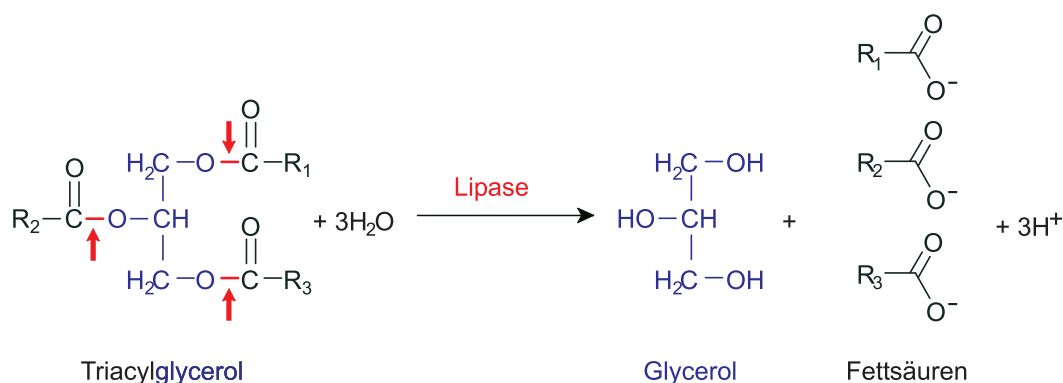


Abb. 2. Lipasen-katalysierte Hydrolyse der Esterbindung (rot markiert) der Triacylglycerole – den natürlichen Substraten von Lipasen.

erlauben, z.B. verschiedene chirale N -^[19], O -^[19,20], C -^[21], S - und H -Nucleophile^[23]. Die stereoselektive Esterspaltung durch Oxazaborolidin-assistierte Boranreduktion mittels chiraalem H -Nucleophil **2** wird beispielsweise zum atropselektiven Aufbau axial-chiraler Biarylverbindungen^{[24]^a} (Abb. 3) genutzt. Aufgrund des häufig eingeschränkten Substratspektrums und der unflexiblen Reaktionsbedingungen sind diese Umsetzungen jedoch nur bedingt konkurrenzfähig. Lipase-katalysierte Biotransformationen finden heute deshalb sowohl in der Herstellung enantiomerenreiner Wirkstoffe^[17] und synthetischer Intermediate als auch im Gebiet der Schutzgruppenchemie^[156,169,175] und der Modifikation natürlicher Lipide^[57,102,166] Anwendung.

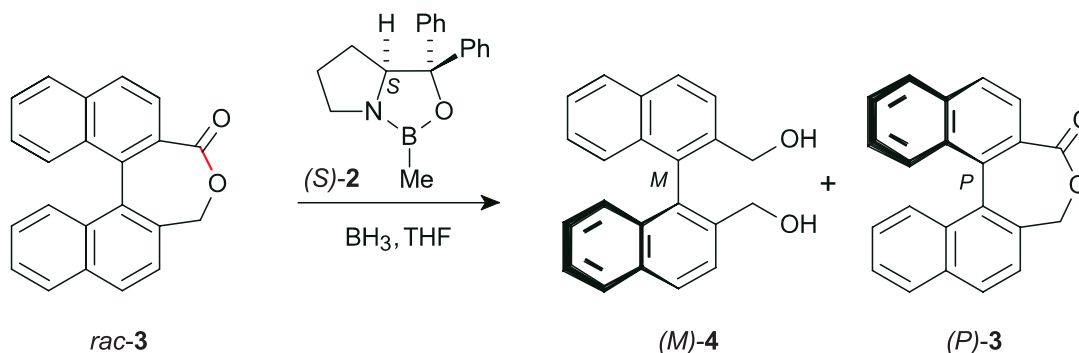


Abb. 3. Die chemische Enantiomerendifferenzierung mittels chiraalem Oxazaborolidin **2** (H -Nucleophil): Die atropselektive Ringöffnung axial-chiraler Biarylverbindungen (M)/(P)-**3** zu nahezu enantiomerenreinem (M)-**4** (er $\geq 98 : 2$).

^aDas stereogene Element axial-chiraler Verbindungen wird nicht wie im Falle der Zentrochiralität durch ein Stereozentrum sondern durch eine stereogene Achse gebildet. Konfigurativ stabile, axial-chirale Wirkstoffe besitzen häufig eine hohe biologische Aktivität. Das axial-chirale Dioncophyllin C aus *Triphyophyllum peltatum* (Pflanzenfamilie Dioncophyllaceae) besitzt beispielsweise neben einer hohen Antimalaria-Aktivität auch fungizide Eigenschaften.

2 Lipasen

Lipasen (*EC* 3.1.1.3) gehören zur Familie der Serin-Hydrolasen und sind in Eukaryonten und Prokaryonten weit verbreitet^[2,17,133]. Ihre natürliche Funktion ist der hydrolytische Abbau von Triglyceriden (Abb. 2, S. 2) zu freien Fettsäuren und Mono- bzw. Diglyceriden.

2.1 Vorkommen und Benennung von Lipasen

Lipasen werden üblicherweise nach dem Organismus in dem sie produziert werden benannt. Die Benennung ändert sich somit häufig, wenn neue Erkenntnisse über den Organismus gewonnen werden. Diese Tatsache mag für organisch arbeitende Chemiker, die sich mit Molekülen beschäftigen, deren Namen sich nur selten verändern, oft verwirrend wirken. Der Mikroorganismus, der die Lipase Amano P (ATCC 21808) produziert, wurde beispielsweise als *Pseudomonas fluorescens* klassifiziert, wenig später jedoch als *Pseudomonas cepacia* reklassifiziert. Veröffentlichungen vor 1990 verwenden deshalb die Bezeichnung *Pseudomonas fluorescens*. Zur Verwirrung halten auch heute noch einige Wissenschaftler an der früheren Bezeichnung *Pseudomonas fluorescens* fest und von Fluka wird die Lipase unter einem weiteren Pseudonym, als SAM-II, vertrieben. Unglücklicherweise wurde die Lipase ATCC 21808 in jüngster Zeit erneut in *Burkholderia cepacia* umbenannt; in der vorliegenden Arbeit wird sie jedoch durchgehend als Lipase aus *Pseudomonas cepacia* bezeichnet. Für weitere Verwirrung sorgt die Reklassifizierung der Lipase aus *Pseudomonas sp.* KWI-56^[69] ebenfalls in *Burkholderia cepacia*, die von Boehringer Mannheim unter dem Namen Chirazyme L-1 eingeführt wurde und vermutlich identisch zu der Lipase Amano PS ist. Einige der kommerziell erhältlichen Lipasen aus Pilzen, Säugetieren und Bakterien sind in Tabelle 1 (S. 4) aufgeführt.

2.2 Anwendungen von Lipasen

Lipasen sind der chemischen Industrie seit Jahrzehnten bekannt, fanden jedoch nur in kleinen Teilgebieten, beispielsweise in der Lebensmittelchemie zur Entwicklung spezifischer Duft- und Geschmacksstoffen^[14,32,62,167] von Käse, Anwendung.

Tab. 1. Die Einteilung einiger kommerziell erhältlicher Lipasen aufgrund der Homologie in der Proteinsequenz.

Klassifizierung	Protein-Größe	Beispiele
Lipasen aus Säugetieren:		
Pankreaslipasen	50 kDa	Porcine pancreatic lipase (PPL)
Lipasen aus Pilzen:		
<i>C. rugosa</i> Familie	60-65 kDa	<i>C. rugosa</i> Lipase (CRL) <i>Geotrichum candidum</i> Lipase
<i>Rhizomucor</i> Familie	30-35 kDa	<i>C. antarctica</i> Lipase (CAL-B) <i>Rhizomucor miehei</i> Lipase (RML) <i>Rhizomucor oryzae</i> Lipase (ROL) <i>Humicola lanuginosa</i> Lipase (HLL)
Weitere Lipasen		<i>Aspergillus niger</i> Lipase (ANL) <i>C. antarctica</i> Lipase (CAL-A) <i>C. lypolytica</i> Lipase (CLL)
Lipasen aus Bakterien:		
<i>P. cepacia</i> Familie	30-35 kDa	<i>P. cepacia</i> Lipase (PCL) <i>P. glumae</i> Lipase (PGL)

Durch die Entwicklung rekomanter DNA-Technologie stieg das wirtschaftliche Interesse an der Enzymklasse der Lipasen, weshalb heute verschiedenste Lipasen (Tab. 1) kommerziell erhältlich und nahezu allen modernen Waschmitteln^[16] zugesetzt sind^b.

Auch in der hydrolytischen und synthetischen (Glycerolyse, Veresterung, Alkohololyse und Umesterung) Weiterverarbeitung von Fetten und Ölen werden Lipasen eingesetzt. Sie sind jedoch im Vergleich zu den billigeren chemischen Prozessen nicht konkurrenzfähig.

Eine ökonomisch bedeutende Anwendung finden Lipasen auf dem Gebiet der organischen Synthese-Chemie. Besonders bewährt haben sie sich im Aufbau optisch aktiver Substanzen durch kinetische Racematspaltung (Abb. 4, S. 5) oder stereospezifische Synthese. Ein wichtiger Faktor für die Wirtschaftlichkeit Lipase-katalysierter Racematspaltungen ist die Rückgewin-

^bSie dienen hier zur Lösung von Fettverschmutzungen aus der Textilfaser und verhindern außerdem die erneute Anlagerung bereits gelöster Fette an die Faser. Als Beispiel sei auf die LipolaseTM verwiesen, die 1988 von NOVO/Nordisk auf den Markt gebracht wurde. Sie enthält die extrazelluläre Lipase aus dem Fungus *Humicola lanuginosa* und wird für den industriellen Maßstab aus *Aspergillus niger* exprimiert.

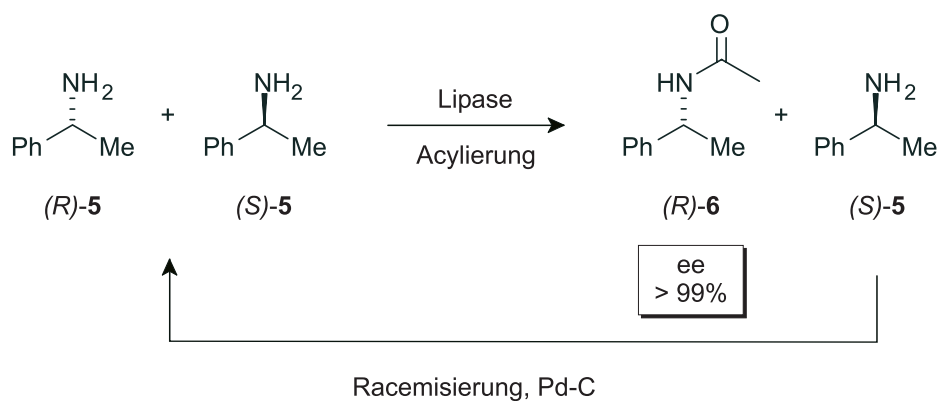


Abb. 4. Das Prinzip der *dynamischen kinetischen Racematspaltung* am Beispiel des *(R)/(S)*-Phenylethylamins basiert auf der enantioselektiven Lipase-katalysierten Acylierung des *(R)*-Enantiomers und Pd-C-katalysierten Racemisierung des *(S)*-Enantiomers.

nung des ungewünschten Enantiomers, welches durch chemische oder enzymatische Reaktion reracemisiert und erneut dem Reaktionsgemisch zugeführt wird^[124] (Abb. 4). Dieses Prinzip der Auftrennung eines Racemats wird als *dynamische kinetische Racemattrennung*^[15,144,147] bezeichnet.

2.3 Was macht ein Enzym zur Lipase?

Zur Klassifizierung eines hydrolytischen Enzyms als Lipase wurde lange Zeit die Erfüllung zweier Kriterien^[71,72] vorausgesetzt:

- Die dreidimensionale Struktur einer Lipase besitzt eine Schleife an der Oberfläche des Proteins – den sogenannten Deckel. Dieser Deckel bedeckt in der inaktiven Form das katalytische Zentrum und öffnet bei Grenzflächenkontakt den Zugang des Substrats zum aktiven Zentrum. Man unterscheidet zwischen offener (aktiver) und geschlossener (inaktiver) Form einer Lipase.
- Sobald Substrate der Lipasen, beispielsweise die Triacylglycerole, monomere Schichten, Micellen oder Emulsionen, d.h. Grenzflächen ausbilden, steigt die Aktivität einer Lipase rapide an. Dieses Phänomen wird auch als Grenzflächenaktivierung bezeichnet.

Die alleinige Berücksichtigung dieser beiden Kriterien stellt sich schnell als unzureichend heraus, wenn man die Anzahl der Lipasen berücksichtigt, die Ausnahmen dieser Regel darstellen. Lipasen werden heute allgemeiner als Carboxylesterasen bezeichnet, die die Hydrolyse langkettiger (Kettenlänge ≥ 10 Kohlenstoffatome) Acylglycerolester katalysieren. Enzyme, die die Hydrolyse von Acylglycerolestern mit einer Kettenlänge < 10 Kohlenstoffatomen spalten, werden hingegen als Esterasen (*EC* 3.1.1.1) bezeichnet.

Diese Einteilung besitzt jedoch keine Allgemeingültigkeit, da sich gezeigt hat, daß die meisten Lipasen ebenfalls hervorragende Katalysatoren in der Hydrolyse kurzkettiger Acylglycerolester darstellen.

2.4 α/β -Hydrolase Faltung

Obwohl bislang keinerlei signifikante Übereinstimmungen in der Aminosäure-Sequenz von Lipasen erkennbar sind, gehören alle in ihrer dreidimensionalen Struktur aufgeklärten Lipasen (z.B. die humane Pankreas^[173] Lipase und die fungale Lipase aus *Rhizomucor miehei*^[18,39]) einem gemeinsamen 3D-Struktur-Typ an. Aufgrund der diesen Enzymen gemeinsamen Eigenschaft – sie katalysieren den gleichen Reaktionstyp, die Hydrolyse – wird das gemeinsame Fal-

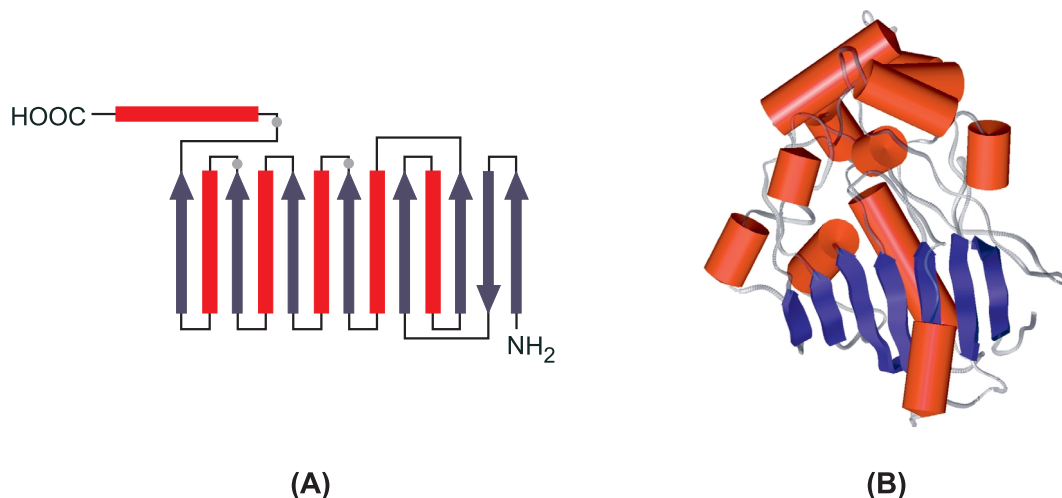


Abb. 5. (A) Schematische Darstellung der α/β -Hydrolase Faltung (rote Rechtecke kennzeichnen α -Helices, blaue Pfeile kennzeichnen β -Faltblätter); die topologischen Positionen der katalytischen Aminosäuren sind durch graue Kreise angezeigt; (B) α/β -Hydrolase Faltung am Beispiel einer Kristallstruktur der Lipase aus *C. rugosa* (PDB-Eintrag 1crl, α -Helices rot, β -Faltblätter blau).

tungsmuster als α/β -Hydrolase Faltung^[106,138] bezeichnet. Die Grundbausteine dieses Strukturtyps (Abb. 5, S. 6) sind acht nahezu parallel angeordnete β -Faltblätter (das zweite β -Faltblatt ist antiparallel angeordnet) im Zentrum der Hydrolase, die beidseitig von α -Helices umgeben sind. Alle α/β -Hydrolasen zeigen dabei eine identische Konnektivität der Bausteine untereinander.

Auch Kristallstrukturen verschiedenster hydrolytischer Enzyme, so z.B. der Haloalkan-Dehalogenasen^[53], der Acetylcholin-Esterasen^[150], der Dienlacton-Hydrolasen^[112] oder auch der Serin-Carboxypeptidasen^[94] weisen dieses spezifische Faltungsmuster auf.

Obwohl alle bislang bekannten Lipasen der α/β -Hydrolyse Faltung angehören, treten auch hier bestimmte strukturelle Abwandlungen auf. So besitzen die Lipasen aus *P. cepacia*, *P. glumae* und *Chromobacterium viscosum* nur sechs parallel angeordnete β -Faltblätter^[76,86,103], die Carboxylesterase aus *P. fluorescens* besitzt sieben β -Faltblätter und die Lipase aus *Streptomyces exfoliatus* besitzt gar ein neuntes antiparallel angeordnetes β -Faltblatt.

2.5 Die katalytische Triade

Hydrolytische Enzyme, die dem Strukturtyp der α/β -Hydrolase Faltung angehören, besitzen drei katalytisch essentielle Aminosäuren. Diese werden auch als katalytische Triade bezeichnet und treten in nachfolgender Anordnung in der Sequenz auf:

- Eine nucleophile Aminosäure: Serin, Cystein oder Aspartat,
- eine acide Aminosäure: Aspartat oder Glutamat und
- das katalytisch aktive Histidin.

Lipasen sind Serin-Hydrolasen, d.h. die katalytische Triade besteht aus Serin, Aspartat oder Glutamat und Histidin. Nicht nur die Anordnung dieser drei Aminoäuren in der Peptidkette, sondern auch deren Orientierung in der dreidimensionalen Proteinstruktur ist in allen bekannten Lipasen gleich.

Das nucleophile Serin steht inmitten eines hoch-konservierten Penta-Peptids: Gly-X-Ser-X-Gly^[106]. Diese Anordnung aus vorstehendem β -Faltblatt, Nucleophil und nachstehender α -Helix wird als *nucleophilic elbow*^[106,138], in Bezug auf die stark abgeknickte dreidimensionale

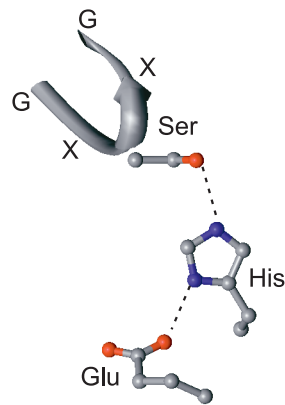


Abb. 6. Die drei katalytisch essentiellen Aminosäuren am Beispiel der Lipase aus *C. rugosa* (PDB-Eintrag 1crl) - Serin 209, Glutamat 341 und Histidin 449 sowie die Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen Serin-Histidin und Histidin-Glutamat. Angedeutet ist auch der *nucleophilic elbow* (Gly-X-Ser-X-Gly), der die nucleophile Aminosäure Serin in eine optimale Position bringt.

Anordnung der Strukturelemente bezeichnet. Die abgewinkelte Struktur mit der nucleophilen Aminosäure im Zentrum führt zu einer optimalen Ausrichtung des Nucleophils, das somit sowohl für das katalytische Histidin als auch für das Substrat frei zugänglich ist. Zudem wird der intermediär gebildete tetrahedrale Zustand, ein ionisches Intermediat der Hydrolyse, optimal durch Aminosäuren der Oxyanionen-Bindetasche stabilisiert.

Die Position der katalytischen aciden Aminosäure - Aspartat oder Glutamat - befindet sich im Prototypen der α/β -Hydrolase Faltung nach dem siebten β -Faltblatt^[106] und ist in der dreidimensionalen Struktur so ausgerichtet, daß eine Wasserstoff-Brückenbindung zum katalytischen Histidin ausgebildet und Elektronendichte abgezogen werden kann. Die topologische Position der aciden Aminosäure ist jedoch vergleichsweise variabel und tritt z.B. in der humanen Pankreas Lipase bereits nach dem sechsten β -Faltblatt^[173] auf. Es gibt auch Variationen, in denen die Wasserstoff-Brückenbindung zum Histidin durch ein Wasser-Molekül^[103] vermittelt wird. Die letzte der drei Aminosäuren der katalytischen Triade befindet sich in einer Schleife nach dem achten β -Faltblatt, wobei Länge und Konformation der Schleife variabel sind^[106].

Die katalytisch bedeutende Oxyanionen-Bindetasche wird von den Amid-Funktionen zweier Aminosäuren des Protein-Grundgerüsts gebildet. Eine dieser beiden Aminosäuren befindet sich in der Sequenz direkt hinter dem katalytischen Serin, die Position der zweiten Aminosäure befindet sich am Ende des dritten β -Faltblatts^[80,88,136]. Sie dienen zur Stabilisierung der

im Katalyse-Mechanismus (Kap. 2.6) gebildeten ionischen Zwischenstufen (erstes und zweites tetrahedrales Intermediat).

2.6 Der Katalyse-Mechanismus der Hydrolyse

Der Mechanismus Lipase-katalysierter Hydrolysen (Abb. 7, S. 10) ist mit dem der Serin-Proteasen vergleichbar^[44]: Das Substrat (blau) gelangt ins katalytische Zentrum der Lipase und wird am Carbonyl-Kohlenstoffatom nucleophil durch das Seitenketten-Sauerstoffatom des katalytischen Serins angegriffen (a). Das entstehende Oxyanion der ersten tetrahedralen Zwischenstufe (B) wird durch Rückgrat-Atome der beiden Aminosäuren stabilisiert, die die Oxyanion-Tasche bilden. Der Zusammenbruch dieses Intermediates führt zur Abspaltung des Alkohols aus der Bindungstasche (b) und das Acylenzym (C) verbleibt. Im Hydrolyseschritt (c) greift nun Wasser oder ein anderes Nucleophil wie z.B. ein Alkohol (ebenfalls in blau dargestellt) das Acylenzym, unter Ausbildung des zweiten tetrahedralen Intermediates (D), an. Dessen Zusammenbruch (d) führt dann zur Abspaltung der Säure und zur Regeneration der freien Lipase (A). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist der Zusammenbruch des ersten tetrahedralen Intermediates (b)^[47].

2.7 Grenzflächenaktivierung

Lipasen weisen eine deutlich höhere Aktivität auf, sobald sie mit Lipid-Wasser Grenzflächen in Kontakt treten^[130]; dieses Phänomen wird als Grenzflächenaktivierung bezeichnet. Hervorgerufen wird diese durch eine Konformationsänderung der dreidimensionalen Lipase-Struktur. Ein Vergleich von Kristallstrukturen freier und inhibierter Lipasen aus *C. rugosa* zeigt (Abb. 8, S. 11), daß das Protein-Rückgrat der freien und inhibierten Lipase in den überlagerten Röntgenkristallstrukturen über weite Bereiche nahezu identisch ist und sich nur ein helicales Sekundärstrukturelement signifikant verändert. Dieser sogenannte Deckel blockiert in der inaktiven (geschlossenen) Konformation den Zugang eines Substrats zum katalytischen Zentrum. Abbildung 8 (S. 11) verdeutlicht, daß der Deckel in der geschlossenen Konformation (grün) die katalytische Triade (blau) verdeckt und somit für Substrate unzugänglich macht. In der Röntgenkristallstruktur der aktiven Konformation mit substratanalogen Inhibitor (nicht dargestellt)

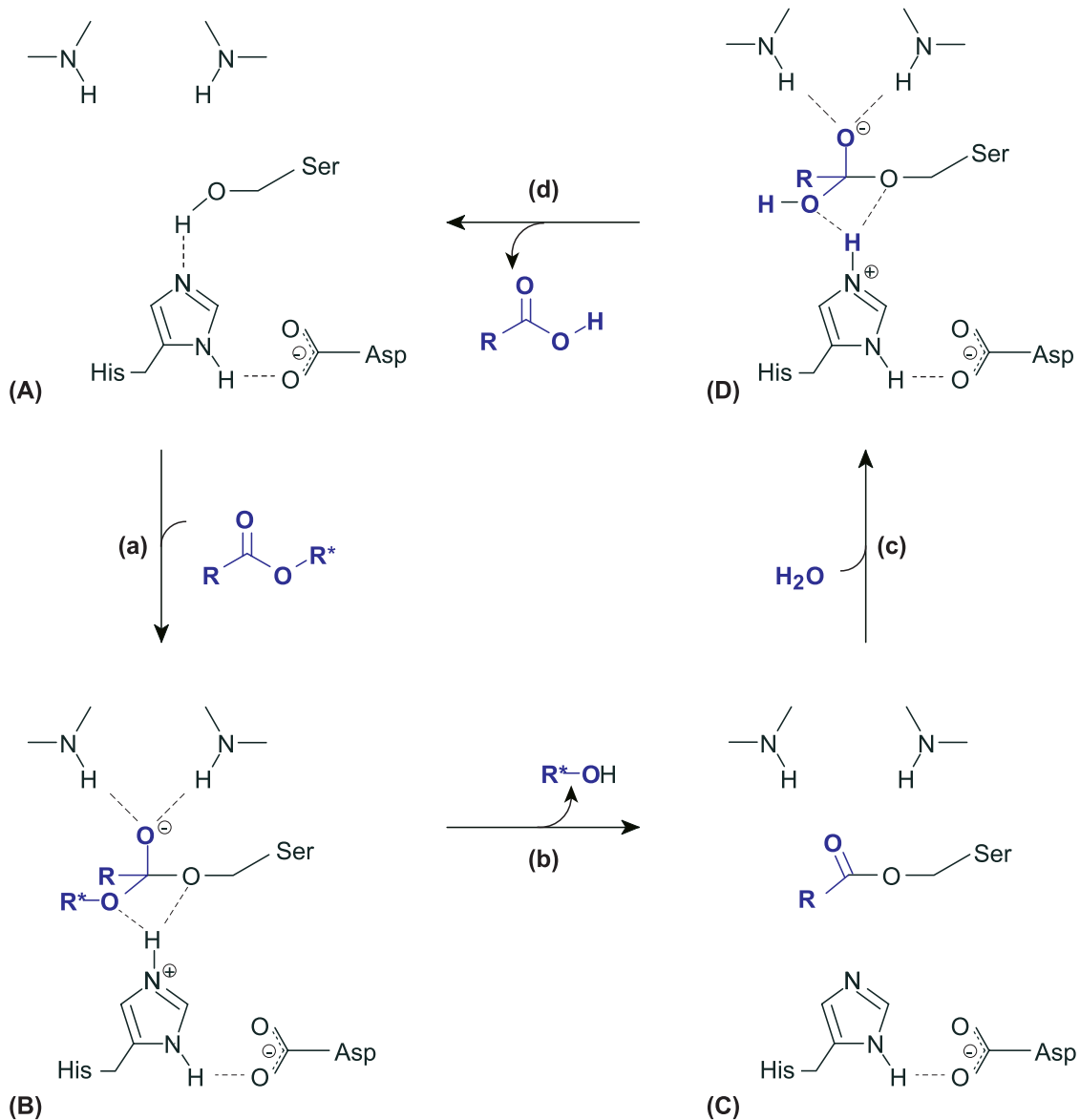


Abb. 7. Die Lipasen-katalysierte Hydrolyse eines Esters: (a) Nucleophiler Angriff des Seitenketten-Sauerstoffs des aktivierten Serins auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrats; das Oxyanion im ersten tetrahedralen Intermediat (B) wird durch mindestens zwei Amid-Gruppen des Protein-Rückgrats stabilisiert. (b) das katalytische Histidin überträgt ein Proton auf den abzuspaltenden OH-funktionalisierten Teil des Substrats; im verbleibenden Acylenzym ist die Säureseite über das Seitenketten-Sauerstoffatom des aktiven Serins verestert. (c) Ein aktiviertes Wasser-Molekül greift das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Acylenzyms an; das gebildete Oxyanion des zweiten tetrahedralen Intermediats (D) wird analog zu (B) stabilisiert; (d) Das katalytische Histidin überträgt ein Proton zum Seitenketten-Sauerstoff des Serins und die Esterbindung zwischen Serin und Säureseite wird gebrochen; die freie Carbonsäure verläßt das Enzym und regeneriert hierdurch die Lipase; Substrat und Wasser-Molekül sind jeweils in blau dargestellt.

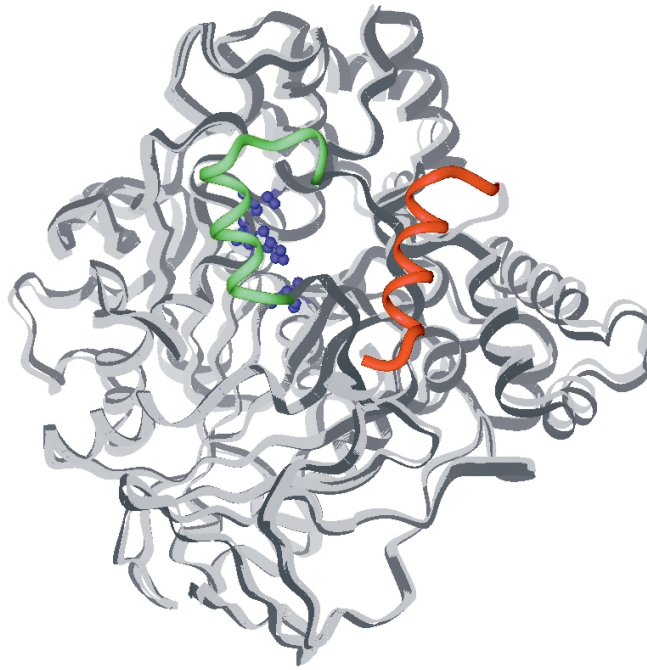


Abb. 8. Dargestellt sind die $C\alpha$ -Atome zweier überlagerter Kristallstrukturen (grau und schwarz) einer Lipase aus *C. rugosa* in offener (Deckel in rot) und geschlossener (Deckel in grün) Konformation. Deutlich zu erkennen die gute Übereinstimmung der beiden Kristallstrukturen, mit Ausnahme des Deckels jedoch, welcher sich in der geschlossenen Konformation vor dem katalytischen Zentrum (Atome der katalytischen Triade sind in blau dargestellt) befindet und es somit unzugänglich für Substrate macht.

gibt der Deckel (rot) das katalytischen Zentrum frei; diese Konformation wird deshalb auch als aktive (offene) Form der Lipase bezeichnet.

Diese Konformationsänderung, sowie die verminderte Enzymaktivität gegenüber Substraten in wässrigen Systemen im Vergleich zur Enzymaktivität an hydrophoben Grenzflächen, z.B. an einem Öltröpfchen, verdeutlicht das Prinzip der Lipid-induzierten Grenzflächenaktivierung von Lipasen.

In der Lipase aus *C. rugosa* ist der Deckel eine einzelne α -Helix bestehend aus 11 Aminosäuren. Es sind jedoch andere Beispiele bekannt, in denen zwei Helices^[76,136] oder auch eine Schleife den Deckel^[61] bilden. Ein weiterer Effekt der Konformationsänderung des Deckels ist, daß in einigen Lipasen eine der beiden das Oxyanion stabilisierenden Aminosäuren erst in eine geeignete Position zur Ausbildung einer Wasserstoff-Brückenbindung gebracht wird.

Eine Ausnahme stellt die Lipase aus *P. aeruginosa* dar; obwohl sie einen Deckel besitzt, zeigt sie keinerlei Grenzflächenaktivierung.

2.8 Substratbindestellen in Lipasen

In umfangreichen kristallographischen Untersuchungen wurden Inhibitor-Lipase-Komplexe untersucht, die das erste tetrahedrale Intermediat der Hydrolyse (Abb. 7, S. 10) nachahmen sollten. Zu den ersten Komplexen gehörten die Röntgenkristallstrukturen der Lipasen aus *R. miehei* mit einem Phosphonat-Inhibitor^[40] (C6), aus *C. rugosa* mit einem langkettigen (C12) Sulfonyl-Inhibitor^[61] sowie die humane Pankreas Lipase, ebenfalls komplexiert mit einem langkettigen Phosphonat-Inhibitor^[46] (C11).

Die beiden ersten Strukturen mit jeweils einer der beiden enantiomeren Formen eines Substratanalogen Inhibitors – (*R*)- und (*S*)-Menthyl-Hexyl-Phosphonat – in der Lipase aus *C. rugosa* stammten von Cygler *et al.*^[37] (PDB-Eintrag 1lpm und 1lps). Diese Strukturen ermöglichten erstmals einen Einblick in die molekularen Grundlagen der Stereopräferenz. Cygler *et al.* führten die beobachtete Stereopräferenz auf eine Wasserstoff-Brückenbindung des Protons am katalytischen Histidin (N ϵ 2 des Imidazols) zum Alkohol-Sauerstoffatom des Substrats zurück. Diese Wasserstoff-Brücke ist im Komplex des schnell umgesetzten (*R*)-Enantiomers gut ausgebildet (Abstand N ϵ 2 – O $_{alc}$ = 3.1 Å), wohingegen sie im komplexierten (*S*)-Enantiomer nicht ausgebildet werden kann (Abstand N ϵ 2 – O $_{alc}$ = 4.4 Å). 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.

Einen Einblick in die Substratbindestelle einer Lipase soll am Beispiel der Lipase aus *P. cepacia* gegeben werden (Abb. 9, S. 13). Die Kristallstruktur (PDB-Eintrag 4lip) enthält einen kovalent gebunden substratanalogen Inhibitor (Butyl-Phosphonat). Die Bindestelle besteht aus einem Bereich, der die Fettsäure des Esters bindet, sowie aus einem weiteren Bereich der den OH-funktionalen Teil des Substrates bindet.

Insgesamt konnten vier spezifische Bindetaschen identifiziert werden: die Oxyanion-Bindetasche und drei Taschen die zur Unterbringung der *sn*-1, *sn*-2 und *sn*-3 Fettsäureketten herangezogen werden. Eine spezifische Klassifizierung der unterschiedlichen Bindetaschen der Lipase aus *P. cepacia* erlaubt die Röntgenkristallstruktur dieser Lipase komplexiert mit einem den natürlichen Substraten der Lipasen analogen Inhibitor – R $_C$ -(R $_P$,S $_P$)-1,2-dioctylcarbonyl-glycero-3-

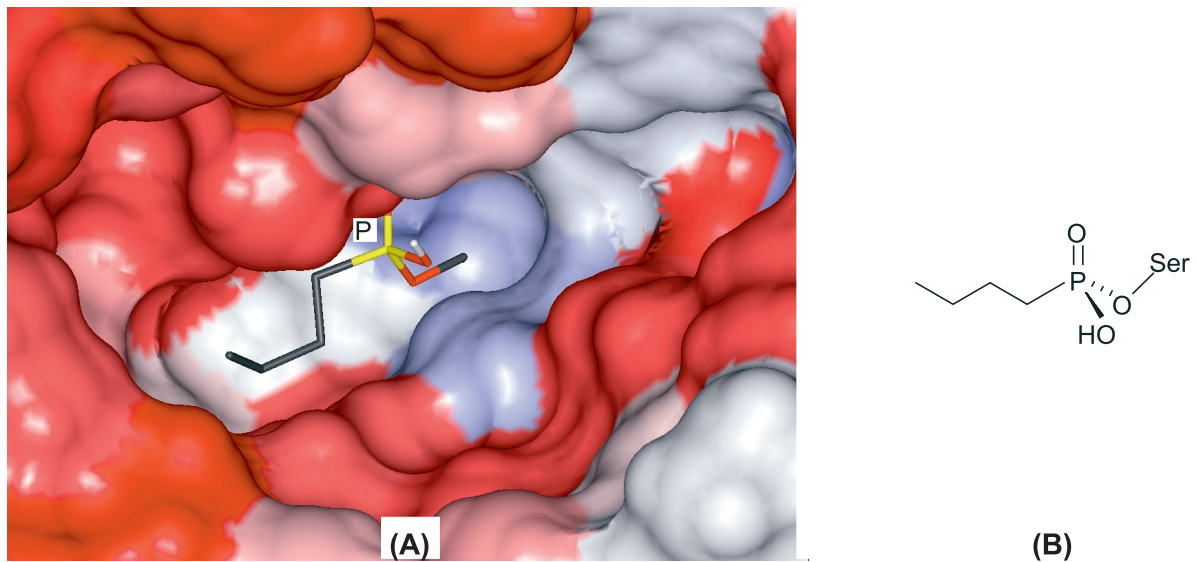


Abb. 9. (A) Die Substratbindestelle der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* mit substratanalogem Inhibitor Butyl-Phosphonat. Die Oberfläche ist entsprechend der elektrostatischen Eigenschaften eingefärbt (rot – hydrophob, blau – polar). (B) Schematische Darstellung des Inhibitors in der Bindetasche sowie die kovalente Bindung zum katalytischen Serin.

O-p-nitrophenyl-octyl-Phosphonat (TC8)^[88,89]. Abbildung 10 (S. 14) enthält eine schematische Ansicht der Gliederung dieser Bindestelle für die *sn*-1, *sn*-2 und *sn*-3 Substituenten der Fette.

Die Fettsäurebindestellen zwischen unterschiedlichen Lipasen variieren stark; so besitzt die Lipase aus *C. rugosa* beispielsweise einen hydrophoben Tunnel, der tief ins Innere der Lipase reicht und lang genug ist für eine C18-Fettsäurekette. Andere Lipasen hingegen weisen lediglich hydrophobe Vertiefungen an der Lipasenoberfläche auf.

Im Gegensatz zu den Fettsäure-Bindestellen sind die Alkohol-Bindetaschen in unterschiedlichen Lipasen vergleichbar. Sie bestehen aus einer hydrophoben, solvens-zugänglichen Oberfläche und einer kleineren, hydrophileren Bindetasche, die an der nicht solvens-zugänglichen Rückwand der Lipase verläuft.

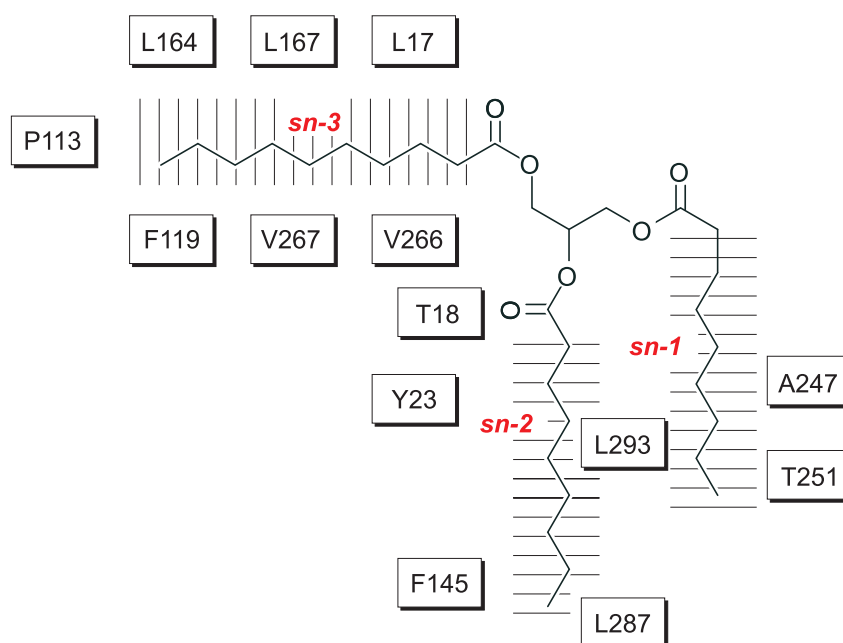


Abb. 10. Schematische Ansicht der Bindestelle der Lipase aus *P. cepacia*. Die Bindetaschen für die *sn*-1, *sn*-2 und *sn*-3 Fettsäureketten sowie die zugehörigen Aminosäuren dieser Bindetaschen sind gekennzeichnet.

2.9 Enantioselektive Lipase-katalysierte Reaktionen

Lipasen katalysieren zahlreiche enantioselektive Synthesen unterschiedlichster Substratklassen^[15,29,51,54,82,83,96,100,129,135,140,155,176]. Einige ausgewählte Beispiele enantioselektiver Lipase-katalysierter Reaktionen, beginnend mit den sekundären Alkoholen, sollen deshalb im Nachfolgenden vorgestellt werden.

2.9.1 Sekundäre Alkohole

Trotz des sehr breiten Substratspektrums von Lipasen hat sich die Substratklasse der sekundären Alkohole in der kinetischen Racematspaltung und der stereoselektiven Synthese besonders bewährt. Sekundäre Alkohole gehören somit zu den bestuntersuchten Substraten in Lipase-katalysierten Umsetzungen.

Aufgrund experimenteller Beobachtungen konnte eine empirische Regel^[82] zur Vorhersage der experimentell zu erwartenden Stereopräferenz (Abb. 11, S. 15) in Lipase-katalysierten Umset-

zungen sekundärer Alkohole erstellt werden. Diese Regel basiert ausschließlich auf dem Größenvergleich der beiden Substituenten am Stereozentrum des chiralen sekundären Alkohols und legt die Vermutung nahe, daß die Enantiomerendifferenzierung durch Lipasen in erster Linie auf dem relativen Größenunterschied der beiden Substituenten basiert. In der Tat konnte diese Vermutung durch gezielte Modifikation (Verkleinerung oder Vergrößerung) der Substituenten, die zur erwartenden Steigerung der experimentellen Enantioselektivität führte, belegt werden^[127]. Es gelang jedoch nicht, eine allgemeingültige Regel aufzustellen, die eine Vorhersage der Enantioselektivität alleine auf Basis des Größenunterschieds der Substituenten erlaubt.

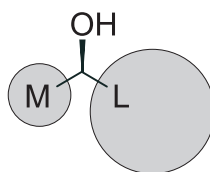


Abb. 11. Eine empirische Regel zur Vorhersage der Stereopräferenz in Lipase-katalysierten Umsetzungen chiraler sekundärer Alkohole; *M* – mittlerer Substituent; *L* – großer Substituent. Der Ester des dargestellten Enantiomers reagiert schneller in Lipase-katalysierten Hydrolysen; in entsprechenden Veresterungen reagiert das dargestellte Enantiomer des sekundären Alkohols schneller. Das Substrat alleine gibt jedoch keine Information über die experimentell zu erwartende Stereoselektivität.

Obwohl sterische Effekte die entscheidende Rolle in der Festlegung der Stereopräferenz spielen, können sich auch elektronische Effekte auf Unterschiede in der Hydrolysegeschwindigkeit der beiden Enantiomere und somit auf die Enantioselektivität der Gesamtreaktion auswirken. So setzt die Lipase B aus *C. antarctica* 3-Nonanol mit hoher Enantioselektivität ($E > 300$) um, wohingegen 1-Brom-2-Octanol (die Größe der beiden mittleren Substituenten $-CH_2CH_3$ und $-CH_2Br$ ist vergleichbar) nur mit niedriger Enantioselektivität ($E = 7.6$) umgesetzt wird^[107,127] (Abb. 12, S. 16); der elektronische Effekt des Broms vermindert in diesem Fall die zu beobachtende Enantioselektivität beträchtlich.

Trotz gezielter Untersuchungen der sterischen und elektronischen Substituenten-Effekte auf die Enantioselektivität in Lipase-katalysierten Reaktionen läßt sich keine allgemeingültige Regel zur quantitativen Vorhersage der zu erwartenden Enantioselektivität erstellen. Dies mag in der Tatsache begründet sein, daß die Entscheidung über Stereopräferenz auf dem molekularen, na-

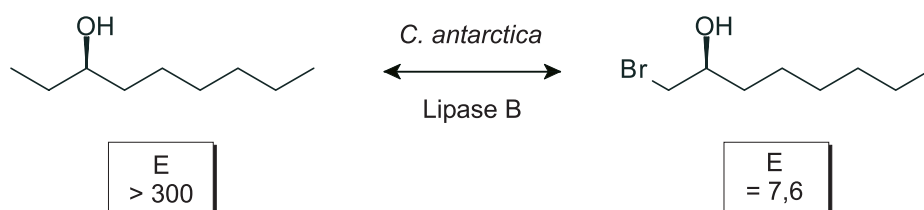


Abb. 12. Trotz gleicher sterischer Ansprüche der mittleren ($-CH_2CH_3$ und $-CH_2Br$) und des großen Substituenten ($-hexyl$) von 3-Nonanol und 1-Brom-2-Octanol variieren die inhärenten Enantioselektivitäten in der kinetischen Racematspaltung durch die *C. antarctica* Lipase B stark. Eine allgemeingültige Regel zur quantitativen Vorhersage der Enantioselektivität aufgrund der sterischen und elektronischen Effekte der Substituenten ist nicht möglich.

hezu unveränderlichen Grundriß der Lipase, d.h. beispielsweise der unterschiedlichen Größe von Bindetaschen, beruht und als konstanter Faktor somit vernachlässigt werden kann, während die Selektivität durch spezifische Substrat-Lipase Wechselwirkungen und geringe Konformationsänderungen der Lipase beeinflusst wird. Ein Modell zur Vorhersage der experimentell zu erwartenden Stereoselektivität kann demnach nicht ausschließlich auf der Betrachtung des Substrats basieren, sondern muß das konkrete Zusammenspiel von Substrat und Lipase berücksichtigen.

Strukturen übergangszustandähnlicher Inhibitor-Komplexe bestätigen die empirische Regel (Abb. 11, S. 15) zur Vorhersage der Stereopräferenz. In Abbildung 13 (S. 17) ist das schneller umgesetzte Enantiomer des Phosphonat-Esters (1*R*)-Menthylhexyl-Phosphonat als kovalentes Intermediat eines *C. rugosa* Lipase-Komplexes dargestellt. Der große Rest des OH-funktionalen Teils der Substrate befindet sich hierbei in einer großen, hydrophoben (rot) und der mittlere Rest in einer kleineren Bindungstasche (grün) der Lipase. Die katalytisch wichtige Wasserstoff-Brückenbindung zwischen protoniertem Imidazol und Sauerstoffatom des Alkohols kann ohne Einschränkungen ausgebildet werden. Die Positionierung der beiden Substituenten M und L gilt auch für das entsprechend langsam umgesetzte Enantiomer. Der gravierende Unterschied besteht jedoch darin, daß die katalytisch essentielle Wasserstoff-Brückenbindung in diesem Komplex aufgrund sterischer Wechselwirkungen nicht ausgebildet werden kann, wodurch dessen Umsetzung unterbunden wird. Diese Beobachtung gibt die experimentell beobachtete Stereopräferenz korrekt wieder.

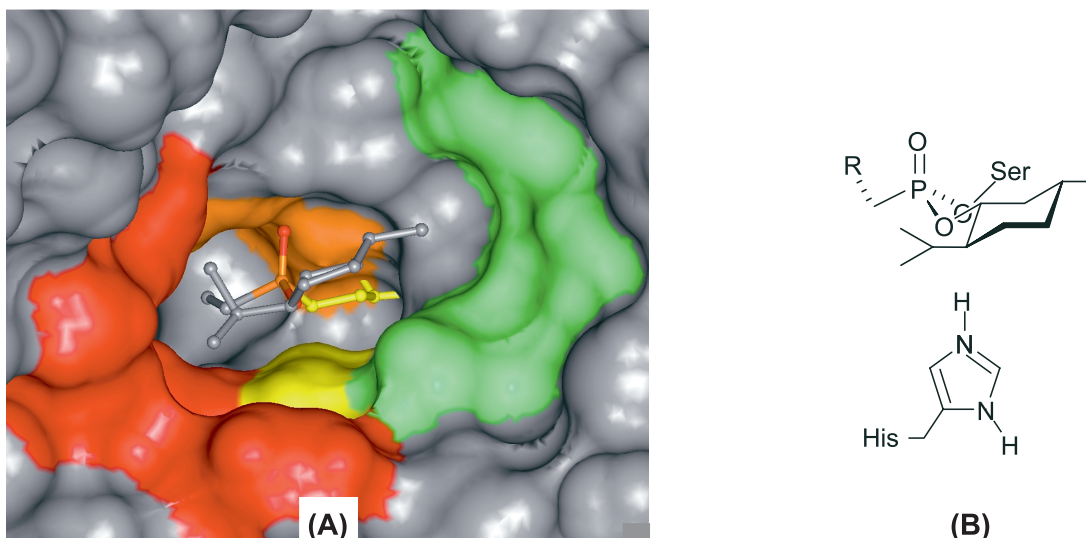


Abb. 13. (A) Berechnete Oberfläche der Bindestelle der Lipase aus *C. rugosa*. Die Oberfläche des katalytischen Histidins sowie die Atome des katalytischen Serins sind gelb gekennzeichnet. Die Oberflächen der Reste der großen Bindetasche sind in rot, die der kleinen in grün dargestellt. Die Oberfläche der Oxyanion-stabilisierenden Bindestelle ist orange gefärbt. (B) Schematische Darstellung des Inhibitors in der Bindetasche sowie die Ausrichtung des katalytischen Histidins und Serins. Die räumliche Nähe des Histidins zum Alkohol-Part des Substrats ist eindeutig zu erkennen.

Es läßt sich also zusammenfassen: der über die Stereopräferenz entscheidende Mechanismus für sekundäre Alkohole basiert auf dem konstanten Grundriß der Lipase und eine Vorhersage der Stereopräferenz kann deshalb meist ohne eine konkrete Betrachtung der Lipase-Bindestelle auskommen. Die Stereoselektivität basiert hingegen auf spezifischen Substrat-Lipase-Wechselwirkungen und geringen Konformationsänderungen in der Protein-Struktur. Die Berücksichtigung der Lipase-Struktur zur Vorhersage der Stereoselektivität ist somit eine unabdingbare Voraussetzung.

Die Frage nach der geeigneten Wahl einer Lipase zu einer effizienten Racemattrennung eines spezifischen Substrats bleibt bislang ebenfalls auf eine bloße Faustregel beschränkt. So zeigt beispielsweise ein Vergleich der Aminosäuren, die die mittlere Bindetasche bilden, daß Reste der Lipase aus *C. rugosa* vergleichsweise klein sind (Glu, Ser, Gly), wohingegen sich in der entsprechenden Bindetasche der *P. cepacia* Lipase große Reste (His und Leu) befinden. Bei vergleichbarer Position der Atome des Protein-Rückgrats führt dies zu einer größeren Bindetasche in der Lipase aus *C. rugosa*. Die Lipase aus *C. rugosa* sollte sich deshalb besonders zur Hydrolyse von Estern sperriger und tertiärer Alkohole eignen, was in der Tat experimentell zu beobachten ist.

2.9.2 Primäre Alkohole

Die inhärente Enantioselektivität von Lipasen gegenüber primären Alkoholen ist im Allgemeinen geringer als gegenüber sekundären Alkoholen. Häufig eingesetzte Lipasen zur kinetischen Racemattrennung primärer Alkohole sind die Schweine-Pankreas Lipase und die Lipase aus *P. cepacia*^[171]. Auch für primäre Alkohole läßt sich die experimentell zu erwartende Stereopräferenz mittels einer empirischen Regel^[171] (Abb. 14) vorhersagen, die jedoch weniger zuverlässig ist als die entsprechende Regel für sekundäre Alkohole (Abb. 11, S. 15). Im Vergleich zu den sekundären Alkoholen wird bei primären Alkoholen das Enantiomer mit der entgegengesetzten Konfiguration am Stereozentrum bevorzugt umgesetzt^c.

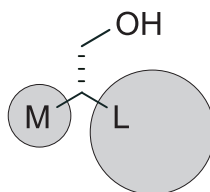


Abb. 14. Eine empirische Regel zur Vorhersage der Stereopräferenz in Lipase-katalysierten Umsetzungen chiraler primärer Alkohole; *M* – mittlerer Substituent; *L* – großer Substituent. Der Ester des dargestellten Enantiomers reagiert schneller in Lipase-katalysierten Hydrolysen; in entsprechenden Veresterungen reagiert das dargestellte Enantiomer des primären Alkohols schneller. Es ist zu beachten, daß im Vergleich zu sekundären Alkoholen das entgegengesetzt konfigurierte Enantiomer bevorzugt wird.

2.9.3 Triglyceride

Triglyceride sind die natürlichen Substrate der Lipasen. Triglyceride mit zwei identischen Substituenten in *sn*-1 und *sn*-3 Position sind prochiral (Abb. 15, S. 19), wobei Lipasen zwischen diesen beiden Positionen unterscheiden^[12,95]. Die selektive Spaltung einer Esterbindung in *sn*-1 oder *sn*-3 Position führt zu den entsprechenden 1, 2- und 2, 3-Diglyceriden und unter zusätzlicher Spaltung der Esterbindung in *sn*-2 Position zu 1- oder 3- Monoglyceriden.

^cDie funktionelle $-OH$ Gruppe in Abbildung 11 (S. 15) weist in der Regel für sekundäre Alkohole nach vorne, wohingegen die funktionelle Gruppe der primären Alkohole $-CH_2OH$ in Abbildung 14 (S. 18) nach hinten weist.

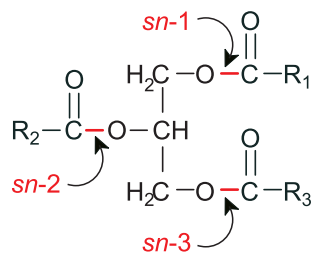


Abb. 15. Die *sn*-1, *sn*-2 und *sn*-3 Positionen in Triacylglyceriden; die Positionen *sn*-1 und *sn*-3 sind prochiral.

In welcher Position das Triglycerid bevorzugt gespalten wird hängt stark von der eingesetzten Lipase ab^[125]. Beispielsweise bevorzugen die Lipasen aus *Pseudomonas sp.*, *R. mihei* und *C. rugosa* die *sn*-1 Position. Andere Lipasen hingegen variieren die Position in Abhängigkeit der Substituenten des Triglycerides.

2.9.4 Analoga sekundärer Alkohole

Tertiäre Alkohole.

Nur wenige Lipase besitzen die Fähigkeit, tertiäre Alkohole zu spalten^[73,74]. Wie für sterisch anspruchsvolle Substrate wie tertiäre Alkohole zu erwarten eignet sich vor allem die Lipase aus *C. rugosa* aufgrund der im Vergleich zu anderen Lipasen größeren Alkohol-Bindetasche zur kinetischen Racemattrennung. Auch für die Lipase aus *R. mihei* sind Beispiele für die Hydrolyse tertiärer Alkohole mit moderater Enantioselektivität bekannt^[9].

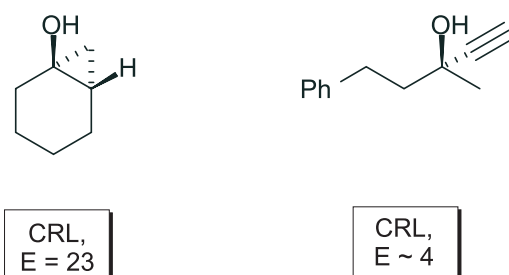


Abb. 16. Beispiele Lipasen-katalysierter enantioselektiver Reaktionen tertiärer Alkohole. Gezeigt sind die jeweils schnell umgesetzten Enantiomere.

Amine.

Amine des Typs $NH_2CHR_1R_2$ sind isosterisch (strukturnalog) zu sekundären Alkoholen. Ihre Umsetzungen (Veresterungen) mit Lipasen verlaufen im Allgemeinen langsamer als die der sekundären Alkohole, weisen aber z.B. für die Lipase B aus *C. antarctica*, und die Lipasen aus *P. cepacia* und *P. aeruginosa* dennoch hohe Enantioselektivitäten auf. Katalysiert wird lediglich eine Veresterung der Amine, die Hydrolyse der im Vergleich zu Estern stabileren Amidbindung wird nicht beobachtet. Amine^[142] gehorchen ebenfalls der empirischen Regel (Abb. 11, S. 15) zur Vorhersage der Stereopräferenz sekundärer Alkohole. Auch racemische Gemische von chiralen Aminen des Typs NHR_1R_2 lassen sich effektiv durch Lipasen trennen (Abb. 17).

Thiole

Primäre und sekundäre Thiole, die einfachsten Schwefelanaloga der primären und sekundären Alkohole, eignen sich in ähnlicher Weise wie die Alkohole selbst für Lipase-katalysierte Hydrolysen und Veresterungen (Abb. 17). Acylierungs-Reaktionen sind nicht möglich, da die Acyl-Donor-Eigenschaften des Acylenzyms (Abb. 7, S. 10) zu schwach für eine effektive Acylierung des Thiols sind.

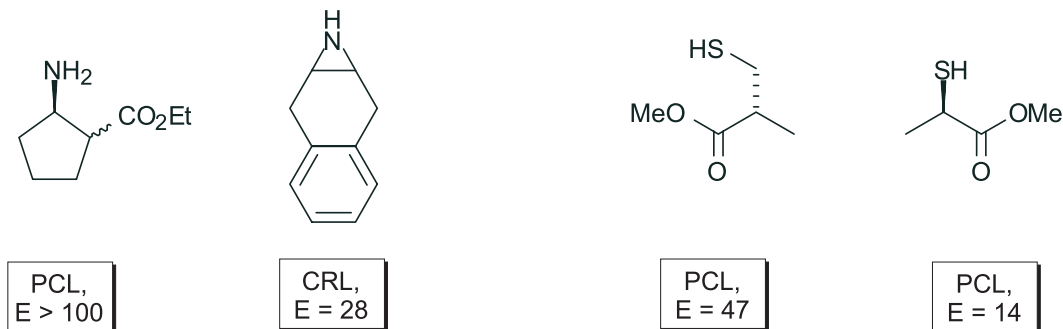


Abb. 17. Beispiele Lipasen-katalysierter enantioselektiver Reaktionen primärer und sekundärer Amine und Thiole. Gezeigt sind die jeweils schnell umgesetzten Enantiomere.

Axial-Chiralität.

Lipasen sind nicht nur in der Lage zentrochirale Verbindungen effektiv zu trennen, sondern eignen sich ebenfalls zum atropselektiven Aufbau axial-chiraler Verbindungen (Abb. 3, S. 2 und Abb. 18, S. 21). Die hohe biologische Aktivität vieler enantiomerenreiner axial-chiraler Verbindungen zeigt neue Herausforderungen Lipasen-katalysierter Umsetzungen auf.

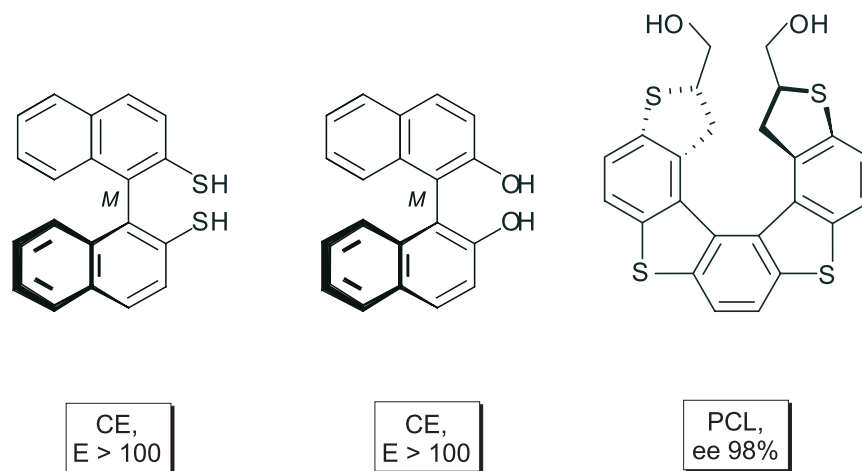


Abb. 18. Beispiele zum atropselektiven Aufbau axial-chiraler Verbindungen. Gezeigt sind die jeweils schnell umgesetzten Enantiomere.

2.10 Stereoselektivität

Während einer kinetischen Racematspaltung verändert sich der Enantiomerenüberschuß im eingesetzten Ausgangsmaterial und im Produkt. Der Enantiomerenüberschuß berechnet sich hierbei nach folgender Gleichung:

$$\%ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} * 100. \quad (1)$$

Zum Zeitpunkt $t = 0$ einer kinetischen Racematspaltung ist der Gehalt der beiden Enantiomere im eingesetzten Ausgangsmaterial gleich und es gilt:

$$[R]_0 = [S]_0. \quad (2)$$

Der Enantiomerenüberschuß ist demnach $ee = 0$. Im Laufe einer optimalen kinetischen Racematspaltung wird nun eines der beiden Enantiomere zum Produkt umgesetzt, wohingegen das andere Enantiomere unreaktiv ist. Am Ende dieser Reaktion ($t = x$) setzt sich das Ausgangsmaterial folgendermaßen zusammen:

$$[R]_0 = [R]_x \quad \text{und} \quad [S]_x = 0. \quad (3)$$

Für den Enantiomerenüberschuß gilt demnach $ee = 1$.

Im nicht-optimalen Fall einer kinetischen Racematspaltung werden beide Enantiomere umgesetzt, wenngleich auch mit unterschiedlichen Reaktionsraten. Die Unterschiede in den Reaktionsraten resultieren in Abhängigkeit vom Zeitpunkt (t) der Gesamtreaktion in Enantiomerenüberschüssen zwischen Null und Eins.

Ein Vergleich der Enantiomerenüberschüsse zweier getrennt verlaufender kinetischer Racematspaltungen nach Gleichung (1) macht deshalb nur zu exakt gleichen Umsetzungsraten beider Reaktionen Sinn. Da Gleichung (1) keinen expliziten Term enthält, der die Umsetzung c berücksichtigt, ist sie ungeeignet zum Vergleich der optischen Reinheit zweier getrennt verlaufender kinetischer Racematspaltungen.

Zu diesem Zweck wurden die Gleichungen (4)-(6) entwickelt, die die Berechnung der inhärenten Enantioselektivität E ^[30,31,140] ermöglichen. Die inhärente Enantioselektivität ist zudem während des gesamten Reaktionsverlaufes konstant und hängt lediglich von der Umgebung des Systems ab.

$$E = \frac{\ln [1 - c(1 + ee_p)]}{\ln [1 - c(1 - ee_p)]} \quad (4)$$

$$E = \frac{\ln [(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln [(1 - c)(1 + ee_s)]} \quad (5)$$

$$E = \frac{\ln \left[\frac{1 - ee_s}{1 + (ee_s/ee_p)} \right]}{\ln \left[\frac{1 + ee_s}{1 + (ee_s/ee_p)} \right]} \quad (6)$$

Zur Berechnung der inhärenten Enantioselektivität müssen zwei der drei Variablen gemessen werden; ee_s ist die optische Reinheit des Ausgangsmaterials, ee_p die des Produkts und c entspricht dem Grad der Umsetzung. Da sich die optischen Reinheiten oft genauer als der Grad der Umsetzung bestimmen lassen wird weitgehend Gleichung (6) zur Bestimmung der inhärenten Enantioselektivität eingesetzt. Insgesamt drei Ausnahmen erfordern eine genauere Betrachtung

enzymkatalysierter Reaktionen und Abwandlungen in den Gleichungen (4)-(6): multienzymatische Reaktionen, Enzym-Inhibition durch Reaktions-Produkte und reversible Reaktionen.

Bei Umsetzungen mit hohen Enantioselektivitäten ($E \approx 100$) sinkt die Genauigkeit des Ergebnisses, da E eine logarithmische Funktion der optischen Reinheit darstellt. Geringe Ungenauigkeiten in der Messung der optischen Reinheit führen so bei hohen Enantioselektivitäten zu großen Ungenauigkeiten von E . Es ist aus diesem Grund nur in seltenen Fällen sinnvoll eine inhärente Enantioselektivität > 100 quantitativ genauer zu spezifizieren.

Die Variablen ee_s , ee_p und c sind über Gleichung (7) miteinander verknüpft:

$$\%c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} * 100. \quad (7)$$

2.11 Aktivität

Die inhärente Enantioselektivität einer Reaktion läßt sich auch durch das Verhältnis der Umsetzungsraten der Enantiomere nach einem Reaktionsverlauf zweiter Ordnung bestimmen (Michaelis-Menten Kinetik^[97]). Die Umsetzungsraten der Enantiomere A und B beziehen sich hierbei auf die entsprechenden k_{kat} - und K_M -Werte der Enantiomere A und B. Für die inhärente Enantioselektivität folgt hieraus:

$$E = \frac{\frac{k_{cat}}{K_M A}}{\frac{k_{cat}}{K_M B}}. \quad (8)$$

3 Zielsetzung

- Im Rahmen dieser Arbeit wurden theoretische Modelle auf der Basis molekulardynamischer Simulationen entwickelt, die eine Vorhersage der experimentell zu erwartende Stereoselektivität in Lipase-katalysierten Umsetzungen sekundärer Alkohole und strukturanalogen Derivaten, z.B. sekundärer Amine, erlauben und ein Verständnis für die molekulare Grundlage der Enantioselektivität schaffen. Die hierfür benötigten experimentellen Daten wurden der Literatur entnommen.
- Ausgehend vom Modell zur Vorhersage der experimentellen Enantioselektivität wurde versucht ein (*in silico assay*) zur Prognose gezielter Modifikation der Lipase (*directed evolution in silico*), die die Enantiomerendifferenzierung verbessern und zu einer Steigerung der Enantioselektivität führen, zu entwickeln.
- Vorhergesagte Mutationen der Lipase aus *P. cepacia* wurden experimentell am Beispiel der kinetischen Racematspaltung von *rac*-2-Octanol überprüft.
- In einem abschließenden Schritt wurde geprüft in welchem Umfang sich die theoretischen Ergebnisse Lipase-katalysierter Umsetzungen chiraler sekundärer Alkohole und Amine auf weitere Enzym-katalysierte Reaktionen, z.B. die stereoselektive Ringöffnung von Epoxiden durch Epoxidhydrolasen, anwenden lassen.

4 Die Theorie molekulardynamischer Methoden

4.1 Einleitung

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

- *Lex prima - 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.
- *Lex secunda - Newtonsches Grundgesetz:*
Newtons zweites Gesetz stellt eine Beziehung zwischen Nettokraft und Beschleunigung her. Demnach ist die Änderung der Bewegungsgröße, der Impuls der Einwirkung der bewegendes Kraft proportional und geschieht in der Richtung der Kraft. Der Impuls p ist definiert als Produkt von Masse m und Geschwindigkeit v und ist demnach gleichwertig mit:

$$F = \frac{dp}{dt}. \quad (9)$$

- *Lex tertia - Wechselwirkungsgesetz:^d*
Die Kraft, mit der die Umgebung auf einen Massenpunkt wirkt, entspricht stets einer gleich großen entgegengesetzt gerichteten Kraft, mit der der Massenpunkt zurück wirkt. Demnach folgt:

$$F_{actio} = -F_{reactio}. \quad (10)$$

^dEine notwendige Bemerkung zum dritten Axiom: Das dritte Newtonsche Axiom ist streng genommen kein allgemeingültiges Naturgesetz. Dieses Gesetz ist aufgrund seines Vektorcharakters nur auf Kräfte anwendbar, die eine direkte Wirkungsachse besitzen. Diese Art Kräfte werden als Zentralkräfte bezeichnet. Zentralkräfte treten auf als Gravitations- und elektrostatische Kräfte, elastische Kräfte, die aus Materialeigenschaften ableitbar sind, etc. Kräfte, die jedoch eine Geschwindigkeitabhängigkeit besitzen, z.B. Kräfte zwischen bewegten elektrischen Ladungen oder Gravitationskräfte zwischen bewegten Massen sind keine Zentralkräfte, somit ist das dritte Newtonsche Gesetz nicht anwendbar.

Newtons drittes Gesetz fordert zusätzlich die Erhaltung des Impulses. In einem abgeschlossenen System, auf das keinerlei äußere Kräfte einwirken, muß der Impuls daher konstant sein.

Die zeitabhängigen Positionen, d.h. die Trajektorie des Systems ergibt sich aus Lösung nachfolgender Differentialgleichung (11), die aus dem zweiten Newtonschen Gesetz (9) folgt:

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i}. \quad (11)$$

Gleichung (11) beschreibt die Bewegung eines Teilchens der Masse m_i entlang einer Koordinate x_i und einer Kraft F_{x_i} , die auf den Partikel in dieser Richtung einwirkt.

Mit Newtons Bewegungsgesetzen lassen sich prinzipiell drei unterschiedliche Problemstellungen behandeln. Im einfachsten Fall wirkt keine weitere Kraft auf zwei miteinander kollidierende Teilchen ein. Die Position eines Teilchens verändert sich deshalb zwischen der ersten und der zweiten Kollision um $v_i \delta t$, wobei es sich bei v_i um eine konstante Geschwindigkeit und bei δt um die Zeit zwischen zwei Stößen handelt.

Im zweiten Fall erfährt das Teilchen eine konstante Kraft zwischen den Kollisionen; ein Beispiel hierfür ist die Bewegung eines geladenen Teilchens durch ein konstantes elektrisches Feld. Im dritten Fall hängt die auf das Teilchen wirkende Kraft von dessen Position relativ zu anderen Teilchen im System ab. Bewegungsabläufe des dritten Typs sind aufgrund gekoppelter Teilchenbewegungen nur sehr schwer bzw. überhaupt nicht analytisch zu beschreiben.

4.2 Ein einfaches Modell

Das erste Modell molekulardynamischer Simulationen stammt bereits aus dem Jahre 1957^[3]. In diesem Modell verläuft der Bewegungsablauf der Teilchen zwischen zwei Kollisionen geradlinig und mit konstanter Geschwindigkeit. Die Kollisionen sind hierbei vollkommen elastisch und finden exakt dann statt, wenn der Abstand zwischen den Zentren der Kugeln dem Kugeldurchmesser entspricht. Die Schritte zur Berechnung eines solchen Systems sind nun folgende:

1. Identifiziere das Kugelpaar, das die nächste Kollision im System durchführt und berechne den Zeitpunkt dieser Kollision.
2. Berechne die Position aller Kugeln zum Kollisionszeitpunkt.
3. Bestimme die Geschwindigkeiten der beiden kollidierenden Kugeln nach der Kollision^e.
4. Beginne erneut bei Punkt 1.

Trotz vieler Unzulänglichkeiten dieses sehr einfachen Modells liefert es nützliche Einblicke in mikroskopische Grundlagen der Eigenschaften von Flüssigkeiten.

4.3 Kontinuierliche Potentiale

Realistischere Modelle zur Beschreibung intermolekularer Wechselwirkungen atomarer Systeme berücksichtigen, daß sich die Kraft auf jedes Teilchen verändert, wenn dieses seine Position bzw. wenn sich die Position wechselwirkender Teilchen verändert^[120,121]. Unter dem Einfluß eines kontinuierlichen Potentials sind die Bewegungen aller Teilchen gekoppelt und führen zum sogenannten *Vielteilchen-Problem*, welches analytisch nicht zu lösen ist und nur über die Integration der Bewegungsgleichungen unter Zuhilfenahme iterativer Methoden zugänglich ist.

4.3.1 Algorithmen

Iterative Lösungsansätze setzen ein paarweise additives Verhalten molekulardynamischer Trajektorien voraus. Eine Integration wird dabei in viele Teile zerlegt, die durch einen bestimmten Zeitabschnitt δt voneinander getrennt sind. Die resultierende Kraft auf ein Teilchen in dieser Konfiguration des Systems zum Zeitpunkt t ergibt sich dann aus der Vektorsumme aller seiner Wechselwirkungen mit anderen Teilchen des Systems. Aus dieser Kraft wiederum läßt sich die Beschleunigung der Teilchen bestimmen, die zusammen mit Position und Geschwindigkeit zur Zeit t die Position und Geschwindigkeit zur Zeit $t + \delta t$ ergeben. Die Kraft wird während dieses Zeitintervalls als konstant vorausgesetzt. Nun werden die Kräfte der Teilchen in ihren neuen Positionen bestimmt, die wiederum zu neuen Positionen und Geschwindigkeiten zur Zeit $t + 2\delta t$

^eDiese ergeben sich aus dem Prinzip der Impulserhaltung

führen, usw.

Alle auf iterativen Lösungsansätzen basierenden Algorithmen zur Integration der Bewegungsgleichungen setzen voraus, daß sich Position und dynamische Eigenschaften aus der Entwicklung von Taylor-Reihen ergeben:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{a}(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 \mathbf{b}(t) + \frac{1}{24} \delta t^4 \mathbf{c}(t) + \dots \quad (12)$$

$$\mathbf{v}(t + \delta t) = \mathbf{v}(t) + \delta t \mathbf{a}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{b}(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 \mathbf{c}(t) + \dots \quad (13)$$

$$\mathbf{a}(t + \delta t) = \mathbf{a}(t) + \delta t \mathbf{b}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{c}(t) + \dots \quad (14)$$

$$\mathbf{b}(t + \delta t) = \mathbf{b}(t) + \delta t \mathbf{c}(t) + \dots \quad (15)$$

\mathbf{v} entspricht der Geschwindigkeit (die erste Ableitung des Ortes nach der Zeit); \mathbf{a} ist die Beschleunigung (die zweite Ableitung des Ortes nach der Zeit); \mathbf{b} und \mathbf{c} sind die jeweils dritten und vierten Ableitungen, usw.

Der am häufigsten eingesetzte Algorithmus in molekulardynamischen Simulationen ist der *Verlet Algorithmus*^[165]. Der Verlet Algorithmus berechnet aus Positionen und Beschleunigungen zum Zeitpunkt t und den Positionen des vorangegangenen Schrittes $\mathbf{r}(t - \delta t)$ die Positionen des nächsten Schrittes zum Zeitpunkt $t + \delta t$, $\mathbf{r}(t + \delta t)$. Die Beziehung zwischen Position und Geschwindigkeit zum Zeitpunkt t läßt sich somit folgendermaßen schreiben:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{a}(t) + \dots \quad (16)$$

und

$$\mathbf{r}(t - \delta t) = \mathbf{r}(t) - \delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{a}(t) - \dots \quad (17)$$

bzw. in additiver Form:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \delta t) + \delta t^2 \mathbf{a}(t) \quad (18)$$

Die Geschwindigkeiten treten laut Gleichung (18) nicht mehr explizit im Verlet Algorithmus auf. Sie lassen sich jedoch auf unterschiedliche Weisen berechnen. Eine einfache Möglichkeit ist die Division der Differenz der Positionen zur Zeit $t + \delta t$ und $t - \delta t$ mit $2\delta t$:

$$\mathbf{v}(t) = \frac{[\mathbf{r}(t + \delta t) - \mathbf{r}(t - \delta t)]}{2\delta t} \quad (19)$$

Ein großer Nachteil des Verlet Algorithmus ist, daß die neuen Positionen aus Gleichung (18) erhalten werden, indem ein relativ kleiner Term $\delta t^2 \mathbf{a}(t)$ zur Differenz zweier viel grösserer Terme ($2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \delta t)$) addiert wird und somit einen Präzisionsverlust zur Folge hat. Weitere Nachteile sind, daß die Geschwindigkeit nicht mehr explizit auftritt in Gleichung (18) und separat berechnet werden muß – diese läßt sich jedoch erst nach Berechnung des nächsten Schrittes aus Gleichung (19) ermitteln. Weiterhin erfordert der Start des Algorithmus eine Initialisierung – neue Positionen $\mathbf{r}(t + \delta t)$ ergeben sich immer aus den derzeitigen $\mathbf{r}(t)$ und den vorangegangenen Positionen $\mathbf{r}(t - \delta t)$; zum Zeitpunkt $t = 0$ sind jedoch keine früheren Positionen bekannt, weshalb ein Start-Set an Positionen zur Verfügung gestellt werden muß.

Aus diesem Grund wurde eine Vielzahl weiterer Algorithmen entwickelt. Eine gängige Methode, der Bockspring-Algorithmus basiert auf folgenden Beziehungen:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t \mathbf{v} \left(t + \frac{1}{2} \delta t \right) \quad (20)$$

$$\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) = \mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2}\delta t\right) + \delta t \mathbf{a}(t). \quad (21)$$

Dieser Algorithmus berechnet zuerst die Geschwindigkeiten $\mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\delta t)$ aus den Geschwindigkeiten zum Zeitpunkt $t - \frac{1}{2}\delta t$ und die Beschleunigung zur Zeit t . Die Positionen $\mathbf{r}(t + \delta t)$ leiten sich dann von den Geschwindigkeiten berechnet aus den Positionen $\mathbf{r}(t)$ zur Zeit t aus Gleichung (20) ab. Die Geschwindigkeiten zur Zeit t ergeben sich aus:

$$\mathbf{v}(t) = \frac{1}{2} \left[\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) + \mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2}\delta t\right) \right] \quad (22)$$

Die Geschwindigkeiten überspringen also die derzeitigen Positionen und ergeben deren Werte zum Zeitpunkt $t + \frac{1}{2}\delta t$. Die Positionen wiederum überspringen die momentanen Geschwindigkeiten und ergeben die neuen Geschwindigkeiten zur Zeit $t + \delta t$, usw. Der Bockspring-Algorithmus hat gegenüber dem Verlet-Algorithmus den entscheidenden Vorteil, daß Geschwindigkeiten explizit berechnet werden. Der große Nachteil liegt jedoch darin, daß Positionen und Geschwindigkeiten nicht synchronisiert vorliegen, d.h. daß sich der Beitrag der kinetischen Energie an der Gesamtenergie des Systems nicht zur gleichen Zeit wie die Positionen im System bestimmen läßt. Ein weiterer Algorithmus, der *velocity Verlet* Algorithmus^[151] bestimmt Positionen, Geschwindigkeiten und Beschleunigungen des Systems zur gleichen Zeit und vermeidet hierdurch einen Präzisionsverlust.

4.3.2 Der Zeitschritt - δt

Die Wahl eines geeigneten Zeitschrittes δt in molekulardynamischen Simulationen ist von besonderer Bedeutung. Die Betrachtung zweier Grenzfälle soll dies illustrieren (Abb. 19, S. 31): wird δt zu klein gewählt, so deckt die Trajektorie nur einen beschränkten Teil des Phasenraums ab bzw. führt zu einer extremen Steigerung des Rechenaufwands (A), wird δt hingegen zu groß gewählt, so können durch die Integration über Energieüberlappungen Instabilitäten des Systems auftreten und zu Verstößen gegen Energie- und Impulserhaltung führen (B). Ziel der Auswahl eines geeigneten Zeitschrittes muß also sowohl die Abdeckung des kompletten Phasenraums als auch die Simulation einer korrekten Trajektorie sein (C).

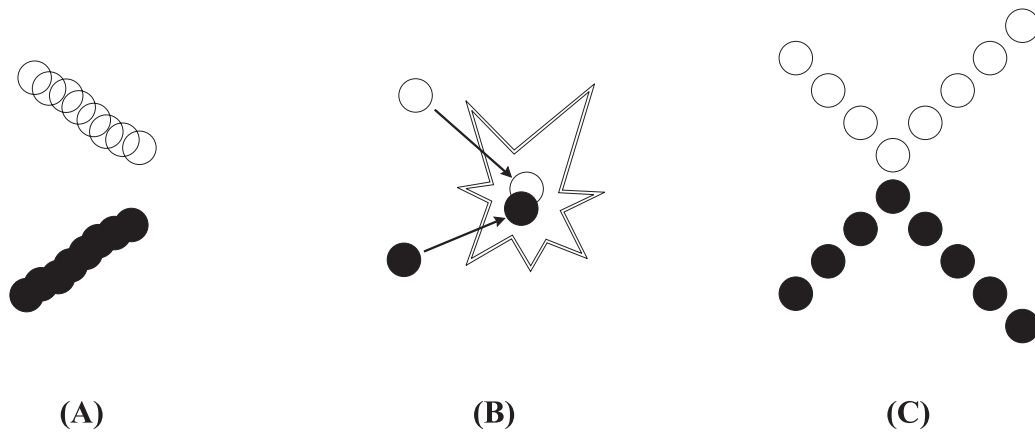


Abb. 19. (A) Kleine δt decken den Phasenraum nur sehr langsam ab, (B) große δt führen zu Systeminstabilitäten, (C) nur eine geeignete Wahl von δt führt zu einer effizienten Abdeckung des Phasenraums und Kollisionen verlaufen ohne Störung des Programms

4.4 Einrichten molekulardynamischer Simulationen

Zum Start einer molekulardynamischen Simulation müssen eine Startkonfiguration des Systems sowie Startgeschwindigkeiten der Teilchen – in diesem Fall der Atome – vorhanden sein. Geschwindigkeiten können aus der Maxwell-Boltzmann Verteilung^f unter Berücksichtigung entsprechender Temperaturen entnommen werden:

$$p(v_{ix}) = \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{\frac{1}{2}} \exp \left[-\frac{m_i v_{ix}^2}{2k_B T} \right]. \quad (23)$$

Startgeschwindigkeiten lassen sich außerdem aus Einheitsverteilungen oder aus einfachen Gauss-Verteilungen entnehmen.

Die Startgeschwindigkeiten werden so angepaßt, daß der Gesamtimpuls des Systems Null beträgt und dieses einem konstanten $NVEP$ Ensemble angehört. Um den Gesamtimpuls des Systems auf Null zu setzen, muß die Summe aller atomaren Impulse entlang der x , y und z -Achse berechnet werden. Die hierdurch erhaltenen richtungsabhängigen Gesamtimpulse des Systems werden durch die Gesamtmasse des Systems relativiert und durch Subtraktion der atomaren Geschwindigkeiten auf Null gesetzt.

^fDie Maxwell-Boltzmann Verteilung gibt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Atom i der Masse m_i die Geschwindigkeit v_{ix} in Richtung x zur Temperatur T besitzt.

Nach Festlegung der Startkonfiguration und Zuweisung der Startgeschwindigkeiten kann die Simulation beginnen. Zu jedem Zeitpunkt des Systems muß die Kraft auf jedes Atom durch Differentiation der Potentialfunktion berechnet werden, welche sich aus unterschiedlichen Termen zusammensetzt, z.B. Bindungslängen und -winkel, Torsionswinkel und weiterreichende atomare Wechselwirkungen. Für zwei wechselwirkende Atome ergibt sich nach dem Lennard-Jones Potential folgende Kraft:

$$\mathbf{f}_{ij} = \frac{\mathbf{r}_{ij}}{|\mathbf{r}_{ij}|} \frac{24\varepsilon}{\sigma} \left[2 \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{13} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^7 \right]. \quad (24)$$

Die erste Phase einer Simulation entspricht einer Equilibrierungsphase, die das System ausgehend von der Startkonfiguration in ein Gleichgewicht bringen soll. Während dieser Phase werden verschiedene Parameter zusammen mit den aktuellen Systemkonfigurationen verfolgt. Sobald diese Parameter einen stabilen Zustand des Systems ergeben^g kann in die Produktionsphase der Simulation übergegangen werden, in der thermodynamische Eigenschaften berechnet werden. Die Frage nach einem geeigneten Parameter zur Kontrolle des Gleichgewichtszustands des Systems richtet sich in gewissem Ausmaß nach der speziellen Aufgabenstellung der Simulation, konstant sollten jedoch kinetische, potentielle und Gesamtenergie^h des Systems sowie Geschwindigkeiten, Temperatur und Druck sein. Geschwindigkeitskomponenten sollten einer Maxwell-Boltzmann Verteilung entsprechen und kinetische Energien sollten in den drei Raumrichtungen gleichverteilt vorliegen. Für die Durchführung von Simulationen bei ganz bestimmten Temperaturen des Systems werden die Geschwindigkeiten während der Equilibrierungsphase entsprechend skaliert, in der darauffolgenden Produktionsphase ist die Temperatur jedoch eine Variable des Systems.

^gDie Simulation inhomogener Systeme, z.B. ein Protein in Lösung, erfordert normalerweise eine umfassendere Gleichgewichtseinstellung.

^hDas mikrokanonische System erlaubt Fluktuationen der kinetischen und potentiellen Energie, die Gesamtenergie muß hingegen konstant sein.

4.5 Berechnung thermodynamischer Eigenschaften

Der momentane Wert der Temperatur ergibt sich aus der kinetischen Energie über den Impuls der Teilchen:

$$\kappa = \sum_{i=1}^N \frac{|\mathbf{p}_i|^2}{2m_i} = \frac{k_B T}{2} (3N - N_c). \quad (25)$$

Für ein isoliertes Systemⁱ sind der Gesamtimpuls und der Gesamtdrehimpuls konstant und können durch eine geeignete Wahl der Startgeschwindigkeiten Null gesetzt werden. Während der Simulation sollte der Gesamtimpuls Null bleiben, der Drehimpuls ist hingegen variabel.

ⁱ N_c ist die Anzahl der Constraints; $3N - N_c$ ist demnach die Anzahl der Freiheitsgrade

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Hersteller:	
BioRad Laboratories, Richmond, USA	SDS-Page-Standard (<i>low molecular weight</i>)
DIFCO-Laboratories, Detroit, USA	Trypton
Fluka Chemie, Buchs, Schweiz	Bacto-Agar
	Bromphenolblau
	Calciumchlorid (CaCl ₂)
	Coomassie Brilliant Blue R-250
	Dimethylsulfoxid (DMSO)
	Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Natrium-salz
	Glucose-Monohydrat
	Ethidiumbromid
	Hefeextrakt
	Natriumchlorid
	Magnesiumchlorid (MgCl ₂)
	Methanol
	Natriumacetat (NaOAc)
	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	Natriumhydroxid (NaOH)
	PEG 6000
	Salzsäure 35% (HCl)
	Tetramethylethylendiamin (TEMED)
	Trix-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)
	Toluol
	Diethylether
	<i>n</i> -Hexan
	2-Octanol

Hersteller:	
Riedel-de Haen, Seelze	<i>R</i> -2-Octanol <i>S</i> -2-Octanol
Gibco BRL GmbH, Eggenstein	1 kb-Ladder (Standard für Agarosegele)
ARK, Darmstadt	Oligonukleotide
Qiagen GmbH, Hilden	QIAGEN Midi-Plasmid-Präparations-Kit QIAprep Spin Miniprep-Plasmid Präparations-Kit
Roth GmbH, Karlsruhe	Ampicillin (Natrium-Salz)
Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg	Agarose
Stratagene, La Jolla, USA	Pfu-Polymerase Pfu-Polymerase Puffer QuikChange-Kit
	SDS-Markerproteine Restriktionsenzyme Taq-DNA-Polymerase DNA-Längenstandard dNTPs für PCR DMSO Rotiphorese Gel 30 30% Acrylamid-Bisacrylamid SDS
Millipore	Millipore Filter 0,025 μm für Dialyse
Eppendorf	Eppendorf-Reaktions-Gefäße
BioRad	Filterpapier (25 μm)
Ratiolab	Mikro-Einmalplastikküvetten (10*4*45 mm)

5.2 Technische Geräte

Gerät	Typen-Kennzeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese	DNA Sub Cell, Gel-Dryer 583, Mini	BioRad
	Sub DNA Cell, Mini Sub Cell GT	
	Video Copy Processor P66E	Mitsubishi
	BWM 9X Monitor	Javelin Electronics
	UV-Leuchttisch	MWG-Biotech
Brutschränke	WTE	Binder
	UM 500	Memmert
Chromatographiesäule für GC	Optima 5, 25m * 0,25mm i.D.	Machery und Nagel
DNA-Sequenzierer	373A DNA Sequencer	Applied Biosystems
	Macintosh Quadra 650	Apple Macintosh
Fermenter	Bioengineering D1180 (30 l)	Bioengineering AG
	Infors HT (5l)	Infors AG
Gaschromatograph	Fisons GC	Fisons Instruments
		Mega Series
Gefriertrockner	Lyovac GT 2	Finn-Aqua
Inkubatoren	HT-Schüttelinkubator	Infors AG
Mikrowellengerät	Micro-Chef FM A935	Moulinex
PAGE	Minigel-Twin G42	Biometra
	Model 583 Gel Dryer	BioRad
PCR-Geräte	DNA Thermocycler	Perlin Elmer
		Eppendorf
	Robocycler Gradient 40	Stratagene
pH-Meter	Digital pH Meter pH525	WTW
Photometer	UV/VIS-Spektrometer, (Ultraspec	Pharmacia Biotech
	3000)	
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waagen	Basic, MC1 Research RC 210 D	Sartorius
	Precision Advanced	OHAUS

Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417 C	Eppendorf
	Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf
	Universal 30 F	Hettich
	KR 22 i (Rotor: AK 500-11, 155mm)	Jouan
	G412	Jouan
	Sorvall RC-5B (Rotor: SA 600)	DuPont Instruments

5.3 Nährmedien, Puffer und Lösungen

5.3.1 Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g Natriumchlorid, ad 1 L Wasser
TSS-Medium	85 ml LB, 10 g PEG 6000, 5 ml DMSO, 10 ml Magnesiumchlorid (1M), (pH 7,5)

Für feste LB-(*Luria-Bertani*)-Medien wird vor dem Autoklavieren 15 g/L Agar zugegeben. Medien zur Selektion von Transformanden werden mit Ampicillin-Lösung (Endkonzentration 100 µg/ml, sterilfiltriert) versetzt.

5.3.2 Puffer und Lösungen

Eine allgemeine Übersicht der Zusammensetzung eingesetzter Puffer ist in den nachfolgenden Tabellen angegeben.

Puffer	Zusammensetzung
TE 10.1:	10 mM Tris/HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)
TE 10.01:	10 mM Tris/HCl (pH 8), 0,1 mM EDTA (pH 8)

Agarose-Gelelektrophorese:

Puffer	Zusammensetzung
TAE (50x):	242 g Tris, 57 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8), ad 1 L H ₂ O
DNA-Auftragspuffer (5x):	0,1 % Bromphenolblau, 50 % Glycerin, 49,9 % 0,5 M EDTA (pH 8)
Agaroselösung:	1 % Agarose, 1 L TAE-Puffer

SDS-PAGE:

Puffer	Zusammensetzung
Lower Tris (4x):	36,34 g Tris, 0,8 g SDS, ad 200 ml H ₂ O, pH 8
Upper Tris (4x):	12,11 g Tris, 0,8 g SDS, ad 200 ml H ₂ O, pH 6,8
Trenngel (15%):	4 ml Acrylamidlösung (30%/0,8%), 2 ml Lower Tris (4x), 2 ml H ₂ O, 4 μ l TEMED, 40 μ l APS (10%)
Sammelgel (4%):	0,52 ml Acrylamidlösung (30%/0,8%), 1 ml Upper Tris (4x), 2,47 ml H ₂ O, 4 μ l TEMED, 40 μ l APS (10%)
Laufpuffer (5x):	15 g Tris, 72 g Glycin, 5 g SDS, 1 L H ₂ O, pH 8,3
Probenpuffer (5x):	320 mM Tris/HCl (pH 6,8), 50 % Glycerin, 10 % SDS, 25 % β -Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau
Coomassie-Färbelösung	2 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,5 g Ethanol, 42,5 % Methanol, 20 % Eisessig
Entfärber für SDS-PAGE:	40 % Methanol, % 10 Eisessig

Proteinblotting:

Anoden-Puffer 1:	0,3 M Tris, 10 % Methanol, pH 10,4
Anoden-Puffer 2:	25 mM Tris, 10 % Methanol, pH 10,4
Kathoden-Puffer:	25 mM Tris, 40 mM 6-Aminocaprinsäure, 10 % Methanol, pH 10,4
PVDF-Färbelösung:	0,025 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 40 % Methanol
PVDF-Entfärbelösung	50 % Methanol

5.3.3 Antibiotikum

Als Antibiotikum wurde sterilfiltrierte Ampicillin-Lösung eingesetzt. Die Konzentration der Stammlösung betrug 100 mg/ml , die der entsprechende Arbeitskonzentration $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

5.4 Stämme und Plasmide

5.4.1 Bakterienstamm *E. coli* DH5 α

Bei dem eingesetzten *E. coli*-Stamm handelt es sich um ein K12-Derivat – *E. coli* DH5 α – welches von Hanahan^[65] generiert und von Quyen^[119] modifiziert wurde. Genetische Merkmale und Herkunft des Stammes sind in Tabelle 2 zusammengefaßt, die Abkürzungen für Geno- und Phänotyp entsprechen der Nomenklatur von Bachmann^[5].

Tab. 2. Eingesetzter Bakterienstamm *E. coli* DH5 α

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F(ϕ 80d Δ lacZM15) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>) <i>supE44relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYAargF</i>)U169	Hanahan, 1983

5.4.2 Das Plasmid pCYTEXP1

Das Ampicillin-resistente Plasmid pCYTEXP1^[10] (4985 bp) trägt die starken Bakteriophagen- λ -promotoren R_R und P_L , welche durch den cIts857-Gen codierten temperatursensitiven Repressor kontrolliert werden (Abb. 20, S. 41). Das Plasmid erlaubt eine starke Expression des insertierten Gens in *E. coli*. Bei Temperaturen zwischen 30-37°C wird der Repressor exprimiert und bindet an den λP_L -Promotor. Ab 42°C wird das Repressorgen inaktiviert und das Repressorprotein verliert die Kontrolle über den λP_L -Promotor; die Transkription des im Anschluß an den Promotor insertierten rekombinanten Gens wird gestartet.

Tab. 3. Eingesetzte Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Resistenz	Referenz
pCYTEXP1	Expressionsvektor, $P_R P_L$	Ap^R	Belev <i>et al.</i> , 1991
pT-Lip-Hp	Gen für die reife Lipase und ihr Helferprotein aus <i>P. cepacia</i>	Ap^R	Quyén <i>et al.</i> , 1999
pTompA Δ 70HpHis	Verkürztes Helfergen aus <i>P. cepacia</i> AT-CC21808 fusioniert mit ompA und His-Tag in pCYTEXP1	Ap^R	Quyén <i>et al.</i> , 1999

5.4.3 Das Plasmid pT-Lip-Hp

Quyén *et al.*^[119] insertierten das Gen der *P. cepacia* Lipase ATCC 21808 (Lip) und das Gen des Helferproteins (Hp) in das Plasmid pCYTEXP1 (Abb. 20, S. 41). Eine optimierte Überexpression in *E. coli* erfolgt, wenn die Genfunktion durch den Temperatur-induzierbaren λP_L Promotor reguliert wird und die Signalsequenz der Lipase entfernt wird.

5.4.4 Das Plasmid pTompA Δ 70HpHis

Bei der Expression der Lipase aus *P. cepacia* in *E. coli* fallen Einschlußkörper an, die zerstört werden müssen. Das Protein muß korrekt rückgefaltet werden um eine aktive Lipase zu erhalten. Die Expression des hierzu nötigen Helferproteins wurde unabhängig von der Lipase

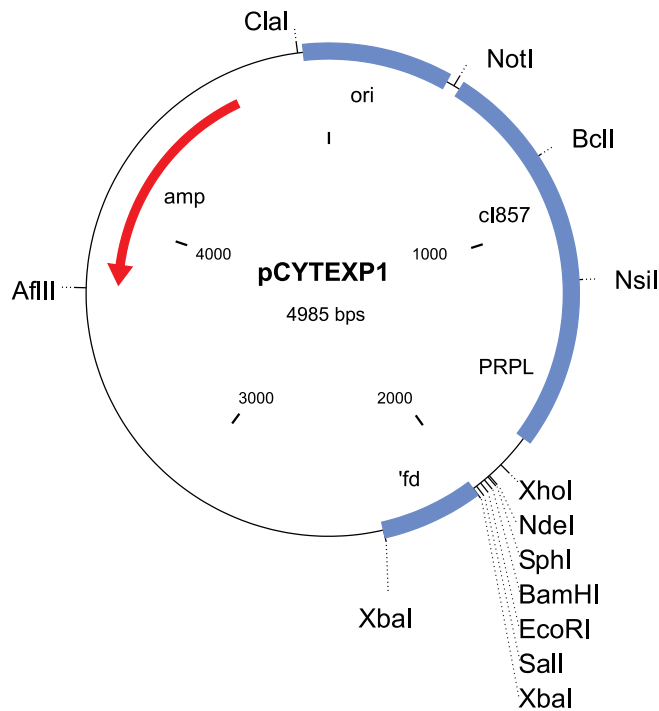


Abb. 20. Das Plasmid pCYTEXP1 stellt die Basis für die von Quyen *et al.* durchgeführten Modifikationen zum Plasmid pT-Lip-Hp dar.

durchgeführt. Das Helferprotein fungiert in diesem Fall als Membrananker und ist auch an der Faltung der Lipase während der Sekretion beteiligt. Um die Blockierung einer Überexpression des Proteins zu vermeiden entfernten Quyen *et al.*^[119] 70 vorwiegend hydrophobe Aminosäuren am N-terminalen Ende des Chaperones^j.

5.5 Anzucht und Stammkultivierung

LB-Agar-Platten wurden mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin versetzt. Ausplattierte Zellen wurden über Nacht bei 37°C anwachsen gelassen und anschließend im Kühlraum bei 4°C zur weiteren Verwendung gelagert. Einzelkolonien der LB-Agar-Platten wurden zusammen mit 3ml LB-Amp-Medium über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. 500 ml LB-Amp-Medium

^jDer Protein-Transport vom Cytoplasma durch die cytoplasmatische Membran ins Periplasma der Zellen geschieht durch ein protein-spezifisches, N-terminales Signal-Peptid. Dieses kann gezielt zur Überführung rekombinanter Proteine vom Cytoplasma ins Periplasma eingesetzt werden. Das von Quyen eingeführte Signal-Peptid (ompA) führt zu einer gesteigerten Überexpression und Stabilität des Proteins aufgrund der im Periplasma höheren Tendenz zur Ausbildung von Disulfidbrücken (Faltung) und der vergleichsweise geringen Protease-Konzentration.

wurde nachfolgend mit jeweils 10 ml (1:50) aus den Vorkulturen in 2 l-Erlenmeyerkolben angeimpft und im Schüttler bis zu einer optischen Zelldichte von 0.8 bei 37°C inkubiert. Der Wachstums-Verlauf der *E. coli* DH5 α -Zellen wurde photometrisch überwacht^k. Die Induktion erfolgte durch Überführen der Kultur in ein auf 42°C erwärmtes Schüttel-Wasserbad. Die Expression wurde über einen Zeitraum von 4 h durchgeführt.

5.6 Molekulargenetische Techniken

5.6.1 Herstellung kompetenter Zellen

Mit 0,5 ml einer Übernachtskultur (LB, Volumen 3 ml) von *E. coli* DH5 α wurden 50 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis OD₅₇₈ \approx 0,5 inkubiert. Die Zellkultur wurde zentrifugiert (3500 Upm, 4°C, 10 min), der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml TSS Puffer (0°C) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 2h auf Eis wurden die Zellen in Reaktionsgefäße (200 μ l) aliquotiert und bei -80°C für Transformationen gelagert.

5.6.2 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen

1 μ l Plasmid-DNA wurde mit 200 μ l kompetenten Zellen gemischt, 20 Minuten auf Eis inkubiert und nach einem Hitzeschock von 30 Sekunden bei 42°C in 2 ml LB-Medium überführt. Das Medium wurde für ca. 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Das resuspendierte Pellet wurde auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.6.3 Isolation der Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte durch die Präparations-Kits des Herstellers QIAGEN unter Einhaltung der Gebrauchsanweisung:

- QIAprep Spin Miniprep-Plasmid Präparations-Kit und

^kFür *E. coli*-Kulturen gilt im Bereich OD_{578nm} von 0 bis 0,3: OD_{578nm} = 5 * 10⁸ * (Zellen/ml).

- Midi-Plasmid Präparations-Kit.

Die DNA-Isolation eines Minipreps liefert bis zu 20 μg Plasmid-DNA. Hierzu wurden 3 ml LB-Amp-Medium in einer Übernachtskultur (37°C, 200 Umin) mit einer einzelnen Kolonie beimpft. 2 ml der Übernachtskultur werden zentrifugiert (1 min, 14000 Umin) und das Pellet in 250 μl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend werden 250 μl des Lyse-Puffers P2 zugegeben und durch vorsichtiges Drehen (4-6 mal) des Reaktionsgefäßes vermischt. Das viskose Lysat wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 350 μl Neutratlisations-Puffer N versetzt (4-6 mal umdrehen) und direkt im Anschluß zentrifugiert (10 min, 14000 Umin). Der Überstand wird durch Dekantieren auf eine QIAprep-Säule mit Sammelröhrchen aufgebracht und zentrifugiert (1 min, 14000 Umin). Das Eluat wird verworfen. Die Säule wird mit 500 μl Puffer PB gewaschen und zentrifugiert (30 sec, 14000 Umin) und das Eluat erneut verworfen. Die Säule wird bis zur Trockene zentrifugiert (1 min, 14000 Umin) und das Sammelröhrchen anschließend durch ein Reaktionsgefäß ausgetauscht. Auf die Säule werden 50 μl Wasser aufgegeben, inkubiert (1 min) und abzentrifugiert (1 min, 14000 Umin).

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde die DNA-Isolation mittels Midi-Plasmid Präparations-Kit gewählt. Der Ansatz der Übernachtskultur hierzu beträgt 50 ml. Die Aufarbeitung erfolgte ebenfalls gemäß den Anweisungen des Herstellers.

5.6.4 Positionsgerichtete Mutagenese

Zum spezifischen Austausch von Aminosäuren in Proteinen (Abb. 21, S. 45) lassen sich Punktmutationen mittels komplementärer Primer im entsprechenden Gen einführen^[101]. Die Primer (Tab. 4) hybridisieren hierbei im Annealingschritt an die Einzelstränge der DNA. Im Extensionsschritt wird das restliche Gen komplettiert. In nachfolgenden Zyklen können die Primer erneut an die verbleibende Matrize hybridisieren. Die positionsspezifische Mutagenese zur Ein-

Tab. 4. Eingesetzte Oligonukleotide zur Gensequenzierung der Lipase aus *P. cepacia*.

Primer	Sequenz (5' → 3')
PCL_X029L_R3	GCC TGC CGC TGC CGC GTC CGG
PCL_X029L_F9	GCA GGA CGC ACT GAC CAC C

Tab. 5. Pipettier-Schema I und II zur positionsspezifischen Mutagenese mit dem QuikChange-Kit.

	I	II
10x <i>Pfu</i> -Polymerase Puffer mit MgCl ₂	10 μ l	10 μ l
dNTP-Mix (c = 2,5 mM)	2 μ l	2 μ l
DMSO	10 μ l	–
Primer F (c = 5 pmol/ μ l)	2,5 μ l	2,5 μ l
Primer R (c = 5 pmol/ μ l)	2,5 μ l	2,5 μ l
pT-Lip-Hp (template-DNA)	8 μ l	8 μ l
Turbo <i>Pfu</i> -Polymerase (1 U/ μ l)	2 μ l	2 μ l
autoklaviertes dH ₂ O	63 μ l	73 μ l

führung der Punktmutation L29Y wurde mit dem QuikChange-Kit (Stratagene, La Jolla, USA) und nachfolgendem Temperatur-Programm durchgeführt (Tab. 5 und Tab. 6).

Nach beendeter Reaktion wurde zur Entfernung von Salzen 10 μ l des QuikChange-Ansatzes auf bidestilliertem Wasser schwimmende Dialyse-Filter aufgetragen und 2 h bei Raumtemperatur abgedeckt dialysiert. Der Ansatz wurde im Anschluß in *E. coli* DH5 α transformiert.

Tab. 6. Temperaturprogramm der QuikChange PCR zur Einführung der Punktmutation L29Y in das Plasmid pT-Lip-Hp.

Reaktionsschritt	Denaturierung	Annealing	Extension
1	95°C, 7 min		
2 (20 Zyklen)	95°C, 1 min	58°C, 1,5 min	68°C, 15 min
3	68°C, 20 min		

5.6.5 Restriktionsanalysen

Für analytische Restriktionsanalysen werden 0,5-1 μ l DNA in einem Reaktionsvolumen von 10-50 μ l mit 1-2 Units der betreffenden Restriktionsendonuklease im entsprechenden Puffer geschnitten. Die Analysen werden ein bis zwei Stunden bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur durchgeführt. Nach dem Verdau wird die DNA für direkt auf ein Agarosegel aufgetragen.

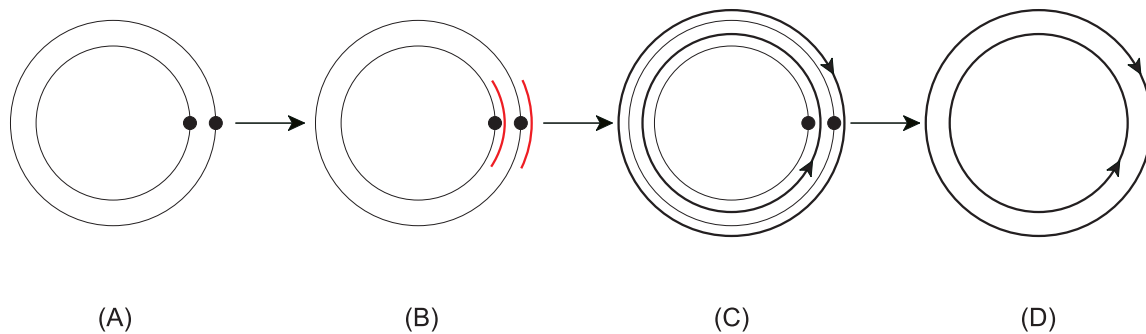


Abb. 21. Prinzip der positionsgerichteten Mutagenese: (A) Plasmid mit Position der Mutagenese, (B) Hybridisierung der Mutagenese-Primer, (C) Mutagenese-PCR, (D) Verdau der parentalen DNA.

5.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von doppelsträngiger DNA unterschiedlicher molekularer Masse erfolgte in 1 % Agarosegelen in TAE-Puffer mit 0,001 % Ethidiumbromid (v/v) durch Agarose-Gelelektrophorese^[141]. Die negativ geladenen DNA wandert im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Porengröße der Agarose, der angelegten Spannung und der Größe der DNA-Stücke abhängt. Ethidiumbromid dient zur Sichtbarmachung der DNA im UV-Licht, indem es sich an die DNA-Helices anlagert und im UV-Licht ($\lambda = 480 \text{ nm}$) fluoresziert. Die Elektrophorese wurde bei 120 V, 400 mA 30 Minuten lang durchgeführt (Standard 1 kb DNA-Leiter). Es ist zu berücksichtigen, daß kleinere DNA-Moleküle bei gleicher Konzentration ein schwächeres Signal ergeben, da sie weniger Ethidiumbromid einlagern können als längere DNA-Fragmente.

5.6.7 Vorbereitung zur DNA-Sequenzierung

Zur Herstellung des Sequenziergels werden 30 g Rotiphorese NF-Harnstoff in einer Mischung aus 9 ml 40 %ige Rotiphores NF-Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 6 ml Rotiphorese NF-10x TBE-Puffer und 23,5 ml Wasser unter Rühren gelöst und anschließend über einen Celluloseacetatfilter ($0,2 \mu\text{m}$) filtriert und entgast. Die Polymerisation wird durch Zugabe von $24 \mu\text{l}$ Tetramethylenethyldiamin (TEMED) und $180 \mu\text{l}$ APS-Lösung (10 % (m/v)) gestartet. Die Lösung wird in die vorbereitete Gelkammer gegossen, der Probenkamm eingesetzt und das Gel polymerisiert zweieinhalb Stunden.

Für die Sequenzierreaktion werden 5 μ l DNA-Lösung aus eine QIAprep Spin Miniprep-Plasmid Präparation, 4 μ l dNTP/ddNTP/Ampli-*Taq*-FS-Polymerase/Puffer-Lösung^l, 5 μ l Primer (1 pmol/ μ l) und 6 μ l destilliertes Wasser zusammengefügt und das Programm nachfolgender Sequenzierreaktion gestartet:

$$95^{\circ}\text{C}(7') \Rightarrow 95^{\circ}\text{C}(1') \Rightarrow 52^{\circ}\text{C}(1') \Rightarrow 60^{\circ}\text{C}(2') \Rightarrow 60^{\circ}\text{C}(1'), 30 \text{ Zyklen.} \quad (26)$$

Die Produkte der Sequenzier-PCR werden durch Ethanol-fällung gereinigt und das Pellet in 4 μ l einer Formamid/EDTA-Lösung (5:1 (v/v), 50 mM EDTA pH 8) aufgenommen. Die DNA wird zwei Minuten lang bei 90°C denaturiert, im Anschluß eine Minute auf Eis gekühlt und auf das Sequenziergel aufgetragen.

Die Sequenzierungs-Fragmente werden unter denaturierenden Bedingungen (Harnstoff) durch hochaufgelöste Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt. Die Elektrophorese wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 12 h, 2500 V, 40 mA, 30 W. Die Fluoreszenzsignale werden 531 nm, 560 nm und 610 nm nach Anregung mit einem Laser (40 mW) aufgezeichnet.

5.7 Biochemische Methoden

5.7.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese - PAGE

Durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) lassen sich Proteine im analytischen und auch im präparativen Maßstab nach Größe von entfalteter oder gefalteter Proteinkette (SDS- und native PAGE^[90]) trennen. Die Proteine wandern in Abhängigkeit ihrer Ladung, der Porengröße und der angelegten Spannung im angelegten elektrischen Feld. Die PAGE beruht auf nicht-denaturierenden Bedingungen, wohingegen bei der SDS-PAGE die Proteine durch den Zusatz

^lDie vier in geringer Konzentration enthaltenen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (ddNTP) führen durch ihren Einbau zum Abbruch der Kettenverlängerung. Der Fluoreszenzmarker der ddNTP's kann durch einen Laserstrahl angeregt werden, wodurch die Basenabfolge in einer Gelbahn durch die Detektion der in verschiedenen Farben fluoreszierenden ddNTP's direkt abgelesen werden kann.

von SDS denaturiert werden und proportional zu ihrem Molekulargewicht negative Ladung tragen.

Zur Herstellung eines SDS-Gels wird ein 12,5 %iges Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach einer Polymerisationsdauer von 20 min wird Propanol abgegossen, das Gel getrocknet und mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet. Ein Probenkamm wird eingesetzt, nach 20 min entfernt und die Proben^m und der Standard (Proteingemisch, Tab. 7) werden aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte zuerst für 10 min bei 10 mA, danach bei 25 mA bis die Bande des Bromphenolblaus das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Nach der Elektrophorese wird das Gel mindestens 1 h in Coomassie-Färbelösung eingelegt und im Anschluß in Entfärbelösung, bis die Proteinbanden sich deutlich vom klaren Hintergrund abheben. Das Gel wird dann im Gelrockner 2 h unter Vakuum getrocknet.

Tab. 7. Zusammensetzung des Proteinstandards bei SDS-Gelen (BioRad)

Protein	Molekulargewicht
Phosphorylase B	97,4 kDa
BSA	66,2 kDa
Ovalbumin	45,0 kDa
Carboanhydrase	31,0 kDa
Trypsininhibitor	21,5 kDa
Lysozym	14,4 kDa

5.7.2 Photometrischer Assay auf Lipase-Aktivität

Das Nachweiseprinzip der Lipase-Aktivität beruht auf der Spaltung der Esterbindung des wasserunlöslichen Substrates *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*-NPP). Gebildet wird *p*-Nitrophenol und Palmitinsäure. Das entstandene *p*-Nitrophenol (gelb) kann bei 410 nm photometrisch nachgewiesen werden.

^mDiese werden zuvor mit SDS-Probenpuffer (2x) verdünnt und bei 95 °C denaturiert.

Für die Bestimmung werden 900 μl der Lösung C in ein Reaktionsgefäß gegeben und 2 min bei 60°C vorinkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 μl Lipase-Probe gestartet. Nach 1-minütiger Inkubation bei 60°C wird die Absorptionsänderung bei 410 nm gegen eine Referenz gemessen. Auch eine Gelb-Verfärbung gibt einen deutlichen Hinweis auf Lipase-Aktivität.

Tab. 8. Anzusetzende Lösungen für den photometrischen Assay zur Bestimmung der Lipase-Aktivität

Lösung A	60 mg <i>p</i> -Nitrophenylpalmitat 20 ml <i>n</i> -Propanol 5 min Ultraschall-Behandlung bei 4°C lagern
Lösung B	1 g Triton X-100 0,2 g Gummi arabicum 200 ml Tris-HCl Puffer (0,1 M) pH 7.5
Lösung C	1 Teil Lösung A 9 Teile Lösung B max. 2h bei RT verwendbar

5.8 Expression der rekombinanten *P. cepacia* Lipase und des Helferproteins aus *E. coli*

Die Vorkultur zur Fermentation im 15 L Maßstab wurde hergestellt durch Animpfen von 20 ml LB-Amp-Medium mit ausplattierten Zellen des Wildtyps und der Mutante Y29L aus *P. cepacia*) bzw. mit einer Glycerin-Dauerkultur des Helferproteinsⁿ bei 37°C im Schüttler (200 Upm). 10 ml der Übernachtskultur wurden anschließend in jeweils 500 ml LB-Amp-Medium überführt und bei 37°C im Schüttler (200 Upm) bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD}_{578} = 0,8$ inokkuliert. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde direkt im Anschluß durch einen Hitzeschock von 42°C für 4 h induziert (Wasserbad, 250 Upm). Zu Beginn der Induktion und

ⁿWildtyp und Mutante der Lipase aus *P. cepacia* fallen beim Zellaufschluß als inaktive Zellkörper an und benötigen zur Faltung das Helferprotein pTompA Δ 70HpHis.

nach 1, 2, 3 und 4 h Stunden wurden Proben (2ml) entnommen. Die Zell-Ernte erfolgte nach 4 h durch Zentrifugation (30 min, 10000 Upm, 4°C). Die erhaltene Feuchtmasse wurde bei -20°C gelagert.

5.9 Zellaufschluß und Rückfaltung

Der chemische Zellaufschluß^[119] zur Freisetzung der Lipasen und des Helferproteins erfolgte durch den Rückfaltungs-Puffer B°.

0,7 g der Feuchtmasse *E. coli* Zellen werden in jeweils 20 ml des Rückfaltungs-Puffers B aufgenommen und für 4 h bei RT gerührt. Analog wird mit 1,5 g Feuchtmasse der Zellen, die das Helferprotein enthalten, in 40 ml des Refolding-Puffers B verfahren. Die Zelltrümmer werden anschließend bei 4°C (4000 Upm, 30 min) abzentrifugiert. Die Lipase enthaltenden Überstände werden mit jeweils 20 ml des Überstands, der das Helferprotein enthält, in 25 L demineralisiertem Wasser aufgenommen und für 2 Tage bei 4°C inkubiert.

5.10 Protein-Rückgewinnung

5.10.1 Cross-Flow Filtration

Durch Cross-Flow Filtration über eine 10 kDa Membran wurde das Gemisch aus Lipase bzw. Mutante und Helferprotein auf ca. 1,2 L aufkonzentriert^p.

5.10.2 Ultra-Filtration

Das verbleibende Lipase- bzw. Mutante-Helfer-Gemisch wurde durch Ultra-Filtration über eine 10 kDa Membran bis zu einem Endvolumen von ca. 100 ml weiter aufkonzentriert und bei -20°C aufbewahrt.

°0,31 g Tris, 120 g Harnstoff (8M), 1,78 g Na₂HPO₄ mit dH₂O auf 250 ml auffüllen und mit HCl auf pH 8 einstellen.

^pDie Membran ist im Anschluß mit ca. 3 L 0,1 N Natronlauge zu spülen.

5.10.3 Lyophilisierung

Die aufkonzentrierten Gemische der Ultra-Filtration wurden für 24 h getrennt im Gefriertrockner lyophilisiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.11 Chemische Methoden

5.11.1 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie stellt eine Möglichkeit zur Auftrennung von Stoffgemischen dar, die bereits gasförmig vorliegen oder unzersetzt in die Gasphase gebracht werden können. Die eigentliche Trennsäule besteht aus einer Glas-, Quarz- oder Metall-Kapillare, deren innere Oberfläche mit der stationären Phase bedeckt ist. Die mobile Phase besteht aus einem Gas. Prinzipiell werden zwei Arten der Gaschromatographie unterschieden: von Gasadsorptions-Chromatographie wird im Falle einer flüssigen stationären Phase gesprochen, von Gasverteilungs-Chromatographie hingegen wird im Falle einer festen stationären Phase gesprochen. Unterschiedliche Trennleistungen der stationären Phase können durch Veränderungen der Phasenpolarität bedingt werden.

Das zu analysierende Stoffgemisch wird mittels Trägergas (Stickstoff, Helium, Wasserstoff oder Argon) durch die Kapillare transportiert. Die Auftrennung der Bestandteile erfolgt entsprechend der Substanzaffinität. Die Substanzen lassen sich bezüglich Retentionszeit und Retentionsvolumen charakterisieren (Ionisationsdetektoren und Wärmeleitfähigkeitsdetektoren).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Flammenionisationsdetektor (FID) eingesetzt und eine 25 m 2,6-Me-3-pe- β -cyclodextrin Trennsäule (50 % in OV1701). Hierbei werden die am Ende der Trennsäule angelangten Substanzen in einer Wasserstoff-Flamme ionisiert und der entstehende Ionenstrom detektiert; die resultierende Signalstärke wächst mit zunehmender Substanzmenge, die pro Zeiteinheit ionisiert wird. Der FID eignet sich im Besonderen für quantitative Bestimmungen der Zusammensetzung untersuchter Stoffgemische.

5.11.2 GC-analytische Bestimmung der Produktverteilung

10 mg Lipase (Wildtyp oder Y29L) werden in 1 ml Solvens aufgenommen und mit 40 μmol des Racemats aus 2-Octanol versetzt. Die Veresterung erfolgt anschließend mit 15 μl Vinylacetat bei 40°C unter Rühren im Ölbad. Die Umsetzung wird durch Probenentnahme nach 2h, 4h und 20h kontrolliert. Hierzu werden 15 μl der Reaktionsmischung entnommen und zunächst mit Trifluoressigsäureanhydrid derivatisiert. 0,1 μl der derivatisierten Reaktionsmischung werden in das GC eingespritzt (chirale Säule:) und nach folgendem Temperaturprogramm analysiert.

Tab. 9. Temperaturprogramm der GC-analytischen Bestimmung der Produktverteilung

Substrat	Temperaturprogramm
<i>(rac)</i> -2-Octanol	50°C / 12 min iso / 10°C pro min / 80°C / 10 min iso // 10 psi

Diese Analytik (Tab. 9) erlaubt eine Trennung des derivatisierten (*rac*)-2-Octanols. Durch die Bestimmung Eduktverteilung der Enantiomere und der Umsatzrate c über die gaschromatographisch bestimmten Peakflächen kann mit Gleichung 5 (S. 22) die Enantioselektivität E der Reaktion bestimmt werden.

5.12 Eingesetzte Hardware

Durchgeführte Modelling Untersuchungen wurden auf Silicon Graphics Workstations unterschiedlicher Typen und Prozessoren durchgeführt. Tabelle 10 enthält eine Auflistung der eingesetzten Hardware.

Tab. 10. Die für Molecular Modelling Untersuchungen eingesetzte Hardware

SGI	Prozessor
Octane	MIPS-R10000 und R12000
Indigo 2	MIPS-R10000
Indy	MIPS-R4400

5.13 Eingesetzte Software und Online-Datenbanken

Sequenz- und Strukturdaten wurden aus Online-Datenbanken, z.B. der Swiss-Prot^[6,7] und Brookhaven Protein Database^[13], extrahiert. Verarbeitung der Daten erfolgte mit den Programmen ClustalX^[157], InsightII (MSI), Sybyl6.5 (5 (Tripos, St. Louis, MO), Prepi^[149] und FlexX^[123]. Eine Auflistung befindet sich in Tabelle 11.

Tab. 11. Die für Molecular Modelling Untersuchungen eingesetzte Software und Online-Datenbanken

Programm	URL	Verwendung	Referenz
Swiss-Prot	www.expasy.chsprot	Sequenzen	Bairoch 1997
ClustalX	ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX	Sequenz-Alignment	Thompson 1997
PDB	www.rcsb.orgpdb	3D-Strukturen	Bernstein 1977
InsightII	www.biosym.com	Visualisierung	
Sybyl6.5	www.tripos.com	Visualisierung, Minimierung, Simulation der Molekulardynamik, Auswertung	
Prepi	ftp.icnet.uk/pub/bmm/graphics	Visualisierung	
FlexX	www.gmd.de	Docking	Rarey 1996

5.14 Lipasestrukturen

3D-Koordinaten der Kristall-Strukturen der Lipasen aus *P. cepacia* (PDB Einträge 1oil^[76], 2lip, 3lip^[136], 4lip, 5lip^[87]), *C. rugosa* (PDB Eintrag 1crl^[60], 1lpm^[37], 1lpn, 1lpo, 1lpp, 1lps^[59], 1thg^[137], 1trh^[58]) und *C. antarctica*-B (PDB Eintrag 1lbs, 1lbt^[161], 1tca, 1tcb, 1tcc^[162]) wurden aus der Protein Datenbank PDB^[13] entnommen. Eine Übersicht ist in Tabelle 12 enthalten.

Tab. 12. Charakteristika der Kristallstrukturen der modellierten Lipasen

Eintrag	Methode	Auflösung	Ketten	Atome	Reste	Annotaion	Inhibitor
Lipasen aus <i>P. cepacia</i> :							
1oil	X-Ray	2,1 Å	A, B	5071	640	ACT, BCT	–
2lip	X-Ray	2,1 Å	–	2403	320	CAT	–
3lip	X-Ray	2,0 Å	–	2532	320	ACT, OXY	–
4lip	X-Ray	1,8 Å	D, E	5245	640	ACD, ACE, OXD, OXE	Butylphosphonat
5lip	X-Ray	2,9 Å	–	2381	320	ACT, OXY	Octyl-Phosphonsäure-1,2- Bis-Octylcarbamoyloxy-ethyl Ester
Lipasen aus <i>C. rugosa</i> :							
1crl	X-Ray	2,06 Å	–	4374	534	ACT	–
1lpm	X-Ray	2,20 Å	–	4346	549	–	(1 <i>R</i>)-Menthylhexyl-Phosphonat
1lpn	X-Ray	2,20 Å	–	4211	549	–	Dodecansulfonat
1lpo	X-Ray	2,20 Å	–	4264	549	–	1-Hexadecansulfonsäure
1lpp	X-Ray	2,05 Å	–	4400	549	–	1-Hexadecansulfonsäure
1lps	X-Ray	2,20 Å	–	4240	549	–	(1 <i>S</i>)-Menthylhexyl-Phosphonat
1thg	X-Ray	7,80 Å	–	4614	544	ACT	Pyroglutamin-Säure
1trh	X-Ray	2,10 Å	–	4351	534	ACT	–
Lipasen aus <i>C. antarctica</i> :							
1lbs	X-Ray	2,60 Å	–	2455	317	CT	N-Hexylphosphonat-Ethyl-Ester
1lbt	X-Ray	2,50 Å	–	2543	317	CT	Methylpenta(oxyethyl)- Heptadecanoat
1tca	X-Ray	1,55 Å	–	2638	317	CAT	–
1tcb	X-Ray	2,10 Å	A, B	5186	634	CTA, CTB	–
1tcc	X-Ray	2,50 Å	A, B	4855	634	CTA, CTB	–

5.15 Charakteristika der Substrat-Bindestellen in Lipasen

Viele Kristallstrukturen enthalten kovalent gebundene, substratanaloge Inhibitoren in der Bindestelle der Lipasen (vgl. Abb. 13, S. 17), die dem ersten tetrahedralen Intermediat (vgl. Abb. 7, S. 10) im Hydrolyse-Mechanismus ähnlich sind. Da der Zusammenbruch dieses ersten Intermediats und der Übergang zum entsprechenden Acylenzym den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion darstellt, ist die Kenntnis über die Orientierung der Inhibitoren in Bezug auf bestimmte Aminosäuren der Bindestelle für Docking-Untersuchungen von besonderer Bedeutung.

Die Annotation der Reste der katalytischen Triade und der das Oxyanion stabilisierenden Reste ist in den PDB-Einträgen bereits enthalten und in Tabelle 13 für die Lipasen aus *P. cepacia*, *C. rugosa* und *C. antarctica* wiedergegeben. Das nucleophile Serin der katalytischen Triade bildet die kovalente Bindung zum Substrat aus und fixiert das Molekül in der Bindetasche. Die beiden Reste der Oxyanionen-Bindestelle stabilisieren das durch den nucleophilen Angriff entstehende Oxyanion des Carboxyl-Sauerstoffs mittels Wasserstoff-Brückenbindungen und geben hiermit die Orientierung des Substrats in der Bindestelle vor.

Tab. 13. Annotierte Aminosäuren der katalytischen Triade und der Oxyanion-stabilisierenden Bindetasche.

Lipase	Katalytische Triade			Oxyanion Bindetasche	
<i>P. cepacia</i>	Ser87	Asp264	His286	Leu17	Gln88
<i>C. rugosa</i>	Ser209	Glu341	His449	Gly124	Ala210
<i>C. antarctica</i> -B	Ser105	Asp187	His224	Thr40	Gln106

Zur weiteren Charakterisierung der Bindestellen wurden Connolly-Oberflächen^[34] der Lipasen berechnet und entsprechend der hydrophoben Eigenschaften eingefärbt. Somit lassen sich die Carboxy-Funktion und der OH-funktionale Teil der Substrate in den Bindetaschen positionieren. Dem manuellen Docking eines neuen Substrats liegen also nachfolgende drei Schritte zugrunde:

- Fixierung des Carbonyl-Kohlenstoffatoms,

- Orientierung des Oxyanions und
- Positionierung der Carboxy- und des OH-funktionalen Substratteile.

5.16 Manuelles Docking der Substrate

Beide enantiomere Formen der sekundären Alkohole wurden kovalent in die Bindestelle der Lipase eingebaut. Für jedes Enantiomer mußten prinzipiell zwei unterschiedliche Konformationen des ersten tetrahedralen Intermediats in der Lipase aus *P. cepacia* (PDB Eintrag 3lip) berücksichtigt werden. Die beiden Konformationen wurden als produktiv und nicht-produktiv in Bezug auf die katalytische Effizienz der Ausrichtung des aktiven Histidins zum Alkohol-

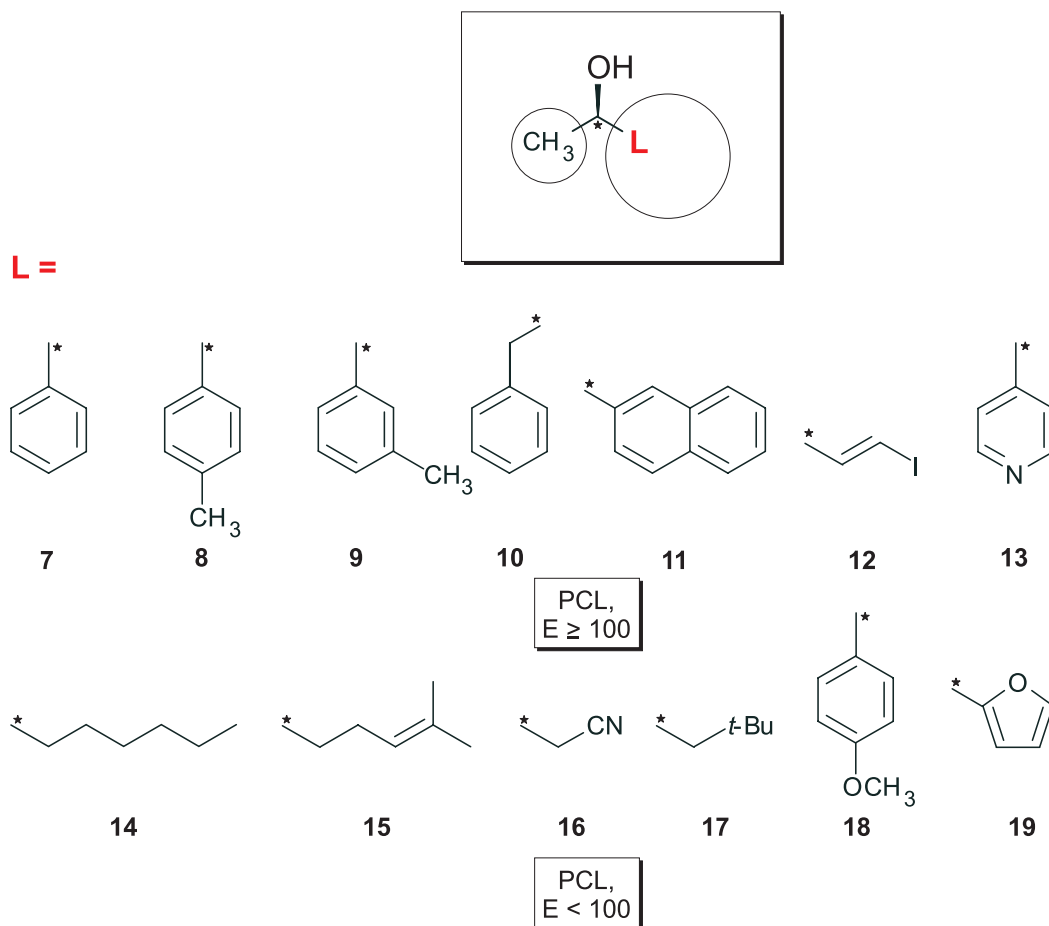


Abb. 22. Modellerte sekundäre Alkohole, die $-\text{CH}_3$ als mittleren Substituenten am Stereozentrum enthalten. Die Substrate sind unterteilt nach den experimentell ermittelten inhärenten Enantioselektivitäten^[8,25,26,28,55,64,70,78,81,91,93,111,114,134,154,153,160,168,4] $E \geq 100$ und $E < 100$.

Sauerstoffatom des Substrats klassifiziert. Abbildung 22 (S. 55) enthält eine Übersicht über die sekundären Alkohle **7-19** mit $-\text{CH}_3$ als mittlerem Substituenten, die kovalent in die Bindestelle der Lipase aus *P. cepacia* gebunden wurden.

Beispielhaft für alle Substrate sind die produktiven Bindungsmodi beider Enantiomere eines ausgewählten Substrats ($M = -\text{CH}_3$, $L = -\text{furyl}$) in Abbildung 23 dargestellt. Die Säureseite wird jeweils im sogenannten *hydrophobic crevice* und der große Substituent L am Stereozentrum im *hydrophobic dent* gebunden. Die Hydrophobizität der beiden Bindestellen ist an der Einfärbung der Connolly-Oberfläche^[34] deutlich zu erkennen (rot entspricht hydrophoben Bereichen auf der Oberfläche der Lipase). Unterschiede zwischen den Enantiomeren bestehen in der Orientierung des Wasserstoffatoms und des mittleren Substituenten am Stereozentrum. Für das schnell umgesetzte Enantiomer bindet der mittlere Substituent im Eingangsbereich des *hydrophilic trench* und das Wasserstoffatom weist gegen eine starre Wand der Lipase, die hauptsächlich aus Atomen des Protein-Rückgrats besteht. Für das langsam umgesetzte Enantiomer sind die Positionen des Wasserstoffatoms und des mittleren Substituenten vertauscht, woraus sich insbesondere für den mittleren Substituenten ungünstige sterische Wechselwirkungen ergeben. Die Ober-

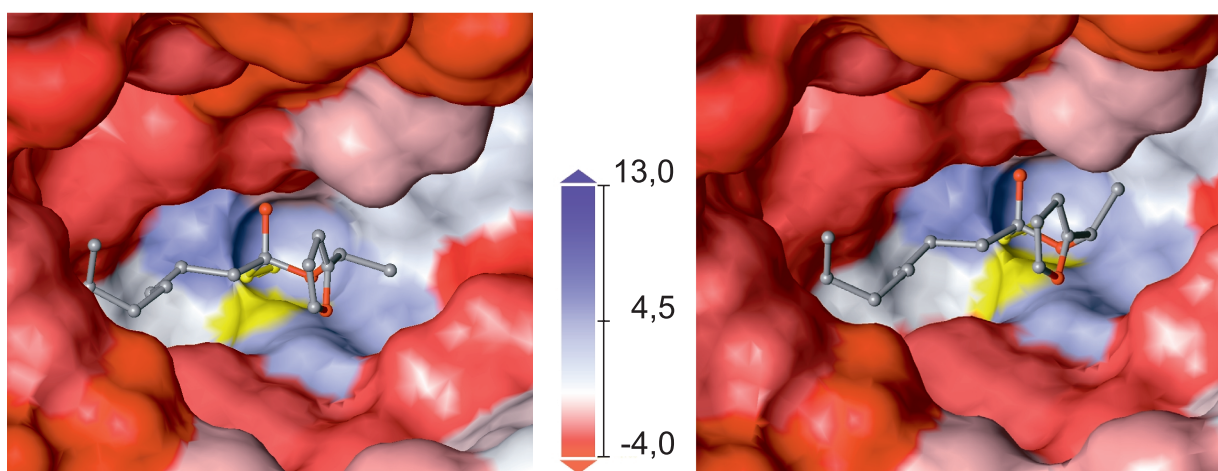


Abb. 23. Modellierte Strukturen von (*R*)- und (*S*)-1-(2-Furyl)-Ethanol in der Bindetasche der Lipase aus *P. cepacia*; die Oberfläche ist entsprechend der hydrophoben Eigenschaften eingefärbt. Die Oberfläche des Wasserstoffatoms des aktiven Histidins ist zur Veranschaulichung der räumlichen Nähe zum Seitenketten-Sauerstoffatom des aktiven Serins und zum Alkohol-Sauerstoffatom des Substrats gelb gekennzeichnet.

fläche des Wasserstoffatoms des aktiven Histidins ist gelb gekennzeichnet, um die räumliche Nähe und somit die Fähigkeit zur Ausbildung stabilisierender Wasserstoff-Brückenbindungen zum Seitenketten-Sauerstoffatom des aktiven Serins und zum Alkohol-Sauerstoffatom zu veranschaulichen.

In Abbildung 24 sind weitere sekundäre Alkohole **20-36** angegeben, die kovalent in die Bindestelle der Lipase aus *P. cepacia* gebunden und analysiert wurden.

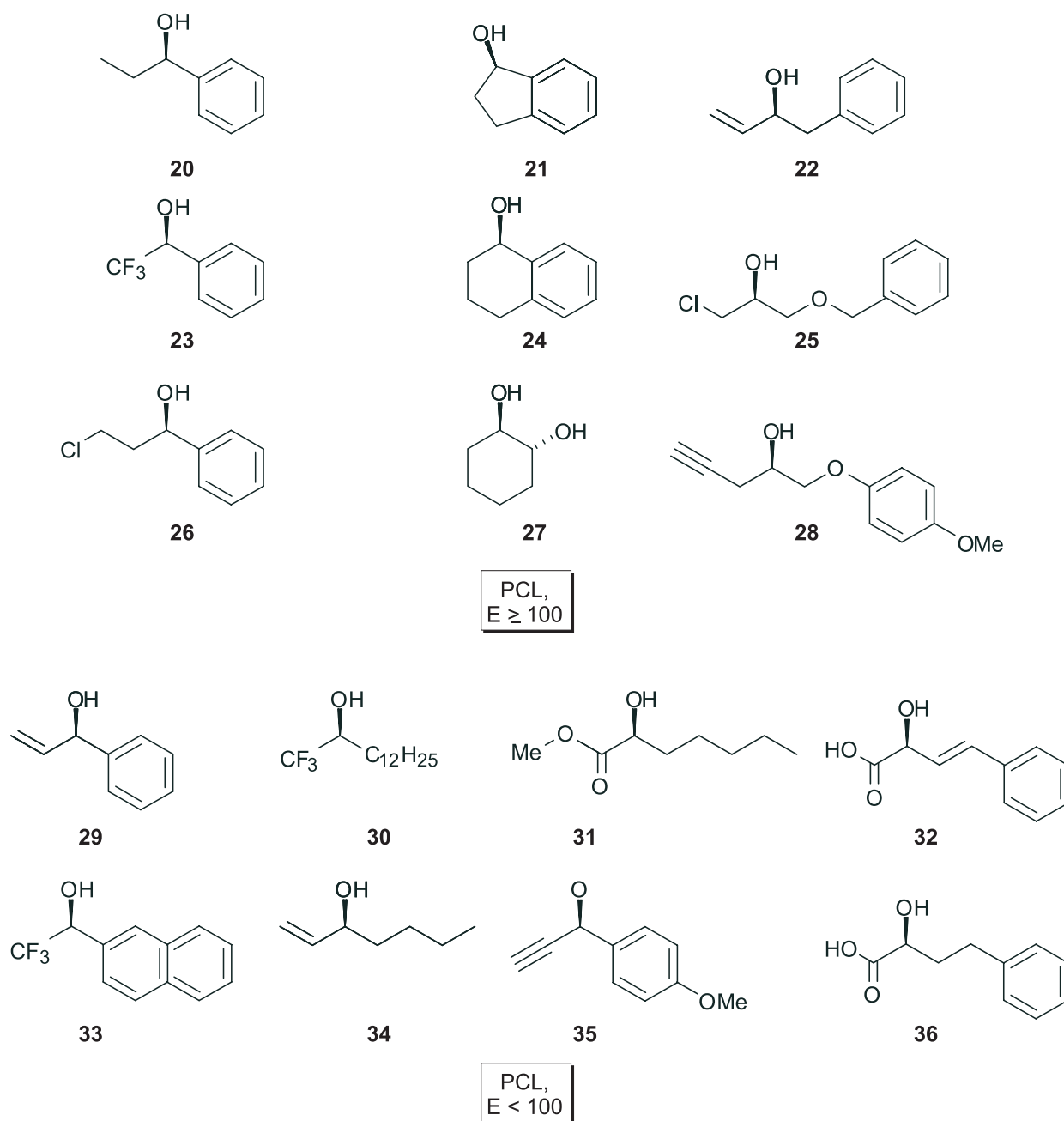


Abb. 24. Modellerte sekundäre Alkohole, die nicht -CH_3 als mittleren Substituenten am Stereozentrum enthalten. Die Substrate sind unterteilt nach den experimentell ermittelten inhärenten Enantioselectivitäten^[8,25,26,28,55,64,70,78,81,91,93,111,114,134,154,153,160,168,4] $E \geq 100$ und $E < 100$.

5.17 Docking mit FlexX

Bei FlexX handelt es sich um ein kommerzielles Docking-Programm zur Vorhersage von Wechselwirkungen zwischen Enzym und Ligand (Inhibitor oder Substrat). FlexX gibt ebenso Auskunft über die Geometrie des Komplexes und über die freie Bildungsenthalpie. Voraussetzung ist allerdings eine dreidimensionale Rezeptorstruktur, die der des komplexierten Zustands ähnelt, da die Struktur des Enzyms während des Dockings als absolut rigide behandelt wird. Flexibel ist lediglich der Aufbau des Liganden in der Bindestelle des Enzyms. Eine Berücksichtigung der durch ein spezifisches Substrat induzierten Anpassung des Rezeptors und die hieraus resultierenden spezifischen Enzym-Ligand-Wechselwirkungen können somit nicht erfolgen. FlexX, insbesondere die implementierte Scoring-Funktion, eignet sich somit nicht zur Bewertung der tetraedrischen Intermediate in Lipase-katalysierten Umsetzungen.

5.18 Partiaalladungen des ersten tetrahedralen Intermediats

Den modellierten tetrahedralen Intermediaten wurden Partiaalladungen nach der im Software-Paket sybyl6.5 implementierten Gasteiger-Hückel-Methode zugewiesen. Diese ist jedoch nicht parametrisiert für das protonierte aktive Histidin, das nun kovalent gebundene aktive Serin und das Substrat. Partiaalladungen dieser Fragmente wurden entsprechend den semiempirisch (MNDO94/PM3^[42,43,145,146]) berechneten Partiaalladungen^[67] abgeändert (Abb. 25, S. 59).

5.19 Energieminimierung

Tetraedrale Intermediate müssen nach der korrekten Zuordnung der Partiaalladungen Energieminimiert werden, da die durch den manuellen Substrat-Einbau verursachten energetisch ungünstigen Bindungslängen, -winkel und Torsionswinkel die innere Energie des Systems erhöhen und eventuell zu einem Abbruch nachfolgender MD-Simulationen führen können. Die Parameter-Einstellungen sind in Tabelle 14 (S. 60) gegeben; im Übrigen, z.B. für den Wert des Cut-off, wurden Standard-Einstellungen des Sybyl6.5 Programmpaketes eingesetzt. Energieminimierungen erfolgen bis zum nächstliegenden lokalen Energieminimum des Intermediats, wohingegen das Ziel molekuldynamischer Simulationen das globale Energieminimum ist (Abb.

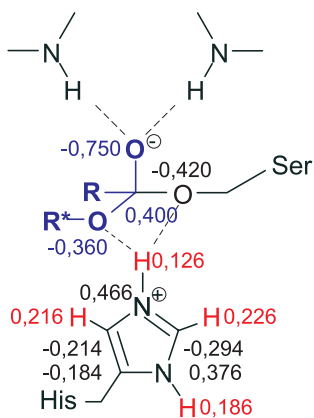


Abb. 25. Schematische Ansicht des katalytischen Zentrums: katalytisches Histidin und Serin sowie ein kovalent gebundenes Substrat (blau), diese repräsentieren das erste tetraedrale Intermediat Lipase-katalysierter Hydrolysen. Säure- und Alkohol-Part des Substrats sind mit R bzw. R* abgekürzt. Die nach der Gasteiger-Hückel-Methode (schwarz) modifizierten Partialladungen (farbig) der betroffenen Atome sind angegeben.

26).

Das Energieminimierungs-Prinzip beruht auf iterativen Techniken, die die Atomkoordinaten solange variieren, bis ein lokales Minimum nahe der Startkoordinaten gefunden wird. Informationen über das globale Energieminimum des Systems können hieraus nicht gewonnen wer-

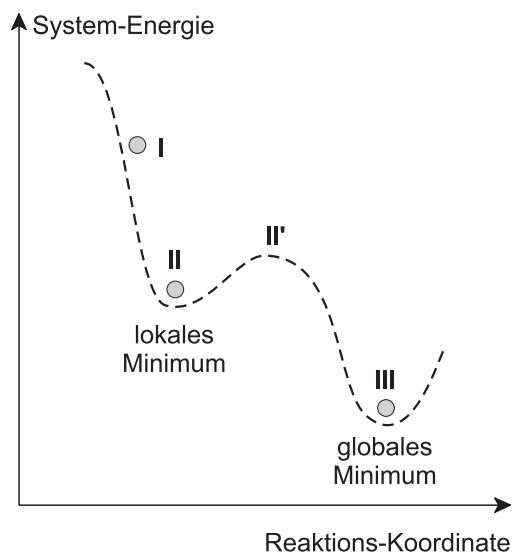


Abb. 26. Energieminimierungen führen ein System von einem gegebenen Startpunkt (I) aus in das nächstliegende lokale Energieminimum (II). MD-Simulationen hingegen können Energiebarrieren überwinden (II') und enden im globalen Energieminimum (III) des Systems.

Tab. 14. Standard-Einstellung der Energieminimierungen.

	SIMPLEX	Powell
Schritte	20	100
Abbruch-Kriterium	Gradient	Gradient
Gradient	1000 kcal/mol	0,05 kcal/mol

den. Eine Vorminimierung (SIMPLEX^[118]) ist notwendig, da die Systeme durch den manuellen Einbau der Substrate häufig stark verzerrt sind. SIMPLEX-Iterationen verlaufen ableitungsfrei und können deshalb Systeme optimieren deren Energiehyperfläche und deren Ableitung nicht stetig sind. Die angegebene Schrittzahl in Tabelle 14 von 20 Schritten für eine SIMPLEX-Minimierung führte in jedem Fall zum Erreichen des Abbruchkriteriums. Der Powell-Algorithmus^[117] legt im Anschluß eine Richtung im n -dimensionalen Raum fest und verfolgt diese Richtung solange, bis das nächstliegende lokale Minimum erreicht ist.

5.20 Molekulardynamische Simulationen

Eine umfangreiche Zusammenfassung der Grundlagen molekulardynamischer Simulationen ist in Kapitel 4 gegeben.

Alle MD-Simulationen der vorliegenden Arbeit wurden *in vacuo*, d.h. ohne Berücksichtigung von Lösungsmittel-Einflüssen (Dielektrizitätskonstante = 1,0^[56]) und unter Verwendung des Tripos Force Fields des Programm-Paketes sybyl6.5 durchgeführt. Tabelle 15 enthält die Parameter der Simulationen. Die Simulationen basieren auf drei jeweils 1000 ps dauernden Heizschrit-

Tab. 15. Standard-Einstellung molekulardynamischer Simulationen.

	Dauer [ps]	Temperatur [K]	Schrittweite [fs]	Kopplung [fs]	Startgeschwindigkeit
Phase I	1000	5	1,0	10	previous
Phase II	1000	30	1,0	10	previous
Phase III	1000	70	0,5	100	previous
Phase IV	5000	100	0,5	100	previous

ten (I-III) in denen dem System kinetische Energie zugeführt wird. Im letzten Schritt erfolgt die Aufheizung auf die Endtemperatur von 100 K, eine Relaxation des Systems bei 100 K sowie der abschließende Produktionsschritt, der für die analytische Bewertung der tetrahedralen Intermediate notwendig ist. Eine Gesamtdauer von 5000 ps der Phase IV stellte sich im Vergleich (10000 ps und 15000 ps) als ausreichend heraus.

Atome des Protein-Rückgrats der Lipasen wurden bei allen durchgeführten Simulationen festgehalten. Dies ist vor allem auf die lösungsmittelfreie Umgebung (*in vacuo*) des Systems zurückzuführen, ein komplett freies Enzym könnte seine dreidimensionale Struktur *in vacuo* nicht aufrecht erhalten und würde sich entfalten. Dieser Effekt wird durch die Fixierung der Atome des Protein-Rückgrats unterbunden.

Für Punktmutationen wurden zuerst verkürzte MD-Simulationen durchgeführt (Tab. 16). Ausichtsreiche Varianten wurden im Anschluß nachsimuliert (Tab. 15, S. 60).

Tab. 16. Einstellungen molekulardynamischer Simulationen von Punkt-Mutationen tetrahedraler Intermediate.

	Dauer [ps]	Temperatur [K]	Schrittweite [fs]	Kopplung [fs]	Startgeschwindigkeit
Phase I	500	5	1,0	10	previous
Phase II	500	30	1,0	10	previous
Phase III	500	70	0,5	100	previous
Phase IV	2500	100	0,5	100	previous

5.21 Auswertung der MD-Simulationen

5.21.1 Trajektorien

Trajektorien lassen sich mit Sybyl visualisieren und geben sowohl einen Eindruck über die Qualität der Simulation, als auch über spezifische Wechselwirkungen des Substrats mit der Bindestelle der Lipase. Während der Aufheizphase kann sich das System stark dynamisch verhalten, da sich z.B. innere Spannungen des Systems lösen. Es ist jedoch zu berücksichtigen,

daß es durch sprunghaftes Aufheizen zu lokalen Bereichen hoher Energie (in der Visualisierung rot gekennzeichnet) kommen kann, die den Substrat-Enzym-Komplex zerstören können. Die Ausrichtung von Aminosäuren in der Bindestelle der Lipase auf das Substrat während der Simulationen geben bereits erste Hinweise auf spezifische Wechselwirkungen der Reaktionspartner.

5.21.2 Mittlere Strukturen

Aus insgesamt 25 Strukturen der Produktionsphase der MD-Simulationen werden nach visueller Prüfung der Trajektorie mit Sybyl mittlere Strukturen der Substrat-Enzym-Komplexe berechnet. Das System hat zu diesem Zeitpunkt die Heiz- und die Relaxationsphase bereits überschritten und befindet sich in der Produktionsphase. Aus der Überlagerung der 25 Strukturen geben sich auch flexible Bereiche der Bindestelle und des Substrats wieder⁹. Mittlere Strukturen dürfen nicht über zwei oder mehr relevante Grenzstrukturen gebildet werden, da diese in keinem Fall einen realen, für die analytische Auswertung geeigneten Zustand beschreiben würden.

5.21.3 Zuordnung der Bindungsmodi

Mittlere Strukturen beider Enantiomere wurden in produktive und nicht-produktive Bindungsmodi unterteilt. Dies ist beispielhaft in Abbildung 27 (S. 63) für (*S*)-1-(2-Furyl)-Ethanol gezeigt. Deutlich zu erkennen ist, daß in der produktiven Form die katalytisch essentiellen Wasserstoff-Brückenbindungen ausgebildet werden können, wohingegen keine stabilisierende Wechselwirkung zwischen Wasserstoffatom des aktiven Histidins und Alkohol-Sauerstoffatom im nicht-produktiven Bindungsmodus zustande kommt. Der strukturelle Unterschied läßt am besten durch den den Torsionswinkel $O^- - C^{cov} - O_{alc} - C^*$ beschreiben: für (*S*)-1-(2-Furyl)-Ethanol beträgt er $48,5^\circ$ in der produktiven Form und $-178,8^\circ$ in der nicht-produktiven Anordnung.

Prinzipiell müssen also für jedes Substrat zwei enantiomere Formen in jeweils zwei unterschiedlichen Bindungsmodi berücksichtigt werden. Es hat sich jedoch gezeigt, daß der nicht-produktive Bindungsmodus schnell umgesetzter Enantiomere nur bis 70 K stabil ist und danach in eine produktive Konformation übergeht.

⁹Es ist unbedingt anzumerken, daß diese Information in den mittleren Strukturen verloren geht.

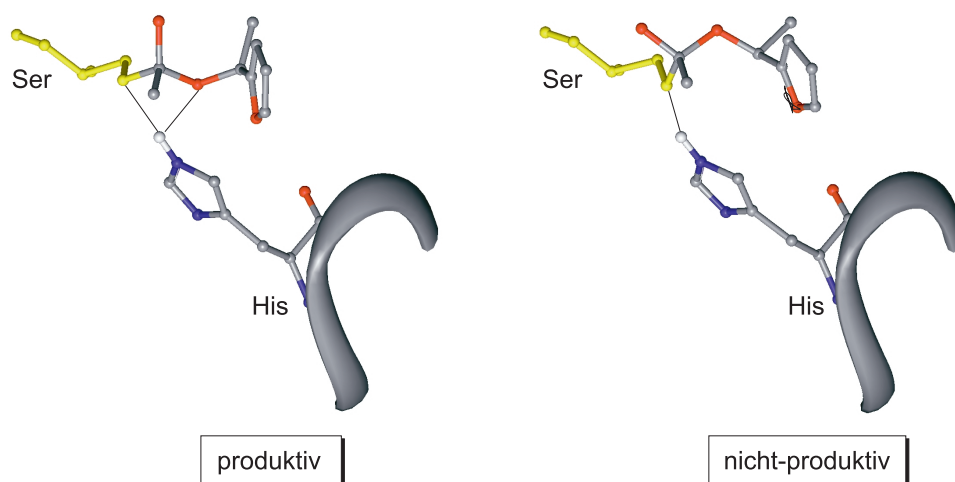


Abb. 27. Illustration der produktiven und der nicht-produktiven Bindungsmodi am Beispiel des (*S*)-1-(2-Furyl)-Ethanoles (langsam umgesetztes Enantiomer). Gezeigt sind die Atome des aktiven Serins (gelb), des aktiven Histidins und des Substrats sowie der Loop-Bereich in dem sich das aktive Histidin befindet. Deutlich zu erkennen die beiden Wasserstoff-Brückenbindungen des produktiven Bindungsmodus, die eine effektive Übertragung des Protons ermöglichen sowie die fehlende Wasserstoff-Brückenbindung des nicht-produktiven Bindungsmodus, die eine Abreaktion unterbindet. Die unterschiedliche Population der beiden Bindungsmodi ist verantwortlich für die Gesamtgeschwindigkeit mit der das Enantiomer umgesetzt wird.

5.21.4 Analytische Bewertung der berechneten Strukturen

Die geometrische Veränderung durch molekulardynamische Simulationen in Bezug auf die experimentell ermittelte Stereoselektivität der untersuchten sekundären Alkohole erfolgte durch Messung des Abstandes vom Wasserstoffatom des katalytischen Histidins zum Alkohol-Sauerstoffatom des Substrats – $d(\text{H}_{\text{N}\epsilon}\text{-O}_{\text{alc}})$ – eben jenem Abstand, der auch für die Klassifizierung in produktive und nicht-produktive Bindungsmodi verantwortlich ist. In nicht-produktiven Bindungsmodi ist dieser Abstand gewöhnlich $> 3 \text{ \AA}$ und gibt keine Information über die beobachtete Stereoselektivität. Für eine analytische Bewertung der Stereoselektivität wurden deshalb nur produktive Bindungsmodi herangezogen. Abstände $d(\text{H}_{\text{N}\epsilon}\text{-O}_{\text{alc}})$ langsam umgesetzter Enantiomere der Substrate **7-36** sind in Tabelle 18 (S. 88) enthalten.

6 Ergebnisse

6.1 Charakterisierung der Lipase-Bindestellen

Die Bindestellen unterschiedlicher Lipasen lassen sich bezüglich ihrer Bindetaschen, die zur Unterbringung spezifischer Substituenten der Substrate dienen, charakterisieren. Als Gemeinsamkeit läßt sich hierbei der Teil der Bindestellen identifizieren, der den OH-funktionalen Bereich der Substrate bindet. Unterschiede treten in der Bindetasche zur Bindung der Fettsäure auf, sie kann an einer Vertiefung entlang der Lipasen-Oberfläche^[115] (Lipase aus *P. cepacia* und Lipase B aus *C. antarctica*) oder auch in einem Tunnel (Lipase aus *C. rugosa*), der tief ins Innere der Lipase reicht^[59], verlaufen. Dieser sogenannte *hydrophobic tunnel*, wie er im Fall der *C. rugosa* Lipase bezeichnet wird, ist lange genug um eine bis zu 18 C-Atome lange Fettsäure zu beherbergen; er besteht aus den Aminosäuren Gly124, Phe125, Met213, Val245, Pro246, Ser247, Leu302, Leu304, Leu307, Phe345, Phe415 und Val534.

6.1.1 Lipase aus *P.cepacia*

Die Substrat-Bindestelle der Lipase aus *P. cepacia* ist in einer tiefen Einkerbung^[115] an der Enzymoberfläche lokalisiert (Abb. 28, S. 65). Zwei Aminosäuren der katalytischen Triade, Ser87 und His286, sowie die beiden Oxyanion-stabilisierenden Reste Leu17 und Gln88 sind Solvens-exponiert. Die Bindestelle weist drei spezifische Bindetaschen auf, die sich sowohl in der räumlichen Orientierung aber auch in Bezug auf sterische und elektronische Eigenschaften unterscheiden.

Die funktionellen Gruppen der Ester sekundärer Alkohole werden spezifisch in drei Bindetaschen der Lipase aus *P. cepacia* gebunden:

- der *hydrophobic crevice*,
- der *hydrophobic dent* und
- der *hydrophilic trench*^r.

^rAuf eine deutsche Übersetzung der Bindestellen-Bezeichnungen wird zwecks der Eindeutigkeit zur meist englisch-sprachigen Literatur verzichtet.

Der *hydrophobic crevice* (grün colorierte Oberfläche in Abb. 28) ist zur Beherbergung der Säureseite vorgesehen. Er weist einen abgewinkelten Verlauf in der Bindestelle hin zur Enzymoberfläche auf. Der *hydrophobic crevice* setzt sich aus den Aminosäuren Pro113, Ser117, Phe119, Val123, Leu164, Leu167 und Val267 zusammen, die für den hydrophoben Charakter der Bindestasche verantwortlich sind (Für eine Darstellung der hydrophoben Eigenschaften der gesamten Bindestelle vgl. Abb. 27, S. 63).

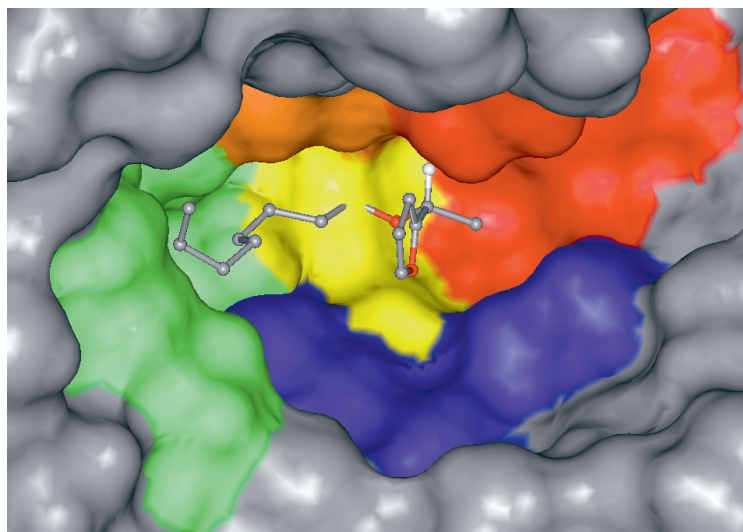


Abb. 28. Illustration der Bindestelle der Lipase aus *P. cepacia*. Folgende Farbgebung der Oberfläche wurde gewählt: gelb – katalytisches Serin und Histidin, orange – Oxyanion-stabilisierende Reste, grün – *hydrophobic crevice*, rot – *hydrophilic trench*, blau – *hydrophobic dent*. In der Bindestelle befindet sich der Octansäure-Ester des sekundären Alkohols (*R*)-1-(2-Furyl)-Ethanol (schnell umgesetztes Enantiomer). Wasserstoffatome sind, mit Ausnahme des sich am Stereozentrums befindlichen Wasserstoffatoms, nicht dargestellt.

Der *hydrophobic dent* besteht aus den Aminosäuren Leu248, Thr251, Val266 und Leu287. Der *hydrophilic trench* setzt sich aus Thr18, Tyr29, His86, Leu287 und Ile290 zusammen. Diese Bindetaschen binden die Substituenten M und L (Abb. 11, S. 15) am Stereozentrum des OH-funktionalen Teils der Ester. Der zur Oberfläche der Lipase verlaufende *hydrophobic dent* beherbergt hierbei bevorzugt den großen, meist unpolaren Substituenten, wohingegen im Eingang zum *hydrophilic trench* – er befindet sich tief im Inneren der Bindestelle – der mittlere Substituent (vgl. Abb. 22, S. 55 und Abb. 24, S. 57) gebunden wird. Die relative Größe der mittleren Substituenten bestimmt, ob die hydrophile Bindetasche vollständig oder nur teilweise ausgefüllt wird.

Zur exakteren Charakterisierung der Bindestelle muß zusätzlich zwischen starren und flexiblen Bereichen der Bindestelle unterschieden werden. Starre Bereiche werden oft durch die Atome des Protein-Gerüsts verursacht, wohingegen flexible Bereiche eher durch Seitenketten der Aminosäuren gebildet werden.

Zwei sehr starre Bereiche der Lipase aus *P. cepacia* müssen in Lipase-katalysierten Umsetzungen sekundärer Alkohole näher berücksichtigt werden:

- der *oxyanion stop* und
- der *His stop*.

Der *oxyanion stop* besteht aus Atomen des Protein-Gerüsts der Aminosäure Thr18. Die Atome befinden sich in direkter Nachbarschaft zu Leu17, einer der Aminosäuren, die das Oxyanion stabilisierenden und zum Stereozentrum der sekundären Alkohole. Bedingt durch das extrem starre Verhalten dieser Atome werden Substituenten am Stereozentrum, die auf diesen Bereich gerichtet und größer als ein Wasserstoffatom sind, sterisch gehindert.

Der *His stop* befindet sich in räumlicher Nähe zum *hydrophobic dent* und wird sowohl durch Atome der Seitenkette von His86, als auch von Atomen des Protein-Rückgrats des katalytischen Histidins His286 gebildet. Auch hier kommt es bei größeren Substituenten am Stereozentrum des Alkohols zu ungünstigen sterischen Wechselwirkungen mit der starren Wand der Lipase. Welche der beiden starren Wände – *oxyanion stop* oder *His stop* – direkt mit dem Substrat interagiert hängt von der Konformation des Substrats in der Bindetasche ab. In molekulardynamischen Simulationen ist die sterische Hinderung von mittleren Substituenten, beispielsweise schon für eine relativ kleine -CH₃-Gruppe, mit diesen starren Bereichen der Lipase deutlich zu erkennen. Häufig erfolgt eine räumliche Reorientierung der Substrate hin zu Konformationen mit geringeren sterischen Wechselwirkungen.

6.1.2 Lipase B aus *C. antarctica*

Die Lipase B aus *C. antarctica* wird häufig in enantioselektiven Reaktionen sekundärer Alkohole eingesetzt, deren mittlerer Substituent maximal zwei Kohlenstoffatome enthält – beispiels-

weise $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH = CH_2$ oder $-C\equiv CH$ ^[81]. Die Ursache hierfür liegt in einer, im Vergleich beispielsweise zur Lipase aus *P. cepacia*, relativ engen und flachen Bindestelle der Lipase (Abb. 29, S. 67).

Die Säureseite des Esters bindet auch hier in einem sogenannten *hydrophobic crevice* (Oberfläche in grün dargestellt), der sich aus den Aminosäuren Thr40, Gln106, Leu109, Asp134, Thr138, Ala141, Leu144, Val154 und Gln157 zusammensetzt. Die Aminosäure L144 bildet den Abschluß des *hydrophobic crevice* und unterbindet die Spaltung der Ester langkettiger Fettsäuren.

Bindetaschen der Substituenten des Alkohol-Parts sind hier der *hydrophobic dent* und die sogenannte *cavity*; sie bestehen aus den Aminosäuren Glu188, Ile189, Ile285 und Val286 bzw. Leu278, Ala279, Ala281 und Ala282. Die *cavity* in der Lipase B aus *C. antarctica* ist das Analogon des *hydrophilic trench* in der Lipase aus *P. cepacia*. Im Gegensatz hierzu ist die *cavity* jedoch nicht über die Bindestelle des mittleren Substituenten hinaus weit geöffnet, sondern

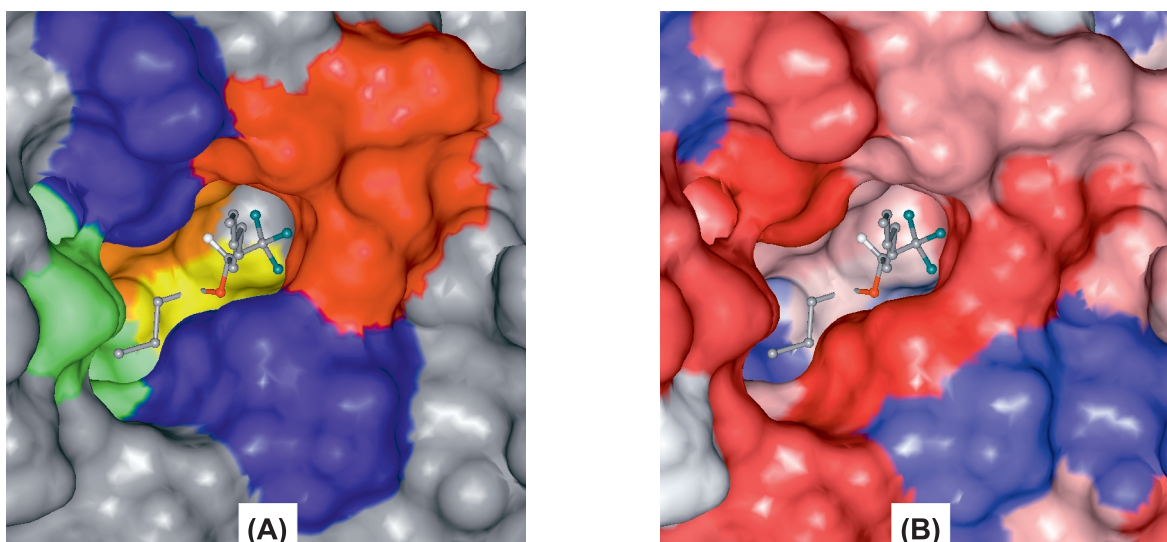


Abb. 29. Illustration der Bindestelle der Lipase B aus *C. antarctica*. (A) Farbgebung entsprechend der unterschiedlichen Bindetaschen. Folgende Farbgebung wurde gewählt: gelb – katalytisches Serin und Histidin, orange – Oxyanion-Hole, grün – *hydrophobic crevice*, rot – *cavity*, blau – *hydrophobic dent*. In der Bindestelle befindet sich der Butansäure-Ester des sekundären Alkohols (*S*)-1,1,1-Trifluor-2-Hexanol (schnell umgesetztes Enantiomer). (B) Einfärbung der Oberfläche nach hydrophoben Eigenschaften der Aminosäuren (rote Oberflächen entsprechen hydrophoben Bereichen).

stellt eine durch die Aminosäure W104^[113] begrenzte Bindetasche dar. Dies spiegelt sich auch in der experimentellen Beobachtung wieder, die zeigt daß sich die Lipase B aus *C. antarctica* vorzugsweise zur Umsetzung sekundärer Alkohole mit einem mittleren Substituenten von ≤ 2 Kohlenstoffatomen eignet^[81].

Auch ein *oxyanion stop* in Analogie zur Lipase aus *P. cepacia* läßt sich für die Lipase B aus *C. antarctica* detektieren. Er wird aus Atomen des Protein-Rückgrats der Aminosäure Thr40 gebildet, die eine der beiden das Oxyanion stabilisierenden Reste darstellt. Abbildung 30 (S. 68) zeigt die sterische Wechselwirkung des OH-funktionalisierten Substratbereiches mit dem als *oxyanion stop* agierenden Thr40. Thr40 besitzt nicht nur die Fähigkeit das intermediär gebildete Oxyanion über eine Wasserstoff-Brückenbindung der Amid-Funktion des Protein-Rückgrats zu stabilisieren, sondern auch über eine zusätzliche stabilisierende Wechselwirkung durch die Seitenkettenfunktion des Threonins (Abb. 30, S. 68).

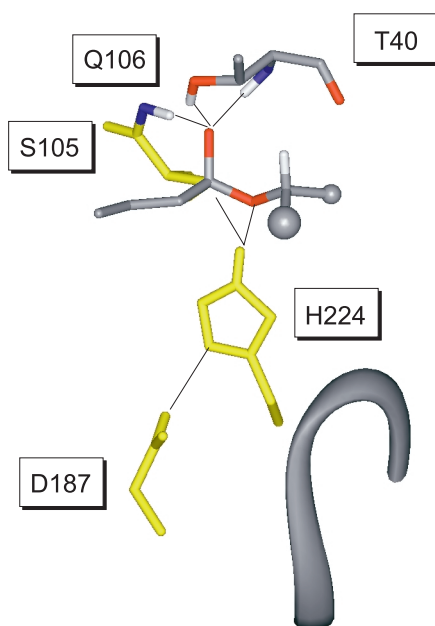


Abb. 30. Die katalytisch essentiellen Wasserstoff-Brückenbindungen in der Lipase B aus *C. antarctica*. Deutlich zu erkennen ist die dreifache Stabilisierung des Oxyanions durch Wasserstoff-Brückenbindungen sowie die räumliche Nähe des OH-funktionalisierten Substratbereiches zur Aminosäure Thr40.

6.1.3 Lipase aus *C. rugosa*

Eine Einteilung der Bindestelle in verschiedene Bindetaschen, die die Substituenten am Stereozentrum der sekundären Alkohole binden, ist aufgrund der enormen Größe der Bindestelle im Vergleich zu anderen Lipasen nicht gerechtfertigt. Neben rein sterischen Effekten zur Festlegung der Stereopräferenz scheint in Lipase-katalysierten Umsetzungen mit der Lipase aus *C. rugosa* auch eine detaillierte Betrachtung elektronischer Effekte vonnöten. Eine genauere Erläuterung soll deshalb anhand konkreter Substrat-Beispiele in Kapitel 6.2.2 (S. 75) erfolgen.

6.2 Molekulare Grundlagen der Stereopräferenz

6.2.1 Anwendung auf die Lipase aus *P. cepacia*

Die Lipase aus *P. cepacia* bevorzugt die (R_r)-konfigurierte Form enantiomerer Substrate^[82]. (R_r) legt hierbei die relative Konfiguration, d.h. die rein von der Substituentengröße abhängige Konfiguration der Enantiomere, fest. Beide Enantiomere werden umgesetzt, wenn auch mit sehr unterschiedlichen Reaktionsraten. Beide Enantiomere müssen somit in einer produktiven, d.h. in einer katalytisch effizienten Konformation im katalytischen Zentrum der Lipase gebunden werden können.

Überprüft wurde diese These durch den kovalenten Einbau von insgesamt 30 chiralen Substraten in die Bindestelle der Lipase aus *P. cepacia* und nachfolgender Durchsuchung des Konformationsraumes der Enantiomere.

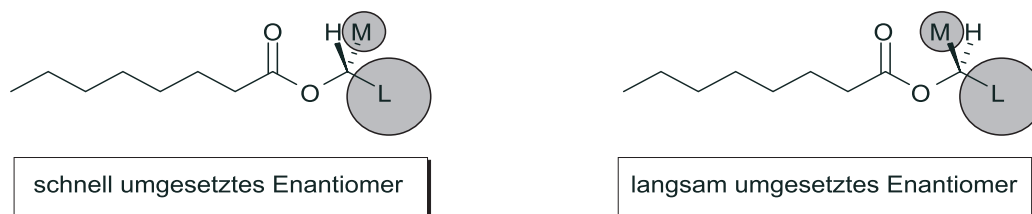


Abb. 31. Einteilung der Octansäure-Ester chiraler sekundärer Alkohole in schnell und langsam umgesetzte Enantiomere in der Lipase-katalysierten Hydrolyse. Die Einteilung erfolgt ausschließlich aufgrund der sterischen Anordnung der Substituenten am Stereozentrum.

Aufgrund sterischer Ansprüche der Substrate, der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substituenten sekundärer Alkohole und der Substrat-Positionierung in der Bindestelle ist die Anzahl möglicher Substrat-Konformationen in der Bindestelle limitiert. Die Anzahl der Bindungsmodi läßt sich durch die Einschränkung, daß lediglich niederenergetische Zustände ausreichend populiert sind um die Enantioselektivität merklich zu beeinflussen, weiter reduzieren. Als für die Enantioselektivität entscheidende Bindungsmodi müssen deshalb nur zwei der möglichen Geometrien (Abb. 33, S. 73 und Abb. 27, S. 63) eines Substrates innerhalb der Bindestelle der Lipase aus *P. cepacia* in Betracht gezogen werden.

Die Betrachtung dieser Bindungsmodi bestätigt die empirische Regel zur Vorhersage der Stereopräferenz^[82] und ermöglicht außerdem die Identifizierung der molekularen Grundlage der Stereopräferenz in Lipase-katalysierten Umsetzungen sekundärer Alkohole.

Die relevanten Bindungsmodi werden als

- produktiver Bindungsmodus und
- nicht-produktiver Bindungsmodus

charakterisiert.

Der produktive Bindungsmodus

Der produktive Bindungsmodus ist charakterisiert durch einen kurzen Abstand zwischen dem Wasserstoffatom $H_{N\epsilon}$ des katalytischen Histidins und dem Alkohol-Sauerstoffatom des Substrats O_{alc} . Die Länge dieses Abstandes ist ein Maß für die Fähigkeit zur Ausbildung der katalytisch essentiellen Wasserstoff-Brückenbindung (Abb. 7, S. 10) zwischen $H_{N\epsilon}$ und O_{alc} . Die Umsetzung beider Enantiomere erfolgt ausschließlich aus den produktiven Bindungsmodi heraus.

Der große Substituent L bindet sowohl für das schnell als auch für das langsam umgesetzte Enantiomer (Abb. 32, S. 72) im *hydrophobic dent* der Bindestelle. Im schnell umgesetzten Enantiomer wird der mittlere Substituent im Eingangsbereich zum *hydrophilic trench* platziert und das Wasserstoffatom am Stereozentrum weist gegen eine starre Wand der Lipase, den *oxyanion stop*. Aufgrund des geringen sterischen Anspruchs des Wasserstoffatoms können ungünstige sterische Substrat-Lipase-Wechselwirkungen in dieser Substituenten-Anordnung vermieden werden.

Im langsam umgesetzten Enantiomer hingegen sind die Positionen von mittlerem Substituenten und Wasserstoffatom vertauscht, hier ragt das Wasserstoffatom in den Eingangsbereich des *hydrophilic trench* und der mittlere Substituent wechselwirkt mit dem *oxyanion stop*. Je nach Größe und Form des mittleren Substituenten – der kleinste untersuchte mittlere Substituent ist eine CH_3 -Gruppe – kommt es hierbei zu starken sterischen Abstoßungen und einer Destabili-

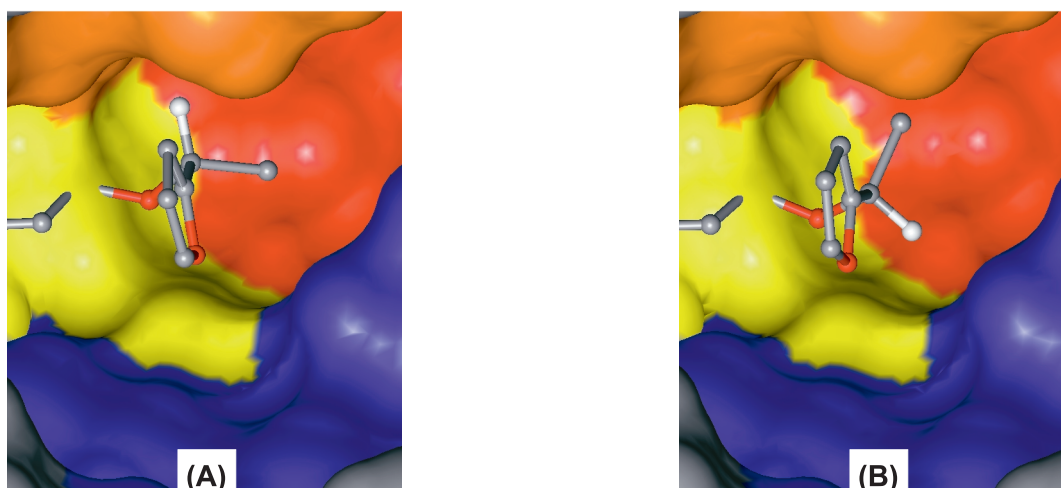


Abb. 32. Illustration der produktiven Bindungsmodi am Beispiel der Enantiomere **(A)** (*R*)-1-(2-Furyl)-Ethanol (schnell umgesetztes Enantiomer) und **(B)** (*S*)-1-(2-Furyl)-Ethanol (langsam umgesetztes Enantiomer). Oberflächen des aktiven Serins und Histidins sind in gelb, des *oxyanion stops* in orange, des *hydrophobic dents* in blau und die des *hydrophilic trench* in rot angezeigt. Deutlich zu erkennen die CH_3 -Gruppe des mittleren Substituenten, die sich im (*R*)-Enantiomer inmitten des Eingangsbereichs zum *hydrophilic trench* befindet, wohingegen sie im (*S*)-Enantiomer gegen die starre Wand des *oxyanion stops* (orange) weist und eine starke sterische Hinderung erfährt.

sierung des produktiven Bindungsmodus für dieses Enantiomer. Die dadurch bedingte relativ hohe potentielle Energie dieses Bindungsmodus resultiert in einer geringen Gleichgewichtskonzentration dieser Anordnung.

Der nicht-produktive Bindungsmodus

Charakteristisch für den nicht-produktiven Bindungsmodus sind ein langer Abstand $d(H_{Ne}-O_{alc}) (> 3 \text{ \AA})$. Die damit verbundene nur mangelhafte Fähigkeit zur Ausbildung der katalytisch essentiellen Wasserstoff-Brückenbindung verhindert einen effektiven Wasserstoff-Transfer im geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt. Eine Umsetzung beider Enantiomere aus dem nicht-produktiven Bindungsmodus findet nicht statt.

Wie auch im produktiven Bindungsmodus bindet der große Substituent beider Enantiomere im *hydrophobic dent* der Bindestelle. Im Gegensatz zum produktiven Bindungsmodus jedoch bindet nun der mittlere Substituent des langsam umgesetzten Enantiomers im Eingangsbereich zum *hydrophilic trench* und erzeugt keinerlei ungünstige sterische Wechselwirkungen. Der mitt-

lere Substituent des schnell umgesetztes Enantiomers hingegen weist gegen eine starre Wand der Lipase – den *His stop*. Durch die resultierende Destabilisierung sind schnell umgesetzte Enantiomere im nicht-produktiven Bindungsmodus in molekulardynamischen Simulationen nur bis 70 K stabil und vollziehen bei $T \geq 100$ K einen Konformations-Wechsel in eine produktive Anordnung. Die Gleichgewichts-Konzentration des schnell umgesetzten Enantiomers im nicht-produktiven Bindungsmodus ist gering.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß schnell umgesetzte Enantiomere bevorzugt einen produktiven und langsam umgesetzte Enantiomere bevorzugt einen nicht-produktiven Bindungsmodus einnehmen (Abb. 33). Der nicht-bevorzugte Bindungsmodus für das langsam umgesetzte Enantiomer (produktiv) ist in molekulardynamischen Simulationen bis 100 K stabil, wohingegen der nicht-bevorzugte Bindungsmodus für schnell umgesetzte Enantiomere (nicht-

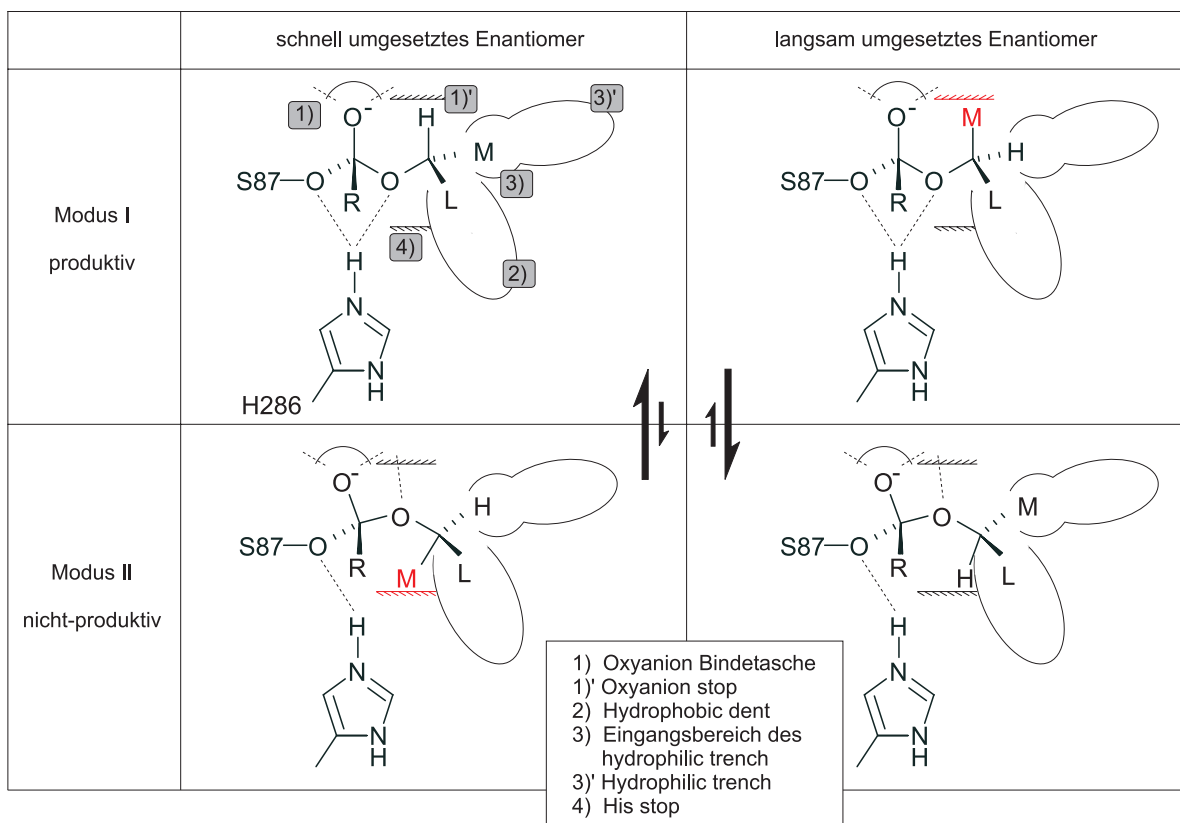


Abb. 33. Schematische Darstellung des jeweils schnell und langsam umgesetzte Enantiomers in Lipase-katalysierten Umsetzungen in den jeweils produktiven und nicht-produktiven Bindungsmodi. Die ungünstigen sterischen Wechselwirkungen mit den mittleren Substituenten M sind in rot gekennzeichnet.

produktiv) bei Temperaturen ≥ 100 K in die bevorzugte Konformation (produktiv) übergeht. Diese Beobachtungen stimmen mit den experimentellen Beobachtungen der Stereopräferenz und der empirisch ermittelten Regel (Abb. 11, S. 15) zur Vorhersage der Stereopräferenz überein.

Die molekulare Grundlage der Stereopräferenz in der *P. cepacia* Lipasen-katalysierten Umsetzung sekundärer Alkohole ist demnach auf die unterschiedlichen Wechselwirkungen der mittleren Substituenten mit den starren Wänden der Lipase – dem *oxyanion stop* (Leu17 und Thr18) und dem *His stop* (His86 und His286) – zurückzuführen.

Ein dritter Bindungsmodus?

Ein dritter Bindungsmodus muß für Substrate, die spezielle sterische und elektronische Eigenschaften erfüllen, in Betracht gezogen werden. In diesem bindet der große Rest beider Enantiomere jeweils im *hydrophilic trench* (Abb. 34). Mittlere Substituenten des produktiven und nicht-produktiven Bindungsmodus reichen häufig nur bis in den Eingangsbereich des *hydrophilic trench*. Im Gegensatz hierzu reicht der große Substituent im dritten Bindungsmodus oft weit in den *hydrophilic trench* hinein. Dies führt für die meisten Substrate (Abb. 22, S. 55 und Abb. 24, S. 57) zu ungünstigen Wechselwirkungen der hydrophoben Substituenten mit den hydrophilen Wänden der Bindetasche wie in Abbildung 34 am Beispiel des 2-Methyl-2-Hepten-3-ols gezeigt. Die Gleichgewichts-Konzentration dieser dritten Bindungsmode ist demnach relativ

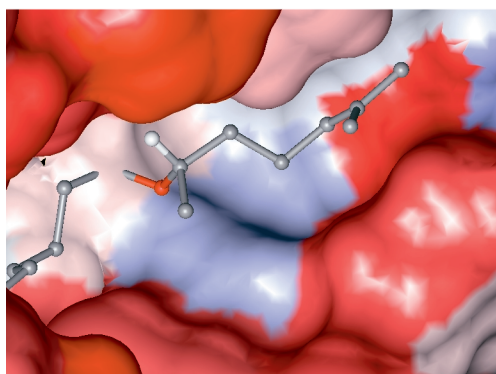


Abb. 34. Darstellung eines dritten denkbaren Bindungsmodus am Beispiel des 2-Methyl-2-Hepten-3-ol. Die Farbgebung der Oberfläche entspricht den hydrophoben Eigenschaften der Aminosäuren (rot – hydrophob, blau – polar). Deutlich zu erkennen die Platzierung des hydrophoben großen Substituenten in der polaren Bindetasche des *hydrophilic trench*.

gering, und nur dann von Bedeutung für die Enantioselektivität, wenn große Substituenten L weit in den *hydrophilic trench* hinein reichen, keine ungünstigen sterischen Wechselwirkungen im schmalen Eingangsbereich verursachen und möglichst polare Substituenten tragen.

Der Abstand $d(H_{N\varepsilon}-O_{alc})$ im dritten Bindungsmodus ist mit dem des produktiven Bindungsmodus vergleichbar. Die katalytisch essentielle Wasserstoff-Brückenbindung zwischen $H_{N\varepsilon}$ und O_{alc} kann effektiv ausgebildet werden. Eine Umsetzung der Enantiomere aus dem dritten Bindungsmodus kann sich auf die Enantioselektivität auswirken, soweit dieser im Gleichgewichtszustand der Reaktion ausreichend besetzt ist.

Amine

Die Amine **37-43**^[79] des Typs $H_2NCHR_1R_2$ (Abb. 35) sind Strukturanaloga der chiralen sekundären Alkohole. Molekulardynamische Untersuchungen dieser Amine zeigen, daß die molekulare Grundlage der Stereopräferenz in *P. cepacia* Lipasen-katalysierten Umsetzungen auch in im Falle der Amine Gültigkeit besitzt und übertragbar ist. Amine weisen, im Gegensatz zu den sekundären Alkoholen, ein wesentlich flexibleres Verhalten während der molekulardynamischen Simulationen auf. Dennoch zeigte sich auch hier bei Simulationstemperaturen bis 100 K für das schnell umgesetzte Enantiomer nur ein produktiver Bindungsmodus und eine Reorientierung des nicht-produktiven Bindungsmodus hin zu einer produktiven Anordnung.

Das entsprechend langsam umgesetzte Enantiomer ist bei Simulationstemperaturen bis 100 K sowohl im produktiven als auch im nicht-produktiven Bindungsmodus zu beobachten. Aus sterischen Gründen bevorzugt das langsam umgesetzte Enantiomer auch hier den nicht-produktiven Bindungsmodus. Dies stimmt mit dem Verhalten der untersuchten schnell und langsam umgesetzten Enantiomere sekundärer Alkohole überein.

6.2.2 Anwendung auf die Lipase aus *C. rugosa*

Die empirische Regel (Abb. 11, S. 15) zur Vorhersage der Stereopräferenz in Lipase-katalysierten Umsetzungen gilt für eine Vielzahl der experimentell untersuchten Lipasen. Auf die Lipase aus *C. rugosa* ist sie jedoch nicht zuverlässig anzuwenden (Abb. 36). Die Lipase aus *C. rugosa* besitzt eine große Bindestelle und wird bevorzugt in der Enantiomerentrennung sperriger Sub-

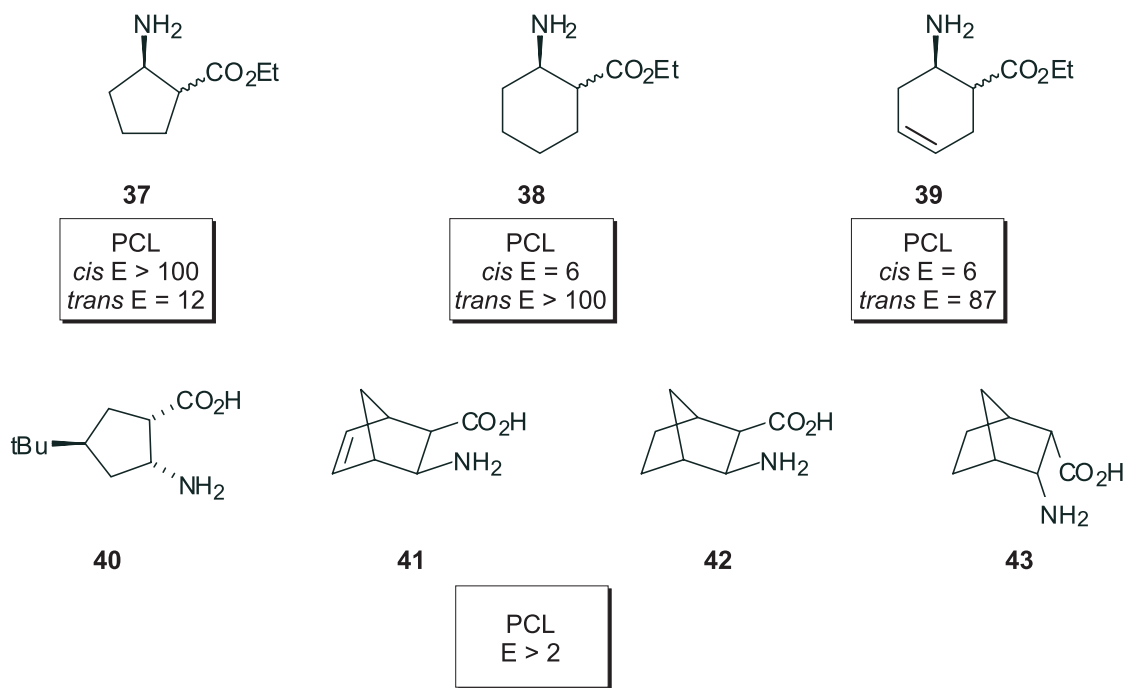


Abb. 35. Experimentell ermittelte Enantioselektivitäten^[79] der untersuchten Amine **37-43** des Typs $H_2NCHR_1R_2$ in der Bindestelle der Lipase aus *P. cepacia*. Dargestellt ist das jeweils schnell umgesetzte Enantiomer.

strate eingesetzt.

Eine Untersuchung des Konformationsraumes lieferte mehrere produktive Bindungsmodi für

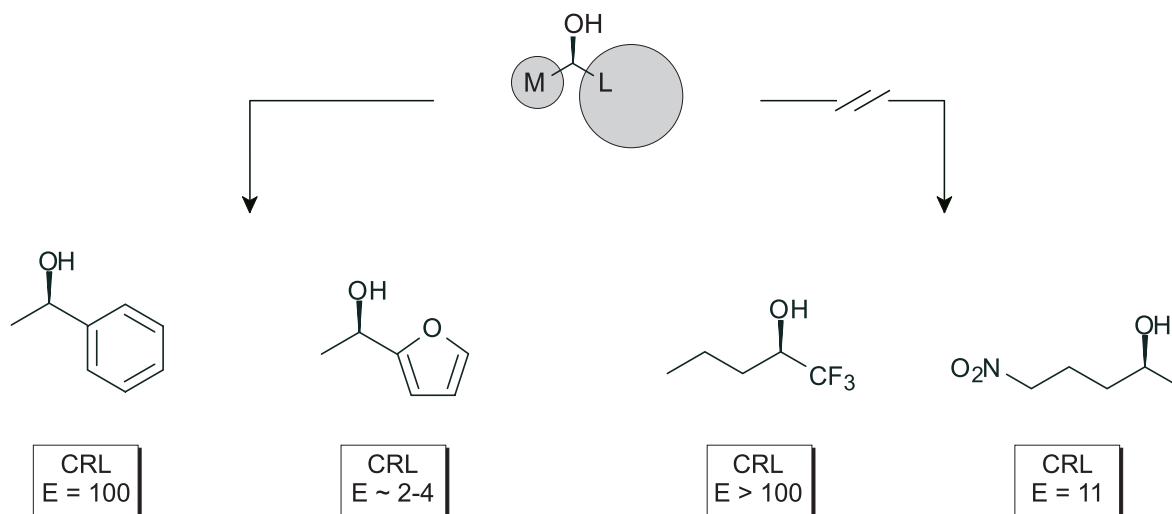


Abb. 36. Beispiele^[81] kleiner sekundärer Alkohole, die in der Umsetzung mit der Lipase aus *C. rugosa* der Regel aus Abb. 11, S. 15 gehorchen bzw. nicht gehorchen. Dargestellt sind die jeweils schnell umgesetzten Enantiomere.

die beiden Enantiomere relativ kleiner sekundärer Alkohole (Abb. 37, S. 78), die sich alle auf die Stereopräferenz auswirken können; einige sogar in dem Maße, daß es zu einer Umkehrung der nach der empirischen Regel^[82] erwarteten Stereopräferenz kommt. Alle am Gleichgewicht beteiligten Konformationen müssten zur Bestimmung der Stereopräferenz, aber noch in viel größerem Maße zur quantitativen Abschätzung der Stereoselektivität berücksichtigt und entsprechend ihrer relativen Bildungsenthalpien gewichtet werden. Es hat sich jedoch in vorangegangenen Arbeiten^[63] bereits gezeigt, daß berechnete Werte der Bildungsenthalpien von Substrat-Enzym-Komplexen zu großen Schwankungen unterliegen, als daß sie sich zur Berechnung der Stereopräferenz oder -selektivität, die oft auf Energiedifferenzen von wenigen kcal/mol basieren, eignen würden.

Kleine, flexible Substrate folgen also weder der empirischen Regel zur Vorhersage der Stereopräferenz in Lipase-katalysierten Umsetzungen sekundärer Alkohole (Abb. 11, S. 15) mit der Lipase aus *C. rugosa*, noch eignen sich quantenchemische Berechnungen der Bildungsenthalpien. Auch eine Auswertung geometrischer Faktoren wie im Falle der Lipase aus *P. cepacia* zur Vorhersage der Stereopräferenz ist ungeeignet.

Im Gegensatz zu kleinen, flexiblen Substraten steigt die Zuverlässigkeit der Vorhersage der Stereopräferenz bei großen, sperrigen Substraten; einige Beispiele sind in Abbildung 38 gegeben. Sperrige Alkohole gehorchen der Regel aus Abbildung 11 (S. 15). Molecular Modelling Ergebnisse identifizieren eindeutig die molekulare Grundlage der Stereopräferenz und beschränken den Konformationsraum auf wenige Bindungsmodi. Dies wurde beispielhaft für die Diastereomere der beiden Verbindungen 3-Phenylbutan-2-ol **44** und 3-*m*-Tolylbutan-2-ol **45** (Abb. 39, S. 79) gezeigt.

Die sekundären Alkohole **44** und **45** besitzen zwei benachbarte Stereozentren α und β . Am α -Stereozentrum sind zwei Substituenten unterschiedlicher Größe (Abb. 39, S. 79) gebunden. Bei den mittleren Substituenten handelt es sich in beiden Substraten jeweils um eine CH_3 -Gruppe, die nachfolgend als ($M\alpha$) bezeichnet wird. Der große Substituent enthält das β -Stereozentrum, das in einen mittleren ($M\beta$) und einen großen Substituenten (L) unterteilt werden kann. Auch bei $M\beta$ handelt es sich sowohl für **44** als auch für **45** um eine CH_3 -Gruppe; bei L handelt es sich um -Phenyl bzw. *m*-Tolyl. Für das Docking der beiden Substrate müssen jeweils vier Diastereomere – (*RR*), (*SS*), (*RS*) und (*SR*) – berücksichtigt werden. Die Regel aus Abbildung 11

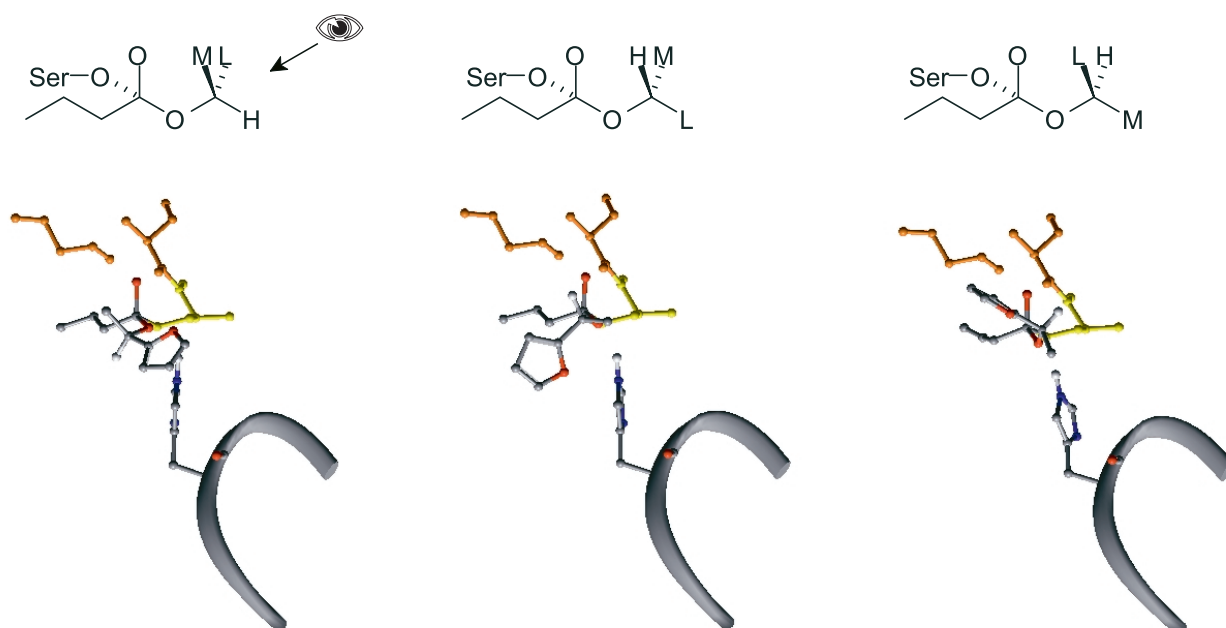


Abb. 37. Drei produktive Bindungsmodi des Butansäure-Esters aus (*R*)-1-(2-Furyl)-Ethanol in der Bindestelle der Lipase aus *C. rugosa*; oben: schematische Ansicht, unten: Ausrichtung des Substrats sowie der Aminosäuren des katalytischen Serins (gelb), Histidins und der das Oxyanion stabilisierenden Reste (orange). Substituenten am Stereozentrum des sekundären Alkohols können durch Rotation um die $O_{alc} - C^*$ -Bindung um jeweils 120° drei energetisch günstige Anordnungen in der Bindetasche der Lipase einnehmen.

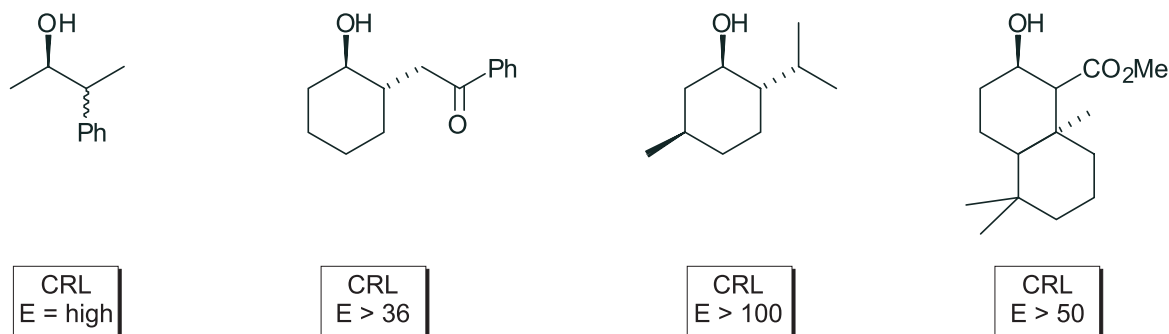


Abb. 38. Beispiele^[81] sperriger sekundärer Alkohole die in der Umsetzung mit der Lipase aus *C. rugosa* der Regel aus Abbildung 11 (S. 15) gehorchen. Dargestellt ist das jeweils schnell umgesetzte Enantiomer.

(S. 15) gibt hierbei die richtige Stereopräferenz für jedes der beiden Enantiomerenpaare. Sie gibt jedoch keine Auskunft über die Reaktivität der Diastereomere der beiden Verbindungen **44** und **45**. Der experimentelle Befund^[4] in der Lipase-katalysierten Hydrolyse der beiden Alkohole zeigt, daß das (*RR*)-Stereoisomer jeweils am schnellsten umgesetzt wird, gefolgt von

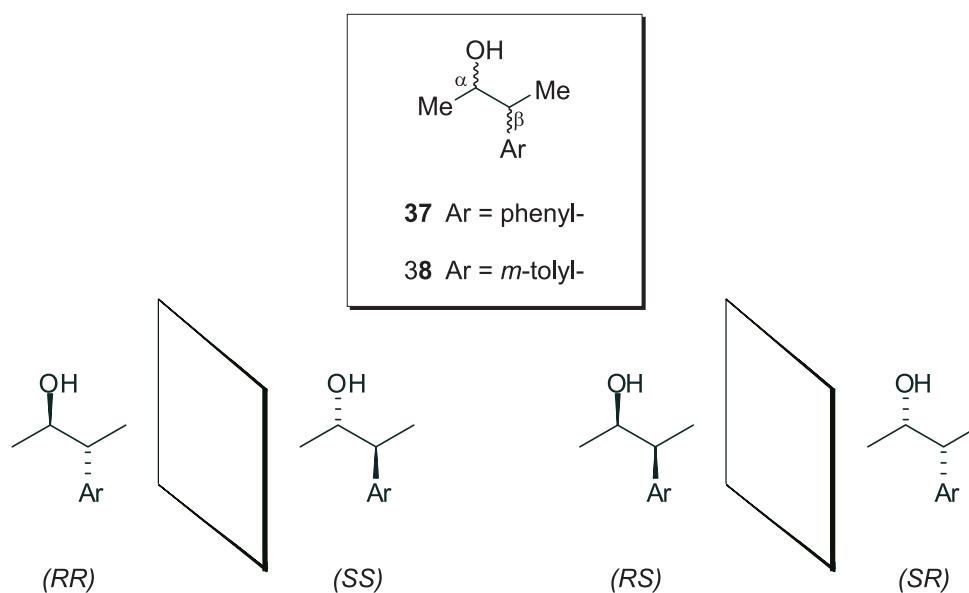


Abb. 39. Die beiden benachbarten Stereozentren α und β der sekundären Alkohole **44** und **45**. Die CH_3 -Gruppe der beiden Stereozentren werden als $\text{M}\alpha$ bzw. $\text{M}\beta$ bezeichnet, der -Aryl Substituent entspricht dem großen Rest L.

den Stereoisomeren (*SS*) und (*RS*), die sich nur geringfügig unterscheiden, und letztlich dem (*SR*)-Stereoisomer. Beide Substrate zeigen vergleichbare Reaktivitäten der Diastereomere und Diastereoselektivitäten, für Substrat **45** konnte jedoch eine geringere Enantioselektivität festgestellt werden^[4].

Molecular Modelling Untersuchungen der Bindestelle der Lipase aus *C. rugosa* identifizieren zwei Bindetaschen – $\text{BP}\alpha$ und $\text{BP}\beta$ – die eine geeignete Form aufweisen um die beiden mittleren Substituenten $\text{M}\alpha$ und $\text{M}\beta$ beider Substrate zu binden. Weiterhin besitzt die Bindestelle zwei starre Wände, bestehend aus Atomen des Protein-Rückgrats der Lipase, die sich direkt über oder unter den beiden Stereozentren befinden. Abbildung 40 (S. 80) veranschaulicht das katalytische Zentrum und klassifiziert die Bindestellen $\text{BP}\alpha$ und $\text{BP}\beta$ anhand des (*RR*) konfigurierten Stereoisomers.

In den kovalent gedockten Intermediaten der Stereoisomere (*RR*) und (*SS*) beider Substrate binden die mittleren Substituenten $\text{M}\alpha$ und $\text{M}\beta$ in den Bindestellen $\text{BP}\alpha$ bzw. $\text{BP}\beta$, und die beiden Wasserstoffatome an den Stereozentren zeigen in Richtung der unflexiblen Wände (Abb. 41, S. 81). Die Enantiomere (*RR*) und (*SS*) weisen somit minimale sterische Abstoßung auf und sind durch hydrophobe Wechselwirkungen in den Bindetaschen stabilisiert. Während molek-

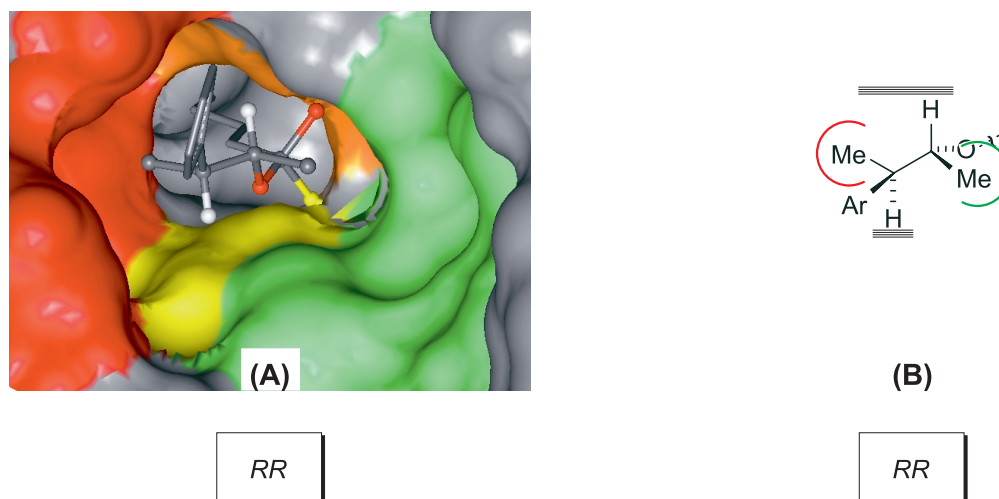


Abb. 40. (A) Charakterisierung der Bindestelle der Lipase aus *C. rugosa* für die sperrigen sekundären Alkohole **44** und **45** mit jeweils zwei benachbarten Stereozentren. Oberflächen der Bindestellen der mittleren Substituenten $M\alpha$ und $M\beta$ sind farblich markiert: $BP\alpha$ – grün, $BP\beta$ – rot. Weiterhin sind das aktive Histidin in gelb sowie die das Oxyanion stabilisierenden Reste in orange gekennzeichnet. (B) Schematische Ansicht des katalytischen Zentrums. In beiden Darstellungen ist das jeweils am schnellsten umgesetzte Stereoisomer *RR* gezeigt.

lardynamischer Simulationen zeigten sich keine konformationellen Veränderungen der beiden Geometrien und die Ausrichtung der Imidazol-Seitenkette des katalytischen Histidins entspricht einer katalytisch produktiven Orientierung. Die Verringerung der Umsatzgeschwindigkeit des (*SS*)-Isomers ist auf die sterische Wechselwirkung der Substituenten des α -Stereozentrums zurückzuführen, welches durch die Inversion der beiden Stereozentren im Vergleich zu (*RR*) nun räumlich näher am katalytischen Histidin platziert ist.

Für das langsamer umgesetzte Enantiomerenpaar (*RS*) und (*SR*) bindet der mittlere Substituent $M\alpha$ in der Bindetasche $BP\alpha$ (Abb. 41, S. 81); in $BP\beta$ ist nun im Gegensatz zum schneller umgesetzten Enantiomerenpaar das Wasserstoffatom des β -Stereozentrums untergebracht. Dieses Wasserstoffatom wird nicht in der Bindetasche stabilisiert und verursacht hierdurch ein flexibles Verhalten der Substrate während der molekulardynamischen Simulationen. Abstoßende Wechselwirkungen treten in beiden Enantiomeren für den mittleren Substituenten $M\beta$ auf. $M\beta$ weist in der Anordnung des Isomers (*RS*) in der Bindestelle der Lipase in Richtung des katalytischen Histidins und drängt die Imidazol-Seitenkette aus einer effizienten katalytischen Orientierung, um dem Raumanpruch der CH_3 -Gruppe gerecht zu werden. Für das (*SR*)-Isomer sind die ab-

stoßenden Kräfte so groß, daß die in Abbildung 41 (S. 81) gezeigte produktive Konformation instabil ist. Dies führt zu einer kompletten Reorientierung des Substrats in der Bindestelle der Lipase während der MD-Simulation, und endet in einer katalytisch nicht-produktiven Anordnung des Histidins (Abb. 42, S. 82).

Die oben angeführten Beobachtungen lassen sich durch einen geometrischen Parameter, den Abstand $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ quantifizieren, der auch in *P. cepacia* Lipase-katalysierten Umsetzungen eine entscheidende Rolle spielt.

Tab. 17. Experimentell ermittelte Reaktivität der Substrate **44** und **45** sowie die berechneten Abstände $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ der tetrahedralen Substrat-Lipase-Komplexe.

Konfiguration (α/β)	Relative exp. Reaktivität ^[4]	Abstand $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ - 44	Abstand $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ - 45
(RR)	1	1,7 Å	1,8 Å
(SS)	2	2,0 Å	2,0 Å
(RS)	3	2,1 Å	2,0 Å
(SR)	4	4,3 Å	4,1 Å

Das (RR)-Isomer besitzt für beide Substrate mit 1,7 Å und 1,8 Å den kürzesten Abstand (Tab. 17, S. 81). Diese Beobachtung korreliert mit der experimentell ermittelten Reaktivität, die für das (RR)-Stereoisomer am höchsten ist. Die Abstände der Diastereomere (SS) und (RS) sind

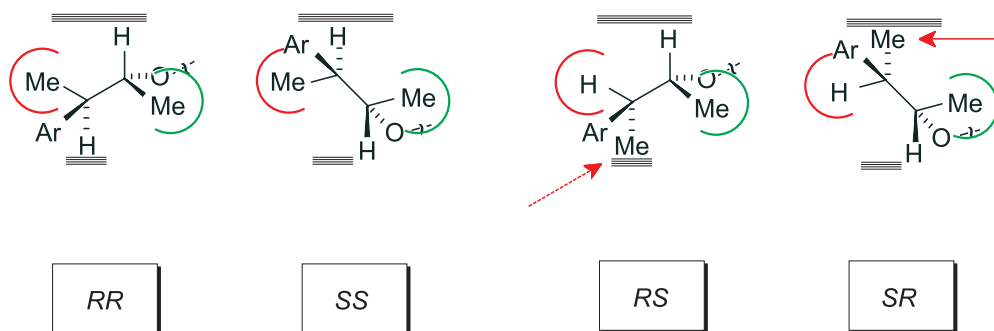


Abb. 41. Schematische Ansicht der jeweils produktiven Bindungsmodi der vier Stereoisomere der Verbindungen **44** und **45** in der Bindestelle der Lipase aus *C. rugosa*. Rote Pfeile kennzeichnen hierbei sterische Abstoßung des Substituenten $\text{M}\beta$.

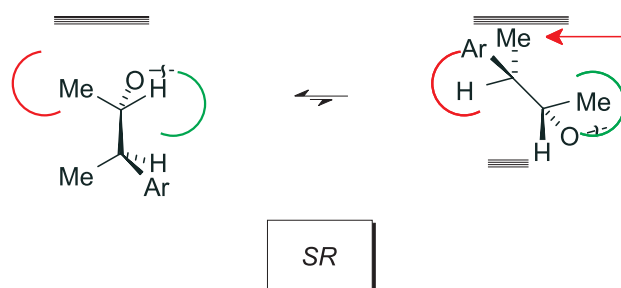


Abb. 42. Schematische Ansicht des produktiven und nicht-produktiven Bindungsmodus des Stereoisomers (*SR*) der Verbindungen **44** und **45**. Rote Pfeile kennzeichnen sterische Abstoßung. Der nicht-produktive Bindungsmodus ist aufgrund starker sterischer Wechselwirkungen des produktiven Bindungsmodus im Gleichgewicht höher populiert.

sich mit 2,0 Å und 2,1 Å sehr ähnlich und belegen die vergleichbaren Umsetzungsrate der beiden Stereoisomere. Der berechnete Abstand des Stereoisomers (*SR*) beider Substrate liegt über 4 Å, was die Ausbildung der katalytisch essentiellen Wasserstoff-Brückenbindung unterbindet. Auch diese Beobachtung gibt deutlich den experimentell ermittelten Sachverhalt wieder, in dem das (*SR*)-Stereoisomer nur sehr langsam umgesetzt wird. Die Gleichgewichts-Konzentration des nicht-produktiven Bindungsmodus ist also sehr hoch. Die experimentell bestimmten Umsetzungsrate der vier Stereoisomere korrelieren mit dem berechneten Abstand $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ beider Substrate.

Die Molecular Modelling Untersuchungen geben in diesem Fall jedoch nicht nur Auskunft über die Stereopräferenz enantiomerer Verbindungen und die relative Umsetzungsgeschwindigkeit der Stereoisomere, sie erlaubt auch einen Vergleich der Aktivität der Lipase aus *C. rugosa* gegenüber den beiden Substraten **44** und **45**^s. Da der Abstand $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ für Substrat (*RR*)-**44** geringfügig kürzer ist als für (*RR*)-**45** sollte Substrat **44** insgesamt schneller umgesetzt werden. Die korrekte Vorhersage der Aktivität erfordert jedoch die Erwägung aller im Gleichgewicht relevant besetzten Bindungsmodi. Für Substrat **45** ergeben sich jeweils zwei unterschiedliche Konformationen, die sich in Bezug auf die CH_3 -Gruppe des *m*-Tolyl-Substituenten unterscheiden. Eine dieser beiden Konformationen des (*RR*)-**45**-Stereoisomers resultiert in einer nicht-produktiven Anordnung. Somit wirken sich also sowohl der etwas kürzere Abstand des Stereoisomers (*RR*)-**44**, als auch die Population einer produktiven und einer nicht-produktiven

^sEin Vergleich ist möglich, da beide Substrate unter den gleichen Reaktionsbedingungen umgesetzt wurden.

Bindungsmodi durch (*RR*)-**45** auf die Präferenz der Lipase gegenüber Substrat **44** aus, die in der Tat experimentell bestätigt wurde.

Die unterschiedlichen Positionen des *meta*-Substituenten müssen prinzipiell auch in den Bindungsmodi der Stereoisomere (*SS*), (*RS*) und (*SR*) berücksichtigt werden. Der katalytisch wichtige Abstand $d(\text{H}_{\text{N}_\epsilon}-\text{O}_{\text{alc}})$ wird hierdurch nur sehr gering beeinflusst, weshalb sich diese Bindungsmodi nicht merklich auf die Vorhersage der Stereopräferenz auswirken.

Für die sperrigen Substrate aus Abbildung 38 (S. 78) ergibt sich zur Bestimmung der Stereopräferenz ein zu den Verbindungen **44** und **45** analoges Bild.

6.2.3 Anwendung auf die Lipase B aus *C. antarctica*

Die Lipase B aus *C. antarctica* und die Lipase aus *P. cepacia* zählen zu den enantioselektivsten Lipasen gegenüber sekundären Alkoholen und gehorchen zuverlässig der Regel zur Vorhersage der Stereopräferenz (Abb. 11, S. 15). So zeigt sich auch in den Molecular Modelling Untersuchungen der beiden Lipasen eine analoge Grundlage der Stereopräferenz. Die Bindestelle der Lipase B aus *C. antarctica* ist jedoch kleiner als die der Lipase aus *P. cepacia*. Die Abgrenzung zwischen den Bindungsmodi fällt demnach wesentlich deutlicher aus. Untersucht wurden tetrahedrale Intermediate der Substrate aus Abbildung 43 (S. 84).

Abbildung 44 zeigt das schnell umgesetzte Enantiomer (*R*)-2-Nonanol im produktiven Bindungsmodus in der Bindestelle der *C. antarctica* Lipase B. Für die Stereopräferenz entscheidend ist hier eine starre Wand, die in Analogie zur *P. cepacia* Lipase als *oxyanion stop* bezeichnet wird, sowie die Bindetasche für den mittleren Rest. Im Gegensatz zur *P. cepacia* Lipase wird in der Lipase B aus *C. antarctica* die Bindestelle für den mittleren Substituenten aus nur zwei Aminosäuren gebildet. Eine dieser Aminosäuren ist Thr40, welche an der Stabilisierung des Oxyanions beteiligt ist und sowohl über die Amidfunktion des Protein-Rückgrats als auch über die Seitenkette eine Wasserstoff-Brückenbindung zum Oxyanion ausbildet (Abb. 30, S. 68). Die zweite Aminosäure ist Trp104, die die Größe der Bindetasche limitiert. Die Bindetasche kann deshalb nur mittlere Substituenten bis maximal zwei Kohlenstoffatome aufnehmen und ist somit vergleichbar mit dem Eingangsbereich des *hydrophilic trench* in der Lipase aus *P. cepacia*. Die tief in der Lipase verlaufende Verlängerung des *hydrophilic trench* fehlt in der Lipase B aus

C. antarctica jedoch.

Aufgrund eines analogen Aufbaus der Bindetaschen der Lipase B aus *C. antarctica* und der Lipase aus *P. cepacia*, besetzen auch in der Lipase B aus *C. antarctica* die schnell umgesetzten Enantiomere bevorzugt einen produktiven Bindungsmodus in dem die katalytisch essentielle Wasserstoff-Brückenbindung des aktiven Histidins zum Substrat effektiv ausgebildet werden kann.

Das entsprechend langsam umgesetzte Enantiomer erhält man durch Vertauschen des mittleren Substituenten und des Wasserstoffatoms am Stereozentrum (Abb. 44). Für den mittleren Substituenten kommt es hierdurch zu starken sterischen Abstoßungen und zur Destabilisierung des produktiven Bindungsmodus. Langsam umgesetzte Enantiomere bevorzugen deshalb auch in der Lipase B aus *C. antarctica* einen nicht-produktiven Bindungsmodus (vgl. Abb.27, S. 63). Der nicht-produktive Bindungsmodus ist durch einen Torsionswinkel $O^- - C_{cov} - O_{alc} - C^* \approx 180^\circ$ charakterisiert.

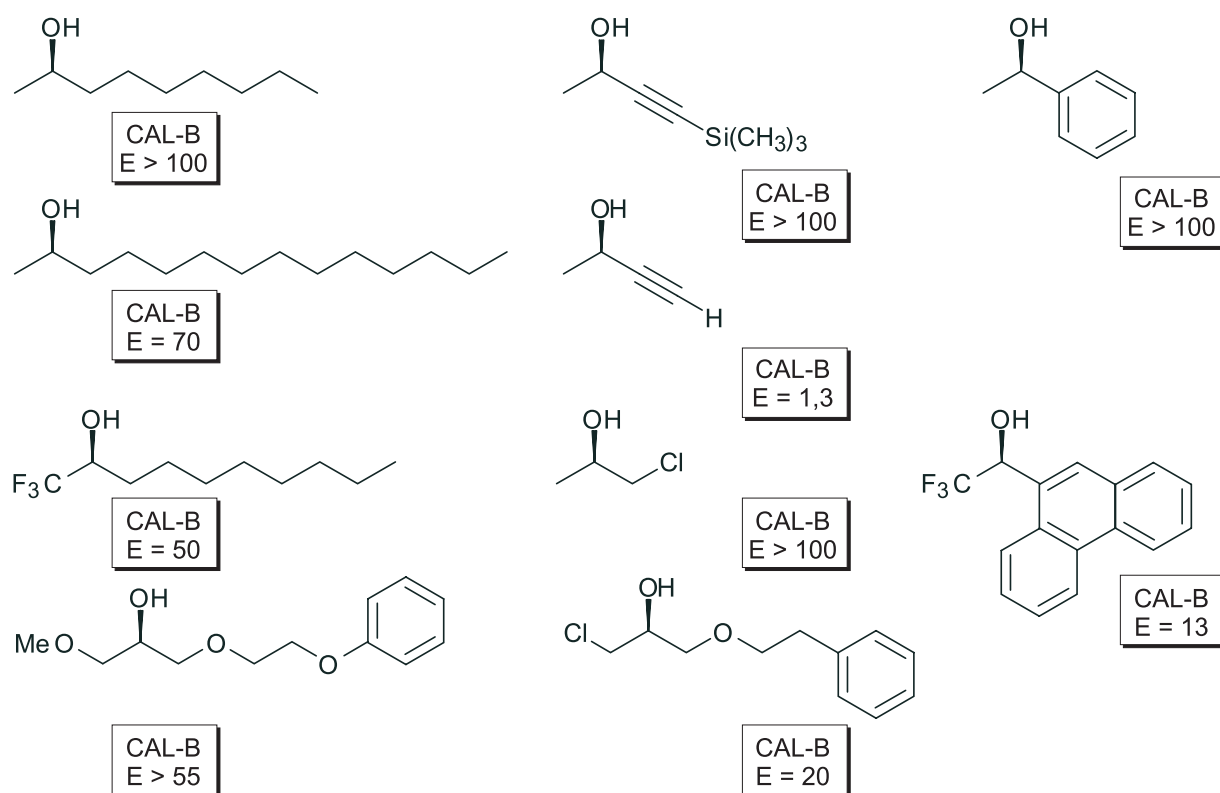


Abb. 43. Untersuchte Substrate in der Bindestelle der Lipase B aus *C. antarctica*. Dargestellt ist das jeweils schnell umgesetzte Enantiomer. Experimentelle Daten wurden der Literatur entnommen [81].

6.3 Molekulare Grundlagen der Stereoselektivität

6.3.1 Enantioselektivität in *P. cepacia* Lipase-katalysierten Umsetzungen chiraler sekundärer Alkohole

Das kovalente Docking der Substrate in die Bindestelle der Lipase aus *P. cepacia* und die molekulardynamischen Simulationen zeigen, daß sich vor allem die Seitenkette des katalytischen Histidins räumlich flexibel verhält. Andere Aminosäuren der Lipase-Bindestelle zeigen kaum Variationen und sind somit ungeeignet, um Aufschluß über spezifische Substrat-Lipase-Wechselwirkungen zu geben. Die Unterschiede in der Seitenketten-Orientierung des aktiven Histidins in Abhängigkeit vom untersuchten Substrat wirken sich direkt auf die Länge des katalytisch bedeutenden Abstandes $d(H_{N\epsilon}-O_{alc})$ aus. Ein kurzer Abstand $d(H_{N\epsilon}-O_{alc})$ sollte nach mechanistischen Gesichtspunkten mit einer effektiven Wasserstoff-Übertragung und somit schneller Umsetzung einhergehen, ein langer Abstand hingegen mit einer gehemmten Wasserstoff-Übertragung und einer langsameren Umsetzung des jeweiligen Enantiomers. Die Differenz der

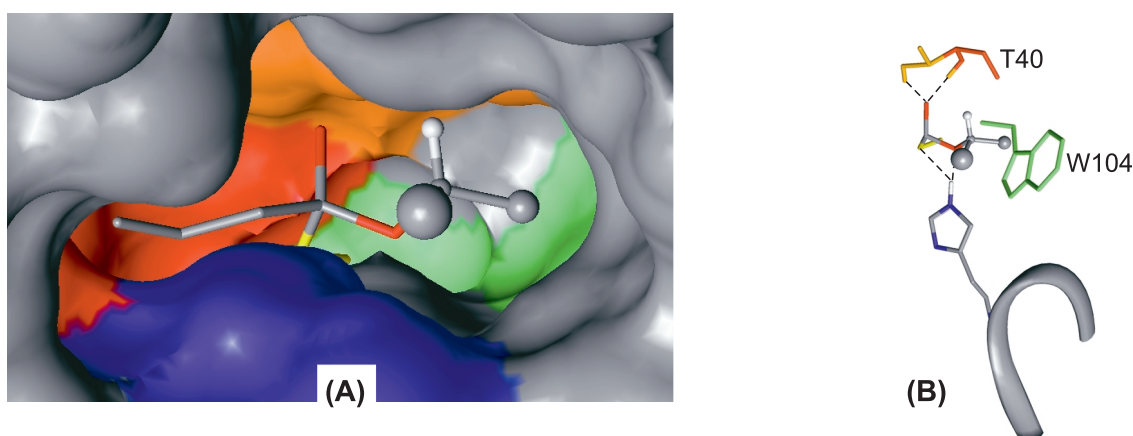


Abb. 44. (A) Einblick in die Bindestelle der Lipase B aus *C. antarctica* mit dem schnell umgesetzten Enantiomer *R*-2-Nonanol. Der große und mittlere Substituent sind durch Kugeln unterschiedlicher Größen angedeutet. Das Wasserstoffatom am Stereozentrum weist gegen die Backbone-Atome der Aminosäure Thr40 (orange), der mittlere Substituent zeigt gegen Trp104 (grün) und der große Substituent bindet im *hydrophobic dent* (blau). Die Säureseite (C4) ist im *hydrophobic crevice* (rot) untergebracht. (B) Die schematische Ansicht zeigt die Wasserstoff-Brückenbindungen von Thr40 und His224 sowie die Seitenkette von Trp104, die die Bindestasche für den mittleren Substituenten beschränkt.

Abstände $\Delta d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ zweier Enantiomere kann demnach Auskunft über die Differenz in deren Umsetzungsraten geben. Die Differenz der Umsetzungsraten zweier Enantiomere aber ist der entscheidende Faktor bei der Bestimmung der Enantioselektivität. Eine quantitative Aussage über die experimentell zu erwartende Enantioselektivität kann demnach über eine analytische Bewertung des geometrischen Parameters $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ erfolgen.

Die tetrahedralen Intermediate beider Enantiomere von insgesamt 30 ausgewählten Substraten (Abb.22, S. 55 und Abb. 24, S. 57) wurden im jeweils produktiven und nicht-produktiven Bindungsmodus anhand des geometrischen Parameters $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ analysiert.

Schnell umgesetzte Enantiomere im produktiven Bindungsmodus

Die Abstände $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ der schnell umgesetzten Enantiomere lagen im Mittel bei 2,5 Å (Mittelwertabweichung: $\pm 0,2$ Å); die Extremwerte lagen bei 2,0 bzw. 2,9 Å. Nur ein Substrat zeigte einen Abstand $< 2,0$ Å.

Bei vergleichbaren Reaktivitäten langsam umgesetzter Enantiomere kann eine Aussage über die experimentell zu erwartende Enantioselektivität aufgrund der Reaktivität des schnell umgesetzten Enantiomers getroffen werden. Je kürzer der Abstand und somit die Umsetzungsrate des schnell umgesetzten Enantiomers in der produktiven Bindungsmode ist, desto höher sollte die experimentell ermittelte Enantioselektivität sein. Eine Korrelation der Abstände $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ mit experimentellen E-Werten konnte jedoch nicht aufgezeigt werden (Abb. 45).

Die Unterschiede zwischen den analysierten Abständen der 30 schnell umgesetzten Enantiomere sind relativ klein ($d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})_{max} - d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})_{min} \approx 1$ Å) und die Abstände scharen sich um den Mittelwert von 2,5 Å. Die Analyse des Abstandes $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ in tetrahedralen Intermediaten schnell umgesetzter Enantiomere ist demnach ungeeignet zur Vorhersage der experimentell zu erwartenden Enantioselektivität.

Langsam umgesetzte Enantiomere im produktiven Bindungsmodus

Die Abstände langsam umgesetzter Enantiomere der Verbindungen **7-36** lagen zwischen 1,6 und 3,2 Å, im Mittel bei 2,3 Å (Mittelwertabweichung: $\pm 0,3$ Å). Sie besitzen also eine we-

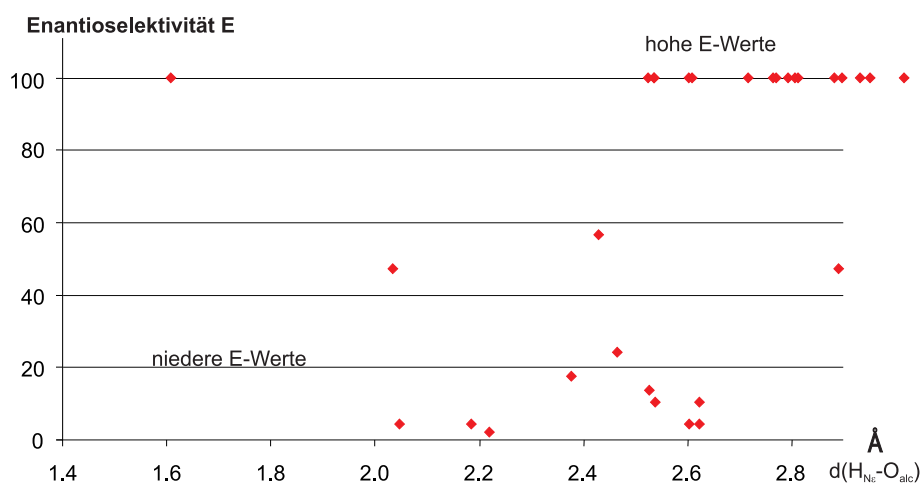


Abb. 45. Das Verhalten des Abstands $d(\text{H}_{N_\epsilon}\text{-O}_{alc})$ der schnell umgesetzten Enantiomere der Verbindungen **7-36** im produktiven Bindungsmodus gegenüber den experimentell ermittelten Enantioselektivitäten. E-Werte ≥ 100 sind an der Ordinate bei $E = 100$ eingetragen. Der Mittelwert der berechneten Abstände $d(\text{H}_{N_\epsilon}\text{-O}_{alc})$ liegt bei $2,5 \text{ \AA}$. Eine Korrelation mit den experimentell ermittelten Enantioselektivitäten ist nicht zu beobachten.

sentlich größere Bandbreite als die schnell umgesetzter Enantiomere. Abstände $d(\text{H}_{N_\epsilon}\text{-O}_{alc})$ langsam umgesetzter Enantiomere der Substrate **7-36** sind in Tabelle 18 (S. 88) enthalten.

Der geometrische Parameter $d(\text{H}_{N_\epsilon}\text{-O}_{alc})$ zeigt eine eindeutige Tendenz in allen Bereichen experimentell bestimmter Enantioselektivität, korreliert somit mit der Enantioselektivität (Abb. 46): Substrate mit kleiner Enantioselektivität ($E \leq 20$) weisen Abstände $d(\text{H}_{N_\epsilon}\text{-O}_{alc}) \leq 2,0 \text{ \AA}$ und Substrate mit großer Enantioselektivität ($E \geq 100$) weisen Abstände $d(\text{H}_{N_\epsilon}\text{-O}_{alc}) \geq 2,2 \text{ \AA}$ auf. Der Bereich zwischen $2,0$ und $2,2 \text{ \AA}$ wird als *twilight zone* bezeichnet, da Substrate, die in diese Region fallen, eine mittlere Enantioselektivität ($E \approx 50$) besitzen oder Grenzfälle kleiner bzw. hoher Enantioselektivität darstellen und nicht eindeutig zugeordnet werden können. Der Bereich ist mit $0,2 \text{ \AA}$ jedoch relativ schmal. Insgesamt fallen acht der ausgewählten 30 Substrate in den Bereich der *twilight zone*, wobei vier dieser Substrate tatsächlich eine experimentell bestimmte mittlere Enantioselektivitäten aufweisen^[116,139].

Die Tendenz in Abbildung 46 (S. 89) stimmt mit der zuvor getroffenen Hypothese überein: ein kurzer Abstand $d(\text{H}_{N_\epsilon}\text{-O}_{alc})$ begünstigt demnach hohe Umsetzungsraten und ein langer Abstand $d(\text{H}_{N_\epsilon}\text{-O}_{alc})$ hemmt die Umsetzung des Enantiomers.

Drei (Verbindungen **18**, **28** und **35**) der insgesamt 30 ausgewählten Substrate korrelieren nicht mit der experimentell bestimmten Enantioselektivität. Diese Substrate besitzen im Gegensatz zu

Tab. 18. Die Länge der katalytisch essentiellen Wasserstoff-Brückenbindung $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ langsam umgesetzter Enantiomere der ausgewählten Substrate **7-36** (Abb.22, S. 55 und Abb. 24, S. 57) in der Bindestelle der Lipase aus *P. cepacia*.

Substrat	Exp. bestimmte	
	Enantioselektivität ^[81]	$d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ ^[139]
7	≥ 100	2,52 Å
8	≥ 100	2,07 Å
9	≥ 100	2,25 Å
10	≥ 100	2,03 Å
11	≥ 100	2,33 Å
12	≥ 100	2,16 Å
13	≥ 100	2,52 Å
14	≤ 20	2,05 Å
15	≈ 50	2,06 Å
16	≤ 20	1,95 Å
17	≈ 50	2,20 Å
18	≤ 20	2,71 Å
19	≈ 50	2,11 Å
20	≥ 100	2,42 Å
21	≥ 100	2,55 Å
22	≥ 100	2,42 Å
23	≥ 100	2,65 Å
24	≥ 100	3,18 Å
25	≥ 100	2,56 Å
26	≥ 100	2,53 Å
27	≥ 100	2,45 Å
28	≥ 100	1,78 Å
29	≤ 20	1,87 Å
30	≤ 20	1,93 Å
31	≤ 20	1,62 Å
32	≈ 50	2,19 Å
33	≤ 20	1,74 Å
34	≤ 20	2,32 Å
35	≤ 20	1,82 Å
36	≤ 20	1,86 Å

den verbleibenden 27 Substraten einen polaren Substituenten (*p*-Methoxy-Phenyl) am großen Rest L, der mindestens fünf Atome vom Stereozentrum des sekundären Alkohols entfernt ist. Diese Substrate erfüllen somit die Kriterien, die eine Anordnung im dritten Bindungsmodus ermöglichen:

- der große Substituenten L muß weit in den *hydrophilic trench* hinein reichen,
- es darf zu keinen ungünstigen sterischen Wechselwirkungen im schmalen Eingangsbereich kommen und
- der große Rest L muß möglichst polare Substituenten tragen.

Dieser für die Verbindungen **18**, **28** und **35** im Gleichgewicht der Reaktion relevant besetzte Bindungsmodus muß zur Bestimmung der Enantioselektivität dieser drei Substrate berücksichtigt werden. Eine Korrelation des Abstandes $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ der Verbindungen **18**, **28** und **35** mit der experimentell bestimmten Enantioselektivität wird deshalb in Abbildung 46 (S. 89) nicht beobachtet.

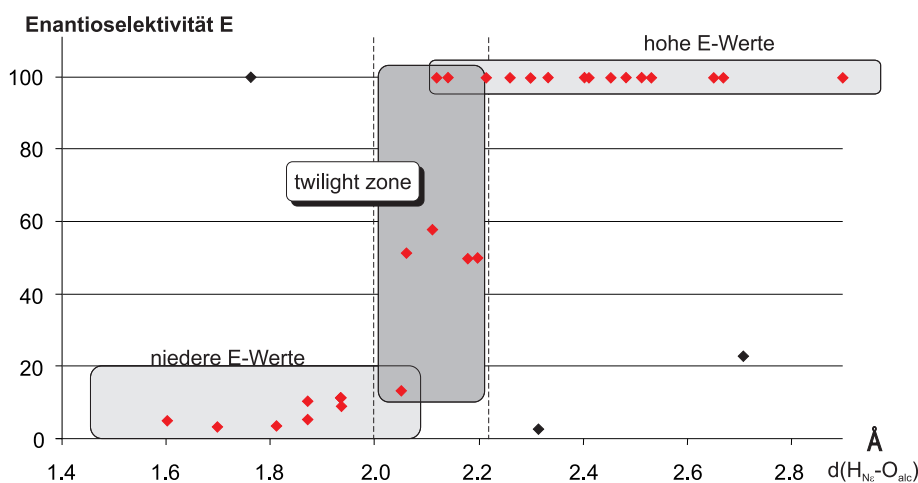


Abb. 46. Korrelation des Abstandes $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ der langsam umgesetzten Enantiomere im produktiven Bindungsmodus mit experimentell ermittelten Enantioselektivitäten. E-Werte ≥ 100 sind an der Ordinate bei $E = 100$ eingetragen. Die Substrate wurden in drei Klassen unterschiedlicher Enantioselektivität unterteilt: Substrate mit kleinen E-Werten ($E < 20$) zeigen Abstände $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc}) < 2,1 \text{ \AA}$ und Substrate mit hohen E-Werten ($E = 100$) zeigen Abstände $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc}) > 2,1 \text{ \AA}$. Die *twilight zone* schließt Substrate niedriger, mittlerer und hoher Enantioselektivität ein und ist auf einen Bereich von nur $0,2 \text{ \AA}$ ($2,0$ zu $2,2 \text{ \AA}$) limitiert. Die drei Ausreißer sind schwarz gekennzeichnet.

Nicht-produktive Bindungsmodi

Der nicht-produktive Bindungsmodus schnell umgesetzter Enantiomere ist in molekulardynamischen Simulationen mit Temperaturen bis ≥ 100 K instabil und geht in eine produktive Konformation über. Diese Tatsache weist auf eine Destabilisierung des Bindungsmodus aufgrund ungünstiger sterischer Wechselwirkungen und eine im Gleichgewicht nur geringe Konzentration dieses Bindungsmodus hin. Da jedoch nur Bindungsmodi, die im Gleichgewicht der Reaktion ausreichend besetzt sind, sich auf die Enantioselektivität auswirken können, wurde eine analytische Bewertung des Abstandes $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ schnell umgesetzter Enantiomere im nicht-produktiven Bindungsmodus nicht durchgeführt.

Für tetraedrale Intermediate der langsam umgesetzten Enantiomere ist der Abstand $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ in allen Fällen $> 3,5$ Å und zu lang zur Ausbildung einer produktiven Wasserstoff-Brückenbindung zwischen den Atomen $\text{H}_{N\epsilon}$ und O_{alc} . Das Fehlen der katalytisch wichtigen Wasserstoff-Brückenbindung im nicht-produktiven Bindungsmodus wird durch eine zusätzliche Wasserstoff-Brückenbindung der Aminosäure Leu17, eine der beiden das Oxyanion stabilisierenden Aminosäuren, kompensiert. Tetraedrale Intermediate langsam umgesetzter Enantiomere sind demnach nicht nur sterisch begünstigt, sondern werden zudem durch die Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoff-Brückenbindung zwischen Leu17 und dem Substrat bevorzugt. Der nicht-produktive Bindungsmodus besitzt folglich eine sehr hohe Gleichgewichts-Konzentration für die langsam umgesetzten Enantiomere und reguliert die experimentell zu beobachtende Stereopräferenz.

6.3.2 Stereoselektivität in *P. cepacia* Lipase-katalysierten Umsetzungen chiraler Amine

Amine des Typs $\text{NH}_2\text{CHR}_1\text{R}_2$ (Abb. 35, S. 76) sind strukturanalog zu den chiralen sekundären Alkoholen. Ihre Acylierungen verlaufen häufig hochselektiv, wenngleich mit unterschiedlicher Reaktivität im Vergleich zu den sekundären Alkoholen. Die Spaltung der vergleichsweise stabileren Amidbindung wird im Experiment nicht beobachtet. Dennoch gehorchen beide Substanzklassen der Regel aus Abbildung 11 (S. 15) zur Vorhersage der Stereopräferenz in Lipase-katalysierten Umsetzungen.

Wie in Kapitel 6.2.1 gezeigt werden konnte sind die molekularen Grundlagen der Stereoprä-

ferenz und die Besetzung unterschiedlicher Bindungsmodi durch die beiden Substanzklassen vergleichbar, wengleich die Amine in den molekulardynamischen Simulationen ein wesentlich flexibleres Verhalten aufweisen. Diese Beobachtung scheint auf den ersten Blick verwunderlich, da Amide durch mesomere Grenzstrukturen (Abb. 47) die im Vergleich zu Estern sekundärer Alkohole starrere Substanzklasse darstellen; die zwitterionische Grenzstruktur mit einem sp^2 -hybridisierten Stickstoffatom und partiellem Doppelbindungscharakter verhindert die Rotation um die $N - C_{\text{Carbonyl}}$ -Bindung. In den untersuchten tetrahedralen Intermediaten kann diese ionische Grenzstruktur jedoch nicht ausgebildet werden, da das Carbonyl-Kohlenstoffatom bereits nucleophil durch das Seitenketten-Sauerstoffatom angegriffen wurde und sich eine negative Ladung am Carbonyl-Sauerstoffatom befindet. Hierdurch kommt es zu einem *quasi*-chiralen Stickstoffatom (sp^3 -Hybridisierung), das durch die Inversion von freiem Elektronenpaar und Wasserstoffatom konfiguratив jedoch nicht stabil ist. Die Inversion am Stickstoffatom und die stetige Anpassung der Seitenketten der Aminosäuren der Bindestelle an die veränderten sterischen und elektronischen Ansprüche führen zum beobachteten flexibleren Verhalten der Amide im Vergleich zu den strukturanalogen Estern in molekulardynamischer Simulationen.

Zur Ermittlung der Faktoren, die die Stereoselektivität vermitteln, wurde analog zu den tetrahedralen Intermediaten der Ester sekundärer Alkohole der geometrische Parameter $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ in den Bindungsmodi der Amide (aus den Aminen der Verbindungen **37-43**) analysiert. Die jeweils schnell umgesetzten Enantiomere üben auch hier nur geringen Einfluß auf Orientierungen der Aminosäure-Seitenketten in der Bindestelle, speziell auf die Seitenkette des aktiven Histid-

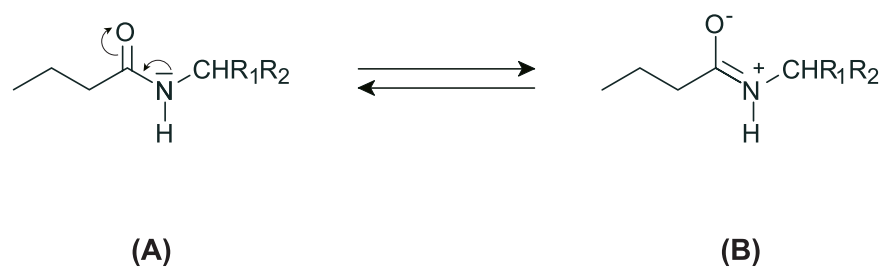


Abb. 47. Mesomere Grenzstrukturen der Amide chiraler Amine des Typs $\text{NH}_2\text{CHR}_1\text{R}_2$. (A) Nicht-ionische Grenzstruktur. Das freie Elektronenpaar des Amids ist am Stickstoffatom lokalisiert. (B) Zwitterionische Grenzstruktur. Die negative Ladung ist am Carbonyl-Sauerstoffatom lokalisiert. Die $\text{C}_{\text{Carbonyl}}$ -Bindung besitzt Doppelbindungscharakter, wodurch eine Rotation um diese Bindung verhindert wird.

ins der Lipase aus, und die Bindestellen-Geometrien der schnell umgesetzten Enantiomere von Substraten unterschiedlicher Stereoselektivität sind nahezu identisch (Abb. 48, S. 93, (A)).

Im Gegensatz hierzu erwiesen sich geometrische Eigenschaften der tetrahedralen Intermediate langsam umgesetzter Enantiomere erneut als Schlüssel zur experimentellen Stereoselektivität. Abbildung 48 (B) (S. 93) zeigt die Geometrien langsam umgesetzter Enantiomere im produktiven Bindungsmodus (aus den Aminen *cis*-**37** und *cis*-**38**). Nur eines der beiden langsam umgesetzten Enantiomere – das Amid des β -Amino-Cyclohexan-Esters **38** – weist eine katalytisch effiziente Ausrichtung des aktiven Histidins auf. Der kurze Abstand $d(\text{H}_{\text{N}\varepsilon}\text{-N}_{\text{amide}})$ und die hiermit einhergehende schnelle Umsetzung des langsam umgesetzten Enantiomers führt zu einer niederen experimentell bestimmten Enantioselektivität von $E = 6$.

Das tetrahedrale Intermediat des β -Amino-Cyclopentan-Ester-Komplexes zeigt im Gegensatz keine katalytisch effiziente Ausrichtung des aktiven Histidins und die Reaktion des langsam umgesetzten Enantiomers ist stark gehemmt. Bei vergleichbaren Reaktionsraten der beiden jeweils schnell umgesetzten Enantiomere *cis*-**37** und *cis*-**38** folgt hieraus eine hohe, experimentell bestimmte Enantioselektivität für *cis*-**37** von $E > 100$.

Die Vorhersage der experimentell zu erwartenden Enantioselektivität kann somit durch die analytische Bewertung des Abstandes $d(\text{H}_{\text{N}\varepsilon}\text{-N}_{\text{amide}})$ der tetrahedralen Intermediate langsam umgesetzter Enantiomere erfolgen (Abb. 49). In Tabelle 19 (S. 94) sind die zugehörigen Abstände angegeben. Schnell umgesetzte Enantiomere üben keinen oder nur geringen Einfluß auf die Enantioselektivität aus. Diese Beobachtungen und die Korrelation mit der experimentell bestimmten Enantioselektivität stimmt mit der Auswertung der *P. cepacia* Lipase-katalysierten Umsetzungen sekundärer Alkohole überein.

6.3.3 Stereoselektivität in *C. rugosa* Lipase-katalysierten Umsetzungen sekundärer Alkohole mit zwei benachbarten Stereozentren

Für die sekundären Alkohole **44** und **45** mit zwei benachbarten Stereozentren (Abb. 39, S. 79), die mit der Lipase aus *C. rugosa* umgesetzt werden, zeigt sich ein anderer Sachverhalt als für die *P. cepacia* Lipase-katalysierten Umsetzungen sekundärer Alkohole. Für quantitative Angaben zur Enantio- und Diastereoselektivität müssen die produktiven Bindungsmodi von insgesamt

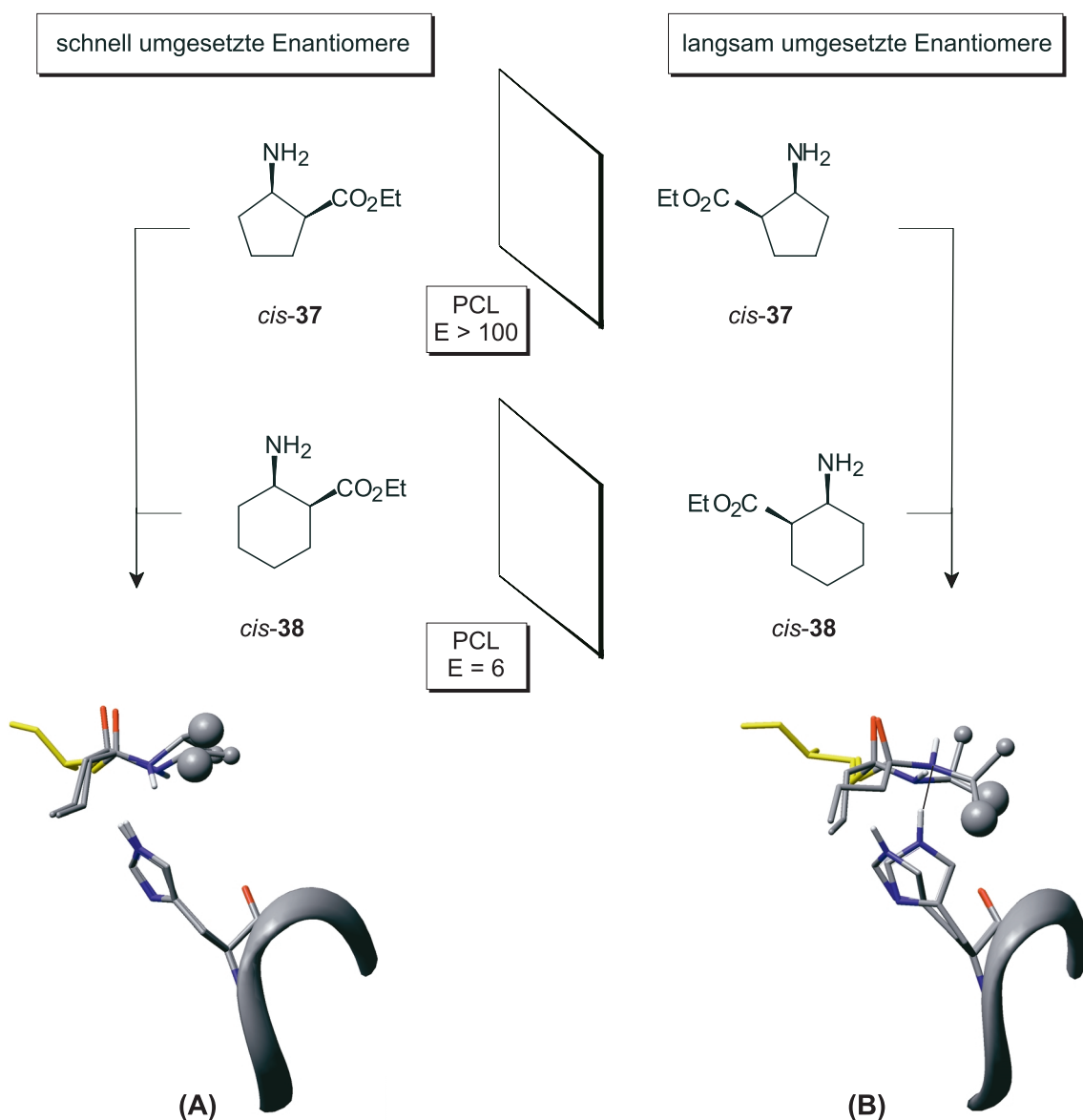


Abb. 48. Vergleich der schnell und langsam umgesetzten Enantiomere zweier Substrate, das Amid aus dem β -Amino-Cyclopentan-Ester *cis*-37 und dem β -Amino-Cyclohexan-Ester *cis*-38 in der Bindestelle der Lipase aus *P. cepacia*, die mit unterschiedlicher Enantioselektivität umgesetzt werden. Die Substituenten der Stereozentren sind durch unterschiedliche Kugelgrößen angedeutet. (A) zeigt die beiden schnell umgesetzten Enantiomere. Deutlich zu erkennen, daß sich für die beiden Substrate nahezu identische Anordnungen, vor allem in Bezug auf das katalytische Histidin ergeben. (B) zeigt die beiden langsam umgesetzten Enantiomere. Das katalytische Histidin nimmt zwei vollständig unterschiedliche Positionen ein. Auch die Geometrien der Substrate unterliegen größeren Variationen als die vergleichsweise schnell umgesetzten Enantiomere in (A). Die Wasserstoff-Brückenbindung des Substrats β -Amino-Cyclohexan-Esters *cis*-38 ist angezeigt.

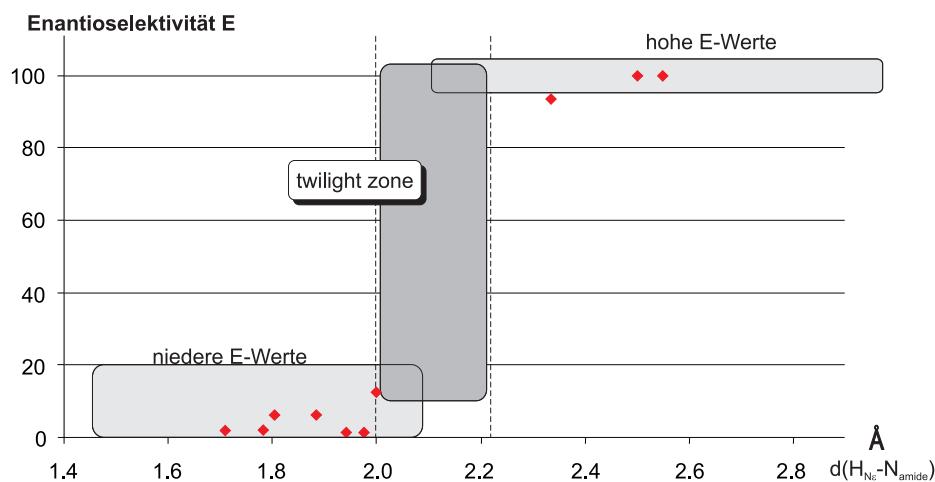


Abb. 49. Korrelation des Abstands $d(\text{H}_{N_{\epsilon}}-\text{N}_{amide})$ der langsam umgesetzten Enantiomere der Verbindungen **37-43** im produktiven Bindungsmodus mit den experimentell ermittelten Enantioselectivitäten. E-Werte ≥ 100 sind an der Ordinate bei $E = 100$ eingetragen. Die Einteilung in Klassen unterschiedlicher Enantioselectivität erfolgt in Analogie zur Einteilung bei sekundären Alkoholen (vgl. 46, S. 89). Es gilt die gleiche Unterteilung der Klassen: Substrate mit kleinen E-Werten ($E < 20$) zeigen Abstände $d(\text{H}_{N_{\epsilon}}-\text{N}_{amide}) < 2,1 \text{ \AA}$ und Substrate mit hohen E-Werten ($E = 100$) zeigen Abstände $d(\text{H}_{N_{\epsilon}}-\text{N}_{amide}) > 2,1 \text{ \AA}$.

Tab. 19. Die Länge der katalytisch essentiellen Wasserstoff-Brückenbindung $d(\text{H}_{N_{\epsilon}}-\text{N}_{amide})$ langsam umgesetzter Enantiomere der ausgewählten Substrate **37-43** (Abb.35, S. 76) in der Bindestelle der Lipase aus *P. cepacia*.

Substrat	Exp. bestimmte	
	Enantioselectivität ^[79]	$d(\text{H}_{N_{\epsilon}}-\text{N}_{amide})$
<i>cis-37</i>	≥ 100	2,51 Å
<i>trans-37</i>	12	2,00 Å
<i>cis-38</i>	6	1,81 Å
<i>trans-37</i>	≥ 100	2,54 Å
<i>cis-39</i>	6	1,88 Å
<i>trans-39</i>	87	2,33 Å
40	≈ 2	1,94 Å
41	≈ 2	1,79 Å
42	≈ 2	1,96 Å
43	≈ 2	1,72 Å

vier Stereoisomeren für jedes der beiden Substrate **44** und **45** berücksichtigt werden.

Die Enantioselektivität ergibt sich aus dem Aktivitäts-Unterschied (Kap. 2.11, S. 23) zwischen schnell und langsam umgesetzten Enantiomer:

$$E = \frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_{fast}}{\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_{slow}}. \quad (27)$$

Der berechnete Abstand $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ stellt ein Maß für die Umsatzrate eines Enantiomers und somit für die Aktivität der Lipase gegenüber dem untersuchten Substrat dar. Hohe Enantioselektivitäten resultieren im Experiment aus großen Aktivitäts-Unterschieden und sollten sich in der Analyse des Abstandes $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ in großen Differenzen zwischen schnell und langsam umgesetzten Enantiomer widerspiegeln.

Die nachfolgenden Werte sind Tabelle 17 (S. 81) zu entnehmen. Für die Enantiomerenpaare *RR* und *SS* der Substrate **44** und **45** ergibt sich die Differenz der Abstände $\Delta d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc}) = d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})^{RR} - d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})^{SS}$ zu 0,3 Å bzw. 0,2 Å. Die größere Differenz für Substrat **44** entspricht einem erwartungsgemäß höheren Enantiomerenüberschuß des Enantiomerenpaares *RR/SS-44* (ee 62 %) als für *RR/SS-45* (ee 35 %). Die Differenz $\Delta d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ für das Enantiomerenpaar *RR/SR* der Substrate **44** und **45** ergibt 2,1 Å bzw. 2,2 Å. Auch diese Beobachtung stimmt mit einem experimentell bestimmten höheren Enantiomerenüberschuß für *RS/SR-44* (ee 59 %) als für *RS/SR-45* (ee 43 %) überein.

6.4 Gerichtete Evolution *in silico* am Beispiel der Lipase aus *P. cepacia*

Lipasen haben sich sowohl in der kinetischen Racematspaltung als auch in der gezielten stereoselektiven Synthese einer großen Vielfalt chiraler sekundärer Alkohole bewährt. Es existieren jedoch zahlreiche Ausnahmen in Umsetzungen (Abb. 50), deren Enantioselektivität kein synthetisch ausreichendes Maß ($E = 4$) aufweisen.

Um nun die Lipase bezüglich der Enantioselektivität gegenüber eines bestimmtem Substrats oder einer bestimmten Substratklasse zu verbessern, 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 variieren.

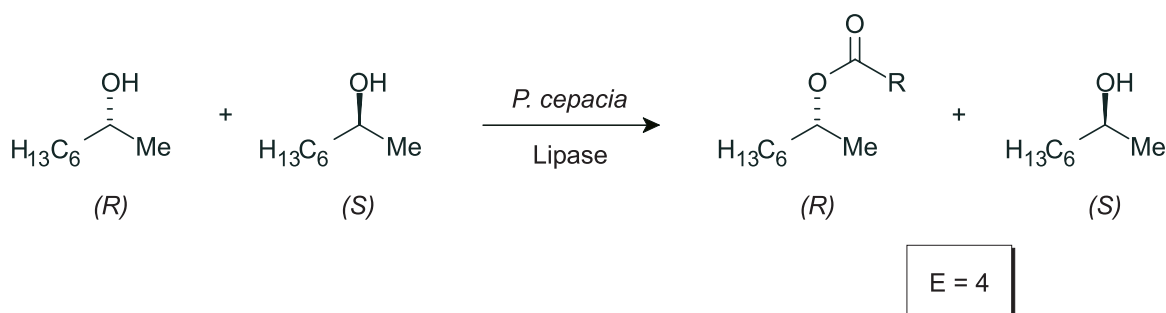


Abb. 50. Ein racemisches Gemisch aus 2-Octanol **14** (Abb. 22, S. 55) liefert in der kinetischen Racematspaltung mit der Lipase aus *P. cepacia* eine inhärente Enantioselektivität von nur $E = 4$.

Die Verbesserung kann hierbei über einen rationalen Ansatz, durch positionsgerichtete Mutagenese, über einen kombinatorischen Ansatz, der auch als Zufallsmutagenese bezeichnet wird, oder eine Kombination beider Methoden erfolgen.

Die positionsgerichtete Mutagenese erfordert die dreidimensionale Struktur des Enzyms oder die Struktur homologer Enzyme basierend auf NMR- oder Röntgenstruktur-Daten zur Auswahl der zu mutierenden Position. 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 zur Verfügung gestellt (Expression) und gereinigt werden muß, um dann die biochemischen Eigenschaften bestimmen zu können. Diese Ergebnisse können dann das bereits bestehende Modell verfeinern und als Grundlage für weitere Mutations-Vorschläge dienen.

Ein anderer Ansatz ist die Zufallsmutagenese eines Enzyms. Hierbei fällt eine große Anzahl von Mutanten in Abhängigkeit der Anzahl der zu mutierenden Aminosäuren an. Der Nachteil auch dieser Methode besteht im enormen Zeitaufwand, da alle Varianten exprimiert und auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden müssen.

Von grundlegender Bedeutung ist daher ein effizientes experimentelles Screening-System oder ein theoretisches Modell, das zu einer schnellen Auswahl verbesserter Varianten befähigt ist.

In Kapitel 6.2.1 wurde ein Modell zur Vorhersage der Enantioselektivität in *P. cepacia* Lipase-katalysierten Reaktionen Umsetzungen sekundärer Alkohole vorgestellt. Es konnte gezeigt werden, daß diese anhand des geometrischen Parameters $d(\text{H}_{N\epsilon}\text{-O}_{alc})$ langsam umgesetzter Enantiomere im produktiven Bindungsmodus eindeutig in drei Klassen unterschiedlicher Enantioselektivität zuzuordnen ist (Abb. 46, S. 89). Ein kurzer Abstand, $d(\text{H}_{N\epsilon}\text{-O}_{alc}) < 2,0 \text{ \AA}$, fördert demnach die Umsetzung langsam umgesetzter Enantiomere und resultiert in schlechten Enantioselektivitäten ($E < 20$) wohingegen ein langer Abstand, $d(\text{H}_{N\epsilon}\text{-O}_{alc}) > 2,2 \text{ \AA}$, die Umsetzung unterbindet und zu hohen Enantioselektivitäten ($E \geq 100$) führt. Ein Substrat mit niedriger Enantioselektivität ($E = 4$) wie in Abbildung 50 (S. 96) für 2-Octanol zeigt beispielsweise einen Abstand $d(\text{H}_{N\epsilon}\text{-O}_{alc})$ von $> 2,0 \text{ \AA}$.

Punkt-Mutationen des Enzyms, die in den untersuchten tetrahedralen Intermediaten der Varianten zu einer Verlängerung dieses Abstandes führen, sollten experimentell in einer höheren Enantioselektivität resultieren. Das ursprüngliche Modell zur Vorhersage der Enantioselektivität kommt ohne eine Betrachtung der jeweils schnell umgesetzten Enantiomere aus und basiert ausschließlich auf dem berechneten Bindungsabstand $d(\text{H}_{N\epsilon}\text{-O}_{alc})$ der langsam umgesetzten Enantiomere im produktiven Bindungsmodus.

Ein verlängerter Abstand $d(\text{H}_{N\epsilon}\text{-O}_{alc})$ langsam umgesetzter Enantiomere in Mutanten der Lipase aus *P. cepacia* führt deshalb nur dann zu einer gesteigerten Enantioselektivität, wenn der Abstand $d(\text{H}_{N\epsilon}\text{-O}_{alc})$ für das schnell umgesetzte Enantiomer im Vergleich zum Wildtyp-Komplex nahezu unverändert bleibt.

Zur Überprüfung der Behauptung wurde 2-Octanol **14** als Substrat gewählt. Tabelle 20 (S. 98) zeigt die berechneten Abstände $d(\text{H}_{N\epsilon}\text{-O}_{alc})$ beider Enantiomere im Wildtyp der Lipase aus *P. cepacia*. Eine gesteigerte Enantioselektivität wird demnach für Mutanten erhalten, die den

Abstand $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ des schnell umgesetzten Enantiomers nahezu unverändert bei 2,46 Å belassen, jedoch den Abstand des langsam umgesetzten Enantiomers auf $\geq 2,3$ Å (Bedingung für $E > 100$, vgl. Abb. 46, S. 89) steigern.

Tab. 20. Berechnete Abstände $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ für R- und S-2-Octanol der tetrahedralen Substat-Lipase-Komplexe des Wildtyps der Lipase aus *P. cepacia*.

R	S	E-Wert
2,46 Å	1,94 Å	4

Zur Mutation ausgewählt wurden Aminosäuren der *P. cepacia* Lipase, die sich direkt in der Bindestelle der Lipase oder in direkter Nachbarschaft zum aktiven Histidin befinden und sich auf die Orientierung des Seitenketten-Imidazols des aktiven Histidins auswirken können. Ausgewählt Aminosäuren sind His15, Thr18, Tyr29, Ile110, Phe119, Leu248, Ala272, Val266, Val267, Leu287 und Ile290. Jede dieser Aminosäuren wurde durch die 19 verbleibenden Aminosäuren und zur Kontrolle auch durch sich selbst ersetzt. Für die elf ausgewählten Aminosäuren ergeben sich 220 durchzuführende molekulardynamische Simulationen. Die Generierung der Mutanten *in silico* sowie die Ladungsberechnung, Minimierung, MD-Simulation (Tab. 15, S. 60) und Auswertung der Strukturen wurde mit automatisierten Skripten bewerkstelligt. Die analytische Auswertung des Abstandes $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ der 220 Strukturen der S-2-Octanol-Lipase-Komplexe (langsam umgesetztes Enantiomer) sind in Tabelle 21 (S. 99) zusammengefaßt.

Insgesamt 13 Mutationen aus Tabelle 21 (S. 99) weisen einen Abstand $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc}) > 2,3$ Å auf: T18R, T18Y, Y29I, Y29L, V267H, A272R, L287F, Y290N, Y290K, Y290S, Y290T, Y290W und Y290V.

Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden diese aussichtsreichen Varianten mit den Standard-MD-Einstellungen (Tab. 15, S. 60) nachsimuliert und zusätzlich die jeweils schnell umgesetzten Enantiomere auf ihre Invariabilität hin überprüft (Tab. 22, S. 100).

Das Auswahl-Kriterium für aussichtsreiche Varianten bleibt ein Abstand $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc}) \geq 2,3$ Å. Für die Mutanten T18R, T18Y, Y29I, V267H, L287F, Y290K, Y290S, Y290T, Y290W und Y290V ergibt sich ein kürzerer Abstand als das gesetzte Auswahl-Kriterium. Zudem zeigt in

Tab. 21. Berechnete Abstände $d(H_{Ne}-O_{alc})$ der Strukturen der *S*-2-Octanol-Lipase-Komplexe (langsam umgesetztes Enantiomer) in Å.

	His15	Thr18	Tyr29	Ile110	Phe119	Leu248	Ala272	Val266	Val267	Leu287	Ile290
Ala	1,95	2,09	1,82	2,05	2,11	2,11	2,12	1,94	2,09	2,04	1,76
Arg	2,02	2,30	1,95	1,98	2,21	2,21	2,68	2,03	2,06	2,22	2,24
Asn	2,07	2,12	1,79	1,97	2,06	2,06	2,11	1,85	2,07	2,09	4,24
Asp	2,09	2,11	1,86	2,00	2,06	2,06	2,16	2,17	2,13	2,03	1,83
Cys	2,10	2,14	1,82	2,00	2,13	2,13	2,07	2,04	2,07	2,16	1,69
Gln	2,10	2,15	1,77	1,98	2,06	2,06	2,12	2,10	1,78	2,17	1,98
Glu	2,10	2,07	1,86	1,97	2,11	2,11	2,15	1,87	2,21	2,09	1,85
Gly	2,08	2,11	1,85	1,66	1,62	1,62	2,13	2,14	2,07	2,09	1,82
His	2,34	2,19	2,05	1,94	2,25	2,25	2,09	2,97	2,52	2,11	2,22
Ile	2,13	2,13	2,76	2,02	2,05	2,05	2,08	2,01	2,08	2,10	2,13
Leu	2,06	2,12	2,71	2,10	2,13	2,13	2,10	2,01	2,06	2,09	2,14
Lys	2,04	2,21	2,05	1,99	2,13	2,13	2,24	2,10	2,06	2,18	2,30
Met	2,05	2,11	2,29	1,88	2,08	2,08	2,07	2,02	2,06	2,17	2,19
Phe	2,16	2,12	2,14	2,07	2,19	2,19	2,10	2,13	2,12	2,49	1,95
Pro	2,10	2,10	1,78	2,04	2,08	2,08	2,10	2,23	2,19	2,07	1,80
Ser	2,10	2,10	1,83	1,99	2,11	2,11	2,14	2,00	2,06	2,12	4,56
Thr	2,10	2,10	1,81	2,01	2,08	2,08	2,14	2,09	2,09	2,13	2,33
Trp	2,10	2,09	1,97	1,98	1,90	1,90	2,03	2,03	2,03	2,00	2,31
Tyr	2,10	2,32	2,11	2,13	2,09	2,09	2,12	2,01	2,10	2,06	2,15
Val	2,07	2,10	1,92	1,85	2,09	2,09	2,10	2,12	2,12	2,17	2,83

den drei verbleibenden Varianten nur die Punkt-Mutation Y29L einen unveränderten Abstand des entsprechend schnell umgesetzten Enantiomers. Die Variante Y290V weist zwar einen verlängerten Abstand des langsam umgesetzten Enantiomers auf, aber entsprechend auch einen verlängerten Abstand des schnell umgesetzten Enantiomers. Hierbei kann es sich um einen Hinweis auf verminderte Aktivität des Proteins bedingt durch die eingeführte Mutation handeln. Die aussichtsreiche Variante Y290N zeigt hingegen einen verkürzten Abstand des schnell umgesetzten Enantiomers, eine insgesamt also noch gesteigerte Differenz der Umsatzraten der beiden Enantiomere.

Das 'directed evolution *in silico* Modell' weist demnach die beiden Punktmutationen Y29L und Y290N als erfolgsversprechende Variationen zur Verbesserung der Enantioselektivität gegenüber 2-Octanol aus.

Tab. 22. Berechnete Abstände $d(H_{N\epsilon}-O_{alc})$ des Wildtyps sowie der aussichtsreichen Varianten aus Tab. 21 im Vergleich mit den nachsimulierten Varianten der *S*-2-Octanol-Lipase-Komplexe (langsam umgesetztes Enantiomer) und der schnell umgesetzten *R*-2-Octanol-Lipase-Komplexe in Å. Nur die beiden Mutanten Y29L und Y290N erfüllen die gestellten Kriterien.

	wt	T18R	T18Y	Y29I	Y29L	V267H	A272R
S_1	1,94	2,30	2,34	2,76	2,71	2,52	2,68
S_2	1,94	2,16	2,28	1,90	2,65	2,13	2,95
R_2	2,46	2,20	2,39	2,38	2,41	2,22	2,67
	L287F	Y290N	Y290K	Y290S	Y290T	Y290W	Y290V
S_1	2,49	4,24	2,30	4,56	2,33	2,31	2,83
S_2	1,70	4,04	2,04	1,79	2,16	1,99	2,24
R_2	2,63	2,07	2,20	3,33	2,35	1,81	2,86

6.5 Überprüfung des Modells am Beispiel der Mutante Y29L

Für die Charakterisierung der rekombinanten Lipase aus *P. cepacia* und der entsprechenden Einfachmutanten Y29L wurde die Aktivität gegenüber *p*-Nitrophenylpalmitat (pNPP) und die Selektivität gegenüber einem racemischen Gemisch aus 2-Octanol in unterschiedlichen Lösungsmitteln überprüft.

6.5.1 Bestimmung der Aktivität

Die Bestimmung der Aktivitäten der aus *E. coli* exprimierten Wildtyp Lipase aus *P. cepacia* und der Y29L-Mutante erfolgte durch den photometrischen Nachweis der hydrolytischen Aktivität nach der Spaltung von *p*-Nitrophenylpalmitat. Beide Lipasen spalten *p*-Nitrophenylpalmitat. Die relative Aktivität der Einfachmutante Y29L ist jedoch geringer als die des Wildtyps. Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Aktivitäten pro Gramm Biofeuchtmasse. Die Berechnung der Aktivität erfolgte entsprechend nachfolgender Gleichung:

$$U = \frac{\Delta E * V_{Test}}{t * \epsilon * d * V_{Probe}} * 1000. \quad (28)$$

- ΔE : Unterschied in der Extinktion von Probe und Blindprobe
 V_{Test} : Testvolumen, 1 ml
 t: Testdauer
 ϵ : Extinktionskoeffizient von DMSO, $1500 [l * mol^{-1} * cm^{-1}]$
 d: Schichtdicke der Testküvette, 1 cm
 V_{Probe} : Probevolumen

Tab. 23. Die relative Aktivitäten der Wildtyp Lipase aus *P. cepacia* und der Y29L-Mutante wurden mit dem *p*-NPP-Assay bei 60°C bestimmt.

Lipase	Aktivität pNPP-Assay [U/g]
Wildtyp Lipase	120
Y29L	60

6.6 Bestimmung der Enantioselektivität

Die durchgeführten biokatalytischen Untersuchungen dienen zur Überprüfung und Bestätigung der der Literatur entnommenen Enantioselektivitäten in der kinetischen Racematspaltung von 2-Octanol. Die von Suginaka *et al.*^[148] bestimmte Enantioselektivität in der Acylierung von *rac*-2-Octanol wurde zu $E = 4$ bestimmt. Hamada *et al.*^[64] erzielten vergleichbare Ergebnisse in der kinetischen Racematspaltung von 2-Nonanol; hier wurde die Enantioselektivität zu $E = 12$ bestimmt. In Abbildung 51 ist das Gaschromatogramm der Umsetzung von *rac*-2-Octanol mit dem Wildtyp der Lipase aus *P. cepacia* in *n*-Hexan dargestellt; die inhärente Enantioselektivität in der Umsetzung mit der Wildtyp Lipase aus *P. cepacia* ergibt sich demnach zu $E = 7$ und bestätigt den zuvor ermittelten geringen Wert von Suginaka *et al.*^[148].

Biokatalytische Untersuchungen der Einfachmutante Y29L sollen die Auswirkungen der Mutation auf Aktivität und Enantioselektivität klären. Dem in Abbildung 51 dargestellten Chromatogramm ist zu entnehmen, daß sich in der Umsetzung von *rac*-2-Octanol in *n*-Hexan eine geringfügig höhere Enantioselektivität von $E = 10$ ergibt. Eine weitere Steigerung der Enantioselektivität konnte auch in den Lösungsmitteln Toluol, Dichlormethan und Diethylether nicht

beobachtet werden.

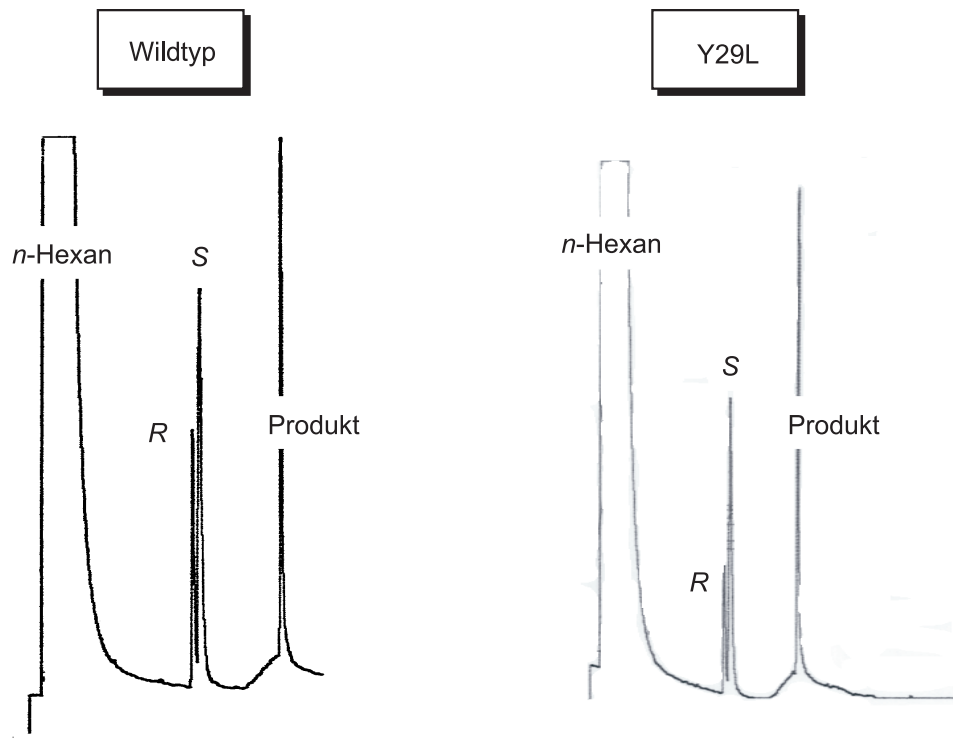


Abb. 51. Gaschromatogramm der Umsetzung von *rac*-2-Octanol mit dem Wildtyp der Lipase aus *P. cepacia* und der Einfachmutante Y29L in *n*-Hexan. Die Proben wurden nach jeweils 4 h entnommen.

7 Diskussion

Die vorliegende Arbeit stellt ein auf Molecular Modelling Untersuchungen basierendes, theoretisches Modell vor, welches die Identifikation sowohl der molekularen Grundlage der experimentell zu beobachtenden Stereopräferenz, als auch der Stereoselektivität Lipase-katalysierter Reaktionen erlaubt. Das strukturbasierte Modell erlaubt weiterhin die Vorhersage der Stereoselektivität gegenüber bislang nicht experimentell untersuchten Substraten, ein gezieltes Substrat-Design, sowie die Auswahl einer geeigneten Lipase für ein definiertes Substrat. Das Mutanten-Design *in silico* unter Verwendung des vorgestellten Modells wurde ebenfalls überprüft.

7.1 Auswahl der Substrate

Die Auswahl der Substrate zur Überprüfung des Modells erfolgte unter Berücksichtigung spezieller Kriterien: so sollte das Substituenten-Spektrum in Bezug auf Sterik (Größe und Form), Elektronik und Flexibilität eine breite Bandbreite abdecken um das resultierende Modell möglichst weitreichend anwenden zu können.

Die untersuchten Substrate^[8,25,26,28,55,64,70,78,81,91,93,111,114,134,154,153,160,168,4] enthielten ausschließlich die Atomtypen C, H, N, O sowie Halogene, um eine hinreichende Parametrisierung durch das verwendete Tripos Kraftfeld^[33] zu gewährleisten.

7.1.1 Substrate in *P. cepacia* Lipase-katalysierten Umsetzungen

Mittlere Substituenten M in *P. cepacia* Lipase-katalysierten Umsetzungen differierten von kleinen sphärischen, hydrophoben Substituenten wie $-CH_3$ (Abb. 22, S. 55) bis hin zu relativ großen, hydrophilen Substituenten wie $-CO_2CH_3$ (Abb. 24, S. 57). Große Substituenten L schließen gesättigte und ungesättigte aliphatische aber auch aromatische Substituenten in das Modell ein.

Die experimentell mit der Lipase aus *P. cepacia* ermittelten Enantioselektivitäten decken das gesamte Spektrum von sehr kleinen Enantioselektivitäten ($E \leq 20$) über moderate Enantioselektivitäten ($E \approx 50$) bis hin zu sehr hohen Enantioselektivitäten ($E \geq 100$) ab.

7.1.2 Substrate in *C. antarctica* B Lipase-katalysierten Umsetzungen

Die Auswahl der Substrate (Abb. 43, S. 84) erfolgte in Analogie zur Auswahl der Substrate in *P. cepacia* Lipase-katalysierten Umsetzungen. Beide Bindestellen ähneln sich im Aufbau, zeigen die höchsten Enantioselektivitäten in den Umsetzungen sekundärer Alkohole und gehorchen streng der Regel^[82] zur Vorhersage der Stereopräferenz (Abb. 11, S. 15).

7.1.3 Substrate in *C. rugosa* Lipase-katalysierten Umsetzungen

In der Substrat-Auswahl^[4,36,1] wurden ähnliche Kriterien wie im Falle der Lipase aus *P. cepacia* in Betracht gezogen, wobei sich jedoch gezeigt hat, daß das Modell für die *C. rugosa* Lipase aufgrund der wesentlich größeren Bindestelle nicht in gleichem Maße allgemeingültig zu halten ist. Aussagen lassen sich in den entsprechenden Umsetzungen nur für solche Substrate treffen, die den sterischen Ansprüchen der Bindetasche der Lipase aus *C. rugosa* genügen. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der vorgestellten empirischen Regel^[?], die im Falle der *C. rugosa* Lipase ebenfalls eine nur schlechte Vorhersagemöglichkeit liefert.

Für in besonderem Maße geeignet hat sich die Lipase aus *C. rugosa* zur Auftrennung der Diastereomeren- und Enantiomerenpaare der sekundären Alkohole mit jeweils zwei Stereozentren (Abb. 39, S. 79) erwiesen. Diese beanspruchen durch ihre speziellen sterischen Ansprüche die gesamte Bindestelle der Lipase aus *C. rugosa*, wobei eine eindeutige Zuordnung von spezifischen Bindetaschen und Bindungsmodi ermöglicht wird, weshalb sich letztendlich auch die empirische Regel zur Vorhersage der Stereopräferenz erfolgreich auf diese Substratklasse anwenden läßt.

7.2 Der Katalyse-Mechanismus

Der Reaktionsmechanismus von Lipasen (Abb. 7, S. 10) gleicht dem der Serinproteasen^[170]. Kinetische^[47] und quantenmechanische^[41,11,104,105,50,98] Untersuchungen konnten hierbei die Reaktion des ersten tetrahedralen Intermediates zum Acylenzym in der Hydrolyse als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion identifizieren (Abb. 7, S. 10).

7.2.1 Tetrahedrale Reaktionsintermediate und deren Übergangszustände

Eine Berechnung der relativen Aktivierungsenthalpien der diastereomeren Substrat-Lipase-Komplexe im Reaktionsschritt der ersten tetrahedralen Intermediate hin zu den Acylenzymen und die Anwendung der Eyring-Theorie^[48,49] (Transition State Theory) würde die Reaktionsraten k (Gleichung 29) der beiden Enantiomere liefern. Hierdurch würde ein mathematischer Zugang zu den experimentell ermittelten Enantioselektivitäten geschaffen (Gleichung 30).

$$k = \frac{k_B T}{h} * e^{-\Delta H^\ddagger/RT} * e^{-\Delta S^\ddagger/R} \quad (29)$$

und

$$\frac{(R)}{(S)} = \frac{k_R}{k_S} = \frac{e^{-\Delta H_R^\ddagger/RT} e^{-\Delta S_R^\ddagger/R}}{e^{-\Delta H_S^\ddagger/RT} e^{-\Delta S_S^\ddagger/R}} \quad (30)$$

In erster Näherung sind die enthaltenen Entropieanteile ΔS^\ddagger , bei vergleichbaren relativen Aktivierungsenthalpien ΔH^\ddagger nahezu gleich groß und lassen sich demnach aus Gleichung 30 herauskürzen. Die Problemstellung ist somit durch Gleichung 31, die keine Entropiebeiträge mehr enthält, lösbar.

$$\frac{(R)}{(S)} = \frac{k_R}{k_S} = \frac{e^{-\Delta H_R^\ddagger/RT}}{e^{-\Delta H_S^\ddagger/RT}} \quad (31)$$

Die derzeitige Unzulänglichkeit quantenchemischer Berechnungen unterbindet jedoch diesen Lösungsansatz, da sie speziell auf Übergangszustände von Systemen dieser Größenordnung nicht anzuwenden sind. Zum einen steigen die Fluktuationen in den Enthalpieberechnungen mit zunehmender Systemgröße, zum anderen verbieten die wichtigen Solvensbeiträge eine Vernachlässigung des entropischen Beitrages.

Eine weitere Näherung, das sogenannte Hammond-Postulat, ermöglicht hingegen einen Zugang zu Systemen dieser Art. Hammond postulierte, daß endergonische Reaktionen über späte, Produkt-ähnliche Übergangszustände und exergonische Reaktionen über frühe, Edukt-ähnliche

Übergangszustände verlaufen. Unter Zuhilfenahme dieser Näherung ist der im Übergangszustand Lipase-katalysierter Reaktionen stattfindende Zusammenbruch der tetraedrischen Zwischenstufe mit den eigentlichen tetrahedralen Intermediaten vergleichbar. Quantenchemische Berechnungen fokussieren deshalb häufig auf Reaktionsintermediate und nicht auf die echten Übergangszustände der Reaktionen.

Frühere Publikationen quantenchemischer Untersuchungen Lipase-katalysierter Reaktionen^[47,63] und auch die vorliegende Arbeit basieren deshalb auf einer eingehenden Betrachtung der kovalent gebundenen Substrat-Lipase-Komplexe, die den Übergangszustand der ersten tetraedrischen Zwischenstufe nachahmen.

7.2.2 Der manuelle Einbau der Substrate

Das Substrat-Docking der vorliegenden Arbeit lehnt an vorangegangene theoretische Untersuchungen^[63,109,131,132,152] der tetrahedralen Reaktionsintermediate sowie der Orientierung von substratanalogen Inhibitoren in Kristallstrukturen von Lipasen^[136] an.

Säure-Seiten wurden in die Acyl-Bindetaschen^[115] der Lipasen gebunden^[161]. Die Bindetaschen der Lipase B aus *C. antarctica* und der Lipase aus *P. cepacia* für die Säureseiten lassen sich beide mit einem elliptisch aufgebauten Trichter (engl.: elliptical funnel), mit den Maßen 9,5 * 4,5 Å bzw. 16,5 * 4,5 Å, vergleichen. Im Falle der Lipase aus *C. rugosa* wird die Säure-Seite in einem hydrophoben Tunnel (er verläuft nicht an der Protein-Oberfläche) untergebracht, der eine Länge von mindestens 22 Å und eine Breite von 4 Å besitzt. Die Bindestellen für die Säureseiten erfüllen die sterischen und elektronischen Ansprüche zu einer effektiven Stabilisierung dieses Substrateiles.

Der OH-funktionale Bereich der Substrate wurde so modelliert, daß die katalytisch essentiellen Wasserstoff-Brückenbindungen^[180] des positiv geladenen Imidazols^[84] des aktiven Histidins effektiv ausgebildet werden können. Die stabilisierenden Wechselwirkungen der das Oxyanion stabilisierenden Aminosäuren und des aktiven Aspartats wurden ebenfalls ausgerichtet.

Ab initio Rechnungen zeigten, daß alleine das Vorhandensein der katalytischen Wasserstoff-

Brückenbindungen eine Absenkung der Aktivierungsbarriere um insgesamt 15 kcal/mol^[75] im Vergleich zum nicht durch Wasserstoff-Brückenbindungen stabilisierten Reaktionsverlauf ergibt. Die Austausch des ionischen Aspartats in Trypsin und Subtilisin gegen eine neutrale Aminosäure beispielsweise verkleinert die Reaktionsrate um einen Faktor, der einer Erhöhung der freien Aktivierungsenergie von 6 kcal/mol^[27,35,143] entspricht. Jede der beiden Oxyanion-stabilisierenden Aminosäuren liefert weiterhin eine Absenkung der freien Aktivierungsenergie von 5 kcal/mol^[172]. Beide Beobachtungen ließen sich durch Berechnungen der freien Energie (EVB und MM) bestätigen^[68,122]. Semiempirische Methoden (PM3 Parametrisierung) lieferten gar einen energetischen Beitrag des Aspartats und der Oxyanion-stabilisierenden Aminosäuren von 20 kcal/mol^[38].

Diese Beobachtungen spiegeln die essentielle Bedeutung der Wasserstoff-Brückenbindungen in Bezug auf die katalytische Aktivität der Enzym-Substrat-Komplexe wieder. Um die Aktivität der in dieser Arbeit untersuchten Enzym-Substrat-Komplexe zu gewährleisten wurde deshalb besonderen Wert auf eine effiziente Ausbildung dieser Wechselwirkungen gelegt.

7.3 Qualität der MD-Simulationen

7.3.1 Zeitliches Limit

Die Berechnungen wurden mit einer Simulationsdauer der Produktionsphase (Phase IV) von 5 ps und einer Simulations-Temperatur von 100 K durchgeführt. Ein Vergleich mit Berechnungen, deren Simulations-Dauer 10 ps und 15 ps betragen zeigte keinerlei signifikante strukturelle Veränderungen und auch *simulated annealing*^t Untersuchungen wiesen im Vergleich zu mittleren Strukturen der Standardeinstellungen keine wesentlichen Veränderung in der Struktur auf.

^tIn molekulardynamischen Simulationen wird bei einer gegebenen Temperatur ein thermischer Gleichgewichtszustand des Systems erreicht; für hohe Temperaturen ist das System zu diesem Zeitpunkt in der Lage hochenergetische Zustände des Konformationsraums zu besetzen und Energiebarrieren zu überwinden. Eine schrittweise Absenkung der Temperatur bedingt in Übereinstimmung mit der Boltzmann Verteilung eine höhere Wahrscheinlichkeit in der Besetzung niederenergetischer Zustände. Am absoluten Nullpunkt ($T = 0$ K) sollte das System dann den Zustand niedrigster Energie, das sogenannte globale Minimum besetzen.

7.3.2 Einschränkung der Freiheitsgrade

Positionen der Atome des Proteinerückgrats wurden während der Simulationen im Raum fixiert, wohingegen die Koordinaten der Seitenketten-Atome zur Anpassung freigegeben wurden.

Ein Vergleich der Kristallstrukturen freier^[136] und inhibierter^[88] Lipasen am Beispiel der Lipase aus *P. cepacia* zeigt, daß Atome des Proteinerückgrats auch durch die kovalente Anbindung eines Inhibitors nahezu unverändert bleiben ($C\alpha$ RMS 0,4 Å) und in drei dreidimensionalen Struktur fixiert sind. Die in den molekulardynamischen Simulationen getroffenen Einschränkungen der Freiheitsgrade der Lipasen rechtfertigen sich somit durch die experimentellen Beobachtungen an Kristallstrukturen.

Diese Tatsache entspricht einer Betrachtung der Enzym-Ligand-Wechselwirkungen nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip^u von E. Fischer^[115]. Die unbeweglichen Atome des Proteingerüsts stellen demnach die feste Beziehung zwischen Schlüssel und Schloß dar, wohingegen die Beweglichkeit der Seitenketten ein Maß der Anpassungsfähigkeit eines Enzyms, das sogenannte *induced fit* Verhalten prägen.

7.4 Experimentelle Befunde zur Stereopräferenz

Cygler *et al.*^[37] lieferten aufgrund struktureller Untersuchungen an Röntgenstrukturen von Enzym-Substrat-Komplexen mit eingebauten kovalenten Inhibitoren, die als Substrat-Analoga den Übergangszustand imitieren, erste Interpretationen der empirischen Regel zur Vorhersage der experimentell zu beobachtenden Stereopräferenz^[82]. Die Allgemeingültigkeit der empirischen Regel konnte hierbei auf drei Faktoren zurückgeführt werden:

- Die empirische Regel suggeriert einen spezifischen strukturellen Aufbau sowie Übereinstimmungen im Aussehen der Substratbindungsstellen unterschiedlicher Lipasen; diese Vermutung konnte durch einen Vergleich von Röntgenkristall-Strukturen verschiedener Lipasen bestätigt werden.
- Für das langsam umgesetzte Enantiomer konnte eine Destabilisierung der katalytischen

^uE. Fischer: *Um ein Bild zu gebrauchen, will ich sagen, dass Enzym und Glucosid wie Schloss und Schlüssel zu einander passen müssen, um eine chemische Wirkung auf einander ausüben zu können.*

Wasserstoff-Brückenbindung zwischen dem katalytischen Histidin des aktiven Zentrums und dem Substrat festgestellt werden.

- Die zu beobachtende Stereopräferenz wird durch eine direkt mit dem katalytischen Zentrum verbundene Bindungsstelle der sekundären Alkohole bestimmt. Der katalytische Apparat unterschiedlicher Lipasen und Esterasen besitzt jedoch einen häufig sehr ähnlichen Aufbau und somit eine identische Stereopräferenz.

Auch Rogalska *et al.*^[125,126] führten die spezifische Stereopräferenz einer Lipase für ein gegebenes Substrat unter gegebenen lipolytischen Bedingungen auf eine Art unveränderlichen Grundriß der Lipase, den er als Fingerabdruck der Lipase bezeichnet, zurück.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Molecular Modelling Untersuchungen Lipase-katalysierter Umsetzungen sekundärer Alkohole sind in guter Übereinstimmung mit den zuvor getroffenen Annahmen, die aus experimentellen Ergebnissen gewonnen werden konnten. So konnte sowohl die von Cygler *et al.*^[37] gezeigte Störung des aktiven Histidins durch langsam umgesetzte Enantiomere als auch die für die Stereopräferenz verantwortliche strukturelle Gemeinsamkeit unterschiedlicher Lipasen nachvollzogen werden. Als besonders charakteristische Position konnte beispielsweise in der Lipase aus *P. cepacia* (Leu17,Thr18) und der Lipase B aus *C. antarctica* (Thr40) der sogenannte *oxyanion stop* identifiziert werden, welcher durch sterische Wechselwirkung mit den Substituenten des Stereozentrums die Besetzung der produktiven und nicht-produktiven Bindungsmodi reguliert und hierdurch die experimentell zu beobachtende Stereopräferenz verursacht.

7.5 Die Bewertung Enzym-katalysierter Reaktionen

Aus den im Kapitel 7.2.1 behandelten Näherungen zur Berechnung der Enantioselektivität über relative Energieunterschiede diastereomerer Substrat-Lipase-Komplexe nach Gleichung 31 (S. 105) ergibt sich die Frage nach der Grundlage eines auf der Enzym-Substrat-Struktur basierenden Modells zur Bewertung Enzym-katalysierter Reaktionen. Die strukturbasierte Bewertung im speziellen Fall der Lipase-katalysierten Umsetzungen ermöglicht eine Abschätzung der experimentell zu erwartenden Enantioselektivität in kinetischen Racematspaltungen sekundärer Alkohole und strukturanalogen Substanzklassen.

7.5.1 Energie- oder strukturbasierte Bewertung?

Viele der bislang publizierten Arbeiten^[63,104,105] auf dem Gebiet der Vorhersage der Stereoselektivität Enzym-katalysierter Umsetzungen basieren auf Energieberechnungen unterschiedlichster Enzym-Substrat-Komplexe. Im konkreten Fall der Lipase-katalysierten Reaktionen erlauben diese Methoden heute schon häufig eine korrekte Vorhersage der experimentell zu erwartenden Stereopräferenz, versagen jedoch stets in einer quantitativen Abschätzung der Stereoselektivität. Die Schwierigkeit in der Identifizierung der molekularen Grundlage der Stereoselektivität auf Basis von Energieberechnungen liegt in den relativ geringen Energieunterschieden, aus denen die zu beobachtende Stereoselektivität letztendlich resultiert ($\approx 1\text{-}2$ kcal/mol). Eine geeignete Möglichkeit zur Berücksichtigung von Einflußgrößen wie Solvens oder Temperatur ist derzeit ebenfalls nicht bekannt.

Eine durch Optimierung der Reaktionsbedingungen verursachte Selektivitätserhöhung um den Faktor 10 beispielsweise ist auf eine Steigerung in der freien Aktivierungsenthalpie $\Delta\Delta G^\ddagger$ von nur 1,4 kcal/mol zurückzuführen, was in der Tat sehr schwachen Wechselwirkungen entspricht. Eine Berechnung von diastereomeren Substrat-Lipase-Komplexen liefert jedoch relativ große Energie-Werte, die im Vergleich zum Unterschied in den Aktivierungsenthalpien wesentlich größeren Fluktuationen ($\gg 1$ kcal/mol) unterliegen.

Eine äußerst kritische Näherung in diesem Zusammenhang ist die Vernachlässigung der Entropiebeiträge. Diese werden für rigide Komplexe während des Katalyse-Schrittes auf ≤ 1 kcal/mol geschätzt^[41] und aus diesem Grunde in den Berechnungen oft vernachlässigt. Bei quantitativen Selektivitätsberechnung aber stellt sich diese Annahme als unzulänglich heraus, da sich Entropie-Effekte signifikant auf die Aktivierungsenthalpie ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) und somit auf die Selektivität auswirken können; Abbildung 52 soll dies veranschaulichen. Abbildung 52 (A) (S. 111) zeigt einen freien Liganden in Lösung. Der Ligand ist konformativ flexibel und kann sich räumlich frei bewegen. Solvensmoleküle sind in der Hydrathülle des Liganden und der Bindestelle des Rezeptors fixiert. Abbildung 52 (B) (S. 111) zeigt den mit dem Liganden komplexierten Rezeptor. Die Desolvatisierung des Liganden und des Rezeptors wird teilweise durch die Bindungs-Affinität des Liganden an den Rezeptor ausgeglichen. Entropisch ungünstig für die Komplexbildung wirkt sich jedoch der Verlust der konformationellen Flexibilität und der räumlichen Beweglichkeit des Liganden aus. Teile des Entropieverlusts werden durch die

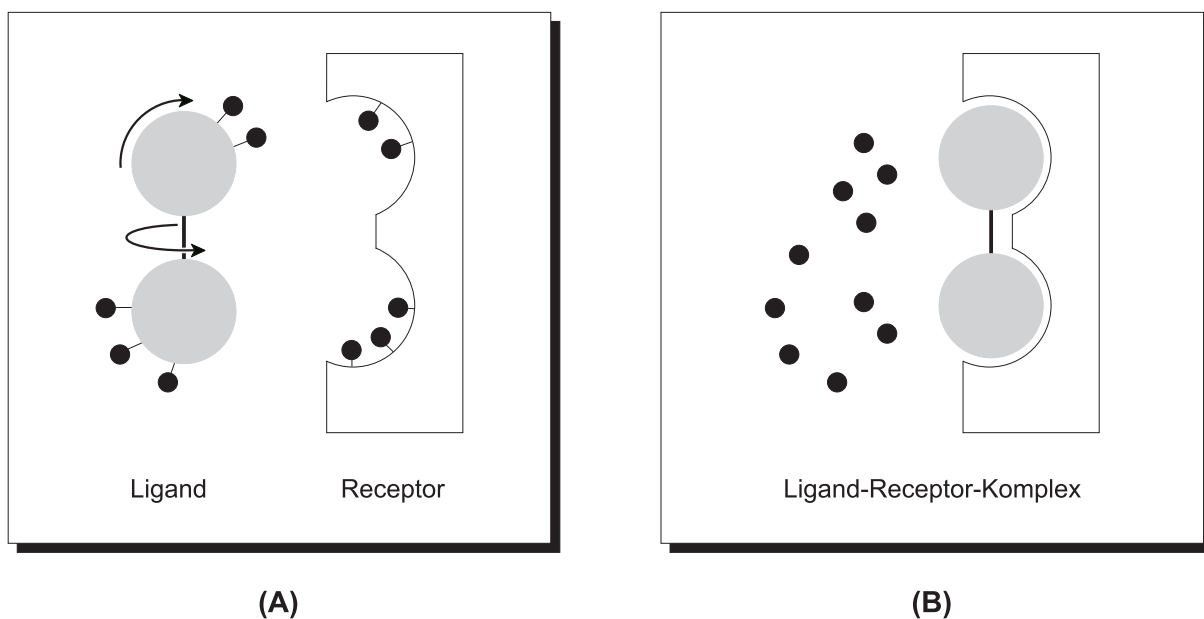


Abb. 52. (A) Schematische Darstellung eines konformativ flexiblen Liganden, der sich räumlich frei bewegen kann. Ligand und Rezeptor beinhalten fixierte Solvensmoleküle in ihrer Hydrathülle. (B) Der Ligand ist mit dem Rezeptor komplexiert. Die konformative Flexibilität und die räumlich freie Beweglichkeit geht hierbei verloren. Der Entropieverlust wird durch die nun frei beweglichen Solvensmoleküle teilweise kompensiert. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß zur Abspaltung der Solvensmoleküle aus der Hydrathülle Energie aufzuwenden ist.

zunehmende Beweglichkeit der Solvensmoleküle kompensiert. Ein komplexes Zusammenspiel zwischen Enthalpie und Entropie regelt die Komplexbildung eines Liganden in der Bindestelle eines Rezeptors, wobei Unterschiede der Entropiebeiträge ≥ 1 kcal/mol die Umsetzung beeinflussen können.

Eine energetische Betrachtung, die präzise genug sein soll, dieses Zusammenspiel nachzuvollziehen und Unterschiede in den freien Aktivierungsenthalpien von ≈ 1 kcal/mol vorherzusagen, muß deshalb sowohl Enthalpie- als auch Entropie-Effekte genauestens berücksichtigen.

Das entwickelte strukturbasierte Bewertungsmodell zur Vorhersage der Stereoselektivität kommt im Gegensatz zu den energiebasierten Methoden ohne die Berücksichtigung der oben genannten Effekte aus. Wie gezeigt werden konnte, wirken sich schon kleine Einflüsse, wie z.B. Solvens-Effekte in den Energieberechnungen, vor allem aber das additive Verhalten verschiedener Effekte signifikant auf die resultierende Energie des Systems aus. Eine Berechnung aller im Experiment auftretenden Erscheinungen ist derzeit nicht möglich, weshalb sich Energie-Berechnungen

nicht zu einer quantitativen Abschätzung der Stereoselektivität eignen.

Ein anderes Bild zeigt sich für das Scoring anhand berechneter struktureller Eigenschaften. Im Gegenzug zur Energie des Systems führen äußere Effekte nur zu einer geringfügigen strukturellen Veränderung des untersuchten Systems. Das entscheidende Kriterium in der strukturbasierten Vorhersage ist die Anpassung der Lipase auf das kovalent gebundenen Substrat und diese ist – solange Solvensmoleküle nicht in den Katalysemechanismus involviert sind – unabhängig von äußeren Einflußgrößen wie beispielsweise Solvens-Effekten.

7.5.2 Weitere Bewertungsmethoden

Neben energie- und strukturbasierten Bewertungsmethoden wurden bereits die unterschiedlichsten Parameter auf ihre Fähigkeit zur quantitativen Abschätzung der Aktivität und Selektivität in Enzym-katalysierten Reaktionen untersucht. Hierzu gehörte sowohl die Untersuchung einzelner Parameter wie die Dielektrizitätskonstante, Polarisierbarkeit, Elektronen-Akzeptanz, der Löslichkeit-Parameter nach Hildebrand^[66] und Hydrophobizität (log P) aber auch der Versuch einer Korrelation mehrerer Parameter^[45,85,92]. Es hat sich jedoch gezeigt, daß keine dieser Regeln eine generelle Anwendbarkeit findet und jeweils nur für spezielle, oft vergleichbare Reaktionsbedingungen Gültigkeit besitzt.

7.6 Effekte äußerer Einwirkungen

7.6.1 Solvens-Effekte

Das vorgestellte theoretische Modell zur Vorhersage der Stereoselektivität Lipase-katalysierter Umsetzungen berücksichtigt den Lösungsmiteleinfluß auf die experimentell zu beobachtende Stereoselektivität nicht; die angewandten molekulardynamischen Simulationen werden ausschließlich *in vacuo* durchgeführt.

Experimentelle Untersuchungen zeigen hingegen eine beträchtliche Abhängigkeit der Enantioselektivität vom eingesetzten Solvens. In vielen Untersuchungen wird das organische Solvens zur Optimierung der Enantioselektivität eingesetzt (solvent engineering); so zeigt die Hydrolyse von Seudenol-Acetat durch die Schweine-Pankreas Lipase keinerlei Enantioselektivität^[100],

aber eine moderate Enantioselektivität ($E = 17$) in der Acylierungsreaktion von Seudenol mit Trifluorethyl-Acetat in Diethylether^[77]. Die Enantioselektivität in der durch die Lipase B aus *C. antarctica* katalysierten Acetylierung variierte zwischen 8 und 32 in Abhängigkeit des eingesetzten Lösungsmittels und des jeweiligen Wassergehaltes; die höchste Enantioselektivität konnte in trockenem Benzol erzielt werden^[108].

Auch die Stereopräferenz der Umsetzung kann durch die Wahl des Solvens beeinflusst werden. Die Veresterungen der chiralen Säure 2-Phenoxy-Propionsäure mit Butanol in CCl_4 mittels der Lipase aus *C. rugosa* beispielsweise zeigt eine Stereopräferenz für das *R*-Enantiomer, wohingegen in Aceton bevorzugt die *S*-konfigurierte Form umgesetzt wird^[159]. Auch die im Modell untersuchte Lipase aus *P. cepacia* weist beträchtliche Solvens-Effekte auf, so variiert die Enantioselektivität für 2,2,2-Trifluor-1-(2-Naphthyl)-Ethanol zwischen $E = 22$ für die hydrolytische Umsetzung in *t*-Butyl-methylether und $E \geq 100$ in Aceton und Benzol.

Andere Umsetzungen werden von Solvens-Effekten nur unmerklich beeinflusst, so z.B. die Lipase-katalysierte Umsetzung von 1,1,1-Trifluor-Tetradekan-2-ol in Hexan, THF, Benzol, Aceton, Diethylether, CH_2Cl_2 und CH_3Cl , die sich über eine geringe Enantioselektivität von $E = 13$ nicht weiter steigern läßt.

Umfangreiche Untersuchungen zu Solvens-Einflüssen auf die Enantioselektivität wurden bereits von Wolff *et al.*^[174] und Van Tol *et al.*^[164,163] unternommen. In diesen Modellen wird ein Solvens-unabhängiger thermodynamischer Aktivitätskoeffizient der für die Enantioselektivität relevanten Enzym-Spezies angenommen. Die Michaelis-Menten Konstante K_M und die maximale Reaktionsrate V_{max} eines Enantiomers sind in unterschiedlichen Solventien variabel, wobei das Verhältnis zwischen K_M und V_{max} der beiden Enantiomere konstant bleibt. Die Beobachtungen von Wolff *et al.* und Van Tol *et al.* implizieren, daß sich der *E*-Wert in einer untersuchten Solvens-Reihe konstant verhalten sollte, während sich die absoluten Reaktionsraten durchaus verändern können. Wolff legte weiter fest, daß in einem bestimmten Solvens Unterschiede zwischen den thermodynamischen Aktivitätskoeffizienten der relevanten Enzym-Spezies eher die Ausnahme als die Regel darstellen. Die im vorangegangenen vorgestellten Arbeiten zur experimentellen Ermittlung des Solvens-Effektes belegen jedoch, daß dieses Modell in keinster Weise in der Lage ist diese Effekte zu erklären und als Basis somit ungeeignet ist^[110].

Diese Beispiele zeigen die besondere Bedeutung des Solvens auf das Ergebnis in Lipase-katalysierten Reaktionen auf. Der Zwiespalt zwischen Experiment und strukturbasiertem Modell, das völlig ohne Betrachtung des Solvens auskommt, wird hierdurch verdeutlicht.

Dieser Zwiespalt ist folgendermaßen zu interpretieren: Eine Korrelation des berechneten, katalytisch essentiellen Abstandes $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ wird für die Gesamtheit aller untersuchten Substrate zur Solvens-optimierten Stereoselektivität festgestellt, d.h. im Falle des in diesem Kapitel bereits angesprochenen 2,2,2-Trifluor-1-(2-Naphthyl)-Ethanol zu $E \geq 100$ in Aceton und Benzol und nicht zu $E = 22$ in *t*-Butyl-methylether.

Die Konsequenz dieser Beobachtung legt nahe, daß eine Selektivitätssteigerung durch Solvens-optimierung, wie sie häufig Anwendung findet, durch das Zusammenspiel der Struktur der Lipase und der des Substrates limitiert ist. In anderen Worten ausgedrückt: wird ein optimales Solvens eingesetzt und kann die Lipase auf struktureller Basis gut zwischen zwei Enantiomeren differenzieren so resultiert diese Umsetzung in einer hohen Enantioselektivität; für ein nicht optimales Solvens hingegen resultiert auch diese Umsetzung in einer geringen Stereoselektivität. Umgekehrt zeigt sich: ist die strukturelle Differenzierung einer Lipase zwischen zwei Enantiomeren schlecht, so ist auch eine Solvensoptimierung nicht in der Lage eine Selektivitätssteigerung über ein von der Struktur vorgegebenes Limit hinaus herbei zu führen.

In diesem Falle bietet nur die Modifikation der Lipase durch das sogenannte *Protein Engineering* die Möglichkeit die Stereoselektivität über das vorgegebene Limit hinaus zu verbessern. Das theoretische Modell zur Vorhersage der Stereoselektivität Lipase-katalysierter Umsetzungen gibt demnach lediglich Auskunft über den optimalen Reaktionsverlauf und keine Information über negative Auswirkungen eines Solvens auf die resultierende Selektivität.

7.6.2 Temperatur-Effekte

Nicht nur das Solvens sondern auch die Temperatur können sich erheblich auf die resultierende Enantioselektivität einer Lipase-katalysierten Reaktion auswirken. Sakai *et al.*^[128] konnte beispielsweise die Enantioselektivität in einer *P. cepacia* Lipasen-katalysierten Reaktion in Diethylether von $E = 17$ bei 30°C auf $E = 84-99$ bei -40°C steigern. Andere Beispiele^[177-179] zeigen den umgekehrten Trend, indem eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auch zu einer Steigerung der Enantioselektivität führt.

Die durchgeführten molekulardynamischen Simulationen fanden hingegen bei experimentell nicht überprüfbar 100 K statt und lassen den Effekt der Temperatur auf die Enantioselektivität unberücksichtigt. Auch für diesen Fall wird eine Korrelation zum experimentell ermittelten Optimum der Enantioselektivität beobachtet. Zusätzlich besitzen die Proteine *in vacuo*, sprich ohne Solvens-Hülle bereits bei diesen Temperaturen die Flexibilität, die im Experiment erst bei viel höheren Temperaturen erzielt wird. Temperatur und Solvens sind demnach eng mit der erzielten Enantioselektivität einer Reaktion verknüpft, können jedoch in molekulardynamischen Simulationen zur Betrachtung des Reaktions-Optimums vernachlässigt werden.

7.7 Vergleich der Modelle zur Vorhersage der Stereopräferenz

Abbildung 53 zeigt noch einmal die empirische Regel^[82] zur Vorhersage der Stereopräferenz in Lipase-katalysierten Umsetzungen sekundärer Alkohole. Die Regel besitzt für eine Vielzahl der untersuchten Lipasen Gültigkeit und basiert einzig auf einem Größenvergleich der Substituenten am Stereozentrum des Alkohols. Die Einbeziehung detaillierter Eigenschaften der Lipase-Bindestelle ist für diese Regel nicht vonnöten.

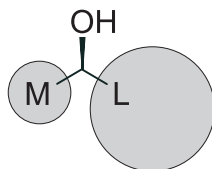


Abb. 53. Die empirische Regel zur Vorhersage der Stereopräferenz in Lipase-katalysierten Umsetzungen chiraler sekundärer Alkohole; *M* – mittlerer Substituent; *L* – großer Substituent. Der Ester des dargestellten Enantiomers reagiert schneller in Lipase-katalysierten Hydrolysen; in entsprechenden Veresterungen reagiert das dargestellte Enantiomer des sekundären Alkohols schneller. Das Substrat alleine gibt jedoch keine Information über die experimentell zu erwartende Stereoselektivität.

7.7.1 Lipase aus *P. cepacia* und Lipase B aus *C. antarctica*

Die Lipase aus *P. cepacia* und die Lipase B aus *C. antarctica* weisen gegenüber sekundären Alkoholen die höchste Enantioselektivität auf und die Umsetzungen gehorchen streng der empirischen Regel zur Vorhersage der Stereopräferenz. Die Bindestellen dieser Lipasen sind ver-

gleichsweise klein und den Substituenten am Stereozentrum sind entsprechend ihren unterschiedlichen sterischen Ansprüchen spezifische Bindetaschen zuzuordnen. Diese spezifische Substituentenzuordnung kann jedoch jeweils nur für ein Enantiomer erfüllt werden, wohingegen das spiegelbildliche Enantiomer sterische Hinderungen in der Bindestelle erfährt und sich in einer katalytisch ineffizienten Ausrichtung in der Bindestelle orientiert.

Die empirische Regel und das Ergebnis der Molecular Modelling Untersuchungen sind miteinander in Einklang und spiegeln E. Fischers^[115] Betrachtung vom Schlüssel-Schloß-Prinzip Enzym-katalysierter Reaktionen wider. Die empirische Regel vermittelt den Eindruck nahezu unflexibler Bindetaschen (Schloß), die aufgrund ihrer sterischen Konstanz in der Betrachtung der Stereopräferenz zu vernachlässigen sind. Für den konkreten Fall der Lipasen heißt das, daß schnell-umgesetzte Enantiomere (passende Schlüssel) in ihrer Konfiguration dem Protein entsprechen, wohingegen die spiegelbildliche Konfiguration langsam-umgesetzter Enantiomere (nicht-passende Schlüssel) keine oder nur geringe chemische Wirkung des Proteins, sprich Enzym-Katalyse, erfährt (Abb. 54).

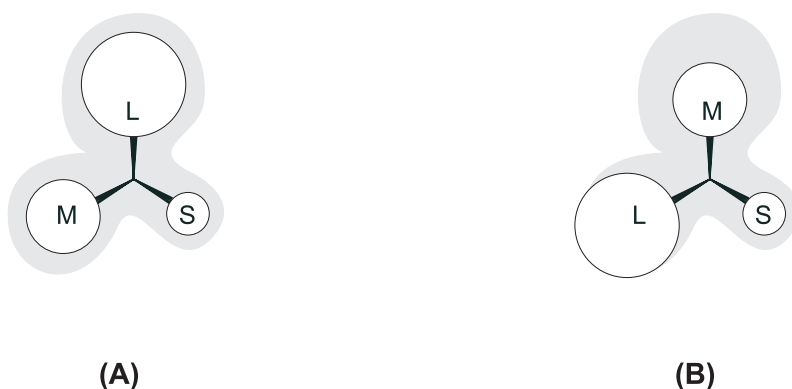


Abb. 54. Schematische Darstellung einer relativ kleinen Lipase-Bindestelle (grau) wie im Beispiel der Lipase aus *P. cepacia*. (A) Im schnell-umgesetzten Enantiomer besetzen die Substituenten alleine aufgrund sterischer Ansprüche die hierfür vorgesehenen Bindetaschen. (B) Im langsam-umgesetzten Enantiomer kommt es durch die Unterbringung von Substituenten in nicht hierfür vorgesehenen Bindetaschen zu ungünstigen sterischen Wechselwirkungen.

Molecular Modelling Ergebnisse zeigen, daß die Bindetaschen von spezifischen Substituenten der Substrate (Schlüssel) besetzt werden. Die größenorientierte Abfolge der Bindetaschen ist konstant und wird nicht durch die kovalente Fixierung unterschiedlicher Substrate bzw. Enantiomere beeinflusst. Lediglich die relative Größe der Bindetaschen ist durch das *induced fit* Verhalten der Seitenketten veränderlich. Molecular Modelling Untersuchungen erlauben weiterhin

eine genaue Identifizierung der an der Bildung der Bindetaschen beteiligten Aminosäuren (Kapitel 6.2.1, S. 70 und 6.2.3, S. 83) und somit eine Identifizierung der molekularen Grundlage der Stereopräferenz.

7.7.2 Lipase aus *C. rugosa*

Für die Lipase aus *C. rugosa* zeigt sich im Vergleich zu der Lipasen aus *P. cepacia* und der Lipase B aus *C. antarctica* ein anderes Bild. Die empirische Regel erlaubt in diesem Fall nur eine korrekte Vorhersage von ca. 50 % der untersuchten Substrate. Molecular Modelling Untersuchungen liefern ein vergleichbares Bild. Hierbei lassen sich langsam- und schnell-umgesetzte Enantiomere kleiner, flexibler Substrate (Abb. 36, S. 76) in mehreren produktiven Bindungsmodi in der Bindestelle so fixieren, daß es zu keinerlei ungünstigen sterischen Wechselwirkungen kommt (Kapitel 6.2.2, S. 75). Der Grund hierfür liegt in einer verhältnismäßig großen Bindestelle der Lipase aus *C. rugosa*. Eine Unterbringung der Substituenten am Stereozentrum in die spezifischen Bindetaschen alleine aufgrund sterischer Eigenschaften ist nicht in der Lage die experimentell zu beobachtende Stereopräferenz der Umsetzungen zu begründen.

Bezüglich einer Vorhersage der experimentell zu erwartenden Stereopräferenz liefern beide Modelle die exakt gleichen Ergebnisse. Die Übereinstimmungen der beiden Modelle bestätigen die eingesetzten Methoden und Näherungen.

Aufgrund der zeitintensiven MD-Simulationen und der hierzu nötigen Rechenleistung ist jedoch die empirische Regel zu einer alleinigen Vorhersage der Stereopräferenz dem strukturbasierten Modell vorzuziehen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß keinerlei Informationen über Stereoselektivität aus der empirischen Regel erhalten werden können; diese sind nur über den strukturbasierten Ansatz zugänglich.

7.7.3 Abweichungen in der Messung des Abstandes $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$

Die strukturbasierte Bewertung Lipase-katalysierter Umsetzungen erfolgt anhand des Abstandes $d(\text{H}_{N\epsilon}-\text{O}_{alc})$ langsam umgesetzter Enantiomere im produktiven Bindungsmodus. Die untersuchten Substrate lassen sich in insgesamt drei Kategorien einteilen: Substrate mit experi-

mentell bestimmten Enantioselektivitäten von $E < 100$ besitzen Abstände $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc}) < 2,1 \text{ \AA}$, Substrate mit hohen Enantioselektivitäten $E > 100$ hingegen zeigen Abstände $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc}) > 2,1 \text{ \AA}$. Im engen Bereich (2,0 bis 2,2 \AA), der sogenannten 'Twilight Zone' befinden sich Substrate, die Grenzfälle niederer und hoher Enantioselektivität darstellen und Substrate, die mit nur moderater Enantioselektivität ($E \approx 50$) umgesetzt werden.

Der Fehler in der Messung des Abstandes $d(\text{H}_{N\varepsilon}-\text{O}_{alc})$ ist $\approx 0,1 \text{ \AA}$. Die eindeutige Zuordnung der Substrate in die insgesamt drei unterschiedlichen Kategorien bezüglich der Enantioselektivität kann somit zuverlässig gewährt werden.

7.8 Mutanten-Design *in silico* unter Verwendung des theoretischen Modells

Die Fähigkeit des theoretischen Modells wurde zur Vorhersage von verbesserten Einfach-Mutanten der Lipase aus *P. cepacia* bezüglich der Stereoselektivität gegenüber sekundären Alkoholen herangezogen und experimentell überprüft (Kapitel 6.4, S. 96).

7.8.1 Das eingesetzte Struktur-Modell

Das dieser Arbeit zugrunde liegende theoretische Modell basiert auf der Kristallstruktur der Lipase aus *P. cepacia* (PDB-Eintrag 3lip). Die Auflösung der Struktur beträgt $2,0 \text{ \AA}^{[136]}$, was sich zur Erstellung des Modells in Bezug auf den Wildtyp der Lipase aus *P. cepacia* als hinreichend heraus gestellt hat.

Zur Generierung der Einfach-Mutante *in silico* wurde ein Austausch der Seitenkette der Aminosäure Y29 (Tyrosin), die sich in einer Schleifenposition befindet, gegen $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, die Seitenkette der Aminosäure Leucin durchgeführt. Das Protein-Grundgerüst *in silico* bleibt hierbei unverändert. Der Einfluß des Austausches der Aminosäuren kann am *in silico* Modell nicht abgeschätzt werden und findet somit keine Berücksichtigung. Eine Überprüfung der Qualität der generierten Modell-Strukturen der Mutanten ist durch Röntgenkristallstrukturen denkbar, die aber aufgrund der enormen Anzahl untersuchter Mutanten nicht zugänglich sind.

7.8.2 Das optimale Solvens und die optimalen Reaktionsbedingungen

Die Umsetzung des *rac*-2-Octanols wurde in den Lösungsmitteln *n*-Hexan, Toluol, Dichlormethan und Diethylether durchgeführt. Eine Steigerung der Enantioselektivität von $E = 7$ in *n*-Hexan für die Wildtyp-Lipase zu $E = 10$ in *n*-Hexan für die Einfachmutante Y29L konnte erzielt werden. Eine erwartete Selektivitätssteigerung von $E > 50$ konnte in den gewählten Lösungsmitteln und Reaktionsbedingungen nicht detektiert werden.

Das Modell zur Vorhersage der Enantioselektivität ergibt den E-Wert für das optimale Lösungsmittel unter optimalen Reaktionsbedingungen einer Umsetzung. Eine weitere Selektivitätssteigerung durch Optimierung sämtlicher Einfluß-Größen ist demnach möglich.

7.8.3 Die Fehlergröße in der experimentellen Bestimmung der Enantioselektivität

Fehler in der GC-Analytik können unter anderem durch geringe Abweichungen in der Herstellung des Racemats aus enantiomerenreinem *R*- und *S*-2-Octanol, sowie durch Fehler in der Integration der Signale (Abb. 51, S. 102) des Chromatogramms unterlaufen.

Die Enantioselektivität der Umsetzung von *rac*-2-Octanol konnte von $E = 7$ auf $E = 10$ gesteigert werden. Die Selektivitätssteigerung ist somit deutlich größer als ein möglicher Meßfehler in der analytischen Auswertung.

7.9 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Grundlage der Stereopräferenz und Stereoselektivität von unterschiedlichen mikrobiellen Lipasen in der Umsetzung von sekundären Alkoholen identifiziert und beschrieben. Eine Bewertung erfolgte anhand eines einfachen geometrischen Parameters $d(H_{N\epsilon}-O_{alc})$, dem Abstand zwischen $H_{N\epsilon}$ des katalytischen Histidins zum Alkohol-Sauerstoffatom des Substrats. Die Ausweitung des Prinzips des strukturbasierten Scorings scheint für weitere Lipasen und andere Enzym-katalysierte Reaktionen erfolgversprechend. Als Beispiel sind die Epoxidhydrolasen zu nennen, für die eine ausreichende Anzahl von 3D-Strukturen (NMR- oder Röntgenkristall-Strukturen) in der PDB zur Verfügung steht. Jedoch läßt sich auch für Enzyme ohne bislang verfügbare 3D-Strukturen mittels Homologie-Modelling zu strukturellen Vorlagen mit entsprechend hoher Sequenz-Homologie ein strukturbasiertes Scoring durchführen.

Zur experimentellen Bestätigung der berechneten Strukturen und ebenso zur Verfeinerung des *in silico* Designs neuer Mutanten wäre ein struktureller Beweis des Verhaltens des aktiven Histidins in substratanalogen Inhibitor-Komplexen sowie die Auswirkung der Mutation Y29L auf die 3D-Struktur von besonderer Bedeutung. Anhand der 3D-Struktur der Mutante Y29L kann das bestehende *in silico* Modell überprüft und revidiert werden.

Neben den Substratklassen der Triacylglyceride, der primären Alkohole, sowie der sekundären Alkohole und Amine sollte das Modell auf möglichst viele Substanzklassen, wie z.B. Thiole, tertiäre Alkohole, axial-chirale und spiro-Verbindungen, ausgeweitet werden und die gewonnenen Erkenntnisse in einem allgemeingültigen Modell für Lipasen zur Vorhersage der experimentell zu erwartenden Stereopräferenz und Stereoselektivität vereint werden.

Literatur

- [1] H. Akita, M. Nozawa, Y. Futagami, M. Miyamoto, C. Saotome, *Simple approach to optically active drimane sesquiterpenes based on enzymatic resolution*. Chem. Pharm. Bull. **45** (1997), 824-831.
- [2] L. Alberghina, R. D. Schmid, R. Verger. (Eds.) (1991) *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*, GBF Monographs **Vol. 16**, Weinheim: Wiley-VCH.
- [3] B. J. Alder, T. E. Wainwright, *Phase transition for a hard-sphere system*. J. Chem. Phys. **27** (1957), 237-246.
- [4] Y. S. Angelis, I. Smonou, *Enantioselectivity and Diastereoselectivity in the Hydrolysis of Acylals and Structurally Related Esters of Secondary Alcohols with Candida rugosa Lipase*. Tetrahedron Lett. **39** (1998), 2823-2826.
- [5] B. J. Bachmann, *Linkage map of Escherichia coli K-12*. Edition 8, Microbiol. Rev. **54** (1990), 130-197.
- [6] A. Bairoch, R. Apweiler, *The SWISS-PROT protein sequence database: its relevance to human molecular medical research*. J. Mol. Mod. **75** (1997), 312-316.
- [7] A. Bairoch, R. Apweiler, *The SWISS-PROT protein data bank and its supplement TrEMBL in 1999*. Nucleic Acids Res. **27** (1999), 49-54.
- [8] M. Bänziger, G. J. Griffiths, J. F. McGarrity, *A facile synthesis of (2R,3E)-4-iodobut-3-en-2-ol and (2S,3E)-4-iodobut-3-en-2-yl chloroacetate*. Tetrahedron: Asymmetry **4** (1993), 723-726.
- [9] J. P. Barnier, L. Blanco, G. Rousseau, E. Guibé-Jampel, I. Fresse, *Enzymic resolution of cyclopropanols. An easy access to optically active cyclohexanones possessing an α -quaternary chiral carbon*. J. Org. Chem. **58** (1993), 1570-1574.
- [10] T. N. Belev, M. Singh, J. E. McCarthy, *A fully modular vector system for optimization of gene expression in Escherichia coli*. Plasmid **26** (1991), 147-150.
- [11] G. W. Bemis, G. Carlson-Golab, J. A. Katzenellenbogen, *A molecular dynamics study of the stability of chymotrypsin acyl enzymes*. J. Am. Chem. Soc. **114** (1992), 570-578.

- [12] M. Berger, M. P. Schneider, *Enzymatic esterification of glycerol II. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1(3)-rac-monoacylglycerols*. J. Am. Oil. Chem. Soc. **69** (1992), 961-965.
- [13] F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, E. F. Jr Meyer, M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, *The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures*. J. Mol. Biol. **112** (1977), 525-542.
- [14] D. F. Berry, A. Paterson. (1990), *Enzymes in the food industry.*, in.: Enzyme Chemistry (Suckling, C.J.; Ed.), **2nd Ed.** pp. 306-351. London: Chapman and Hall.
- [15] W. Boland, C. Fröbl, M. Lorenz, *Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis*. Synthesis, (1991), 1049-1072.
- [16] B. Borgstrom, H. L. Brockman, (Eds.) (1984), *Lipases.*, New York: Elsevier.
- [17] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas. (1999), *Hydrolases in organic synthesis.*, Weinheim: Wiley-VCH.
- [18] L. Brade, A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, *A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase*. Nature **343** (1990), 767-770.
- [19] G. Bringmann, R. Walter, C. Ewers, *Diastereoselective Ring Opening of Achiral Bridged Biaryls Using Chiral O- and N-Nucleophiles: First Atropo-Enantioselective Synthesis of (-)-4,4'-Bis(orcinol)*. Synlett (1991), 581-583.
- [20] G. Bringmann, L. Göbel, O. Schupp, *Ein konzeptionell neuer Zugang zu axialchiralen Biarylen - Die atropselektive Öffnung stereochemisch labiler cyclischer Biarylvorstufen*. GIT Fachz. Lab. **37** (1993), 189-200.
- [21] G. Bringmann, J. R. Jansen, *Stereocontrolled Ring Opening of Axially Prostereogenic Biaryl Lactones with Hydrogen Nucleophiles: Directed Synthesis of a Dioncophylline A Precursor and (Optionally) its Atropodiastereomer*. Synthesis, (1991), 825-827.
- [22] G. Bringmann, C. L. J. Ewers, L. Göbel, T. Hartung, B. Schöner, O. Schupp, R. Walter, *Selective Reactions of Metal-Activated Molecules* (Eds.: H. Werner, A. G. Griesbeck, W. Adam, G. Bringmann, W. Kiefer), Vieweg, Braunschweig, (1992), 183-186.

- [23] G. Bringmann, T. Hartung, *The Atropo-Enantioselective Ring Opening of Achiral Lactone-Bridged Biaryls Using Chirally Modified Aluminum Hydrides*. *Synthesis* (1992), 433-435.
- [24] G. Bringmann, J. Hinrichs, J. Kraus, A. Wuzik, T. Schulz, *Non-Dynamic Kinetic Resolution of Configurationally Stable Biaryl Lactones by Reduction with Oxazaborolidine-Activated Borane: AM1 Studies and Experimental Verification*. *J. Org. Chem.* **65** (2000), 2508-2516.
- [25] K. Burgess, L. D. Jennings, *Enantioselective esterifications of unsaturated alcohols mediated by a lipase prepared from Pseudomonas sp.*. *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991), 6129-6139.
- [26] G. Caron, R. J. Kazlauskas, *An optimized sequential kinetic resolution of trans-1,2-cyclohexanediol*. *J. Org. Chem.* **56** (1991), 7251-7256.
- [27] P. Carter, J. A. Wells, *Dissecting the catalytic triad of a serine protease*. *Nature* **332** (1988), 564-568.
- [28] A. Chadha, M. Manohar, *Enzymatic resolution of 2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid and 2-hydroxy-4-phenylbutenoic acid*. *Tetrahedron: Asymmetry* **6** (1995), 651-652.
- [29] C. S. Chen, C. J. Sih, *Enantioselective biocatalysis in organic solvents. Lipase catalyzed reactions*. *Angew. Chem. Int. Edit. Engl.* **28** (1989), 695-707.
- [30] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers*. *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982), 7294-7299.
- [31] C. S. Chen, S. H. Wu, G. Girdaukas, C. J. Sih, *Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. Enzyme-catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems*. *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987), 2812-2817.
- [32] P. S. J. Cheetham, *Combining the technical push and the business pull for natural flavors*. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **55** (1997), 1-49.
- [33] M. Clark, R. D. III Cramer, N. van Opdenbosch, *Validation of the general purpose TRIPOS 5.2 force field*. *J. Comp. Chem.* **10** (1989), 982-1012.
- [34] M. L. Connolly, *Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids*. *Science* **221** (1983), 709-713.

- [35] C. S. Craik, S. Roczniak, C. Largman, W. J. Rutter, *The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases*. *Science* **237** (1987), 909-913.
- [36] P. Crotti, V. Dibussolo, L. Favero, F. Minutolo, M. Pineschi, *Efficient application of lipase-catalyzed transesterification to the resolution of γ -hydroxy ketones*. *Tetrahedron: Asymmetry* **7** (1996), 1347-1356.
- [37] M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, *A structural basis for the chiral preferences of lipases*. *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994), 3180-3186.
- [38] V. Daggett, S. Schröder, P. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991), 8926-8931.
- [39] U. Derewenda, A. M. Brzozowski, D. M. Lawson, Z. S. Derewenda, *Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase*. *Biochemistry* **31** (1992), 1532-1541.
- [40] U. Derewenda, L. Swenson, R. Green, Y. Wei, G. G. Dodson, *An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases*. *Nat. Struct. Biol.* **1** (1994), 36-47.
- [41] D. F. DeTar, *Computation of enzyme-substrate specificity*. *Biochemistry* **20** (1981), 1730-1743.
- [42] M. J. S. Dewar, W. Thiel, *Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximation and parameters*. *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977), 4907-4917.
- [43] M. J. S. Dewar, W. Thiel, *Ground states of molecules. 39. MNDO results for containing hydrogen, carbon, nitrogen and oxygen*. *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977), 4899-4907.
- [44] G. Dodson, A. Wlodawer, *Catalytic triads and their relatives*. *Trends Biochem. Sci.* **23** (1998), 347-352.
- [45] A. Ducret, M. Trani, R. Lortie, *Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity*. *Enzyme Microb Technol* **22** (1998), 212-216.
- [46] M.-P. Egloff, F. Marguet, G. Buono, R. Verger, C. Cambillau, *The 2.46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate*. *Biochemistry* **34** (1995), 2751-2762.

- [47] T. Ema, J. Kobayashi, S. Maeno, T. Sakai, M. Utaka, *Origin of the enantioselectivity of lipases explained by a stereo-sensing mechanism operative at the transition state*. Bull. Chem. Soc. Jpn. **71** (1998), 443-453.
- [48] M. G. Evans, M. Polyani, Trans Faraday Soc **31** (1935), 875-882.
- [49] H. Eyring, J. Chem. Phys. **3** (1935), 107-115.
- [50] K. Faber, H. Griengl, H. Höning, J. Zuegg, *On the prediction of the enantioselectivity of Candida rugosa lipase by comparative molecular field analysis*. Biocatalysis **9** (1994), 227-239.
- [51] K. Faber, S. Riva, *Enzyme-catalyzed irreversible acyl transfer*. Synthesis (1992), 895-910.
- [52] E. Fischer, *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme*. Ber. Dt. Chem. Ges. **27** (1894), 2985-2993.
- [53] S. M. Franken, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, B. W. Dijkstra, *Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes*. EMBO J. **10** (1991), 1297-1302.
- [54] H. J. Gais, V. H. M. Elferink, *Hydrolysis and formation of C-O-bonds*, in.: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Drauz, K., Waldmann, H.; Eds.), 1995, **Vol 1**, pp. 165-271 (ref. on pp 343-348). Weinheim: Wiley-VCH.
- [55] J. Gaspar, A. Guerrero, *Lipase-catalysed enantioselective synthesis of naphthyl trifluoromethyl carbinols and their corresponding non-fluorinated counterparts*. Tetrahedron: Asymmetry **6** (1995), 231-238.
- [56] W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Moleküldynamik-Computersimulationen: Methodik, Anwendungen und Perspektiven in der Chemie*. Angew. Chem. **102** (1990), 1020-1055.
- [57] F. D. Gunstone, *Movements towards tailor-made fats*. Prog. Lipid Res. **37** (1998), 277-305.
- [58] P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, M. Cygler, *Two conformational states of Candida rugosa lipase*. Protein Sci. **3** (1994), 82-91.
- [59] P. Grochulski, F. Bouthillier, R. J. Kazlauskas, A. N. Serreqi, J. D. Schrag, E. Ziomek, M. Cygler, *Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in Candida rugosa lipase*. Biochemistry **33** (1994), 3494-3500.

- [60] P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, F. Bouthillier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin, M. Cygler, *Insights into interfacial activation from an open structure of Candida rugosa lipase*. *J. Biol. Chem.* **268** (1993), 12843-12847.
- [61] P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, M. Cygler, *Two conformational states of Candida rugosa lipase*. *Protein Sci.* **3** (1994), 82-91.
- [62] M. J. Haas, R. D. Joerger, *Lipases of the genera Rhizopus and Rhizomucor: versatile catalysts in nature and the laboratory*, in.: *Food Biotechnology: Microorganisms*. (Khachatourians, GG. Hui, HY.; Eds.), 1995, pp. 549-588. Weinheim: Wiley-VCH.
- [63] F. Haeffner, T. Norin, K. Hult, *Molecular modeling of the enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterification reactions*. *Biophys. J.* **74** (1998), 1251-1262.
- [64] H. Hamada, M. Shiromoto, M. Funahashi, T. Itoh, K. Nakamura, *Efficient synthesis of optically pure 1,1,1-trifluoro-2-alkanols through lipase-catalyzed acylation in organic media*. *J. Org. Chem.* **61** (1996), 2332-2336.
- [65] D. Hanahan, *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. *J. Mol. Biol.* **166** (1983), 557-580.
- [66] J. H. Hildebrand, R. L. Scott, *The Solubility of Nonelectrolytes*, Dover Pub, London (1950).
- [67] H. C. Holzwarth, J. Pleiss, R. D. Schmid, *Computer aided modelling of Rhizopus oryzae lipase catalyzed stereoselective hydrolysis of triglycerides*. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **3** (1997), 73-82.
- [68] J. K. Hwang, A. Warshel, *Semiquantitative calculations of catalytic free energies in genetically modified enzymes*. *Biochemistry* **26** (1987), 2669-2673.
- [69] T. Iizumi, K. Nakamura, Y. Shimada, A. Sugihara, Y. Tominaga, T. Fukase, *Cloning, nucleotide sequence and expression in Escherichia coli of a lipase and its activator genes from Pseudomonas sp. KWI-56*. *Agric. Biol. Chem.* **55** (1991), 2349-2357.
- [70] T. Itoh, Y. Hiyama, A. Betchaku, H. Tsukube, *Enhanced reaction rate and enantioselectivity in lipase-catalyzed hydrolysis by addition of a crown ether*. *Tetrahedron Lett.* **34** (1993), 2617-2620.

- [71] K. E. Jaeger, M. T. Reetz, *Microbial lipases form versatile tools for biotechnology*. Trends Biotechnol. **16** (1998), 396-403.
- [72] K. E. Jaeger, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, *Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases*. Annu. Rev. Microbiol. **53** (1999), 315-351.
- [73] D. O'Hagan, N. A. Zaidi, *Hydrolytic resolution of tertiary acetylenic acetate esters with the lipase from Candida cylindracea*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. **1** (1992), 947-948.
- [74] D. O'Hagan, N. A. Zaidi, *The resolution of tertiary α -acetylene acetate esters by the lipase from Candida cylindracea*. Tetrahedron: Asymmetry **5** (1994), 1111-1118.
- [75] C.-H. Hu, T. Brinck, K. Hult, *Ab initio and Density Functional Theory studies of the catalytic mechanism for ester hydrolysis in serine hydrolases*. Int. J. Quant. Chem. **69** (1997), 89-103.
- [76] K. K. Kim, H. K., Song, D. H., Shin, K. Y., Hwang, S. W. Suh, *The crystal structure of a triacylglycerol lipase from Pseudomonas cepacia reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor*. Structure **5** (1997), 173-185.
- [77] B. R. Johnston, B. Morgan, A. C. Oehlschlager, S. Ramaswamy, *A convenient synthesis of both enantiomers of seudenol and their conversion to 1-methyl-2-cyclohexen-1-ol*. Tetrahedron: Asymmetry **2** (1991), 377-380.
- [78] J. Kaminska, I. Gornicka, M. Sikora, J. Gora, *Preparation of homochiral (S)- and (R)-1-(2-furyl)ethanols by lipase-catalyzed transesterification*. Tetrahedron: Asymmetry **7** (1996), 907-910.
- [79] L. T. Kanerva, P. Csomós, O. Sundholm, G. Bernáth, F. Fülöp, *Approach to Highly Enantiopure β -Amino Acid Esters by Using Lipase Catalysis in Organic Media*. Tetrahedron: Asymmetry **7** (1996), 1705-1716.
- [80] R. J. Kazlauskas, *Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties*. Trends Biotechnol. **12** (1994), 464-472.
- [81] R. J. Kazlauskas, U. T. Bornscheuer, *Biotransformations with lipases* In: Rehm HJ, Reed G, Pühler A, Stadler PJW, Kelly DR, eds. Biotransformations with lipases in biotechnology, Vol. 8 Weinheim, Germany: VCH. 1998 pp 37-191.

- [82] R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, T. Rappaport, L. A. Cuccia, *A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from Pseudomonas cepacia, and lipase from Candida rugosa*. *J. Org. Chem.* **56** (1991), 2656-2665.
- [83] A. M. Klibanov, *Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents*. *Acc. Chem. Res.* **23** (1990), 114-120.
- [84] A. A. Kossiakoff, S. A. Spencer, *Direct determination of the protonation states of aspartic acid-102 and histidine-57 in the tetrahedral intermediate of the serine proteases: neutron structure of trypsin*. *Biochemistry* **20** (1981), 6462-6476.
- [85] C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents*. *Biotechnol. Bioeng.* **30** (1987), 81-87.
- [86] D. Lang, B. Hofmann, L. Haalck, H.-J. Hecht, F. Spener, *Crystal structure of a bacterial lipase from Chromobacterium viscosum ATCC 6918 refined at 1.6 Å resolution*. *J. Mol. Biol.* **259** (1996), 704-717.
- [87] D. A. Lang, M. L. M. Mannesse, G. De Haas, H. M. Verheij, B. W. Dijkstra, *Structural Evidence for the Chiral Regio Selectivity of the Lipase from Pseudomonas Spec. Atcc 21808*
To be Published
- [88] D. A. Lang, M. L. Mannesse, G. H. de Haas, H. M. Verheij, B. W. Dijkstra, *Structural basis of the chiral selectivity of Pseudomonas cepacia lipase*. *Eur. J. Biochem.* **254** (1998), 333-340.
- [89] D. A. Lang, B. W. Dijkstra, *Structural investigations of the regio- and enantioselectivity of lipases*. *Chem. Phys. Lipids* **93** (1998), 115-122.
- [90] U. K. Laemmli, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* **227** (1970), 680-685.
- [91] K. Laumen, M. P. Schneider, *A highly selective ester hydrolase from Pseudomonas Sp. for the enzymatic preparation of enantiomerically pure secondary alcohols, chiral auxiliaries in organic synthesis*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1988), 598-600.
- [92] S. B. Lee, *Linear free energy relationship of nonaqueous biocatalysis: analysis of solvent effects on enzyme enantioselectivity*. *J. Ferment. Bioeng.* **80** (1995), 141-147.

- [93] S. Liang, L. A. Paquette, *Biocatalytic-based synthesis of optically-pure (C-6)-functionalized 1-(tert-butyldimethylsilyloxy) 2-methyl-(E)-2-heptenes*. *Tetrahedron: Asymmetry* **1** (1990), 445-452.
- [94] D. I. Liao, K. Breddam, R. M. Sweet, T. Bullock, S. J. Remington, *Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase-II at 2.2 Ångstrom resolution*. *Biochemistry* **31** (1992), 9796-9812.
- [95] A. R. Macrae, R. C. Hammond, *Present and future applications of lipases*. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **3** (1985), 193-217.
- [96] A. L. Margolin, D. L. Delinck, M. R. Whalon, *Enzyme-catalyzed regioselective acylation of castanospermine*. *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990), 2849-2854.
- [97] L. Michaelis, M. L. Menten, *Die Kinetik der Invertinwirkung*. *Biochem. Z.* **49** (1913), 333-369.
- [98] P. Monecke, R. Friedemann, S. Naumann, R. Csuk, *Molecular modelling studies on the catalytic mechanism of Candida rugosa lipase*. *J. Mol. Mod.* **4** (1998), 395-404.
- [99] K. Mori, *Biochemical methods in enantioselective synthesis of bioactive natural products*. *Synlett.* (1995), 1097-1109.
- [100] K. Mori, B. G. Hazra, R. J. Pfeiffer, A. K. Gupta, B. S. Lindgren, *Synthesis and bioactivity of optically-active forms of 1-methyl-2-cyclohexen-1-ol, an aggregation pheromone of Dendroctonus pseudotsugae*. *Tetrahedron* **43** (1987), 2249-2254.
- [101] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, *Specific amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51** (1986), 263-273.
- [102] T. Nielsen, *Industrial application possibilities for lipase*. *Fat Sci. Technol.* **87** (1985), 15-19.
- [103] M. E. M. Noble, A. Cleasby, L. N. Johnson, M. R. Egmond, L. G. J. Frenken, *The crystal structure of triacylglycerol lipase from Pseudomonas glumae reveals a partially redundant catalytic aspartate*. *FEBS Lett.* **331** (1993), 123-128.

- [104] M. Norin, F. Haeffner, A. Achour, T. Norin, K. Hult, *Computer modeling of substrate binding to lipases from Rhizomucor miehei, Humicola lanuginosa, and Candida rugosa*. *Protein Sci.* **3** (1994), 1493-1503.
- [105] M. Norin, K. Hult, A. Mattson, T. Norin, *Molecular modelling of chymotrypsin-substrate interactions: calculation of enantioselectivity*. *Biocatalysis.* **7** (1993), 131-147.
- [106] D. L. Ollis, E. Seah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, *The α/β -Hydrolase fold*. *Protein Eng.* **5** (1992), 197-211.
- [107] C. Orrenius, N. Oehrner, D. Rotticci, A. Mattson, K. Hult, T. Norin, *Candida antarctica lipase B catalyzed kinetic resolutions: substrate structure requirements for the preparation of enantiomerically enriched secondary alcohols*. *Tetrahedron: Asymmetry* **6** (1995), 1217-1220.
- [108] C. Orrenius, T. Norin, K. Hult, G. Carrea, *The Candida antarctica lipase B catalyzed kinetic resolution of seudenol in non-aqueous media of controlled water activity*. *Tetrahedron: Asymmetry* **6** (1995), 3032-3030.
- [109] C. Orrenius, C. van Heusden, J. van Ruiten, P. L. Overbeeke, H. Kierkels, J. A. Duine, J. A. Jongejan, *Simple conformation space search protocols for the evaluation of enantioselectivity of lipases*. *Protein Eng.* **11** (1998), 1147-1153.
- [110] P. L. Overbeeke, J. A. Jongejan, J. J. Heijnen, *Solvent effect on lipase enantioselectivity. Evidence for the presence of two thermodynamic states*. *Biotechnol. Bioeng.* **7** (2000), 278-290.
- [111] V. Partali, V. Waagen, T. Alvik, T. Anthonsen, *Enzymatic resolution of butanoic esters of 1-phenylmethyl and 1-[2-phenylethyl]ethers of 3-chloro-1,2-propanediol*. *Tetrahedron: Asymmetry* **4** (1993), 961-968.
- [112] D. Pathak, D. Ollis, *Refined structure of dienelactone hydrolase at 1.8 Å*. *J. Mol. Biol.* **214** (1990), 497-525.
- [113] S. Patkar, J. Vind, E. Kelstrup, M. W. Christensen, A. Svendsen, K. Borch, O. Kirk, *Effect of mutations in Candida antarctica B lipase*. *Chem. Phys. Lipids* **93** (1998), 95-101.

- [114] I. Petschen, E. A. Malo, M. P. Bosch, A. Guerrero, *Highly enantioselective synthesis of long chain alkyl trifluoromethyl carbinols and β -thiotrifluoromethyl carbinols through lipases*. *Tetrahedron: Asymmetry* **7** (1996), 2135-2143.
- [115] J. Pleiss, M. Fischer, R. D. Schmid, *Anatomy of lipase binding sites: 1. The scissile fatty acid binding site*. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **93** (1998), 67 - 80.
- [116] J. Pleiss, M. Fischer, H. Scheib, T. Schulz, R. D. Schmid, *Modelling structure-function relationship of lipase binding sites - a case study of specificity and selectivity*. in G. Kokotos (Ed.): *Proceedings of the 1999 conference on lipases and lipids*, Crete University Press.
- [117] M. J. D. Powell, *Restart Procedures for the Conjugate Gradient Method*. *Mathematical Programming* **12** (1977), 241-254.
- [118] W. H. Press, B. P. Flannery, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, *Simplex. Numerical recipes in C. The art of scientific programming*. Cambridge University Press: 1988, 312-327.
- [119] D. T. Quyen, C. Schmidt-Dannert, R. D. Schmid, *High-level formation of active Pseudomonas cepacia lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in Escherichia coli and rapid in vitro refolding*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (1999), 787-794.
- [120] A. Rahman, *Correlations in the motion of atoms in liquid argon*. *Phys. Rev.* **136** (1964), 405-411.
- [121] A. Rahman, F. H. Stillinger, *Molecular Dynamics study of liquid water*. *J. Chem. Phys.* **55** (1971), 3336-3359.
- [122] S. N. Rao, U. C. Singh, P. A. Bash, P. A. Kollman, *Free energy perturbation calculations on binding and catalysis after mutating Asn 155 in subtilisin*. *Nature.* **328** (1987), 551-554.
- [123] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm*. *J. Mol. Biol.* **261** (1996), 470-489.
- [124] M. T. Reetz, K. Schimossek, *Lipase-catalyzed dynamic kinetic resolution of chiral amines: use of palladium as the racemization catalyst*. *Chimica* **50** (1996), 668-669.

- [125] E. Rogalska, C. Cudrey, F. S. Ferrato, R. Verger, *Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases*. *Chirality* **5** (1993), 24-30.
- [126] E. Rogalska, S. Ransac, R. Verger, *Stereoselectivity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases*. *J. Biol. Chem.* **265** (1990), 20271-20276.
- [127] D. Rotticci, C. Orrenius, K. Hult, T. Norin, *Enantiomerically enriched bifunctional sec-alcohols prepared by *Candida antarctica* lipase B catalysis. Evidence of non-steric interactions*. *Tetrahedron: Asymmetry* **8** (1997), 359-362.
- [128] T. Sakai, I. Kawabata, T. Kishimoto, T. Ema, M. Utaka, *Enhancement of the enantioselectivity in lipase-catalyzed kinetic resolutions of 3-phenyl-2H-azirine-2-methanol by lowering the temperature to -40 degree*. *J. Org. Chem.* **62** (1997), 4906-4907.
- [129] E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, A. Manzocchi, *The biocatalytic approach to the preparatin of enantiomerically-pure chiral building blocks*. *Chem. Rev.* **92** (1992), 1071-1140.
- [130] L. Sard, P. Desnuelle, *Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion*. *Biochim. Biophys. Acta* **30** (1958), 513-521.
- [131] H. Scheib, J. Pleiss, A. Kovac, F. Paltauf, R. D. Schmid, *Stereoselectivity of *Mucorales* lipases toward triradylglycerols – a simple solution to a complex problem*. *Protein Sci.* **8** (1999), 215-221.
- [132] H. Scheib, J. Pleiss, P. Stadler, A. Kovac, A. P. Potthoff, L. Haalck, F. Spener, F. Paltauf, R. D. Schmid, *Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward triradylglycerols*. *Protein Eng.* **11** (1998), 675-682.
- [133] R. D. Schmid, R. Verger, *Lipases: interfacial enzymes with attractive applications*. *Angew. Chem. Int. Edit.* **37** (1998), 1608-1633.
- [134] M. P. Schneider, U. Georgens, *An efficient route to enantiomerically pure antidepressants: Tomoxetine, Nisoxetine and Fluoxetine*. *Tetrahedron: Asymmetry* **3** (1992), 525-528.
- [135] E. Schoffers, A. Golebiowski, C. R. Johnson, *Enantioselective synthesis through enzymatic asymmetrization*. *Tetrahedron* **52** (1996), 3769-3826.

- [136] J. D. Schrag, Y. Li, M. Cygler, D. Lang, T. Burgdorf, H. J. Hecht, R. D. Schmid, D. Schomburg, T. J. Rydel, J. D. Oliver, L. C. Strickland, C. M. Dunaway, S. B. Larson, J. Day, A. McPherson, *The open conformation of a Pseudomonas lipase*. *Structure* **5** (1997) 187-202.
- [137] J. D. Schrag, M. Cygler, *1.8 A refined structure of the lipase from Geotrichum candidum*. *J. Mol. Biol.* **575** (1993), 230-235.
- [138] J. D. Schrag, M. Cygler, *Lipases and α/β hydrolase fold*. *Methods Enzymol.* **284** (1997), 85-107.
- [139] T. Schulz, J. Pleiss, R. D. Schmid, *Stereoselectivity of Pseudomonas cepacia lipase towards secondary alcohols: a quantitative model*. *Protein Sci.* **9** (2000), 1053-1062.
- [140] C. J. Sih, S. H. Wu, *Resolution of enantiomers via biocatalysis*. *Topics in Stereochemistry*. Vol 19 1989 (Eliel, EL, Wilen SH. Eds.) pp. 63-125. New York: John Wiley & sons.
- [141] P. A. Sharp, B. Sugden, J. Sambrook, *Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis*. *Biochemistry* **12** (1973), 3055-3063.
- [142] H. Smidt, A. Fischer, P. Fischer, R. D. Schmid, *Preparation of optically pure chiral amines by lipase-catalyzed enantioselective hydrolysis of N-acyl-amines*. *Biotechnol. Tech.* **10** (1996), 335-338.
- [143] S. Sprang, T. Standing, R. J. Fletterick, R. M. Stroud, J. Finer-Moore, N. H. Xuong, R. Hamlin, W. J. Rutter, C. S. Craik, *The three-dimensional structure of Asn102 mutant of trypsin: role of Asp102 in serine protease catalysis*. *Science* **237** (1987), 905-909.
- [144] H. Stecher, K. Faber, *Biocatalytic deracemization techniques. Dynamic resolutions and stereoinversions*. *Synthesis* 1997, 1-16.
- [145] J. J. P. Stewart, *Optimization of parameters for semiempirical methods I. Applications*. *J. Comp. Chem.* **10** (1989), 221-264.
- [146] J. J. P. Stewart, *Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications..* *J. Comp. Chem.* **10** (1989), 209-220.

- [147] R. Stürmer, *Enzymes and transition metal complexes in tandem - a new concept for dynamic kinetic resolution*. *Angew. Chem. Int. Edit. Engl.* **36** (1997), 1173-1174.
- [148] K. Suginaka, Y. Hayashi, Y. Yamamoto, *Highly Selective Resolution of Secondary Alcohols and Acetoacetates with Lipases and Diketene in Organic Media*. *Tetrahedron: Asymmetry* **7** (1996), 1153-1158.
- [149] S. A. Islam, Biomolecular Modelling Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, 44 Lincoln's Inn Fields, P.O. Box 123, London W.C.2A 3PX, England.
- [150] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, *Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein*. *Science* **253** (1988), 872-879.
- [151] W. C. Swope, H. C. Anderson, P. H. Berens, K. R. Wilson, *A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: application to small water clusters*. *J. Chem. Phys.* **76** (1982), 3271-3276.
- [152] A. Tafi, A. van Almsick, F. Corelli, M. Crusco, K. E. Laumen, M. P. Schneider, M. Botta, *Computer simulations of enantioselective ester hydrolyses catalyzed by *Pseudomonas cepacia* lipase*. *J. Org. Chem.* **65** (2000), 3659-3665.
- [153] Y. Takagi, J. Teramoto, H. Kihara, T. Itoh, H. Tsukube, *Thiacrown ether as regulator of lipase-catalyzed trans-esterification in organic media - Practical optical resolution of allyl alcohols*. *Tetrahedron Lett.* **37** (1996), 4991-4992.
- [154] S. Takano, M. Setoh, K. Ogasawara, *Enantiocomplementary resolution of 4-hydroxy-5-(4-methoxyphenoxy)-1-pentyne using the same lipase*. *Tetrahedron: Asymmetry* **4** (1993), 157-160.
- [155] F. Theil, *Lipase-supported synthesis of biologically active compounds*, *Chem. Rev.* **95** (1995), 2203-2227.
- [156] J. Thiem, *Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry*, *FEMS Microbiol. Rev.* **16** (1995), 193-211.

- [157] J. D. Thompson, T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D. G. Higgins, *The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. *Nucleic Acids Res.* **24** (1997), 4876-4882.
- [158] K. F. Tipton, *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement: corrections and additions*. *Eur. J. Biochem.* **223** (1994), 1-5.
- [159] S. Ueji, R. Fujino, N. Okubo, T. Miyazawa, S. Kurita, M. Kitadani, A. Muromatsu, *Solvent-induced inversion of enantioselectivity in lipase-catalyzed esterification of 2-phenoxypropionic acids*. *Biotechnol. Lett.* **14** (1992), 163-168.
- [160] A. Uejima, T. Fukui, E. Fukusaki, T. Omata, T. Kawamoto, *Efficient kinetic resolution of organosilicon compounds by stereoselective esterification with hydrolases in organic solvent*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38** (1993), 482-486
- [161] J. Uppenberg, N. Ohrner, M. Norin, K. Hult, G. J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T. A. Jones, *Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from Candida antarctica reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols*. *Biochemistry* **34** (1995), 16838-16851.
- [162] J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones, *The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica*. *Structure* **2** (1994), 293-308.
- [163] J. B. A. Van Tol, J. B. Odenthal, J. A. Jongejan, J. A. Duine, *Relation of enzymatic reaction rate and hydrophobicity of the solvent*. In: Tramper J, Vermüe MH, Beeftink HH, Von Stockar U, editors. *Biocatalysis in non-conventional media*. Noordwijkerhout, The Netherlands: Elsevier. 1992, p 229-235.
- [164] J. B. A. Van Tol, D. E. Kraayveld, J. A. Jongejan, J. A. Duine, *The catalytic performance of pig pancreas lipase in enantioselective transesterification in organic solvents*. *Biocatal. Biotrans.* **12** (1995), 119-136.
- [165] L. Verlet, *Computer 'experiments' on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones Molecules*. *Phys. Rev.* **159** (1967), 98-103.

- [166] P. Villeneuve, T. A. Foglgia, *Lipase specificities: Potential applications in lipid bioconversions*. Inform. **8** (1997), 640-650.
- [167] E. N. Vulfson, *Industrial applications of lipases*, in.: *Lipases their structure biochemistry and application* (Wooley., P P., Peterson, SB.; Eds.) 1994, pp. 271-288. Cambridge: Cambridge University Press.
- [168] C. Waldinger, M. Schneider, M. Botta, F. Corelli, V. Summa V, *Aryl propargylic alcohols of high enantiomeric purity via lipase-catalyzed resolutions*. Tetrahedron: Asymmetry **7** (1996), 1485-1488.
- [169] H. Waldmann, D. Sebastian, *Enzymic protecting group techniques*, Chem. Rev. **94** (1994), 911-937.
- [170] A. Warshel, G. Naray-Szabo, F. Sussman, J.-K. Hwang, *Biochemistry* **28** (1989), 3629-3637.
- [171] A. N. E. Weissfloch, R. J. Kazlauskas, *Enantiopreference of lipase from Pseudomonas cepacia toward primary alcohols*. J. Org. Chem. **60** (1995), 6959-6969.
- [172] J. A. Wells, B. C. Cunningham, T. P. Graycar, D. A. Estell, *Philos. Trans. R. Soc. London* **317** (1986), 415-420.
- [173] F. K. Winkler, A. D'Arcy, W. Hunziker, *Structure of human pancreatic lipase*, Nature **343** (1990), 771-774.
- [174] A. Wolff, A. J. J. Straathof, J. A. Jongejan, J. J. Heijnen, *Solvent induced change of enzyme enantioselectivity: rule or exception?* Biocatal. Biotrans. **15** (1997), 175-184.
- [175] C.-H. Wong, *Enzymatic and chemo-enzymatic synthesis of carbohydrates*. Pure Appl. Chem. **67** (1995), 1609-1616.
- [176] Z. F. Xie, *Pseudomonas fluorescens lipase in asymmetric synthesis*. Tetrahedron: Asymmetry **2** (1991), 733-750.
- [177] Y. Yasufuku, S. Ueji, *Effect of temperature on lipase-catalyzed esterification in organic solvent*. Biotechnol. Lett. **17** (1995), 1311-1316.

- [178] Y. Yasufuku, S. Ueji, *Improvement (5-fold) of enantioselectivity for lipase-catalyzed esterification of a bulky substrate at 57° C in organic solvent*. *Biotechnol. Tech.* **10** (1996), 625-628.
- [179] Y. Yasufuku, S. Ueji, *High temperature-induced high enantioselectivity of lipase for esterifications of 2-phenoxypropionic acids in organic solvent*. *Bioorg. Chem.* **25** (1997), 88-99.
- [180] Z. S. Derewenda, L. Lee, U. Derewenda, *The occurrence of C-H...O hydrogen bonds in proteins*. *J. Mol. Biol.* **252** (1995), 248-262.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Tanja Schulz
Geburtsdatum/-ort	25.Juni.1974 in Künzelsau
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1980-1984	Grundschule Ingelfingen
1984-1990	Realschule Künzelsau
1990-1993	Wirtschaftsgymnasium Öhringen
Mai 1993	Allgemeines Abitur

Wissenschaftliche Ausbildung

1993-1998	Studium der Chemie an der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Oktober 1994	Diplomvorprüfung Physik
Oktober 1995	Diplomvorprüfung Chemie
Dezember 1997	Diplomhauptprüfung
September 1998	Diplomarbeit bei Prof. Dr. G. B. Bringmann zum Thema: <i>Quantenchemische Berechnungen zum Mechanismus der kinetischen Racematspaltung von stereochemisch stabilen Biarylverbindungen mit chiralen Nucleophilen.</i>