

**UNTERSUCHUNGEN ZUR  
ENANTIOSELEKTIVITÄT VON LIPASEN AUF  
MOLEKULARER EBENE  
DURCH COMPUTERGESTÜTZTES  
*MOLECULAR MODELING* UND  
MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN**

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

Vorgelegt von

**CHRISTIAN GENTNER**

AUS LEONBERG

Hauptberichter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid

Mitberichter: Prof. Dr. Wolfgang Schwack

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2003

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart 2003

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

Stuttgart, den 10.07.2003

**Worte und Gedanken  
können die Welt  
verändern**

**The only way of learning the method of science  
is the long and bitter way of  
personal experience.**

*(John Desmond Bernal)*

## ABSTRACT

### Enantioselectivity of lipases towards primary alcohols

In this work a model has been established to predict enantiopreference of *Pseudomonas cepacia* lipase-catalysed hydrolysis and acylation of chiral primary alcohols which was validated with literature data on enantiopreference of 50 substrates. The enzyme-substrate complexes were relaxed by performing molecular dynamics simulations, and the resulting average structures of the substrates were geometrically analysed. In the model, the large substituent of the preferred enantiomer always moves deeper into a well defined binding pocket, the *His gap*, formed by the side chain of catalytic H286 and its neighbour L287. Enantiopreference can be predicted by measuring a single torsion angle which describes this movement.

The predictive power of the *in silico* assay was experimentally verified by measuring enantioselectivity of recombinant wild type lipase of *Pseudomonas cepacia* (PCL) towards 5 new primary alcohol substrates (substrate **A**: 1,2-Propanediol; substrate **B**: 1,2-Dodecanediol; substrate **C**: 1-Phenyl-1,2-ethanediol; substrate **D**: 2-Phenyl-1-propanol; substrate **E**: Dihydro-5-(hydroxymethyl)-2(3H)-furanone) for which no literature data on enantioselectivity were available.

The *in silico* assay was further applied to explain the enantiopreference of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B) and *Rhizomucor miehei* lipase (RML) towards primary alcohol substrates, with experimental data taken from literature, and additional experiments for 2 substrates. For all lipase-substrate complexes, for which enantiopreference was experimentally found, we observed a movement of the preferred enantiomer into the *His gap*. In a few cases of no measurable enantiopreference, neither enantiomer moved into the *His gap*. In porcine pancreatic lipase (PPL) and *Candida rugosa* lipase (CRL), the substrates bind in a different binding pocket. For all five lipases we can predict enantioselectivity towards primary alcohol substrates; for PCL, CAL-B, RML and PPL, the preferred enantiomer can be predicted.

Published experimental data on enantiopreference of *Pseudomonas cepacia* lipase towards 50 chiral primary alcohols from a wide range of chemical classes, size, including substrates with an oxygen next to the stereocentre were used as a database to set up an *in silico* assay of enantiopreference. The tetrahedral intermediate of the butyrates of substrates were manually



docked to the lipase with a covalent bond to S87 and the oxyanion was oriented to the oxyanion hole (L17 and Q88). The fatty acid chain was placed in the *hydrophobic crevice*, an elliptical funnel in the binding site of PCL. There are two different binding regions for the alcohol moiety, the *hydrophilic trench* and the *hydrophobic dent*. Two initial orientations of the substituents were compared, the large substituent  $R_L$  placed in the *hydrophobic dent* or in the *hydrophilic trench*. The complexes were relaxed by energy minimisation. Molecular dynamics simulations were performed at 100K, and the last 400fs of the production phase were averaged. While the first orientation was stable, starting with the latter orientation led for all but one substrate to a conformational change toward the first orientation. Only substrate 37 with two very large substituents at the stereocentre stayed with one substituent in the *hydrophilic trench*. Therefore we concluded that primary alcohols bind with the large substituent to the *hydrophobic dent*. Here they bind near to or inside the *His gap*, a well defined structure motif in the *hydrophobic dent*, formed by catalytic H286 and its neighbour L287.

The trajectory of the simulation and the average structure were analysed. For all substrates it was observed that the large substituent of the preferred enantiomer moved more deeply into the *His gap* than the non-preferred enantiomer. The movement of the substrates into the *His gap* can be analysed and measured geometrically by the torsion angle about bond  $O_{alc}-C$  ( $\phi_{O_{alc}-C}$ ), which is reflecting this movement. For 45 of the substrates, the different movement into the *His gap* is reflected by a significant difference of the torsion angle ( $\Delta\phi_{O_{alc}-C} > 10^\circ$ ) between the preferred and non-preferred enantiomer. For 5 substrates, the differences are very small. For these substrates, the visual analysis of the enzyme-substrate complex confirmed that the preferred enantiomer was located more deeply in the *His gap* than the non-preferred.

The predictive power of the *in silico* assay was experimentally verified by measuring enantioselectivity of recombinant wild type lipase of *Pseudomonas cepacia* for acylation of five new primary alcohol substrates for which no literature data on enantioselectivity exist. The *in silico* assay predicted that PCL prefers the (*R*)-enantiomer for substrates **E**. The E-value was determined using gas chromatography. The retention times of the substrates were determined with standards in the absolute (*R*)- and (*S*)-conformation. The E-value was evaluated from the chromatograms, using the area of the two substrate and the two product peaks of the primary alcohol group. The predicted enantiopreference was confirmed by experiment, however enantioselectivity was low for substrate **E** ( $E = 3 \pm 0.2$  (*R*)).

### ***Applying the in silico assay to other lipases***

Other microbial lipases show only enantioselectivity towards selected primary alcohols. To investigate the molecular basis of their enantiopreference, molecular dynamics simulations were performed for complexes of substrates **D** and **E** with CAL-B, RML and CRL. In addition we modelled CAL-B, RML, CRL and PPL with 5, 2, 4, and 6 substrates, respectively, with experimentally determined enantiopreference from literature.

#### ***CAL-B***

In the model, the large substituent of the preferred enantiomer of four substrates taken from literature and the (*R*)-enantiomer of substrate **E** moved into the *His gap* of the CAL-B, formed by the side chain of the catalytic H224 and L278. This movement is also reflected by the torsion angle  $\phi_{\text{Oalc-C}}$ , which is always larger for the preferred enantiomer (Tab.1b). The (*S*)-enantiomer of substrate **E** and both enantiomers of substrate **D** did not enter the *His gap*. Both enantiomers of substrate **E** bound in the *hydrophobic dent* with no observable difference. Therefore we expected enantioselectivity of CAL-B towards substrate **E**, with (*R*)-preference, but not towards substrate **D**. This was confirmed by experiment: substrate **E** (E=7, (*R*)-preference).

#### ***RML***

In the model, the large substituent of the preferred enantiomer of two substrates taken from literature and the (*R*)-enantiomer of substrate **E** moved into the *His gap* of the RML, formed by the side chain of the catalytic H253 and its neighbour L254. The movement can be described by the torsion angle  $\phi_{\text{Oalc-C}}$ , which is always larger for the preferred enantiomer. The (*S*)-enantiomer of substrate **E** and both enantiomers of substrate **D** did not enter the *His gap*. Therefore we expected enantioselectivity of RML only towards substrate **E**, with (*R*)-preference. This was confirmed by experiment: substrate **E** (E=9, (*R*)-preference).

#### ***CRL***

In the model, none of the substrates moved into the *His gap* of CRL, formed by the side chains of catalytic H449 and its neighbour S450. Thus, the torsion angle  $\phi_{\text{Oalc-C}}$ , which describes a movement into the *His gap*, can not be used to predict the enantiopreference of CRL towards primary alcohols. Molecular modelling of four substrates taken from literature identified a different binding pocket for CRL to bind the primary alcohols. This binding

pocket corresponds to the *hydrophilic trench* of the PCL. The *hydrophilic trench* is distant from the catalytic S209 and can only be reached by large substrates. For the CRL, both enantiomers of the substrates **D** and **E** were bound with no observable differences and did not reach the *hydrophilic trench*. Thus, we expected for the CRL no enantioselectivity towards these two substrates. This was confirmed by experiment: substrate **E** ( $E=1.1$  (*R*)-preference), while CRL shows enantiopreference towards 4 substrates, which bind in the *hydrophilic trench*.

## PPL

PCL and PPL are the only lipases which show high enantioselectivity towards a wide range of primary alcohols. For PPL, data on its enantioselectivity have been published, and we modelled enantioselectivity towards six substrates. The substrates do not bind in the *His gap* of the PPL, since it is geometrically located too close to the catalytic serine, so that the substrates do not reach it. Similar to CRL we observed a movement of the substrates into another binding pocket, which corresponds to the *hydrophilic trench* in PCL. In this binding pocket, the preferred enantiomer binds deeply in a cleft which is formed by H152 and L265. Thus, enantiopreference can be predicted by the movement of the large substituent into this cleft. The distance between H152 and L265 correlates with the enantioselectivity.

## Enantioselectivity of lipases towards carboxylic acids

This work describes a computer model to predict enantiopreference and enantioselectivity of lipases from *Candida rugosa* (CRL) and *Pseudomonas cepacia* (PCL) for lipase-catalyzed esterification of carboxylic acids. The tetrahedral substrate intermediates were docked to the enzymes, the complexes relaxed by molecular dynamics simulations, and averaged structures were geometrically analyzed. The medium-sized substituent of the non-preferred enantiomer moved deep into the *acid His gap*, a binding pocket formed by the catalytic histidine and its structural neighbor towards the binding site for the acid moiety (CRL: H449 and F345; PCL: H286 and V267), while the non-preferred enantiomer did not move into the *acid His gap*. This motion is reflected by a torsion angle  $\phi_{\text{C}_{\text{tert}}-\text{C}^*}$  around the bond between the tetrahedral carbon ( $\text{C}_{\text{tert}}$ ) and the  $\alpha$ -carbon at the chiral center ( $\text{C}^*$ ), which for all substrates was smaller in the case of the preferred enantiomer (preferred enantiomer:  $\phi_{\text{C}_{\text{tert}}-\text{C}^*} < 100^\circ$ , non-preferred enantiomer:  $\phi_{\text{C}_{\text{tert}}-\text{C}^*} > 300^\circ$ ). As a consequence, the medium-sized substituent pushed the side chain of the catalytic histidine apart. For CRL, the experimentally determined E-value correlated with the distance  $d_{\text{H}_{\text{N}\epsilon}-\text{O}_{\text{Alc}}}$  between catalytic histidine and the oxygen of the alcohol

moiety. There are two regions: low E-values ( $E < 10$ ) for  $d_{\text{HNE-OAlc.}} < 1.8 \text{ \AA}$  and high E-values ( $E > 80$ ) for  $d_{\text{HNE-OAlc.}} > 2.1 \text{ \AA}$ . To validate the model, two CRL mutants (P246F and L304F) and three substrates (2-phenyl butyric acid, 2-phenyl propionic acid, for 2-chlorine propionic acid) were also *in silico* investigated. Our *in silico* assay predicted a decrease in enantioselectivity for 2-phenyl-butyric-acid and 2-phenyl-propionic-acid, and the loss of enantioselectivity for 2-chlorine-propionic-acid. For PCL, prediction of enantiopreference by  $\phi_{\text{Ctert.-C}^*}$  was successful for 10 of 12 substrates investigated.

### ***In silico* assay to predict enantiopreference of CRL**

The data on the enantioselectivity of 8 substrates were taken from literature. The tetrahedral intermediate of these substrates esterified with heptanol were docked to the lipase with a covalent bond to S209; the oxyanion was oriented towards the oxyanion hole (G124 and A210). The carboxylic acid was positioned in the tunnel and the alcohol moiety in the *hydrophobic dent*. The catalytic H449 and its structural neighbor F345 form a well-defined binding pocket at the entrance to the tunnel, the *acid His gap*. The complexes were relaxed by energy minimization. Molecular dynamics simulations were performed at 100K, and the last 400fs of the production phase were averaged.

The trajectory of the simulation and the average structure were analyzed. For all 8 substrates, the medium-sized substituent of the non-preferred enantiomer moved more deeply into the *acid His gap* than the preferred enantiomer. The movement of the substrates into the *acid His gap* can be analyzed and measured geometrically by the torsion angle of bond C<sub>tert.-C\*</sub> ( $\phi_{\text{Ctert.-C}^*}$ ). The average value of  $\phi_{\text{Ctert.-C}^*}$  was less than  $100^\circ$  for the preferred, greater than  $300^\circ$  for the non-preferred enantiomer. Thus, for all modeled substrates enantiopreference can be predicted by measuring and comparing this torsion angle.

To test the predictive power of the *in silico* assay, 3 new carboxylic acid substrates (2-phenyl butyric acid, 2-phenyl propionic acid and 2-chlorine propionic acid: substrate **A**, **B** and **C**) were analyzed, for which no data have been published so far. The *in silico* assay predicted that CRL prefers the (*R*)-enantiomer for substrate **A** and the (*S*)-enantiomer for substrates **B** and **C**.

### ***In silico* assay to predict enantioselectivity of CRL**

The movement of the medium-sized substituent of the non-preferred enantiomer into the *acid His gap* moved the side chain of the catalytic H449. The more it was pushed apart, the higher was the experimentally determined E-value. The experimentally determined E-value correlates with the distance  $d_{\text{HNE-OAlc}}$  between the hydrogen of the catalytic histidine and the alcohol oxygen. There are two regions of the E-values and the distances  $d_{\text{HNE-OAlc}}$ : for a distance of more than 2.0 Å, the experimentally determined E-value is more than 80, while for a distance less than 1.8 Å the E-value is less than 10. Thus the assay predicts whether a given substrate is transformed by CRL with high or low enantioselectivity. To validate and apply this assay we predicted mutants with altered distance  $d_{\text{HNE-OAlc}}$  for substrates **A**, **B** and **C**. We found two mutants affecting the tunnel shape, P246F and L304F, which altered the distance for all three substrates  $d_{\text{HNE-OAlc}}$ .

#### **Substrate A:**

For wild type and mutants, the large substituent bound in the tunnel. In the wild type CRL, the non-preferred enantiomer moved into the *acid His gap* of the CRL, while the chlorine atom stayed outside. In contrast, for the mutants P246F and L304F the chlorine atom pointed to the *acid His gap*. As a consequence, the substrate did not bind deep into the *acid His gap*, and the torsion angles of both enantiomers were identical. Therefore, we expected loss of enantioselectivity for the mutants.

#### **Substrate B:**

In the mutants, the large substituent of the preferred (*S*)-enantiomers was slightly pushed into the tunnel by the large side chain of F246 and F304, as compared to wild type. There was, however, a substantial effect on the non-preferred (*R*)-enantiomer. In the case of the P246F mutant, the phenyl ring of the substrate rotates about 90° and binds in the tunnel. Thus, the medium-sized substituent is not able to move deeply into the *acid His gap* but binds parallel to the H449 side chain. In the case of the L304F mutant, the medium-sized substituent was not able to move so deeply into the *acid His gap*. As a result, the side chain of the catalytic H449 was only slightly moved apart compared to the wild type.  $\phi_{\text{Ctert.-C}^*}$  did not change significantly in the case of both mutants, but the  $d_{\text{HNE-OAlc}}$  decreased for both non-preferred enantiomers. Therefore, we expected the same enantioselectivity as for wild type enzyme, but a decrease in enantioselectivity.

### Substrate C:

In the case of substrate **C**, the same effects of the mutants were observed as in the case of mutant P246F for substrate **B**. Compared to the wild type, the large substituent of both enantiomers was slightly pushed down into the tunnel because of the larger side chains of F246 and F304. The medium-sized substituent of the non-preferred enantiomer rotated about 90° and bound in a parallel way in the tunnel. Thus, the medium-sized substituent was not able to move so deeply into the *acid His gap* and bound parallel to the H449 side chain. As a result, the side chain of the catalytic H449 was only slightly moved away.  $\phi_{\text{Ctert.-C}^*}$  did not change significantly in the case of either mutant;  $d_{\text{HNe-OAlc}}$ , however, decreased for the non-preferred enantiomer. Therefore, we expected a decrease in enantioselectivity.

### ***In silico* assay to predict enantiopreference of PCL**

Experimentally determined enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase (PCL) towards 12 substrates was derived from literature. The tetrahedral intermediate of the substrates esterified with heptanol were manually docked to the lipase with a covalent bond to S87. The oxyanion was oriented towards the oxyanion hole (L17 and Q88). The acid moiety was positioned in the *hydrophobic crevice*, the alcohol moiety was located in the *hydrophobic dent*. The catalytic H286 and its structural neighbor V267 form a well-defined binding pocket, the *acid His gap*. The complexes were relaxed by energy minimization. Molecular dynamics simulations were performed at 100K, and the last 400fs of the production phase were averaged.

The trajectory of the simulation and the average structure were analyzed in the same way as described earlier for CRL. For 10 of the 12 substrates, the medium-sized substituent of the non-preferred enantiomer moved more deeply into the *acid His gap* than the preferred enantiomer. Consequently, for these ten substrates the average value of the torsion angle,  $\phi_{\text{Ctert.-C}^*}$ , was smaller for the preferred enantiomer than for the non-preferred enantiomer. However, two substrates did not follow the rule, both carrying one or three fluorine atoms at the stereocenter. Thus, our *in silico* assay enables us to predict the enantiopreference of PCL towards carboxylic acids, but excludes substrates with fluorine at the stereo center.

The movement of the medium-sized substituent into the *acid His gap* also caused a movement of the side chain of the catalytic H286. When compared to CRL, the direction of the movement was different and altered  $d_{\text{HNe-Oalc}}$  in a different way. Experimentally determined

E-values failed to correlate to  $d_{\text{HNE-Oalc}}$  and to other single geometric parameters which were tested.

## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Technische Biochemie an der Universität Stuttgart unter der Leitung von Prof. Dr. Rolf D. Schmid angefertigt.

- Prof. Rolf D. Schmid danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, sowie für die Überlassung des Themas, die anregenden Diskussionen und die großzügige Förderung meiner Arbeit.
- PD Dr. Jürgen Pleiss gilt mein Dank für die wertvolle Unterstützung und konstruktive Betreuung während der vergangenen Jahre.
- Den Profs. Schwack und Wolf danke ich für die Durchsicht und Begutachtung dieser Arbeit.
- Der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) gebührt mein Dank für die finanzielle Förderung.
- Den Arbeitsgruppenleitern molekulare Biotechnologie, Dr. Jutta Schmitt, Stefan Lange, Biokatalyse, Dr. Sabine Lutz-Wahl, und Fermentation, Dipl.-Ing. (FH) Gaby Neumann, danke ich für die ausgezeichnete Betreuung und Hilfestellung während meiner Tätigkeiten in den jeweiligen Labors. Dabei gilt mein Dank auch Volker Nödinger für seine hilfreiche Unterstützung.
- Besonderer Dank gilt meinen Mitarbeitern und Freunden für ihre ständige Unterstützung und immer währende Hilfe: Markus Fischer, Holger Scheib, Stefan Minning, Erik Henke und Cornelius Bessler.
- Allen Mitarbeitern des ITB danke ich für die schöne und produktive Zeit der vergangenen Jahre.
- Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, im Besonderen meiner Mutter, für den Respekt für meine Entscheidung, Ihre Unterstützung, unermüdliche Hilfe und Liebe.
- Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Schwiegereltern bedanken, die durch ihre tatkräftige Hilfe und Förderung diese Arbeit mit ermöglichten.
- Mein ganz besonderer Dank gilt dir, Anja, für deine Liebe, deine Geduld, dein Verständnis, deine nie endende Unterstützung, den Rückhalt, die Kraft und die Sicherheit für mein Tun, die du mir gibst.



## ZUSAMMENFASSUNG

Die Enantioselektivität von mikrobiellen Lipasen bei der Hydrolyse und Veresterung von primären Alkoholen konnte in dieser Arbeit erstmals in ihren molekularen Zusammenhängen verstanden werden. Demnach beruht die Enantioselektivität auf sterischen Wechselwirkungen nur weniger Reste der Lipase mit hauptsächlich dem großen Substituenten des Substrats. Die Lipase von *Pseudomonas cepacia* (PCL) ist die einzige mikrobielle Lipase, die ein breites Spektrum an primären Alkoholen enantioselektiv umsetzt. Daher wurde diese zur Etablierung eines Computermodells, dem *in silico* Assay, verwendet.

*Molecular modeling* Untersuchungen der entsprechenden PCL-Substrat-Komplexe wurden anhand von Substraten durchgeführt, deren Daten über die Enantioselektivität aus der Literatur entnommen wurden, um den *in silico* Assay zur Vorhersage der Enantiopräferenz von PCL gegenüber primären Alkoholen zu etablieren. Diese Untersuchungen zeigten, dass das bevorzugte Enantiomer tiefer als das nicht bevorzugte oder ausschließlich in einem bestimmten Strukturmotiv in der Bindungstasche, dem *His gap*, bindet. Das *His gap* von Lipasen wird vom katalytischen Histidin und einem strukturellen Nachbarn gebildet. In der PCL sind das H286 und L287. Diese Bewegung der Substrate in das *His gap* wird durch einen Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  beschrieben. Da das bevorzugte Enantiomer sich in allen untersuchten Fällen tiefer in das *His gap* bewegt, ist der resultierende  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  für dieses Enantiomer auch immer größer als für das nicht bevorzugte. Dadurch wird zum ersten Mal die Vorhersage der Enantiopräferenz für primäre Alkohole möglich.

Zur Überprüfung dieses Modells wurden *molecular modeling* Untersuchungen für fünf weitere Substrate (Substrat **A**: 1,2-Propanediol; Substrat **B**: 1,2-Dodecanediol; Substrat **C**: 1-Phenyl-1,2-ethanediol; Substrat **D**: 2-Phenyl-1-propanol; Substrat **E**: Dihydro-5-(hydroxymethyl)-2(3H)-furanone) unternommen, für die bislang keine experimentellen Daten über die Enantioselektivität der PCL bekannt waren. Anhand des vorliegenden Modells konnte aufgrund der unterschiedlichen Bewegung der beiden Enantiomere der Substrate **A-E** ins *His gap* eine Vorhersage der Enantiopräferenz getroffen werden. Anschließend wurde Substrat **E** mit rekombinanter PCL umgesetzt, die Substrate und Produkte mit Hilfe der Gaschromatographie bestimmt und der resultierende E-Wert berechnet. Die richtige Vorhersage der Enantiopräferenz wurde für das Substrat **E** bestätigt.

Da das Modell (*in silico* Assay) die Vorhersage der Enantiopräferenz der PCL-katalysierter Umsetzung primärer Alkohole erlaubt, erfolgte im nächsten Schritt die Ausweitung des Modells zum Verständnis und zur gezielten Vorhersage der Enantioselektivität PCL gegenüber dieser Substratklasse. Es konnte beobachtet werden, dass je tiefer sich das bevorzugte und je weniger tief sich das nicht bevorzugte Enantiomer in das *His gap* bewegten, desto größer war nicht nur die resultierende Differenz der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  des bevorzugten und des nicht bevorzugten Enantiomers, sondern auch der experimentell ermittelte E-Wert. Daher wurden *in silico* Mutanten der PCL gesucht, die eine deutliche Änderung der Differenz der Torsionswinkel  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  zeigten und deshalb eine signifikante Veränderung der Enantioselektivität zur Folge haben sollten. Diese *molecular modeling* Untersuchungen wurden ebenfalls wieder an den fünf Substraten durchgeführt, die schon zur Überprüfung des Modells zur Vorhersage der Enantiopräferenz herangezogen wurden.

Da das *His gap* für die Enantioselektivität der PCL gegenüber primären Alkoholen entscheidend ist, wurde im Modell die dem *His gap* zugehörige Aminosäure L287 gegen Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Alanin und Glycin ersetzt. Eine Verkleinerung der Seitenkette (L287A, L287G) führte zu einer „Auflösung“ des *His gaps*. Daher konnte das bevorzugte Enantiomer dort nicht mehr binden. Dies führte zu einer Angleichung der Torsionswinkel der beiden Enantiomere, was eine Abnahme der Enantioselektivität erwarten ließ. Eine Vergrößerung der Seitenkette (L287F, L287W und L287Y) führte sowohl zur Erhöhung als auch zur Abnahme der Differenz der Torsionswinkel von  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$ . Dies sollte zu einer Erhöhung, bzw. einer Verringerung der Enantioselektivität führen. Für zwei Substrate und die Mutante L287W konnte sogar eine Umkehr in der Enantiopräferenz vorhergesagt und für eines experimentell bestätigt werden. Die Betrachtung der Trajektorie der molekulardynamischen Simulationen zeigte, dass die Seitenkette des Y29 ebenfalls mit den Substraten interagiert. Aus diesem Grund wurden auch Mutanten an dieser Position *in silico* getestet. Die Vergrößerung der Seitenkette durch die Mutante Y29W führte zu einer Bewegung von drei Substraten tiefer in das *His gap*, weshalb die Mutanten L287F, L287W, L287Y und Y29W *in vitro* hergestellt wurden. Die Einführung der Punktmutationen L287F, L287W, L287Y und Y29W in das Gen der PCL erfolgte durch die QuikChange Methode. Anschließend wurde das Lipasegen in 5'-3'- und in 3'-5'-Richtung sequenziert, um den korrekten Einbau der Mutationen zu überprüfen. Expression, Aufschluss der als inaktive Einschlusskörper vorliegenden Lipase sowie die Umfaltung in aktive Lipase unter

Zuhilfenahme eines Helferproteins erfolgte analog zu Quyen und Mitarbeitern (Quyen *et al.* 1999).

Die Resultate der Torsionswinkel und experimentell bestimmten E-Werte der Mutanten wurden mit denen des Wildtyps verglichen. Im Modell bewegt sich das auch im Wildtyp bevorzugte Enantiomer aller fünf untersuchten Substrate tiefer in das *His gap* der Mutante L287F, da sich der planare Phenylring parallel zum Imidazolring des katalytischen H286 dreht. Somit öffnet sich das *His gap* für das bevorzugte Enantiomer. Das auch im Wildtyp nicht bevorzugte Enantiomer aller fünf Substrate bindet nicht im *His gap*. Der Phenylring des F287 dreht sich senkrecht zum Imidazolring des H286 und „verschließt“ das *His gap*. Als Folge nimmt  $\Delta\Phi_{\text{OAIK.-C}}(\text{S-R})$  für alle fünf Substrate zu, was eine Steigerung im experimentell ermittelten E-Wert erwarten ließ, die auch im Experiment für Substrat **E** gemessen wurde. Für die L287Y Mutante konnte die Öffnung des *His gaps* nur für zwei auch beim Wildtyp bevorzugte Enantiomere beobachtet werden ((*R*)-Enantiomer von Substrat **D** und (*S*)-Enantiomer von Substrat **E**). Allerdings bewegten sich diese im Modell nicht so tief in das *His gap* wie bei der L287F Mutante. Aus diesem Grund wurde keine entsprechende Steigerung des E-Wertes wie für die Mutante L287F erwartet. Für zwei der untersuchten Substrate (Substrat **A** und Substrat **E**) konnte sich keines der beiden Enantiomere während der molekulardynamischen Simulationen in das *His gap* bewegen, was zu einer experimentell bestimmten Abnahme des E-Wertes für Substrat **E** führte. Für das fünfte Substrat (Substrat **D**) änderte sich die Orientierung der beiden Enantiomere innerhalb der Bindungstasche im Vergleich zum Wildtyp nicht. Durch ihre Sperrigkeit ließ sich die große Seitenkette von W287 nur von einem auch beim Wildtyp bevorzugten Enantiomer ((*S*)-Enantiomer von Substrat **C**) im Modell wegdrücken. Für zwei (Substrat **D** und Substrat **E**) änderte sich sogar das Vorzeichen von  $\Delta\Phi_{\text{OAIK.-C}}(\text{S-R})$ , da nun das andere Enantiomer als beim Wildtyp tiefer im *His gap* bindet, was eine experimentell bestimmte Umkehr in der Enantiopräferenz für Substrat **E** im Vergleich zum Wildtyp zur Folge hatte. Im Modell konnte beobachtet werden, dass die größere Seitenkette der Y29W Mutante drei der bevorzugten Enantiomere ((*R*)-Enantiomer von Substrat **A**, (*R*)-Enantiomer von Substrat **B** und (*S*)-Enantiomer von Substrat **C**) tiefer in das *His gap* drückt und  $\Delta\Phi_{\text{OAIK.-C}}(\text{S-R})$  somit zunahm.

Anhand dieser Daten konnte eine Korrelation zwischen der Differenz der Torsionswinkel  $\Delta\Phi_{\text{OAIK.-C}}(\text{S-R})$  und dem experimentell bestimmten E-Wert abgeleitet werden, aufgrund

dessen eine semi-quantitative Vorhersage des E-Wertes für ein neues Substrat oder eine neue Mutante mit *molecular modeling* Untersuchungen möglich ist.

Für 10 verschiedene in dieser Arbeit untersuchte primäre Alkoholsubstrate mit dem Stereozentrum in einer Ringstruktur führte die Bewegung des bevorzugten Enantiomers in das *His gap* aufgrund ihrer Rigidität und der daraus resultierenden repulsiven sterischen Wechselwirkungen mit der Lipase zu einem Wegdrücken des Imidazolringes des katalytischen H286. Durch diese Öffnung des *His gaps* konnte sich das Substrat weiter in das *His gap* bewegen und der E- Wert nahm zu, je tiefer das bevorzugte Enantiomer in das *His gap* band. Die Größe des *His gaps*,  $d_{His\ gap}$ , die zwischen den beiden Atomen der *His gap*-bildenden Aminosäuren gemessen wurde, die sich jeweils am nächsten lagen, korrelierte mit dem experimentell ermittelten E-Wert. Substrate, deren experimentelle Daten aus der Literatur entnommen wurden, zeigten ein Optimum des  $d_{His\ gap}$  zwischen 6,3 Å und 6,8 Å. Wenn  $d_{His\ gap}$  größer als 6,8Å war, nahm der E-Wert wieder ab, da in diesem Falle das katalytische H286 zu weit vom Sauerstoff der Esterbindung des Alkohols weggedrückt wurde und somit die Lipase ihren katalytischen Einfluss und Aktivität verlor. Eine Korrelation zwischen  $d_{His\ gap}$  und dem experimentell bestimmten E-Wert konnte auch für Substrat **E** und den Wildtyp sowie die PCL Mutanten L287F, L287W, L287Y, Y29W, Y29W / L287F und Y29W / L287Y gezeigt werden.

Die Untersuchung von anderen Lipasen mit unterschiedlichen Substraten, deren Daten über die Enantioselektivität aus der Literatur entnommen wurden, zeigten, dass die *Rhizomucor miehei* Lipase (RML) und die *Candida antarctica* Lipase B (CAL-B) auch nur gegenüber solchen Substraten Enantioselektivität besitzen, die im *His gap* der Lipase binden. Die experimentellen Untersuchungen dieser Lipasen bestätigten dies, da ein Substrat, welches im Modell im *His gap* bindet (Substrat **E**), selektiv umgesetzt wird. Die *Candida rugosa* Lipase (CRL) besaß keine Enantioselektivität gegenüber diesem Substrat, welches allerdings im Modell auch nicht im *His gap* der Lipase bindet. Untersuchungen mit verschiedenen Substraten aus der Literatur, gegenüber denen die CRL Enantioselektivität besitzt, zeigten, dass die Substrate alle groß und sperrig sind und in einem anderen Bereich der Bindungstasche binden als in der PCL. Für die Schweinepankreas Lipase (porcine pancreatic lipase: PPL), die einzige Lipase neben PCL, die hohe Enantioselektivität gegenüber einem breiten Spektrum an primären Alkoholen besitzt, wurde basierend auf Literaturdaten ebenfalls ein Computermodell zur Beschreibung der Enantioselektivität generiert. Hier zeigte sich, dass

die Substrate nicht im *His gap* der Lipase binden, welches vom katalytischen H264 und seinem strukturellem Nachbarn gebildet wird. Die Substrate binden in einer anderen Bindungstaschenregion, die der der CRL entspricht. Dort binden die Substrate allerdings in einem speziellen Strukturmotiv, das wie bei der PCL auch von einem Histidin und einem Leucin gebildet wird (H152 und L265). Für die PPL konnte die Vorhersage der Enantiopräferenz gegenüber primären Alkoholen ebenfalls durch die Bewegung des bevorzugten Enantiomers tiefer oder ausschließlich in dieses Strukturmotiv erfolgen. Durch die Bewegung der Substrate bzw. Enantiomere in diese Region der Bindungstasche verändert sich der Abstand zwischen den beiden Aminosäuren H152 und L265. Als Folge korrelierte die Größe dieses Strukturmotivs im Modell mit der experimentell bestimmten Enantioselektivität.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein Modell zur Vorhersage und Beschreibung der Enantioselektivität von *Candida rugosa* Lipase (CRL) gegenüber chiralen Carbonsäuren etabliert. Die Enantioselektivität der CRL bei der Veresterung dieser Substratklasse konnte somit ebenfalls erstmals vorhergesagt werden. Die Bindungstasche der CRL besteht aus einem *hydrophobic dent*, in dem der Alkoholrest bindet und einem *hydrophobic tunnel*, in dem die Säure bindet. *Molecular modeling* Untersuchungen zeigten, dass die Enantiopräferenz der CRL gegenüber Carbonsäuren anhand eines Torsionswinkels,  $\Phi_{\text{Ctetr.-C}^*}$ , vorhergesagt werden kann. Dieser Torsionswinkel beschreibt die Bewegung des großen Substituenten am Stereozentrum in den *hydrophobic tunnel* und die des mittleren Substituenten in eine bestimmte Bindungstaschenregion, das *acid his gap*, das durch die Seitenketten der Aminosäuren F345 und H449 gebildet wird. Der große Substituent der beiden Enantiomere eines Substrates band beinahe identisch. Der mittlere Substituent des nicht bevorzugten Enantiomers eines chiralen Carbonsäuresubstrates bewegte sich jedoch tief in das *acid his gap*. Aus diesem Grund war der Torsionswinkel des bevorzugten Enantiomers ( $<100^\circ$ ) immer kleiner als der des dazugehörigen nicht bevorzugten ( $>300^\circ$ ). Die Bewegung des mittleren Substituenten des nicht bevorzugten Enantiomers in das *acid his gap* drückte die Seitenkette des katalytischen H449 weg. Die Enantioselektivität korrelierte mit dem Abstand zwischen katalytischem Histidin zum Sauerstoff der mit dem Substrat veresterten Alkoholgruppe des nicht bevorzugten Enantiomers  $d_{\text{HNE-OAlk.}}$ .

Dieses Modell zur Vorhersage der Enantiopräferenz und der Enantioselektivität sollte durch die Veresterung von drei Substraten (Substrat **F**: 2-Chlorpropionsäure; Substrat **G**: 2-

Phenylbuttersäure und Substrat **H**: 2-Phenylpropionsäure) mit rekombinanter CRL und zwei Mutanten (P246F, L304F) verifiziert werden. Diese Mutationen änderten den Abstand  $d_{\text{HNe-OAlk}}$ . Allerdings konnte eine veränderte Enantioselektivität experimentell nicht bestimmt werden, da für die Produkte keine Standards vorlagen und die Edukte unzureichend getrennt wurden.

Eine Übertragung des Modells für CRL auf die von PCL-katalysierte Umsetzung chiraler Carbonsäuren war allerdings nur bedingt möglich. Für die PCL konnte eine dem *acid his gap* vergleichbare Region innerhalb der Bindungstasche identifiziert werden, an die der mittlere Substituent binden kann. Allerdings ist diese kleiner als bei der CRL. Der *acid his gap* der PCL wird aus den Seitenketten der Aminosäuren V267 und H286 begrenzt. Die Bewegung des mittleren Substituenten in das *acid his gap* konnte auch bei der PCL durch den Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Ctet}-\text{C}^*}$  beschrieben werden. Die Vorhersage der Enantiopräferenz anhand des Torsionswinkels  $\Phi_{\text{Ctet}-\text{C}^*}$  war für zehn von zwölf untersuchten Substraten möglich. Beide Substrate, für die das Modell nicht trägt, besitzen Fluoratome in direkter Nachbarschaft zum Stereozentrum. Eine direkte Korrelation zwischen dem experimentell bestimmten E-Wert aller untersuchten Substrate und dem Abstand zwischen katalytischem Histidin und Sauerstoff der veresterten Alkoholgruppe,  $d_{\text{HNe-OAlk}}$ , war jedoch nicht erkennbar, da durch die Bewegung des mittleren Substituenten in das *acid his gap* die Seitenkette des katalytischen H286, im Gegensatz zur CRL, bei der die Bewegung des katalytischen Histidins ausschließlich senkrecht zum F345 erfolgte, in unterschiedlichen Richtungen und resultierend in alternativen Orientierungen von den einzelnen Substraten weg gedrückt werden konnte.

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Lipasen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Vorkommen, Nomenklatur und Systematik von Lipasen	1
1.1.2	Biochemische und biotechnologische Aspekte	3
1.1.3	<i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase, PCL	4
1.1.4	<i>Candida rugosa</i> Lipase, CRL	5
1.1.5	Andere Lipasen	6
1.1.6	Eigenschaften und Verwendung von Lipasen	6
1.1.7	Struktur, Aufbau und Reaktionsmechanismus von Lipasen	9
<b>1.2</b>	<b>Enantioselektivität von Lipasen</b>	<b>13</b>
<b>1.3</b>	<b>Substrate</b>	<b>14</b>
1.3.1	Sekundäre Alkohole	14
1.3.2	Primäre Alkohole	16
1.3.3	Triacylglyceride und Triacylglycerid Analoga	17
1.3.4	Carbonsäuren	19
<b>1.4</b>	<b>Charakterisierung der Substratbindungstaschen für Lipasen und <i>docking</i> der Substrate</b>	<b>20</b>
1.4.1	Bindungstaschencharakteristika der PCL	20
1.4.2	Bindungstaschencharakteristika der CRL	21
1.4.3	Bindung und <i>docking</i> von primären Alkoholen an PCL	22
1.4.4	Bindung und <i>docking</i> von Carbonsäuren an CRL und PCL	23
<b>1.5</b>	<b>Molekulardynamische Simulationen</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b><i>Zielsetzung</i></b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b><i>Materialien und Methoden</i></b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Geräte und Materialien</b>	<b>29</b>
3.1.1	Verwendete Geräte	29
3.1.2	Eingesetzte Enzyme und Chemikalien	30
3.1.3	Nährmedien	32
3.1.4	Verbrauchsmaterialien	33
3.1.5	Puffer	33
3.1.6	Antibiotikum	33
<b>3.2</b>	<b>Plasmide</b>	<b>34</b>

3.2.1	Das Plasmid pCYTEXP1	34
3.2.2	Das Plasmid pT-Lip-Hp	34
3.2.3	Das Plasmid pTomp $\Delta$ 70HpHis	34
<b>3.3</b>	<b>Stammhaltung <i>E. coli</i></b>	<b>35</b>
3.3.1	<i>E. coli</i> Dh5 $\alpha$	35
3.3.2	Stammhaltung auf festen Nährböden, Anlegen von Glycerinkulturen und Anzucht in Flüssigmedium	35
<b>3.4</b>	<b>Molekulargenetische Methoden</b>	<b>36</b>
3.4.1	Herstellung kompetenter Zellen nach Chung <i>et al.</i> (Chung et al. 1989) und Transformation von kompetenten DH5 $\alpha$ Zellen	36
3.4.2	Isolierung von Plasmid-DNA	37
3.4.3	Polymerase Kettenreaktion, PCR und positionsgerichtete Mutagenese mit QuickChange	37
3.4.4	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	39
3.4.5	DNA zur Sequenzierung	39
<b>3.5</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>40</b>
3.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	40
3.5.2	SDS-Gel Färbung und Bestimmung der Proteinkonzentraion	40
<b>3.6</b>	<b>Lipaseaktivitätsbestimmung</b>	<b>41</b>
<b>3.7</b>	<b>Expression und Proteingewinnung von PCL und Helferprotein</b>	<b>43</b>
3.7.1	Fermentation im 5 l und 25 l Maßstab	43
3.7.2	Zellaufschluss und Rückfaltung der <i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase	43
3.7.3	Proteingewinnung mittels <i>cross-flow</i> Filtration und Lyophilisierung	44
<b>3.8</b>	<b>Analytische Untersuchungen zur Enantioselektivität von Lipasen</b>	<b>44</b>
3.8.1	Primäre Alkohole	44
3.8.2	Carbonsäuren	44
3.8.3	Ermittlung der Produktverteilung mittels GC-Analyse	45
<b>3.9</b>	<b>Verwendete Hardware, Software und Online-Datenbanken</b>	<b>46</b>
<b>3.10</b>	<b>Eingesetzte Lipasestrukturen</b>	<b>47</b>
<b>3.11</b>	<b>Charakterisierung der Substrat-Bindungsstellen in Lipasen</b>	<b>47</b>
<b>3.12</b>	<b>Manuelles <i>docking</i> der Substrate in die Bindungstasche</b>	<b>48</b>
3.12.1	Primäre Alkohole	48
3.12.2	Carbonsäuren	51
<b>3.13</b>	<b>Anpassung der Partialladungen des ersten tetraedrischen Intermediats und Minimierung</b>	<b>53</b>
<b>3.14</b>	<b>Molekulardynamische Simulationen; <i>molecular modeling</i></b>	<b>55</b>



<b>3.15</b>	<b>Auswertung molekuldynamischer Simulationen</b>	<b>57</b>
3.15.1	Bestimmung der Substratgeometrie für primäre Alkohole	57
3.15.2	Bestimmung der Substratgeometrie für Carbonsäuren	58
3.15.3	Auswertung molekuldynamischer Simulationen an Komplexen der PCL mit Carbonsäureestern	59
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b>Primäre Alkohole</b>	<b>61</b>
4.1.1	<i>Docking</i> der Substrate in die Bindungstasche der PCL	61
4.1.2	Modell zur Vorhersage der Enantiopräferenz von PCL gegenüber primären Alkoholen	62
4.1.3	Enantioselektivität <i>in silico</i>	70
<b>4.2</b>	<b>Herstellung der Mutanten L287W, L287Y und Y29W</b>	<b>79</b>
<b>4.3</b>	<b>Experimentelle Enantioselektivität der PCL-Mutanten</b>	<b>83</b>
<b>4.4</b>	<b>Korrelation zwischen der Differenz der Torsionswinkel und dem experimentell bestimmten E-Wert</b>	<b>84</b>
<b>4.5</b>	<b>Enantioselektivität von Substraten mit dem Stereozentrum in einer Ringstruktur</b>	<b>85</b>
4.5.1	Substrate aus der Literatur	85
4.5.2	Substrat E: Korrelation Zwischen dem E-Wert und der Größe des <i>His gaps</i>	88
<b>4.6</b>	<b>Enantioselektivität anderer Lipasen gegenüber primären Alkoholen</b>	<b>90</b>
<b>4.7</b>	<b>Bestimmung der Aktivität der PCL-Mutanten <i>in silico</i></b>	<b>95</b>
<b>4.8</b>	<b>Enantioselektivität von Lipasen gegenüber Carbonsäuren</b>	<b>98</b>
4.8.1	Enantioselektivität von CRL gegenüber chiralen Carbonsäuren	98
4.8.2	Veränderte Enantioselektivität von CRL-Mutanten gegenüber drei Carbonsäuren <i>in silico</i>	104
4.8.3	Übertragung des Modells zur Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität der CRL gegenüber Carbonsäuren auf PCL	109
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>113</b>
<b>5.1</b>	<b>Molecular Modeling Grundlagen</b>	<b>113</b>
5.1.1	Tetraedrische Reaktionsintermediate und deren Übergangszustände	113
5.1.2	Manuelles <i>docking</i> der Substrate	114
5.1.3	Fixierung des Proteinerückgrats	116
5.1.4	Verwendete Strukturmodelle der Lipasemutanten	116
5.1.5	Länge der Simulation	117
<b>5.2</b>	<b>Gültigkeit des Modells zur Beschreibung und Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität der PCL gegenüber primären Alkoholen</b>	<b>118</b>
5.2.1	Modell zur Vorhersage der Enantiopräferenz	118
5.2.2	Modell zur Vorhersage der Enantioselektivität	119

5.2.3	Andere Modelle zur Vorhersage der Enantiopräferenz von PCL gegenüber primären Alkoholen 124	
5.2.4	Substrate, die der empirischen Regel von Weissfloch und Kazlauskas folgen _____	126
5.2.5	Enzym-Substrat- Komplex _____	127
5.2.6	<i>Docking</i> und Bindung der Substrate _____	129
5.2.7	Modell zur Vorhersage der Aktivität der PCL-Mutanten <i>in silico</i> _____	130
<b>5.3</b>	<b>Gültigkeit des Modells zur Beschreibung und Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität der CRL gegenüber Carbonsäuren _____</b>	<b>131</b>
5.3.1	Andere Modelle zur Vorhersage der Enantiopräferenz der CRL gegenüber Carbonsäuren ____	131
5.3.2	Modell zur Vorhersage der Enantiopräferenz _____	131
5.3.3	Modell zur Vorhersage der Enantioselektivität _____	132
<b>5.4</b>	<b>Übertragung des Modells zur Beschreibung und Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität der PCL gegenüber Carbonsäuren _____</b>	<b>134</b>
5.4.1	Gültigkeit des Modells zur Beschreibung der Enantiopräferenz der PCL gegenüber Carbonsäuren 134	
5.4.2	Modell zur Beschreibung der Enantioselektivität der PCL gegenüber chiralen Carbonsäuren _	136
<b>6</b>	<b><i>Ausblick</i> _____</b>	<b>138</b>
<b>7</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i> _____</b>	<b>139</b>
<b>8</b>	<b><i>Anhang</i> _____</b>	<b>151</b>
<b>8.1</b>	<b>Sequenzen der verwendeten Mutagenese-Primer _____</b>	<b>151</b>
<b>8.2</b>	<b>Sequenzen der verwendeten Sequenzierprimer _____</b>	<b>152</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Schematische Übersicht der verschiedenen Lipasen. ....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lipase-katalysierten Veresterung (oben) bzw. Hydrolyse (unten) mit hoher Enantioselektivität am Beispiel eines primären Alkohols. ....	7
Abbildung 3: <b>Links:</b> Schematische Darstellung des $\alpha/\beta$ -Hydrolase <i>fold</i> (rot: $\alpha$ -Helices; blau $\beta$ -Faltblätter). Die topologischen Positionen der katalytischen Aminosäuren sind durch grüne Punkte gekennzeichnet. .... <b>Rechts:</b> PCL in offener Konformation mit gebundenem Substrat 1-Phenyl-1,2-ethandiol (Enzym-Substrat-Komplex in der ersten tetraedrischen Zwischenstufe). Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot hervorgehoben. Die Sekundärstrukturzuordnung erfolgte nach Kabsch-Sander (Kabsch und Sander 1983). Das Faltungsmuster des $\alpha/\beta$ -Hydrolase <i>fold</i> s ist deutlich zu erkennen: acht antiparallele $\beta$ -Stränge, die den Kern des Enzyms bilden, sind von $\alpha$ -Helices umgeben (Ollis <i>et al.</i> 1992). ....	9
Abbildung 4: Geschlossene Form (gelb) der <i>Pseudomonas glumae</i> Lipase (Cleasby <i>et al.</i> 1992) und offene Form (cyan) der Lipase aus <i>Pseudomonas cepacia</i> (Schrag <i>et al.</i> 1997). Durch die Überlagerung der beiden Strukturen ist die unterschiedliche Orientierung des <i>lids</i> in der geschlossenen und offenen Konformation der Lipase gut zu erkennen. ....	10
Abbildung 5: PCL in offener Form. Die Aminosäuren wurden nach Hydrophobizität eingefärbt und zur besseren Orientierung wurde ein primärer Alkohol als Substrat (grün) in die Bindungstasche gebunden. Rote Färbung weist auf hydrophobe, blaue Färbung auf hydrophile Aminosäuren hin. Die Substratbindungstasche besteht überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren. ....	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung zweier Enantiomere. Die beiden Moleküle unterscheiden sich nur in ihrer räumlichen Anordnung und verhalten sich wie Bild und Spiegelbild. Die graue Kugel stellt in diesem Fall das Stereozentrum (oder chirales Zentrum) dar. ....	13
Abbildung 7: Korrelation des Abstandes zwischen dem katalytischen H286 und dem Alkohol-Sauerstoff im Modell mit experimentell bestimmtem E-Wert (Schulz <i>et al.</i> 2000). ....	15
Abbildung 8: Veranschaulichung der empirischen Regeln zur Vorhersage der Enantiopräferenz von PCL gegenüber sekundären (links) und primären (Mitte und rechts) Alkoholen. <b>Links:</b> Enantiomer des bevorzugt umgesetzten sekundären Alkoholsubstrats in dem von Kazlauskas <i>et al.</i> postulierten Bindungsmodus (nach Kazlauskas <i>et al.</i> (Kazlauskas <i>et al.</i> 1991)). <b>Mitte:</b> Enantiomer des bevorzugt umgesetzten primären Alkoholsubstrats in dem von Weissfloch und Kazlauskas sowie von Tuomi und Mitarbeitern postulierten Bindungsmodus (Hypothese 1) (Weissfloch und Kazlauskas 1995; Tuomi und Kazlauskas 1999). <b>Rechts:</b> Enantiomer des bevorzugt umgesetzten primären Alkoholsubstrats in alternativem Bindungsmodus (Hypothese 2) (Weissfloch und Kazlauskas 1995). Die Regel für primäre Alkoholsubstrate besitzt keine Gültigkeit, wenn ein Sauerstoffatom direkt benachbart zum Stereozentrum lokalisiert ist (nach Weissfloch und Kazlauskas (Weissfloch und Kazlauskas 1995)). ....	17

Abbildung 9: Strukturformel eines Triacylglycerids und stereospezifische Nummerierung der an das Glycerid gebundenen Substituenten.....	18
Abbildung 10: Korrelation zwischen dem gemessenen Torsionswinkel im Modell und dem experimentell bestimmten E-Wert. Eine <i>sn</i> -1 Präferenz ist zu beobachten, wenn der Torsionswinkel größer als 150° ist, bei einem Torsionswinkel kleiner als 150° zeigen die Lipasen <i>sn</i> -3-Präferenz (Scheib <i>et al.</i> 1998; Scheib <i>et al.</i> 1999).....	18
Abbildung 11: Empirische Regel zur Vorhersage der Enantiopräferenz von CRL gegenüber Carbonsäuren, basierend auf der Größe der Substituenten am Stereozentrum (Ahmed <i>et al.</i> 1994). Die Abbildung zeigt das bevorzugte Enantiomer. ....	20
Abbildung 12: Die Substratbindungstasche der PCL. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot, die des <i>hydrophobic crevice</i> blau, die des <i>hydrophobic dent</i> gelb, die des <i>hydrophilic trench</i> orange/grau und die der <i>wall</i> grau eingefärbt. Die Oberflächendarstellung der Lipase erfolgt nach Connolly (Connolly 1983). ....	21
Abbildung 13: Die Substratbindungstasche der CRL. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot, die des <i>hydrophobic tunnel</i> blau, die des <i>hydrophobic dent</i> gelb und die der <i>hydrophilic trench</i> orange eingefärbt. Die Oberflächendarstellung der Lipase erfolgt nach Connolly (Connolly 1983). ....	22
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Bindung der Substrate in der Bindungstasche der PCL. Die Substrate wurden bei verschiedenen Untersuchungen und im Rahmen dieser Arbeit sowohl mit ihrem großen Substituenten in den <i>hydrophobic dent</i> (Zuegg <i>et al.</i> 1997) (a.) als auch in den <i>hydrophilic trench</i> orientiert (Tuomi und Kazlauskas 1999) (b.). ....	23
Abbildung 15: Links: Das Plasmid pCYTEXP1 von Belev und Mitarbeitern war die Grundlage für die von Quyen <i>et al.</i> durchgeführten Modifikationen (Belev <i>et al.</i> 1991). Rechts: Das Plasmid pT-LipHp mit den Genen der PCL ATCC 21808 und des PCL-Helferproteins (Quyen <i>et al.</i> 1999). ....	35
Abbildung 16: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Substrate, deren Daten über Enantioselektivität von Lipasen teilweise selber bestimmt wurden und zum <i>in silico</i> Design von PCL-Mutanten verwendet wurden. Es ist jeweils das vom PCL-Wildtyp bevorzugte Enantiomer dargestellt. ....	51
Abbildung 17: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Substrate, deren experimentell bestimmten E-Werte der CRL aus der Literatur entnommen (Substrate 51-58) (Bornscheuer und Kazlauskas 1999) und für die Vorhersage von Mutanten eingesetzt wurden (Substrat <b>F</b> , <b>G</b> , <b>H</b> ). Es ist jeweils das von der CRL bevorzugte Enantiomer dargestellt.....	52
Abbildung 18: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Substrate, deren experimentell bestimmte Enantioselektivität der PCL aus der Literatur entnommen wurde (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Es ist jeweils das von der PCL bevorzugte Enantiomer dargestellt.....	53
Abbildung 19: Schematische Darstellung des ersten tetraedrischen Intermediats bei der Enzymkatalysierten Esterhydrolyse durch PCL (katalytisches Histidin 286, katalytisches Serin 87 und	

Substrat, sowie die Aminosäuren des <i>oxyanion hole</i> Leucin 17 und Glutamin 88). Die hier rot aufgeführten Partialladungen wurden dahingehend modifiziert (verändert nach Scheib 1999)... 54	
Abbildung 20: Schematische Darstellung des Energieprofils entlang einer Reaktionskoordinate. Durch die Energieminimierung wird ausgehend von der Startstruktur ein lokales Minimum erreicht, wohingegen eine molekulardynamische (MD-) Simulation das Erreichen eines globalen Energieminimums ermöglicht (verändert nach Scheib 1999)..... 55	
Abbildung 21: Verlauf der kinetische Energie und die Equilibrierung während der Produktionsphase einer 11ps langen Simulation bis 150 K (links), einer 8 ps Simulation bis 200 K (Mitte) und einer 8 ps Simulation bis 100 K (rechts)..... 56	
Abbildung 22: Definition der Torsionswinkel $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$ . Unten rechts ist die Definition eines Torsionswinkels zwischen den aus den Atomen A, B, C und B, C, D aufgebauten Ebenen abgebildet..... 58	
Abbildung 23: Definition der Torsionswinkel $\Phi_{\text{Ctet.-C*}}$ und des Abstandes $d_{\text{HNE-OAlk.}}$ ..... 59	
Abbildung 24: Die Substrate bewegen sich während der Simulation in eine bestimmte Region im <i>hydrophobic dent</i> , das <i>His gap</i> . Das <i>His gap</i> wird durch die Aminosäuren H286 (rot) und L287 (blau) in der PCL gebildet..... 63	
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Orientierung der primären Alkohole in der Bindungstasche der PCL. Der große Substituent am Stereozentrum orientiert sich immer zum <i>hydrophobic dent</i> und bindet nahe dem <i>His gap</i> . Der Torsionswinkel $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$ beschreibt die Bewegung der Substrate in das <i>His gap</i> ..... 64	
Abbildung 26: Kinetik der Reaktion von Substrat <b>E</b> . Es ist deutlich zu erkennen, dass die Produktpeaks im Laufe der Reaktion zunehmen, während die Eduktpeaks abnehmen (hier für L287F-Mutante nach 0,5 h, 1 h und 4 h). Dem stärker abnehmenden Substratpeak des ( <i>R</i> )-Enantiomers wurde der stärker ansteigende Peak als Produktpeak zugeordnet und umgekehrt... 67	
Abbildung 27: Gaschromatogramme der Substrate <b>A-E</b> . Die Retentionszeiten wurde mit Standardsubstraten bestimmt. Die Produktpeaks von Substrat <b>A-D</b> können nicht eindeutig zugewiesen werden. Die hier beschrifteten Peaks sind somit nur spekulativ. .... 68	
Abbildung 28: <b>Links oben</b> : Das <i>His gap</i> wird durch den Phenylring des F287 geschlossen und der Phenylring des nicht bevorzugten ( <i>R</i> )-Enantiomers von Substrat <b>D</b> ist senkrecht zu den Ringen der Seitenkette H286 und F287. Daher kann das nicht bevorzugte ( <i>R</i> )-Enantiomer nicht sehr tief in das <i>His gap</i> binden und das katalytische H286 wird weggedrückt. <b>Rechts oben</b> : Der Phenylring des F287 und der Imidazolring des H286 sind parallel zueinander und das <i>His gap</i> öffnet sich dadurch. Der Phenylring des bevorzugten ( <i>S</i> )-Enantiomers ist parallel zu den Ringen von H286 und F287 und daher kann das Enantiomer sehr tief in das <i>His gap</i> binden. Zum Vergleich <b>links unten</b> das nicht bevorzugte ( <i>R</i> )-Enantiomer im Wildtyp und <b>rechts unten</b> das bevorzugte ( <i>S</i> )-Enantiomer im Wildtyp..... 74	

- Abbildung 29: Lage der beiden Enantiomere des Substrates **E** in der Bindungstasche des PCL-Wildtyps (oben) und der Doppelmutante Y29W / L287F (unten). Das nicht bevorzugte (*S*)-Enantiomer (links) kann durch die senkrechte Orientierung des F287 nicht im *His gap* binden und wird von den großen Seitenketten des W29 und F287 nach vorne gedrückt. Beim bevorzugten (*R*)-Enantiomer ändert sich die Form der Bindungstasche durch die Orientierung der Seitenketten des W29 und L287F. Der *hydrophilic trench* ist nicht mehr zugänglich und das Substrat bindet tief im *His gap*. ..... 79
- Abbildung 30: Ausschnitt aus den Aminosäure- und Nucleotidsequenzen der Wildtyp-PCL und L287W, L287Y (oben) und Y29W-Mutanten (unten). Die Nummerierung (jeweils obere Zeile) entspricht der Aminosäuresequenz (mittlere Zeile). In der unteren Zeile findet sich die Nucleotidsequenz. Das katalytisch aktive H286 ist rot, die modifizierten Aminosäuren 287 bzw. 29 blau (in Wildtyp-PCL) bzw. grün (in den Mutanten) hervorgehoben..... 80
- Abbildung 31: Links Mutante pT-LipHpL287F: SDS-Gel der fermentierten und transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen unter Kontrolle des  $\lambda$ P<sub>L</sub>-Promotors. Spur 1 zeigt Zellysate nach 4 h Inkubation, Spur 2 nach 3 h, Spur 3 nach 2h Spur 4 nach 1 h und Spur 6 vor der Inkubation als Kontrolle. Spur 5 und 9 ist der Standard. Rechts Mutante pT-LipHpL287W: Spur 7 ist als Kontrolle vor Inkubation. Spur 8 nach 1 h, Spur 10 nach 2h, Spur 11 nach 4 h und Spur 12 nach 3 h Inkubation. .... 81
- Abbildung 32: Gaschromatogramme der Umsetzung des Substrates **E** mit: Mutante L287F, Mutante L287W, Mutante Y29W, Mutante L287Y, Doppelmutante Y29W / L287F und Doppelmutante Y29W / L287Y ..... 83
- Abbildung 33: Das bevorzugte (*S*)-Enantiomer von Substrat **D** in der Bindungstasche der PCL-L287F-Mutante nach der molekulardynamischen Simulation. Diese Abbildung zeigt sehr gut, wie der Phenylring des Substrates, der Phenylring der F287-Seitenkette und der Imidazolring des katalytischen H286 sich parallel zueinander orientieren, daher kann sich dieses Enantiomer sehr tief das *His gap* bewegen. Ebenso verhält es sich für Substrat **E** und die Mutante L287F..... 84
- Abbildung 34: Die Korrelation zwischen dem *in silico* Assay,  $\Delta\Phi_{\text{OAIK-C}}(\text{S-R})$  [berechnet als  $(\text{S})\Phi_{\text{OAIK-C}} - (\text{R})\Phi_{\text{OAIK-C}}$ , daraus folgt:  $\Delta\Phi_{\text{OAIK-C}} > 0 = (\text{S})$ -Präferenz und  $\Delta\Phi_{\text{OAIK-C}} < 0 = (\text{R})$ -Präferenz] (blau), und dem experimentell bestimmten E-Wert (rot) für Substrat **E**..... 85
- Abbildung 35: Die Daten über die Enantioselektivität der PCL gegenüber diesen neun Substraten wurden aus der Literatur (Weissfloch und Kazlauskas 1995; Bornscheuer und Kazlauskas 1999) entnommen (siehe auch Tabelle 13). Alle Substrate sind in der Darstellungsform nach Weissfloch und Kazlauskas (Weissfloch und Kazlauskas 1995), mit der funktionellen COH-Gruppe nach hinten und dem "großen" Substituenten auf der rechten Seite dargestellt. Das experimentell bestimmte bevorzugte Enantiomer der PCL-katalysierten Umsetzung und der ermittelte E-Wert sind unter der jeweiligen Struktur angegeben. Dabei folgen alle 5-Ringe der

- empirischen Regel, während die 6-Ringe ihr nicht folgen und somit das nicht bevorzugte Enantiomer hier dargestellt ist. .... 86
- Abbildung 36: Die Bewegung des bevorzugten Enantiomers eines Substrates (Substrat **E**) mit dem Stereozentrum in einer Ringstruktur drückt die Seitenkette des katalytischen H286 weg (hellgrau und dünn Startstruktur aus pdb-Struktur; dunkelgrau und dick Imidazolring nach der Simulation). Durch diese Bewegung ändert sich die Größe des *His gap*, was durch die Darstellung des katalytischen H286 aus der pdb-Struktur (hellgrau) und der resultierenden mittleren Struktur der Simulation (dunkelgrau) verdeutlicht wird. .... 87
- Abbildung 37: Die Korrelation zwischen dem experimentell bestimmten E-Wert und der Größe des *His gap* ( $d_{His\ gap}$  als Abstand zwischen  $N_{\epsilon}$ (H286) und  $C_{\delta}$ (L287)) des bevorzugten Enantiomers von den Substraten, deren Daten über die Enantioselektivität aus der Literatur entnommen wurden. Das Optimum der E-Wert liegt bei  $d_{His\ gap}$  zwischen 6,3 Å und 6,7 Å. .... 87
- Abbildung 38: Korrelation zwischen dem experimentell bestimmten E-Wert und der Größe des *His gap* ( $d_{His\ gap}$ ) des bevorzugten Enantiomers von Substrat **E** und dem PCL Wildtyp und Mutanten.  $d_{His\ gap}$  wurde gemessen als Abstand zwischen  $N_{\epsilon}$ (H286) und  $C_{\delta}$ (L287) im Wildtyp (WT),  $N_{\epsilon}$ (H286) und  $C_{\epsilon}$ (F287) in der L287F und Y29W/ L287F Mutante,  $N_{\epsilon}$ (H286) und  $C_{\epsilon}$ (W287) in der L287W Mutante,  $N_{\epsilon}$ (H286) und  $C_{\epsilon}$ (Y287) in der L287Y und Y29W / L287Y Mutante und  $N_{\epsilon}$ (H286) und  $C_{\delta}$ (L287) in der Y29W Mutante. .... 90
- Abbildung 39: Gaschromatogramme der Umsetzung von Substrat **E** mit CAL-B (links), RML (Mitte) und CRL (rechts)..... 92
- Abbildung 40: Orientierung des Substrates **E** nach der molekulardynamischen Simulation. Das hier dargestellte (*R*)-Enantiomer bindet bei PCL, RML und CAL-B im *His gap* und diese drei Lipasen besitzen experimentell bestimmte Enantioselektivität gegenüber diesem Substrat. Bei der CRL kann das Substrat aus geometrischen Gründen nicht im *His gap* binden. Das *His gap* der CRL für primäre Alkohole unterscheidet sich zu dem für Triacylglycerolen (Pleiss *et al.* 2000) 93
- Abbildung 41: Das bevorzugte Enantiomer bindet in der PPL immer tiefer oder ausschließlich in einer Spalte, welche vom nicht katalytischen H152 und seinem strukturellem Nachbarn L265 gebildet wird. Die Region, in der dieses Strukturmotiv liegt, entspricht dem *hydrophilic trench* der PCL (vergl. Abbildung 33)..... 94
- Abbildung 42: Die Korrelation zwischen dem experimentell bestimmten E-Wert und der Größe des *His gap* ( $d_{His\ gap}$ ) für die sechs mit PPL untersuchten Substrate (PPL 1 – PPL 6).  $d_{His\ gap}$  wurde gemessen als Abstand zwischen  $N_{\epsilon}$ (H152) und  $C_{\delta}$ (L265). Die dunklen Punkte(◆) zeigen die Abstände im Modell für das bevorzugte Enantiomer und die hellen die des nicht bevorzugten Enantiomers(■)..... 95
- Abbildung 43: Aktivitäten des PCL-Wildtyps und der PCL-Mutanten gegenüber Substrat **E** (bestimmt anhand des Substrat- und Produktverhältnisses der GC-Chromatogramme der Biotransformation) und gegenüber Tributyrin (bestimmt mittels pH-Stat-Methode). .... 97

- Abbildung 44: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Substrate, deren experimentell bestimmten E-Werte der CRL aus der Literatur entnommen (Substrate 51-58) (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Die Substrate **F**, **G** und **H** wurden zur Bestätigung des Modells molekulardynamisch untersucht. Es ist jeweils das bevorzugte Enantiomer der CRL-katalysierten Veresterung dargestellt. .... 98
- Abbildung 45: Die Seitenketten der Aminosäuren F345 und H449 bilden eine kleine, schmale Bindungstaschenregion, den *acid his gap*, in den der mittlere Substituent der chiralen Carbonsäuren bindet. Der mittlere Substituent des nicht bevorzugten Enantiomers bewegt sich immer tief in den *acid his gap*. Durch diese Bewegung wird der Imidazolring des katalytischen H449 weggedrückt (Pfeil). .... 100
- Abbildung 46: Die Bewegung des großen Substituenten in den *hydrophobic tunnel* und des mittleren Substituenten in den *acid his gap* wird durch den Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Cetr.-C}^*}$  beschrieben. Anhand der Messung dieses Torsionswinkels  $\Phi_{\text{Cetr.-C}^*}$  der beiden zusammengehörenden Enantiomere kann die Enantiopräferenz von CRL gegenüber Carbonsäuren vorhergesagt werden. Er war immer für das bevorzugte Enantiomer kleiner  $100^\circ$  und für das nicht bevorzugte größer als  $300^\circ$ . Der Abstand  $d_{\text{HNe-OAlk}}$  zwischen dem katalytischen H449 und dem Alkoholsauerstoff des nicht bevorzugten Enantiomers korreliert mit der Enantioselektivität. .... 102
- Abbildung 47: Der Abstand  $d_{\text{HNe-OAlk}}$  des nicht bevorzugten Enantiomers der Substrate 51-58 im Computermodell korreliert mit dem experimentell bestimmten E-Wert. .... 103
- Abbildung 48: Die beiden Aminosäuren L304 und P256 im CRL-Wildtyp wurden gegen Phenylalanin ausgetauscht und *in silico* und *in vitro* untersucht. Durch ihre im Vergleich zum Wildtyp größere Seitenkette ändern die Mutanten die Konformation und Größe des *hydrophobic tunnels*. Durch ihre Position haben sie direkten Einfluss auf das Substrat und können durch diese Interaktionen die Enantioselektivität verändern. .... 104
- Abbildung 49: Durch die Vergrößerung der Seitenketten der Mutanten P246F und L304F bindet das nicht bevorzugte Enantiomer in einer anderen Orientierung im *hydrophobic tunnel* der CRL, was hier im Beispiel für das (*R*)-Enantiomer von Substrat **G** dargestellt ist. Im Gegensatz zum Wildtyp (Bild links) wird der *hydrophobic tunnel* durch die Mutanten verkleinert. Dadurch rotiert der Phenylring des Substrat **H** für beide Mutanten (wie in Bild Mitte) um  $90^\circ$  und bindet parallel zu den Seitenketten der Aminosäuren an Position 304 und 246. Dasselbe wird für Substrat **G** und die Mutante P246 beobachtet (Bild Mitte). Die Seitenkette der F304 Mutante drückt das nicht bevorzugte Enantiomer von Substrat **G** sehr weit nach unten (Bild rechts). Für alle Mutanten bindet der mittlere Substituent nicht so tief und parallel zu der Seitenkette des katalytischen H449. Dadurch wird es nicht so weit weggedrückt und der Abstand  $d_{\text{HNe-OAlk}}$  ist im Vergleich zum Wildtyp kleiner. .... 107
- Abbildung 50: Die Bindungstaschenregion der PCL für den mittleren Substituenten der Carbonsäuren, das *acid his gap*, wird von den Seitenketten der Aminosäuren V267 und dem katalytischen H286



gebildet. Diese Bewegung des mittleren Substituenten in dieses Strukturmotiv wird durch den Torsionswinkel $\Phi_{\text{C}_{\text{tetr.}}-\text{C}^*}$ beschrieben. ....	109
Abbildung 51: Der Abstand $d_{\text{HNe-OAlk}}$ des nicht bevorzugten Enantiomers im Computermodell korreliert nicht mit dem experimentell bestimmten E-Wert der PCL-katalysierten Umsetzung chiraler Carbonsäuren. ....	112
Abbildung 52: Orientierung des der Bindungen am Stereozentrum zum großen Substituenten $R_L$ und mittelgroßen Substituenten $R_M$ der primären Alkohole, wenn sie der empirischen Regel (Weissfloch und Kazlauskas 1995) folgen (links) und wenn sie ihr nicht folgen (rechts).....	127

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Klassifizierung der <i>Pseudomonas</i> Lipasen nach Gilbert (Gilbert 1993). Die in dieser Arbeit untersuchte Lipase stammt aus <i>Pseudomonas cepacia</i> ATCC 21808, einer Lipase der Gruppe II.5	
Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte .....	29
Tabelle 3: Liste der eingesetzten Enzyme und Chemikalien .....	30
Tabelle 4: Verwendete Nährmedien und Herstellung .....	32
Tabelle 5: Liste der Verbrauchsmaterialien .....	33
Tabelle 6: Verwendete Puffer und deren Herstellung .....	33
Tabelle 7: Verwendeter <i>E. coli</i> -Stamm mit Genotyp und Resistenz .....	35
Tabelle 8: Temperaturprogramm der QuikChange-PCR bei der Einführung einer Punktmutation in das Plasmid pT-LipHp .....	38
Tabelle 9: Temperaturprogramm für die zyklische Sequenzierreaktion .....	39
Tabelle 10: Zusammensetzung des Proteinstandards, <i>low molecular weight</i> Standard (LMW) .....	40
Tabelle 11: Einzelne Temperaturprogramme der Gaschromatographie für die fünf untersuchten primären Alkohole. ....	45
Tabelle 12: Katalytische Triade und <i>oxyanion hole</i> der verwendeten Lipasen .....	47
Tabelle 13: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Substrate, deren Daten über Enantioselektivität der PCL aus der Literatur entnommen wurden (Weissfloch und Kazlauskas 1995; Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Oberhalb der Tabelle sind die Strukturen 1-13 aufgeführt, die verschiedenen lange Reste R, die in der Tabelle genau beschrieben sind, besitzen. Es wurden nur Substrate mit einem E-Wert 2 oder größer ausgewählt. Neben den Strukturen sind noch das jeweils bevorzugte Enantiomer und der experimentell bestimmte E-Wert aufgelistet. ....	49
Tabelle 14: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Substrate zur Untersuchung der Enantioselektivität von CAL-B, CRL, RML und PPL. Die Daten über die Enantioselektivität der Lipasen wurden aus der Literatur entnommen. Es ist immer das bevorzugte Enantiomer dargestellt. ....	50
Tabelle 15: Einstellungen bei der Durchführung einer Energieminimierung .....	54
Tabelle 16: Parametereinstellungen der durchgeführten molekulardynamischen Simulationen an Lipasen .....	56
Tabelle 17: Die Torsionswinkel $\Phi_{\text{OAlk..C}}$ der bevorzugten und nicht bevorzugten Enantiomere von 50 primären Alkoholen, deren Daten über die Enantioselektivität aus der Literatur entnommen wurden (Weissfloch und Kazlauskas 1995; Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Oberhalb der Tabelle sind die Strukturen 1-13 aufgeführt, die verschiedenen lange Reste R, die in der Tabelle genau beschrieben sind, besitzen. Bis auf eine Ausnahme ist der Torsionswinkel für das bevorzugte Enantiomer immer größer als für das nicht bevorzugte. ....	65
Tabelle 18: Substrate A-E wurden zur Verifikation des Computermodells mittels molekulardynamischer Simulationen untersucht. Die Vorhersage der experimentell erwarteten	

Enantiopräferenz von PCL gegenüber diesen Substraten erfolgte durch die Analyse der Torsionswinkel $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$ im Modell. ....	66
Tabelle 19: Im Modell gemessene Differenz der Torsionswinkel $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$ der Mutanten L287A, L287G, Y29A und Y29G der Substrate <b>A-E</b> . ....	72
Tabelle 20: Die Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität (E-Wert im Vergleich zum Wildtyp; +: Steigerung; -: Abnahme und o: unveränderte Enantioselektivität) von L287F gegenüber den Substraten <b>A-E</b> erfolgte durch visuelle Analyse und die Messung der Torsionswinkel. ....	74
Tabelle 21: Die Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität (E-Wert im Vergleich zum Wildtyp; +: Steigerung; -: Abnahme und o: unveränderte Enantioselektivität) von L287W gegenüber den Substraten <b>A-E</b> erfolgte durch visuelle Analyse und die Messung der Torsionswinkel. ....	76
Tabelle 22: Die Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität (E-Wert im Vergleich zum Wildtyp; +: Steigerung; -: Abnahme und o: unveränderte Enantioselektivität) von L287Y gegenüber den Substraten <b>A-E</b> erfolgte durch visuelle Analyse und die Messung der Torsionswinkel. ....	77
Tabelle 23: Die Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität (E-Wert im Vergleich zum Wildtyp; +: Steigerung; -: Abnahme und o: unveränderte Enantioselektivität) von Y29W gegenüber den Substraten <b>A-E</b> erfolgte durch visuelle Analyse und die Messung der Torsionswinkel. ....	77
Tabelle 24: Die Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität (E-Wert im Vergleich zum Wildtyp; +: Steigerung; -: Abnahme und o: unveränderte Enantioselektivität) von Y29W / L287F und Y29W / L287Y gegenüber dem Substrat <b>E</b> erfolgte durch Messung der Torsionswinkel. ....	78
Tabelle 25: Aktivität der Wildtyp-PCL und der Mutanten bei der Hydrolyse von <i>p</i> -NPP bei 37° C. ....	82
Tabelle 26: Aktivität der Wildtyp-PCL und der Mutanten mittels pH-Stat-Methode. ....	82
Tabelle 27: Die experimentell bestimmten E-Werte des PCL-Wildtyps und der Mutanten für Substrat <b>E</b> . ....	83
Tabelle 28: Substrate zur Untersuchung der Enantioselektivität von CAL-B, CRL, RML und PPL, deren Daten über die Enantioselektivität aus der Literatur entnommen wurden (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Es ist jeweils das bevorzugte Enantiomer dargestellt. ....	91
Tabelle 29: Aktivitäten des PCL-Wildtyps und der Mutanten gegenüber dem experimentell untersuchten primären Alkohol (Substrat <b>E</b> ) und Tributyrin. Die Aktivität des Wildtyps gegenüber dem Substrat wurde auf 100 % gesetzt. ....	96
Tabelle 30: Abstand $d_{\text{HNE-OAlk.}}$ zwischen dem katalytischen H286 und dem Alkoholsauerstoff des bevorzugten Enantiomers des experimentell untersuchten Substrat <b>E</b> und Tributyrin im Computermodell, sowie die experimentell bestimmte Aktivität der einzelnen Lipasen gegenüber Substrat <b>E</b> . ....	97

Tabelle 31: Die Torsionswinkel $\Phi_{\text{Ctetr.-C}^*}$ der acht mit molekulardynamischen Simulationen untersuchten Substrate, die die Bewegung des großen Substituenten tief in den <i>hydrophobic tunnel</i> und des mittleren Substituenten in den <i>acid his gap</i> beschreiben. Es ist jeweils die Konfiguration des experimentell bestimmten bevorzugte Enantiomer und die des nicht bevorzugte Enantiomer der einzelnen Substrate aufgeführt. ....	101
Tabelle 32: Die Torsionswinkel der mit rekombinanter CRL veresterten Carbonsäure-Substrate <b>F</b> , <b>G</b> und <b>H</b> , deren aus dem Computermodell vorhergesagte und die experimentell bestimmte Enantiopräferenz. ....	102
Tabelle 33: Gemessene Distanz $d_{\text{HNe-OAlk}}$ des nicht experimentell bevorzugten Enantiomers (Konfiguration ist jeweils angegeben) im Computermodell und der experimentell bestimmte E-Wert. ....	103
Tabelle 34: Die im Computermodell gemessenen Torsionswinkel $\Phi_{\text{Ctetr.-C}^*}$ und die Abstände $d_{\text{HNe-OAlk}}$ der beiden Enantiomere der Substrate <b>F</b> , <b>G</b> und <b>H</b> für den Wildtyp und die Mutanten P246F und L304F. ....	108
Tabelle 35: Der Torsionswinkel $\Phi_{\text{Ctetr.-C}^*}$ der 12 mit PCL untersuchten Substrate. Anhand dieses Torsionswinkels ist die Vorhersage der Enantiopräferenz bei der CRL möglich. Dies ist bei der PCL nicht uneingeschränkt möglich, da er für zehn Substrate für das bevorzugte Enantiomer kleiner und für zwei größer (rot gefärbt) ist als für das nicht bevorzugte Enantiomer. ....	110

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS****Aminosäuren**

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

**Lipasen**

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

**Weitere Abkürzungen**

A	Adenin
Amp	Ampicillin
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
c	Umsatz einer Lipase-katalysierten Reaktion oder Stöchiometrische Konzentration in mol/l
d	Abstand
CPU	<i>Central Processing Unit</i>
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
ddATP	2',3'-Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	2',3'-Didesoxycytosin-5'-triphosphat
ddGTP	2',3'-Didesoxyguanosin-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphat
ddTTP	2',3'-Didesoxythymidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	Enantioselektivität oder Energie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ee <sub>p</sub>	Enantiomerenüberschuss des Produkts
ee <sub>s</sub>	Enantiomerenüberschuss des Substrats
E <sub>ges</sub>	Gesamtenergie
E <sub>kin</sub>	Kinetische Energie

$E_{\text{pot}}$	Potentielle Energie
$\Phi$	Torsionswinkel
FID	Flammenionisations-Detektor
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
Hp	Gen des Helferproteins der PCL im Vektor pCYTEXP1
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactopyranosid
kb	Kilobasen
l	Bindungslänge
L287F	Mutante der PCL, in der Leucin 287 durch Phenylalanin ersetzt wurde
L287W	Mutante der PCL, in der Leucin 287 durch Tryptophan ersetzt wurde
L287Y	Mutante der PCL, in der Leucin 287 durch Tyrosin ersetzt wurde
L304F	Mutante der CRL, in der Leucin 304 durch Phenylalanin ersetzt wurde
LB	Luria Bertani-Medium
Lip	Gen der PCL im Vektor pCYTEXP1
m/v	Masse pro Volumen
mA	Milliampere
MD-Simulation	Molekulardynamische Simulation
min	Minute
ml	Milliliter
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OD <sub>578</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
<i>p</i>	Para
P246F	Mutante der CRL, in der Prolin 246 durch Phenylalanin ersetzt wurde
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PDB	Protein Datenbank
PEG	Polyethylenglycol
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat



---

pT	Vektor pCYTEXP1
( <i>R</i> )	( <i>R</i> )-Konfiguration
( <i>S</i> )	( <i>S</i> )-Konfiguration
$\sigma$	Standardabweichung
<i>sn</i>	Stereospezifische Nummerierung
T	Thymin
TEMED	Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TY	Trypton-Hefe-Medium
U	Unit in mmol/min bzw. $\mu$ mol/h oder Umsatz
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Strahlung im ultraviolettem Bereich
V	Volt oder Potentialfunktion
Vol.	Volumen
%v/v	Volumenprozent
v/v	Volumen pro Volumen
%(wv)	Gewichtsprozent
W	Watt
WT	Wildtyp
Y29W	Mutante der PCL, in der Tyrosin 287 durch Tryptophan ersetzt wurde
$\lambda$	Wellenlänge in nm

## VERWENDETEN ANGLISMEN

<i>acid his gap</i>	Bindungstasche der CRL und PCL für den mittleren Substituenten am Stereozentrum chiraler Carbonsäuren. In der CRL durch die Seitenketten der Aminosäuren F345 und H449 gebildet; in der PCL durch V267 und H286.
<i>annealing</i>	Anlagerungsschritt bei der PCR. In einem Temperaturbereich zwischen 45° C und 65° C erfolgt die Anlagerung der Primer an die Einzelstrang-DNA.
<i>BTL</i>	Bindungsregion für den großen Rest des Alkohols.
<i>BTM</i>	Bindungsregion für den mittleren Rest des Alkohols.
<i>cavity</i>	Dritte Bindungsregion in der Bindungstasche von Lipasen, bestehend aus polaren und unpolaren Resten.
<i>docking</i>	Einpassen von Substraten in die Bindungstasche von Enzymen für <i>molecular modeling</i> Untersuchungen.
<i>fold</i>	Charakteristisches Faltungsmuster eines Proteins im Raum, bedingt durch seine Aminosäuresequenz und (in einigen Fällen) die Anwesenheit eines Helferproteins.
<i>His gap</i>	Spalte zwischen den Seitenketten des katalytisch aktiven Histidins und einer strukturell benachbarten Aminosäure des <i>hydrophobic dent</i> , in die sich der große Substituenten eines primären Alkohols orientieren kann. Für CRL, RML und PCL sind die Aminosäuren des <i>His gap</i> direkte Sequenznachbarn.
<i>hydrophilic trench</i>	Alternative Bindestelle (BTM) für die zu spaltenden großen Substituenten von primären Alkoholen in der PCL.
<i>hydrophobic crevice</i>	Bindestelle für die zu spaltende Säure. In allen Lipasen vorhanden, aufgebaut aus unpolaren Aminosäuren.
<i>hydrophobic dent</i>	In allen Lipasen vorhandene kleinere Bindestelle aus unpolaren Resten. Bildet einen Teil der BTL. Anlagerung des großen Substituenten bei primären Alkoholen.
<i>hydrophobic tunnel</i>	Bindestelle für die zu spaltende Säure in der CRL.
<i>interfacial activation</i>	Aktivierung einer Lipase durch Öffnung des <i>lids</i> an einer Lipid-Wasser Grenzschicht.
<i>lid, flap</i>	Flexibles Sekundärstrukturelement (eine oder zwei $\alpha$ -Helices), das in hydrophiler Umgebung den Zugang zur Substratbindungstasche und dem aktiven Zentrum blockiert. In lipophiler Umgebung erfolgt eine Konformationsänderung. Der Deckel klappt auf, das Substrat kann gebunden werden.

<i>loop</i>	Schleife im Rückgrat eines Proteins, der keine höhere Sekundärstrukturordnung zugewiesen werden kann.
<i>molecular modeling</i>	Imitation des Verhaltens von Molekülen und molekularen Systemen, in der Regel durch Computeranwendungen.
<i>open reading frame</i>	Offenes Leseraster bei der Übersetzung des DNA-Codes in die Aminosäuresequenz. Ein Codon besteht aus drei Purin- bzw. Pyrimidinbasen und ist charakteristisch für eine Aminosäure. Von drei aufeinander folgenden Aminosäuren kann demnach jede den Beginn eines Codons darstellen. Ein Gen kann somit in drei Aminosäuresequenzen übersetzt werden.
<i>oxyanion hole</i>	Strukturelement in der Bindungstasche der Lipase. Aufgebaut aus zwei Aminosäuren, deren Säureamidgruppen als H-Brücken Donoren zum Oxyanion dienen.
<i>protein engineering</i>	Design von Proteinen mit veränderten Eigenschaften durch gentechnische Methoden.
<i>refolding</i>	Umfaltung von als inaktive Einschlusskörper vorliegendem Protein zu aktivem Protein unter Zuhilfenahme eines spezifischen Helferproteins (auch Chaperone oder Refoldase).
<i>screening</i>	Durchsuchen einer großen Anzahl von Proben und Auswahl geeigneter Spezies mit einem charakteristischen Assay.
<i>sequence alignment</i>	Vergleich von DNA-, RNA- und Proteinsequenzen und deren bestmögliche Überlagerung nach einer Bewertungsfunktion.
<i>simulated annealing</i>	Aufheizen, Produktion und anschließendes Abkühlen der Enzym-Substrat-Komplexe bei molekulardynamischen Simulationen, um im Zustand der niedrigsten Energie das globale Minimum zu besetzen.
<i>template</i>	DNA-Vorlage bei der Polymerase Kettenreaktion.
<i>united atoms</i>	Zusammenfassen der Atome und Massen von CH-CH <sub>2</sub> - bzw. CH <sub>3</sub> -Gruppen.
<i>wall</i>	Verhindert das tiefere Anlagern eines Substrats in die Bindungstasche der Lipase. Besteht bei RML aus dem <i>G-elbow loop</i> , bei PCL, CRL und CAL-B aus den Seitenketten einiger Aminosäuren der Bindungstasche.

# 1 EINLEITUNG

Aus chiralen Bausteinen, den *L*-Aminosäuren aufgebaut, stellen Enzyme hocheffiziente und hochselektive chirale Katalysatoren dar. Enzyme, wie z.B. Lipasen beschleunigen eine Menge von einfach bis hoch komplexen chemischen und biochemischen Umsetzungen oder schaffen erst die Möglichkeit dafür. Aus diesem Grund werden sie auch zur Enantiomerentrennung bei der enzymatischen kinetischen Racematspaltung eingesetzt. Dabei wird das Enantiomer schneller umgesetzt, welches aufgrund seiner Konfiguration bevorzugt an ein katalytisches Zentrum bindet. Es gibt eine Vielzahl von kommerziell erhältliche Enzymen und diese werden häufig in der präparativen organischen Chemie eingesetzt. Einige dieser Enzyme sind unter anderem hydrolysierende (wie Esterasen, Lipasen, Peptidasen) und reduzierende Enzyme (Dehydrogenasen).

## 1.1 Lipasen

Lipasen finden vor allem Anwendung in der chemischen und pharmazeutischen Industrie. Von besonderem Interesse ist dabei ihre hohe Enzymstabilität in organischen Lösungsmitteln in Verbindung mit ihrer häufig geringen Substratspezifität. Außerdem zeigen sie gegenüber einem breiten Substratspektrum hohe Stereo- und Regioselektivität und werden deshalb als Katalysatoren bei der Herstellung enantiomerenreiner Wirkstoffe (Bornscheuer und Kazlauskas 1999), synthetischer Intermediate (Thiem 1995; Wong 1995) und der Modifikation natürlicher Lipide (Nielsen 1985; Villeneuve 1997) eingesetzt.

### 1.1.1 Vorkommen, Nomenklatur und Systematik von Lipasen

Lipasen sind spezielle Enzyme, deren biologische Funktion im hydrolytischen, stufenweisen Abbau von Triacylglyceriden zu Di- und Monoacylglyceriden, freien Fettsäuren und Glycerin besteht. Bei Tieren und Pflanzen bilden Glyceride den Hauptbestandteil der Speicherfette und werden als Öle bezeichnet, wenn sie im flüssigen Aggregatzustand vorliegen oder als Fette, liegen sie fest vor (Haas und Joerger 1995). Für die Mobilisierung der Reserven im Fettgewebe der Menschen sind spezielle Triacylglycerid-Lipasen geschwindigkeitsbestimmend (Karlson *et al.* 1994). Lipasen, die zur Familie der Serin-Hydrolasen gehören

(Triacylglyceridhydrolasen EC 3.1.1.3. (Tipton 1994; Barrett 1995; Barrett 1996; Barrett 1997)), sind nicht an einen speziellen Zelltyp gebunden. Lipasen wurden unter anderem in der Milch, in Ölsaaten, Cerealien, in Obst und Gemüse und im Verdauungstrakt nachgewiesen (Belitz und Grosch 1992), kommen also in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen vor (Borgstrom und Brockman 1984; Alberghina *et al.* 1991; Boland *et al.* 1991; Faber 1997; Schmid und Verger 1998; Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Deshalb unterscheidet man auch zwischen mikrobiellen Lipasen, tierischen Lipasen und Pilzlipasen. Die Gruppe der bakteriellen Lipasen wird in die Untergruppen der *Pseudomonas*- (*Pseudomonas cepacia* Lipase PCL, *Pseudomonas fluorescens* Lipase PFL, *Chromobacterium viscosum* Lipase CVL) und der *Staphylococcus*-Familie (*Bacillus thermocatenulatus* Lipase 2 BTL2) unterteilt, die der Pilze in die *Rhizomucor*- (*Candida antarctica* Lipase B CAL-B, *Rhizomucor miehei* Lipase RML, *Rhizopus oryzae* Lipase ROL, *Penicillium camembertii* Lipase PcamL, *Humicola lanuginosa* HLL) und *Candida rugosa*- Familie (*Candida rugosa* Lipase CRL, *Geotrichum candidum* Lipase GCL). Proteine ähnlicher Sequenz weisen im Allgemeinen auch gleiche Faltung auf und besitzen oft ähnliche biochemische Eigenschaften. Daher erwies sich eine Klassifikation der Proteine auf der Basis ihrer Aminosäuresequenz als sinnvoller.

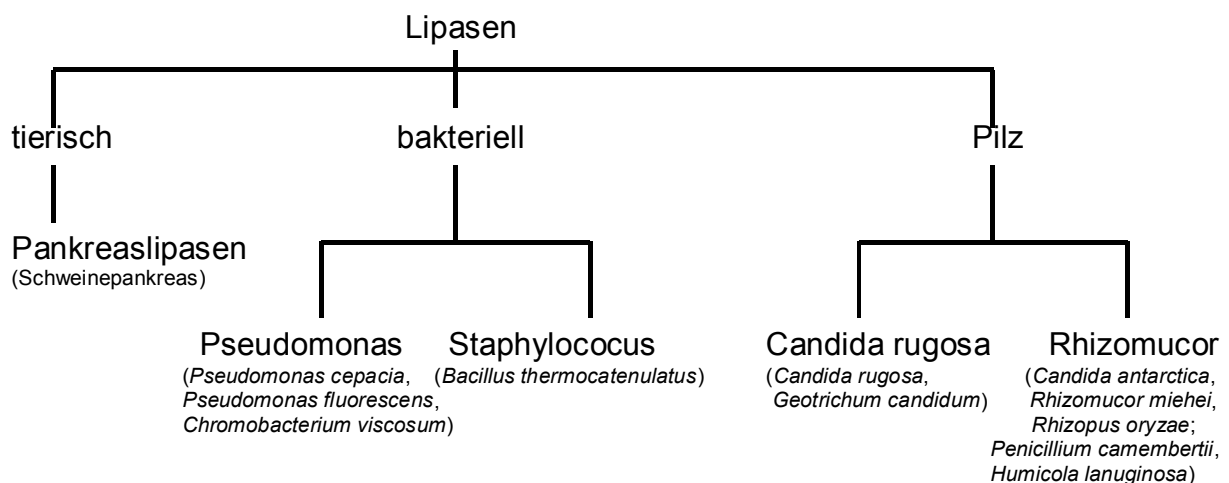


Abbildung 1: Schematische Übersicht der verschiedenen Lipasen.

Ihre Namensgebung erfolgt in Bezug auf den Mikroorganismus, der die Lipase produziert. Neben dem Organismus gehen bei tierischen Lipasen auch die Lipase-produzierende Organe in die Namensgebung mit ein. Zu Verwirrungen kommt es hin und wieder durch die Namensänderungen der Mikroorganismen, wenn im Laufe der Zeit genauere Informationen zur Klassifizierung der Mikroorganismen vorliegen. Anfang der 1990er Jahre wurde *Pseudomonas fluorescens*, reklassifiziert zu *Pseudomonas cepacia*. Diese Namensänderung wurde jedoch nicht allgemein akzeptiert und in letzter Zeit erfolgte eine erneute

Umklassifizierung und *Pseudomonas cepacia* Lipase (PCL) wurde zu *Burkholderia cepacia* Lipase (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). In dieser Arbeit wird der Begriff *Pseudomonas cepacia* Lipase verwendet, die noch weitgehend übliche alte Bezeichnung. Ebenfalls umklassifiziert wurde *Candida rugosa* Lipase, die in älteren Veröffentlichungen noch als *Candida cylindracea* Lipase bezeichnet wird. In dieser Arbeit wird der Name *Candida rugosa* Lipase verwendet.

### 1.1.2 Biochemische und biotechnologische Aspekte

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

Diesem Wunsch vor allem der Industrie folgend, immer effektivere, aktivere oder selektivere Katalysatoren für bestimmte Reaktionen auch in großer Menge zu erhalten oder bestimmte Reaktionen durch Verwendung von Biokatalysatoren überhaupt erst zu ermöglichen, werden seit einigen Jahren die biochemischen Eigenschaften bereits bekannter Wildtyp-Lipasen verändert. Zur Herstellung großer Mengen von Lipase wurden rekombinante DNA-Techniken verwendet. Da die zugänglichen Wildtyp-Lipasen aber oft die gewünschten Reaktions-Eigenschaften nicht besitzen, wurden und werden neue gesucht, auf bestimmte biochemische Merkmale getestet und isoliert. Die hier ebenfalls verwendeten rekombinanten DNA-Techniken erlaubten unter anderem auch die Identifizierung von Lipase-DNA und deren Transfer in einen heterologen Wirtsorganismus (wie zum Beispiel *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*), sowie die Beeinflussung der Genregulation. Diese Wirtsorganismen besitzen die notwendigen Eigenschaften für einen ungefährlichen und wirtschaftlichen Umgang und eine einfache gentechnische Veränderung.

Die dadurch resultierenden veränderten Enzyme zeigen unter anderem modifizierte Aktivität und Substratspezifität, erhöhte Thermostabilität, verbesserte Stabilität gegenüber alkalischen oder sauren Medien und chemischen Einflüssen, wie z.B. Oxidationsmitteln, oder dem Abbau durch Proteasen (Frenken *et al.* 1993; Bott *et al.* 1994). Zudem wurden, um die für die katalytische Aktivität essentiellen Aminosäuren zu identifizieren, gezielt Mutationen in die

Gene von Enzymen eingeführt; für PCL: Quyen *et al.* (Quyen *et al.* 1999). Prinzipiell stehen zwei unterschiedliche Ansätze zur Verfügung, um dieses Ziel zu erreichen: evolutive Methoden und rationales Proteindesign. Bei evolutiven Methoden werden oft mehrere Tausend Zufalls-Mutanten hergestellt und die erhaltenen Proteine auf ihre veränderten Eigenschaften getestet. Dabei werden anschließend nur die Mutanten sequenziert, die die gewünschte Eigenschaft aufweisen. Beim rationalen Design von Mutanten hingegen werden gezielt nur einzelne Mutanten hergestellt, die die gewünschten Eigenschaften besitzen. Diese Mutanten werden vorher an einem Modellsystem am Computer, *in silico*, getestet. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Mutanten wurden alle durch rationales Design generiert.

### 1.1.3 *Pseudomonas cepacia* Lipase, PCL

In der Biotechnologie spielen Lipasen aus *Pseudomonas* eine wichtige Rolle, da sie eine große Vielseitigkeit in bezug auf Substratspektrum, Reaktionsbedingungen und Enantioselektivität besitzen. Zahlreiche mikrobiellen Lipasen wurden sowohl biochemisch als auch molekulargenetisch charakterisiert, wobei die *Pseudomonas* Lipasen zu den mit am besten untersuchten gehören. Dabei zeigte sich, dass viele *Pseudomonas* Lipasen ein zusätzliches Protein benötigen, ein sogenanntes Helferprotein (auch als Chaperone oder Refoldase bezeichnet), um zu einer korrekten Faltung in ihre aktiven Konformation zu gelangen. Dieses zweite Protein ist auf der DNA in 3'-Richtung kodiert. Gilbert unterteilte 1993 die *Pseudomonas* Lipasen, die sequentielle Verwandtschaft zugrunde legend, in Gruppe I und II, welche ein Helferprotein benötigen, und III, welche kein Helferprotein benötigen (Tabelle 1). Die Unterteilung der *Pseudomonas* Lipasen erfolgte aufgrund der Sequenzhomologie der Helferproteine der unterschiedlichen *Pseudomonas*-Stämmen (Tabelle 1). Die in dieser Arbeit experimentell untersuchte *Pseudomonas cepacia* Lipase ATCC 21808 benötigt ein Helferprotein und gehört zu den Lipasen der Gruppe II. Diese Lipasen besitzen ein Molekulargewicht von ca. 33 kDa und weisen ein breites Substratspektrum auf.

PCL ATCC 21808 ist aus 320 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von 33 kDa. Bei der kommerziell erhältlichen PCL (Amano P oder Amano PS) handelt es sich wahrscheinlich nicht um ein rekombinantes Enzym. Viele *Pseudomonas*-Stämme erfordern aufgrund ihrer Pathogenität besondere Sicherheitsvorkehrungen bei ihrer Kultivierung. Um dieses Problem zu umgehen und die Ausbeuten bei der Lipaseproduktion zu erhöhen, wurde PCL ATCC 21808 sowohl in den rekombinanten Wirtsorganismen *Bacillus subtilis* (Hom und

Mielenz 1991), *E. coli* (Quyen *et al.* 1999), *Pseudomonas* (Hom *et al.* 1991) und *Staphylococcus lividans* (Nakanishi *et al.* 1989; Jorgensen *et al.* 1991; Nakanishi *et al.* 1991) exprimiert. Da PCL zu den *Pseudomonas* Lipasen der Gruppe II gehört, wird die Expression durch das benötigte Helferprotein limitiert. Deshalb muss eine Umfaltung von inaktiven Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) in aktive Lipase erfolgen. Quyen und Mitarbeiter (Quyen *et al.* 1999) entwickelten eine Methode, die es erstmals ermöglichte, *Pseudomonas cepacia* Lipase in großen Mengen herzustellen.

PCL ist die einzige mikrobielle Lipase, die ausreichend hohe Enantioselektivität gegenüber einem breiten Spektrum an verschiedenen primären Alkoholen und außerdem noch gegenüber Carbonsäuren besitzt.

Tabelle 1: Klassifizierung der *Pseudomonas* Lipasen nach Gilbert (Gilbert 1993). Die in dieser Arbeit untersuchte Lipase stammt aus *Pseudomonas cepacia* ATCC 21808, einer Lipase der Gruppe II.

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

#### 1.1.4 *Candida rugosa* Lipase, CRL

Die Kristallstruktur der aus 524 Aminosäuren bestehenden CRL ist schon seit langem bekannt (Grochulski *et al.* 1993; Grochulski *et al.* 1994). Die den Pilzlipasen zugehörige CRL wurde



am intensivsten untersuchten und besitzt fünf Isoenzyme, die alle ähnliche Molekulargewichte aufweisen und kloniert werden konnten (Lotti *et al.* 1993). Lange Zeit war es aufgrund eines unüblichen Codons für das Serin des aktiven Zentrums nicht möglich, CRL rekombinant herzustellen. Doch gelang Brocca und Mitarbeitern die Synthese des Gens der CRL (Brocca *et al.* 1998).

Die CRL besitzt ein selbst für Lipasen breites Substratspektrum und die Fähigkeit zur Umsetzung ungewöhnlicher Substrate (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Außerdem besitzt CRL generell hohe Enantioselektivität gegenüber chiralen Carbonsäuren. Allerdings setzt sie nur sehr große und sperrige primäre Alkohole mit hoher Enantioselektivität um.

### 1.1.5 Andere Lipasen

Andere gut untersuchte und häufig für biochemische Untersuchungen eingesetzte Lipasen sind die mikrobiellen Lipasen aus *Candida antarctica* Lipase B (CAL-B), *Rhizomucor miehei* (RML) und die tierische Schweinepankreas Lipase (PPL: porcine pancreatic lipase). Von diesen Lipasen ist die Kristallstruktur bekannt, und es gibt zahlreiche veröffentlichte Daten über ihre chemischen und biochemischen Eigenschaften. Neben der PCL ist die PPL die einzige Lipase, die ein breites Spektrum an primären Alkoholen enantioselektiv umsetzt. Die anderen Lipasen zeigen nur geringe Enantioselektivität gegenüber primären Alkoholen.

### 1.1.6 Eigenschaften und Verwendung von Lipasen

#### *Eigenschaften von Lipasen*

Besonders interessant für biochemische Anwendungen sind Lipasen, da sie neben ihrer biologischen Funktion, der Hydrolyse von Triacylglyceriden, eine Vielzahl anderer natürlicher und unnatürlicher Substrate oft mit hoher Enantio- oder Regioselektivität umsetzen. Sie katalysieren die Hydrolyse von wasserlöslichen Estern und andere Biotransformationen wie die Alkoholyse, die Veresterung primärer, sekundärer und tertiärer Alkohole sowie Umesterungsreaktionen (Abbildung 2) (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Darüber hinaus setzen Lipasen auch alkoholanalogue Substrate wie Amine, Thiole und Hydroperoxide um.

Lipasen liegen im wässrigen Medium normalerweise in einer wenig aktiven Form vor (Ransac *et al.* 1996; Verger 1997). Ihre Aktivität erhöht sich um ein Vielfaches durch den Kontakt mit einem Fetttropfen oder einer Micelle bzw. wenn sie in ein organisches Lösungsmittel exponiert werden. Dabei wird die Lipase nahe am Substrat platziert und das Enzym erfährt eine Konformationsänderung. Dadurch wird das aktive Zentrum für das Substrat erst zugänglich und die Bildung des sogenannten *oxyanion holes* erfolgt, eines essentiellen Strukturelements für die Umsetzung von Substraten durch Lipasen (siehe 1.1.7). Diese Aktivität an einer Wasser-Lipid Grenzschicht bezeichnet man folglich als Grenzflächen-Aktivierung (engl. *interfacial activation*; Ransac *et al.* 1996; Verger 1997) und ermöglicht auch den Einsatz von Lipasen als Biokatalysatoren für die organische Synthese in unpolaren Medien (Bornscheuer und Kazlauskas 1999).

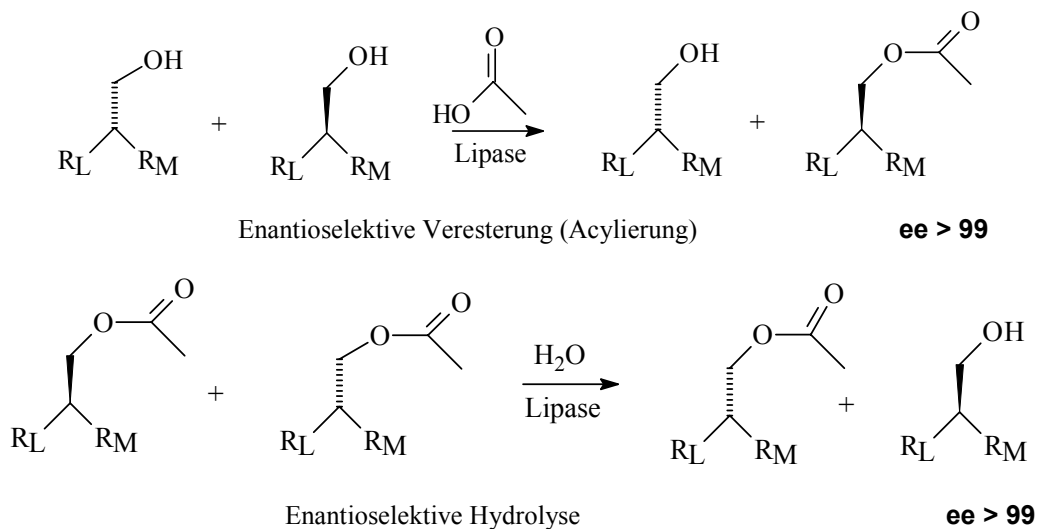


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lipase-katalysierten Veresterung (oben) bzw. Hydrolyse (unten) mit hoher Enantioselectivität am Beispiel eines primären Alkohols.

### *Verwendung von Lipasen in der Lebensmittel- und Waschmittelindustrie*

Die Produktion und Verwendung von Lipasen im großtechnischen Maßstab ist häufig ökonomisch nicht konkurrenzfähig zu entsprechenden chemischen Verfahren und Prozessen (Schmid und Verger 1998; Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Daher ist der Anteil von Lipasen am Weltmarkt in absoluten Zahlen eher gering (US\$ 70 Mio. (Sheldon 1996)). Dennoch wird damit, nach Proteasen und Carbohydrasen, weltweit der drittgrößte Umsatz auf dem Enzymmarkt erzielt (weltweiter Markt für industrielle Enzyme 1999: US\$ 1,6 Mrd. (Novozymes 2000)).

Durch die Vielzahl der von ihnen katalysierten Reaktionen werden Lipasen auch in der Lebensmittelindustrie und -produktion eingesetzt. Dabei beschränkt sich ihr Einsatz nicht nur

auf die reine Herstellung, sondern Lipasen werden auch zur Weiterverarbeitung und Veredelung eingesetzt. Mikrobiologisch erzeugte Lipasen (z. B. *Candida lipolytica*) werden zur Verstärkung des Aromas in der Käseherstellung eingesetzt (Berlitz und Grosch 1992). In der modernen Käseherstellung werden spezielle Lipasen verwendet, die besonders aktiv sind, besondere Geschmacksstoffe liefern oder aus Organismen stammen, die gegen Krankheiten resistent sind, wie z.B. die Lipasen aus *Aspergillus niger* und *Rhizomucor miehei* (Berry und Paterson 1990; Cheetham 1993; Vulfson 1994; Haas und Joerger 1995).

Eine geringe Hydrolyse des Milchfettes ist aber auch für Milkschokolade von Interesse und hebt im Geschmack den „Milchcharakter“, wozu auch Lipasen eingesetzt werden. Vermutlich durch die entstehenden Mono- und Diacylglyceride werden bei Backwaren durch den Einsatz von Lipasen Alterungsvorgänge verzögert. Die Entfettung von Knochen für die Gelatineherstellung, die unter milden Bedingungen erfolgen muss, wird auch durch Lipasen erleichtert (Berlitz und Grosch 1992). Allerdings können sich Lipasen auch negativ auf Lebensmittel auswirken. Wie das Beispiel aus *Pseudomonas fluoreszens* zeigt, überstehen hitzestabile Lipasen die Pasteurisation, die Ultraheißerhitzung und auch Trockenverfahren, wie zum Beispiel bei der Herstellung von Trockenmilch. Durch ihre somit noch vorhandene Aktivität können sie einen Qualitätsabfall bei der Lagerung solcher Produkte verursachen.

Der Großteil der Lipasen wird aufgrund ihrer fettlösenden Eigenschaft als Waschmittelzusatzstoff eingesetzt. Zu diesem Zweck müssen sie eine hohe Temperatur- und pH-Stabilität besitzen und sind ausschließlich mikrobiellen Ursprungs. Hier zeigt sich noch eine weitere, in diesem Falle äußerst nützliche Eigenschaft von Lipasen. Nach der Reinigung verbleiben sie auf den Fetttröpfchen an den Textilien, bauen weiterhin die Fette ab und die Abbauprodukte werden beim nächsten Waschen entfernt. Das Verbleiben der Lipasen auf den Textilien reduziert auch eine erneute Anlagerung von Fetten. Die Entwicklung neuer Lipasen, die gewünschte Eigenschaften zeigen, ist in diesem Bereich noch lange nicht abgeschlossen, da vom Verbraucher und somit auch der Industrie im Laufe der Zeit immer effektivere Waschmittel und dadurch Waschmittelinhaltsstoffe gefordert werden. So wurde zum Beispiel mit LipoPrime<sup>TM</sup> von Novo Nordisk 1998 eine neue, durch *protein engineering* erhaltene Lipase eingeführt, die im Gegensatz zu anderen Lipasen schon beim ersten Waschgang ausreichend fettlösende Eigenschaften besitzt (Novo-Nordisk 1998).

### *Verwendung von Lipasen in der organischen Synthese und in der Pharmaindustrie*

Der Einsatz von Lipase ermöglicht durch ihre selektive Umsetzung vieler Substrate die Herstellung bestimmter enantiomerenreiner oder pharmazeutisch relevanter Stoffe. Diese Stoffe können selbst schon ein Wirkstoff sein oder die Zwischenstufen eines solchen, die durch Weiterverarbeitung oder während ihres Wegs durch den menschlichen Körper ihre Funktion erhalten. Die Forschung und Entwicklung auf diesem Gebiet brachte mit Hilfe von Lipasen schon Wirkstoffe gegen Krebs, AIDS, Asthma, Pilzkrankungen u.a. hervor (Bornscheuer und Kazlauskas 1999).

#### 1.1.7 Struktur, Aufbau und Reaktionsmechanismus von Lipasen

##### *Der $\alpha/\beta$ -Hydrolase fold*

Alle Lipasen besitzen dasselbe charakteristische Faltungsmuster (englisch *fold*), den sogenannten  $\alpha/\beta$ -Hydrolase *fold*, obgleich ihrer Proteinsequenzen nicht so stark konserviert sind (Ollis *et al.* 1992). Unabhängig davon aus wie vielen Aminosäuren eine Lipase oder Esterase aufgebaut ist, zeigen alle bisher aufgeklärten Raumstrukturen dieses selbe Bau- und Faltungsprinzip. Der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase *fold* besteht aus acht antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern, die den Kern bilden und durch  $\alpha$ -Helices verbunden sind (Abbildung 3).

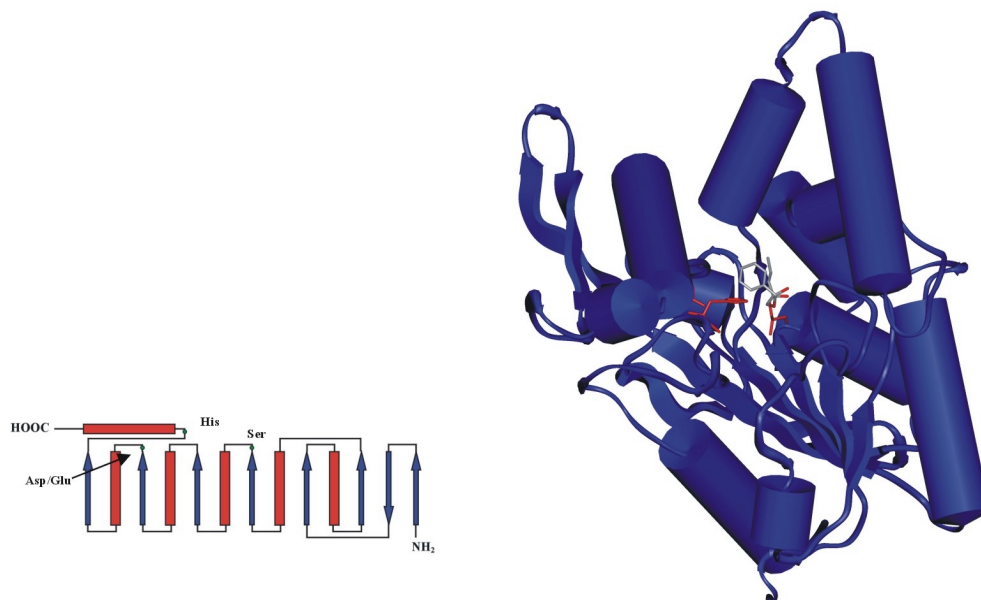


Abbildung 3: **Links:** Schematische Darstellung des  $\alpha/\beta$ -Hydrolase *fold* (rot:  $\alpha$ -Helices; blau  $\beta$ -Faltblätter). Die topologischen Positionen der katalytischen Aminosäuren sind durch grüne Punkte gekennzeichnet.

**Rechts:** PCL in offener Konformation mit gebundenem Substrat 1-Phenyl-1,2-ethandiol (Enzym-Substrat-Komplex in der ersten tetraedrischen Zwischenstufe). Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot hervorgehoben. Die Sekundärstrukturzuordnung erfolgte nach Kabsch-Sander (Kabsch und Sander 1983). Das Faltungsmuster des  $\alpha/\beta$ -Hydrolase *fold*s ist deutlich zu erkennen: acht antiparallele  $\beta$ -Stränge, die den Kern des Enzyms bilden, sind von  $\alpha$ -Helices umgeben (Ollis *et al.* 1992).

### *Grenzflächenaktivierung und lid*

Wasserlösliche Lipasen liegen in wässrigem Medium in einer inaktiven Form vor und werden durch Kontakt an einer Lipid-Wasser Grenzschicht aktiviert. Bei dieser sogenannten Grenzflächenaktivierung (Sarda und Desnuelle 1958) kommt es zur Konformationsänderung des *lid* oder *flap*. Dabei handelt es in der Regel um eine kurze starre amphiphile  $\alpha$ -Helix, wie z.B. in der RML (Brzozowski *et al.* 1991; Derewenda *et al.* 1992), wobei in der geschlossenen Konformation der unpolare Teil ins Innere der Lipase und der polare Teil der Helix zum Lösungsmittel orientiert ist (Schrag *et al.* 1991). In wässrigem Medium ist das katalytische Zentrum der Lipase dadurch für Substrate unzugänglich (Brzozowski *et al.* 1991; Derewenda *et al.* 1992; van Tilbeurgh *et al.* 1993; Grochulski *et al.* 1994). Durch die Adsorption an eine hydrophobe Grenzfläche öffnet sich das *lid* und das katalytische Zentrum in der Bindungstasche wird zugänglich (Brady *et al.* 1990; Winkler *et al.* 1990; Schrag *et al.* 1991). In Abbildung 4 sind zur Veranschaulichung des *lids* die Überlagerung der offenen Form von PCL und die geschlossene Form der *Pseudomonas glumae* Lipase (PGL) dargestellt. Beide Lipasen sind sehr ähnlich. Während es von der PCL nur die Kristallstruktur der offenen Form gibt, ist von PGL nur die der geschlossenen Form bestimmt worden (Cleasby *et al.* 1992; Schrag *et al.* 1997).

PCL:  
*lid* offen

PGL:  
*lid* geschlossen

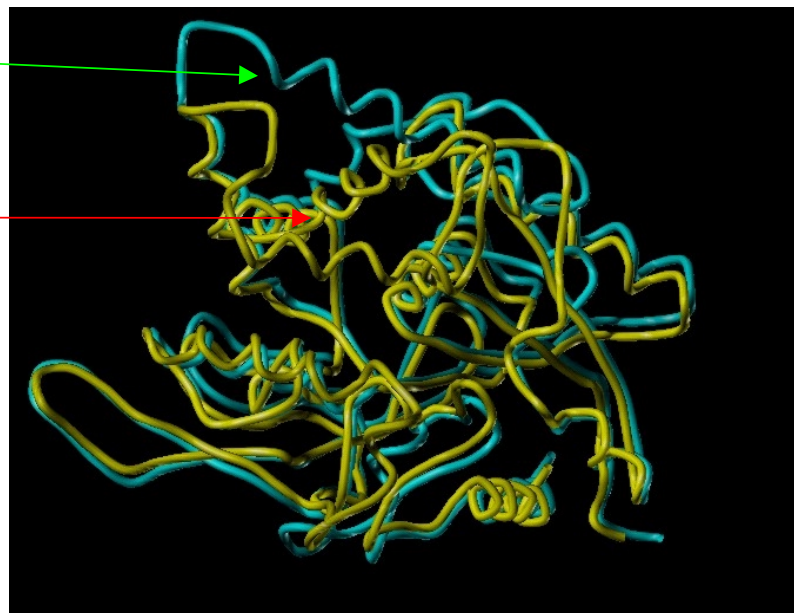


Abbildung 4: Geschlossene Form (gelb) der *Pseudomonas glumae* Lipase (Cleasby *et al.* 1992) und offene Form (cyan) der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (Schrag *et al.* 1997). Durch die Überlagerung der beiden Strukturen ist die unterschiedliche Orientierung des *lids* in der geschlossenen und offenen Konformation der Lipase gut zu erkennen.

Obwohl sie gleichfalls ein *lid* besitzen, weisen CAL-B, CVL und *Pseudomonas aeruginosa* Lipase (PAL) keine und die Lipase aus *Staphylococcus hyicus* nur für bestimmte Substrate Grenzflächenaktivierung auf (Ransac *et al.* 1996; Verger 1997).

Bedingt durch diese Konformationsänderung, nimmt die hydrophobe Oberfläche um das aktive Zentrum zu (für RML z.B. von 10560 Å<sup>2</sup> in der geschlossenen auf 11816 Å<sup>2</sup> (Vasel *et al.* 1993)), wodurch die Anlagerung und Bindung hydrophober Substrate erleichtert wird.

In Abbildung 5 ist die PCL in offener Konformation dargestellt, wobei die Aminosäuren entsprechend ihrer Hydrophobizität eingefärbt sind. Dabei wird deutlich, dass in unmittelbarer Umgebung der Fettsäureketten (zur besseren Orientierung wurde ein Ester eines primären Alkohols in die Bindungstasche der PCL gebunden) überwiegend hydrophobe Aminosäuren vorkommen.

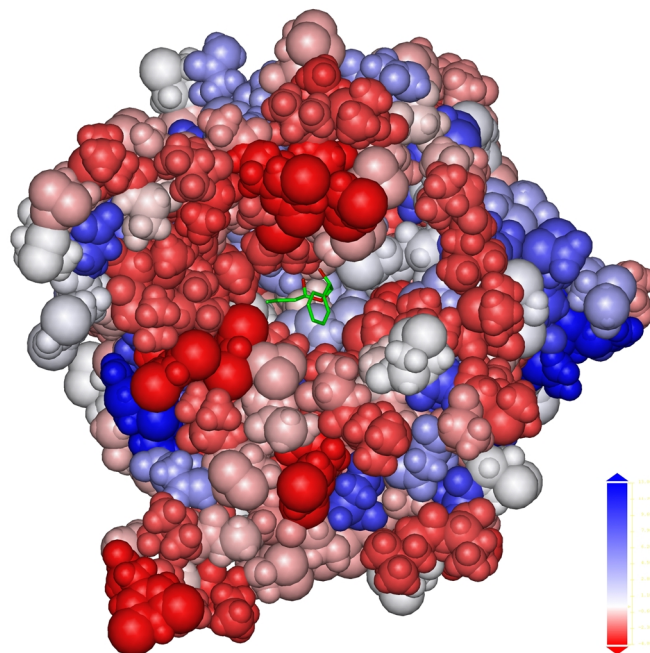


Abbildung 5: PCL in offener Form. Die Aminosäuren wurden nach Hydrophobizität eingefärbt und zur besseren Orientierung wurde ein primärer Alkohol als Substrat (grün) in die Bindungstasche gebunden. Rote Färbung weist auf hydrophobe, blaue Färbung auf hydrophile Aminosäuren hin. Die Substratbindungstasche besteht überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren.

Untersuchungen an Esterasen wie Acetylcholinesterase und *Fusarium solani pisi* Cutinase (FSC) stützen die Theorie der Grenzflächenaktivierung, da sie kein vergleichbares Strukturelement wie das *lid* besitzen und der Michaelis-Menten Kinetik gehorchen (Martinez *et al.* 1992; Derewenda und Sharp 1993; Martinez *et al.* 1994).

Es gibt zwei Theorien, wie der Aktivierungsmechanismus der Lipasen an einer Grenzschicht ablaufen könnte: (1) während man in neueren Publikationen von einer über mehrere Stufen ablaufende Öffnung des *lids* ausgeht (Derewenda *et al.* 1994; Peters *et al.* 1996; Peters *et al.* 1997), (2) gingen andere zuvor durch Röntgenstrukturanalysen von einem Zwei-Schritt-Mechanismus aus, der entweder nur die offene oder die geschlossene Form erlaubt (Holmquist *et al.* 1993; Holmquist *et al.* 1993; Martinelle *et al.* 1996).

#### *Der Reaktionsmechanismus, oxyanion hole und die katalytische Triade von Lipasen*

Wichtig für die über verschiedene Zwischenstufen verlaufende von Lipasen katalysierte Esterspaltung sind die katalytische Triade und das *oxyanion hole*. Die katalytische Triade ist ein in allen Lipasen hoch konserviertes Strukturelement, welches aus drei Aminosäuren besteht. Sequentiell liegen diese Aminosäuren weit auseinander. Die Aminosäuren, welche die katalytische Triade bilden sind in der Regel Serin, Histidin und Aspartat bzw. Glutamat (Schrag *et al.* 1991; Cygler *et al.* 1993; Grochulski *et al.* 1993; Grochulski *et al.* 1994; Ollis *et al.* 1992; Monecke *et al.* 1998; Beer *et al.* 1996; Rogalska *et al.* 1993). Außerdem ist das Pentapeptid mit der Sequenz GX**S**XG um das aktive **S**erin hoch konserviert (Cygler *et al.* 1994). Dieses aktive Zentrum wird bei der PCL aus den Aminosäuren S87, D264 und H286 gebildet. In direkter Nachbarschaft zum katalytischen Serin befindet sich eine Aminosäure des *oxyanion holes*. Hierbei handelt es sich um ein Strukturmotiv, welches durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken die negative Ladung am Carboxylsauerstoff im ersten tetraedrischen Intermediat stabilisiert. Bei der PCL besteht dieses Strukturmotiv aus den *backbone* Amidgruppen der Aminosäuren L17 und Q88. Das erste Intermediat entsteht bei der Lipase-katalysierten Esterspaltung nach dem nukleophilen Angriff des aktiven Serins und dem folgenden zweiten Reaktionsschritt. In diesem entsteht ein Acyl-Enzym-Komplex durch Abspaltung des Alkoholrestes. Das wird durch die Aufnahme des Protons des aktiven Serins durch das katalytische Histidin ermöglicht. Die Bildung dieses ersten tetraedrischen Intermediats stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Lipase-katalysierten Esterhydrolyse dar (Bees *et al.* 1996). Aus diesem Grund wurde auch die erste tetraedrische Zwischenstufe für die *molecular modeling* Untersuchungen zur Enantioselektivität in dieser Arbeit genutzt. Im folgenden Reaktionsschritt entsteht das zweite tetraedrische Intermediat durch die Bindung eines Wassermoleküls an den Acyl-Enzym-Komplex. Als letzter Reaktionsschritt in diesem Katalyseprozess trennen sich Enzym und Produkt. Dieser gesamte Katalysemechanismus wurde mit Hilfe von *molecular modeling* Untersuchungen an CRL im Gesamten bestätigt (Monecke *et al.* 1998)

## 1.2 Enantioselektivität von Lipasen

Untersuchungen zur enantioselektiven Hydrolyse und Veresterung von chiralen und prochiralen primären Alkoholen wurden u.a. von Laumen, Carrea *et al.*, Xie *et al.* und Naemura *et al.* durchgeführt (Carrea *et al.* 1993; Laumen 1987; Naemura *et al.* 1996, Rogalska *et al.* 1993; Stadler *et al.* 1995; Xie *et al.* 1990) und für Carbonsäuren von Chenevert *et al.*, Sariaslani *et al.*, Zemlicka *et al.*, Zoete *et al.*, Ahmed *et al.* und Kim *et al.* (Sariaslani *et al.*; Zemlicka *et al.* 1988; Chenevert und Martin 1992; Kim *et al.* 1994; Zoete *et al.* 1994; Ahmed 1995).

Für die enantioselektiven Biotransformation ist die Enantiopräferenz von Lipasen entscheidend. Diese gibt an, welche der beiden umgesetzten Antipoden bevorzugt umgesetzt wird. Zwei Enantiomere unterscheiden sich in ihrer räumlichen Anordnung wie Bild und Spiegelbild (siehe Abbildung 6).

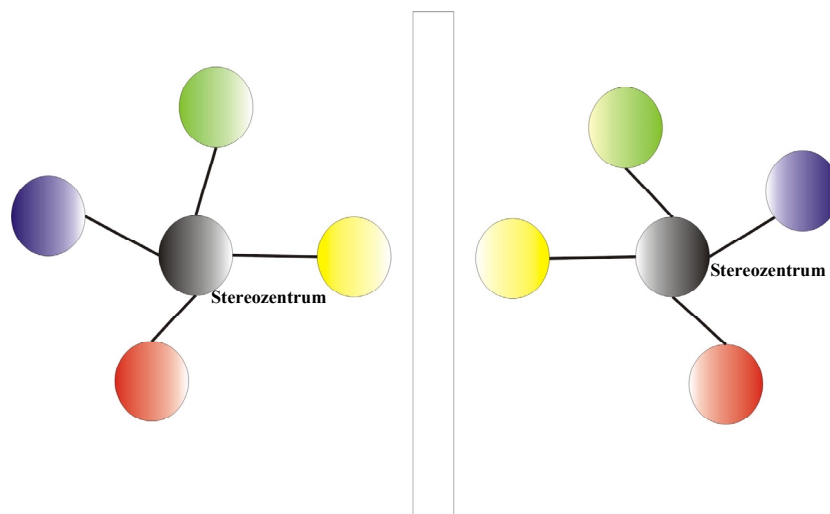


Abbildung 6: Schematische Darstellung zweier Enantiomere. Die beiden Moleküle unterscheiden sich nur in ihrer räumlichen Anordnung und verhalten sich wie Bild und Spiegelbild. Die graue Kugel stellt in diesem Fall das Stereozentrum (oder chirales Zentrum) dar.

Der E-Wert, das Maß der Enantioselektivität gibt an, um wie viel schneller das bevorzugte Enantiomer umgesetzt wird. Neben den äußeren Einflüssen auf die Enantioselektivität von Lipasen, wie Reaktionstemperatur und Polarität des Lösungsmittels, spielen auch die Form und Größe der Lipasebindungsstelle und der Substrate eine entscheidende Rolle. Aus diesen Gründen setzten Lipasen ein breites Spektrum an Substraten mit unterschiedlicher Enantioselektivität um (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). So setzt die selbe Lipase



verschiedene primäre Alkohole mit experimentell bestimmten E-Werten zwischen 1 und >100 um.

Experimentell lässt sich die Enantioselektivität E durch eine der drei unten stehenden Gleichungen berechnen, wenn zwei der drei Variablen, Enantiomerenüberschuss des Produkts,  $ee_p$ , Enantiomerenüberschuss des Substrats,  $ee_s$ , und Umsatz,  $c$ , bestimmt wurden (Chen *et al.* 1982; Chen *et al.* 1987):

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

Der Umsatz errechnet sich wie folgt:

$$c [\%] = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} * 100$$

### 1.3 Substrate

Neben ihren natürlichen Substraten, den Triacylglyceriden, sind Lipasen in der Lage, weitere Biotransformationen zu katalysieren. Darunter fallen nicht nur die Hydrolyse von Estern und die Veresterung von Carbonsäuren, primären und sekundären Alkoholen, sondern auch von tertiären Alkoholen, Lactonen, Thiolen, sowie Aminen (Bornscheuer und Kazlauskas 1999).

#### 1.3.1 Sekundäre Alkohole

Trotz des breiten Substratspektrums von Lipasen gehört die enantioselektive Umsetzung von sekundären Alkoholsubstraten durch Lipasen zu den am besten untersuchten und verstandenen Reaktionen. Die in diesem Zusammenhang am intensivsten untersuchten Lipasen sind CAL-B, CRL, PPL, PCL und RML. Eine allgemeingültige empirische Regel, mit der es möglich ist, das bevorzugt umgesetzte Enantiomer eines sekundären

Alkoholsubstrats bei der Hydrolyse, respektive Veresterung, vorherzusagen, wurde von Kazlauskas *et al.* etabliert (Kazlauskas *et al.* 1991) (Abbildung 8, links). An einem Stereozentrum befinden sich neben der funktionellen Gruppe noch drei weitere Substituenten. Der kleinste Substituenten ist meist ein H-Atom. Die beiden andere Substituenten unterscheidet man nach ihrer Kettenlänge in den mittleren (**M**) und den großen Substituenten (**L**) (z.B. ist eine CH<sub>3</sub>-Gruppe am Stereozentrum der mittlere Substituent **M** und ein Phenylring der groß Substituent **L**). Die Enantiopräferenz kann hierbei allein durch den Größenvergleich der beiden Substituenten am Stereozentrum vorhergesagt werden. Durch die experimentellen Ergebnisse mit weiterer Lipase-katalysierter Biotransformationen von sekundären Alkoholsubstraten wurde diese Regel bestätigt (Orrenius *et al.* 1995; Kazlauskas *et al.* 1991; Kim und Cho 1992; Laumen 1987; Xie *et al.* 1990; Kazlauskas *et al.* 1991; Burgess und Jennings 1991; Naemura *et al.* 1993; Naemura *et al.* 1995; Janssen *et al.* 1991; Lutz *et al.* 1992; Roberts 1989; Naemura *et al.* 1996). In der Tat ist es einer Reihe von Wissenschaftlern gelungen, die Enantioselektivität durch gezielte Variation der Größe der Substituenten zu modifizieren (Kazlauskas *et al.* 1991; Gupta und Kazlauskas 1993; Rotticci *et al.* 1997).

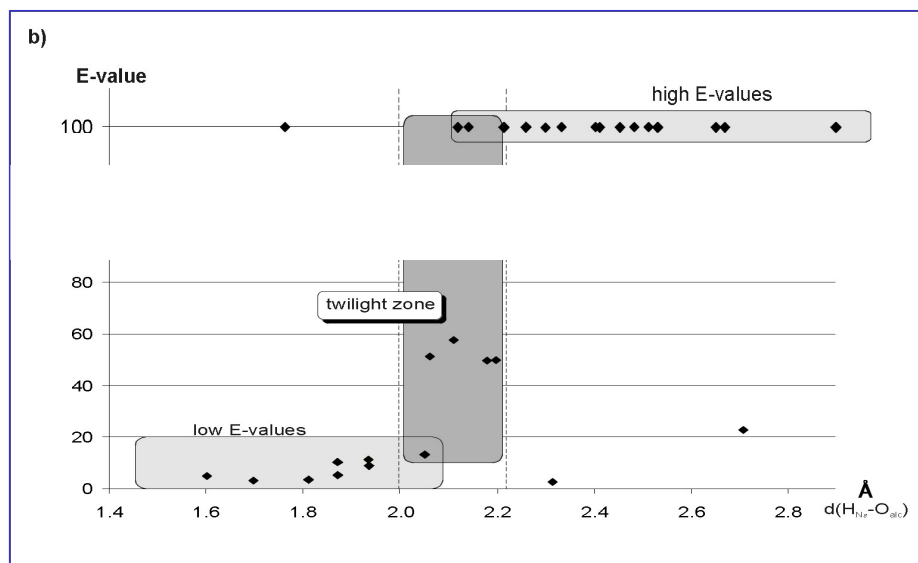


Abbildung 7: Korrelation des Abstandes zwischen dem katalytischen H286 und dem Alkohol-Sauerstoff im Modell mit experimentell bestimmtem E-Wert (Schulz *et al.* 2000).

Aufgrund der Analyse von Energieunterschieden während der MD-Simulation von Enzymkomplexen mit beiden Enantiomeren gelang es, die Enantiopräferenz von CRL und PCL gegenüber sekundären Alkoholen vorherzusagen (Zuegg *et al.* 1997; Raza *et al.* 2001). Eine Vorhersage oder Quantifizierung der Enantioselektivität war allerdings nicht möglich. Kürzlich wurde ein Computermodell zur Beschreibung, Vorhersage und Quantifizierung der

Enantioselektivität von PCL gegenüber sekundären Alkoholen etabliert (Schulz *et al.* 2000). Durch Untersuchungen mittels molekulardynamischer Simulationen konnte gezeigt werden, dass dabei Abstand zwischen dem katalytischen H286 und dem Alkoholsauerstoff des nicht bevorzugten Enantiomers mit dem experimentell bestimmten E-Wert korreliert (Abbildung 7).

### 1.3.2 Primäre Alkohole

Nur wenige Lipasen setzen primäre Alkohole enantioselektiv um. Im Allgemeinen zeigen Lipasen bei der Umsetzung von primären Alkoholen auch geringere Enantioselektivität als gegenüber sekundären Alkoholen. *Pseudomonas cepacia* Lipase ist die einzige mikrobielle Lipase, die relevante Enantioselektivität gegenüber einem breiten Spektrum an verschiedenen primären Alkoholen zeigt. Ihre Enantioselektivität war bis heute nicht verstanden und in hohem Maße empirisch. Untersuchungen zu den molekularen Ursachen der Enantioselektivität von PCL bei der Umsetzung primärer Alkohole waren maßgeblicher Bestandteil dieser Arbeit.

Weissfloch und Kazlauskas postulierten eine Regel, die, analog zur Regel für sekundäre Alkohole, beruhend auf der Größe der Substituenten am Stereozentrum die Enantioselektivität von PCL für primäre Alkoholsubstrate beschreibt (Weissfloch und Kazlauskas 1995). **M** und **L** binden in diesem Fall in identische Bindungstaschenbereiche wie bei der Umsetzung von sekundären Alkoholsubstraten (Abbildung 8, Mitte). Die Hydroxylgruppe des sekundären Alkoholderivats zeigt allerdings in die entgegengesetzte Richtung der Hydroxymethylgruppe des primären Alkohols und somit unterscheidet sich die Enantiopräferenz für sekundäre von der für primäre Alkoholsubstrate (Abbildung 8). Die Autoren führten dies, soll eine katalytisch aktive Bindung erreicht werden, auf einen Knick zurück, dem sich die Methylengruppe bei der Bindung des primären Alkoholsubstrats an die Lipase unterwerfen muss. Ein zweiter von den Autoren postulierter Bindungsmodus hat den Vorteil, dass der Knick in Modus 1 vermieden wird. Hierbei binden **M** und **L** in die Bindungstasche für den großen Substituenten (BTL), während die Bindungstasche für den Substituenten mittlerer Größe (BTM) von einem Wasserstoff der Methylengruppe besetzt wird. Dieser Modus wurde jedoch als nicht wahrscheinlich interpretiert und *molecular modeling* Studien postulierten, dass die Alkoholsubstituenten in primären und sekundären Alkoholsubstraten nicht in denselben Bindungstaschenbereich bänden (Tuomi und Kazlauskas 1999).

Eine Ausnahme bildeten Substrate, die ein Sauerstoffatom in direkter Nachbarschaft zum Stereozentrum besitzen. Für alle anderen untersuchten primären Alkohole beschreibt die empirische Regel die Enantiopräferenz der PCL für 89 % (in 54 von 61 Fällen) der Substrate. Allerdings scheiterten Versuche, die bestehenden Regeln für sekundäre Alkohole auf primäre Alkohole auszuweiten. Eine gezielte Modifikation der Kettenlänge der Substituenten führte, anders als bei sekundären Alkoholen, nur teilweise zur Erhöhung der Enantioselektivität. In anderen Fällen führte es aber auch zu deren Abnahme bzw. unveränderten Enantioselektivität (Carrea 1993, Xie *et al.* 1993; Naemura *et al.* 1993; Naemura *et al.* 1996). *Molecular modeling* Untersuchungen und deren Analyse von Energieunterschieden der beiden Enantiomere eines Substrates während der MD-Simulation, konnten die Enantiopräferenz und Enantioselektivität nicht beschreiben und vorhersagen (Zuegg *et al.* 1997). Tuomi und Mitarbeitern gelang es, die Enantioselektivität von kommerzieller PCL gegenüber zwei primären Alkoholen durch chemische Modifikation der Lipase zu erhöhen (Tuomi und Kazlauskas 1999). Gezielte Erhöhung der Enantioselektivität durch Mutanten der PCL wurden bislang nicht veröffentlicht.

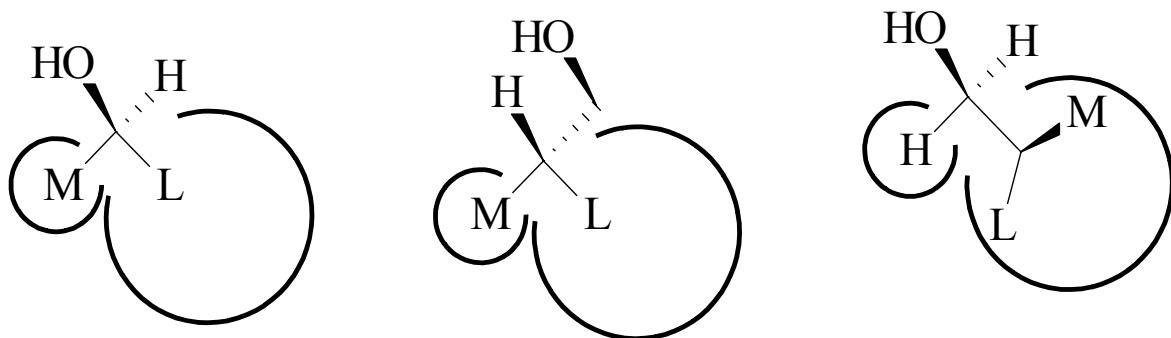


Abbildung 8: Veranschaulichung der empirischen Regeln zur Vorhersage der Enantiopräferenz von PCL gegenüber sekundären (links) und primären (Mitte und rechts) Alkoholen. **Links:** Enantiomer des bevorzugt umgesetzten sekundären Alkoholsubstrats in dem von Kazlauskas *et al.* postulierten Bindungsmodus (nach Kazlauskas *et al.* (Kazlauskas *et al.* 1991)). **Mitte:** Enantiomer des bevorzugt umgesetzten primären Alkoholsubstrats in dem von Weissfloch und Kazlauskas sowie von Tuomi und Mitarbeitern postulierten Bindungsmodus (Hypothese 1) (Weissfloch und Kazlauskas 1995; Tuomi und Kazlauskas 1999). **Rechts:** Enantiomer des bevorzugt umgesetzten primären Alkoholsubstrats in alternativem Bindungsmodus (Hypothese 2) (Weissfloch und Kazlauskas 1995). Die Regel für primäre Alkoholsubstrate besitzt keine Gültigkeit, wenn ein Sauerstoffatom direkt benachbart zum Stereozentrum lokalisiert ist (nach Weissfloch und Kazlauskas (Weissfloch und Kazlauskas 1995)).

### 1.3.3 Triacylglyceride und Triacylglycerid Analoga

In der Natur katalysieren Lipasen die hydrolytische Spaltung von Triacylglyceriden, wodurch Di- und Monoglyceride sowie Glycerin und freie Fettsäuren entstehen. Die drei Esterbindungen der Fettmoleküle unterscheiden sich, wobei die beiden äußeren Ester primärer

Alkohole (*sn*-1 bzw. *sn*-3), die mittlere den Ester eines sekundären Alkohols (*sn*-2) darstellen (Abbildung 9). Das Triacylglycerid ist prochiral, wenn die Reste an *sn*-1 und *sn*-3 identisch sind. *sn* ist demnach die "stereospezifische Nummerierung".

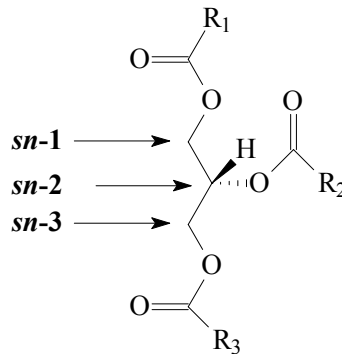


Abbildung 9: Strukturformel eines Triacylglycerids und stereospezifische Nummerierung der an das Glycerid gebundenen Substituenten.

Triacylglyceride besitzen ein Sauerstoffatom in direkter Nachbarschaft zum Stereozentrum und stellen strukturell Ester primärer Alkohole dar. Eine Übertragung der erweiterten empirischen Regel von Weissfloch und Kazlauskas für primäre Alkohole zur Vorhersage der Enantiopräferenz (Weissfloch und Kazlauskas 1995) auf Triacylglyceride war bislang nicht möglich.

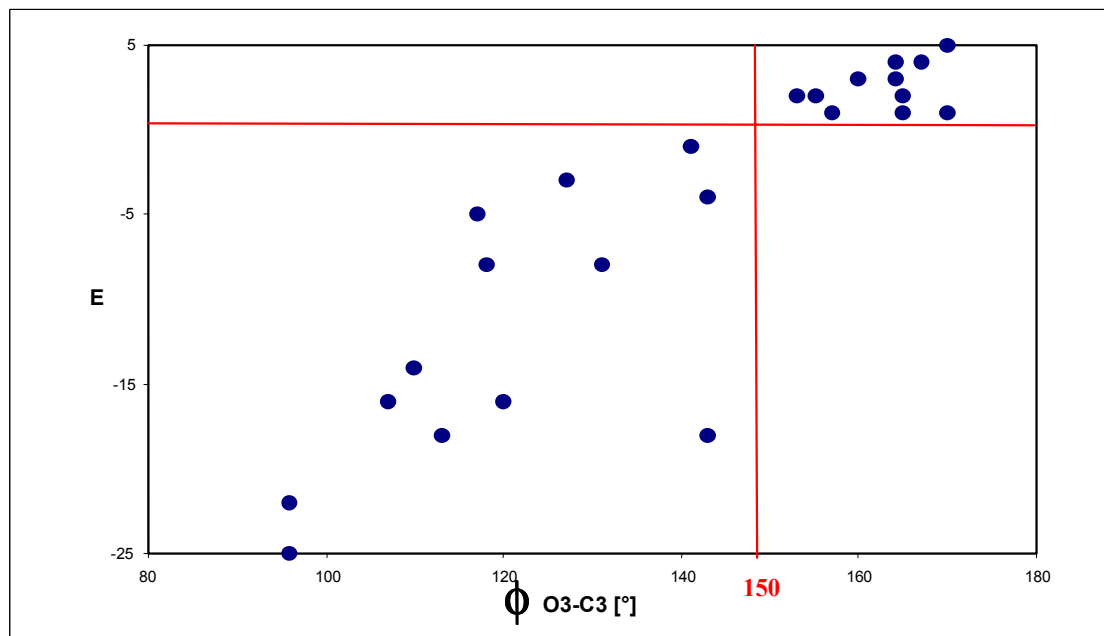


Abbildung 10: Korrelation zwischen dem gemessenen Torsionswinkel im Modell und dem experimentell bestimmten E-Wert. Eine *sn*-1 Präferenz ist zu beobachten, wenn der Torsionswinkel größer als 150° ist, bei einem Torsionswinkel kleiner als 150° zeigen die Lipasen *sn*-3-Präferenz (Scheib *et al.* 1998; Scheib *et al.* 1999).

Untersuchungen der Stereoselektivität von Lipasen durch computergestütztes *molecular modeling* und molekularbiologische Methoden (Scheib 1999) ermöglichte eine Beschreibung und Vorhersage der Stereoselektivität von Lipasen gegenüber diesen Substraten (Scheib *et al.* 1998; Scheib *et al.* 1999). Ein Torsionswinkel im Modell korreliert mit der experimentell bestimmten Stereoselektivität. Dies konnte auch durch experimentelle Untersuchungen mit Lipasemutanten bestätigt werden, die neben einer Selektivitätserhöhung sogar eine Umkehr in der Präferenz zeigten (Abbildung 10).

### 1.3.4 Carbonsäuren

Es gibt nur wenige Beispiele von Lipase-katalysierten enantioselektiven Umsetzungen von Carbonsäuren (Sariaslani *et al.* ; Zemlicka *et al.* 1988; Chenevert und Martin 1992; Kurita 1992; Barton *et al.* 1994; Zoete *et al.* 1994; Ahmed 1995; Krebsfänger *et al.* 1998). *Candida rugosa* Lipase zeigt hohe Selektivität gegenüber dieser Substratklasse und es existiert eine empirische Regel zur Vorhersage der Enantiopräferenz, die ebenfalls allein auf dem Größenunterschied der Liganden am Stereozentrum basiert (Kim *et al.* 1994; Ahmed *et al.* 1994). Für andere Lipasen existieren bisher keine Regeln oder Modelle zur Vorhersage der Enantiopräferenz, obwohl unter anderem auch *Candida antarctica* Lipase und vor allem auch *Pseudomonas cepacia* Lipase Carbonsäuren enantioselektiv umsetzen. Allein die hohe Enantioselektivität von PCL gegenüber chiralen Carbonsäuren, die Fluoratome am Substituenten in  $\alpha$ -Position tragen, wird auf stereoelektronische Effekte zurückgeführt (O'Hagan und Rzepa, 1994). Durch Änderungen der Reaktionsbedingungen gelang es verschiedenen Wissenschaftlern, die Enantioselektivität von CRL zu erhöhen (Chen und Sih 1989; Sih 1989; Colton *et al.* 1995). *Molecular modeling* Untersuchungen von CRL mit Carbonsäuren zeigten, dass sich die Enantioselektivität der CRL durch einen Tunnel, den *hydrophobic tunnel* erklären lässt, in dem der große Substituent bindet (Holmquist 1996; Botta *et al.* 1997). Das Stereozentrum liegt an der Mündung dieses Tunnels. Weitere *molecular modeling* Untersuchungen zeigten, dass es einige Ausnahmen von der empirischen Regel gibt (Holmquist 1996). Eine starke Verzweigung des großen Substituenten führt zu einer Umkehrung der Präferenz, da das entsprechende Enantiomer nicht mehr in diesen Tunnel passt. Auch für diese Substratklasse liegen keine veröffentlichte Daten über veränderte Enantioselektivität durch Mutanten vor.

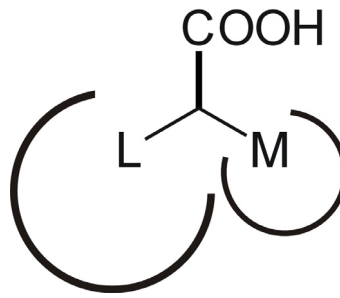


Abbildung 11: Empirische Regel zur Vorhersage der Enantiopräferenz von CRL gegenüber Carbonsäuren, basierend auf der Größe der Substituenten am Stereozentrum (Ahmed *et al.* 1994). Die Abbildung zeigt das bevorzugte Enantiomer.

## 1.4 Charakterisierung der Substratbindungstaschen für Lipasen und *docking* der Substrate

### 1.4.1 Bindungstaschencharakteristika der PCL

Die Form der Bindungstasche der PCL entspricht einem elliptischen Trichter (Pleiss *et al.* 1998). Das katalytische Zentrum befindet sich in der Spitze des Trichters, welche sich in drei Bereiche aufteilt, an die sich die Substituenten anlagern können. Die Fettsäurekette bindet im *hydrophobic crevice* der PCL, der große Substituent am Stereozentrum des Alkoholrestes entweder in der BTL, dem *hydrophobic dent* oder in der BTM, dem *hydrophilic trench*. Im *hydrophobic dent* befindet sich noch eine spezielle Tasche, das *His gap*, welches vom katalytischen H286 und seinem Nachbarn dem L287 gebildet wird. Der *hydrophobic crevice* der PCL wird aus den Aminosäuren L17, P113, S117, F119, V123, L164, L167 und V267 gebildet, der *hydrophobic dent* aus L248, T251, V266 und L287. Der *hydrophilic trench* (BTM) besteht aus fünf unpolaren (V26, L27, F146, I290 und L293) und fünf polaren Aminosäuren (T18, Y29, P243, S244 und Q292). Abbildung 12 zeigt die Bindungstasche der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* nach der Oberflächendarstellung von Connolly (Connolly 1983).

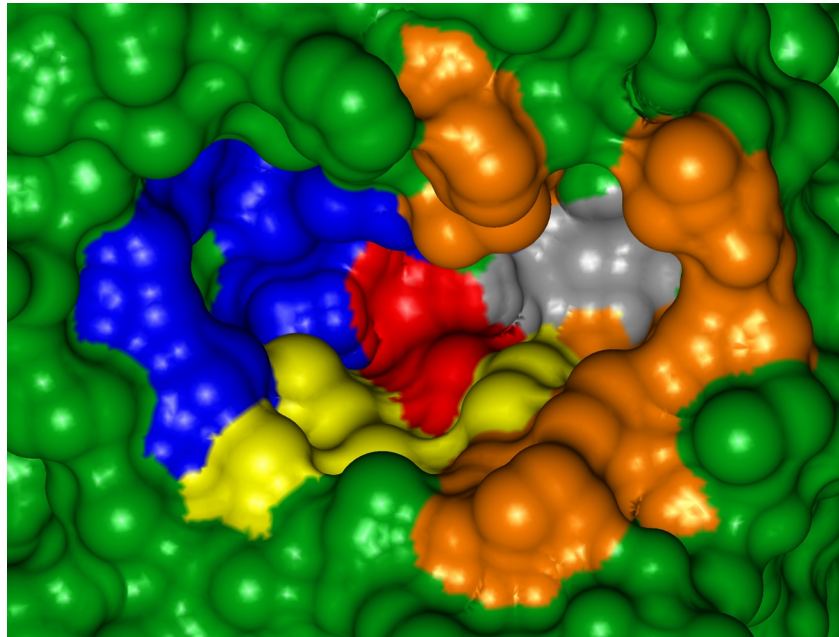


Abbildung 12: Die Substratbindungstasche der PCL. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot, die des *hydrophobic crevice* blau, die des *hydrophobic dent* gelb, die des *hydrophilic trench* orange/grau und die der *wall* grau eingefärbt. Die Oberflächendarstellung der Lipase erfolgt nach Connolly (Connolly 1983).

#### 1.4.2 Bindungstaschencharakteristika der CRL

Die zu spaltende Fettsäurekette oder Carbonsäure orientiert sich bei der Lipase aus *Candida rugosa* in eine Substratbindungstasche, den *hydrophobic tunnel*. Durch seine Größe bietet die Alkoholbindungsstelle des Enzyms einer Vielzahl auch sterisch anspruchsvoller Alkoholreste Platz. Der *hydrophobic tunnel* besteht aus den folgenden Aminosäuren: G124, F125, M213, V245, P246, S247, L302, L304, L307, F345, F415 und V534, der *hydrophobic dent* aus P65, L78, V81, M82, G124, G127, F296, F344 und F345. Wie die PCL besitzt auch die CRL eine dritte Bindungstasche aus polaren und unpolaren Aminosäuren, den *hydrophilic trench*: G122, T132, F133, E208, S450, I453, V454, Y458. Abbildung 13 zeigt die Bereiche der CRL Bindungstasche, an die unpolare Reste binden können.



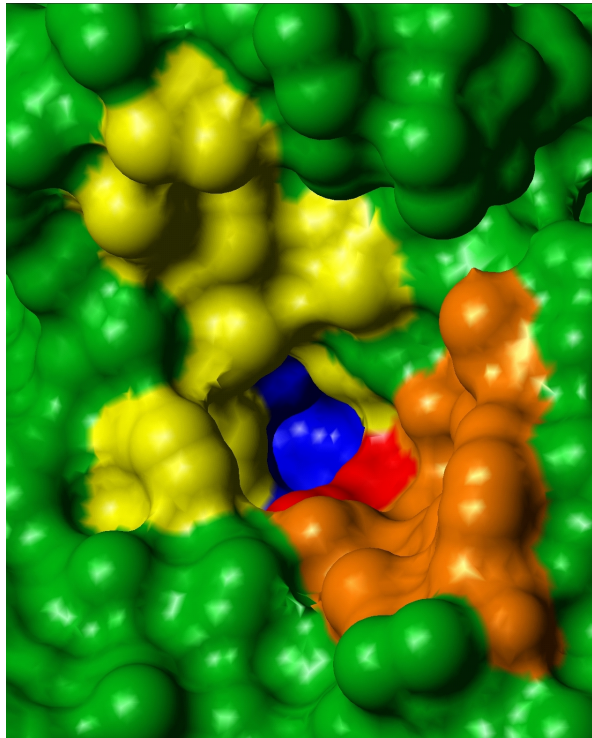


Abbildung 13: Die Substratbindungstasche der CRL. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot, die des *hydrophobic tunnel* blau, die des *hydrophobic dent* gelb und die der *hydrophilic trench* orange eingefärbt. Die Oberflächendarstellung der Lipase erfolgt nach Connolly (Connolly 1983).

### 1.4.3 Bindung und *docking* von primären Alkoholen an PCL

Die Strukturaufklärungen von Lipasen mit Inhibitoren und Untersuchungen der Bindungstaschencharakteristika lieferten Bindungsbereiche von Lipasen, darunter auch der PCL, an die hydrophobe Fettsäureketten und der Alkoholrest binden können. In Verbindung mit der Kenntnis des Katalysemechanismus (siehe Kapitel 1.1.7) ergaben diese Informationen für PCL, dass das *docking* der mit dem primären Alkohol veresterten Fettsäure an den sogenannten *hydrophobic crevice* erfolgt (siehe Abbildung 14). Zuegg *et al.* postulierten die Bindung des großen Substituenten am Stereozentrum der primären Alkohole analog zu der von sekundären Alkoholen im *hydrophobic dent* (Zuegg *et al.* 1997) (siehe Abbildung 14 a.). Tuomi *et al.* schlugen den *hydrophilic trench* als alternative Bindungstasche für den großen Substituenten vor (Tuomi und Kazlauskas 1999) (siehe Abbildung 14 b.).

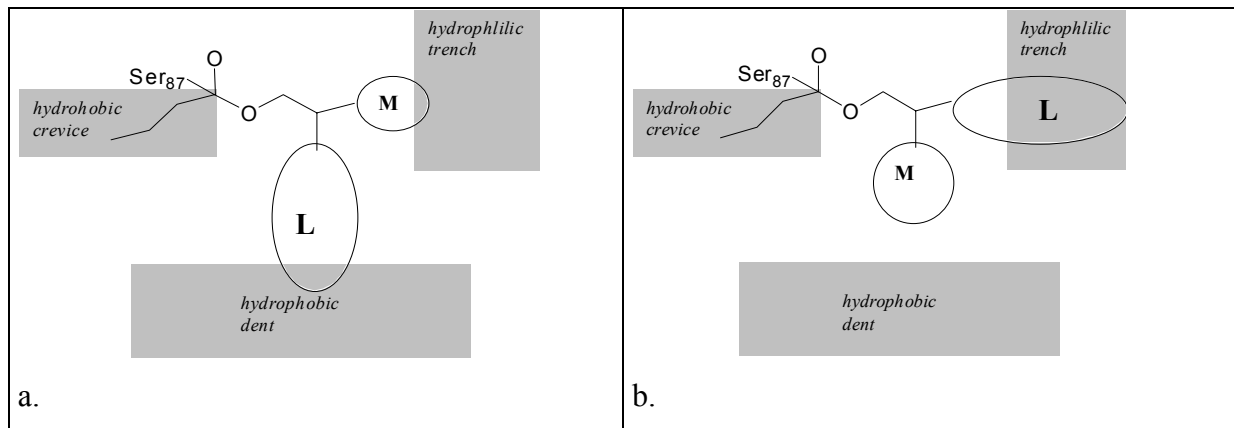


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Bindung der Substrate in der Bindungstasche der PCL. Die Substrate wurden bei verschiedenen Untersuchungen und im Rahmen dieser Arbeit sowohl mit ihrem großen Substituenten in den *hydrophobic dent* (Zuegg *et al.* 1997) (a.) als auch in den *hydrophilic trench* orientiert (Tuomi und Kazlauskas 1999) (b.).

#### 1.4.4 Bindung und *docking* von Carbonsäuren an CRL und PCL

Der mit dem Carbonsäure-Substrat veresterte Alkohol bindet analog zu den *molecular modeling* Untersuchungen von primären und sekundären Alkoholen im *hydrophobic dent*. Die Carbonsäure bindet in den *hydrophobic tunnel* der CRL, wobei der große Substituent am Stereozentrum von der Alkoholbindungstasche weg weiter in den Tunnel hinein reicht (Holmquist 1996; Botta *et al.* 1997). Holmquist *et al.* rationalisierten einige bekannte Annahmen, dass stark verzweigte Substrate nicht mehr in den Tunnel binden und sich deshalb die Enantiopräferenz ändert (Holmquist 1996). Daraus resultierend erfolgen Bindung und *docking* der Carbonsäure abhängig von der Struktur der Substituenten möglichst tief im Tunnel.

Es liegen keine Daten über die Bindung von Carbonsäuren in der PCL vor.

### 1.5 Molekulardynamische Simulationen

Durch Integration der Newton-Bewegungsgleichung werden während einer molekulardynamischen Simulation aufeinanderfolgende Konformere eines Systems erhalten. Die Informationen über die Geschwindigkeit und die Position der einzelnen Atome im System ist in der resultierenden Trajektorie enthalten. Basierend auf den bindenden und nicht-

bindenden Interaktionen ergibt sich eine charakteristische Molekül-Topologie. Das Gesamtsystem besteht aus miteinander wechselwirkenden Atomen.

- (kovalent) gebundene Wechselwirkungen
  - a) die Bindungslänge  $l$  zwischen zwei Atomen (A und B),
  - b) den Bindungswinkel  $\Theta$  zwischen drei Atomen (A, B, C) und
  - c) den Torsionswinkel  $\Phi$ , der den Winkel zwischen zwei Ebenen beschreibt. Jede Ebene wird durch die Position von drei Atomen definiert (A, B, C und B, C, D).

- nicht (kovalent) gebundene Wechselwirkungen

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

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

$$E_{\text{pot}} = \sum E_l + E_{\Theta} + E_{\Phi} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{El}} \quad \text{bzw.} \quad V_{\text{pot}} = \sum V_l + V_{\Theta} + V_{\Phi} + V_{\text{vdw}} + V_{\text{El}}$$

$V(\vec{r}_i)$  ist eine Funktion aller  $3N$  Koordinaten und beschreibt die potentielle Energie des Systems.

Die Methode der Molekulardynamische (MD-) Simulationen berechnet das Verhalten eines molekularen Systems auf dem Computer, was in zweierlei Hinsichten genutzt werden kann. Erstens besteht die Möglichkeit, einen experimentellen Befund am Computer zu verifizieren und zusätzliche, dem Experiment schwer zugängliche, Informationen erhalten. Zweitens lassen sich auf diese Weise „Experimente“ erstellen, die zum einen in der Realität gar nicht möglich und zum anderen zu aufwendig sind um sie tatsächlich durchzuführen. Aufgrund der begrenzten Leistungsfähigkeit der Rechner sind hier jedoch Einschränkungen zu machen. Bislang können nicht beliebig große Systeme beliebig lange simuliert werden. Heutige biologische Systemgrößen umfassen in der Größenordnung 100000 Atome und die Simulationszeiten gehen von einigen hundert ps bis zu einigen ns. Mit einigen Vereinfachungen und der immer schneller werdenden Computerleistung kann man bereits

jetzt in Bereiche vordringen, die äußerst effizient zum Verständnis der Dynamik molekularer Systeme beitragen. Das Grundprinzip der MD-Simulation ist relativ einfach. Es bedient sich den Gesetzen der klassischen Mechanik. Die Trajektorie eines jeden im System vorhandenen Atoms erhält man als Ergebnis nach zweimaliger numerischer Integration der Newtonschen Bewegungsgleichungen.

$$\vec{F}_i(\vec{r}_j, t) = m_i \frac{d^2}{dt^2} \vec{r}_i$$

⇒ Numerische Integration ⇒ Trajektorie  $r_i(t)$

$F_i$ : Gesamtkraft, die auf Atom  $i$  wirkt

$m_i$ : Masse von Atom  $i$

$\frac{d^2}{dt^2} \vec{r}_i$ : Resultierende Beschleunigung auf Atom  $i$

Damit entsteht ein atomares Bild über das Verhalten des untersuchten Systems. Die numerische Integration kann mit Hilfe einer Reihe von unterschiedlichen Algorithmen erfolgen. Ein weit verbreiteter und einfacher Algorithmus ist der Bocksprung (*leap-frog*)-Algorithmus. Dies ist einer der stabilsten und genauesten Algorithmen und soll hier stellvertretend erläutert werden.

Hierzu stellt man folgende Differenzenquotienten auf:

$$\vec{a}_i(t_n) = \frac{\vec{F}(t_n)}{m_i} = \frac{\vec{v}_i(t_{n+\frac{1}{2}}) - \vec{v}_i(t_{n-\frac{1}{2}})}{\Delta t}$$

$$\vec{v}_i(t_{n-\frac{1}{2}}) = \frac{\vec{r}_i(t_{n+1}) - \vec{r}_i(t_{n-1})}{\Delta t}$$

Durch ineinander Einsetzen der beiden Gleichungen erhält man schließlich die Rechenvorschrift:

$$\bar{r}_i(t_{n+1}) = \bar{r}_i(t_n) + \bar{v}_i(t_{n-1/2})\Delta t + \frac{\bar{F}_i(t_n)}{m_i}(\Delta t)^2$$

Gibt man die Positionen und die resultierende Kraft zum Zeitpunkt  $t_n$  zusammen mit der Geschwindigkeit zum Zeitpunkt  $t_{n-1/2}$  an, so erhält man in alternierender Reihenfolge alle Positionen  $r_i(t_{n+k})$  und Geschwindigkeiten  $v_i(t_{n+[(2k-1)/2]})$ . Hier rührt der Name „Bocksprung“ her, da sich Geschwindigkeit und Ort zeitlich „überspringen“. Der Integrationszeitschritt  $\Delta t$  sollte dabei möglichst klein gewählt werden (typischerweise im fs-Bereich) um keine größeren Fehler bei der Berechnung zu machen. Man muss die höchstfrequenten Bewegungen korrekt beschreiben und sollte deshalb mit einem  $\Delta t$  rechnen für das gilt:  $\Delta t < 1/25 f_{max}^{-1}$ . Diese Bewegungen sind in biologischen Systemen Streckschwingungen von Wasserstoff, der an Sauerstoff ( $f_{max}^{-1} \approx 10$  fs) oder Kohlenstoff gebunden ist. Dies ist der erste einschränkende Faktor einer Simulation. Für eine Simulationsdauer von 100ps müssen bei einem Zeitschritt von  $\Delta t = 1$  fs bereits 100000 Integrationsschritte berechnet werden.

Im wesentlichen werden drei Dinge benötigt, um eine MD-Simulation durchzuführen.

- a) Strukturinformation des Systems
- b) Topologie
- c) Kraftfeldfunktion

#### *a) Strukturinformation des Systems*

Simulationen werden meist mit experimentell bestimmten Daten begonnen. Im Fall biologischer Systeme, insbesondere von Proteinen, steht die Brookhaven Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org>) im Internet zur Verfügung (Bernstein *et al.* 1977). Hier finden sich alle in den letzten Jahren veröffentlichte Strukturen in einem einheitlichen Format, sogenannte pdb (Protein-Data-Bank)-files.

#### *b) Topologie*

Die Topologie beschreibt alle im System befindlichen Atome, welche kovalenten Bindungen sie eingehen und welche Wechselwirkungen während der Simulation zu berechnen sind.

#### *c) Kraftfeldfunktion*

Eine große Schwierigkeit besteht darin, ein hinreichend genaues, atomares Modell des zu untersuchenden Systems zu schaffen und die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen

Atomen so zu wählen, dass die gesuchten Systemeigenschaften möglichst genau wiedergegeben werden können. Aufgrund der schon erwähnten, limitierten Rechenleistung sind auch hier Näherungen und Vereinfachungen notwendig um die Simulationszeiten in Grenzen zu halten.

Aus diesem Grund verwendet man die sogenannte „Force-field“- Methode, auch Molekular-Mechanik genannt. Sie vernachlässigt die Bewegung der Elektronen und berechnet die Energie des Systems lediglich als Funktion der Positionen der Atomkerne. Hierzu beschreibt man das untersuchte System als Modell aus geladenen Massenpunkten, die über ein Netzwerk von Federn miteinander verbunden sind.

Die Tatsache, dass Molekular-Mechanik überhaupt funktioniert, beruht auf mehreren Annahmen. Eine der wichtigsten ist die Born-Oppenheimer-Näherung, die es zulässt, die Bewegung der Atomkerne von der Bewegung der Elektronen zu trennen. Um die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Atomen zu beschreiben, verwendet man eine Kraftfeldfunktion, die aus Beiträgen besteht, wie beispielsweise der Änderung von Bindungslängen, der Änderung von Bindungswinkeln oder der Torsion um Einfachbindungen. Selbst wenn man hierfür einfache analytische Funktionen ansetzt, ist man in der Lage brauchbare Ergebnisse zu erzielen.

Gängige Kraftfelder als Grundlage molekulardynamischer Simulationen sind *GROMOS* (van Gunsteren und Berendsen 1987), *Amber* (Weiner *et al.* 1984), *CHARMM* (Gelin und Karplus 1979) und *Tripos* (Clark *et al.* 1989).

## 2 ZIELSETZUNG

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung theoretischer Modelle zum molekularen Verständnis der Enantioselektivität von Lipasen bei der hydrolytischen Esterspaltung und Veresterung von:

- 1) primären Alkoholen mit chiraler Gruppe an  $\alpha$ -Position
- 2) chiralen Carbonsäuren

mit dem Ziel, Vorhersagen zu treffen und gezielt Modifikationen an Lipasen vorschlagen zu können, die die Enantioselektivität deutlich beeinflussen.

Ausgehend von der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (PCL) sollten die Wechselwirkungen zwischen Lipase und primären Alkoholen mittels molekulardynamischer Simulationen untersucht und analysiert werden. Die experimentellen Daten über die Enantioselektivität wurden zum Teil aus der Literatur entnommen und durch Umsetzungen von fünf Substraten im Rahmen dieser Arbeit generiert. Des Weiteren sollten gezielt Mutationen in das Gen der *Pseudomonas cepacia* Lipase eingeführt werden, die zu modifizierter Enantioselektivität bzw. -präferenz führen und mit deren Hilfe die Gültigkeit des Computermodells überprüft werden sollte. Eine Übertragung des Modells auf andere mikrobielle Lipasen sollte erklären, warum diese keine ausreichend hohe Enantioselektivität gegenüber einem breiten Spektrum an primären Alkoholen besitzen. Weitere Untersuchungen zur Enantioselektivität von *Candida antarctica* Lipase B (CAL-B), *Candida rugosa* Lipase (CRL), *Rhizomucor miehei* Lipase (RML) und Schweinepankreas Lipase (PPL) gegenüber primären Alkoholen sollten die Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten bei der selektiven Umsetzung aufzeigen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Enantioselektivität von *Candida rugosa* Lipase bei der Veresterung von Carbonsäuren untersucht werden. Die hierfür notwendigen experimentellen Daten wurden zum einen der Literatur entnommen und durch Umsetzung von drei Substraten versucht selber zu generieren.

Außerdem wurde versucht, auch die Enantioselektivität der *Pseudomonas cepacia* Lipase gegenüber Carbonsäuren zu erklären. Die hierfür benötigten experimentellen Daten wurden ausschließlich der Literatur entnommen.

## 3 MATERIALIEN UND METHODEN

### 3.1 Geräte und Materialien

#### 3.1.1 Verwendete Geräte

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte

Verwendete Geräte	Typbezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese	DNA Sub Cell™, Gel-Dryer 583, Mini Sub™ DNA Cell, Mini Sub™ Cell GT	BioRad
	Video Copy Processor P66E	Mitsubishi
	BWM 9X Monitor	Javelin Electronics
	UV-Leuchttisch	MWG-Biotech
Brutschränke	WTE	Binder
	UM 500	Memmert
Chromatographiesäulen für GC	2,6-Me-3-pentyl-β-Cyclodextrin (50 % in OV1701), 25 m	König;
	6TBDMS-2,3-acetyl-β-CD (50 % in OV1701), 25 m	Universität Hamburg
DNA-Sequenzierer	373A DNA Sequencer	Applied Biosystems
	Macintosh Quadra 650	Apple Macintosh
Fermenter	Bioengineering D1180 (30 l)	Bioengineering AG
	Infors HT (5 l)	Infors AG
Gaschromatograph	Tressmetrics 9001	Tressmetrics
Gefriertrockner	Lyovac GT 2	Finn-Aqua
Homogenisator	Ultra Turrax T25 mit Dispergierstab S25N-25F	Janke & Kunkel
Inkubatoren	HT – Schüttelinkubator (30°C, 37° C)	Infors AG
Mikrowellengerät	Micro-Chef FM A935	Moulinex
PAGE	Minigel-Twin G42	Biometra®
	Model 583 Gel Dryer	BioRad
PCR-Geräte	DNA Thermocycler	Perkin Elmer
	Robocycler® Gradient 40	Eppendorf Stratagene
pH-Meter	Digital pH Meter pH525	WTW
pH-Stat	Impulsomat 614, pH-Meter 620, Dosmiat 665, Thermostatierbare Rührzelle	Metrohm
	Kryostat C1	Haake
	Flachsreiber	Linseis



Verwendete Geräte	Typbezeichnung	Hersteller
Photometer	UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec 3000)	Pharmacia Biotech
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
"Vortexer"	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waagen	Basic, MC1 Research RC 210 D Precision Advanced	Sartorius OHAUS®
Zellaufschluss	Branson Sonifier 250	Branson
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417 C Eppendorf Centrifuge 5415 R Universal 30 F KR 22 i (Rotor: AK 500-11, 155 mm) G412 Sorvall RC-5B (Rotor: SA 600)	Eppendorf Eppendorf Hettich Jouan Jouan Du Pont Instruments

### 3.1.2 Eingesetzte Enzyme und Chemikalien

Tabelle 3: Liste der eingesetzten Enzyme und Chemikalien

Hersteller	Enzyme und Chemikalien
Bio Rad Laboratories, Richmond, USA	SDS-PAGE-Standard ( <i>low molecular weight</i> )
DIFCO-Laboratories, Detroit, USA	Trypton
Fluka Chemie, Buchs, Schweiz	Agar Bromphenolblau Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> ) (±)-2-Chlorpropionsäure (R)-(+)-2-Chlorpropionsäure (S)-(-)-2-Chlorpropionsäure Coomassie Brilliant Blue R-250 (±)-Dihydro-5-(hydroxymethyl)-2(3H)-furanon (R)-(-)-Dihydro-5-(hydroxymethyl)-2(3H)-furanon (S)-(+)-Dihydro-5-(hydroxymethyl)-2(3H)-furanon Dimethylsulfoxid (DMSO) Dithiothreitol (DTT) (R)-1,2-Dodecandiol (S)-1,2-Dodecandiol Ethidiumbromid Ethyldiamintetraacetat (EDTA), Natriumsalz Glucose-Monohydrat

Hersteller	Enzyme und Chemikalien
	Hefeextrakt Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid (IPTG) Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) Methanol Natriumacetat (NaOAc) Natriumchlorid (NaCl) Natriumdodecylsulfat (SDS) Natriumhydroxid (NaOH) 4-Nitrophenol 4-Nitrophenylacetat Polyethylenglycol 6000 (±)-2-Phenylbuttersäure, racemisch (R)-(-)- 2-Phenylbuttersäure (S)-(+)- 2-Phenylbuttersäure (R)-(-)-1-Phenyl-1,2-ethandiol (S)-(+)-1-Phenyl-1,2-ethandiol (R)-(+)-2-Phenyl-1-propanol (S)-(-)-2-Phenyl-1-propanol (±)-2-Phenylpropionsäure, racemisch (R)-(-)-2-Phenylpropionsäure (S)-(+)-2-Phenylpropionsäure (R)-(-)-1,2-Propandiol (S) (+)-1,2-Propandiol Salzsäure 35 % (HCl) Tetramethylethylendiamin (TEMED) Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) Tributyrin
Gibco BRL GmbH, Eggenstein	1 kb-Ladder (Standard für Agarosegele)
Interaktiva, Ulm	Oligonukleotide
MBI Fermentas, St. Leon-Rot	Restriktionsendonukleasen: <i>Bam</i> HI (10U/μl), <i>Eco</i> RI (10 U/μl), <i>Dpn</i> I (10 U/μl) T4-DNA-Ligase
PE Applied Biosystems, Weiterstadt	BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
Pharmacia LKB, Freiburg	Ultrapure dNTP-Set
Promega, Madison, USA	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (3 U/μl)
Qiagen GmbH, Hilden	QIAGEN Midi-Plasmid-Präparations-Kit QIAprep Spin Miniprep-Plasmid Präparations-Kit

Hersteller	Enzyme und Chemikalien
Riedel-de Haen, Seelze	Essigsäure 100 %, Eisessig Ethanol Glycerin
Roth GmbH, Karlsruhe	Ampicillin (Natrium-Salz) Glycin Rotiphorese <sup>®</sup> NF-10x TBE-Puffer Rotiphorese <sup>®</sup> NF-Harnstoff Rotiphorese <sup>®</sup> NF-Acrylamid/Bisacrylamid Lösung 30 % (30/08) für PAGE Rotiphorese <sup>®</sup> NF-Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40 % (19:1) für Sequenzierung
Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg	Agarose
Stratagene, La Jolla, USA	<i>Pfu</i> -Polymerase <i>Pfu</i> -Polymerase Puffer QuikChange-Kit

### 3.1.3 Nährmedien

Tabelle 4: Verwendete Nährmedien und Herstellung

Nährmedium	Inhaltsstoffe	Menge
<b>LB (Luria-Bertani) Medium</b> ( <i>Luria et al. 1960</i> ) (für 1 l Medium)	Bacto Trypton, 1 % (w/v)	10 g
	Hefeextrakt, 0,5 % (w/v)	5 g
	NaCl, 1 % (w/v)	5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
Mit 5 N wässriger KOH-Lösung auf pH 7,5 einstellen und anschließend autoklavieren. Für feste Medien vor dem Autoklavieren 16 g/l Agar zugeben. Medium zur Selektion von Transformanden mit Ampicillin-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzen.		
<b>TSS-Medium</b> <b>(Transformation-Storage Solution)</b> (für 100 ml Medium)	LB	85 ml
	PEG 6000, 10 % (w/v)	10 g
	DMSO, 5 % (v/v)	5 ml
	MgCl <sub>2</sub> (1M)	5 ml
pH-Wert auf 6,5 einstellen.		
<b>TY/Glycerin-Medium</b>	Bacto Trypton	1,0 %
	Hefeextrakt	0,5 %
pH-Wert auf 7,2 einstellen. Autoklaviertes TY-Medium und autoklaviertes 86 % Glycerin im Verhältnis 1:1 mischen.		

### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Liste der Verbrauchsmaterialien

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

### 3.1.5 Puffer

Tabelle 6: Verwendete Puffer und deren Herstellung

Puffern	Inhaltsstoffe	Menge
<b>DNA-Auftragspuffer (10x)</b>	Bromphenolblau	0,1 %
	Glycerin	50,0 %
	EDTA (0,5 M, pH 8)	49,9 %
<b>Gelelektrophoresepuffer (TAE(50x))</b> (für 1 l Puffer)	Tris	15,0 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA (Natrium-Salz)	18,6 g
	dH <sub>2</sub> O	ad 1,0 l
<b>SDS-Laufpuffer(5x)</b> (für 1 l Puffer)	Tris	15 g
	Glycin	72 g
	SDS	5 g
	dH <sub>2</sub> O	ad 1 l
<b>TE 10:1</b>	Tris/HCl pH 8	10 mM
	EDTA	1 mM
<b>Tris-Puffer</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,5	

### 3.1.6 Antibiotikum

Die Konzentration des sterilfiltrierten Ampicillins betrug 100 mg/ml, was einer Arbeitskonzentration von 100 µg/ml entspricht.

## 3.2 Plasmide

### 3.2.1 Das Plasmid pCYTEXP1

Von Quyen *et al.* wurde das Ampicillin-resistente Plasmid pCYTEXP1 mit einer Größe von 4985 bp als Expressionsvektor der PCL gewählt (Abbildung 15) (Belev *et al.* 1991). Es trägt den Promoter ( $P_{LPR}$ ) des Bakteriophagen Lambda. Der Repressor, welcher die Transkription unterdrückt und das auf dem Plasmid befindlichen Gen *cI857* kodiert, wird in einem Temperaturbereich zwischen 30° C und 37° C exprimiert. Bei der Erhöhung der Temperatur auf 42° C wird das Repressorgen unterdrückt und die Transkription des rekombinanten Gens gestartet.

### 3.2.2 Das Plasmid pT-Lip-Hp

Im weiteren wurde die Gene der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* ATCC 21808 (Lip) und des Helfergens (Hp) in das pCYTEXP1-Plasmid insertiert. Durch Regulierung der Genfunktion durch  $\lambda$ PL und Entfernung der Lipase-Signalsequenz wurden eine optimierte Überexpressionen in *E.coli* erzielt (Abbildung 15).

### 3.2.3 Das Plasmid pTomp $\Delta$ 70HpHis

Um eine aktive Lipase zu erhalten, müssen die bei der Expression anfallenden Einschlusskörper zerstört und das Protein rückgefaltet werden. Das Helferprotein ist an der Faltung der Lipase beteiligt und dient als Membrananker. Die Expression des benötigten Helferproteins wird separat durchgeführt. Am N-terminalen Ende des Chaperons entfernten Quyen und Mitarbeiter (Quyen *et al.* 1999) hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren, um die Blockierung der Überexpression des Proteins zu vermeiden.

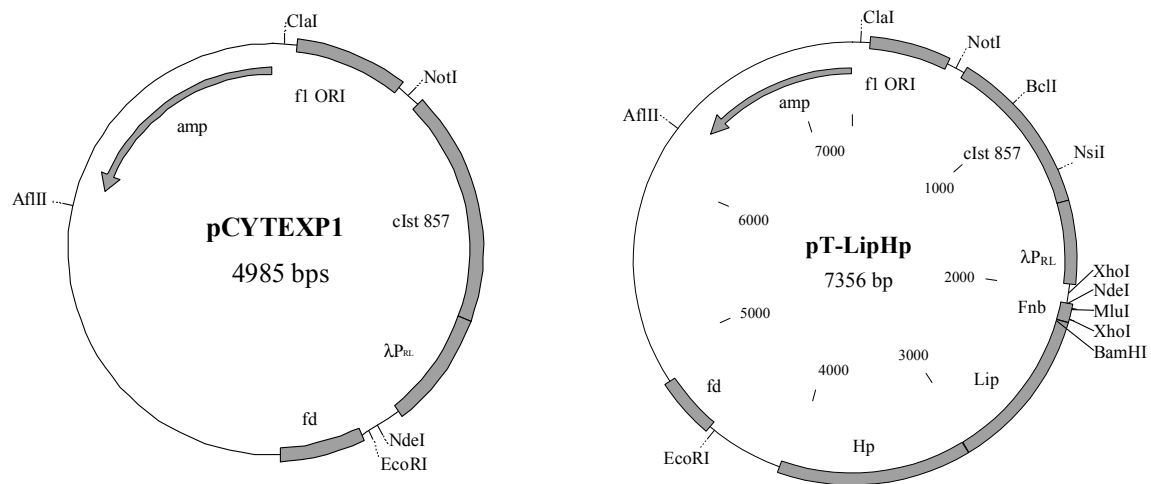


Abbildung 15: Links: Das Plasmid pCYTEXP1 von Belev und Mitarbeitern war die Grundlage für die von Quyen *et al.* durchgeführten Modifikationen (Belev *et al.* 1991). Rechts: Das Plasmid pT-LipHp mit den Genen der PCL ATCC 21808 und des PCL-Helferproteins (Quyen *et al.* 1999).

### 3.3 Stammhaltung *E. coli*

#### 3.3.1 *E. coli* Dh5 $\alpha$

Der in dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stamm wurde von Hanahan generiert (Hanahan 1983) und von Quyen modifiziert (Tabelle 7) (Quyen *et al.* 1999).

Tabelle 7: Verwendeter *E. coli*-Stamm mit Genotyp und Resistenz

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44 ΔlacU169 [φ80lacZΔM15] hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> ; Ampicilin-Resistenz	Quyen <i>et al.</i> 1999

#### 3.3.2 Stammhaltung auf festen Nährböden, Anlegen von Glycerinkulturen und Anzucht in Flüssigmedium

LB-Agarplatten wurden mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt. Die *E. coli*-Stämme nach dem Anwachsen bei 37° C über Nacht mit Parafilm verschlossen und im Kühlraum bei 4° C als Stammhaltung bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Langzeitlagerung wurden in 3 ml mit entsprechendem Selektionsmarker angeimpften LB-Medium Einzelkolonien der Agarplatten bei 37° C inkubiert, bis sie eine OD<sub>578</sub> von 0,5-1,0 erreichten (im Bereich OD<sub>578nm</sub> von 0-0,3 gilt für *E. coli*-Kulturen: OD<sub>578nm</sub> = 5·10<sup>8</sup>·(Zellen/ml)). Die Pellets aus den Kulturen (nach Abzentrifugierung bei 4500 Upm für 5 min) wurden in 2 x 1,5 ml TY/Glycerin-Medium resuspendiert und bei -80° C in 1,5 ml Eppendorf-Tubes gelagert.

Für die Anzucht in Flüssigmedium wurden Einzelkolonien in 3 ml LB-Amp-Medium bei 37° C über Nacht inkubiert. In 2 l-Erlenmeyerkolben wurden 500 ml LB-Amp-Medium mit 10 ml (Verhältnis 1:50) angeimpft und im Schüttler bei 37° C bis zu einer optischen Zelldichte von 0.8 inkubiert, wobei das Zellwachstum photometrisch überwacht wurde. Durch die Erhöhung der Temperatur des Wasserbades auf 42° C wurde die Expression gestartet und für 4 h durchgeführt.

Zusätzlich wurden ebenfalls 500 µl Übernachtskultur mit 75 % Glycerin vermengt und bei -80° C eingelagert.

### 3.4 Molekulargenetische Methoden

#### 3.4.1 Herstellung kompetenter Zellen nach Chung *et al.* (Chung *et al.* 1989) und Transformation von kompetenten DH5α Zellen

Eine Menge von 50 ml LB-Medium wurden mit LB-Übernachtskulturen von *E. coli* DH5α ohne Selektionsantibiotikum in Verhältnis 1:100 angeimpft. Die nach der Zentrifugation bei 3500 Upm und 4° C für 10 min (Universal 30 F) erhaltenen Pellets der Zellkulturen wurden in 2 ml TSS Puffer bei 0° C resuspendiert und auf Eis für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl aliquotiert und bei -80° C für Transformationen gelagert.

Zur Transformation wurden zu je 200µl kompetenten Zellen 50 µl mit *DpnI* verdaute und dialysierte DNA zupipettiert. Diese wurden 20 min auf Eis inkubiert und nach einem Hitzschock im Wasserbad für 45 Sekunden bei 42° C direkt in 2 ml LB-Medium überführt. Nach 1 h Inkubationszeit bei 37° C wurde das Medium abzentrifugiert und das erhaltene Pellet auf LB-Platten mit Selektionsmarker über Nacht bei 37° C inkubiert.

### 3.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolation der Nukleinsäuren wurde das Präparationskit des Herstellers QIAGEN gemäß der Gebrauchsanweisung eingesetzt. Es wurden folgende Kits verwendet:

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

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

Bei der erstgenannten Methode erfolgt die alkalische Lyse der Zellen (Birnboim und Doly 1979), die zuvor nach der Abtrennung durch Zentrifugation bei 14000 Upm für 1 min von 1,5 ml Übernachtskultur erhalten wurden. Die DNA bindet hierbei spezifisch an einen Ionentauscher. Dies kann nur bei solchen Proben vorgenommen werden, bei der die Plasmid-DNA sehr rein vorliegt (z.B. PCR- und Sequenz-Reaktionen).

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

Die zweite Methode unterscheidet sich von der ersten nur dadurch, dass hierbei größere Mengen Plasmid-DNA verwendet werden. Nach den Angaben des Herstellers wurden das Zellpellet aus 50 ml Übernachtskultur eingesetzt, welche für 10 min bei 500 Upm und 4° C zentrifugiert wurde.

### 3.4.3 Polymerase Kettenreaktion, PCR und positionsgerichtete Mutagenese mit QuickChange

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde 1986 von Mullis entwickelt (Mullis *et al.* 1986). Hierbei werden durch Zyklen von Reaktionsschritten DNA-Vorlagen, die sogenannten *templates*, amplifiziert.

Mit der QuickChange PCR lassen sich mit Hilfe von Primern spezifische Punktmutationen zum Austausch von einzelnen Aminosäuren von Proteinen in Gene einbauen. Im ersten



Schritt erfolgt die Denaturierung der DNA bei 95° C, wodurch Einzelstränge entstehen. Danach folgt der Annealingschritt, bei dem sich der Primer an die Einzelstränge der DNA anlagert, während im Extensionsschritt bei 72° C das restliche Gen komplettiert wird. Diese Reaktion wird durch die Polymerase katalysiert. Die Zyklen werden bis zu 40 mal durchlaufen.

<b>Pipettierschema</b>		
	10 x <i>Pfu</i> -Polymerase Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	10 µl
	DNTP-Mix (c = 2,5 mM)	2 µl
	DMSO	10 µl
	Primer <i>L287W forward</i> (c = 5 pmol/µl)	2,5 µl
	Primer <i>L287W revers</i> (c = 5 pmol/µl)	2,5 µl
	[Primer <i>L287Y forward</i> (c = 5 pmol/µl)]	[2,5 µl]
	[Primer <i>L287Y revers</i> (c = 5 pmol/µl)]	[2,5 µl]
	[Primer <i>Y29W forward</i> (c = 5 pmol/µl)]	[2,5 µl]
	[Primer <i>Y29W revers</i> (c = 5 pmol/µl)]	[2,5 µl]
	pT-LipHp ( <i>template</i> -DNA) (c = 0,6 µg/µl)	2 µl
	Turbo <i>Pfu</i> -Polymerase(1 U/µl)	2 µl
	Autoklaviertes dH <sub>2</sub> O	69 µl

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die drei Punktmutationen L287W, L287Y und Y29W eingeführt. Dafür wurde jeweils folgendes Temperaturprogramm verwendet (Tabelle 8):

Tabelle 8: Temperaturprogramm der QuikChange-PCR bei der Einführung einer Punktmutation in das Plasmid pT-LipHp

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

Nach der QuickChange-PCR wurde der gesamte Ansatz mit 1 µl *DpnI* versetzt und bei 37° C für 2 h inkubiert. Da Salze die Transformation negativ beeinflussen können, wurden je 20 µl des Ansatzes auf einem auf bidestillierten Wasser schwimmenden Dialyse-Filter aufgegeben. Der gesamte Ansatz wurde nach dem er 2 h dialysiert wurde in *E. coli* DH5α transformiert.

### 3.4.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes erfolgt die Auftrennung von DNA-Molekülen auf Grund ihrer differierenden Größe. Abhängig von der angelegten Spannung und der Porengröße der Agarose, wandern die Moleküle unterschiedlich weit.

Die Auftrennung der vollständig linearisiert doppelsträngigen DNA-Moleküle erfolgte in 1 % Agarosegel in TAE-Puffer mit 0,5 µg Ethidiumbromid. Ethidiumbromid wird durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt und kann daher verwendet werden, um DNA-Fragmente sichtbar zu machen. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/5 Vol 5x Auftragspuffer versetzt und die Elektrophorese in einer Flachbett-Agarosekammer (BIO-RAD) bei 120 V für 30 min durchgeführt. Es wurden 10 µl eines 1 kb DNA ladders (50 nmol/µl) als Standard eingesetzt. Die Detektion der DNA erfolgte auf einem UV-Leuchttisch durch Anregung der Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromid bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 480$  nm.

### 3.4.5 DNA zur Sequenzierung

Nach der Methode des „Fluorescence-based dideoxy DNA cycle sequencing“ erfolgte die DNA-Sequenzierung (Sanger *et al.* 1977). Nach Angaben des Herstellers wurden folgende Kits eingesetzt:

BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystems)  
 ABI Prism™ TerminatorTaq Dye Deoxy™ Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems)

Im Thermocycler wurden die Sequenzierreaktionen (mit 5 µl DNA-Lösung, 4 µl dNTP/ddNTP/Ampli-Taq-FS-Polymerase/Puffer-Lösung\*) nach folgendem Zyklus durchgeführt: (durch den Einbau der hier\* enthaltenen vier fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (ddNTP) kommt es zum Abbruch der Kettenverlängerung. Die Basenfolge kann durch die Detektion der verschiedenen Farben (durch Laserstrahl angeregt) direkt abgelesen werden)

Tabelle 9: Temperaturprogramm für die zyklische Sequenzierreaktion

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

Anschließend wurden die Sequenzierprodukte mit dem *373A-DNA-Sequencer* von Applied Biosystems nach den Angaben des Herstellers aufgetrennt und mit Hilfe der Fluoreszenzmessung bei 488 nm und 514 nm detektiert (Prober *et al.* 1987; Freeman *et al.* 1990).

### 3.5 Proteinchemische Methoden

#### 3.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Gefaltete und entfaltete Proteinketten lassen sich durch SDS-Page in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem nach ihrer Molekülgröße im analytischen und präparativen Maßstab auftrennen (Laemmli 1970). Die Wanderung der Proteine ist neben ihrer Ladung auch von der Porengröße und der Spannung im angelegten Feld abhängig. Zur Herstellung des SDS-Gels wurde nach der Polymerisation (20 min) ein 12,5 %iges Trenngel mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet und in dieses der Probensammelkamm eingeführt (Entfernung nach 20 min). Anschließend werden die Proben, nachdem sie zuvor mit SDS-Probenpuffer verdünnt (Sambrook *et al.* 1989) und bei 95° C denaturiert wurden, und der Standard in die Kammern eingefüllt.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Proteinstandards, *low molecular weight* Standard (LMW)

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

#### 3.5.2 SDS-Gel Färbung und Bestimmung der Proteinkonzentration

Im ersten Schritt wurden die Polyacrylamidgele mit Coomassie-Blue-Färbelösung für 45 min gefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung für 2 h. Zur Aufbewahrung für Dokumentationszwecke wurden die Gele unter Vakuum getrocknet (Gel-Dryer 583 von BIO-

RAD). Die Proteinkonzentration der Lipase wurde mit Hilfe der densitometrischen Bestimmung durchgeführt (Vergleich der Bandenstärken).

### 3.6 Lipaseaktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte für die Lipase und die Mutanten direkt aus dem *Refolding*-Ansatz mittels *p*-NPP-Assay und für das lyophilisierte Enzym mittels pH-Stat-Methode mit Tributyrin als Substrat.

#### Methode 1: *p*-NPP-Assay

Lipasen spalten *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*-NPP). Diese Esterspaltung dient zur Bestimmung der Lipaseaktivität, da das entstandene *p*-Nitrophenol photometrisch bei 410 nm bestimmt werden kann (Winkler und Stuckmann 1979). Die Menge Lipase, die unter diesen Assaybedingungen 1  $\mu\text{mol}$  *p*-NPP hydrolysiert, wird als 1 Unit definiert.

Lösung 1: 90 mg *p*-Npp in 30 ml Isopropanol (5 min Ultraschallbad gelöst).

Lösung 2: 0,8 g Taurocholat + 100 mg Gummi arabicum in 100 ml 100 mM Tris/HCl pH 8 gelöst.

Lösung 3: 1 Teil Lösung 1 wurde unter Rühren zu 9 Teilen Lösung 2 gegeben.

Zur Bestimmung der Lipaseaktivität wurden zu 990  $\mu\text{l}$  Lösung 3 10  $\mu\text{l}$  der Enzymlösung gegeben. Die Messung erfolgte bei 60° C und die Zunahme der Absorption wurde bei 410 nm bestimmt (Ultraspec, Pharmacia). Aus der bestimmten Änderung der Absorption errechnet sich die Aktivität A der Lipase in U/ml wie folgt:

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

$\Delta E$ : Unterschied der Extinktion von Probe und Blindprobe. Steigung der Kurve im linearen Bereich bei Durchführung der Kinetikmessung.

$V_{\text{Test}}$ : Testvolumen, 1 ml

$t$ : Testdauer

$\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient von *p*-Nitrophenol, 1500 [ $\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ]

$d$ : Schichtdicke der Testküvette, 1 cm

$V_{\text{Probe}}$ : Probenvolumen

## Methode 2: pH-Stat-Methode

Die Aktivität der lyophilisierten Lipasen wurde mittels pH-Stat-Methode mit Tributyrin als Substrat bestimmt (nach Peled und Krenz 1981). Grundlage dabei ist die Lipase-katalysierte Hydrolyse des Triglycerides. 20 mM Tributyrin wurden in destilliertem Wasser, das 0,5 %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (w/v) und 2 % (w/v) Gummi arabicum als Stabilisator enthielt, mit einem Homogenisator (Ultraturrax T25, Janke & Kunkel, Freiburg) für sieben Minuten mit maximaler Geschwindigkeit emulgiert. 20 ml Substratlösung wurden auf 30° C erhitzt und auf pH 8,1 eingestellt. Nach der Zugabe von 10 mg in Wasser gelöster lyophilisierter Lipase, wurde die Aktivität mittels pH-Stat-Methode (Metrohm, Germany) bestimmt.

Die freigesetzten Fettsäuren werden automatisch mit 0,01 N NaOH auf einen konstanten pH von 8,1 gegenditiert. Der Verbrauch von 1 ml 0,01 N NaOH entspricht 10  $\mu\text{l}$  freigesetzter Fettsäure, daher kann leicht auf den Verbrauch pro Minute umgerechnet werden. Eine Einheit (U) Lipaseaktivität wurde definiert als Menge Enzym, die 1  $\mu\text{mol}$  Fettsäure pro Minute unter diesen Bedingungen freisetzt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$A = f_x \cdot f_y \cdot C_{\text{NaOH}} \cdot \frac{1}{V_E} \cdot \frac{\Delta x}{\Delta y}$$

A [ $\text{U mg}^{-1}$ ]:	Aktivität
$C_{\text{NaOH}}$ :	Konzentration der NaOH
$f_x$ [ $\mu\text{l mm}^{-1}$ ]:	Schreiberparameter bzgl. NaOH-Verbrauch
$f_y$ [ $\text{mm min}^{-1}$ ]:	Schreiberparameter bzgl. Reaktionszeit
$V_E$ [mg]:	Menge des eingesetzten Enzymes
$\frac{\Delta x}{\Delta y}$ [ $\text{mm mm}^{-1}$ ]:	Steigung

Vor der Enzymzugabe wurde die Autohydrolyse bestimmt, da diese in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert erfolgt. Von der Gesamthydrolyseaktivität wurde die Autohydrolyseaktivität abgezogen und somit die eigentliche Lipaseaktivität errechnet.

## 3.7 Expression und Proteingewinnung von PCL und Helferprotein

### 3.7.1 Fermentation im 5 l und 25 l Maßstab

Durch Animpfen von 20 ml LB-Amp-Medium mit 100 µl Glycerin-Dauerkultur des Wildtyps, der Mutanten und des Helferproteins (*ompAΔ70Hp* wurde benötigt, da Wildtyp und Mutanten als inaktive Zellkörper beim Zellaufschluss anfallen) wurden Vorkulturen zur Fermentation im 5 L und 25 L Maßstab als Übernachtskulturen bei 37° C hergestellt. 10 ml dieser Übernachtskulturen wurden jeweils 500 ml LB-Amp-Medium überführt und im Schüttler (200 Upm) bei 37° C bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{578} = 0,8$  inokkuliert und dann in die Fermenter in 24,5 L steriles Medium überführt. Hier wurde wiederum bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{578} = 0,8$  inokkuliert. Durch Erhöhung der Temperatur auf 42° C wurde mittels diesem Heatshock die Expression des Proteins für 4 h induziert. Um die Zunahme der Proteinmenge zu verfolgen, wurden zu Beginn der Induktion und nach jeder weiteren Stunde Proben (1,5 ml) entnommen. Nach vier Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 Upm, 20 min, 4° C) und die erhaltene Feuchtmasse bei -20° C aufbewahrt.

### 3.7.2 Zellaufschluss und Rückfaltung der *Pseudomonas cepacia* Lipase

Der chemische Aufschluss zur Freisetzung der Proteine erfolgte in Abwandlung der Methode von Quyen *et al.* (Quyen *et al.* 1999) sowohl für PCL als auch Helferprotein in *Refolding*-Puffer B (0,61 g Tris; 240 g Harnstoff 8M; 3,55 g  $Na_2HPO_4$  auf 500 ml mit  $dH_2O$  auffüllen und mit HCl auf pH 8,0 einstellen).

Dabei wurden für die Gewinnung der Lipase ca. 5 g Biofeuchtmasse der *E. coli* Zellen in 25 ml *Refolding*-Puffer B aufgenommen und für 5 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Der Zellaufschluss des Helferproteins erfolgte durch Rühren einer Suspension von 20 g Biofeuchtmasse und 100 ml *Refolding*-Puffer für ebenfalls 6 Std.

Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (4° C, 4000 Upm für 20 min) und 25 ml Lipase-Überstand und 25 ml Überstand des Helferproteins in 25 l demineralisiertem Wasser aufgenommen, gerührt und für 7 Tage bei 4° C inkubiert.

### 3.7.3 Proteingewinnung mittels *cross-flow* Filtration und Lyophilisierung

Durch die sogenannte *cross-flow* Filtration über eine 10 kDa Membran der Firma Omega (Stamford, CT, USA) erfolgte die Aufkonzentration des Lipase-Chaperone Gemisches bis zu einem Endvolumen von ca. 50 ml. Dieser aufkonzentrierte Rest wird mittels Gefriertrocknung lyophilisiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 3.8 Analytische Untersuchungen zur Enantioselektivität von Lipasen

### 3.8.1 Primäre Alkohole

Das Substrat **E** (Abbildung 16) wurde eingesetzt, um den *in silico* Assay zur Vorhersage der Enantiopräferenz von PCL gegenüber primären Alkoholen zu bestätigen. Die Substrate **A**, **B**, **C**, **D** und **E** wurden verwendet, um *in silico* Mutanten zu identifizieren, die eine veränderte Enantioselektivität zeigen. Zur Etablierung und Bestätigung der Vorhersage der veränderten Enantioselektivität wurde Substrat **E** *in vitro* auch von PCL-Mutanten L287F, L287W, L287Y und Y29W, sowie den Doppelmutanten Y29W / L287F und Y29W / L287Y umgesetzt.

10 mmol des racemischen Gemisches wurden bei  $40^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln in Toluol durch Reaktion mit 12 mmol Vinylacetat durch die Lipase in einen Ester überführt. Ein Aliquot des Überstandes wurde nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h und 24 h aus dem Reaktionsgefäß entnommen und mit Hilfe der Gaschromatographie analysiert.

Die Mutante L287F wurde von Herrn Dr. Scheib (Scheib 1999) und die beiden Doppelmutanten von Herrn Alexander Neugebauer zur Verfügung gestellt.

### 3.8.2 Carbonsäuren

Die Carbonsäuren (Abbildung 17) wurden verwendet, um den *in silico* Assay zur Vorhersage der Enantioselektivität bei der Veresterung von Carbonsäuren durch CRL zu etablieren. Ebenso wurden die Substrate **F** ((±)-2-Chlorpropionsäure), **G** ((±)-2-Chlorpropionsäure) und

**H** ((±)-2-Phenylpropionsäure) (Abbildung 17) dazu verwendet, verschiedene Mutanten *in silico* auf ihre veränderte Enantioselektivität zu testen.

Die analytische Auswertung der Umsetzung war nicht möglich, da keine Produktstandards zur Verfügung standen und die Kinetik der entstehenden Peaks nicht eindeutig zuzuordnen waren. Außerdem wurden die Edukte nur unzureichend getrennt.

### 3.8.3 Ermittlung der Produktverteilung mittels GC-Analyse

Die GC-Analyse erfolgte auf einem Tressmetrics 9001 GC mit FID auf einer 2,6-Me-3-pentyl-β-Cyclodextrin (50 % in OV1701)-Säule. Die Chromatographiesäule wurde abhängig vom jeweils analysierten Substrat vorgeheizt und in Schritten zu 10° C pro Minute bis zu einer Endtemperatur von 180° C erhitzt (Tabelle 11). Als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet. Der eingestellte Gasdruck war 130 kPa. Die Temperatur von Injektor und Detektor betrug 300° C. Die Retentionszeiten wurden mit Standards der Substrate bestimmt. Die Verwendung dieser GC-Analytik erlaubte die Trennung von Substrat und Produkten für Substrat E. Die zugehörigen Produktpeaks wurden mit Hilfe der Kinetik bestimmt. Die während der Umsetzung entstehenden Produktpeaks wurden ihrer Größe nach den abnehmenden Substratpeaks zugeordnet.

Tabelle 11: Einzelne Temperaturprogramme der Gaschromatographie für die fünf untersuchten primären Alkohole.

Substrat	Druck [psi]	Temperatur [°C]	Retentionszeit Substrate [min]	Retentionszeit Produkte [min]
<b>A:</b> (±)-1,2-Propandiol	5	50 (15 min)	R: 10,2 S: 11,9	Keine eindeutige Zuordnung möglich
<b>B:</b> 1,2-Dodecandiol	6	150 (45 min)	R: 35,7 S: 34,6	Keine eindeutige Zuordnung möglich
<b>C:</b> (±)-2-Phenyl-1-propanol	3	115 (25 min)	R: 23,8 S: 22,3	Nicht getrennt
<b>D:</b> (±)-1-Phenyl-1,2-ethandiol	5	120 (75 min)	R: 61,8 S: 60,3	Keine eindeutige Zuordnung möglich
<b>E:</b> (±)-Dihydro-5-(hydroxymethyl)-2(3H)-furanon	3	130 (40 min)	R: 31,7 S: 30,1	R: 28,5 S: 27,1



Für die anderen Substrate war die Trennung der Produkt- bzw. Eduktpeaks nicht ausreichend und eine genaue Zuordnung der Produktpeaks war durch das Vorhandensein einer sekundären Alkoholgruppe nicht möglich (Substrat **A,B** und **D**) oder die Produktpeaks wurden nicht getrennt (Substrat **C**).

Die Berechnung des E-Wertes für Substrat **E** erfolgte aufgrund der Flächenverhältnisse der Substrat- und Produktpeaks nach der in Kapitel 1.2 beschriebenen Formeln. Außerdem erfolgte eine Analyse der Peaks und eine Berechnung der Flächen durch ein Graphikprogramm (AutoCAD). Da die Trennung der Substrat- und Produktpeaks von Substrat **E** gut gelang, wurde nur ein geringer Fehler von 3 % ermittelt.

### 3.9 Verwendete Hardware, Software und Online-Datenbanken

Die *molecular modeling* Untersuchungen wurden auf folgenden Silicon Graphics Workstations (SGI) durchgeführt:

SGI	Prozessor	Arbeitsspeicher
Indigo 2	MIPS-R10000	128 MB
Octane	MIPS-R12000	256 MB
Octane 2	MIPS-R12000	512 MB

Aus den unten aufgeführten Online-Datenbanken wurden die Sequenz- und Strukturdaten entnommen und mit verschiedenen Programmen (siehe unten) weiterverarbeitet.

Programm	Verwendung	URL	Referenz
Swiss-Prot	Proteinsequenzen	<a href="http://www.expasy.ch/sprot/">http://www.expasy.ch/sprot/</a>	(Bairoch und Apweiler 1997; Bairoch und Apweiler 1999)
ClustalX	Sequenzalignment	<a href="ftp-igbmc.u-strabg.fr/pub/clustalx">ftp-igbmc.u-strabg.fr/pub/clustalx</a>	(Thompson <i>et al.</i> 1997)
Protein Databank (PDB)	Proteinstrukturen	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/">http://www.rcsb.org/pdb/</a>	(Bernstein <i>et al.</i> 1977)
InsightII Insight2000	Visualisierung	<a href="http://www.accelrys.com/about/msi.html">http://www.accelrys.com/about/msi.html</a>	-
Sybyl6.4 Sybyl6.5	Energieminimierung	<a href="http://www.tripos.com">http://www.tripos.com</a>	-
Sybyl6.4 Sybyl6.5	Molekulardynamische Simulationen	<a href="http://www.tripos.com">http://www.tripos.com</a>	-

### 3.10 Eingesetzte Lipasestrukturen

Aus der Protein Daten Banken (PDB) (Bernstein *et al.* 1977) wurden folgende Lipasestrukturen für diese Arbeit extrahiert:

Lipase	Entry	Methode	Referenz
<i>Rhizomucor miehei</i>	4tgl	X-Ray	Derewenda <i>et al.</i> 1992; Derewenda <i>et al.</i> 1992
<i>Candida rugosa</i>	1lpm	X-Ray	Cygler <i>et al.</i> 1994; Grochulski <i>et al.</i> 1994
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	1lbs	X-Ray	Uppenberg <i>et al.</i> 1995
<i>Pseudomonas cepacia</i>	2lip	X-Ray	Schrag <i>et al.</i> 1997
Schweinepankreas Lipase	1eth	X-Ray	Hermoso <i>et al.</i> 1996

### 3.11 Charakterisierung der Substrat-Bindungsstellen in Lipasen

Für die *molecular modeling* Untersuchungen dieser Arbeit waren die Kenntnis der katalytischen Triade und des *oxyanions holes* für das *docking* der Substrate von grundlegender Bedeutung. Diese Informationen können aus den Sequenz- und Strukturdaten der einzelnen Lipasen entnommen werden, da dort die betreffenden Aminosäuren bereits annotiert sind.

Tabelle 12: Katalytische Triade und *oxyanion hole* der verwendeten Lipasen

Lipase	<i>oxyanion hole</i>		Katalytische Triade		
PCL	L17	Q88	S87	D264	H286
CRL	G124	A210	S209	E341	H449
CAL-B	T40	Q106	S105	D187	H224
RML	S82	L145	S144	D203	H257
PPL	F78	L154	S153	D177	H265

Für die Orientierung und das *docking* der Substrate in der Bindungstasche sind außerdem hydrophobe und hydrophile Eigenschaften der Lipaseoberfläche wichtig. Diese konnten mit Hilfe der Berechnung der Conolly-Oberfläche (Conolly 1983) farblich dargestellt werden.

## 3.12 Manuelles *docking* der Substrate in die Bindungstasche

### 3.12.1 Primäre Alkohole

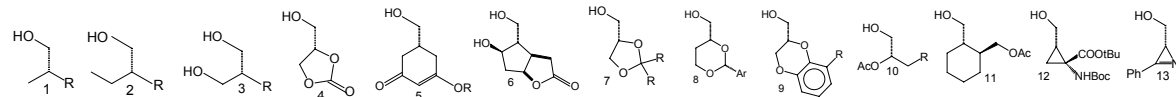
Die ausgewählten Substrate werden in zwei Gruppen unterteilt

- 1) Substrate, deren Daten über die Enantioselektivität von PCL, CAL-B, CRL, RML und PPL aus der Literatur entnommen wurden (Weissfloch und Kazlauskas 1995; Bornscheuer und Kazlauskas 1999)
- 2) Substrate, deren Daten über Enantioselektivität selber bestimmt und zudem auch für das Design von Mutanten der PCL verwendet wurden. Zwei dieser Substrate wurden auch herangezogen, um die Enantioselektivität von CRL, CAL-B und RML gegenüber primären Alkoholen zu beschreiben.

Bei der Auswahl der Substrate der Gruppe 1) für PCL wurde darauf geachtet, dass sie das breite Spektrum an Strukturen und chemischen Verbindung von primären Alkoholen abdecken, um ein allgemeingültiges Modell zur Vorhersage der Enantiopräferenz zu etablieren. Es wurden kleine, flexible, rigide bis hin zu sehr großen und sperrigen Substraten verwendet, mit und ohne Sauerstoff am Stereozentrum (Tabelle 13). Bei den Reaktionen zur experimentellen Bestimmung der Enantioselektivität handelt es sich um die PCL-katalysierte Esterhydrolyse (Terao *et al.* 1988; Egri *et al.* 1996) und um die Veresterung mit Vinylacetat (Gaziola *et al.* 1996).

Viele dieser Substrate zeigen strukturelle Ähnlichkeit, unterscheiden sich aber in ihrer Enantioselektivität. Einige besitzen völlig verschiedene Strukturen, zeigen aber ähnliche Enantioselektivität.

Tabelle 13: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Substrate, deren Daten über Enantioselektivität der PCL aus der Literatur entnommen wurden (Weissfloch und Kazlauskas 1995; Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Oberhalb der Tabelle sind die Strukturen 1-13 aufgeführt, die verschiedenen lange Reste R, die in der Tabelle genau beschrieben sind, besitzen. Es wurden nur Substrate mit einem E-Wert 2 oder größer ausgewählt. Neben den Strukturen sind noch das jeweils bevorzugte Enantiomer und der experimentell bestimmte E-Wert aufgelistet.

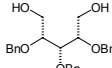
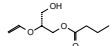
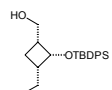
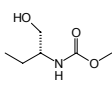
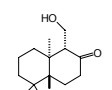
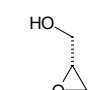
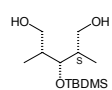
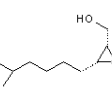
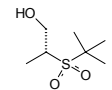
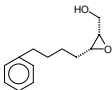
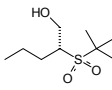
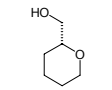
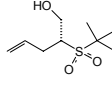
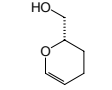
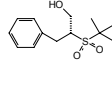
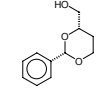


Nr.	Struk.	R	Bev. Enant.	E	Nr.	Struk.	R	Bev. Enant.	E
1	1	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	6	26	3	- OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	20
2	1	- CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	9	27	3	- OCH <sub>2</sub> Ph	S	24
3	1	- CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	S	6	28	4		S	15
4	1	- CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	S	15	29	5	- CH <sub>3</sub>	S	14
5	1	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	S	11	30	5	- CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	S	>50
6	1	- <i>trans</i> -CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>3</sub>	S	13	31	6		S	>100
7	1	- CH <sub>2</sub> Ph	S	20	32	7	- CH <sub>3</sub>	S	7
8	1	- CH <sub>2</sub> (2-thiophene)	S	>24	33	7	- CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	4
9	1	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SPh	S	21	34	7	- Ph	S	5
10	1	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> Ph	S	21	35	7	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -	S	3
11	1	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	S	4	36	7	- CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	S	23
12	1	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> Ph	S	20	37	7	- CH <sub>2</sub> Ph	S	9
13	1	- CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> Ph	R	24	38	8	- Ph	S	>50
14	1	- CH <sub>2</sub> OC(O)Ph	R	22	39	8	- 4-OCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S	>50
15	1	- CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> OH	S	>50	40	9		R	16
16	2	- CH <sub>2</sub> OAc	R	16	41	10	- <i>i</i> -Pr	S	>100
17	2	- CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	7	42	10	- <i>t</i> -Bu	S	>100
18	3	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CHCH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> <i>i</i> -Pr	R	13	43	10	- Ph	S	>100
19	3	- CH <sub>2</sub> -3,4-OCH <sub>2</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	R	>50	44	10	- Et	S	4
20	3	- CH <sub>2</sub> -3,4-(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	R	>50	45	10	- <i>n</i> -Bu	S	5
21	3	- CH <sub>2</sub> -3,4,5-(CH <sub>3</sub> O) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	R	20	46	10	- <i>n</i> -decyl	S	6
22	3	- CH <sub>2</sub> -4-Ph-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	R	>50	47	10	- benzyl	S	7
23	3	- CH <sub>2</sub> -Ph	R	>50	48	11		S	33
24	3	- CH <sub>2</sub> -1-naphtyl	R	50	49	12		S	5
25	3	- OCH <sub>3</sub>	S	5	50	13		R	>50

Für die *molecular modeling* Untersuchungen wurde der erste tetraedrische Zwischenzustand der Esterhydrolyse der Butyrate von primären Alkoholen verwendet, wobei das Substrat kovalent an die Lipase gebunden ist. Die Fettsäurekette wurde in den *hydrophobic crevice* orientiert (Pleiss *et al.* 1998). Neben der funktionellen C-OH-Gruppe befinden sich noch drei unterschiedliche Substituenten am chiralen Zentrum eines primären Alkohols. Der kleinste Substituent ist das H-Atom. Dann befinden sich noch zwei weitere Substituenten, meist Kohlenstoffketten am Stereozentrum, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge in den großen und mittleren Substituenten unterschieden werden. Der große Substituent der Alkoholgruppe wurde sowohl in den *hydrophobic dent* (Zuegg *et al.* 1997; Scheib *et al.* 1998;

Scheib 1999; Scheib *et al.* 1999; Schulz *et al.* 2000), als auch in den *hydrophilic trench* (Tuomi und Kazlauskas 1999; Schulz *et al.* 2000) orientiert (siehe auch Abbildung 14). Der OH-funktionale Bereich der Substrate wurde so modelliert, dass die katalytischen Wasserstoffbrückenbindungen (Derewenda *et al.* 1995) des positiv geladenen Imidazolrings (Kossiakkoff *et al.* 1981) des aktiven Histidins ausgebildet werden können. Die stabilisierenden Wechselwirkungen der das *oxyanion* bildenden Aminosäuren wurden ebenfalls ausgerichtet. Während der Simulation bewegte sich das Substrat aus dem *hydrophilic trench*, während das im *hydrophobic dent* orientierte Substrat in dieser Konformation blieb. Es konnte festgestellt werden, dass die Substrate unabhängig von der Startstruktur im *hydrophobic dent* binden.

Tabelle 14: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Substrate zur Untersuchung der Enantioselektivität von CAL-B, CRL, RML und PPL. Die Daten über die Enantioselektivität der Lipasen wurden aus der Literatur entnommen. Es ist immer das bevorzugte Enantiomer dargestellt.

Lipase	Substrat	E-Wert	Lipase	Substrat	E-Wert
CRL 1		7	RML 1		4
CRL 2		8	RML 2		53
CRL 3		10	PPL 1		13
CRL 4		12	PPL 2		13
CAL-B 1		18	PPL 3		50
CAL-B 2		6	PPL 4		21
CAL-B 3		6	PPL 5		30
CAL-B 4		49	PPL 6		50

Für alle anderen in dieser Arbeit untersuchten Lipasen (CAL-B, CRL, RML, PPL) wurde die Fettsäurekette ebenfalls in den *hydrophobic crevice* und der große Substituent am

Stereozentrum der primären Alkohole (Tabelle 14) in den *hydrophobic dent* oder in eine diesem Bindungstaschenbereich entsprechende Region der Lipase orientiert.

Bei der Auswahl der Substrate der Gruppe 2) wurden dieselben Kriterien angewendet wie für die Substrate der Gruppe 1); sehr kleine (**A**) und flexible (**B**), bis zu mehr rigiden und sperrigen (**C**, **D** und **E**) Substraten. Es wurden hier ebenfalls Substrate mit einem Sauerstoff am Stereozentrum ausgewählt (**A**, **B**, **D** und **E**) und ein Substrat mit dem Stereozentrum in einer Ringstruktur (**E**) (siehe Abbildung 16). Bei den Reaktionen handelt es sich um die PCL-katalysierte Veresterung mit Vinylacetat.

Die Fettsäurekette wurde in den *hydrophobic crevice* und der große Substituent am Stereozentrum der Alkoholgruppe in den *hydrophobic dent* (Zuegg *et al.* 1997), die BTL (Bindungstasche für den großen Rest), orientiert. Der mittlere Substituent wurde in die BTM (Bindungstasche für den mittelgroßen Rest) orientiert.

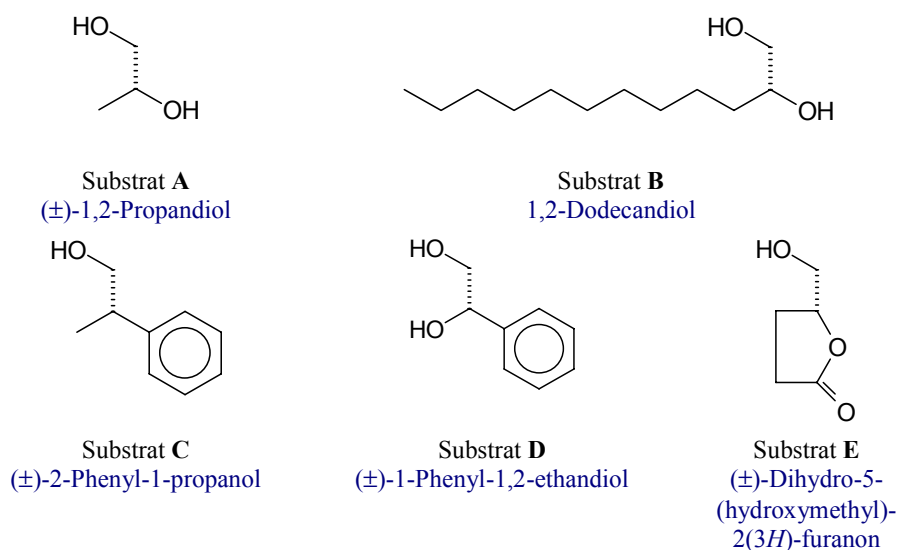


Abbildung 16: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Substrate, deren Daten über Enantioselektivität von Lipasen teilweise selber bestimmt wurden und zum *in silico* Design von PCL-Mutanten verwendet wurden. Es ist jeweils das vom PCL-Wildtyp bevorzugte Enantiomer dargestellt.

### 3.12.2 Carbonsäuren

Für die *molecular modeling* Studien wurden der erste tetraedrische Zwischenzustand der Esterhydrolyse der Carbonsäuren, analog zu den primären Alkoholen untersucht. Die Substrate wurden dafür mit Heptanol verestert. Die ausgewählten Substrate unterteilen sich in drei Gruppen

- 1) Substrate, deren experimentell bestimmten E-Werte der CRL katalysierten Esterhydrolyse aus der Literatur entnommen wurden (Bornscheuer und Kazlauskas 1999).
- 2) Substrate, die nur für die Etablierung des *in silico* Assays verwandt wurden und für die keine experimentell bestimmten E-Werte vorlagen.
- 3) Substrate, deren Daten über die Enantioselektivität von PCL aus der Literatur entnommen wurden (Bornscheuer und Kazlauskas 1999).

Für die Gruppe 1) und 3) wurden alle vorhandenen Substrate aus der angegebenen Literatur entnommen. Zur Validierung des Modells wurden drei weitere Substrate mit Wildtyp und Mutanten der CRL umgesetzt (Gruppe 2)). In Abbildung 17 und Abbildung 18 sind alle untersuchten Substrate aufgeführt. Die Alkoholreste wurden sowohl für die CRL, als auch für die PCL in die Bindungstaschenregion für den großen Alkoholrest (BTL), genauer den *hydrophobic dent*, gebunden. Auch bei Carbonsäuren befinden sich neben der funktionellen COOH-Gruppe noch drei unterschiedliche Substituenten am chiralen Zentrum. Der kleinste Substituent ist ebenfalls das H-Atom. Dann befinden sich noch zwei weitere Substituenten, meist Kohlenstoffketten am Stereozentrum, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge in den großen und mittleren Substituenten unterschieden werden. Die Carbonsäure wurde in den Tunnel der CRL orientiert, wobei der große Substituent von der Alkoholbindungstasche weg weiter in den Tunnel hinein reicht (Holmquist 1996; Botta *et al.* 1997).

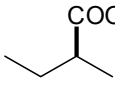
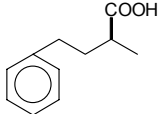
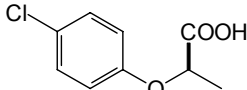
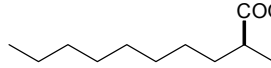
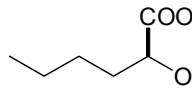
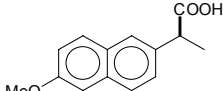
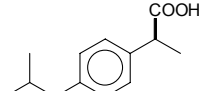
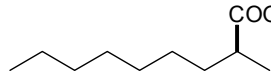
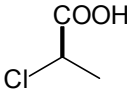
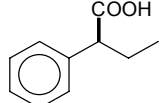
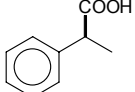
 Substrat 51: E=5	 Substrat 52: E=40	 Substrat 53: E>100	 Substrat 54: E>50
 Substrat 55: E=88	 Substrat 56: E>100	 Substrat 57: E>100	 Substrat 58: E=3
 Substrat F (±)-2-Chlor-propionsäure	 Substrat G (±)-2-Phenylbuttersäure	 Substrat H (±)-2-Phenylpropionsäure	

Abbildung 17: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Substrate, deren experimentell bestimmten E-Werte der CRL aus der Literatur entnommen (Substrate 51-58) (Bornscheuer und Kazlauskas 1999) und für die Vorhersage von Mutanten eingesetzt wurden (Substrat F, G, H). Es ist jeweils das von der CRL bevorzugte Enantiomer dargestellt.

Es liegen keine Daten über *molecular modeling* Untersuchungen über die Bindung und das *docking* von Carbonsäuren in der PCL vor. Daher erfolgte die sinnvolle Annahme, dass der Alkoholrest im *hydrophobic dent* der PCL bindet und die Carbonsäure im *hydrophobic crevice*. Aus diesem Grund erfolgte das *docking* der Substrate mit dem veresterten Alkoholrest im *hydrophobic dent* und der Carbonsäure im *hydrophobic crevice*.

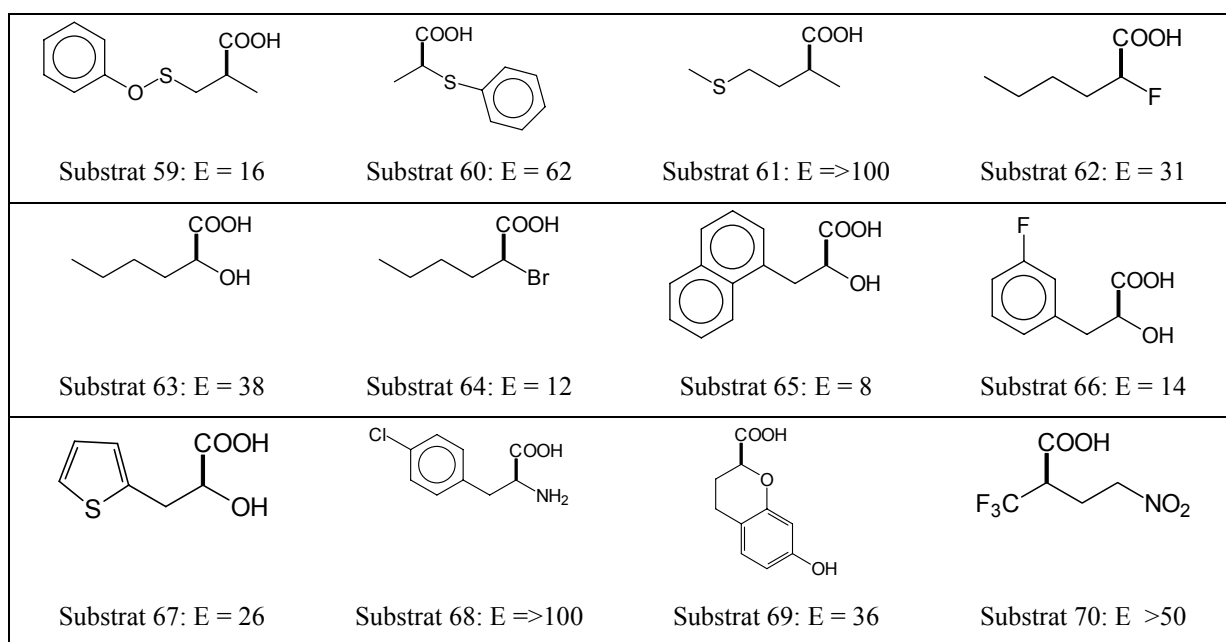


Abbildung 18: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Substrate, deren experimentell bestimmte Enantioselektivität der PCL aus der Literatur entnommen wurde (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Es ist jeweils das von der PCL bevorzugte Enantiomer dargestellt.

### 3.13 Anpassung der Partiaalladungen des ersten tetraedrischen Intermediats und Minimierung

Die Partiaalladungen der einzelnen Atome wurde in sybyl6.5 nach der Methode von Gasteiger-Hückel zugewiesen (Gasteiger und Marsili 1980). Für den tetraedrischen Übergangszustand ist das kovalent gebundene Serin, das katalytische Histidin und das Substrat bei dieser Methode allerdings nicht parametrisiert. Aus diesem Mangel heraus wurden einige Partiaalladungen nach *MNDO94/PM3* (Stewart 1989; Stewart 1989) (Dewar und Thiel 1977; Dewar und Thiel 1977) modifiziert.



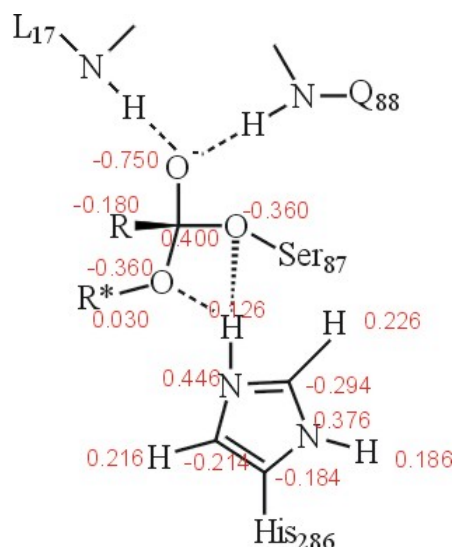


Abbildung 19: Schematische Darstellung des ersten tetraedrischen Intermediats bei der Enzym-katalysierten Esterhydrolyse durch PCL (katalytisches Histidin 286, katalytisches Serin 87 und Substrat, sowie die Aminosäuren des *oxyanion hole* Leucin 17 und Glutamin 88). Die hier rot aufgeführten Partialladungen wurden dahingehend modifiziert (verändert nach Scheib 1999).

Nach der Änderung der Partialladungen wurde der gesamte Enzym-Substrat-Komplex minimiert. Solch eine Energieminimierung ist nach dem manuellen Einbau der Substrate erforderlich, da energetisch ungünstige Bindungswinkel, -längen und Torsionswinkel die innere Energie des Systems erhöhen und unter Umständen sogar zu einem Abbruch der folgenden MD-Simulation führen können. Bis auf die Veränderungen in Tabelle 13 wurden die Standardeinstellung des Programms *sybyl6.5* verwendet. Da durch den manuellen Einbau die Substrate gelegentlich verzerrt sind, ist eine Vorminimierung (SIMPLEX, ableitungsfreie Iteration) notwendig. Der Powell Algorithmus legt im Anschluss eine Richtung im  $n$ -dimensionalen Raum fest und diese Richtung wird solange verfolgt, bis das lokale Minimum erreicht wird (Powell 1977).

Tabelle 15: Einstellungen bei der Durchführung einer Energieminimierung

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

Im Unterschied zur MD-Simulation, welches ein globales Minimum des untersuchten Komplexes erreicht, führt eine Energieminimierung nur bis zum nächsten lokalen Minimum (Abbildung 19). Die Atomkoordinaten werden, beruhend auf einer iterativen Technik, solange verändert, bis ein lokales Minimum erreicht wird.

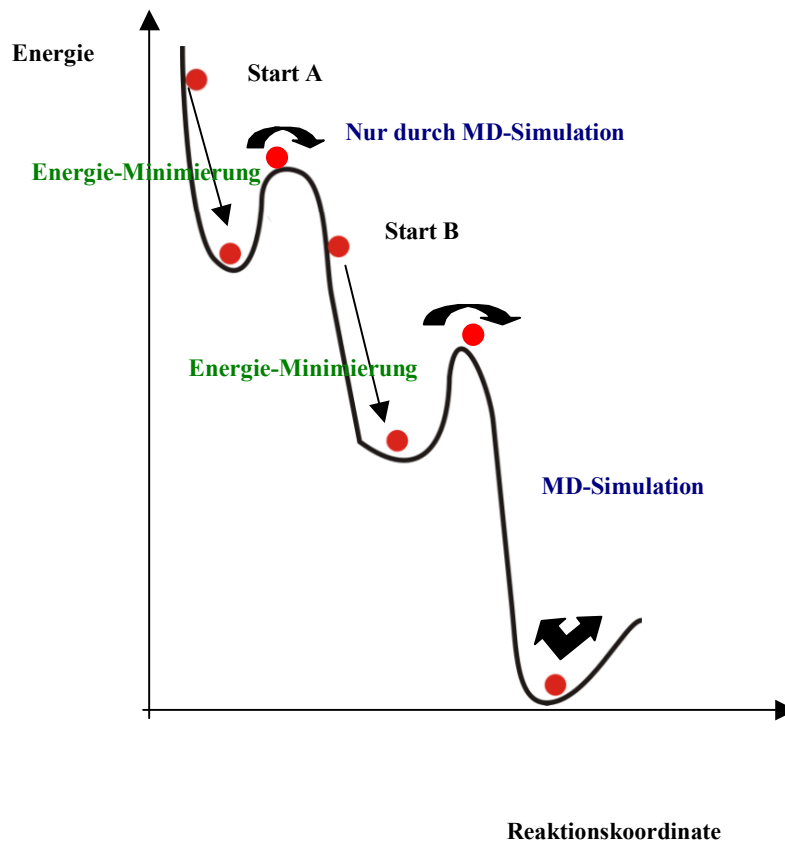


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Energieprofils entlang einer Reaktionskoordinate. Durch die Energieminimierung wird ausgehend von der Startstruktur ein lokales Minimum erreicht, wohingegen eine molekulardynamische (MD-) Simulation das Erreichen eines globalen Energieminimums ermöglicht (verändert nach Scheib 1999).

### 3.14 Molekulardynamische Simulationen; *molecular modeling*

In der Einleitung sind die Grundlagen der molekulardynamischen Simulationen beschrieben. In dieser Arbeit wurde das Tripos Force Field des Programms sybyl6.5 verwendet. Alle Simulationen wurden im Vakuum durchgeführt und somit keine Lösungsmittelleffekte berücksichtigt. In Tabelle 13 sind die Parameter der MD-Simulationen aufgeführt. Der Enzym-Substrat-Komplex wurde langsam aufgeheizt, das System für 2500 fs bei 100K equilibriert und die letzten 500 fs zur Auswertung der Simulation herangezogen. Die *backbone* Atome wurden wegen des fehlenden Lösungsmittels während der gesamten Simulation festgehalten. Ohne diese Fixierung hätte es zur Deformation der Lipase oder sogar Entfaltung des Proteins kommen können.

Tabelle 16: Parametereinstellungen der durchgeführten molekulardynamischen Simulationen an Lipasen.

Phase	Dauer [fs]	Temperatur [K]	Schrittweite [fs]	Kopplung [fs]	Startgeschwindigkeit
Heizphase 1	1000	5	1,0	100	previous
Heizphase 2	500	10	1,0	100	previous
Heizphase 3	500	20	1,0	100	previous
Heizphase 4	500	30	1,0	100	previous
Heizphase 5	500	40	1,0	100	previous
Heizphase 6	500	50	1,0	100	previous
Heizphase 7	500	60	1,0	100	previous
Heizphase 8	500	70	0,5	100	previous
Heizphase 9	500	80	0,5	100	previous
Equilibrierungsphase	2500	100	0,5	100	previous
Produktionsphase	500	100	0,5	100	previous

Es wurden verschiedene Simulationslängen (bis 20 ps), *simulated annealing* (heizen auf 100 K, Produktion und anschließend abkühlen auf 5K) und verschiedene Simulationstemperaturen (bis 200 K) untersucht. Die so erhaltenen Strukturen waren nahezu identisch, da die Substrate sich schon während der Heizphase orientieren und die Relaxation des Enzym-Substrat-Komplexes schnell erreicht ist. Dies kann auch durch den Vergleich der Energien verschiedener Simulationen, deren Verlauf und Equilibrierung bei verschiedenen Temperaturen verdeutlicht werden (Abbildung 21). Daher war eine kurze Simulationslänge und eine Simulationstemperatur von 100 K für diese Substratklassen ausreichend.

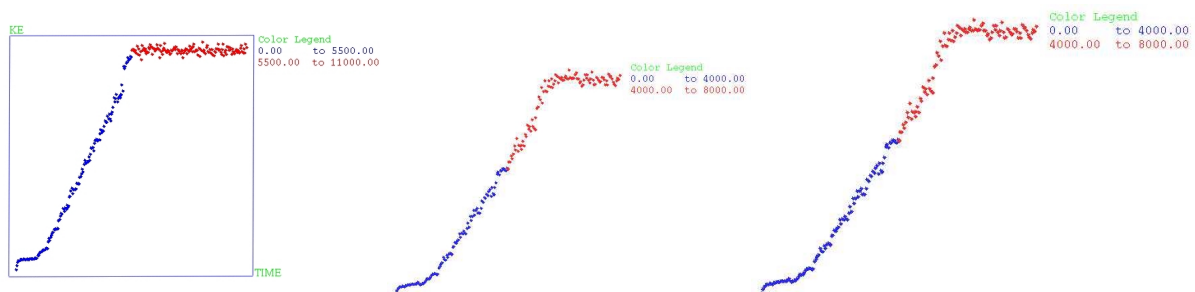


Abbildung 21: Verlauf der kinetische Energie und die Equilibrierung während der Produktionsphase einer 11ps langen Simulation bis 150 K (links), einer 8 ps Simulation bis 200 K (Mitte) und einer 8 ps Simulation bis 100 K (rechts).

### 3.15 Auswertung molekulardynamischer Simulationen

Für die Auswertung der MD-Simulationen wurde neben der Geometrie der mittleren Struktur auch die Trajektorie herangezogen.

#### **Trajektorie**

Mit Hilfe des Programms sybyl6.5 lassen sich die Trajektorien der Simulationen darstellen. Dies ermöglicht eine Analyse der Qualität der Simulation und der spezifischen Wechselwirkung des Substrates mit der Lipase. Während der Trajektorie sollte es nicht zu einem Springen oder Rotieren des Substrates in der Bindungstasche kommen, was durch zu schnelles Aufheizen möglich ist. Solche energetisch ungünstigen Regionen werden während der Trajektorie rot dargestellt und lassen sich somit identifizieren. Die Bewegung des Substrates und die Ausrichtung der Aminosäuren der Bindungstasche der Lipase geben erste Hinweise auf die Wechselwirkungen und spezielle Bindungsregionen des Substrates.

#### **Mittlere Struktur**

Nach der Überprüfung der Trajektorie wurden die letzten 10 Strukturen der Produktionsphase verwendet, um eine mittlere Struktur der Enzym-Substrat-Komplexe zu erstellen. In der Produktionsphase ist das System hinreichend entspannt. Allerdings ist zu beachten, dass das System nicht um zwei relevante Grenzstrukturen schwingt, da eine Mittelwertbildung keinen realen Zustand beschreiben würde.

Zur Auswertung der MD-Simulationen wurde die Trajektorie beobachtet und die Geometrie des Enzym-Substratkomplexes analysiert.

#### **3.15.1 Bestimmung der Substratgeometrie für primäre Alkohole**

Nach der Auswertung der Trajektorie konnte festgestellt werden, dass sich die Substrate in eine bestimmte Region der Bindungstasche bewegen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob diese Bewegung durch eine Entfernung, einen Winkel oder eine Torsion in den mittleren Strukturen der Enzym-Substrat-Komplexe beschrieben werden kann.

Es wurde ein Torsionswinkel gefunden, der diese Bewegung beschreibt (Abbildung 22):  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$ .  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  ist der Torsionswinkel vom tetraedrischen Kohlenstoff ( $\text{C}_{\text{tetr.}}$ ) über den Alkoholsauerstoff ( $\text{O}_{\text{Alk.}}$ ) zum chiralen Kohlenstoff ( $\text{C}^*$ ) im Alkoholsubstrat. Er beschreibt die Bewegung der großen Substituenten der Substrate in eine bestimmte Region der Bindungstasche der Lipase, das *His gap*. Das *His gap* wird in der PCL durch das katalytische H286 und seinen Nachbarn L287 gebildet.

Für die *molecular modeling* Studien zur enantioselektiven Spaltung von primären Alkoholen wurde ein Torsionswinkel gemessen,  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$

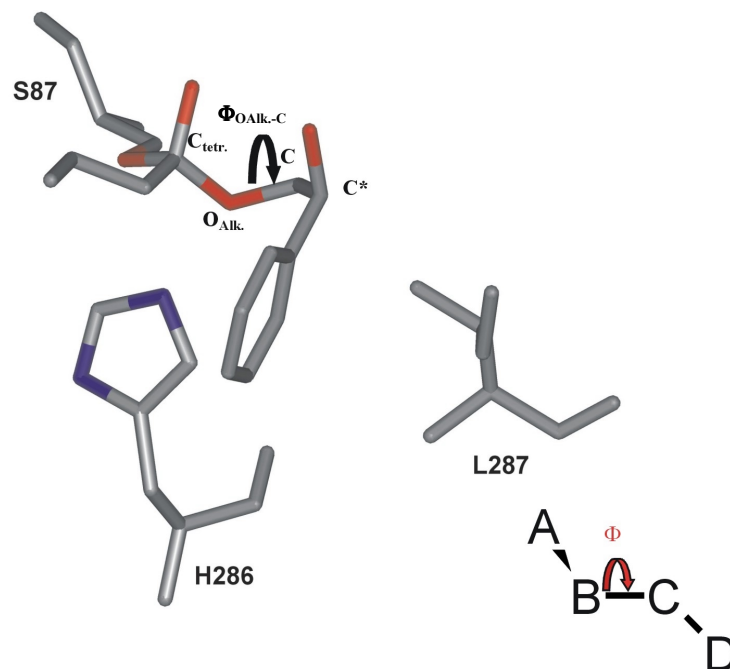


Abbildung 22: Definition der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$ . Unten rechts ist die Definition eines Torsionswinkels zwischen den aus den Atomen A, B, C und B, C, D aufgebauten Ebenen abgebildet.

### 3.15.2 Bestimmung der Substratgeometrie für Carbonsäuren

Auch für diese Substratklasse konnte die Bewegung in ein spezielles Strukturmotiv beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden hier ebenfalls Torsionen, Winkel und Distanzen in den mittleren Strukturen der Enzym-Substrat-Komplexe untersucht.

Auch hier konnte ein Torsionswinkel gefunden werden, der die Bewegung der Substrate beschreibt. Daneben konnte noch eine Distanz analysiert werden, welche mit der experimentell bestimmten Enantioselektivität einhergeht.

Für die *molecular modeling* Studien zur enantioselektiven Spaltung von Carbonsäuren wurde ein Torsionswinkel,  $\Phi_{\text{C}_{\text{tetr.}}-\text{C}^*}$  und eine Distanz,  $d_{\text{HN}\epsilon-\text{OAlk.}}$  gemessen (Abbildung 23).  $\Phi_{\text{C}_{\text{tetr.}}-\text{C}^*}$  ist der Torsionswinkel vom Alkoholsauerstoff ( $\text{O}_{\text{Alk.}}$ ) über tetraedrischen Kohlenstoff ( $\text{C}_{\text{tetr.}}$ ) und dem chiralen Kohlenstoff ( $\text{C}^*$ ) zum kleinen Substituenten am Stereozentrum der Carbonsäure. Die Distanz  $d_{\text{HN}\epsilon-\text{OAlk.}}$  wird zwischen dem H(N $\epsilon$ ) des katalytischen H449 und dem Alkoholsauerstoff gemessen.

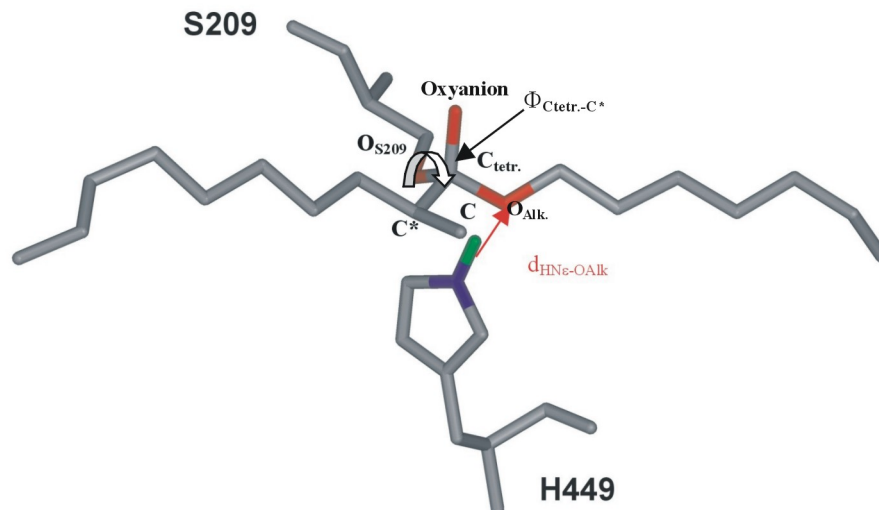


Abbildung 23: Definition der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{C}_{\text{tetr.}}-\text{C}^*}$  und des Abstandes  $d_{\text{HN}\epsilon-\text{OAlk.}}$ .

### 3.15.3 Auswertung molekulardynamischer Simulationen an Komplexen der PCL mit Carbonsäureestern

Ebenso wie die Untersuchung zur Enantioselektivität von PCL gegenüber primären Alkoholen und CRL gegenüber Carbonsäuren, erfolgte die Auswertung der molekulardynamischen Simulationen von PCL mit Carbonsäureestern durch Analyse der Enzym-Substrat-Komplex-Geometrie der mittleren Struktur und der Trajektorie.

Allerdings konnte hier keine eindeutige Zuordnung eines Torsionswinkel oder einer anderen geometrischen Größe zur Beschreibung der experimentellen Resultate herangezogen werden.

## 4 ERGEBNISSE

Die Arbeit unterteilt sich in verschiedene Abschnitte. Als erstes wurde versucht, die Enantiopräferenz der *Pseudomonas cepacia* Lipase (PCL) gegenüber primären Alkoholen anhand eines Computermodells vorherzusagen. Dazu wurden Substrate, deren Daten über die Enantiopräferenz der Literatur entstammen, molekulardynamisch (*in silico*) untersucht. Der somit etablierte *in silico* Assay wurde durch die Vorhersage der Enantiopräferenz anhand des Modells, sowie durch die anschließende experimentelle Untersuchung von einem neuen Substrat bestätigt. Im nächsten Schritt wurde versucht, dieses Modell auf die Vorhersage der veränderten Enantioselektivität von rekombinanter PCL und PCL-Mutanten zu erweitern. Deshalb wurden die schon zur Bestätigung des Modells zur Vorhersage der Enantiopräferenz eingesetzte Substrate mit PCL-Mutanten *in silico* untersucht, um Mutanten zu finden, welche die Enantioselektivität verändern. Erfolgversprechende Mutanten wurden anschließend im Labor hergestellt und die E-Werte der Mutanten gegenüber einem Substrat bestimmt. Es gelang darüber hinaus, für die PCL-Mutanten die veränderte Aktivität gegenüber dem experimentell untersuchten Substrat mit dem Computermodell zu erklären. Eine Besonderheit stellen Substrate dar, die ein Stereozentrum in einer Ringstruktur besitzen. Daher wurden diese Substrate nochmals eingehender untersucht. Ebenfalls wurde versucht, das Computermodell auf die Vorhersage der Enantiopräferenz und der Enantioselektivität von anderen Lipasen gegenüber primären Alkoholen auszuweiten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Enantioselektivität von Lipasen gegenüber chiralen Carbonsäuren untersucht. Zuerst wurde ebenfalls anhand von Literaturdaten ein Modell zur Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität von *Candida rugosa* Lipase (CRL) gegenüber dieser Substratklasse etabliert. Dieses wurde zur Vorhersage von Mutanten mit veränderter Enantioselektivität eingesetzt. Darüber hinaus erfolgte der Versuch, dieses Modell auf die Enantioselektivität der PCL gegenüber chiralen Carbonsäuren auszuweiten.

## 4.1 Primäre Alkohole

### 4.1.1 Docking der Substrate in die Bindungstasche der PCL

Bisher gibt es keine veröffentlichte experimentell bestimmte Struktur einer Lipase mit einem primären Alkohol als gebundenem Substrat. Verschiedene Konformationen wurden daher als mögliche Bindung dieser Substrate durchgeführt (*docking*) und anhand *molecular modeling* Studien untersucht. Die *molecular modeling* Untersuchungen dieser Arbeit wurden am ersten tetraedrischen Intermediat der Esterhydrolyse, dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion, der kovalent an das S87 gebundenen Butyrate primärer Alkohole durchgeführt. Die Substrate wurden ohne die Verwendung einer automatischen *Dockingsoftware* in die Bindungstasche der PCL orientiert. Untersuchungen der Bindungstaschencharakteristika der PCL lieferten charakteristische Bindungsbereiche, an die hydrophobe Fettsäureketten und der Alkoholrest binden können. Diese Informationen in Verbindung mit der Kenntnis des Katalysemechanismus (siehe Kapitel 1.1.7) und der Orientierung des Oxyanions im *oxyanion hole* ergaben für PCL, dass die Bindung der mit dem primären Alkohol veresterten Fettsäure an den sogenannten *hydrophobic crevice* erfolgt. Analog zu sekundären Alkoholen postulierten Zuegg *et al.* die Bindung des großen Substituenten am Stereozentrum der primären Alkohole im *hydrophobic dent* (BTL) (Zuegg *et al.* 1997). Tuomi *et al.* schlugen als alternative Bindungstasche für den großen Substituenten den *hydrophilic trench* (BTM) vor (Tuomi und Kazlauskas 1999). Daher wurde das *docking* der Substrate in diesen beiden Orientierungen in die Bindungstasche der PCL durchgeführt. Der mittlere Substituent der Substrate wurde mit einem Minimum an sterischen Interaktionen mit der Lipase verbunden, möglichst in eine der beiden Bindungstaschenregion, in die der große Rest nicht bindet.

Die Beobachtung der Trajektorie zeigte, dass die Startkonformation mit dem großen Substituenten im *hydrophobic dent* (BTL) stabil war, während eine Änderung der Konformation des großen Substituenten zum *hydrophobic dent* hin beobachtet wurde, wenn er im *hydrophilic trench* (BTM) platziert wurde. Nur die nicht bevorzugten Enantiomere von zwei Substraten blieben mit einem Substituenten während der gesamten Simulationszeit im *hydrophilic trench*. Diese Substrate hatten jeweils zwei große Substituenten am Stereozentrum, die sich in ihrer Größe nur wenig unterschieden (Substrate 34 und 37 in Tabelle 17).



#### 4.1.2 Modell zur Vorhersage der Enantiopräferenz von PCL gegenüber primären Alkoholen

##### *Substrate*

Zur Etablierung eines allgemeingültigen Modells zur Vorhersage der Enantiopräferenz von PCL gegenüber primären Alkoholen wurden die experimentellen Daten über die Enantioselektivität der PCL gegenüber 50 primären Alkoholen aus der Literatur entnommen (Weissfloch und Kazlauskas 1995; Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Diese experimentellen Daten wurden entweder durch Hydrolyse oder Veresterung mit kommerzieller PCL bestimmt. Die Substrate zeigten eine große strukturelle Vielfalt und Spanne an E-Werten ( $E = 2 - 100$ ) und sind repräsentativ für das breite Spektrum an primären Alkoholen. Es wurden sehr kleine, flexible, größere und sehr rigide Substrate ausgewählt (Tabelle 13), mit und ohne Sauerstoff am Stereozentrum. Einige Substrate besitzen die gleiche Grundstruktur und unterscheiden sich nur in der Kettenlänge der großen Substituenten.

##### *Simulationen*

Die Enzym-Substrat-Komplexe wurden minimiert und anschließend mit Hilfe von molekulardynamischen Simulationen weiter relaxiert. Bei den molekulardynamischen Simulationen war ein langsames Aufheizen des Systems nötig, da ein zu schnelles Aufheizen zu einer Rotation der flexiblen Substrate innerhalb der Bindungstasche führte. Ebenso war eine lose Kopplung mit vergleichsweise langer Relaxationszeit von 100 fs nötig, um Störungen im System, die zu einer Rotation der Substrate in der Bindungstasche führten, zu unterdrücken. Die Trajektorie der letzten 0,5 ps der Simulation wurde gemittelt und die resultierende mittlere Struktur geometrisch untersucht. Es wurden verschiedene Torsionswinkel und Winkel in den Substraten und Abstände zwischen den Seitenketten der Lipase und den Substraten gemessen. Außerdem wurde die Trajektorie der gesamten Simulation betrachtet.

##### *His gap*

Beim Betrachten der Trajektorien und der mittleren Strukturen konnte festgestellt werden, dass sich die Substrate während der Simulation alle in das *His gap* orientieren, einem speziellen Strukturmotiv im *hydrophobic dent*, das in der PCL von H286 und seinem Sequenz- und Strukturnachbarn L287 gebildet wird (Abbildung 24). Der große Substituent

des bevorzugten Enantiomers bewegt sich im Vergleich zum nicht bevorzugten Enantiomer aufgrund seiner Geometrie und der daraus folgenden Orientierung in der Bindungstasche immer tiefer als das nicht bevorzugte Enantiomer oder sogar ausschließlich in das *His gap*. Wie in Abbildung 24 dargestellt, orientiert sich der mittlere Substituent des bevorzugten Enantiomers senkrecht zum *His gap*. Der mittlere Substituent der nicht bevorzugten Enantiomere liegt um 90° gedreht über dem L287 und verhindert somit eine tiefe Bewegung des großen Substituenten in das *His gap*. Beim bevorzugten Enantiomer von sperrigen Substraten konnte ein „Wegdrücken“ des Imidazolringes des katalytischen H286 beobachtet werden, was zu einer Vergrößerung des *His gaps* führte. Dadurch können sich Substrate tiefer in das *His gap* hineinbewegen.

Das *His gap* wurde auch schon als essentiell für die Stereoselektivität von Lipasen gegenüber Triacylglyceriden und Analoga beschrieben, einer speziellen Gruppe der primären Alkohole (Scheib *et al.* 1998).

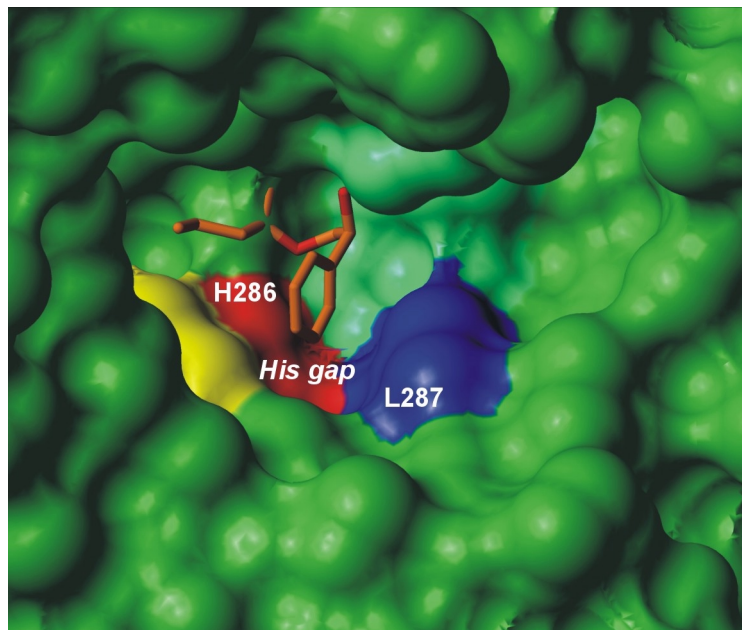


Abbildung 24: Die Substrate bewegen sich während der Simulation in eine bestimmte Region im *hydrophobic dent*, das *His gap*. Das *His gap* wird durch die Aminosäuren H286 (rot) und L287 (blau) in der PCL gebildet.

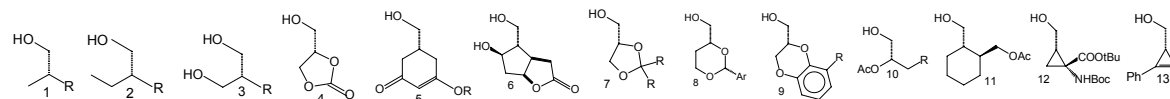
#### *Vorhersage der Enantiopräferenz anhand eines Torsionswinkels*

Durch die Bewegung des Substrates in das *His gap* kommt es zu einer Änderung in der Substratgeometrie. Da das Oxyanion fixiert ist, muss diese Bewegung mit einer Drehung um eine Bindung zwischen dem S87-Sauerstoffatom oder einem Kohlenstoffatom der Fettsäurekette und dem großen Substituenten korrelieren. Dadurch kommt es zu einer signifikanten Änderung des betreffenden Torsionswinkels im Vergleich zur Startstruktur und



visuelle Analyse der Bindung der beiden Enantiomere im *His gap* ergab, dass auch bei diesen Substraten das bevorzugte Enantiomer tiefer im *His gap* bindet.

Tabelle 17: Die Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk-C}}$  der bevorzugten und nicht bevorzugten Enantiomere von 50 primären Alkoholen, deren Daten über die Enantioselektivität aus der Literatur entnommen wurden (Weissfloch und Kazlauskas 1995; Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Oberhalb der Tabelle sind die Strukturen 1-13 aufgeführt, die verschieden lange Reste R, die in der Tabelle genau beschrieben sind, besitzen. Bis auf eine Ausnahme ist der Torsionswinkel für das bevorzugte Enantiomer immer größer als für das nicht bevorzugte.



Nr	Struk	R	bev. Enant	E	Torsionswinkel [°]		Nr	Struk	R	bev. Enant	E	Torsionswinkel [°]	
					(R)	(S)						(R)	(S)
1	1	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S <sup>+</sup>	6	81	153	26	3	-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S <sup>-</sup>	20	78	167
2	1	-CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S <sup>+</sup>	9	74	92	27	3	-OCH <sub>2</sub> Ph	S <sup>-</sup>	24	77	207
3	1	-CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	S <sup>+</sup>	6	75	229	28	4		S <sup>-</sup>	15	107	157
4	1	-CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	S <sup>+</sup>	15	101	214	29	5	-CH <sub>3</sub>	S <sup>-</sup>	14	79	86
5	1	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	S <sup>+</sup>	11	100	165	30	5	-CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	S <sup>-</sup>	>50	80	110
6	1	- <i>trans</i> -CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>3</sub>	S <sup>+</sup>	13	89	113	31	6		S <sup>+</sup>	>100	76	172
7	1	-CH <sub>2</sub> Ph	S <sup>+</sup>	20	79	214	32	7	-CH <sub>3</sub>	S*	7	140	177
8	1	-CH <sub>2</sub> (2-thiophene)	S <sup>+</sup>	>24	81	181	33	7	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S*	4	77	79
9	1	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SPh	S <sup>+</sup>	21	92	199	34	7	-Ph	S*	5	70	183
10	1	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> Ph	S <sup>+</sup>	21	85	201	35	7	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -	S*	3	153	172
11	1	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	S <sup>+</sup>	4	76	200	36	7	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	S*	23	111	184
12	1	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> Ph	S <sup>+</sup>	20	95	87	37	7	-CH <sub>2</sub> Ph	S*	9	133	180
13	1	-CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> Ph	R <sup>+</sup>	24	171	78	38	8	-Ph	S <sup>-</sup>	>50	160	172
14	1	-CH <sub>2</sub> OC(O)Ph	R <sup>+</sup>	22	155	87	39	8	-4-OCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S <sup>-</sup>	>50	94	204
15	1	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> OH	S <sup>+</sup>	>50	76	160	40	9		R <sup>-</sup>	16	168	76
16	2	-CH <sub>2</sub> OAc	R <sup>+</sup>	16	136	83	41	10	- <i>i</i> -Pr	S*	>100	165	167
17	2	-CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S <sup>+</sup>	7	70	296	42	10	- <i>t</i> -Bu	S*	>100	154	161
18	3	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CHCH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> <i>i</i> -Pr	R <sup>+</sup>	13	185	76	43	10	-Ph	S*	>100	83	85
19	3	-CH <sub>2</sub> -3,4-OCH <sub>2</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	R <sup>+</sup>	>50	173	87	44	10	-Et	S <sup>-</sup>	4	80	166
20	3	-CH <sub>2</sub> -3,4-(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	R <sup>+</sup>	>50	101	83	45	10	- <i>n</i> -Bu	S*	5	80	160
21	3	-CH <sub>2</sub> -3,4,5-(CH <sub>3</sub> O) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	R <sup>+</sup>	20	189	85	46	10	- <i>n</i> -decyl	S*	6	71	143
22	3	-CH <sub>2</sub> -4-Ph-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	R <sup>+</sup>	>50	267	187	47	10	-benzyl	S*	7	103	165
23	3	-CH <sub>2</sub> -Ph	R <sup>+</sup>	>50	92	78	48	11		S <sup>-</sup>	33	79	231
24	3	-CH <sub>2</sub> -1-naphhtyl	R <sup>+</sup>	50	190	84	49	12		S <sup>+</sup>	5	88	201
25	3	-OCH <sub>3</sub>	S <sup>-</sup>	5	73	78	50	13		R <sup>-</sup>	>50	178	167

+: folgt der empirischen Regel (Weissfloch und Kazlauskas 1995)

\*: folgt der empirischen Regel, obwohl Sauerstoff am Stereozentrum (Weissfloch und Kazlauskas 1995)

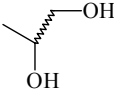
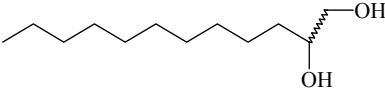
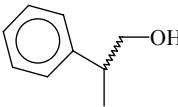
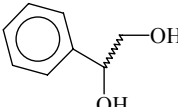
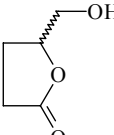
-: folgt nicht der empirischen Regel (Weissfloch und Kazlauskas 1995)

### Verifikation des Modells

Zur Überprüfung des Modells wurden *molecular modeling* Untersuchungen von 5 Substraten, deren Daten über Enantioselektivität der PCL bisher nicht bekannt waren, durchgeführt.

Anhand der resultierenden Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  wurde eine Vorhersage der Enantiopräferenz vorgenommen. In Tabelle 18 sind die Torsionswinkel der beiden Enantiomere jedes Substrates und die daraus resultierende Vorhersage der Enantiopräferenz der PCL aufgelistet. Für Substrate **A**, **B** und **E** wurde durch das Modell das (*R*)-Enantiomer als bevorzugt vorhergesagt, für die Substrate **C** und **D** das (*S*)-Enantiomer.

Tabelle 18: Substrate **A-E** wurden zur Verifikation des Computermodells mittels molekulardynamischer Simulationen untersucht. Die Vorhersage der experimentell erwarteten Enantiopräferenz von PCL gegenüber diesen Substraten erfolgte durch die Analyse der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  im Modell.

Subs.	Strukturformel	$\Phi_{\text{OAlk.-C}} (R) [^\circ]$	$\Phi_{\text{OAlk.-C}} (S) [^\circ]$	$\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(S-R) [^\circ]$	Präf.
<b>A</b>		149	80	-69	( <i>R</i> )
<b>B</b>		168	146	-22	( <i>R</i> )
<b>C</b>		70	122	52	( <i>S</i> )
<b>D</b>		66	76	10	( <i>S</i> )
<b>E</b>		80	77	-3	( <i>R</i> )

Bei der Untersuchung der Trajektorie der Simulationen konnte beobachtet werden, dass die Substrate **C**, **D** und **E** sehr früh (nach 2000–3000 fs; bei ca. 30-40 K) während der Simulation in das *His gap* binden und dort relativ starr und fest gebunden für den Rest der Simulation bleiben. Die beiden Substrate **A** und **B** bewegen sich hingegen stärker während der gesamten Simulation in der Bindungstasche und können dadurch nicht so definiert und fest in das *His gap* binden wie die anderen drei Substrate. Für diese beiden Substrate war der rms-Wert der Torsionswinkel 10mal so hoch wie für die sperrigeren Substrate **C**, **D** und **E**, bei denen er zwischen 0,5 und 0,9 lag. Das Substrat **A** bewegt sich wegen seiner relativ kleinen Substituenten nicht tief das *His gap* und wird dadurch nicht fixiert.

Zur Überprüfung der richtigen Vorhersage wurden die fünf Substrate mit rekombinanter PCL umgesetzt. Die rekombinante PCL und das Helferprotein wurden in *E. coli* exprimiert, die gebildeten *inclusion bodies* isoliert und die Lipase in Anwesenheit des Helferproteins rückgefaltet. Die Reinheit der Lipase wurde durch Vergleich der Bandenstärke des SDS-Geles bestimmt (siehe Kapitel 3.5 und Kapitel 4.2). Sie betrug etwa 45 % des hergestellten Proteins und die Aktivität der Lipase wurde mittels pH-Stat-Methode zu 1800 U/mg Lyophilisat bestimmt. Für die Umsetzung der Substrate wurden je 10 mmol der racemischen Gemische mit 12 mmol Vinylacetat in 1 ml Toluol gelöst und die Umesterung durch Zugabe von 10 mg rekombinanter PCL gestartet. Nach 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h und 24 h wurden Aliquots aus dem Reaktionsgefäß entnommen, Substrat- und Produktverteilung mittels Gaschromatographie bestimmt und die E-Werte anhand der Peakflächen-Verhältnisse der Substrate und Produkte berechnet (siehe Kapitel 3.8.1 und 3.8.3). Die GC-Parameter zur Trennung der Substrate und deren Retentionszeiten wurden mit Standardsubstraten ermittelt.

Die Produktpeaks wurden auf Grund der Kinetik den Substratpeaks zugeordnet. Der größere im Laufe der Reaktion entstehende Produktpeak wurde dem stärker abnehmendem Substratpeak zugeordnet. Die Kinetik der Reaktion ist für Substrat E in Abbildung 26 dargestellt. Für Substrat E entstehen bei der Umsetzung mit PCL keine weiteren Produkte außer dem Ester des primären Alkohols. Da sowohl die Kinetik der Reaktion das verhältnismäßige Entstehen der Produktpeaks im Vergleich zu den abnehmenden Substratpeaks widerspiegelt und die Retentionszeiten der entstehenden Produkte auf die Ester rückschließen lassen, können diese entstehenden Peaks den Estern der primären Alkohole zugeordnet werden.

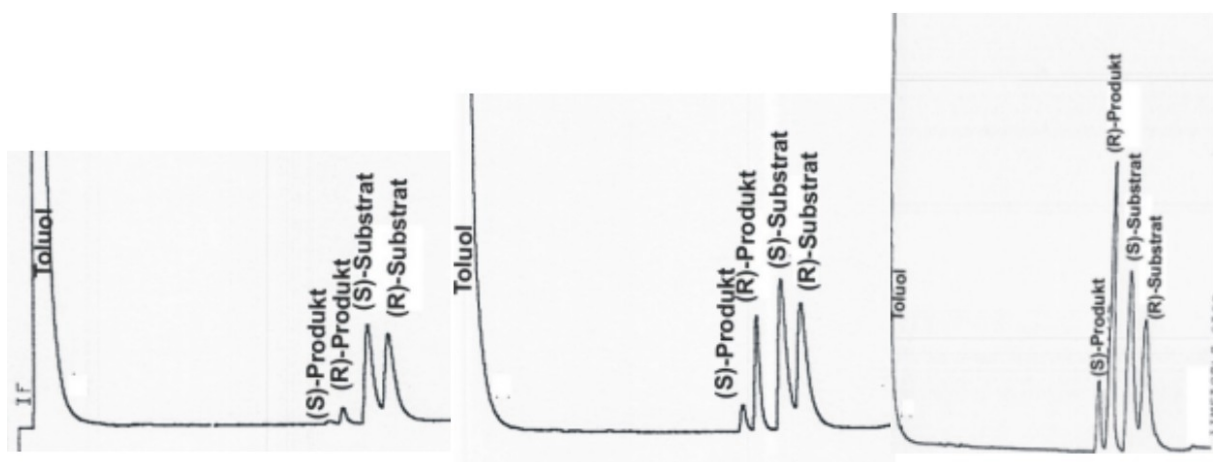


Abbildung 26: Kinetik der Reaktion von Substrat E. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Produktpeaks im Laufe der Reaktion zunehmen, während die Eduktpeaks abnehmen (hier für L287F-Mutante nach 0,5 h, 1 h und 4 h). Dem stärker abnehmenden Substratpeak des (R)-Enantiomers wurde der stärker ansteigende Peak als Produktpeak zugeordnet und umgekehrt.

Da bei den Substraten **A**, **B** und **D** auch eine sekundäre Alkoholgruppe vorhanden ist, konnte keine eindeutige Zuordnung der Produktpeaks erfolgen und somit auch keine Berechnung des E-Wertes. Für Substrat **C** war die Trennung der Produktpeaks nicht möglich und folglich konnte auch hier keine E-Wertberechnung erfolgen. Abbildung 27 zeigt die Chromatogramme der Substrate **A-E**.

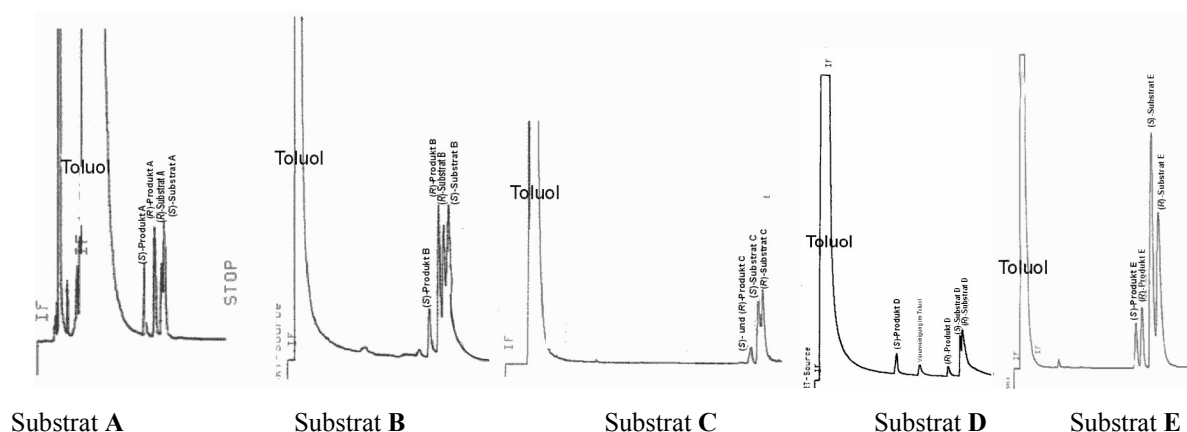


Abbildung 27: Gaschromatogramme der Substrate **A-E**. Die Retentionszeiten wurde mit Standardsubstraten bestimmt. Die Produktpeaks von Substrat **A-D** können nicht eindeutig zugewiesen werden. Die hier beschrifteten Peaks sind somit nur spekulativ.

Die Berechnung der E-Werte erfolgte sowohl durch die Auswertung der Peakflächen, als auch durch die Analyse mit eine Graphikprogramm (AutoCAD), um die Fehler der E-Werte abzuschätzen. Da die Trennung der Substrat- und Produktpeaks von Substrat **E** gut gelang, wurde nur ein geringer Fehler von 3 % ermittelt.

Die Berechnung des E-Wertes erfolgte nach folgender Formel:

$$ee_S = \frac{\text{Fläche}(\text{nichtbevorzugtes Enantiomer}) - \text{Fläche}(\text{bevorzugtes Enantiomer})}{\text{Fläche}(\text{bevorzugtes Enantiomer}) + \text{Fläche}(\text{nichtbevorzugtes Enantiomer})}$$

dies bedeutet für Substrat **E**:

$$ee_S = \frac{\text{Fläche}((S) - \text{Enantiomer}) - \text{Fläche}((R) - \text{Enantiomer})}{\text{Fläche}((R) - \text{Enantiomer}) + \text{Fläche}((S) - \text{Enantiomer})}$$

$$ee_P = \frac{\text{Fläche}(\text{nichtbevorzugtes Enantiomer}) - \text{Fläche}(\text{bevorzugtes Enantiomer})}{\text{Fläche}(\text{bevorzugtes Enantiomer}) + \text{Fläche}(\text{nichtbevorzugtes Enantiomer})}$$

dies bedeutet für Substrat **E**:

$$ee_P = \frac{\text{Fläche}((S) - \text{Enantiomer}) - \text{Fläche}((R) - \text{Enantiomer})}{\text{Fläche}((R) - \text{Enantiomer}) + \text{Fläche}((S) - \text{Enantiomer})}$$

Der Umsatz errechnet sich wie folgt:

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

Oder

$$c \text{ oder } U = \frac{ee_S}{ee_S + ee_P}$$

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

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

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

Somit errechnet sich der E-Wert bei folgenden Peakflächen:

Fläche (S)-Enantiomer Substrat:	2997855
Fläche (S)-Enantiomer Produkt:	928476
Fläche (R)-Enantiomer Substrat:	1579799
Fläche (R)-Enantiomer Produkt	2147405

$$ee_S = 0,31$$

$$ee_P = 0,40$$

$$U = 0,44$$

$$E = 3$$

Der E-Wert von Substrat **E** wurde experimentell mit  $E = 3$ , (*R*)-Präferenz, bestimmt. Die meisten primären Alkohole werden nur mit geringer Enantioselektivität umgesetzt, obwohl die Substrate zur Etablierung des Modells aus der Literatur auch höhere E-Werte besitzen. Für diese Substrate wurde allerdings die Reaktionsbedingungen optimiert, was nicht Ziel dieser Arbeit war. Aus diesem Grund ist der mit rekombinanter PCL bestimmte niedrige E-Werte des Substrates **E** nicht ungewöhnlich.

Die Vorhersage der Enantiopräferenz korreliert für Substrat **E** mit dem experimentellen Ergebnis, so dass das Modell (oder *in silico* Assay) die Vorhersage der Enantiopräferenz PCL-katalysierter Umsetzung von primären Alkoholen erlaubt.



### 4.1.3 Enantioselektivität *in silico*

Das Hauptaugenmerk der Analyse der generierten Strukturen lag immer auch auf der visuellen Auswertung der Bewegung und Bindung der Substrate in das *His gap*. Der ermittelte und analysierte Torsionswinkel ist das geometrische Maß, der diese Bewegung beschreibt. Allerdings können Bewegungen deutlich tiefer in das *His gap* aufgrund der Substratstruktur (z.B. große Substituenten, sehr verzweigte Substituenten, Phenylringe) nur geringen Änderungen des Torsionswinkels zur Folge haben. Daher ist die visuelle Analyse der Strukturen unumgänglich und ein mit entscheidender Faktor zur Beschreibung der veränderten Lage und Orientierung der Substrate im *His gap*. Der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  beschreibt die Konformation und die Bindung der Substrate in der Bindungstasche der PCL, genauer im *His gap*. Je tiefer ein Substrat sich in das *His gap* bewegt, um so größer ist der Torsionswinkel und umgekehrt. Daher sollte die Differenz der Torsionswinkel  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  zweier zusammengehörender Enantiomere mit dem experimentell ermittelten E-Wert in Beziehung stehen. Von dieser Annahme ausgehend wurden *in silico* Mutationen in die Bindungstasche der PCL eingeführt und die Substrate **A**, **B**, **C**, **D** und **E** in die Bindungstasche dieser Mutanten orientiert. Die molekulardynamischen Simulationen wurden mit denselben Bedingungen wie für den Wildtyp durchgeführt und anschließend die Trajektorie betrachtet und der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  gemessen. Es sollten im Modell Mutanten gefunden werden, die  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  [berechnet als:  $[(\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S})\text{-Enantiomer}) - (\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{R})\text{-Enantiomer})]$  zweier zusammengehörender Enantiomere signifikant ändern und in der Folge somit auch den experimentell ermittelten E-Wert. Nach Möglichkeit sollten Mutanten gefunden werden, die den Wert von  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  vergrößern und dadurch den E-Wert erhöhen; andere die den Wert von  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  verkleinern und den E-Wert in Folge dessen erniedrigen bzw. das Vorzeichen von  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  und deshalb die Enantiopräferenz umkehren.

Die Bewegung der Substrate in das von den Aminosäuren H286 und L287 gebildete *His gap* ist essentiell für die Enantioselektivität. Die Größe dieser Bindungstasche ist somit auch entscheidend für die Bewegung der Substrate und ist folglich abhängig von der Größe der Seitenketten der beiden Aminosäuren an Position 286 und 287. Eine Modifikation dieser Bindungstasche durch die Veränderung der Seitenketten der Aminosäuren sollte somit zu einer veränderten Bewegung der Substrate und daraus resultierend zu einer veränderten Enantioselektivität führen. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass für Triacylglyceride

und Analoga, bei denen das *His gap* ebenfalls essentiell für die selektive Umsetzung der Lipasen ist, eine Änderung der Seitenkette der Aminosäure des *His gaps* zu einer Änderung der Stereoselektivität von Lipasen führte und sogar die Umkehr der Präferenz bestimmt wurde (Scheib *et al.* 1999 Scheib *et al.* 1998; Scheib, 1999). Daher sollte eine Änderung der Größe und Konformation des *His gaps* zu einer Änderung der Enantioselektivität der PCL gegenüber primären Alkoholen führen. Da es sich beim H286 um das katalytische Histidin der Lipase handelt, wurde die Aminosäure L287 mutiert. Theoretisch sollte die Größe des *His gaps* mit der Größe der mutierten Aminosäure an der Position 287 korrelieren. Eine Vergrößerung der Seitenkette durch Mutation des L287 sollte zu einer Verkleinerung und eine Verkleinerung der Seitenkette zu einer Vergrößerung des *His gaps* führen.

Die *molecular modeling* Untersuchung wurden alle *in vacuo* durchgeführt. Damit können nur Auswirkungen von Mutanten beobachtet werden, die unmittelbar mit dem Substrat in Wechselwirkung treten. Dies sind nur Aminosäuren, die sich in der Bindungstasche befinden. Beim Betrachten der Trajektorie wurde eine zweite Aminosäure beobachtet, Y29, die ebenfalls mit dem Substrat sterisch interagiert und die Bewegung der Substrate in das *His gap* beeinflusst, da sie senkrecht über dem *His gap* liegt und durch die Bewegung ihrer Seitenkette das Substrat in das *His gap* „drückt“.

#### *Verkleinerung der Seitenkette durch Mutanten L287A, L287G, Y29G und Y29A*

Im Wildtyp binden die Substrate zwischen den Seitenketten der Aminosäuren H286 und L287. Durch die sterische Hinderung dieser beiden Seitenketten und die Wechselwirkungen des Substrates mit den Aminosäuren werden die Substrate somit im *His gap* fixiert. Eine Verkleinerung der Seitenkette an der Position 287 durch Alanin und Glycin führte zu einer „Auflösung“ des *His gaps*, da die für die Bildung dieses Strukturmotiv erforderlichen Seitenketten nicht vorhanden sind oder eine zu geringe Größe besitzen. Alle fünf untersuchten Substrate konnten nicht mehr im *His gap* binden, da sie durch die verkleinerte Seitenkette und die daraus fehlenden Wechselwirkungen nicht mehr fixiert wurden. Dadurch banden beide zusammengehörenden Enantiomere annähernd gleich und die Unterschiede der Torsionswinkel waren im Vergleich zum Wildtyp nur noch sehr gering. Dies sollte zu einer Abnahme der Enantioselektivität führen.

Eine Verkleinerung der Aminosäure an Position 29 durch Alanin bzw. Glycin hatte keine Auswirkung auf die Bindung der Substrate und die resultierenden Torsionswinkel. Somit wurde auch keine Änderung der Enantioselektivität erwartet.

Tabelle 19: Im Modell gemessene Differenz der Torsionswinkel  $\Delta\Phi_{\text{Oalk.-C}}(\text{S-R})$  der Mutanten L287A, L287G, Y29A und Y29G der Substrate A-E.

Subs.	$\Delta\Phi_{\text{Oalk.-C}}(\text{S-R})$		$\Delta\Phi_{\text{Oalk.-C}}(\text{S-R})$		$\Delta\Phi_{\text{Oalk.-C}}(\text{S-R})$		$\Delta\Phi_{\text{Oalk.-C}}(\text{S-R})$			
	Wildtyp	[°]	L287A	[°]	L287G	[°]	Y29A	[°]	Y29G	[°]
<b>A</b>	-69		-23		-14		-57		-68	
<b>B</b>	-22		-4		-5		-12		-17	
<b>C</b>	52		12		7		44		52	
<b>D</b>	10		0		2		9		10	
<b>E</b>	-3		-1		-1		-2		-2	

#### *Vergrößerung der Seitenkette durch Mutanten L287F, L287W, L287Y und Y29W*

Durch eine Vergrößerung der Seitenkette der Aminosäure an Position 287 wurden verschiedene Auswirkungen auf die Bindung der Substrate und der daraus resultierenden Torsionswinkel beobachtet. Es wurden die Mutanten L287F, L287W und L287Y untersucht. Entgegen der Annahme, dass die Vergrößerung der Seitenkette durch diese Mutanten die Größe des *His gaps* generell reduziert, konnte durch eine Rotation der Seitenketten auch eine Öffnung und eine Bewegung der Substrate tiefer in das *His gaps* beobachtet werden. Die Vergrößerung der Seitenkette der Aminosäure an Position 29 durch den Austausch von Tyrosin durch Tryptophan führte zu einer Konformationsänderung von drei Substraten (Substrat **A**, **B** und **C**; siehe unten).

Wenn im Folgenden auf die Änderung der Orientierung der Substrate und die Enantiopräferenz und –selektivität eingegangen wird, bezieht sich dies in jedem Fall auf den Wildtyp der PCL, da diese Daten als Grundlage dienen, die durch die Mutanten verändert wurden. Die Vorhersage der Enantiopräferenz der Mutanten erfolgte auch hier anhand visueller Analyse der Bewegung der Substrate in das *His gap* und des gemessenen Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Oalk.-C}}$ . Der gemessene Torsionswinkel und die Vorhersage der Enantiopräferenz sind in den folgenden Abschnitten für jede Mutante in einer Tabelle zusammengefasst.

*Mutante L287F in silico*

Die visuelle Analyse der Bewegung der Substrate in das *His gap* anhand der mittleren Struktur und der Trajektorie, sowie die Messung des Torsionswinkels  $\Phi_{\text{OAIK-C}}$  sagen für die L287F-Mutante dieselbe Enantiopräferenz gegenüber den fünf Substraten **A-E** vorher wie der Wildtyp. Das jeweils bevorzugte Enantiomer (siehe Tabelle 20) von allen fünf untersuchten Substraten bewegt sich im Vergleich zum Wildtyp tiefer in das *His gap* dieser Mutante. Es konnte beobachtet werden, dass sich der planare Phenylring des F287 hierbei parallel zum Imidazolring des H286 dreht, vom Substrat weggedrückt wird und sich somit das *His gap* im Vergleich zum Wildtyp vergrößert. Dadurch können die bevorzugten Enantiomere tiefer in das *His gap* binden als beim Wildtyp (Abbildung 28), was zu einer Vergrößerung des Torsionswinkels  $\Phi_{\text{OAIK-C}}$  führt (siehe Tabelle 20). Beim nicht bevorzugten Enantiomer dreht sich der Phenylring des F287 senkrecht zum Imidazolring des H286, da diese Enantiomere sich nicht in das *His gap* bewegen. Somit wird das *His gap* im Vergleich zum Wildtyp für diese Enantiomere kleiner.

Die nicht bevorzugten Enantiomere binden nicht mehr im *His gap* und als Folge nimmt der Torsionswinkels  $\Phi_{\text{OAIK-C}}$  im Vergleich zum Wildtyp ab. Für die Substrate **C**, **D** und **E** wurde für die bevorzugten Enantiomere noch ein weiterer Effekt beobachtet. Die Ringe des großen Substituenten dieser Enantiomere drehen sich parallel zu den Ringen der Seitenketten des *His gaps* und können sich deshalb sehr tief in das *His gap* bewegen. Bei Substrat **D** und **E** dreht sich der Ring des nicht bevorzugten Enantiomer senkrecht zu den Ringen des *His gaps*. Durch die Bewegung dieser nicht bevorzugten Enantiomere in das *His gap* wird die Seitenkette des katalytische H286 weggedrückt.

Der flexible große Substituent des bevorzugte (*R*)-Enantiomer von Substrat **B** wird durch die Seitenkette der L287F-Mutante nach oben gedrückt und bindet bei dieser Mutante mit dem Ende seiner langen Kohlenstoffkette in direkter Nachbarschaft zum *oxyanion hole* und dem *hydrophobic crevice*, und somit deutlich oberhalb (2,7 Å) des *His gap*. Daher ist eine Bewegung dieses Enantiomers tiefer in das *His gap* nur im Bereich des Stereozentrums zu beobachten. Das nicht bevorzugte (*S*)-Enantiomer bleibt annähernd in der gleichen Konformation wie beim Wildtyp, bewegt sich aber etwas tiefer in das *His gap*.

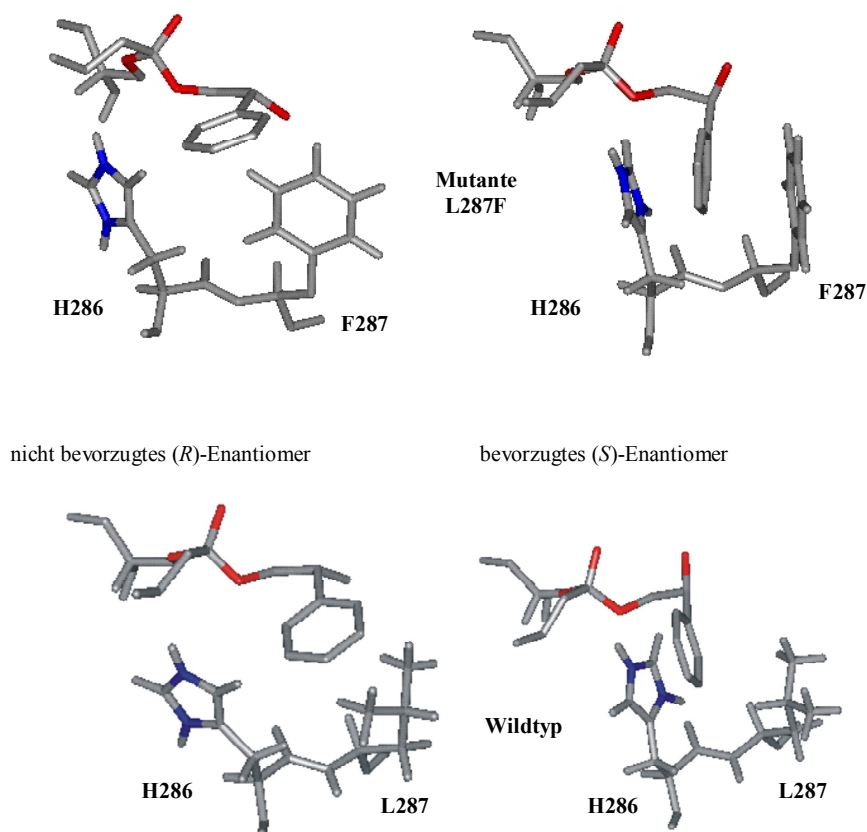


Abbildung 28: **Links oben:** Das *His gap* wird durch den Phenylring des F287 geschlossen und der Phenylring des nicht bevorzugten (*R*)-Enantiomers von Substrat **D** ist senkrecht zu den Ringen der Seitenkette H286 und F287. Daher kann das nicht bevorzugte (*R*)-Enantiomer nicht sehr tief in das *His gap* binden und das katalytische H286 wird weggedrückt. **Rechts oben:** Der Phenylring des F287 und der Imidazolring des H286 sind parallel zueinander und das *His gap* öffnet sich dadurch. Der Phenylring des bevorzugten (*S*)-Enantiomers ist parallel zu den Ringen von H286 und F287 und daher kann das Enantiomer sehr tief in das *His gap* binden. Zum Vergleich **links unten** das nicht bevorzugte (*R*)-Enantiomer im Wildtyp und **rechts unten** das bevorzugte (*S*)-Enantiomer im Wildtyp.

Die Differenz der Torsionswinkel  $\Delta\Phi_{\text{OAlk-C}}(\text{S-R})$  nimmt dadurch auch für alle Substrate, außer Substrat **B** zu (Tabelle 20). Dies sollte zu einer Erhöhung der Enantioselektivität für Substrat **A**, **C**, **D** und **E** führen.

Tabelle 20: Die Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität (E-Wert im Vergleich zum Wildtyp; +: Steigerung; -: Abnahme und o: unveränderte Enantioselektivität) von L287F gegenüber den Substraten **A-E** erfolgte durch visuelle Analyse und die Messung der Torsionswinkel.

Substrat	Torsionswinkel $\Phi_{\text{OAlk-C}}(\text{R})$ [°]	Torsionswinkel $\Phi_{\text{Oalk-C}}(\text{S})$ [°]	$\Delta\Phi_{\text{OAlk-C}}(\text{S-R})$ L287F [°]	$\Delta\Phi_{\text{OAlk-C}}(\text{S-R})$ Wildtyp [°]	Präferenz Modell	Änderung des E-Wertes
<b>A</b>	166	79	-87	-69	( <i>R</i> )	+
<b>B</b>	179	172	-7	-22	( <i>R</i> )	-
<b>C</b>	72	172	100	52	( <i>S</i> )	+
<b>D</b>	65	81	16	10	( <i>S</i> )	+
<b>E</b>	85	75	-10	-3	( <i>R</i> )	+

*Mutante L287W in silico*

Die visuelle Analyse und die Messung des Torsionswinkels  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  sagen für die L287W-Mutante dieselbe Enantiopräferenz gegenüber den Substraten **A**, **B** und **C** wie der Wildtyp und eine Umkehr in der Enantiopräferenz für die Substrate **D** und **E** vorher. Im Vergleich zur L287F Mutante ist die Seitenkette der L287W Mutante größer und sperriger. Aus diesem Grund kann sie von den Substraten nicht so leicht weggedrückt werden, damit eine Bewegung tiefer in das *His gap* ermöglicht wird. Die Substrate können aufgrund der senkrechten Orientierung des mittleren Substituenten zur Tryptophanseitenkette und der geringen Größe des *His gaps* nicht tief in das *His gap* binden. Nur für das bevorzugte (*S*)-Enantiomer (siehe Tabelle 21) von Substrat **C** wurde diese Bewegung tiefer in das *His gap* beobachtet, da sich der mittlere Substituent, die Methylgruppe, auch parallel zu den Ringen des *His gaps* orientiert. Es kann sich tiefer in das *His gap* hinein bewegen als beim Wildtyp und das nicht bevorzugte Enantiomer bewegt sich weniger tief in das *His gap* als beim Wildtyp. Da sich dadurch  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  vergrößert, sollte eine deutliche Steigerung der Enantioselektivität die Folge sein. Für Substrat **A** konnte ebenfalls eine Erhöhung von  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  beobachtet werden, da dieses kleine Substrat durch die größere Seitenkette der L287W-Mutante im dadurch entstandenen „höher reichenden“ *His gap* binden kann. Beide Enantiomere von Substrat **B** binden nicht mehr sehr tief in das *His gap*. Das bevorzugte (*R*)-Enantiomer bindet hier ebenfalls mit dem Ende der Kohlenstoffkette des großen Substituenten, hoch gedrückt durch die Seitenkette des W287, oberhalb des *His gaps*, allerdings nicht so weit oben wie für die L287F Mutante. Als Folge nimmt  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  zu, daher sollte der E-Wert für dieses Substrat gering zunehmen. Durch die große und sperrige Seitenkette des Tryptophans wird die Konformation der Bindungstasche im Vergleich zum Wildtyp verändert. Dadurch bewegen sich für die Substrate **D** und **E** die im Wildtyp nicht bevorzugten Enantiomere tiefer in das *His gap*. Somit ändert sich das Vorzeichen von  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  und sollte zu einer Umkehrung der Enantiopräferenz führen.

Zur Bestätigung der veränderten Bewegung in das *His gap* der Mutante L287W im Gegensatz zum Wildtyp der beiden Enantiomere von Substrat **D** und **E** wurden weitere *molecular modeling* Untersuchungen vorgenommen. Es wurden beide Enantiomere dieser Substrate tief in das *His gap* des Wildtyps und der Mutante L287W gedockt und die Simulationen durchgeführt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass für den Wildtyp das bevorzugte (*S*)-Enantiomer des Substrates **D** und das bevorzugte (*R*)-Enantiomer des Substrates **E** im *His gap* bleiben. Die nicht bevorzugten Enantiomere beider Substrate bewegen sich dagegen aus dem

*His gap* hinaus. Für die Mutante L287W konnte beobachtet werden, dass das anhand der *molecular modeling* Untersuchungen als bevorzugt vorhergesagte (*R*)-Enantiomer des Substrates **D** und das bevorzugte (*S*)-Enantiomer des Substrates **E** im *His gap* bleiben und sich die jeweils nicht bevorzugten Enantiomere beider Substrate dagegen aus dem *His gap* hinaus bewegen. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass sich für Substrat **D** und **E** die Enantiopräferenz im Falle der Mutante L287W umkehrt.

Tabelle 21: Die Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität (E-Wert im Vergleich zum Wildtyp; +: Steigerung; -: Abnahme und o: unveränderte Enantioselektivität) von L287W gegenüber den Substraten **A-E** erfolgte durch visuelle Analyse und die Messung der Torsionswinkel.

Substrat	Torsionswinkel $\Phi_{\text{OAlk.-C}}(R)$ [°]	Torsionswinkel $\Phi_{\text{OAlk.-C}}(S)$ [°]	$\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(S-R)$ L287W [°]	$\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(S-R)$ Wildtyp [°]	Präferenz Modell	Änderung des E-Wertes
<b>A</b>	185	85	-100	-69	( <i>R</i> )	+
<b>B</b>	103	80	-23	-22	( <i>R</i> )	o
<b>C</b>	69	169	100	52	( <i>S</i> )	+
<b>D</b>	82	69	-13	10	( <i>R</i> )	Umkehr
<b>E</b>	90	147	57	-3	( <i>S</i> )	Umkehr

#### Mutante L287Y *in silico*

Die visuelle Analyse und die Messung des Torsionswinkels  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  sagen für die L287Y-Mutante dieselbe Enantiopräferenz gegenüber den fünf Substraten vorher wie der Wildtyp. Die Öffnung des *His gaps* durch die parallele Orientierung des planaren Phenylringes der Tyrosinseitenkette wurde bei dieser Mutante für das bevorzugte (*R*)-Enantiomer von Substrat **B** und das (*S*)-Enantiomer von Substrat **C** beobachtet. Dadurch kann das bevorzugte Enantiomer tief in das *His gap* binden,  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(S-R)$  nimmt zu, woraus eine Erhöhung der E-Werte resultieren sollte (siehe Tabelle 22).

Für Substrat **A** wurde eine Abnahme von  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(S-R)$  gemessen, was eine Abnahme der Selektivität voraussagt. Die Werte von  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(S-R)$  der anderen drei Substrate sind beinahe unverändert, wodurch die Enantioselektivität ebenfalls unverändert bleiben sollte. Das bevorzugte (*R*)-Enantiomer von Substrat **B** wird durch die Seitenkette der L287Y-Mutante nach oben gedrückt und bindet mit dem Ende der Kohlenstoffkette des großen Substituenten wieder oberhalb des *His gap*. Das nicht bevorzugte (*S*)-Enantiomer von Substrat **B** bindet annähernd in der gleichen Konformation, wie im Wildtyp.

Tabelle 22: Die Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität (E-Wert im Vergleich zum Wildtyp; +: Steigerung; -: Abnahme und o: unveränderte Enantioselektivität) von L287Y gegenüber den Substraten **A-E** erfolgte durch visuelle Analyse und die Messung der Torsionswinkel.

Substrat	Torsionswinkel	Torsionswinkel	$\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$		Präferenz Modell	Änderung des E-Wertes
	$\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{R})$ [°]	$\Phi_{\text{Oalk.-C}}(\text{S})$ [°]	L287Y	Wildtyp		
<b>A</b>	77	75	-2	-69	(R)	-
<b>B</b>	295	165	-130	-22	(R)	+
<b>C</b>	67	127	60	52	(S)	+
<b>D</b>	66	74	8	10	(S)	o
<b>E</b>	79	77	-2	-3	(R)	o

#### Mutante Y29W *in silico*

Auch für die Y29W-Mutante sagen die visuelle Analyse und die Messung der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  dieselbe Enantiopräferenz wie der Wildtyp gegenüber den fünf Substrate vorher. Die Seitenkette der Aminosäure an Position 29 ist weiter vom Substrat entfernt als die Seitenkette der Aminosäure 287. Daher wurden keine vergleichbar starken Auswirkungen dieser Mutante auf die Bindung und Orientierung der Substrate wie durch die Mutationen an Position 287 erwartet. Es konnte aber beobachtet werden, dass die Vergrößerung der Seitenketten durch den Austausch von Tyrosin durch Tryptophan die Bewegung der Substrate in das *His gap* beeinflusst, da diese Aminosäure sich oberhalb der Substrate und des *His gap* befindet. Das bevorzugte (R)-Enantiomer von Substrat **B** und das bevorzugte (S)-Enantiomer von Substrat **C** bewegten sich tiefer in das *His gap*, während die Konformation des nicht bevorzugten Enantiomers im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert wurde (siehe Tabelle 23). Daher vergrößert sich  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  und somit sollte für diese beiden Substrate eine Umsetzung mit der Mutante zu einer Erhöhung des E-Wertes führen. Das bevorzugte (R)-Enantiomer von Substrat **B** bindet in diesem Fall genauso wie für den Wildtyp im *hydrophobic dent*. Der Einfluss der Mutante auf die Substrate **D** und **E** war unerheblich.

Tabelle 23: Die Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität (E-Wert im Vergleich zum Wildtyp; +: Steigerung; -: Abnahme und o: unveränderte Enantioselektivität) von Y29W gegenüber den Substraten **A-E** erfolgte durch visuelle Analyse und die Messung der Torsionswinkel.

Substrat	Torsionswinkel	Torsionswinkel	$\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$		Präferenz Modell	Änderung des E-Wertes
	$\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{R})$ [°]	$\Phi_{\text{Oalk.-C}}(\text{S})$ [°]	Y29W	Wildtyp		
<b>A</b>	87	80	-7	-69	(R)	-
<b>B</b>	163	74	-87	-22	(R)	+
<b>C</b>	63	157	94	52	(S)	+
<b>D</b>	71	78	7	10	(S)	-
<b>E</b>	79	77	-2	-3	(R)	o



### Doppelmutanten Y29W / L287F und Y29W / L287Y

Für alle fünf Substrate wurden noch zusätzlich *molecular modeling* Untersuchungen mit den beiden Doppelmutanten Y29W / L287F und Y29W / L287Y durchgeführt. Allerdings konnte ausschließlich für das Substrat **E** deutliche Änderung der Torsionswinkel beobachtet werden. Für die anderen vier Substrate waren die Werte vergleichbar mit dem Wildtyp oder anderer bereits untersuchter Mutanten (Daten nicht aufgeführt). Für beide Mutanten sagt die Messung der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  des Substrates **E** (*R*)-Präferenz voraus. Im Vergleich zum Wildtyp ändert sich die Konformation der beiden Enantiomere des Substrates **E** nur unwesentlich für Y29W / L287Y. Die Torsionswinkel werden nicht verändert und somit wird eine unveränderte Enantiopräferenz und –selektivität anhand des Modells erwartet (siehe Tabelle 24). Die Analyse der Torsionswinkel zeigt, dass die Auswirkungen der Doppelmutanten im Vergleich zu denen der Einzelmutanten nicht additiv sind.

Tabelle 24: Die Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität (E-Wert im Vergleich zum Wildtyp; +: Steigerung; -: Abnahme und o: unveränderte Enantioselektivität) von Y29W / L287F und Y29W / L287Y gegenüber dem Substrat **E** erfolgte durch Messung der Torsionswinkel.

Mutante	$\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$		$\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$		$\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$		$\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$		Präferenz Modell	Änderung des E-Wertes
	Mutante	[°]	Wildtyp	[°]	Y29W	[°]	L287X	[°]		
Y29W / L287F	R: 126 S: 67	-59	-3	-2	-2	-10			( <i>R</i> )	+
Y29W / L287Y	R: 81 S: 77	-4	-3	-2	-2				( <i>R</i> )	o

Die Form Bindungstasche der Doppelmutante Y29W / L287F wird durch die beiden vergrößerten Seitenketten stark verändert (Abbildung 29). Die Seitenkette des W29 orientiert sich in Richtung des F287 und verschließt dadurch den *hydrophilic trench*. Die Seitenkette des F287 dreht sich beim bevorzugten (*R*)-Enantiomer parallel zum Imidazolring des katalytischen H286 und vergrößert dadurch das *His gap*. Als Folge bindet das (*R*)-Enantiomer sehr tief im *His gap* (Abbildung 29 rechts), was zu einer Erhöhung des Torsionswinkels  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  von 80° beim Wildtyp auf 126° bei dieser Mutante zu erkennen ist. Das nicht bevorzugte (*S*)-Enantiomer kann durch die senkrechten Orientierung des Phenylringes des F287 zum Imidazolring des H286 nicht im *His gap* binden und wird durch die Bewegung der Seitenkette des W29 nach vorne gedrückt (Abbildung 29 links unten). Als Resultat nimmt der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  von 77° im Wildtyp auf 67° bei dieser Mutante ab. Durch die Steigerung der Differenz der Torsionswinkel  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  von -3° beim Wildtyp auf -59°,

sagt das Modell eine große Erhöhung der Enantioselektivität voraus. Auch hier sind die Effekte der Doppelmutante nicht additiv zu denen der Einzelmutanten.

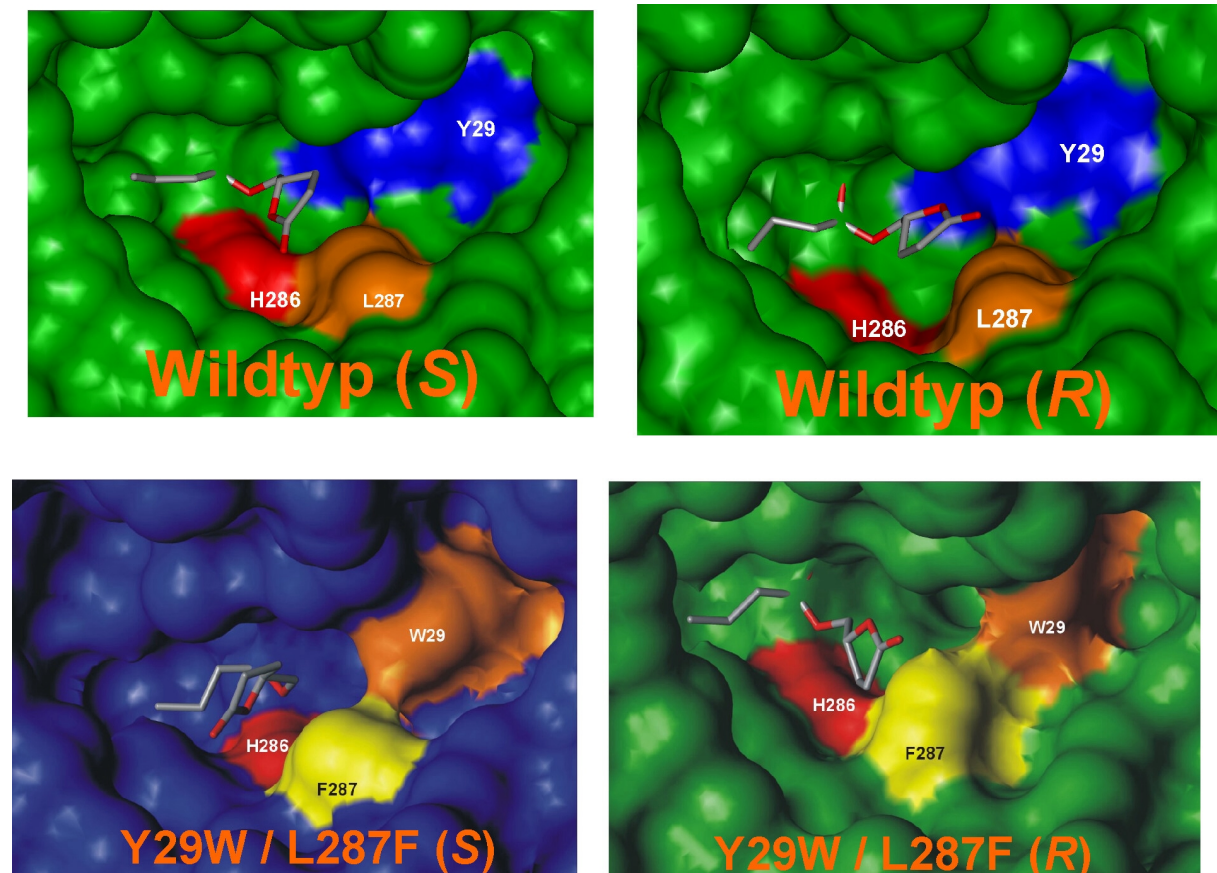


Abbildung 29: Lage der beiden Enantiomere des Substrates E in der Bindungstasche des PCL-Wildtyps (oben) und der Doppelmutante Y29W / L287F (unten). Das nicht bevorzugte (S)-Enantiomer (links) kann durch die senkrechte Orientierung des F287 nicht im *His gap* binden und wird von den großen Seitenketten des W29 und F287 nach vorne gedrückt. Beim bevorzugten (R)-Enantiomer ändert sich die Form der Bindungstasche durch die Orientierung der Seitenketten des W29 und L287F. Der *hydrophilic trench* ist nicht mehr zugänglich und das Substrat bindet tief im *His gap*.

## 4.2 Herstellung der Mutanten L287W, L287Y und Y29W

### *Molekulargenetik*

Zur Verifizierung der *molecular modeling* Ergebnisse mit Mutanten der PCL wurde durch zielgerichtete Mutagenese Punktmutationen in das Gen der PCL eingeführt. So erfolgte der Austausch der Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin + Cytosin und Guanin (L287W), Cytosin und Thymin + Thymin und Adenin (L287Y) in den Positionen 2930/2931/2932 bzw. Cytosin und Thymin + Thymin und Guanin (Y29W) in den Positionen 2157/2158/2159 im Plasmid pT-LipHp (Abbildung 30). Das Gen der Mutante L287F wurde von Herrn Holger Scheib zur

Verfügung gestellt, die Gene der Doppelmutanten Y29W / L287F und Y29W / L287Y von Herrn Alexander Neugebauer.

<b>Wildtyp-PCL</b>										
282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292
C	K	W	N	H	L	D	E	I	N	Q
tgc	aag	tgg	aac	cat	ctc	gac	gag	atc	aac	cag
<b>L287W-Mutante</b>										
282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292
C	K	W	N	H	W	D	E	I	N	Q
tgc	aag	tgg	aac	cat	ttg	gac	gag	atc	aac	cag
<b>L287Y-Mutante</b>										
282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292
C	K	W	N	H	Y	D	E	I	N	Q
tgc	aag	tgg	aac	cat	tac	gac	gag	atc	aac	cag
<b>Wildtyp-PCL</b>										
24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
A	G	V	L	E	Y	W	Y	G	I	Q
gca	ggt	gtg	ctc	gag	ctg	tgg	tac	ggg	atc	cag
<b>Y29W-Mutante</b>										
24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
A	G	V	L	E	W	W	Y	G	I	Q
gca	ggt	gtg	ctc	gag	tgg	tgg	tac	ggg	atc	cag

Abbildung 30: Ausschnitt aus den Aminosäure- und Nucleotidsequenzen der Wildtyp-PCL und L287W, L287Y (oben) und Y29W-Mutanten (unten). Die Nummerierung (jeweils obere Zeile) entspricht der Aminosäuresequenz (mittlere Zeile). In der unteren Zeile findet sich die Nucleotidsequenz. Das katalytisch aktive H286 ist rot, die modifizierten Aminosäuren 287 bzw. 29 blau (in Wildtyp-PCL) bzw. grün (in den Mutanten) hervorgehoben.

Nach dem "QuikChange"-Protokoll erfolgte der Austausch der Basen im ansonsten unveränderten Plasmid pT-LipHp (Quyen *et al.* 1999). Die Mutation wurden durch die verwendeten Primer L287W, L287Y und Y29W *forward* und L287W, L287Y und Y29W

*reverse* (siehe Kapitel 8.1) an den gewünschten Stellen eingeführt. Durch vollständige Sequenzierung des Lipasegens sowohl in 5'-3'- als auch in 3'-5'-Richtung (siehe Kapitel 8.2) wurde der Einbau der Mutation überprüft und zeigte darüber hinaus, dass das Gen der PCL an keiner weiteren Stelle modifiziert worden war. Die mutierten Plasmide wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und überexprimiert. Die anschließende Fermentation der modifizierten PCL und des Helferproteins erfolgte analog Quyen *et al.* (Quyen *et al.* 1999). Die Expression wurde durch Erhöhen der Fermenter-Temperatur von 37° C auf 42° C induziert, nachdem eine OD<sub>578</sub> von 0,8 bis 1,0 erreicht wurde. Die Expression wurde nach 4 Std. Induktion gestoppt. Die Wildtyp-PCL und die PCL-Mutanten (L287F, L287W, L287Y und Y29W) wurden aus den Einschlusskörpern isoliert und nach einer von Quyen und Mitarbeitern entwickelten Umfaltungsprozedur in aktiver Form gewonnen (Quyen *et al.* 1999). Die hydrolytische Aktivität der umgefalteten Lipasen wurde durch den *p*-NPP-Test und pH-Stat Methode bestimmt.

#### *Charakterisierung der Expressionsprodukte der Wildtyp-PCL und der PCL-Mutanten L287F, L287W, L287Y und Y29W*

Die Auftrennung der Zellysate nach der Fermentation der Wildtyp-PCL und der PCL-Mutante L287F, L287W, L287Y und Y29W durch SDS-Gelelektrophorese zeigte, dass bei der Fermentation von Wildtyp-PCL und Mutanten vergleichbar viel Lipase exprimiert wurde (Abbildung 31 zeigt beispielhaft die Gele der Mutanten L287F und L287W). Densitometrische Bestimmung des Lipasegehaltes (Vergleich der Bandenstärke) im lyophilisierten Gesamtprotein ergaben für alle Lipasen ca. 45 %.

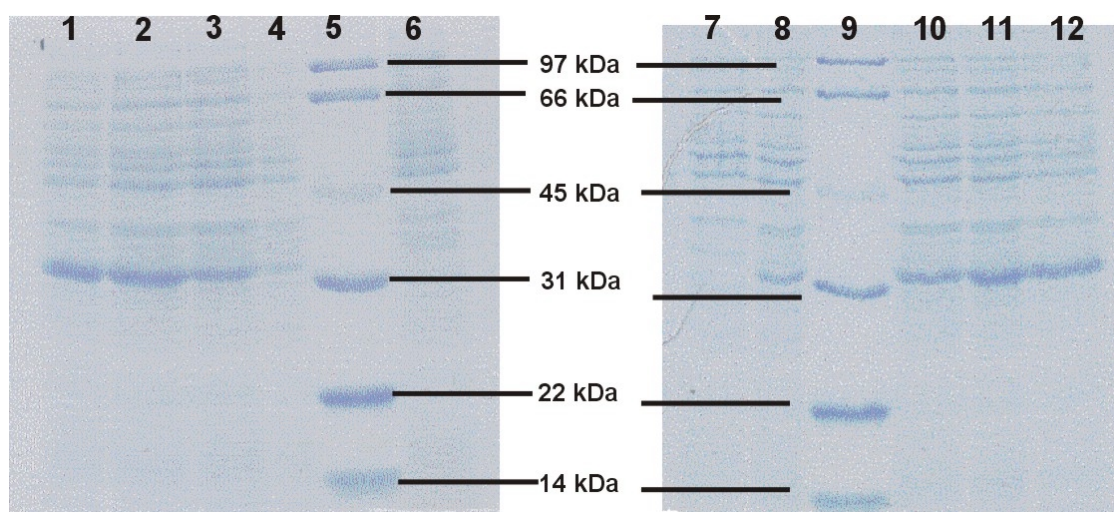


Abbildung 31: Links Mutante pT-LipHpL287F: SDS-Gel der fermentierten und transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen unter Kontrolle des  $\lambda$ P<sub>L</sub>-Promotors. Spur 1 zeigt Zellysate nach 4 h Inkubation, Spur 2 nach 3 h, Spur 3 nach 2h Spur 4 nach 1 h und Spur 6 vor der Inkubation als Kontrolle. Spur 5 und 9 ist der Standard. Rechts Mutante pT-LipHpL287W: Spur 7 ist als Kontrolle vor Inkubation. Spur 8 nach 1 h, Spur 10 nach 2h, Spur 11 nach 4 h und Spur 12 nach 3 h Inkubation.

Die Bestimmung der Lipasemenge im Lyophilisat ergab für den Wildtyp und die Mutanten nach der densitometrischen Bestimmung jeweils ca. 45 %. Daher wurde für die Aktivitätsbestimmung bei allen Lipasen die gleichen Mengen eingesetzt. Die daraus resultierende Aktivität der einzelnen Lipasen ist somit vergleichbar. Die Messung der Aktivitäten von Wildtyp-PCL und der Mutanten erfolgte durch den photometrischen Nachweis der hydrolytischen Aktivität nach der Spaltung von *p*-Nitrophenylpalmitat. Alle Mutanten spalteten *p*-Nitrophenylpalmitat mit vergleichbarer Aktivität. Tabelle 25 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Aktivitäten pro ml eingesetzter *Refolding*-Lösung.

Tabelle 25: Aktivität der Wildtyp-PCL und der Mutanten bei der Hydrolyse von *p*-NPP bei 37° C.

Lipase	Aktivität <i>p</i> -NPP-Test [U/ml]
Wildtyp-PCL	3650
L287F-Mutante	1800
L287W-Mutante	1700
L287Y-Mutante	1650
Y29W-Mutante	1875

Die Lipaseaktivität des lyophilisierten Enzyms wurde mittels pH-Stat-Methode mit Tributyrin als Substrat bestimmt. 20 ml Substratlösung wurden auf 30° C erhitzt und auf pH 8,1 eingestellt. Nach der Zugabe von 10 mg in Wasser gelöster Lipase wurde die Aktivität bestimmt. Eine Einheit (U) Lipaseaktivität wurde definiert als Menge Enzym, die 1 µmol Fettsäure pro Minute unter diesen Bedingungen freisetzt.

Tabelle 26: Aktivität der Wildtyp-PCL und der Mutanten mittels pH-Stat-Methode

Lipase	Aktivität pH-Stat-Methode [U/g]
Wildtyp-PCL	1800
L287F-Mutante	815
L287W-Mutante	800
L287Y-Mutante	820
Y29W-Mutante	865



### 4.3 Experimentelle Enantioselektivität der PCL-Mutanten

10 mmol des racemischen Gemisches des Substrates **E** wurden in 1ml Toluol gelöst, 12 mmol Vinylacetat zugegeben und zum Start der Reaktion 10 mg Lipase ins Reaktionsgefäß eingebracht. Die Reaktion wurde bei 40° C unter Schütteln durchgeführt. Nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h und 24 h wurden Aliquotes des Reaktionsgemisches entnommen und mit Hilfe der Gaschromatographie getrennt. Die ermittelten E-Werte der Mutanten sind in Tabelle 27 aufgelistet.

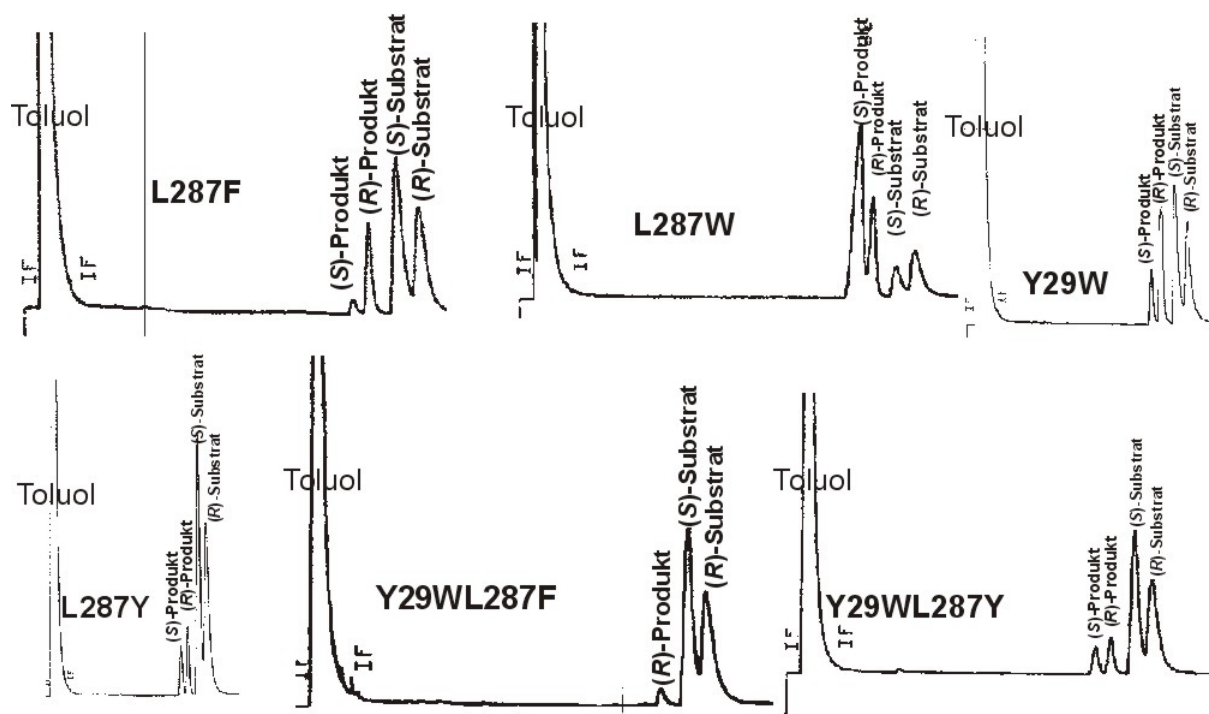


Abbildung 32: Gaschromatogramme der Umsetzung des Substrates **E** mit: Mutante L287F, Mutante L287W, Mutante Y29W, Mutante L287Y, Doppelmutante Y29W / L287F und Doppelmutante Y29W / L287Y.

Die größte Steigerung des E-Wertes konnte für Substrat **E** und die Y29W / L287F-Mutante ( $E > 100$ ) und die L287F-Mutante gemessen werden. Bei beiden Mutanten drückt das nicht bevorzugte Enantiomer die Seitenkette des katalytischen H286 weg und das bevorzugte Enantiomer bewegt sich besonders tief in das *His gap*, da der Ring des Substrates, der planare Phenylring der F287-Seitenkette und der Imidazolring des katalytischen H286 parallel zueinander orientiert sind. Dieser Effekt ist besonders anschaulich in Abbildung 33 dargestellt.

Tabelle 27: Die experimentell bestimmten E-Werte des PCL-Wildtyps und der Mutanten für Substrat **E**.

Wildtyp	L287F	L287W	L287Y	Y29W	Y29W/L287Y	Y29W/L287F
(R) $E = 3 \pm 0,2$	(R) $E = 6 \pm 0,5$	(S) $E = 2 \pm 0,2$	(R) $E = 2 \pm 0,2$	(R) $E = 3 \pm 0,2$	(R) $E = 3 \pm 0,2$	(R) $E > 100$

Gegenüber Substrat **E** besitzt die Mutante Y29W den selben E-Wert wie der Wildtyp, für L287Y (E=2 im Gegensatz zu E=3 beim Wildtyp) eine etwas geringere und für L287F eine etwas gesteigerte (E=6 im Gegensatz zu E=3 beim Wildtyp) Enantioselektivität gemessen. Im Vergleich zum Wildtyp besitzt die Doppelmutante Y29W / L287Y keine veränderte Enantioselektivität, während die Doppelmutante Y29W / L287F eine sehr große Steigerung der Enantioselektivität bewirkt (E>100). Somit sind die Effekte der Doppelmutanten gegenüber Substrat **E** nicht additiv zu denen der Einzelmutanten.

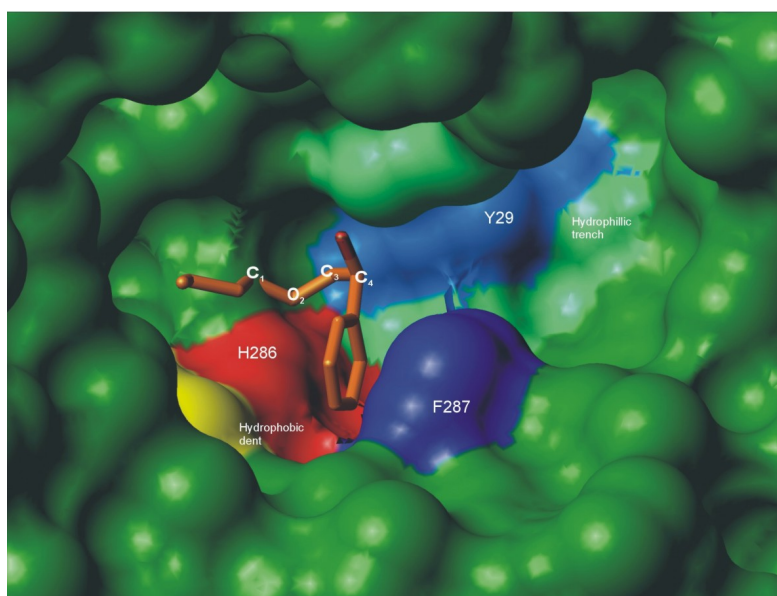


Abbildung 33: Das bevorzugte (*S*)-Enantiomer von Substrat **D** in der Bindungstasche der PCL-L287F-Mutante nach der molekulardynamischen Simulation. Diese Abbildung zeigt sehr gut, wie der Phenylring des Substrates, der Phenylring der F287-Seitenkette und der Imidazolring des katalytischen H286 sich parallel zueinander orientieren, daher kann sich dieses Enantiomer sehr tief das *His gap* bewegen. Ebenso verhält es sich für Substrat **E** und die Mutante L287F.

#### 4.4 Korrelation zwischen der Differenz der Torsionswinkel und dem experimentell bestimmten E-Wert

Die *in vitro* hergestellten und getesteten Mutanten wurden aufgrund ihres Einflusses auf die Differenz des Torsionswinkel  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  [berechnet als  $(\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-Enantiomer})) - (\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{R-Enantiomer}))$ , daraus folgt:  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}} > 0 = (\text{S-Präferenz})$  und  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}} < 0 = (\text{R-Präferenz})$ ] der beiden Enantiomere eines Substrates im Computermodell untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob eine Korrelation zwischen dem *in silico* Assay ( $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$ ) und dem experimentell ermittelten E-Wert besteht. Daher wurde in Abbildung 34 die Differenz der Torsionswinkel  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  gegen den E-Wert des Substrates **E** aufgetragen.

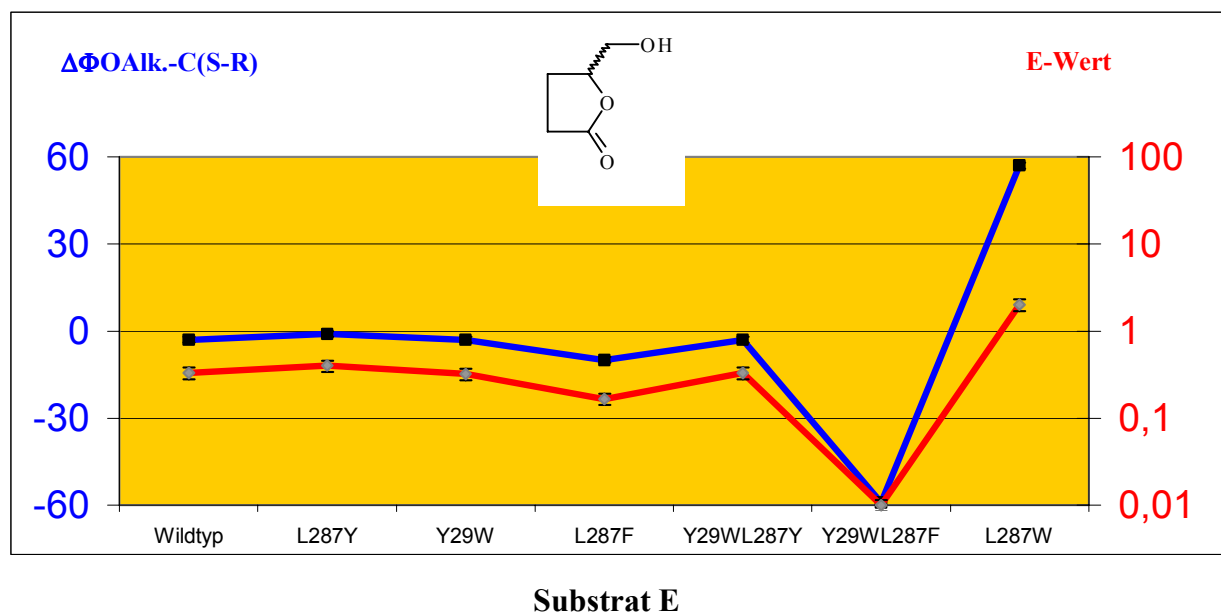


Abbildung 34: Die Korrelation zwischen dem *in silico* Assay,  $\Delta\Phi_{\text{OAIK.-C}}(\text{S-R})$  [berechnet als  $(S)\Phi_{\text{OAIK.-C}} - (R)\Phi_{\text{OAIK.-C}}$ , daraus folgt:  $\Delta\Phi_{\text{OAIK.-C}} > 0 = (S)$ -Präferenz und  $\Delta\Phi_{\text{OAIK.-C}} < 0 = (R)$ -Präferenz] (blau), und dem experimentell bestimmten E-Wert (rot) für Substrat E.

Auf den oben gezeigten Diagrammen ist das Verhältnis zwischen dem *in silico* Assay und dem experimentell ermittelten E-Wert zu erkennen. Diese Korrelation zwischen dem *in silico* Assay und den experimentell bestimmten E-Werten erlaubt die semi-quantitative Vorhersage des E-Wertes anhand des *molecular modeling* für weitere Mutanten oder Substrate, welche unter identischen Bedingungen wie die in dieser Arbeit durchgeführten und beschriebenen untersucht werden.

## 4.5 Enantioselektivität von Substraten mit dem Stereozentrum in einer Ringstruktur

### 4.5.1 Substrate aus der Literatur

Von den Substraten, deren Daten über die Enantioselektivität aus der Literatur entnommen wurden, haben neun ihr Stereozentrum in einer Ringstruktur (Abbildung 35). Diese Substrate folgen häufig nicht der empirischen Regel zur Vorhersage der Enantiopräferenz von Weissfloch und Kazlauskas (Weissfloch und Kazlauskas 1995). Alle in Abbildung 35 dargestellten Substrate mit 5-Ringen folgen der empirischen Regel, während alle Substrate



mit 6-Ringe eine Ausnahme der Regel darstellen, unabhängig ob die Substrate ein Sauerstoff am Stereozentrum besitzen oder nicht.

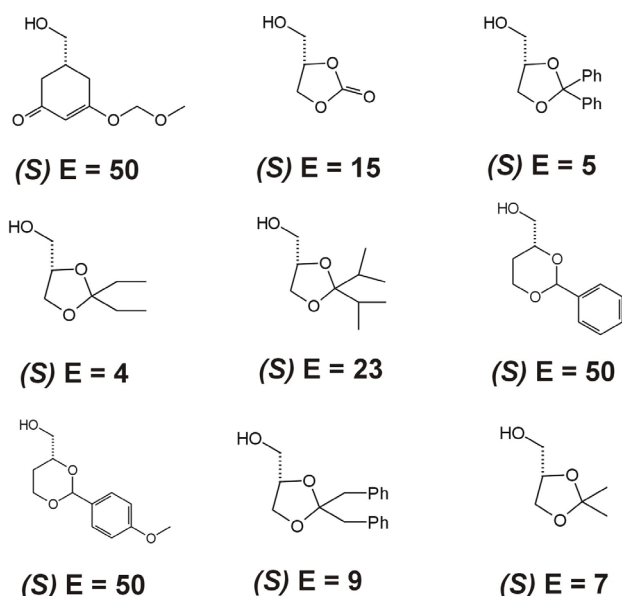


Abbildung 35: Die Daten über die Enantioselektivität der PCL gegenüber diesen neun Substraten wurden aus der Literatur (Weissfloch und Kazlauskas 1995; Bornscheuer und Kazlauskas 1999) entnommen (siehe auch Tabelle 13). Alle Substrate sind in der Darstellungsform nach Weissfloch und Kazlauskas (Weissfloch und Kazlauskas 1995), mit der funktionellen COH-Gruppe nach hinten und dem „großen“ Substituenten auf der rechten Seite dargestellt. Das experimentell bestimmte bevorzugte Enantiomer der PCL-katalysierten Umsetzung und der ermittelte E-Wert sind unter der jeweiligen Struktur angegeben. Dabei folgen alle 5-Ringe der empirischen Regel, während die 6-Ringe ihr nicht folgen und somit das nicht bevorzugte Enantiomer hier dargestellt ist.

Auch diese Substrate bewegen sich mit ihrem „großen“ Substituenten, dem gesamten Ring, in das *His gap*. Da diese Substrate wenig flexibel sind, wird durch die Bewegung des bevorzugten Enantiomers der Imidazolring des katalytischen H286 weggedrückt (Abbildung 36).

Das nicht bevorzugte Enantiomer kommt nicht in Kontakt mit dem *His gap*, daher bleibt der Imidazolring des H286 in der gleichen Position für alle Substrate. Je tiefer das bevorzugte Enantiomer sich in das *His gap* bewegt, um so mehr wird die Seitenkette des H286 weggedrückt. Dadurch vergrößert sich das *His gap* (zwischen 5Å und 7Å), dessen Größe immer zwischen den zwei Atomen der beiden *His gap* bildenden Aminosäuren (PCL Wildtyp H286 und L287) gemessen wurde, die sich am nächsten waren. Dies war für den Wildtyp immer der Abstand von N<sub>ε</sub>(H286) und C<sub>δ</sub>(L287). In dem Maße, wie das *His gap* sich vergrößert nimmt auch der E-Wert der Substrate zu (Abbildung 37). Ein Optimum liegt zwischen 6,3Å und 6,7Å mit experimentell bestimmten E-Werten mit E = 50. Eine weitere

Zunahme der Größe, was mit einem extremen Wegdrücken der H286 Seitenkette verbunden ist, führt wieder zu eine Abnahme der Enantioselektivität.

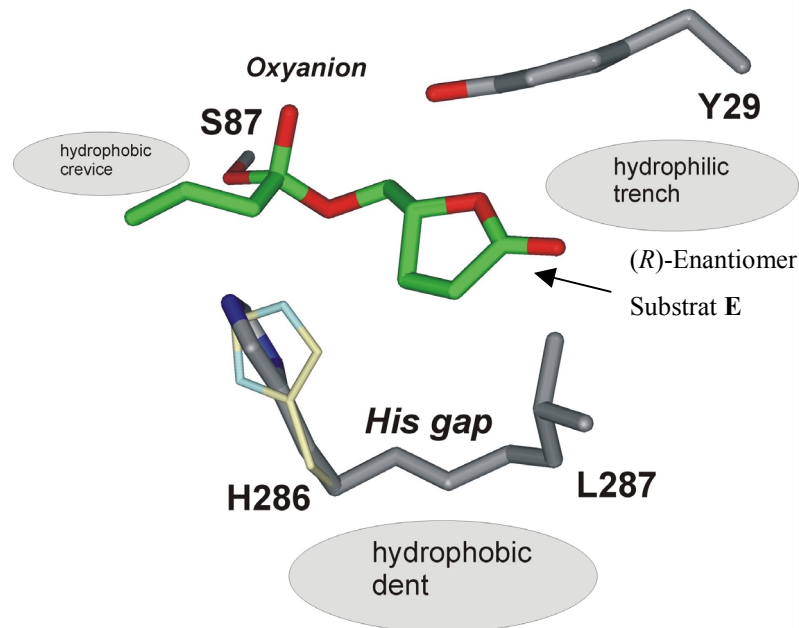


Abbildung 36: Die Bewegung des bevorzugten Enantiomers eines Substrates (Substrat **E**) mit dem Stereozentrum in einer Ringstruktur drückt die Seitenkette des katalytischen H286 weg (hellgrau und dünn Startstruktur aus pdb-Struktur; dunkelgrau und dick Imidazolring nach der Simulation). Durch diese Bewegung ändert sich die Größe des *His gap*, was durch die Darstellung des katalytischen H286 aus der pdb-Struktur (hellgrau) und der resultierenden mittleren Struktur der Simulation (dunkelgrau) verdeutlicht wird.

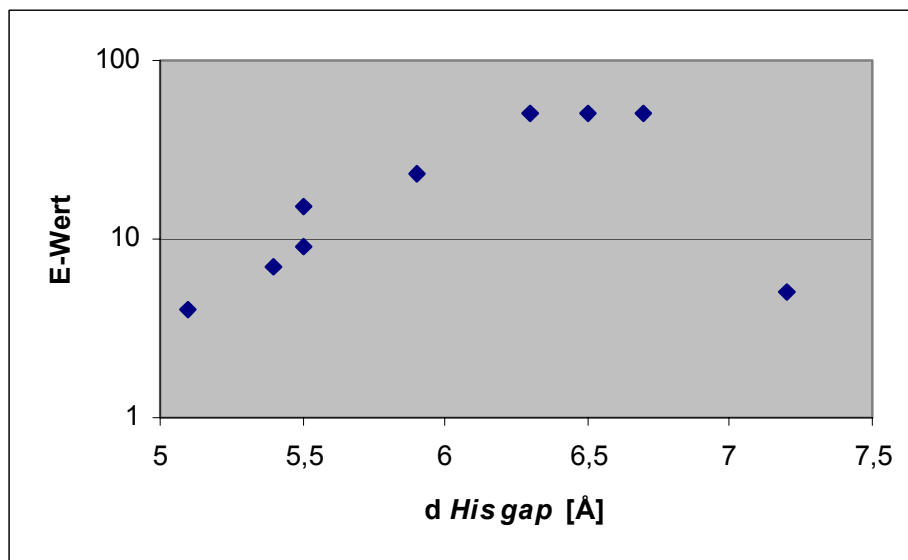


Abbildung 37: Die Korrelation zwischen dem experimentell bestimmten E-Wert und der Größe des *His gap* ( $d_{His\ gap}$  als Abstand zwischen  $N_{\epsilon}$ (H286) und  $C_{\delta}$ (L287)) des bevorzugten Enantiomers von den Substraten, deren Daten über die Enantioselektivität aus der Literatur entnommen wurden. Das Optimum der E-Werte liegt bei  $d_{His\ gap}$  zwischen 6,3 Å und 6,7 Å.

Zusätzliche *molecular modeling* Untersuchungen, bei denen die beiden Enantiomere dieser neun Substrate (Abbildung 35) ins *His gap* gedockt wurden, zeigten, dass sich das jeweils nicht bevorzugte während der Simulation aus dem *His gap* hinaus bewegt, während das bevorzugte Enantiomer dort bleibt.

#### 4.5.2 Substrat E: Korrelation Zwischen dem E-Wert und der Größe des *His gaps*

Da für Substrate, die das Stereozentrum in einer Ringstruktur besitzen, die Öffnung des *His gaps* mit der experimentell bestimmten Enantioselektivität korreliert, wurde dieser Effekt ebenfalls für Substrat E und den Wildtyp sowie den Mutanten untersucht. Auch in diesem Fall konnte eine Öffnung des *His gaps* durch das Wegdrücken des Imidazolringes des H286 durch das bevorzugten Enantiomer beobachtet werden. Für das nicht bevorzugte bleibt die Größe des *His gaps* auch hier beinahe unverändert. Die experimentell bestimmten E-Werte und dazugehörigen Chromatogramme wurden bereits in Kapitel 4.3 aufgeführt.

##### *Wildtyp*

Das bevorzugte (*R*)-Enantiomer drückt durch die Bewegung in das *His gap* den Imidazolring des katalytischen H286 weit weg. Die Größe des *His gaps*, gemessen zwischen  $N_{\epsilon}(\text{H286})$  und  $C_{\delta}(\text{L287})$  beträgt 7,0 Å und der experimentell bestimmte E-Wert war  $E = 3$ ; (*R*)-Präferenz.

##### *Mutante L287F*

Im Modell konnte im Vergleich zum Wildtyp eine Bewegung des bevorzugten (*R*)-Enantiomers tiefer in das *His gap* beobachtet werden. Der Phenylring der F287 Seitenkette dreht sich parallel zum Imidazolring des katalytischen H286, welcher aufgrund der daraus resultierenden Vergrößerung des *His gaps* nicht so weit weggedrückt wird. Die Größe des *His gaps*, gemessen zwischen  $N_{\epsilon}(\text{H286})$  und  $C_{\epsilon}(\text{F287})$  beträgt 6,2 Å und der experimentell bestimmte E-Wert war  $E = 6$ ; (*R*)-Präferenz.

##### *Mutante L287W*

Durch die Mutante L287W wurde die Umkehr der Enantiopräferenz für Substrat E im Vergleich zum Wildtyp experimentell bestimmt. Die sperrigere Seitenkette des W287 lässt sich wegen seiner Größe nicht wegdrücken. Daher bewegt sich das bevorzugte (*S*)-Enantiomer nicht tief in das *His gap*. Die Seitenkette des H286 wird dadurch nicht

weggedrückt. Die Größe des *His gaps*, gemessen zwischen  $N_{\epsilon}(\text{H286})$  und  $C_{\epsilon}(\text{W287})$  beträgt 5,5 Å und der experimentell bestimmte E-Wert war  $E = 2$ ; (*S*)-Präferenz.

#### *Mutante L287Y*

Der Imidazolring des katalytischen H286 wird durch die Bewegung des bevorzugten (*R*)-Enantiomers in das *His gap* weit weggedrückt. Die Größe des *His gaps*, gemessen zwischen  $N_{\epsilon}(\text{H286})$  und  $C_{\epsilon}(\text{Y287})$  beträgt 7,2 Å, der experimentell bestimmte E-Wert=2; (*R*)-Präferenz.

#### *Mutante Y29W*

Das bevorzugte (*R*)-Enantiomer drückt durch die Bewegung in das *His gap* den Imidazolring des katalytischen H286 leicht weg. Die Größe des *His gaps*, gemessen zwischen  $N_{\epsilon}(\text{H286})$  und  $C_{\delta}(\text{L287})$  beträgt 6,1 Å und der experimentell bestimmte E-Wert war 3, (*R*)-Präferenz.

#### *Doppelmutante Y29W / L287Y*

Der Imidazolring des katalytischen H286 wird durch die Bewegung des bevorzugten (*R*)-Enantiomers in das *His gap* nicht weit weggedrückt. Aufgrund der Größe und Konformation der W29 Seitenkette, die eine senkrechte Orientierung des Ringes zum H286 räumlich nicht ermöglicht, bindet der Ring senkrecht zum Imidazolring und Phenylring des Y287. Da das *His gap* sich nicht weit öffnet, bindet das Substrat nicht sehr tief darin. Die Größe des *His gaps*, gemessen zwischen  $N_{\epsilon}(\text{H286})$  und  $C_{\epsilon}(\text{Y287})$  beträgt 6,0 Å und der experimentell bestimmte E-Wert war 3; (*R*)-Präferenz.

#### *Doppelmutante Y29W / L287F*

Im Modell konnte im Vergleich zum Wildtyp eine Bewegung des bevorzugten (*R*)-Enantiomers tiefer in das *His gap* beobachtet werden. Der Phenylring der F287 Seitenkette dreht sich parallel zum Imidazolring des katalytischen H286, welcher aufgrund der daraus resultierende Vergrößerung des *His gaps* nicht so weit weggedrückt wird. Durch die große Seitenkette des W29 wird das bevorzugte (*R*)-Enantiomer sehr tief in das *His gap* gerückt. Im Vergleich zu den anderen Mutanten, ändert sich bei dieser Mutante die Lage des nicht bevorzugten Enantiomers, welche sonst immer beinahe unverändert ist. Die Seitenkette des W29 drückt das Substrat nach unten. Durch die senkrechte Orientierung des Phenylrings des F287 verschließt dieser allerdings das *His gap*, wodurch das Substrat geometrisch ungünstig vor dem *His gap* bindet. Dennoch wird durch die Bewegung des (*S*)-Enantiomers der Imidazolring des H286 weit weggedrückt. Die Größe des *His gaps*, gemessen zwischen

$N_{\epsilon}$ (H286) und  $C_{\delta}$ (F287) für das (*R*)-Enantiomer beträgt 6,5 Å und der experimentell bestimmte E-Wert war  $E > 100$ ; (*R*)-Präferenz.

Auch in diesem Falle korreliert die Größe des *His gap* mit dem experimentell bestimmten E-Wert (Abbildung 38). Das Optimum für dieses Substrat und die untersuchten Mutanten liegt bei 6,5 Å für Mutante Y29W / L287F mit einem E-Wert von  $E > 100$ ; (*R*)-Präferenz.

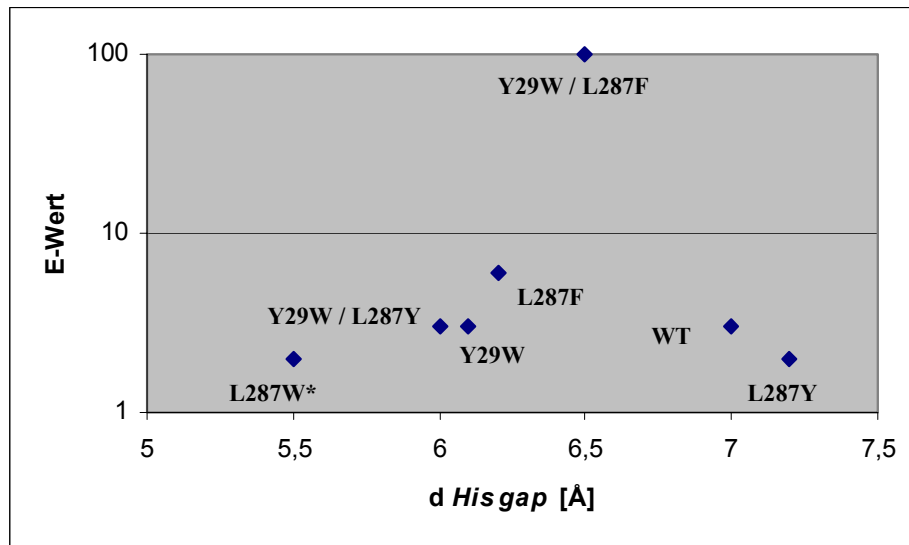


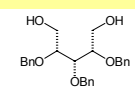
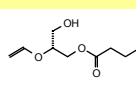
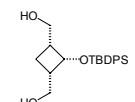
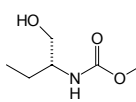
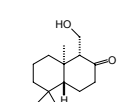
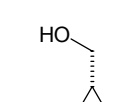
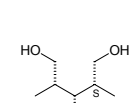
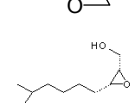
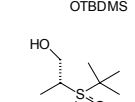
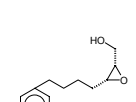
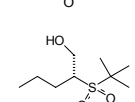
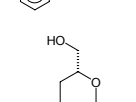
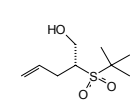
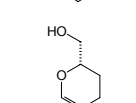
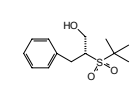
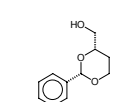
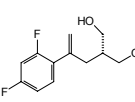
Abbildung 38: Korrelation zwischen dem experimentell bestimmten E-Wert und der Größe des *His gap* ( $d_{His\ gap}$ ) des bevorzugten Enantiomers von Substrat **E** und dem PCL Wildtyp und Mutanten.  $d_{His\ gap}$  wurde gemessen als Abstand zwischen  $N_{\epsilon}$ (H286) und  $C_{\delta}$ (L287) im Wildtyp (WT),  $N_{\epsilon}$ (H286) und  $C_{\delta}$ (F287) in der L287F und Y29W/L287F Mutante,  $N_{\epsilon}$ (H286) und  $C_{\delta}$ (W287) in der L287W Mutante,  $N_{\epsilon}$ (H286) und  $C_{\delta}$ (Y287) in der L287Y und Y29W / L287Y Mutante und  $N_{\epsilon}$ (H286) und  $C_{\delta}$ (L287) in der Y29W Mutante.

\*Für L287W ist das (*S*)-Enantiomer bevorzugt, für alle anderen das (*R*)-Enantiomer

#### 4.6 Enantioselektivität anderer Lipasen gegenüber primären Alkoholen

Andere mikrobielle Lipasen besitzen keine oder nur geringe Enantioselektivität gegenüber primären Alkoholen, oder wie im Fall der *Candida rugosa* Lipase (CRL), nur gegenüber sperrigen und großen Substraten. Als einzige weitere Lipase zeigt die Schweinepankreas Lipase (PPL) hohe Enantioselektivität gegenüber einem breiten Spektrum an primären Alkoholen. Es wurden *molecular modeling* Untersuchungen von *Candida antarctica* Lipase B (CAL-B), *Rhizomucor miehei* Lipase RML, CRL und PPL anhand von unterschiedlichen Substraten durchgeführt (Tabelle 28), deren Daten über die Enantioselektivität aus der Literatur entnommen wurden (Bornscheuer und Kazlauskas 1999).

Tabelle 28: Substrate zur Untersuchung der Enantioselektivität von CAL-B, CRL, RML und PPL, deren Daten über die Enantioselektivität aus der Literatur entnommen wurden (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Es ist jeweils das bevorzugte Enantiomer dargestellt.

Lipase	Substrat	bevorzugtes E-		$\Phi_{\text{OAlk-C}}$		Lipase	Substrat	bevorzugtes E-		$\Phi_{\text{OAlk-C}}$	
		Enantiomer	Wert	(R)	(S)			Enantiomer	Wert	(R)	(S)
CRL 1		S	7	197	233	RML 1		R	4	192	169
CRL 2		R	8	256	214	RML 2		R	53	182	134
CRL 3		R	10	123	124	PPL 1		R	13	300	280
CRL 4		S	12	211	200	PPL 2		S	13	274	211
CAL 1		R	18	182	136	PPL 3		S	50	189	301
CAL 2		R	6	177	122	PPL 4		R	21	234	237
CAL 3		R	6	192	171	PPL 5		S	30	256	264
CAL 4		R	49	103	77	PPL 6		S	50	123	154
CAL 5		S	2	135	145						

Zusätzlich wurden noch die Substrate **D** und **E** in die Bindungstasche von CRL, CAL-B und RML gedockt und die molekulardynamischen Untersuchungen analog zu den Simulationen der PCL durchgeführt und die experimentellen E-Werte von Substrat **E** bestimmt.

#### *Candida antarctica* Lipase B

Die in Tabelle 28 aufgeführten Substrate CAL-B 1 – CAL-B 4 wurden in die Bindungstasche der CAL-B gedockt und mit denselben Bedingungen wie für PCL beschrieben, molekulardynamisch untersucht. Das bevorzugte Enantiomer der untersuchten Substrate bindet im *His gap*, welches von katalytischen H224 und L278 gebildet wird. Das nicht bevorzugte Enantiomer bindet oberhalb des *His gaps*. Die auf gleiche Weise durchgeführten Simulationen für Substrat **D** und **E** zeigten, dass nur das (R)-Enantiomer des Substrates **E** im *His gap* bindet (Abbildung 40). Beide Enantiomere des Substrates **D** binden ohne signifikante



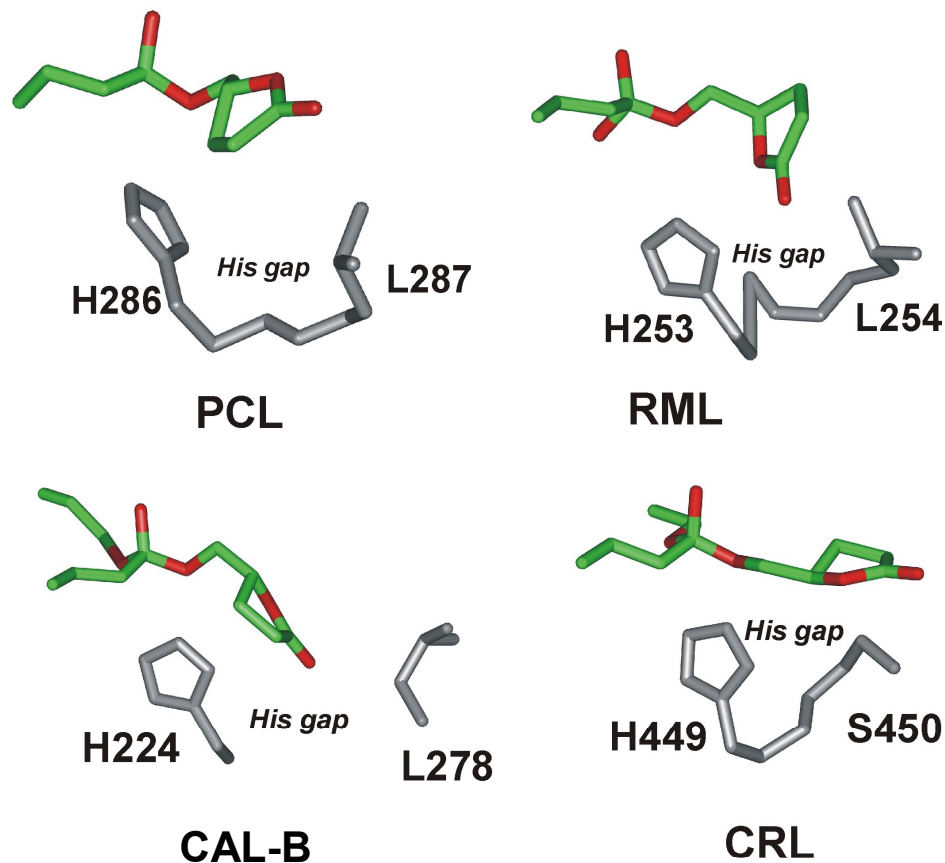


Abbildung 40: Orientierung des Substrates E nach der molekulardynamischen Simulation. Das hier dargestellte (*R*)-Enantiomer bindet bei PCL, RML und CAL-B im *His gap* und diese drei Lipasen besitzen experimentell bestimmte Enantioselektivität gegenüber diesem Substrat. Bei der CRL kann das Substrat aus geometrischen Gründen nicht im *His gap* binden. Das *His gap* der CRL für primäre Alkohole unterscheidet sich zu dem für Triacylglyceride (Pleiss *et al.* 2000)

### *Schweinepankreas Lipase*

Es wurden sechs Substrate (Tabelle 28; PPL 1 – PPL 6) in die Bindungstasche der PPL gedockt und die molekulardynamischen Simulationen ebenso wie für die mikrobiellen Lipasen beschrieben, durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Substrate nicht im *His gap* binden, welches vom katalytischen H264 und seinem strukturellem Nachbarn L265 gebildet wird. Die Konformation und die Lage des *His gaps* der PPL ermöglicht nicht die Bewegung der Substrate in dieses *His gap*. Dazu müssen die Substrate das chirale Zentrum um ein Atom näher zum tetraedrischen Kohlenstoff besitzen. Die Substrate binden vielmehr in einer anderen Bindungstaschenregion, dem *hydrophilic trench* der PCL entsprechend. In diesem Bindungstaschenbereich binden sie allerdings auch in einer Spalte, ein Strukturmotiv, das vom nicht katalytischen H152 und seinem strukturellem L265 gebildet wird (Abbildung 41).



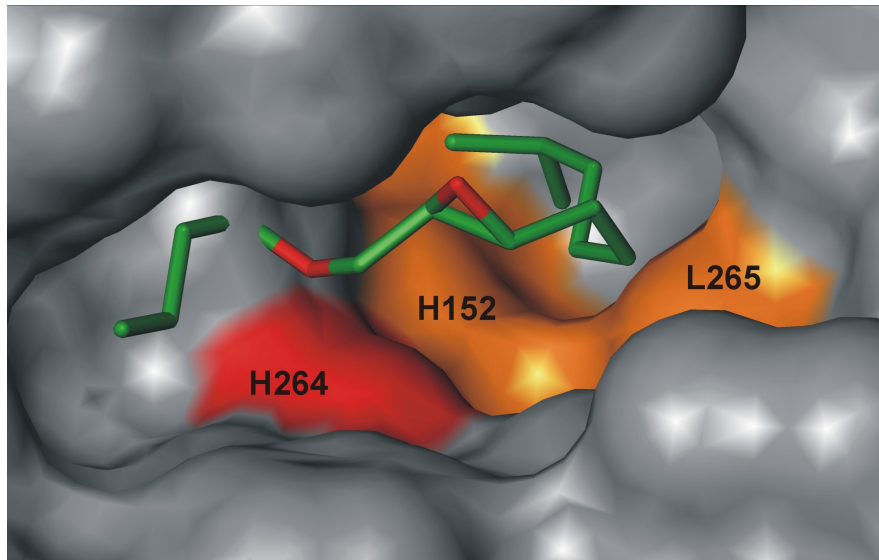


Abbildung 41: Das bevorzugte Enantiomer bindet in der PPL immer tiefer oder ausschließlich in einer Spalte, welche vom nicht katalytischen H152 und seinem strukturellem Nachbarn L265 gebildet wird. Die Region, in der dieses Strukturmotiv liegt, entspricht dem *hydrophilic trench* der PCL (vergl. Abbildung 33)

Das bevorzugte Enantiomer eines Substrates bindet immer tiefer oder ausschließlich in dieser Spalte, was eine Vorhersage der Enantiopräferenz anhand des Computermodells erlaubt. Die Größe dieser Spalte korreliert mit der experimentell bestimmten Enantioselektivität. Je kleiner diese Bindungstasche für das bevorzugte Enantiomer ist, um so größer ist der resultierende experimentell bestimmte E-Wert (Abbildung 42). Für das nicht bevorzugte Enantiomer verhält es sich genau umgekehrt. Die Größe der Spalte korreliert mit der Enantioselektivität. Im Gegensatz zur PCL, bei der die Enantioselektivität mit zunehmender Größe des *His gaps* korreliert (siehe Kapitel 4.5), wurde für die PPL beobachtet, dass je kleiner die Spalte im Modell ist, umso größer ist der experimentell bestimmte E-Wert. Dies liegt darin begründet, dass das bevorzugte Enantiomer sich parallel zu den Seitenketten der Spalte ausrichtet und so darin binden kann, auch wenn die Spalte sehr eng ist. Dies konnte für das nicht bevorzugte nicht beobachtet werden, weshalb es nicht so tief in diesem Strukturmotiv bindet oder bei Substrat PPL 5 und PPL 6 sich sogar aus dieser Bindungstaschenregion hinaus bewegt.

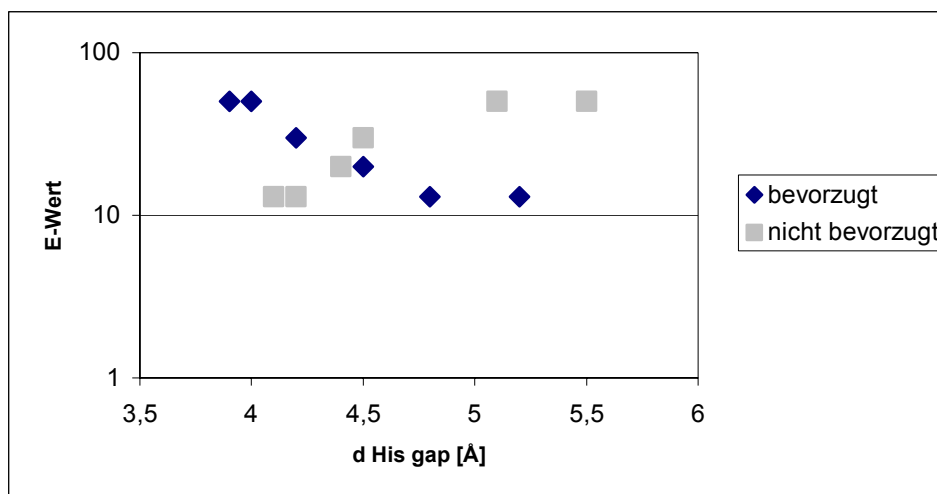


Abbildung 42: Die Korrelation zwischen dem experimentell bestimmten E-Wert und der Größe des *His gap* ( $d_{His\ gap}$ ) für die sechs mit PPL untersuchten Substrate (PPL 1 – PPL 6).  $d_{His\ gap}$  wurde gemessen als Abstand zwischen  $N_{\epsilon}$ (H152) und  $C_{\delta}$ (L265). Die dunklen Punkte (◆) zeigen die Abstände im Modell für das bevorzugte Enantiomer und die hellen die des nicht bevorzugten Enantiomers (■).

### *Candida rugosa* Lipase

Die Substrate CRL 1 – CRL 4 (Tabelle 28) wurden in die Bindungstasche der CRL gedockt und mittels molekulardynamischer Simulationen untersucht. Auch hier konnte festgestellt werden, dass die großen Substituenten nicht im *His gap* binden, welches vom katalytischen H449 und seinem sequentiellen und strukturellem Nachbarn S450 gebildet wird (Abbildung 40), sondern entsprechend dem Bindungsmodus der PPL in der Bindungstaschenregion, die dem *hydrophilic trench* der PCL entspricht. Auch in diesem Fall ist die Bewegung der Substrate in das *His gap* durch die Geometrie der Bindungstasche und der Lage des *His gaps* nicht möglich und die Enantiopräferenz kann deshalb nicht anhand des *in silico* Assays vorhergesagt werden. Das *His gap* ist schmal und der große Rest bindet über dem *His gap* bildenden S450. Die ebenfalls untersuchten Substrate **D** und **E** besitzen zu kleine Substituenten, die dadurch nicht in den Bindungstaschenbereich analog dem *hydrophilic trench* der PCL gelangen können (Abbildung 40). Beide Enantiomere der Substrate **D** und **E** binden in der selben Orientierung ohne große Unterschiede. Experimentell konnte keine Enantioselektivität der CRL gegenüber dem Substrat **E** ( $E = 1$ ) bestimmt werden.

## 4.7 Bestimmung der Aktivität der PCL-Mutanten *in silico*

Bei der experimentellen Bestimmung des E-Wertes durch Veresterung eines primären Alkohols (Substrat **E**) mit dem Wildtyp der PCL und den Mutanten konnte festgestellt

werden, dass die mit pH-Stat-Methode bestimmte Aktivität gegenüber Tributyrin der Lipasen nicht gleichzeitig auch der Aktivität gegenüber Substrat **E** entspricht. Die Aktivität der Mutanten gegenüber Tributyrin, bestimmt mit pH-Stat Methode, war auch für alle Mutanten etwa gleich, diese besaßen aber unterschiedliche Aktivitäten gegenüber Substrat **E** (Tabelle 29). Die Berechnung der Aktivität erfolgte durch den Vergleich der Verhältnisse von Substratpeaks und der Produktpeaks nach einer bestimmten Reaktionszeit und des daraus resultierenden Umsatzes. Die Aktivität des Wildtyps gegenüber den einzelnen Substraten wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Die Fehler der Aktivitätsbestimmung der einzelnen Lipasen gegenüber Substrat **E** können nur schlecht wiedergegeben werden. Bei den ermittelten Werten der Aktivität handelt es sich um eine Abschätzung. Anhand der SDS-Gele konnte gezeigt werden, dass das Lyophilisat des Wildtyps und der Mutanten vergleichbare Mengen an Lipase enthalten (Kapitel 4.2). Dazu jeder Umsetzung 10 mg Lyophilisat eingesetzt wurden, sollten bei jeder Umsetzung gleiche Mengen Lipase vorgelegen haben.

Tabelle 29: Aktivitäten des PCL-Wildtyps und der Mutanten gegenüber dem experimentell untersuchten primären Alkohol (Substrat **E**) und Tributyrin. Die Aktivität des Wildtyps gegenüber dem Substrat wurde auf 100 % gesetzt.

Lipase	Tributyrin	Substrat E
Wildtyp	100 %	100 %
L287F	44 %	110 %
L287W	45 %	130 %
L287Y	46 %	75 %
Y29W	52 %	100 %

Der Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  des katalytischen H286 zum Alkoholsauerstoff im Computermodell steht in keinem Zusammenhang mit der Enantioselektivität der PCL gegenüber primären Alkoholen. Im Vergleich zum Wildtyp ist dieser Abstand bei den Mutanten allerdings für das bevorzugte Enantiomer oftmals kleiner, wenn diese eine höhere Aktivität als der Wildtyp gegenüber einem Substrat besitzen (Tabelle 30). Dies ist besonders deutlich für die L287W-Mutante zu beobachten. Die Substrate binden bei dieser Mutante nicht tief im *His gap*, dadurch wird der Imidazolring des katalytischen H286 nicht weggedrückt und diese Mutante zeigt gegenüber Substrat **E** eine höhere Aktivität als der Wildtyp, allerdings nicht gegenüber Tributyrin.



Abbildung 43: Aktivitäten des PCL-Wildtyps und der PCL-Mutanten gegenüber Substrat **E** (bestimmt anhand des Substrat- und Produktverhältnisses der GC-Chromatogramme der Biotransformation) und gegenüber Tributyrin (bestimmt mittels pH-Stat-Methode).

Um den Einfluss des Abstandes des katalytischen H286 zum Alkoholsauerstoff auf die spezifische Aktivität der Lipase bei der Katalyse zu bestimmen, wurde auch Tributyrin molekulardynamisch untersucht.

Tabelle 30: Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  zwischen dem katalytischen H286 und dem Alkoholsauerstoff des bevorzugten Enantiomers des experimentell untersuchten Substrat **E** und Tributyrin im Computermodell, sowie die experimentell bestimmte Aktivität der einzelnen Lipasen gegenüber Substrat **E**.

Lipase	Tributyrin	Substrat E	Aktivität gegenüber Substrat E
Wildtyp	1,7 [Å]	1,7 [Å]	100 %
L287F	4,6 [Å]	1,6 [Å]	110 %
L287W	4,6 [Å]	3,0 [Å]	130 %
L287Y	4,4 [Å]	1,6 [Å]	75 %
Y29W	3,1 [Å]	1,6 [Å]	100 %

In Tabelle 30 ist zu erkennen, dass der Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  bei Tributyrin für die Mutanten, die nur noch etwa 45 % Aktivität des Wildtyps gegenüber Tributyrin besitzen, deutlich größer ist als für den Wildtyp. Bei kleinerem Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  des bevorzugten Enantiomers des Substrates **E** zum katalytischen Histidin, ist allerdings eine Steigerung der Lipase-Aktivität zu beobachten. Teilweise ist aber auch der Abstand des nicht-bevorzugten Enantiomers mit zu beachten (erklärt die hohe Aktivität der L287W-Mutante, da dort das katalytische Histidin weit weg gedrückt wird).

Die beiden Doppelmutanten zeigten gegenüber Substrat **E** eine wesentlich geringere Aktivität als der Wildtyp. Der Abstand zwischen dem katalytischen H286 zum Alkoholsauerstoff bei beiden Mutanten kleiner als beim Wildtyp.

## 4.8 Enantioselektivität von Lipasen gegenüber Carbonsäuren

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Enantioselektivität von Lipasen gegenüber chiralen Carbonsäuren untersucht. Es wurde versucht, zum einen ein Modell zur Beschreibung der Enantioselektivität von *Candida rugosa* Lipase (CRL) und zum anderen von *Pseudomonas cepacia* Lipase (PCL) gegenüber dieser Substratklasse zu erstellen.

### 4.8.1 Enantioselektivität von CRL gegenüber chiralen Carbonsäuren

#### Substrate

Zur Etablierung eines allgemeingültigen Modells zur Vorhersage und Beschreibung der Enantioselektivität von CRL gegenüber Carbonsäuren, wurden die experimentellen Daten über die Enantioselektivität von acht chiralen Carbonsäuren aus der Literatur entnommen (Bornscheuer und Kazlauskas 1999) (siehe Abbildung 17). Diese experimentellen Daten wurden durch Veresterung mit kommerzieller CRL (gereinigt) bestimmt. Die Substrate zeigten eine strukturelle Vielfalt und breite Spanne an E-Werten (zwischen  $E = 3$  und  $E = >100$ ) und sind repräsentativ für das Spektrum an Carbonsäuren.

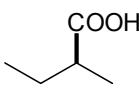
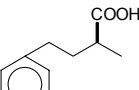
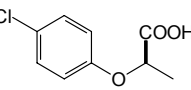
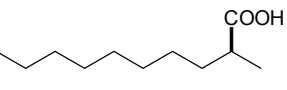
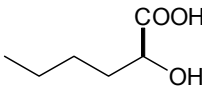
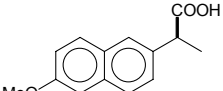
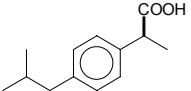
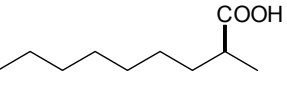
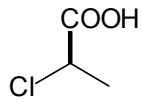
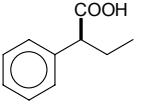
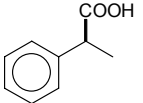
 Substrat 51: $E=5$	 Substrat 52: $E=40$	 Substrat 53: $E>100$	 Substrat 54: $E>50$
 Substrat 55: $E=88$	 Substrat 56: $E>100$	 Substrat 57: $E>100$	 Substrat 58: $E=3$
 Substrat <b>F</b> $(\pm)$ -2-Chlor-propionsäure	 Substrat <b>G</b> $(\pm)$ -2-Phenylbuttersäure	 Substrat <b>H</b> $(\pm)$ -2-Phenylpropionsäure	

Abbildung 44: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Substrate, deren experimentell bestimmten E-Werte der CRL aus der Literatur entnommen (Substrate 51-58) (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Die Substrate **F**, **G** und **H** wurden zur Bestätigung des Modells molekulardynamisch untersucht. Es ist jeweils das bevorzugte Enantiomer der CRL-katalysierten Veresterung dargestellt.

### *Docking*

Es wurden die mit Heptanol veresterten Substrate kovalent gebunden an S209 im ersten tetraedrischen Intermediat, dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Lipase-katalysierten Veresterung, mittels *molecular modeling* Studien untersucht. Der mit den Substraten veresterte Alkohol Heptanol wurde in den *hydrophobic dent* orientiert. Das *docking* des großen Substituenten am Stereozentrum der Carbonsäure erfolgte in den *hydrophobic tunnel* und des mittleren Substituenten mit einem Minimum an sterischen Interaktionen mit der Lipase.

### *Simulationen*

Die Enzym-Substrat-Komplexe wurden minimiert und anschließend mit Hilfe von molekulardynamischen Simulationen weiter relaxiert. Die Trajektorie der letzten 0,5 ps der Simulationen wurde gemittelt und die resultierende mittlere Struktur geometrisch untersucht. Es wurden verschiedene Torsionswinkel und Winkel in den Substraten und Abstände zwischen Seitenkette der Lipase und dem Substraten gemessen. Außerdem wurde die Trajektorie der gesamten Simulation betrachtet und analysiert.

### *Trajektorie*

Die Auswertung der Trajektorie zeigte, dass alle untersuchten Substrate (Substrate **51–58**) mit ihren großen Substituenten in den *hydrophobic tunnel* orientieren und binden. Die Position der beiden Enantiomere war in diesem Bereich kaum unterschiedlich. Die Bewegungen und Orientierung der Substrate in den *hydrophobic tunnel* war mit Interaktionen mit wenigen Seitenketten in dieser Region verbunden. Dies waren vor allem die Phenylringe der Aminosäuren F448, F366 und Y320. Durch die Bewegung des großen Substituenten in den *hydrophobic tunnel* kam es zu einer daraus resultierenden Interaktion des mittleren Substituenten mit den Aminosäuren F345 und H449 (Abbildung 45). Diese Aminosäuren bilden eine kleine, schmale Bindungstasche, den *acid his gap*, in der der mittlere Substituent binden kann. Durch die Bewegung des mittleren Substituenten in diese Region änderten die Seitenketten ihre Orientierung in der Bindungstasche, was zu einer Bewegung des Imidazolrings des katalytischen H449 führte. Der mittlere Substituent des bevorzugten Enantiomers bewegte sich kaum in den *acid his gap* und daher bleibt das katalytische H449 für alle in dieser Arbeit untersuchten Substrate beinahe unverändert in der selben Position. Beim nicht bevorzugten Enantiomer konnte eine Bewegung der Seitenkette des katalytischen H449 beobachtet werden, da sich der mittlere Substituent in den *acid his gap* bewegt. Der

Imidazolring des katalytischen H449 wird dadurch weggedrückt und zwar senkrecht zum gegenüberliegenden F345 (grüner Pfeil in Abbildung 45), was zur Vergrößerung (zwischen 4,5Å und 6,7Å) des *acid his gap* führte.

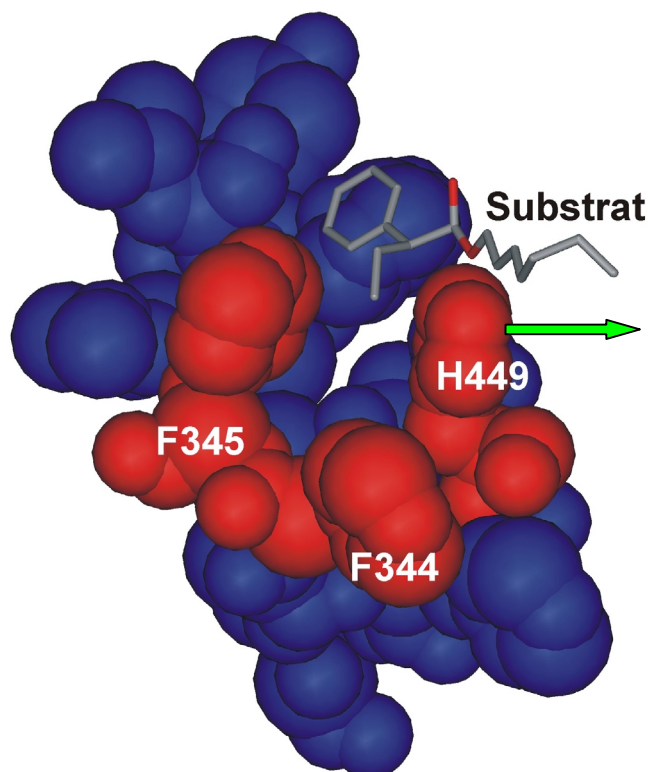


Abbildung 45: Die Seitenketten der Aminosäuren F345 und H449 bilden eine kleine, schmale Bindungstaschenregion, den *acid his gap*, in den der mittlere Substituent der chiralen Carbonsäuren bindet. Der mittlere Substituent des nicht bevorzugten Enantiomers bewegt sich immer tief in den *acid his gap*. Durch diese Bewegung wird der Imidazolring des katalytischen H449 weggedrückt (Pfeil).

#### *Torsionswinkel*

Die Bewegung der Substrate mit dem großen Substituenten in den *hydrophobic tunnel* und dem mittleren Substituenten in den *acid his gap* wird durch einen Torsionswinkel  $\Phi_{\text{C}_{\text{tetr.}}-\text{C}^*}$  beschrieben.  $\Phi_{\text{C}_{\text{tetr.}}-\text{C}^*}$  ist der Torsionswinkel vom Alkoholsauerstoff ( $\text{O}_{\text{Alk.}}$ ) über den tetraedrischen Kohlenstoff ( $\text{C}_{\text{tetr.}}$ ) und den chiralen Kohlenstoff ( $\text{C}^*$ ) zum mittleren Substituenten am Stereozentrum der Carbonsäure.

Da sich das nicht bevorzugte Enantiomer immer tiefer als das bevorzugte Enantiomer in den *acid his gap* bewegte, war dieser Torsionswinkel für das bevorzugte Enantiomer immer kleiner als für das nicht bevorzugte Enantiomer. Der Wert des Torsionswinkels war für das bevorzugte Enantiomer immer kleiner als  $100^\circ$  und für das nicht bevorzugte immer größer als  $300^\circ$  (Tabelle 31).

Tabelle 31: Die Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  der acht mit molekulardynamischen Simulationen untersuchten Substrate, die die Bewegung des großen Substituenten tief in den *hydrophobic tunnel* und des mittleren Substituenten in den *acid his gap* beschreiben. Es ist jeweils die Konfiguration des experimentell bestimmten bevorzugte Enantiomer und die des nicht bevorzugte Enantiomer der einzelnen Substrate aufgeführt.

Substrat	Torsionswinkel $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$ [°]	Torsionswinkel $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$ [°]
	Exp. bevorzugtes Enantiomer	Exp. nicht bevorzugtes Enantiomer
51	78 (S)	311 (R)
52	49 (S)	322 (R)
53	46 (R)	311 (S)
54	50 (S)	304 (R)
55	51 (S)	308 (R)
56	62 (S)	301 (R)
57	61 (S)	322 (R)
58	62 (S)	313 (R)

Daher lässt sich anhand dieses Modells die Enantiopräferenz für Carbonsäuren vorhersagen. Zur Überprüfung wurden drei weitere Substrate **F**, **G** und **H**, für die bisher keine experimentellen Daten der Enantioselektivität der CRL bekannt waren, molekulardynamisch untersucht und die Vorhersage der Enantiopräferenz durch Veresterung mit rekombinanter CRL (am Institut bereits vorhanden) überprüft. Dazu wurden 10 mmol des racemischen Gemisches mit 12 mmol Ethanol in 1 ml Toluol mit 50  $\mu\text{l}$  rekombinanter CRL (Überstand der Expression) bei 40° C unter Schütteln verestert. Nach 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 36 h und 48 h wurde ein Aliquot aus dem Reaktionsgefäß entnommen, Substrat- und Produktpeaks gaschromatographisch getrennt.

Die Retentionszeiten der Substrate konnten mittels Standards bestimmt werden. Die Standards der Produkte waren nicht verfügbar und somit die Retentionszeiten nicht bekannt. Es wurde hier ebenfalls versucht, mittels der Reaktionskinetik der entstehenden Produktpeaks und der abnehmenden Substratpeaks eine Zuordnung zu treffen. Dies war allerdings nicht möglich, da die Peaks von Rückständen des Expressionsüberstandes der Lipase nicht eindeutig zu unterscheiden waren. Außerdem war die Trennung der Substratpeaks unzureichend. Aus diesem Grund konnte keine Aussage zur Enantiopräferenz und Enantioselektivität getroffen werden, wobei die schlecht getrennten Substratpeaks von Substrat **G** und **H** die richtige Vorhersage der Enantiopräferenz anhand des *in silico* Assays vermuten lassen.

Die *molecular modeling* Untersuchungen dieser drei Substrate ergaben, dass sie ebenso wie die zuvor untersuchten Substrate **51-58**, deren Daten über die Enantioselektivität aus der



Literatur entnommen wurden, mit dem großen Substituenten im *hydrophobic tunnel* binden. Das nicht bevorzugte (*R*)-Enantiomer der Substrate **G** und **H** bewegt sich wie alle anderen bisher untersuchten Substrate mit dem mittleren Substituenten ins *acid his gap*. Nur beide Enantiomere des kleinen Substrates **F** binden aufgrund ihrer Flexibilität und geringen Größe mit dem H-Atom am Stereozentrum im *acid his gap*. Ansonsten konnten keine besonderen Änderungen zu den bislang untersuchten Substraten festgestellt werden. Auch die deutlich verschiedenen Werte der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  der beiden Enantiomere eines Substrates wurden für diese drei Substrate gemessen (Tabelle 32).

Tabelle 32: Die Torsionswinkel der mit rekombinanter CRL veresterten Carbonsäure-Substrate **F**, **G** und **H**, deren aus dem Computermodell vorhergesagte und die experimentell bestimmte Enantiopräferenz.

Substrat	$\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$ [°] ( <i>S</i> )	$\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$ [°] ( <i>R</i> )	Präferenz Modell
<b>F</b>	299	54	( <i>R</i> )
<b>G</b>	55	304	( <i>S</i> )
<b>H</b>	46	300	( <i>S</i> )

Die Vorhersage der Enantiopräferenz der Substrate kann neben der Auswertung des Torsionswinkels  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  (Abbildung 46) auch nach der empirischen Regel von Ahmed *et al.* (Ahmed *et al.* 1994) erfolgen.

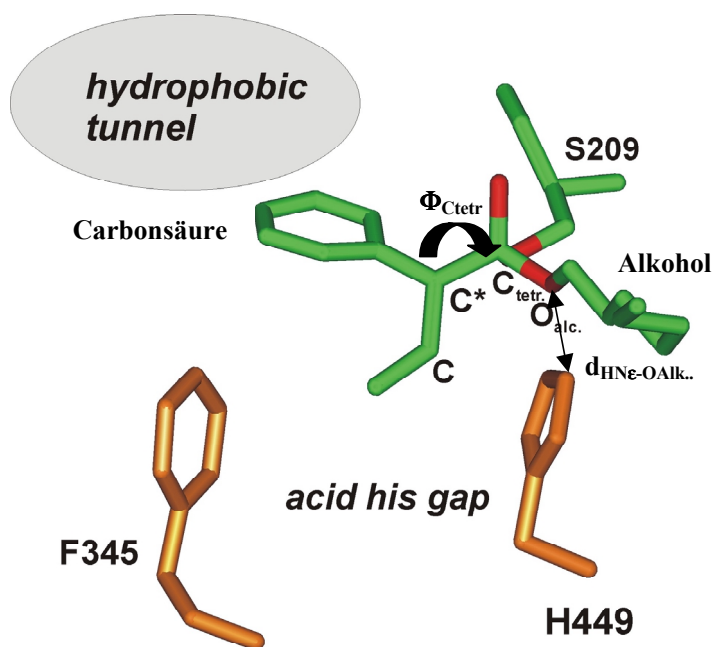


Abbildung 46: Die Bewegung des großen Substituenten in den *hydrophobic tunnel* und des mittleren Substituenten in den *acid his gap* wird durch den Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  beschrieben. Anhand der Messung dieses Torsionswinkels  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  der beiden zusammengehörenden Enantiomere kann die Enantiopräferenz von CRL gegenüber Carbonsäuren vorhergesagt werden. Er war immer für das bevorzugte Enantiomer kleiner  $100^\circ$  und für das nicht bevorzugte größer als  $300^\circ$ . Der Abstand  $d_{\text{HN}\epsilon\text{-OAlk.}}$  zwischen dem katalytischen H449 und dem Alkoholsauerstoff des nicht bevorzugten Enantiomers korreliert mit der Enantioselektivität.

### Abstand zwischen dem katalytischen H449 und dem Alkoholsauerstoff des Substrates

Der Abstand  $d_{\text{HNe-OAlk}}$  wurde in den mit molekulardynamischen Simulationen generierten mittleren Strukturen der einzelnen Enzym-Substrat-Komplexe zwischen dem H(Ne) des katalytischen H449 und dem Alkoholsauerstoff  $\text{O}_{\text{Alk}}$  gemessen. Der Abstand  $d_{\text{HNe-OAlk}}$  des bevorzugten Enantiomers ist für alle Substrate annähernd gleich groß (1,8 Å - 1,9 Å). Für das nicht bevorzugte Enantiomer wurden für die verschiedenen Substrate unterschiedliche Abstände  $d_{\text{HNe-OAlk}}$  (1,8 Å - 2,4 Å) gemessen.

Tabelle 33: Gemessene Distanz  $d_{\text{HNe-OAlk}}$  des nicht experimentell bevorzugten Enantiomers (Konfiguration ist jeweils angegeben) im Computermodell und der experimentell bestimmte E-Wert.

Substrat	$d_{\text{HNe-OAlk}}$ in [Å] nicht bevorzugtes Enantiomer	Experimentell bestimmter E-Wert
51	1,8 (R)	5
52	1,9 (R)	40
53	2,1 (S)	>100
54	2,0 (R)	70
55	2,1 (R)	88
56	2,4 (R)	>100
57	2,3 (R)	>100
58	1,7 (R)	8

Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass die experimentell bestimmte Enantioselektivität mit der im Modell gemessenen Entfernung  $d_{\text{HNe-OAlk}}$  korreliert (Abbildung 47).

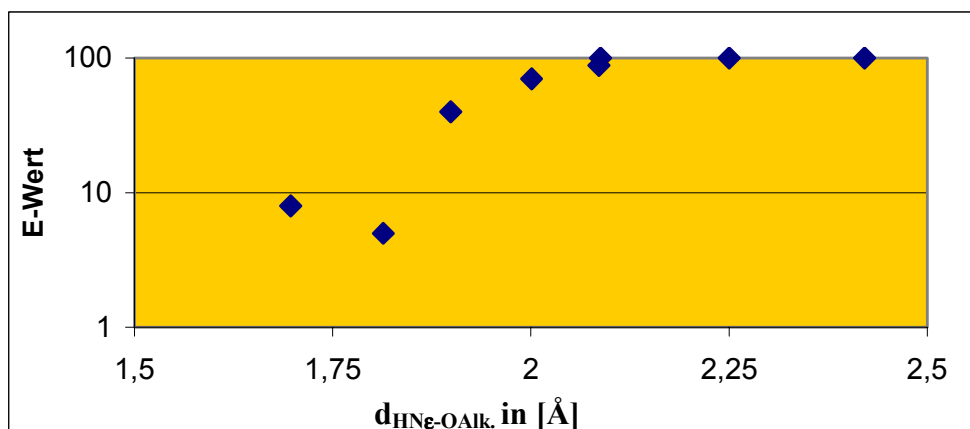


Abbildung 47: Der Abstand  $d_{\text{HNe-OAlk}}$  des nicht bevorzugten Enantiomers der Substrate 51-58 im Computermodell korreliert mit dem experimentell bestimmten E-Wert.

#### 4.8.2 Veränderte Enantioselektivität von CRL-Mutanten gegenüber drei Carbonsäuren *in silico*

Mittels *molecular modeling* wurden die zwei CRL-Mutanten P246F und L304F untersucht. In die Bindungstasche dieser Mutanten, L304F und P246F, wurden die Substrate **F**, **G** und **H** gedockt und die molekulardynamischen Simulationen analog zum Wildtyp durchgeführt und mit diesem verglichen. Diese Mutanten tragen im Vergleich zum Wildtyp an den einzelnen Positionen jeweils eine größere Seitenkette, die die Konformation des *hydrophobic tunnels* beeinflussen (siehe Abbildung 48). Durch ihre Position im *hydrophobic tunnel* stehen sie im unmittelbaren Kontakt mit dem Substrat und können dessen Bindung im *hydrophobic tunnel* beeinflussen, was eine Änderung der Orientierung des mittleren Substituenten im *acid his gap* zur Folge haben sollte. Daraus folgend sollten Mutanten an dieser Stelle durch die Interaktion mit dem Substrat die Enantioselektivität verändern. Es wurde untersucht, ob es durch diese Mutanten zu einer Änderung der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Ctetr.-C}^*}$  und des Abstandes  $d_{\text{HNe-OAlk}}$  kommt.

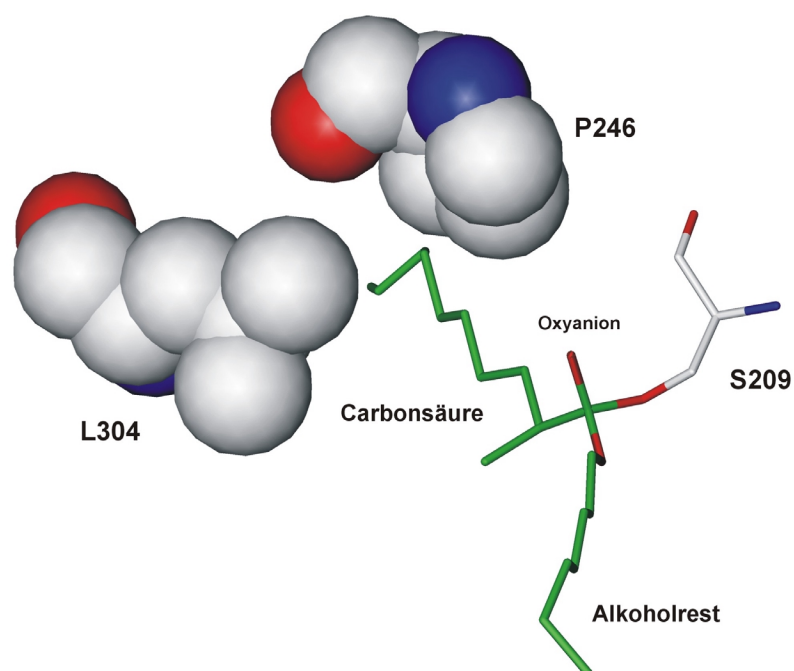


Abbildung 48: Die beiden Aminosäuren L304 und P256 im CRL-Wildtyp wurden gegen Phenylalanin ausgetauscht und *in silico* untersucht. Durch ihre im Vergleich zum Wildtyp größere Seitenkette ändern die Mutanten die Konformation und Größe des *hydrophobic tunnels*. Durch ihre Position haben sie direkten Einfluss auf das Substrat und können durch diese Interaktionen die Enantioselektivität verändern.

Das Hauptaugenmerk der Analyse der generierten Strukturen lag, ähnlich wie für die Enantioselektivität der PCL gegenüber primären Alkoholen schon beschrieben, immer auch

auf der visuellen Auswertung der Bewegung und Bindung der Substrate in das *acid his gap*. Es wurden die Konformationen der Substrate in den CRL-Mutanten P246F und L304F mit denen des Wildtyps verglichen. Durch die Vergrößerung der Seitenkette an Position 246 durch Austausch von Prolin durch Phenylalanin und an Position 304 durch Austausch von Leucin durch Phenylalanin kann bei allen drei Substraten **F**, **G** und **H** der große Substituent nicht mehr in der selben Orientierung wie im Wildtyp in den *hydrophobic tunnel* binden. Die die Enantiopräferenz und Enantioselektivität beschreibenden Parameter  $\Phi_{\text{Ctetf.-C}^*}$  und  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  wurden ausgewertet. Diese Parameter sind in Tabelle 34 für den Wildtyp und die zwei Mutanten P246F und L304F zusammengefasst.

#### *Mutante P246F in silico*

Generell konnte für alle drei Substrate eine Änderung der Lage in der Bindungstasche nach den molekulardynamischen Simulationen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Während kaum ein Einfluss der Mutanten auf das im Wildtyp bevorzugte Enantiomer beobachtet wurde, kam es zu deutlichen Änderungen bei den nicht bevorzugten Enantiomeren. Neben der Änderung der Konformation des Substrates wurden die größten Änderungen der Orientierung in der Bindungstasche an den Phenylalaninseitenkette der Aminosäuren F296, F345 und F415 beobachtet. Durch die veränderte Lage des Substrates und die Vergrößerung der Seitenkette der P246F-Mutante, wird die Form des *hydrophobic tunnel* durch die daraus resultierende Änderung der Konformation dieser Seitenketten zusätzlich umgestaltet. Die Vergrößerung der Seitenkette durch F246 führt zu einer Verengung des *hydrophobic tunnel* in dieser Region, weshalb der große Substituent der Carbonsäuren davon weggedrückt wird. Dadurch sollten sich auch die Eigenschaften und somit die Enantioselektivität der Lipase ändern.

Aufgrund der geringen Größe des Substrates **F** konnte beim Wildtyp beobachtet werden, dass bei beiden Enantiomeren das H-Atom am Stereozentrum in den *acid his gap* bindet. Das im Wildtyp bevorzugte (*R*)-Enantiomer bindet beinahe identisch in der Bindungstasche der P246F-Mutante. Allerdings ändert sich die Konformation des im Wildtyp nicht bevorzugten (*S*)-Enantiomer. Dieses bindet mit dem Chloratom im *acid his gap*. Durch diese variierte Drehbewegung des Substrates ändert sich der Wert des Torsionswinkels erheblich (Wildtyp: 299°; P246F: 46°) und wird sogar kleiner als für das (*R*)-Enantiomer (51°), das im Vergleich zum Wildtyp nahezu unverändert bindet. Diese Angleichung der Torsionswinkel der beiden Enantiomere könnte mit einem Verlust der Enantiopräferenz und somit –selektivität einher

gehen. Ansonsten wurde hier für beide Enantiomere nur eine kleine Veränderung der Konformation beobachtet. Das H449 ändert seine Konformation nur wenig und der Abstand des im Wildtyp nicht bevorzugten (*S*)-Enantiomer  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  wurde kleiner (Wildtyp: 2,0 Å; P246F: 1,7 Å), was, falls noch vorhanden, eine Abnahme der Enantioselektivität zur Folge haben sollte.

Das im Wildtyp bevorzugte (*S*)-Enantiomer von Substrat **G** wird durch die vergrößerte Seitenkette der P246F-Mutante leicht nach unten gedrückt (vergl. Abbildung 49 Mitte, ohne Rotation des Phenylringes), bindet ansonsten aber im Vergleich zum Wildtyp identisch. Dadurch ändert sich die Konformation des mittleren Substituenten des bevorzugten (*S*)-Enantiomer nur unwesentlich, der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  bleibt mit 56° (Wildtyp 55°) nahezu unverändert (Tabelle 32). Allerdings ändert sich die Konformation des im Wildtyp nicht bevorzugten (*R*)-Enantiomer. Der große Substituent dieses Enantiomers wird im Vergleich zum Wildtyp durch die größere Seitenkette der F246 Mutante leicht nach unten gedrückt (vergl. Abbildung 49 Mitte), rotiert um 90° und bindet parallel zu den Seitenketten der Aminosäuren an Position 246 und 304. Der mittlere Substituent des nicht bevorzugten (*R*)-Enantiomers bewegt sich aber aufgrund dieser veränderten Lage des großen Substituenten tiefer in den *acid his gap* als beim Wildtyp und  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  nimmt als Folge etwas zu (Wildtyp 304°; P246F: 327°) (Tabelle 32). Der Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  verkleinert sich für das nicht bevorzugte (*R*)-Enantiomer (Wildtyp: 2,0 Å; P246F: 1,9 Å), da der mittlere Substituent parallel zum Imidazolring des katalytischen H449 in den *acid his gap* bindet und ihn somit nicht so weit wegdrückt. Dies sollte zu einer Abnahme der Enantioselektivität führen.

Auch der große Substituent von Substrat **H** wird im Vergleich zum Wildtyp bei beiden Enantiomeren etwas nach unten gedrückt, was zu einer Konformationsänderung des gesamten Substrates in der Bindungstasche führt. Der mittlere Substituent des nicht bevorzugten (*R*)-Enantiomers bindet tiefer im *acid his gap*, wodurch sich der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  vergrößert (WT: 300° auf P246F: 321°) (Abbildung 49 Mitte). Der Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  nimmt von 2,9 Å (WT) auf 2,7 Å (P246F) beim nicht bevorzugten (*R*)-Enantiomer ab und bleibt für das bevorzugte (*S*)-Enantiomer mit 1,9 Å unverändert. Der Phenylring des nicht bevorzugten Enantiomers rotiert ebenfalls um 90° und bindet parallel zu den Seitenketten der Aminosäuren an Position 246 und 304. Dadurch bewegt sich das nicht bevorzugte Enantiomer parallel zum Imidazolring des H449 in den *acid his gap*. Auch hier sollte eine geringere Enantioselektivität als beim Wildtyp experimentell zu messen sein.

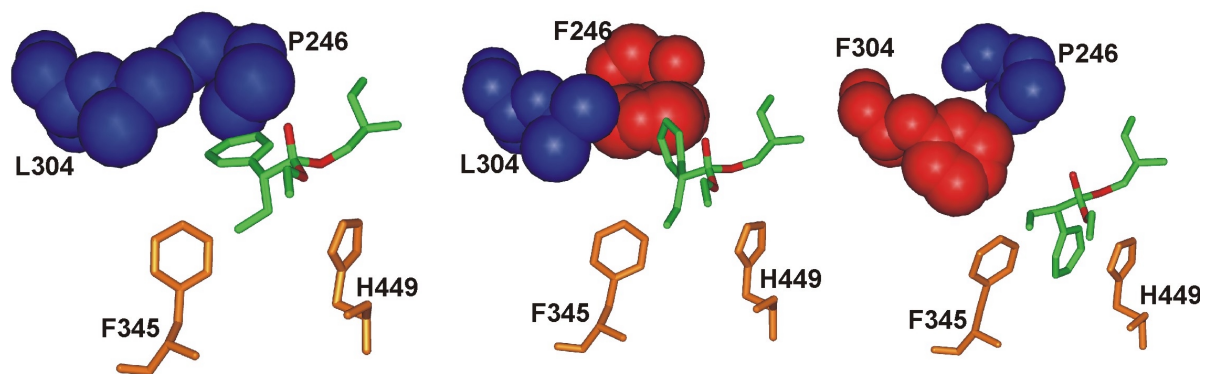


Abbildung 49: Durch die Vergrößerung der Seitenketten der Mutanten P246F und L304F bindet das nicht bevorzugte Enantiomer in einer anderen Orientierung im *hydrophobic tunnel* der CRL, was hier im Beispiel für das (*R*)-Enantiomer von Substrat **G** dargestellt ist. Im Gegensatz zum Wildtyp (Bild links) wird der *hydrophobic tunnel* durch die Mutanten verkleinert. Dadurch rotiert der Phenylring des Substrats **H** für beide Mutanten (wie in Bild Mitte) um 90° und bindet parallel zu den Seitenketten der Aminosäuren an Position 304 und 246. Dasselbe wird für Substrat **G** und die Mutante P246 beobachtet (Bild Mitte). Die Seitenkette der F304 Mutante drückt das nicht bevorzugte Enantiomer von Substrat **G** sehr weit nach unten (Bild rechts). Für alle Mutanten bindet der mittlere Substituent nicht so tief und parallel zu der Seitenkette des katalytischen H449. Dadurch wird es nicht so weit weggedrückt und der Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  ist im Vergleich zum Wildtyp kleiner.

#### Mutante L304F *in silico*

Es wurden für diese Mutante und die drei Substrate **F**, **G** und **H** ebenfalls die Änderungen in der Konformation im Vergleich zum Wildtyp beobachtet und ausgewertet. Im Falle dieser Mutante bindet durch die Vergrößerung der Seitenkette bei allen drei Substraten der große Substituent nicht mehr in der selben Lage in den *hydrophobic tunnel* wie beim Wildtyp. Ebenso wie für Mutante P246F ist der Einfluss auf das nicht bevorzugte Enantiomer der untersuchten Substrate wesentlich größer. Bei dieser Mutante wurden gleichfalls die Änderungen in der Orientierung der Phenylalaninseitenkette der Aminosäuren F296, F345 und F415 und die daraus resultierende geänderte Form des *hydrophobic tunnel* beobachtet.

Aufgrund der geringen Größe des Substrates **F** konnte auch hier für beide Enantiomere nur eine kleine Veränderung der Konformation beobachtet werden. Das nicht bevorzugte (*S*)-Enantiomer bindet auch bei dieser Mutante mit dem Chloratom im *acid his gap*. Der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{C}_{\text{tet}}-\text{C}^*}$  nimmt dadurch im Vergleich zum Wildtyp für das nicht bevorzugte (*S*)-Enantiomer stark ab (64°) und bleibt für das im Wildtyp bevorzugte (*R*)-Enantiomer mit 55° nahezu unverändert (Tabelle 34). Auch hier könnte es zu einem Verlust der Enantiopräferenz kommen. Allerdings bindet das nicht bevorzugte (*S*)-Enantiomer besonders tief mit seinem mittleren Substituenten, dem Chloratom im *acid his gap*. Dadurch ändert das H449 seine Konformation deutlich und der Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  wird größer (2,7 Å), was eine Zunahme der Enantioselektivität, falls überhaupt noch vorhanden, zur Folge haben sollte.

Für Substrat **G** ändert sich die Konformation des im Wildtyp bevorzugten (*S*)-Enantiomere nur unwesentlich, der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  bleibt auch mit  $53^\circ$  nahezu unverändert. Beim nicht bevorzugten (*R*)-Enantiomer nimmt er aber deutlich ab ( $187^\circ$ ), da das Substrat mit dem großen Substituenten im *acid his gap* bindet (Abbildung 49 rechts). Der Phenylring des großen Substituenten bindet aber dafür mehr parallel zu den Seitenketten des F345 und H449 und drückt dadurch den Imidazolring des katalytischen H449 nicht sehr weit weg. Der Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk.}}$  vermindert sich als Folge für das nicht bevorzugte (*R*)-Enantiomer ( $1,9 \text{ \AA}$ ), was mit einer Abnahme der Enantioselektivität verbunden sein sollte.

Auch der große Substituent von Substrat **H** wird im Vergleich zum Wildtyp bei beiden Enantiomeren etwas nach unten gedrückt, was zu einer Konformationsänderung des gesamten Substrates in der Bindungstasche führt. Dadurch wird der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  für beide Enantiomere etwas vergrößert ( $57^\circ$  bzw.  $344^\circ$ ). Der mittlere Substituent des nicht bevorzugten (*R*)-Enantiomer bewegt sich tiefer, aber auch parallel zu den Seitenketten von F345 und H449 in den *acid his gap*. Der Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk.}}$  verkleinert sich beim nicht bevorzugten (*R*)-Enantiomer ( $2,3 \text{ \AA}$ ) und bleibt für das bevorzugte (*S*)-Enantiomer ( $1,8 \text{ \AA}$ ) unverändert. Dies sollte zu einer verminderten Enantioselektivität führen.

Tabelle 34: Die im Computermodell gemessenen Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  und die Abstände  $d_{\text{HNE-OAlk.}}$  der beiden Enantiomere der Substrate **F**, **G** und **H** für den Wildtyp und die Mutanten P246F und L304F.

<b>Substrat F</b>	$\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$	$d_{\text{HNE-OAlk.}}$	$\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$	$d_{\text{HNE-OAlk.}}$
	( <i>S</i> )-Enantiomer	( <i>S</i> )-Enantiomer	( <i>R</i> )-Enantiomer	( <i>R</i> )-Enantiomer
Wildtyp	299	2,0	54	1,7
P246F	46	1,7	51	2,2
L304F	64	2,7	55	1,7

<b>Substrat G</b>	$\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$	$d_{\text{HNE-OAlk.}}$	$\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$	$d_{\text{HNE-OAlk.}}$
	( <i>S</i> )-Enantiomer	( <i>S</i> )-Enantiomer	( <i>R</i> )-Enantiomer	( <i>R</i> )-Enantiomer
Wildtyp	55	1,7	304	2,0
P246F	56	1,7	327	1,9
L304F	53	2,2	187	1,9

<b>Substrat H</b>	$\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$	$d_{\text{HNE-OAlk.}}$	$\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$	$d_{\text{HNE-OAlk.}}$
	( <i>S</i> )-Enantiomer	( <i>S</i> )-Enantiomer	( <i>R</i> )-Enantiomer	( <i>R</i> )-Enantiomer
Wildtyp	46	1,9	300	2,9
P246F	54	1,9	321	2,7
L304F	57	1,8	344	2,3

Eine Überprüfung des Modells mit experimentellen Daten war wegen der schlechten Trennung der Substrate und der nicht eindeutigen Zuordnung der Produktpeaks nicht möglich.

#### 4.8.3 Übertragung des Modells zur Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität der PCL gegenüber Carbonsäuren auf PCL

Es wurde versucht, das in dieser Arbeit etablierte Modell der CRL auf die Enantiopräferenz und Enantioselektivität der PCL gegenüber Carbonsäuren auszuweiten. Aus diesem Grund wurden andere 12 Substrate (Substrate 59-70 in Abbildung 18), deren Daten über ihre Enantioselektivität der PCL aus der Literatur entnommen wurden, in die Bindungstasche der PCL gedockt. Die *molecular modeling* Untersuchungen der mit Heptanol veresterten Substrate erfolgten am ersten tetraedrischen Intermediat der Lipase-katalysierten Hydrolyse, kovalent an S87 gebunden und entsprechend wie bei der CRL beschrieben, durchgeführt. Der mit dem Substrat veresterte Alkohol wurde wie bei der CRL in den *hydrophobic dent* orientiert. Die Carbonsäure wurde, wie die Fettsäure bei der Untersuchung von primären Alkoholen, in den *hydrophobic crevice* gebunden.

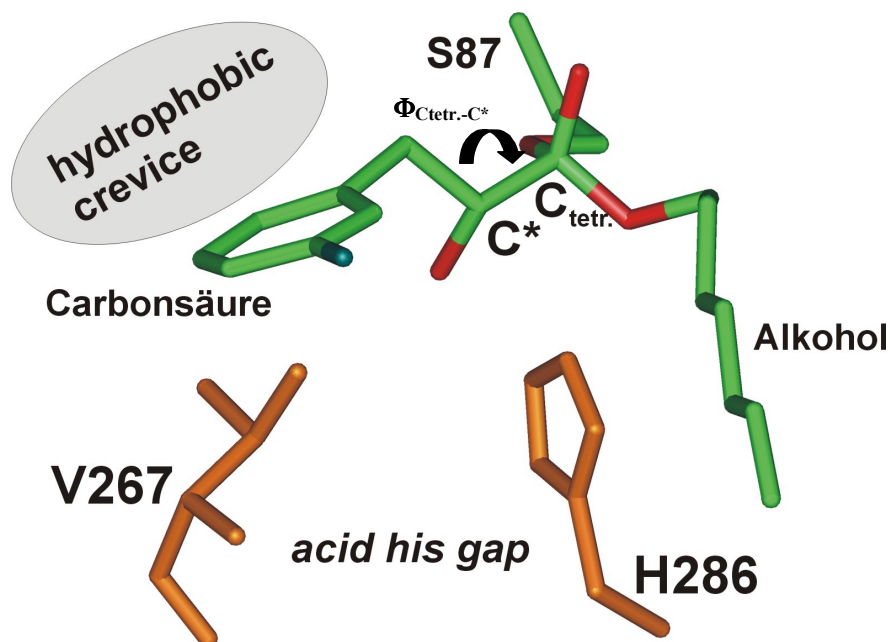


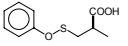
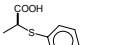
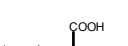

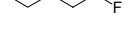
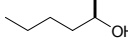
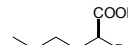
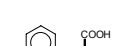

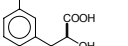
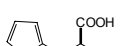
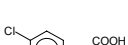
Abbildung 50: Die Bindungstaschenregion der PCL für den mittleren Substituenten der Carbonsäuren, das *acid his gap*, wird von den Seitenketten der Aminosäuren V267 und dem katalytischen H286 gebildet. Diese Bewegung des mittleren Substituenten in dieses Strukturmotiv wird durch den Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Ctetr.-C}^*}$  beschrieben.



### Modell zur Vorhersage der Enantiopräferenz

Bei der PCL konnte eine spezielle Bindungstaschenregion identifiziert werden, in die der mittelgroße Substituent der Substrate bindet. Dieser Bindungstaschenbereich, der *acid his gap*, ist im Vergleich zur CRL wesentlich kleiner (PCL: 3,5 Å und CRL: 4,8 Å) und wird von den Seitenketten der Aminosäuren V267 und dem katalytischen H286 gebildet (Abbildung 50). Die mittleren Substituenten bewegen sich nicht so tief in diese Bindungstasche wie bei der CRL. Der große Substituent bindet für alle Substrate im *hydrophobic crevice* der PCL.

Tabelle 35: Der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  der 12 mit PCL untersuchten Substrate. Anhand dieses Torsionswinkels ist die Vorhersage der Enantiopräferenz bei der CRL möglich. Dies ist bei der PCL nicht uneingeschränkt möglich, da er für zehn Substrate für das bevorzugte Enantiomer kleiner und für zwei größer (rot gefärbt) ist als für das nicht bevorzugte Enantiomer.

Substrat	Torsionswinkel $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$ [°] bevorzugtes Enantiomer	Torsionswinkel $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$ [°] nicht bevorzugtes Enantiomer
	213	274
	212	260
	173	309
	<b>230</b>	<b>175</b>
	76	319
	71	224
	205	297
	272	293
	276	296
	38	271
	83	305
	<b>181</b>	<b>63</b>

Die Bewegung der Substrate in den *acid his gap* kann auch anhand des Torsionswinkels  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  beschrieben werden. Dieser Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$ , der bei der CRL eine

Vorhersage der Enantiopräferenz erlaubt, ist bei der PCL für das bevorzugte Enantiomer allerdings nicht ausnahmslos kleiner. Für zehn Substrate ist der Wert kleiner für das bevorzugte Enantiomer und bei zwei Substraten größer als beim nicht bevorzugten Enantiomer (Tabelle 35). Allerdings haben diese beiden Substrate (Substrat 62 und 70) gemeinsam, dass sie ein bzw. drei Fluoratome in der unmittelbaren Nähe des Stereozentrums besitzen.

#### *Modell zur Vorhersage der Enantioselektivität*

Die mittelgroßen Substituenten der Carbonsäure (Substrate **59-70**) binden alle in der selben Region, im *acid his gap* der PCL. Die Bewegung des mittleren Substituenten beeinflusst die Orientierung des Imidazolringes des katalytischen H286. Allerdings bewegt sich die Seitenkette des katalytischen H286 nicht immer in die gleiche Richtung, wie es bei der CRL der Fall ist. Der Imidazolring des katalytischen H286 der PCL kann, in seiner Orientierung zum L267 hin, entsprechend wie bei der CRL senkrecht weggedrückt werden. Für einige Substrate wurde aber auch eine Rotation des Imidazolringes und ein anschließendes seitliches Wegdrücken beobachtet. Beide Bewegungen verändern in unterschiedlicher Weise den Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  des katalytischen H286 zum Alkoholsauerstoff. Eine Korrelation zwischen dem im Computermodell gemessenen Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  des nicht bevorzugten Enantiomers und dem experimentell bestimmten E-Wert ist hier nicht zu erkennen (Abbildung 51). Es wurde auch ansonsten keine geometrischen Gemeinsamkeiten für die bevorzugten oder nicht bevorzugten Enantiomere festgestellt. Durch die Auswertung verschiedener Torsionswinkel, Winkel und Abstände im Enzym-Substrat-Komplex konnte kein Parameter gefunden werden, der die Enantioselektivität der PCL gegenüber Carbonsäuren beschreibt oder mit dem experimentell bestimmten E-Wert korreliert.

Auch die Betrachtung von Energieunterschieden während der molekulardynamischen Simulationen erlaubt keine Beschreibung und Vorhersage der Enantioselektivität. Die visuelle Analyse der Trajektorie, wobei das Hauptaugenmerk auf das Verhalten des Substrats in der Bindungstasche der Lipase und der im Verlauf der molekulardynamischen Simulationen ausgebildeten H-Brücken Bindungen zwischen Lipase und Substrat gerichtet wurde, sowie die Beeinflussung der relativen Position der Seitenkette des aktiven H286 wurde zusätzlich analysiert. Die Bindungsaffinität zwischen PCL und Substrat wurde berechnet und mit Hilfe der *score*-Software in einen Wert zusammengefasst. Auch anhand dieser Vorgehensweise konnte keine allgemeine Beschreibung der Enantioselektivität erfolgen.

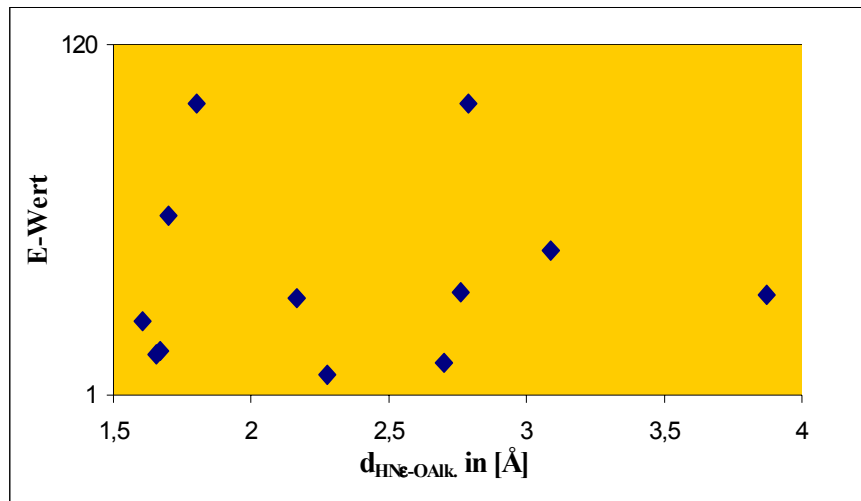


Abbildung 51: Der Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  des nicht bevorzugten Enantiomers im Computermodell korreliert nicht mit dem experimentell bestimmten E-Wert der PCL-katalysierten Umsetzung chiraler Carbonsäuren.

Die Enantioselektivität der PCL gegenüber Carbonsäuren konnte auch nicht aufgrund

- 1) Visuelle Analyse der Trajektorie, wobei das Hauptaugenmerk auf das Verhalten des Substrats in der Bindungstasche der Lipase gerichtet war
- 2) Im Verlauf der molekulardynamischen Simulation ausgebildeten H-Brücken Bindungen zwischen Lipase und Substrat und
- 3) Lage der Substituenten in der Bindungstasche

erreicht werden.

## 5 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit stellt auf *molecular modeling* Untersuchungen basierende Modelle vor, welche die Beschreibung und Identifikation der molekularen Grundlagen der experimentell bestimmten Enantiopräferenz und Enantioselektivität Lipase-katalysierter Reaktionen erlaubt. Durch die Validierung der strukturbasierten Modelle mit Lipasemutanten, erlauben diese *in silico* Assays zudem die Vorhersage der Enantioselektivität bislang nicht experimentell bestimmter Substrate. Weiterhin können anhand der Computermodelle Mutanten *in silico* vorhergesagt werden, die eine veränderte Enantioselektivität und, im Falle der PCL, sogar eine veränderte Aktivität besitzen.

### 5.1 *Molecular Modeling* Grundlagen

#### 5.1.1 Tetraedrische Reaktionsintermediate und deren Übergangszustände

Der Reaktionsmechanismus von Lipasen gleicht dem der Serinproteasen. Die Reaktion des ersten tetraedrischen Intermediates zum Acylenzym in der Hydrolyse konnten mittels kinetischer (Ema *et al.* 1998) und quantenmechanischer (DeTar 1981; Faber und Riva 1992; M. Norin 1993; Norin *et al.* 1994; Monecke *et al.* 1998) Untersuchungen als geschwindigkeits-bestimmender Schritt der Gesamtreaktion identifiziert werden.

Die Anwendung der Eyring-Theorie (*Transition State Theory*) und eine Berechnung der relativen Aktivierungsenthalpien der diastereomeren Substrat-Lipase-Komplexe im Reaktionsschritt der ersten tetraedrischen Intermediate hin zu den Acylenzymen würden die Reaktionsraten  $k$  der beiden Enantiomere liefern.

$$k = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\Delta H^\ddagger/R} \cdot e^{-\Delta S^\ddagger/R} \quad \text{und} \quad \frac{(R)}{(S)} = \frac{k_R}{k_S} = \frac{e^{-\Delta H_R^\ddagger/RT} e^{-\Delta S_R^\ddagger/R}}{e^{-\Delta H_S^\ddagger/RT} e^{-\Delta S_S^\ddagger/R}}$$

Die erhaltenen Entropieanteile  $\Delta S^\ddagger$  sind bei vergleichbarer relativer Aktivierungsenthalpien  $\Delta H^\ddagger$  in erster Näherung nahezu gleich groß (Raza *et al.* 2001) und lassen sich demnach aus

der Gleichung herauskürzen. Daher ist die Problemstellung anhand der folgenden Gleichung lösbar, die keine Entropiebeiträge mehr enthält.

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

Der Lösungsansatz wird jedoch durch die derzeitige Unzulänglichkeit quantenmechanischer Berechnungen unterbunden, da sie auf spezielle Übergangszustände von Systemen dieser Größenordnung nicht anzuwenden sind. Die wichtigen Solvensbeiträge verbieten eine Vernachlässigung des entropischen Beitrages und die Fluktuationen in den Enthalpieberechnungen steigt mit zunehmender Systemgröße an. Einen Zugang zu solchen Systemen erlaubt das Hammond-Postulat, eine weitere Näherung. Dies postuliert, dass endergonische Reaktionen über späte, produktähnliche Übergangszustände und exergonische Reaktionen über frühe, eduktähnliche Übergangszustände verlaufen. Der im Übergangszustand Lipase-katalysierter Reaktionen stattfindende Zusammenbruch der tetraedrischen Zwischenstufe ist unter Anwendung dieser Näherung mit dem eigentlichen tetraedrischen Intermediat vergleichbar. Quantenmechanische Berechnungen fokussieren deshalb häufig auf Reaktionsintermediaten und nicht auf den echten Übergangszuständen der Reaktion (Raza *et al.* 2001).

Aus diesem Grund basieren die quantenmechanischen Untersuchungen Lipase-katalysierter Reaktionen dieser Arbeit, wie in anderen Publikationen (Haeffner *et al.* 1998; Scheib *et al.* 1998; Scheib *et al.* 1999; Schulz *et al.* 2000) auf der eingehenden Betrachtung der kovalent gebundenen Substrat-Lipase-Komplexe, die den Übergangszustand der ersten tetraedrischen Zwischenstufe nachahmen.

### 5.1.2 Manuelles *docking* der Substrate

Bei der Auswahl der Substrate zur Erstellung und Überprüfung der Modelle wurde für jede Lipase darauf geachtet, dass ein möglichst großes Spektrum an Substraten eingesetzt wurde. Diese Substrate unterscheiden sich also in Bezug auf Sterik, Elektronik und Flexibilität, um die resultierenden Modelle möglichst weitreichend einsetzen zu können. Die experimentell mit den Lipasen ermittelten E-Werte decken das gesamte Spektrum von sehr klein ( $E=2- < 10$ )

über moderate ( $E=30-50$ ) bis zu sehr hohen Enantioselektivitäten ( $E=80->100$ ) ab. Um eine hinreichende Parametrisierung durch das verwendete Tripos Kraftfeld (Clark *et al.* 1989) zu gewährleisten, wurden ausschließlich Substrate mit den Atomtypen C, H, N, O, S und Halogene untersucht. Das Substrat-*docking* der vorliegenden Arbeit wurde manuell durchgeführt. Dieses *docking* lehnte sich an vorangegangene Untersuchungen (Haeffner *et al.* 1998; Orrenius *et al.* 1998; Scheib *et al.* 1998; Scheib *et al.* 1999; Schulz *et al.* 2000; Tafi *et al.* 2000) der tetraedrischen Reaktionsintermediate an und war anhand der Kenntnis der Bindungstaschencharakteristika und der Orientierung von substratanalogen Inhibitoren in Kristallstrukturen von Lipasen möglich.

Das *docking* der einzelnen Substratklassen in die Bindungstaschen der Lipasen wurde bereits jeweils genau beschrieben. Der OH-funktionale Bereich der Substrate wurde so modelliert, dass die katalytischen Wasserstoffbrückenbindungen (Derewenda *et al.* 1995) des positiv geladenen Imidazolringes (Kossiakoff *et al.* 1981) des aktiven Histidins ausgebildet werden können. Die stabilisierenden Wechselwirkungen der das Oxyanion stabilisierenden Aminosäuren wurden ebenfalls ausgerichtet. *Ab initio* Rechnungen zeigten, dass alleine das Vorhandensein der katalytischen Wasserstoffbrückenbindung eine Absenkung der Aktivierungsbarriere um insgesamt 15 kcal/mol (Hu *et al.* 1998) im Vergleich zum nicht durch Wasserstoffbrückenbindung stabilisierten Reaktionsverlauf gibt. Beispielsweise verkleinert der Austausch des ionischen Aspartats in Trypsin und Subtilisine gegen eine neutrale Aminosäure die Reaktionsrate um einen Faktor, der einer Erhöhung der freien Aktivierungsenergie von 6 kcal/mol entspricht (Craik *et al.* 1987; Sprang *et al.* 1987; Carter und Wells 1988). Weiterhin liefert jede der beiden das Oxyanion stabilisierenden Aminosäuren eine Absenkung der Aktivierungsenergie von 5 kcal/mol (Wells *et al.* 1986). Durch die Berechnung der freien Energie ließen sich beide Beobachtungen bestätigen (Rao *et al.* 1987). Einen energetischen Betrag des Aspartats und der Oxyanion stabilisierenden Aminosäuren von sogar 20 kcal/mol lieferten semi-empirische Methoden (PM3 Parametrisierung) (Daggett *et al.* 1991). Die essentielle Bedeutung der Wasserstoffbrückenbindung in Bezug auf die katalytische Aktivität der Enzym-Substrat-Komplexe spiegeln diese Beobachtungen wider. Deshalb wurde besonderer Wert auf eine effiziente Ausbildung dieser Wechselwirkungen gelegt, um die Aktivität der in dieser Arbeit untersuchten Enzym-Substrat-Komplexe zu gewährleisten. Die auf diese Weise durchgeführten molekulardynamischen Simulationen und die erhaltenen mittleren Strukturen, deuten auf eine ausreichend exaktes *docking* durch die gewählte Methode hin.

### 5.1.3 Fixierung des Proteinrückgrats

Die Positionen der Atome des Proteinrückgrates (*backbone*) wurden während der Simulation im Raum fixiert, wohingegen die Koordination der Seitenkettenatome zur Anpassung freigegeben wurde. Ein Vergleich der Kristallstruktur freier (Schrag *et al.* 1997) und inhibierter (Lang *et al.* 1998) Lipase aus *Pseudomonas cepacia* zeigt, dass die Atome des Proteinrückgrats auch durch die kovalente Anbindung eines Inhibitors nahezu unverändert bleiben ( $C\alpha$  RMS 0,4 Å) und in der dreidimensionalen Struktur fixiert sind. Durch die experimentelle Beobachtung an Kristallstrukturen rechtfertigten sich somit die in den molekulardynamischen Simulationen getroffenen Einschränkungen der Freiheitsgrade der Lipase. Diese Tatsache entspricht einer Betrachtung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip von E. Fischer. Demnach stellt die Unbeweglichkeit der Atome des Proteingrundgerüsts die feste Beziehung zwischen Schlüssel und Schloss dar, wohingegen die Beweglichkeit der Seitenketten das Maß der Anpassung eines Enzyms, das sogenannte *induced fit* Verhalten, prägt.

Der große Nachteil dieser Methode ist, dass nur die Wechselwirkung von Aminosäuren im unmittelbaren Kontakt mit dem Substrat berücksichtigt werden. Dadurch können nur Einflüsse auf das Substrat von Mutationen innerhalb der Bindungstasche untersucht werden. Durch das Fehlen von Lösungsmitteln und die Fixierung des Proteinrückgrates kann eine Veränderung der Dynamik oder Flexibilität des gesamten Enzymes aufgrund der Mutationen nicht beobachtet werden.

### 5.1.4 Verwendete Strukturmodelle der Lipasemutanten

Die Fähigkeiten der theoretischen Modelle wurden zur Vorhersage der veränderten Enantioselektivität von PCL- und CRL-Mutanten herangezogen und experimentell überprüft. Basierend auf der Kristallstruktur der PCL (PDB-Eintrag 3lip) und der CRL (PDB-Eintrag 1LPM) wurden die theoretischen Modelle der Mutanten dieser Arbeit generiert. Durch den Austausch der Seitenketten einzelner Aminosäuren wurden die PCL-Mutanten L287F, L287W, L287Y und Y29W und die CRL-Mutanten P246F und L304F *in silico* hergestellt. Das Proteinrückgrat bleibt daher *in silico* unverändert. Der Einfluss auf die tatsächliche Struktur des Enzyms durch Austausch dieser Aminosäuren kann also nicht abgeschätzt

werden. Allerdings zeigten Strukturaufklärungen von Mutanten, dass sich diese im Vergleich zum Wildtyp nur durch die Orientierung der veränderten Seitenkette unterscheiden. Aufgrund der Anzahl der untersuchten Mutanten ist eine Überprüfung der Qualität der generierten Modellstrukturen der Mutanten durch Röntgenkristallstrukturen zwar prinzipiell machbar, aber im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

### 5.1.5 Länge der Simulation

Die Modelle zur Beschreibung der Enantioselektivität von Lipasen gegenüber primären Alkoholen und Carbonsäuren sollten nach Möglichkeit als eine Art „*in silico High-Throughput-Screening* Methode“ entwickelt und verwendet werden. Aus diesem Grund wurde versucht, möglichst kurze Simulationszeiten zu erreichen. Die Simulationszeit wurde systematisch von 20 ps auf 8 ps verkürzt. Die Analyse der mittleren Struktur verdeutlichte, dass die erhaltenen Strukturen des Enzym-Substrat-Komplexes bei allen Simulationen keine wesentlichen Veränderungen zeigten. Das Substrat bindet schon zu Beginn der Produktionsphase in der jeweils speziellen Region der Bindungstasche der Lipase, das System equilibriert sich anschließend sehr schnell und die Konformation des Enzym-Substrat-Komplexes ändert sich nur noch unwesentlich. Die Erhöhung der Temperatur auf bis zu 200 K für sperrige Substrate und *simulated annealing* für ausgewählte Substrate führte zu annähernd identischen Strukturen. Eine beispielhaft durchgeführte Simulation für Substrat **D** über 50 ps zeigte auch keine signifikante Änderung der mittleren Struktur. Die Analyse der Energien während der Simulation zeigten, dass sich das System bei jeder durchgeführten Simulation schnell equilibriert und es zu keinen Änderungen mehr kommt. Andere Arbeiten zeigten schon, dass für die Untersuchung solcher Enzym-Substrat-Komplexe im Vakuum relativ kurze Simulationszeiten und Simulationstemperaturen von 100 K ausreichend sind (Scheib *et al.* 1998; Scheib *et al.* 1999; Schulz *et al.* 2000).



## 5.2 Gültigkeit des Modells zur Beschreibung und Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität der PCL gegenüber primären Alkoholen

Zentrales Ziel der Arbeit war es, die molekularen Ursachen der Enantioselektivität von PCL in der Hydrolyse und Veresterung von primären Alkoholen zu verstehen. Durch die Arbeit konnte ein Modell entwickelt werden, welches für alle untersuchten Substrate, bis auf eines, die Vorhersage der Enantiopräferenz erlaubt und den Einfluss von Modifikationen an Substrat und Protein vorhersagt, sowie gezielt Substrat- und *Protein Engineering* ermöglicht. Eine Vorhersage der Veränderung und die quantitative Bewertung des E-Wertes ist anhand dieses Modells ebenfalls möglich.

### 5.2.1 Modell zur Vorhersage der Enantiopräferenz

Die in dieser Arbeit durchgeführten *molecular modeling* Untersuchungen primärer Alkohole zeigten, dass diese Substrate mit dem großen Substituenten am Stereozentrum im *His gap* der PCL binden. Das bevorzugte Enantiomer bewegt sich immer tiefer in das *His gap* als das nicht bevorzugte Enantiomer, was eine Vorhersage der Enantiopräferenz erlaubt.

#### *His gap* und Torsionswinkel $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$

Die molekulardynamischen Untersuchungen zur Enantiopräferenz und Enantioselektivität erfolgte unter Berücksichtigung der beiden möglichen Orientierungen des großen Substituenten am Stereozentrum des Substrats in der Bindungstasche, im *hydrophobic dent* und im *hydrophilic trench*. Unabhängig von der Startstruktur binden die Substrate immer im *His gap* des *hydrophobic dent*. Die Anlagerung des großen Substituenten in den *His gap* verringert die Zahl der Rotationsfreiheitsgrade. Flexible und kleine Substrate können sich nicht so gut an dieses Strukturelement anlagern wie starre und große. Die starren Substrate lagern sich tief im *His gap* an, während sich kleine und flexible Substrate zu dessen Oberfläche hin orientieren. Es wurde beobachtet, dass das bevorzugte Enantiomer sich immer tiefer in das *His gap* bewegt als das nicht bevorzugte Enantiomer. Diese Änderung in der Substratgeometrie ist anschaulich durch einen Torsionswinkel zu beschreiben:  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$ . Dieser Parameter spiegelt deutlich die Bewegung des bevorzugten Enantiomers in das *His gap* bei einem Wert von  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}} > 10^\circ$  wider; des weiteren ist für alle bis auf eines der untersuchten

Substrate der Torsionswinkel auch immer für das bevorzugte Enantiomer größer als für das nicht bevorzugte Enantiomer (Tabelle 13), wobei für Substrate, deren Differenz der Torsionswinkel  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C.}} < 10^\circ$  war, die Bewegung tiefer in das *His gap* durch die visuelle Analyse bestätigt wurde.

### 5.2.2 Modell zur Vorhersage der Enantioselektivität

Da der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  die Konformation der Substrate in der Bindungstasche und deren Bewegung in das *His gap* beschreibt, wurde angenommen, dass eine Veränderung dieses Parameters im Modell eine Änderung der experimentell bestimmten Enantioselektivität zur Folge haben sollte. Je tiefer ein Substrat sich in das *His gap* bewegt, um so schneller sollte es umgesetzt werden. Dies zeigte sich auch für Substrate, die ihr Stereozentrum in einer Ringstruktur besitzen. Die Bindung tiefer im *His gap* führte bei diesen Substraten aufgrund ihrer Größe und Sperrigkeit durch die resultierende Bewegung des Imidazolringes des katalytischen H286 zu einer Vergrößerung des *His gaps*. Bei einer Größe zwischen 6,3 Å und 6,7 Å wurde für Substrate, deren Daten über ihre Enantioselektivität der PCL aus der Literatur entnommen wurden, ein Optimum mit E-Werten bis zu  $E = 50$  beobachtet. Wenn die Größe des *His gaps* weiter zunimmt, nimmt der E-Wert allerdings wieder ab. Dies ist auf den abnehmenden katalytischen Einfluss der Lipase auf das bevorzugte Enantiomer zurückzuführen. Das katalytische H286 ist in solchen Fällen so weit vom Alkoholsauerstoff entfernt, dass eine Katalyse der Reaktion nicht mehr schnell erfolgen kann.

Die Strukturanalyse von *Candida rugosa* Lipase im Übergangszustand an beide Enantiomere des chiralen sekundären Alkohols Menthol gebunden, zeigte eine Bewegung des Imidazolringes des katalytischen Histidins für das nicht bevorzugte Enantiomer und einen damit verbundenen Effekt auf die Enantioselektivität (Cygler *et al.* 1994; Grochulski *et al.* 1994). Der gleiche Effekt wurde auch für die Enantioselektivität der PCL gegenüber sekundären Alkoholen beobachtet (Schulz *et al.* 2000). Dort korreliert der Abstand zwischen dem katalytischen H286 und dem Alkoholsauerstoff im Modell mit dem experimentell bestimmten E-Wert.

Die Bewegung primärer Alkohole ins *His gap* und der daraus resultierende Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  steht somit auch im Zusammenhang mit der Enantioselektivität, da er die relative

Orientierung der Enantiomere beschreibt. Ausgehend von diesem Ansatz, sollten Mutanten gefunden werden, die die Differenz der Torsionswinkel  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  der beiden Enantiomere der Substrate **A**, **B**, **C**, **D** und **E** ändern und dadurch eine Vorhersage experimentell bestimmter Enantioselektivität erlauben.

#### *Modifikation der Substratbindungstasche*

Größe und Polarität der Bindungstasche der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* wurden verändert. Die Mutationen wurden an zwei verschiedenen Positionen in der Bindungstasche der PCL eingeführt: L287 und Y29. L287 bildet zusammen mit H286 das *His gap* und wechselwirkt aus diesem Grund direkt mit allen Substraten, während Y29 durch seine Position oberhalb des *His gaps* und der Substrate deren Bewegung in das *His gap* verändern kann. Es wurden an diesen beiden Positionen Mutanten gesucht, die eine signifikante Änderung der Differenz der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  hervorrufen und als Folge den experimentell bestimmten E-Wert verändern. Die erhaltenen Resultate wurden mit denen des Wildtyps verglichen.

Eine Verkleinerung der Seitenkette an Position 287 durch L287A und L287G führte zu einer Zerstörung des *His gaps*, wodurch beide Enantiomere in der annähernd selben Konformation binden. Dadurch glichen sich die Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  der beiden Enantiomere an, was eine Abnahme der Enantioselektivität zur Folge haben sollte. Aus diesem Grund und weil die hergestellten Mutanten teilweise ebenfalls eine Abnahme von  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  im Modell und somit der Enantioselektivität bewirkten, wurden diese Mutanten nicht hergestellt und untersucht. Durch die Vergrößerung der Seitenkette durch L287F, L287W und L287Y konnten allerdings verschiedene Auswirkungen im Modell auf  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  beobachtet werden. Es kam zur Zu- und Abnahme von  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$ , was mit einer Steigerung bzw. Absenkung der Enantioselektivität verbunden sein sollte und sogar zur Umkehr des Vorzeichens, was eine Enantiopräferenzänderung zur Folge haben sollte. Daher wurden die Mutanten L287F, L287W und L287Y hergestellt und die E-Werte der Mutanten L287F, L287W und L287Y gegenüber dem Substrat **E** *in vitro* bestimmt.

#### *Modifikation der Enantioselektivität von PCL durch positionsgerichtete Mutagenese*

Um die Gültigkeit des Modells zur Beschreibung und Vorhersage der molekularen Ursachen der Enantiopräferenz von PCL gegenüber primären Alkoholen zu überprüfen, wurde gezielt eine Aminosäure der Bindungstasche ausgetauscht. Die Mutation erfolgte in Position 287

durch Austausch des dem katalytischen H286 C-terminal benachbarten Leucins durch Tyrosin und Tryptophan und an der Position 29 durch Austausch des Tyrosins durch Tryptophan.

Die Mutationen wurden mit Hilfe des "QuikChange"-Protokolls in das Gen der PCL eingeführt. Diese Methode hat den Vorteil, deutlich schneller als die von Quyen und Mitarbeitern entwickelte zu sein und darüber hinaus keine Probleme mit der Ligation aufzuweisen (Quyen *et al.* 1999). Die Umfaltungsprozedur der inaktiven Einschlusskörper zu aktivem Protein erfolgte basierend auf der Methodik von Quyen *et al.* (Quyen *et al.* 1999), wobei die erzielten Aktivitäten signifikant kleiner waren als in der Literatur beschrieben. Dies lässt sich höchstwahrscheinlich zurückführen auf nicht optimierte Fermentationsbedingungen sowie eine noch nicht ausgereifte Umfaltungsmethodik, insbesondere bezüglich eines Verfahrens zum Zellaufschluss, der Dauer und Temperatur der Umfaltungsprozedur sowie der Verdünnung der Umfaltungslösung.

#### *Korrelation des in silico Assays mit dem experimentell bestimmten E-Wert*

Für ein Substrat lässt sich anhand des *in silico* Assays eine Vorhersage der veränderten Enantioselektivität von Mutanten treffen (Abbildung 34). Durch die Untersuchung der Interaktionen des Enzym-Substrat-Komplexes konnte der experimentell bestimmte E-Wert mit der Differenz der Torsionswinkel  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  korreliert werden. Aufgrund dieser Korrelation konnte nicht nur die Steigerung der Enantioselektivität mit Erfolg vorausgesagt werden, sondern auch die Umkehr der Enantiopräferenz. Von diesem Befund ausgehend, kann für ein neu zu untersuchendes Substrat oder eine neue Mutante, der zu erwartende E-Wert semi-quantitativ vorhergesagt werden. Im Modell verändert sich die Form der Bindungstasche der Doppelmutante Y29W / L287F, da die beiden Mutanten durch die Bewegung ihrer Seitenketten zueinander hin den Zugang zum *hydrophilic trench* verschließen. Durch diese Veränderung bindet das bevorzugte (*R*)-Enantiomer von Substrat **E** sehr tief im *His gap*, während das nicht bevorzugte überhaupt nicht mehr mit dem *His gap* in Kontakt kommt und weit vor ihm bindet. Dadurch wird dieses Enantiomer nicht mehr fixiert und die essentielle Orientierung für die Umsetzung von primären Alkoholen im oder nahe beim *His gap* ist nicht mehr gegeben.

Die Korrelation der experimentell bestimmten E-Werte mit der Differenz der Torsionswinkel  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  korreliert für größere und sperrige Substrate sehr gut. Bei kleinen und flexiblen Substrate muss berücksichtigt werden, dass sie nicht so tief im *His gap* binden.

Daher werden sie nicht fixiert und bewegen sich während der Simulation stärker in der Bindungstasche als größere und sperrige Substrate. Dies spiegelt sich auch bei der Betrachtung der rms-Werte der Torsionswinkel  $\Phi_{\text{OAlk.-C}}$  während der Produktionsphase der MD-Simulationen wider. Für die drei größeren, sperrigeren Substrate **C**, **D** und **E** lag der rms bei 0,8 und für Substrat **A** bei 10,5 und Substrat **B** bei 9,2. Die Vorhersage der Enantioselektivität kann somit für größere und sperrigere Substrate anhand des *in silico* Assays sehr wahrscheinlich genauer erfolgen als für kleinere und flexible.

### *Äußere Einflussgrößen*

Die Enantioselektivität von Lipasen hat jedoch nicht nur Ursachen in der Wechselwirkung von Enzym und Substrat, sondern hängt zusätzlich von äußeren Einflüssen wie der Temperatur, dem Immobilisat, und dem verwendeten Lösungsmittel ab (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Durch entsprechende Wahl der Reaktionsbedingungen ist demnach eine Abweichung des in dieser Arbeit etablierten Modells möglich. Ausgehend von dieser Erkenntnis wurden nur die Daten über Enantiopräferenz der aus der Literatur entnommenen Substrate verwendet. Die Daten der Enantioselektivität wurden nur für solche Substrate ausgewertet, die unter denselben Bedingungen biochemisch bestimmt wurden.

Die Korrelation zwischen dem experimentell bestimmten E-Wert und der im Modell gemessenen Differenz der Torsionswinkel  $\Delta\Phi_{\text{OAlk.-C}}(\text{S-R})$  für Substrate, deren Daten über die Enantioselektivität aus der Literatur entnommen wurden, besteht ebenfalls, wenn sie unter identischen Bedingungen biochemisch umgesetzt wurden. Die semi-quantitative Vorhersage der Enantioselektivität beschränkt sich somit auf Substrate und Mutanten, die unter gleichen Bedingungen umgesetzt werden. Da die Reaktionsbedingungen für das in dieser Arbeit untersuchte Substrat nicht optimiert worden sind, wurden auch keine solch hohen E-Werte, wie die der Literatur entnommenen Substrate, erreicht. Dies war aber auch nicht Ziel der Arbeit. Es sollte nur eine Korrelation des *in silico* Assays mit den experimentell bestimmten E-Werte gezeigt werden. Dafür war es ausreichend, die Umsetzung aller Lipasen unter identischen Reaktionsbedingungen durchzuführen.

### *Enantioselektivität anderer Lipasen gegenüber primären Alkoholen*

Molekulardynamische Simulationen von CRL, CAL-B und RML mit primären Alkoholen deren Daten aus der Literatur genommen wurden und deren E-Werte selber bestimmt wurden (Substrat **E**) zeigten, dass sich die Substrate in das *His gap* der CAL-B und RML bewegen, gegenüber denen diese Lipasen Enantioselektivität zeigen. Bindet ein Substrat mit keinem

Enantiomer in das *His gap* der Lipasen, so zeigen sie auch keine Enantioselektivität. Bei der CAL-B zum Beispiel verhindert die über dem *His gap* orientierte Seitenkette des I189 die Bewegung des Substrates **D** in das *His gap*. Bei der RML wurde beobachtet, dass ein Substrat an der C-OH-Bindung abknicken muss, um das *His gap* zu erreichen. Die wichtige Aufgabe der Fixierung eines primären Alkohols durch das *His gap* wird auch durch die unterschiedlichen E-Werte der PCL, CAL-B und RML gegenüber Substrat **E** gezeigt. Sowohl bei der RML als auch bei der CAL-B bindet ausschließlich das bevorzugte (*R*)-Enantiomer des Substrates **E** im *His gap* und diese Lipasen zeigen mit einem E-Wert von 9 bzw. 7 auch eine höhere Enantioselektivität als die PCL mit einem E-Wert von 3, bei der das bevorzugte Enantiomer nur tiefer im *His gap* bindet.

Auch bei anderen Lipasen ist die Lage des *His gaps* im Vergleich zur PCL geometrisch ungünstig für die Bindung primärer Alkohole, da es im Vergleich zur PCL seitlich versetzt liegt, wodurch die Bewegung ins *His gap* nicht für viele Substrate möglich ist. Die CRL besitzt eine andere Bindungstaschenregion für den großen Substituenten am Stereozentrum primärer Alkohole. Dieser Bindungstaschenbereich entspricht dem *hydrophilic trench* der PCL. Da er vom katalytischen S209 der CRL entfernt ist, können ihn nur große Substrate erreichen und nur gegenüber solchen Substraten zeigt die CRL Enantioselektivität (siehe Tabelle 28). Substrat **D** und **E** erreichen im Modell diese Bindungstaschenregion nicht, binden ohne erkennbare Unterschiede in der Bindungstasche der CRL und es konnte keine Enantioselektivität für Substrat **E** experimentell gemessen werden. Die Untersuchung der PCL und Substraten mit einem Stereozentrum in einer Ringstruktur zeigten, dass eine Orientierung der Substrate im *His gap* und dessen Vergrößerung für die Enantioselektivität entscheidend sind. Die Veränderung der Größe des *His gaps* konnte bei CRL, CAL-B und RML nicht beobachtet werden. Diese Ursachen scheinen der Grund für die nicht vorhandene Enantioselektivität dieser Lipasen gegenüber einem breiten Spektrum an primären Alkoholen zu sein.

Die einzige Lipase außer PCL, die noch ausreichend hohe Enantioselektivität gegenüber einem breiten Spektrum an primären Alkoholen besitzt, ist die PPL. Deshalb wurden sechs Substrate molekulardynamisch mit dieser Lipase untersucht (Tabelle 28), deren Daten über die Enantioselektivität aus der Literatur entnommen wurden. Auch in diesem Falle konnte keine Bindung des Substrates in einem vom katalytischen H264 und seinem Nachbarn L265 gebildeten *His gap* erkannt werden. Allerdings konnte für alle untersuchten Substrate eine

Orientierung und Bindung in einer anderen Bindungstasche erkannt werden, die dem *hydrophilic trench* der mikrobiellen PCL entspricht. Diese ist in der PPL allerdings nicht soweit vom katalytischen Serin entfernt wie bei der CRL. Auch hier bindet das bevorzugte Enantiomer in einer kleinen Bindungstaschenregion, die von nicht katalytischen H152 und L265 gebildet wird. Hierbei korreliert die Größe dieser Bindungstasche mit der experimentell bestimmten Enantioselektivität. Da ausschließlich das bevorzugte Enantiomer parallel in der von den Seitenketten der Aminosäuren H152 und L265 gebildeten Spalte binden kann, ist der E-Wert um so höher, je kleiner dieses Strukturmotiv ist. In diesem Fall kann das nicht bevorzugte Enantiomer dort nicht binden oder bewegt sich vollständig aus diesem Bindungstaschenbereich hinaus (wie für PPL 5 und PPL 6 beobachtet wurde).

Es gibt somit zwei Bindungsmodi für primäre Alkohole in Lipasen. Der eine Typ zeigt Enantioselektivität, wenn die Substrate im *His gap* binden (PCL, CAL-B und RML). Der andere Typ bindet die Substrate in einer Bindungstasche, die dem *hydrophilic trench* der PCL entspricht (CRL und PPL).

### 5.2.3 Andere Modelle zur Vorhersage der Enantiopräferenz von PCL gegenüber primären Alkoholen

#### *Empirische Regel zur Vorhersage der Enantiopräferenz*

In ihrer Komplexität unterscheidet sich die Enantioselektivität von Lipasen bei der Umsetzung von primären Alkoholsubstraten deutlich von der für sekundäre Alkohole. Basiert eine hohe Enantioselektivität bei sekundären Alkoholsubstraten in erster Linie auf einem ausgeprägten Größenunterschied der Substituenten am Stereozentrum (Laumen 1987; Roberts 1989; Burgess und Jennings 1991; Janssen *et al.* 1991; Kazlauskas *et al.* 1991; Kim und Cho 1992; Lutz *et al.* 1992; Naemura *et al.* 1993; Naemura 1994; Naemura *et al.* 1995; Orrenius *et al.* 1995; Naemura *et al.* 1996), ist dieser einfache Zusammenhang für primäre Alkoholsubstrate nicht mehr gültig (Weissfloch und Kazlauskas 1995). Für sekundäre Alkohole konnte gezeigt werden, dass durch Veränderung der Größenunterschiede der beiden Substituenten am chiralen Zentrum auch die resultierende Enantioselektivität modifiziert werden kann. Je größer dieser Unterschied, desto ausgeprägter die Stereopräferenz (Kazlauskas *et al.* 1991; Gupta und Kazlauskas 1993; Rotticci *et al.* 1997). Dabei orientiert sich der mittelgroße Substituent **M** am Stereozentrum in die BTM (*hydrophilic trench* der PCL), der große Substituent **L** in die BTL (*hydrophobic dent* der PCL). Das Substrat hat,

aufgrund der direkten Nachbarschaft des Stereozentrums zum Estersauerstoff und damit zum katalytisch aktiven Histidin, nur eine begrenzte Anzahl von Rotations- und Schwingungsfreiheitsgraden zur produktiven Bindung an die Lipase zur Verfügung.

Im Gegensatz zu sekundären Alkoholen besitzen primäre eine Methylengruppe zwischen dem Estersauerstoff und dem Stereozentrum (Kapitel 1.3.2), woraus die freie Drehbarkeit der C-O bzw. C-C Einfachbindungen an der Methylengruppe resultiert. Dies ermöglicht eine größere Zahl an Rotations- und Schwingungsfreiheitsgraden, welche es dem primären Alkoholsubstrat ermöglichen, sich den strukturellen Gegebenheiten der PCL-Bindungstasche anzupassen. Für sekundäre Alkoholsubstrate ist dies so nicht möglich, weshalb allein aufgrund des Größenunterschieds von **M** und **L** die experimentell beobachtete Diskriminierung (Kazlauskas *et al.* 1991) zwischen bevorzugtem und weniger bevorzugtem Enantiomer ermöglicht sein könnte. Andererseits könnte die Flexibilität der primären Alkoholsubstrate ein entscheidender Grund für die überwiegend geringe Enantioselektivität von Lipasen bei der Umsetzung dieser Substrate sein.

Mitentscheidend für die Komplexität der Enantioselektivität ist sehr wahrscheinlich die strukturelle Flexibilität der primären Alkoholreste nahe dem Stereozentrum. Somit beeinflussen Größe und chemische Struktur von **M** die Tiefe der Substratbindung in die Bindungstasche beträchtlich.

#### *Energiebetrachtungen zur Beschreibung der Stereoselektivität*

Es wurden auch Energiebetrachtungen der molekulardynamischen Untersuchungen der beiden Enantiomere eines sekundären und primären Alkoholsubstrates durchgeführt. Versuche, die Enantioselektivität von Lipasen gegenüber sekundären Alkoholen anhand von Energieberechnungen zu erklären, ermöglichten die Vorhersage der Enantiopräferenz (Hult und Norin 1993; Rotticci *et al.* 1997; Haeffner *et al.* 1998; Rotticci *et al.* 1998). Die Betrachtung der Differenzen der potentiellen Energie zwischen den beiden Enantiomeren erlaubte allerdings, aufgrund der relativ geringen Energieunterschiede (~1-2 kcal/mol) nicht die Vorhersage der Enantioselektivität. Die Energieunterschiede zwischen den beiden Enantiomeren eines primären Alkohols waren ebenfalls äußerst gering und erlaubten keine Vorhersage der Enantiopräferenz, wodurch auch eine Beschreibung der Enantioselektivität nicht möglich war (Zuegg *et al.* 1997). Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Energiebetrachtungen erlaubten weder die Vorhersage der Enantioselektivität noch der



Enantiopräferenz. Offensichtlich wird die Bewegung der Substrate in das *His gap*, was geometrisch analysiert werden kann, nicht durch signifikante Änderungen der Interaktionsenergien widerspiegelt.

#### 5.2.4 Substrate, die der empirischen Regel von Weissfloch und Kazlauskas folgen

Durch Analyse der mit *molecular modeling* Untersuchungen generierten mittleren Struktur der Enzym-Substrat-Komplexe ist es auch möglich zu beschreiben, welche Substrate der empirischen Regel zur Vorhersage der Enantiopräferenz (Weissfloch und Kazlauskas 1995) folgen und welche nicht. Ausnahmen von der empirischen Regel sind Substrate mit einem Sauerstoff am Stereozentrum. Außerdem folgen häufig Substrate mit dem Stereozentrum in einer Ringstruktur nicht der Regel, unabhängig, ob sie ein Sauerstoff am Stereozentrum besitzen oder nicht. Dies ist insofern nachvollziehbar, da die Regel auf der Zuweisung von einem großen und mittleren Substituenten am Stereozentrum der Substrate basiert. Diese Definition ist für Substrate mit dem Stereozentrum in einer Ringstruktur nicht immer möglich oder sinnvoll.

Empirische Regeln, die die experimentell bestimmte Enantiopräferenz vorhersagen, können nur erfolgreich etabliert werden, wenn alle Substrate in der gleichen Orientierung in einem Enzym binden. Welche Substrate anhand ihrer Struktur der Regel folgen und somit in der gleichen Orientierung binden, konnte anhand der in dieser Arbeit generierten mittleren Strukturen beschrieben werden. Dazu muss auf das Stereozentrum weiter zum Alkoholsauerstoff und tetraedrischen Kohlenstoff der Substrate im Modell geblickt werden, wenn das L287 unter dem Substrat positioniert ist (Abbildung 52). Aus dieser Sichtweise zeigen die beiden Bindungen am Stereozentrum zu dem mittelgroßen und großen Substituenten beim bevorzugten Enantiomer nach oben und beim nicht bevorzugten nach unten, wenn das Substrat der Regel folgt (Abbildung 52, links). Wenn das Substrat nicht der Regel folgt, zeigen entweder beide Bindungen nach unten oder eines nach oben und eines nach unten. Durch die Flexibilität der Substrate sind diese verschiedenen Orientierungen möglich. Substrate mit dem Stereozentrum in einer Ringstruktur können diese oben-oben bzw. unten-unten Konformation der Substituenten aufgrund ihrer Geometrie nur schwer erreichen. Auch zeigen für fast alle Substrate mit einem Sauerstoff am Stereozentrum die beiden Substituenten des bevorzugten Enantiomers nach unten (Abbildung 52, rechts). Die meisten Substrate mit einem Sauerstoff am Stereozentrum, die nicht der empirischen Regel

folgen, befinden sich auch in einer Ringstruktur. Daher scheint die empirische Regel hauptsächlich nicht für Substrate in einer Ringstruktur zu halten und nicht für Substrate mit einem Sauerstoff am Stereozentrum (siehe auch Substrate **29**, **30**, **38** und **39** in Tabelle 13).

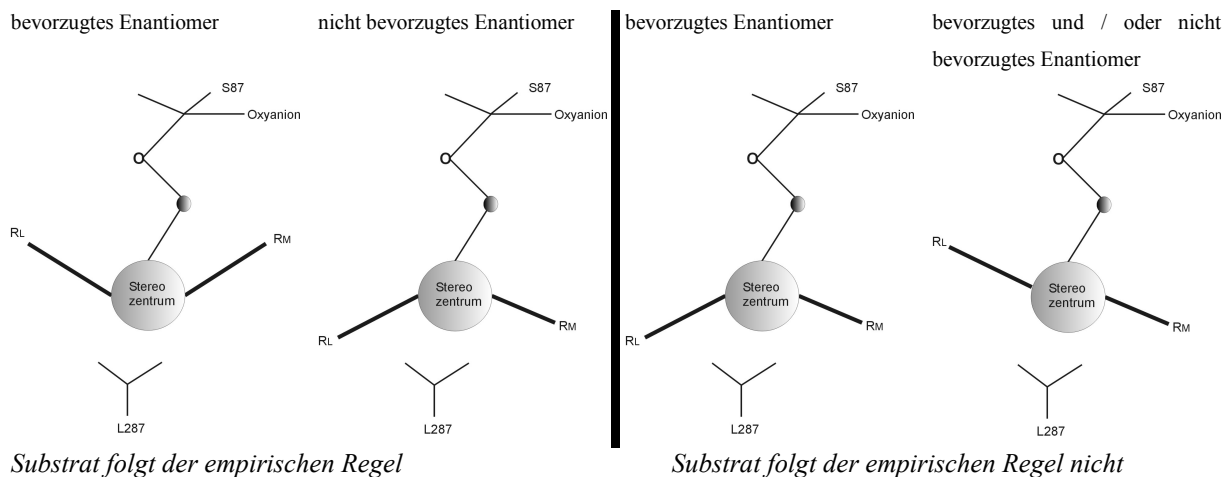


Abbildung 52: Orientierung der Bindungen am Stereozentrum zum großen Substituenten  $R_L$  und mittelgroßen Substituenten  $R_M$  der primären Alkohole, wenn sie der empirischen Regel (Weissfloch und Kazlauskas 1995) folgen (links) und wenn sie ihr nicht folgen (rechts).

### 5.2.5 Enzym-Substrat-Komplex

In den letzten Jahren wurden einige Arbeiten veröffentlicht, die versuchten, auch die Enantioselektivität von primären Alkoholen durch ausschließliches Betrachten der Substrat- oder Enzymseite zu erklären (Carrea 1993; Weissfloch und Kazlauskas 1995; Naemura *et al.* 1996). Dies ist für den speziellen Fall der primären Alkohole jedoch nicht möglich, da nur die Betrachtung und Analyse des Enzym-Substrat-Komplex zum Erfolg führt. Das wurde deutlich anhand der Resultate der Mutanten der PCL. Die Mutanten unterscheiden sich teilweise nur unwesentlich, wenn man ihre Seitenkette betrachtet, zeigen aber unter Umständen eine völlig verschiedene Enantioselektivität. Und andere unterscheiden sich wiederum deutlich in der Seitenkette, zeigen aber den gleichen Effekt.

Änderungen der Eigenschaften in Abhängigkeit von der Größe der Seitenkette der PCL-Mutanten und dem Wildtyp ausgehend, werden theoretisch in der Reihe  $L = F < Y < W$  erwartet. Aber solch eine generelle Reihenfolge konnte für kein Substrat beobachtet werden und wurde außerdem vom *in silico* Assay auch anders vorhergesagt. Aufgrund der Größe sollte sich die L287F-Mutante kaum vom Wildtyp unterscheiden. Durch die

molekulardynamischen Simulationen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass je nach Orientierung des planaren Phenylringes des F287 im Gegensatz zum L287 die Größe des *His gaps* sowohl kleiner als auch größer werden kann. Für die bevorzugten Enantiomere der in dieser Arbeit untersuchten Substrate **A**, **B**, **C**, **D** und **E** konnte durch die Rotation und die parallele Ausrichtung des Phenylringes zum Imidazolring des katalytischen H286 eine Öffnung der *His gaps* festgestellt werden. Dadurch bewegten sich die bevorzugten Enantiomere tiefer in das *His gap*. Das nicht bevorzugte Enantiomer dieser fünf Substrate konnte durch die senkrechte Ausrichtung des Phenylringes zum Imidazolring des katalytischen H286 nicht in das *His gap* gelangen. Die Rotation des Phenylrings führte hier zu einem regelrechten Verschluss des *His gaps*. Als Folge änderte sich die Differenz der Torsionswinkel beider Enantiomere eines Substrates erheblich und eine Steigerung des E-Wertes wurde experimentell bestimmt (Substrat **E**). Der selbe Effekt konnte auch für die L287W und L287Y beobachtet werden. Aufgrund der Größe und Sperrigkeit, lässt sich die Seitenkette der L287W-Seitenkette nicht so leicht wegdrücken und rotieren. Durch diese Mutation ändert sich sogar für zwei Substrate (**D** und **E**) die Enantiopräferenz, da durch die veränderte Konformation der Bindungstasche sich nun das andere Enantiomer tiefer in das *His gap* bewegen kann. Dieselbe Mutante hat theoretisch also nicht grundsätzlich die gleiche Auswirkung auf jedes Substrat. Deshalb ist es unmöglich eine Aussage über den Effekt einer Mutante allgemeingültig zu treffen, indem man zum Beispiel nur die Größe oder die Polarität der veränderten Aminosäuren betrachtet. Auch sind die Änderungen der Doppelmutante Y29W/L287F, sowohl auf die Form und Größe der Bindungstasche, als auch auf die daraus resultierende veränderte Eigenschaft gegenüber dem Substrat nur anhand von Computersimulationen und der anschließenden Analyse der Enzym-Substrat-Komplexe zugänglich.

Für sekundäre Alkohole konnte gezeigt werden, dass eine Vergrößerung des großen Substituenten der Substrate mit einer Steigerung der Enantioselektivität einhergeht (Janssen *et al.* 1991; Kazlauskas *et al.* 1991; Kim und Cho 1992; Lutz *et al.* 1992; Orrenius *et al.* 1995; Naemura *et al.* 1996). Dies war für primäre Alkohole nicht möglich. Durch die Veränderung der Größe der Substituenten wurde die Enantioselektivität in einigen Fällen gesteigert, in anderen nahm sie ab oder war unverändert. Dies zeigte sich auch bei Substraten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden (siehe Tabelle 13, Substrate **41–47**). Die Addition von Methylgruppen oder andere kleine Änderungen der Substrate führte teilweise zu signifikanten Änderungen der Enantioselektivität, abhängig von der Position, an der sich die

Gruppe befindet. Bei Substraten, bei denen die Methylgruppen die Kohlenstoffkette verlängern, wurde keine Änderung der Enantioselektivität gemessen (vergleiche Tabelle 13, Substrate **44** und **45**). Wenn diese zusätzliche Methylgruppen allerdings als Verzweigung an der Kohlenstoffkette sitzen, konnten enorme Enantioselektivitätssteigerungen bestimmt werden (vergleiche Tabelle 13, Substrate **42**, **44** und **45**). Die *molecular modeling* Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass diese verzweigten Kohlenstoffkette für Substrate oder Enantiomere wie ein Anker wirken. Während der Simulation bewegen sie sich in das *His gap* und verbleiben dort. Dieser Anker hält die Substrate in einer bevorzugten und fixierten Position. Wenn die Methylgruppen vom *His gap* weg zeigt, kann dieser Ankereffekt nicht auftreten. Für Substrate, bei denen diese Methylgruppen ausschließlich für das bevorzugte Enantiomer die Ankerfunktion übernimmt, sind solche deutlichen Steigerungen der Enantioselektivität experimentell bestimmt worden. Nur durch schlichte Verlängerung der Kohlenstoffkette kann dieser Effekt nicht eintreten. Die Substrate binden nicht tiefer in das *His gap* und die Enantioselektivität bleibt unverändert.

Somit erlauben die *molecular modeling* Untersuchungen eine Aussage, warum Veränderungen am Substrat oder Enzym die Enantioselektivität erhöhen, erniedrigen oder unverändert lassen. Unter der Beachtung, dass die Mutante L287W sogar für Substrat **E** die Enantiopräferenz umkehrt wird deutlich, dass die Beschränkung auf die Substrat- oder Enzymstruktur nicht ausreichend ist, um die Enantioselektivität von Lipasen zu erklären.

### 5.2.6 Docking und Bindung der Substrate

*Molecular modeling* Untersuchungen beschrieben den *hydrophilic trench* (Tuomi und Kazlauskas 1999) neben dem *hydrophobic dent* (Zuegg *et al.* 1997) als mögliche Bindungstasche für den großen Substituenten am Stereozentrum der primären Alkohole. Von diesem Ansatz ausgehend wurden die in dieser Arbeit untersuchten Substrate nicht nur in den *hydrophobic dent* sondern auch in den *hydrophilic trench* gedockt. Alle bis auf zwei Substrate, die zwei sehr großen Substituenten am Stereozentrum tragen (Tabelle 13, Substrate **34** und **37**), die in den *hydrophilic trench* gedockt wurden, bewegten sich während der Simulation in den *hydrophobic dent*. Keines der Substrate, das in den *hydrophobic dent* gedockt wurde, bewegte sich in den *hydrophilic trench*. Diese Resultate deuten nicht darauf hin, dass der große Substituent primärer Alkohole im *hydrophilic trench* bindet. In dieser

Arbeit wurde dieselbe Bindungstasche in der PCL für primäre wie für sekundäre Alkohole identifiziert, wie sie von Zuegg *et al.* (Zuegg *et al.* 1997) beschrieben wurde.

Allerdings binden primäre Alkohole in der CRL und der PPL in einer Bindungstaschenregion, die dem *hydrophilic trench* der PCL entspricht. Somit ist dies der Bindungstaschenbereich anderer Lipasen für den großen Substituenten am Stereozentrum der primären Alkohole.

### 5.2.7 Modell zur Vorhersage der Aktivität der PCL-Mutanten *in silico*

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigte Korrelation zwischen dem Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  vom katalytischen H286 zum Alkoholsauerstoff im Computermodell mit der experimentell bestimmten Aktivität gegenüber Substraten der PCL-Mutanten, ist der erste Versuch, dies *in silico* zu realisieren. Die Möglichkeit, die relative Aktivität einer Mutante in dieser Weise gegenüber einem Substrat vorherzusagen, bestand bislang nicht. Bisher ging man davon aus, dass dies in dieser Weise nicht möglich ist. Der katalytische Einfluss der Lipase auf ein Substrat wurde anhand des Abstandes  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  nur als Maß zur Beschreibung der Selektivität benutzt (Cygler *et al.* 1994; Grochulski *et al.* 1994; Schulz *et al.* 2000).

Bei den primären Alkoholen zeigte sich aber, dass dieser Abstand in keinem Zusammenhang mit der Enantioselektivität steht, sondern eher mit der Aktivität gegenüber einem Substrat korreliert. Die Aktivität der Doppelmutanten konnte nicht mit dem Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  beschrieben werden. Sie zeigten beide eine wesentlich geringere Aktivität als der Wildtyp (ca. 7 %). Dies liegt vermutlich an der veränderten Form und Größe der Bindungstasche. Die Anlagerung und Bindung der Substrate wird verändert und durch die geringere Größe der Bindungstasche auch sehr wahrscheinlich erschwert. Mit dieser Kenntnis könnte es möglich sein, Mutanten *in silico* zu finden, die nicht nur eine erhöhte Enantioselektivität besitzen, sondern auch eine erhöhte Aktivität.

### **5.3 Gültigkeit des Modells zur Beschreibung und Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität der CRL gegenüber Carbonsäuren**

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein Modell zur Beschreibung der Enantioselektivität der CRL bei der Veresterung von chiralen Carbonsäuren etabliert. Die quantitative Vorhersage der Enantioselektivität war bislang nicht möglich, es existiert lediglich eine empirische Regel zur Vorhersage der Enantiopräferenz (Ahmed *et al.* 1994).

#### **5.3.1 Andere Modelle zur Vorhersage der Enantiopräferenz der CRL gegenüber Carbonsäuren**

Es existiert eine eingeschränkt gültige empirische Regel zur Vorhersage der Enantiopräferenz von CRL katalysierten Umsetzung von Carbonsäuren (Ahmed *et al.* 1994), allerdings kann diese nicht zur Vorhersage der Enantioselektivität genutzt werden. Die Vorhersage der Enantiopräferenz erfolgt auch hier wie bei primären und sekundären Alkoholen durch den Größenunterschied der Substituenten am Stereozentrum der Substrate. Frühere *molecular modeling* Untersuchung von CRL gegenüber Carbonsäuren zeigten, dass sich die Enantioselektivität der CRL durch einen Tunnel erklären lässt, in dem der große Substituent bindet (Holmquist 1996; Botta *et al.* 1997). Das Stereozentrum liegt an der Mündung dieses Tunnels. Weitere *molecular modeling* Untersuchungen zeigten, dass es einige Ausnahmen von der empirischen Regel gibt (Holmquist 1996). Eine starke Verzweigung des großen Substituenten führt zu einer Umkehrung der Präferenz, da das entsprechende Enantiomer nicht mehr in diesen Tunnel passt.

#### **5.3.2 Modell zur Vorhersage der Enantiopräferenz**

Da bereits eine allgemeingültige Möglichkeit zur Vorhersage der Enantiopräferenz von CRL gegenüber chiralen Carbonsäuren besteht, war es nicht das primäre Ziel, dies auch mit *molecular modeling* Untersuchungen zu etablieren. Vielmehr sollte die Enantioselektivität, für die es bisher keine allgemeingültige Regel oder Modell gab, beschrieben werden. Da diese beiden Aspekte aber zusammenhängen, wurde angenommen, dass die Vorhersage der

Enantiopräferenz ebenfalls durch das Modell möglich sein würde. Die Möglichkeit der Beschreibung der Enantiopräferenz der CRL gegenüber Carbonsäuren sollte es erleichtern, das Modell auf weitere Lipasen auszuweiten, was bisher nicht möglich war.

Die beiden Enantiomere eines Substrates binden mit dem großen Substituenten im *hydrophobic tunnel* und mit dem mittelgroßen Substituenten im *acid his gap*. Das nicht bevorzugte Enantiomer bewegt sich immer tiefer ins *acid his gap*. Diese Bewegung ist über die Messung des Torsionswinkels  $\phi_{\text{C}_{\text{tet}}-\text{C}^*}$  zugänglich. Da das nicht bevorzugte Enantiomer immer tiefer im *acid his gap* bindet, ist der resultierende Torsionswinkels  $\phi_{\text{C}_{\text{tet}}-\text{C}^*}$  auch immer größer als für das bevorzugte Enantiomer. Der Torsionswinkel  $\phi_{\text{C}_{\text{tet}}-\text{C}^*}$  des bevorzugten Enantiomers ist immer  $< 100^\circ$  und der des nicht bevorzugten  $> 300^\circ$ . Das deutet darauf hin, dass sich die beiden Enantiomere in Folge ihrer unterschiedlichen Geometrie am Stereozentrum in entgegengesetzter Richtung um die Bindung  $\text{C}_{\text{tet}}-\text{C}^*$  drehen. Dies wäre aufgrund der gleichen Orientierung mit dem großen Substituenten im *hydrophobic tunnel* und ihrer unterschiedlichen Geometrie erklärbar. Aufgrund des Mangels an Daten über die Enantioselektivität von sehr verzweigten Substraten, konnte das Modell nur auf ein solches Substrate angewendet werden (Substrat **57** in Abbildung 44). Auch für diese Substrate konnte die Gültigkeit des Modells gezeigt werden. Daher scheint ein Modell zur Vorhersage und Beschreibung der Enantiopräferenz unzureichend, welches nur die Struktur der Substrate berücksichtigt. Ebenso wie im Falle der primären Alkohole müssen die Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zwischen Lipase und Substrat berücksichtigt werden.

### 5.3.3 Modell zur Vorhersage der Enantioselektivität

Das *acid his gap* der CRL wird von den Seitenketten der Aminosäuren F345 und des katalytischen H449 gebildet. Durch die Bewegung in den *acid his gap* kommt es zur Interaktion des Substrates mit diesen Seitenketten. Die Bewegung der Substrate bewirkt, wie bei den primären Alkoholen mit dem Stereozentrum in einer Ringstruktur, auch hier eine Vergrößerung der speziellen Bindungstaschenregion, in diesem Fall des *acid his gap*, durch die Bewegung der Seitenkette des katalytischen H449. Das bevorzugte Enantiomer bindet nicht sehr tief im *acid his gap*, wodurch für alle Substrate der Imidazolring des katalytischen H449 ungefähr an der gleichen Position bleibt. Da das nicht bevorzugte Enantiomer tiefer im *acid his gap* bindet, kann die Seitenkette des H449 je nach Größe des mittelgroßen

Substituenten und wie weit und in welcher Orientierung er sich in den *acid his gap* bewegt, weiter weggedrückt werden. Durch die daraus resultierende veränderte Lage des Imidazolringes ändert sich auch der Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  zwischen dem katalytischen H449 und dem Alkoholsauerstoff, der für die Katalysegeschwindigkeit entscheidend ist. Die Auswirkung auf die Enantioselektivität wurde schon für sekundäre Alkohole gezeigt (Cygler *et al.* 1994; Grochulski *et al.* 1994; Schulz *et al.* 2000). Der Abstand des katalytischen H449 und dem Alkoholsauerstoff korreliert mit dem experimentell bestimmten E-Wert.

Durch die Umsetzung der drei Substrate **F**, **G** und **H** mit rekombinanter CRL und den CRL-Mutanten P246F und L304F, sowie durch deren *molecular modeling* Untersuchungen, sollte gezeigt werden, dass die Veränderung dieses Abstandes im Modell mit der experimentell bestimmten Enantioselektivität ebenfalls korreliert. Da die eindeutige Zuordnung der Produktpeaks und die Trennung der Substratpeaks nicht gelang, war die experimentelle Überprüfung nicht möglich. Die Mutanten änderten im Modell die Größe und Konformation des *hydrophobic tunnels*. Die Substrate binden im Vergleich zum Wildtyp in einer anderen Konformation. Dadurch ändert sich die Lage des großen Substituenten im *hydrophobic tunnel* und als Folge auch die des mittelgroßen Substituenten im *acid his gap*. Für die nicht bevorzugten Enantiomere der untersuchten Substrate **G** und **H** konnte festgestellt werden, dass der mittelgroße Substituent durch seine Bewegung, im Vergleich zum Wildtyp mehr parallel zu den Seitenketten des *acid his gap*, weniger Interaktionen mit diesen verursacht. Dies hat zur Folge, dass das katalytische H449 nicht so weit weggedrückt wird und im Vergleich zum Wildtyp der Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  abnimmt. Daraus sollte auch die Abnahme der experimentell bestimmten Enantioselektivität resultieren. Für das Substrat **F** konnte eine besondere Konformationsänderung des mittleren Substituenten in der Bindungstasche der Mutanten beobachtet werden. Das nicht bevorzugte Enantiomer bindet im Wildtyp mit dem H-Atom am Stereozentrum im *acid his gap* und für die Mutanten mit dem Chloratom. Dadurch kommt es zu einer deutlichen Änderung des Torsionswinkels  $\phi_{\text{Ctetr.-C}^*}$  für das nicht bevorzugte Enantiomer.

Um signifikante Änderungen der Enantioselektivität zu erreichen, sollten die Seitenketten der zum *acid his gap* gehörenden Aminosäuren mutiert werden. Da das katalytische H449 nicht problemlos durch andere Aminosäuren ersetzt werden kann, sollten durch die Mutation von F345 die größten Enantioselektivitätsänderungen möglich sein. Die Herstellung dieser Mutanten war aber im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Das Ziel der Untersuchung mit



den CRL-Mutanten bestand lediglich darin, dass der *in silico* Assay nicht nur auf den Wildtyp angewendet werden kann, sondern auch die Vorhersage der veränderte Enantioselektivität von Mutanten ermöglicht.

Früher veröffentlichte *molecular modeling* Studien konnten durch die Bindung der Substrate in der Bindungstasche der CRL ausschließlich die Enantiopräferenz vorhersagen. Der in dieser Arbeit etablierte *in silico* Assay erlaubt es zum ersten Mal, die Enantioselektivität der CRL gegenüber Carbonsäuren quantitativ zu beschreiben und vorherzusagen. Dies ermöglicht auch das *in silico* Design von Mutanten. Für ein gegebenes Substrat können somit Mutationen am Computer eingeführt werden und durch die Auswertung der mittleren Struktur auf Mutanten geschlossen werden, die die Enantioselektivität signifikant verändern. Dieser Ansatz des rationalen Designs sollte somit die gezielte Beeinflussung der Enantioselektivität erlauben.

## **5.4 Übertragung des Modells zur Beschreibung und Vorhersage der Enantiopräferenz und Enantioselektivität der PCL gegenüber Carbonsäuren**

Da das Modell zur quantitativen Vorhersage der Enantioselektivität von CRL gegenüber Carbonsäuren erfolgreich etabliert werden konnte, wurde versucht, dies nun auf eine weitere Lipase zu übertragen. Neben der CRL zeigt auch noch die PCL ausreichend hohe Enantioselektivität gegenüber Carbonsäuren und es gibt zahlreiche veröffentlichte experimentell bestimmte Daten. Daher wurde die Enantioselektivität der PCL gegenüber 12 Substraten mittels *molecular modeling* Studien untersucht.

### **5.4.1 Gültigkeit des Modells zur Beschreibung der Enantiopräferenz der PCL gegenüber Carbonsäuren**

Die Strukturaufklärung und *molecular modeling* Untersuchungen von an Lipasen kovalent gebundenen Triacylglyceriden und sekundären Alkohol mit veresterten Fettsäure zeigten, dass die Fettsäure im *hydrophobic crevice* bindet (Cygler *et al.* 1994; Grochulski *et al.* 1994; Cygler *et al.* 1995; Cambillau *et al.* 1997; Lang *et al.* 1998; Scheib *et al.* 1998; Roussel *et al.*

1999; Scheib *et al.* 1999; Schulz *et al.* 2000). Der mit der Fettsäure veresterte sekundäre Alkohol bindet im *hydrophobic dent*. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der PCL mit primären Alkoholen zeigten, dass der Alkoholrest im *hydrophobic dent* bindet. Davon ausgehend wurden die Carbonsäuren für die *molecular modeling* Untersuchungen in den *hydrophobic crevice* und der mit den Substraten veresterte Alkohol Heptanol in den *hydrophobic dent* orientiert. Es konnte anhand der molekulardynamischen Simulationen nur allgemein festgestellt werden, dass die großen Substituenten der Carbonsäure im *hydrophobic crevice* der PCL bindet. Da im Rahmen dieser Arbeit die ersten *molecular modeling* Untersuchungen der Enantioselektivität der PCL gegenüber Carbonsäuren durchgeführt wurden, war dies zwar die sinnvolle Annahme, wurde aber bisher noch nicht in dieser Form nachgewiesen.

In der Bindungstasche der PCL befindet sich wie bei der CRL eine Bindungstasche für den mittelgroßen Substituenten am Stereozentrum der chiralen Carbonsäuren, das *acid his gap*. Deshalb ist die Enantiopräferenz für zehn Substrate durch Messung des Torsionswinkels  $\phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  zugänglich, der auch hier die Bewegung des mittleren Substituenten in den *acid his gap* beschreibt. Für diese zehn Substrate ist dieser Torsionswinkel  $\phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  ebenfalls für das bevorzugte Enantiomer kleiner als für das nicht bevorzugte Enantiomer. Allerdings konnten für die Substrate keine so deutliche Unterscheidung anhand der absoluten Größe des Torsionswinkels beobachtet werden wie bei der CRL.

Das Modell gilt nicht für zwei Substrate (Substrate **62** und **70**), da bei diesen der Torsionswinkel  $\phi_{\text{Ctet.}-\text{C}^*}$  für das bevorzugte Enantiomer größer ist als für das nicht bevorzugte. Beide Substrate besitzen Fluoratome in der unmittelbaren Nachbarschaft zum Stereozentrum. Das Tripos-Kraftfeld des verwendeten Simulationsprogramms Sybyl6.4 ist nicht explizit für die Untersuchung von Systemen mit Fluoratom einsetzbar. Möglicherweise werden die Potentiale für Fluoratome und deren Nachbaratome durch das benutzte *Force Field* nicht richtig berechnet oder zugewiesen. Da dies für molekulardynamische Simulationen allerdings essentiell ist, wäre die Auswertung solcher Simulationen wenig sinnvoll. Anhand des Energieverlaufes und der Trajektorie ist es aber nicht feststellbar, ob die Potentiale fehlerhaft zugewiesen wurden. Daher ist es möglich, dass aufgrund dieses Fehlers das Modell für diese beiden Substrate nicht angewendet werden kann.

Eine andere Ursache könnte in der Elektronegativität der Fluoratome und der daraus resultierenden Wechselwirkung mit dem Enzym liegen. Die Enantioselektivität der PCL gegenüber Carbonsäuren mit Fluoratomen in der  $\alpha$ -Position der Substrate wird auf den stereoelektronischen Effekt zurückgeführt (O'Hagan und Rzepa, 1994). Dadurch ist das Verhalten dieser Substrate möglicherweise völlig unterschiedlich im Vergleich zu weniger elektronegativen Atomen.

Dieses Modell ist das erste, welches die Enantiopräferenz der PCL gegenüber chiralen Carbonsäuren, bis auf zwei Ausnahmen, beschreiben kann.

#### 5.4.2 Modell zur Beschreibung der Enantioselektivität der PCL gegenüber chiralen Carbonsäuren

Die Übertragung des Modells der Enantioselektivität der CRL gegenüber Carbonsäuren auf die PCL war in dieser Form nicht möglich. Es konnte keine Korrelation des Abstandes zwischen dem katalytischen H286 und dem Alkoholsauerstoff und dem experimentell bestimmten E-Wert festgestellt werden. Dies war weder für das nicht bevorzugte noch für das bevorzugte Enantiomer möglich. In der PCL gibt es auch eine spezielle Bindungstaschenregion, das *acid his gap* in die der mittelgroße Substituent bindet. Die Bewegung und die Bindung dieses Substituenten beeinflusst die Lage und Orientierung des Imidazolringes des katalytischen H286. Dieser bewegt sich aber nicht immer in dieselbe Richtung für alle Substrate, wie es für die CRL beobachtet wurde. Der Imidazolring kann sich in seiner Orientierung zur Seitenkette des L267 hin senkrecht weg bewegen und damit den *acid his gap* vergrößern. Für etwa 50 % der untersuchten Substrate rotiert der Imidazolring aber auch und wird seitlich zum L267 weggedrückt. Dadurch ändert sich in beiden Fällen der Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  des katalytischen H286 zum Alkoholsauerstoff unterschiedlich stark. Diese unterschiedliche Bewegung scheint verantwortlich dafür zu sein, weshalb keine Korrelation des experimentell ermittelten E-Wertes zum Abstand  $d_{\text{HNE-OAlk}}$  besteht. Über die Messungen des Torsionswinkel  $\phi_{\text{C}_{\text{tet}}-\text{C}^*}$  und der Differenz dieses Torsionswinkels der beiden Enantiomere eines Substrates war die Beschreibung der Enantioselektivität ebenfalls nicht zugänglich.

Im Vergleich zur CRL konnte auch beobachtet werden, dass die Bewegungsrichtung des Imidazolringes der PCL dieser häufig entgegengesetzt ist und mehr Freiheitsgrade besitzt. Bei

den *molecular modeling* Untersuchungen der Enantioselektivität der PCL gegenüber primären Alkoholen und Carbonsäuren wurden dieselben Bewegungsrichtungen des Imidazolringes beobachtet. Somit scheint die Bewegung des Imidazolringes der PCL prinzipiell flexibler zu sein, als die der CRL. Obwohl die Stereoselektivität von verschiedenen Lipasen gegenüber Triacylglyceriden und Analoga durch dasselbe Modell und denselben Parameter beschrieben werden kann (Scheib 1999), deuten die Resultate dieser Arbeit darauf hin, dass die Eigenschaften wie zum Beispiel die Enantioselektivität von Lipasen sich nicht generell anhand des selben Modells erklären lassen. Vielmehr scheinen die molekularen Ursachen der Enantioselektivität von Lipasen nicht zwangsläufig verallgemeinerbar und auf andere Lipasen übertragbar zu sein. Dies konnte auch schon für die Enantioselektivität der CRL, PPL, RML, CAL-B und PCL gegenüber primären Alkoholen in dieser Arbeit gezeigt werden. Die für die Enantioselektivität der PCL, RML und CAL-B essentielle Bindung des großen Substituenten im *His gap* konnte für die CRL und PPL nicht beobachtet werden. In der CRL binden die enantioselektiv umgesetzten Substrate in einer anderen Bindungstaschenregion. Dies wirft die Frage auf, ob sich diese unterschiedlichen Eigenschaften allein auf die Größe und Konformation der Bindungstaschen zurückführen lassen. Da für die Modelle zur Beschreibung der Enantioselektivität der beiden Lipasen gegenüber den zwei untersuchten Substratklassen in jedem Falle bestimmte Bindungstaschenregionen entscheidend sind, deutet vieles darauf hin. Dies konnte auch ansatzweise durch die Untersuchung der Enantioselektivität gegenüber Substrat **D** und **E** mit diesen beiden und weiteren Lipasen in dieser Arbeit gezeigt werden.

## 6 AUSBLICK

Durch diese Arbeit konnten die molekularen Ursachen der Enantioselektivität von *Pseudomonas cepacia* Lipasen bei der Umsetzung von primären Alkoholen und von *Candida rugosa* Lipase bei der Veresterung von Carbonsäuren identifiziert und durch einfache geometrische Größen (Torsionswinkel  $\Phi_{\text{Oalk.-C}}$ ,  $\Phi_{\text{Ctet.-C}^*}$  und Abstand  $d_{\text{HN}_\epsilon\text{-OAlk.}}$ ) beschrieben werden. Eine Erweiterung des bestehenden Modells zur Vorhersage und Beschreibung der Enantioselektivität von PCL gegenüber primären Alkoholen auf weitere Lipasen auch geringerer Sequenzähnlichkeit war nur teilweise möglich. Die Übertragung des Modells auf die Enantioselektivität von CAL-B und RML war möglich, da diese beiden Lipasen auch Enantioselektivität gegenüber Substraten zeigen, die im *His gap* binden. Andere Lipasen besitzen entweder keine ausreichende Enantioselektivität oder im Falle der CRL und PPL zeigen sie einen anderen Bindungsmodus auf. Es ist somit nicht möglich, ein etabliertes Modell auf alle Lipasen generell zu übertragen.

Die gleichen Einschränkungen gelten auch für das Modell zur Vorhersage und Beschreibung der Enantioselektivität der CRL gegenüber chiralen Carbonsäuren. Dies konnte schon durch die nur bedingte Übertragbarkeit des Modells auf die PCL katalysierte Umsetzung von Carbonsäuren gezeigt werden.

Bisher können durch das festgehaltene Rückgrat der Lipase auch nur Änderungen der Enantioselektivität von Mutationen beschrieben werden, die im unmittelbaren Kontakt mit dem Substrat stehen. Da aber auch in verschiedenen Arbeiten gezeigt wurde, dass Mutationen außerhalb der Bindungstasche die Enantioselektivität beeinflussen können, sollte die Simulationsmethodik erweitert werden. Darin sollten dann Lösungsmittel und die Dynamik des Proteins mit berücksichtigt werden, damit auch die Effekte der Mutanten außerhalb der Bindungstasche untersucht werden können. Für solche Simulationen sind andere, als in dieser Arbeit verwendete Simulationsprogramme und Simulationsstrategien erforderlich. Die Berechnung von Lösungsmittelleffekten erhöht die benötigte Rechenzeit, da durch das Lösungsmittel zusätzlich Atome im System enthalten sind. Um die Dynamik von Proteinen zu untersuchen, müssen Simulationen von bis zu 10 ns durchgeführt werden. Durch diese beiden Faktoren wird die Rechenzeit wesentlich länger sein, als bei den Simulationen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten wurden. Durch die ständige Weiterentwicklung der Prozessoren und der Möglichkeit der Cluster-Bildung sollte dies aber in Zukunft keine Einschränkung mehr darstellen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Ahmed, S. N., Kazlauskas, R. J., Morinville, A. H., Grochulski, P., Schrag, J. D. und Cygler, M. (1994). "Enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward carboxylic acids: A predictive rule from substrate mapping and x-ray crystallography." *Biocatalysis* **9**(1-4): 209-225.

Ahmed, S. N., Kazlauskas R. J. (1995). "A 2-Propranol Treatment Increases the Enantioselectivity of *Candida rugosa* Lipase toward Esters of Chiral Carboxylic Acids." *J. Org. Chem.* **60**: 212-217.

Alberghina, L., Schmid, R. D. und Verger, R., Eds. (1991). *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. GBF Monographs. Weinheim, VCH.

Andreoli, P. M., Cox, M. M. J., Farin, F. und Wohlfahrt, S. (1989). *Molecular cloning and expression of genes encoding lipolytic enzymes*. EU.

Aoyama, S., Yoshida, N. und Inouye, S. (1988). "Cloning, sequencing and expression of the lipase gene from *Pseudomonas fragi* IFO-12049 in *E. coli*." *FEBS Lett* **242**(1): 36-40.

Bairoch, A. und Apweiler, R. (1997). "The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL." *Nucleic Acids Res.* **25**(1): 31-6.

Bairoch, A. und Apweiler, R. (1999). "The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1999." *Nucleic Acids Res.* **27**: 49-54.

Balkenhohl, F., Ditrich, K., Hauer, B. und Ladner, W. (1997). "Optically active amines via lipase-catalyzed methoxyacetylation." *J. Prakt. Chem.* **339**: 381-384.

Barrett, A. J. (1995). "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 2: corrections and additions (1994)." *Eur J Biochem* **232**(1): 1-6.

Barrett, A. J. (1996). "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 3: corrections and additions (1995)." *Eur J Biochem* **237**(1): 1-5.

Barrett, A. J. (1997). "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions (1997)." *Eur J Biochem* **250**(1): 1-6.

Barton, P., Laws, A. P. und Page, M. I. (1994). "Structure -activity relationships in the esterase -catalyzed hydrolysis and transesterification of esters and lactones." *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2**(9): 2021-2029.

Batenburg, A. M., Egmond, M. R., Frenken, L. G. J. und Verrips, C. T. (1991). *Lipases with improved stability and enzymatic detergent compositions*. *Eur. Pat. Appl.* EP, Unilever PLC, UK; Unilever N. V.

Beer, H. D., Wohlfahrt, G., McCarthy, J. E. G., Schomburg, D. und Schmid, R. D. (1996). "Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants." *Protein Eng.* **9**(6): 507-17.

Belev, T. N., Singh, M. und McCarthy, J. E. G (1991). "A fully modular vector system for the optimization of gene expression in *Escherichia coli*." *Plasmid* **26**(2): 147-150.

Berglund, P., Voerde, C., Hoegberg, H.-E. (1994). "Esterification of 2-methylalkanoic acids catalyzed by lipase from *Candida rugosa*: enantioselectivity as a function of water activity and alcohol chain length." *Biocatalysis* **9**: 123-130

Berlitz, H. D., Grosch, W. (1992). "Lehrbuch der Lebensmittelchemie" Springer Verlag

- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer Jr., E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. und Tasumi, M. (1977). "The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures." J. Mol. Biol. **112**: 525-542.
- Berry, D. R. und Paterson, A. (1990). Enzymes in the food industry. Enzyme Chemistry. C. J. Suckling. London, Chapman and Hall: 306-351.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.
- Boland, W., Frössl, C. und Lorenz, M. (1991). "Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis." Synthesis **12**: 1049-1072.
- Borgstrom, B. und Brockman, H. L. (1984). Lipases. New York, Elsevier Science Publishing Co.
- Bornscheuer, U. T. und Kazlauskas, R. J. (1999). Hydrolases in Organic Synthesis - Regio- and Stereoselective Biotransformations. Weinheim, Wiley-VCH.
- Bott, R., Shield, J. W. und Poulouse, A. J. (1994). Protein engineering of lipases. Lipases. P. Wolley und S. B. Petersen: 337-354.
- Botta, M., Cernia, E., Corelli, F., Manetti, F. und Soro, S. (1997). "Probing the substrate specificity for lipases. II. Kinetic and modeling studies on the molecular recognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei* lipases." Biochimica et Biophysica Acta **1337**: 302-310.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Hüge-Jensen, B., Norskov, L. und et al. (1990). "A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase." Nature **343**(6260): 767-770.
- Brocca, S., Schmidt-Dannert, C., Lotti, M., Alberghina, L. und Schmid, R. D. (1998). "Design, total synthesis and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase." Prot. Sci. **7**: 1415-1422.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Hüge-Jensen, B., Patkar, S. A. und Thim, L. (1991). "A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex." Nature **351**(6326): 491-494.
- Burgess, K. und Jennings, L. D. (1991). "Enantioselective esterifications of unsaturated alcohols mediated by a lipase prepared from *Pseudomonas* sp." J. Am. Chem. Soc. **113**: 6129-6139.
- Cambillau, C., Bourne, Y., Egloff, M. P., Martinez, C. und van Tilbeurgh, H. (1997). "Pancreatic lipases and their complexes with colipases and inhibitors: crystallization and crystal packing." Methods Enzymol **284**: 107-119.
- Carrea, G., deAmici, M., DeMicheli, C., Liverani, P., Carnielli, M., Riva, S. (1993). "Nitrile oxides in medicinal chemistry. Lipase PS-catalyzed resolution of a set of heterocyclic derivatives." Tetrahedron: Asymmetry **4**(5): 1063-1072.
- Carter, P. und Wells, J. (1988). "Dissecting the catalytic triad of a serine protease." Nature **322**(6164): 564-568.
- Cheetham, P. S. J. (1993). "The use of biotransformations for the production of flavors and fragrances." Trends Biotechnol. **11**: 478-488.
- Chen, C. S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G. und Sih, C. J. (1982). "Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers." J. Am. Chem. Soc. **104**: 7294-7299.
- Chen, C.-S. und Sih, C. J. (1989). "Enantioselective biocatalysis in organic solvents. Lipase catalyzed reactions." Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **28**: 695-707.

- Chen, C. S., Wu, S. H., Girdaukas, G. und Sih, C. J. (1987). "Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. Enzyme-catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems." J. Am. Chem. Soc. **109**: 2812-2817.
- Chenevert, R. und Martin, R. (1992). "Enantioselective synthesis of (+) and (-)-*cis*-3-aminocyclopentane carboxylic acids by enzymatic asymmetric synthesis." Tetrahedron: Asymmetry **3**: 199-200.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H. (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2172-2175.
- Chung, G. H., Lee, P. Y., Yoo, O. J. und Rhee, J. S. (1991). "Overexpression of a thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* in *Escherichia coli*." Appl. Microbial. Biotechnol. **35**: 237-241.
- Clark, M., Cramer, R. D., III. und van Opdenbosch, N. (1989). "Validation of the general purpose TRIPOS 5.2 force field." J. Comp. Chem. **10**(8): 982-1012.
- Cleasby, A., Garman, E., Egmond, M. R., Batenburg, M. (1992) „Crystallization and preliminary X-ray study of a lipase from *Pseudomonas glumae*.“ J. Mol. Biol. **5**,224(1):281-282
- Coleman, M. H. und Macrae, A. R. (1977). Rearrangement of fatty acid esters in fat reaction reactants. Deutschland, Unilever N.V.
- Colton, I. J., Ahmed, S. N. und Kazlauskas, R. J. (1995). "A 2-Propanol Treatment Increases the Enantioselectivity of *Candida rugosa* Lipase toward Esters of Chiral Carboxylic Acids." J. Org. Chem. **60**(1): 212-217.
- Connolly, M. L. (1983). "Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids." Science **221**(4612): 709-713.
- Craik, C. S., Rocznik, S., Largman, C. und Rutter, W. J. (1987). "The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases." Science **237**: 909-913.
- Cygler, M., Grochulski, P., Kazlauskas, R. J., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Rubin, B., Serreqi, A. N. und Gupta, A. K. (1994). "A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases." J. Am. Chem. Soc. **116**(8): 3180-3186.
- Cygler, M., Grochulski, P. und Schrag, J. D. (1995). "Structural determinants defining common stereoselectivity of lipases toward secondary alcohols." Can. J. Microbiol. **41**(Suppl. 1): 289-296.
- Cygler, M., Schrag, J. D., Sussman, J. L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M. K. und Doctor, B. P. (1993). "Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins." Protein Sci. **2**(3): 366-382.
- Daggett, V., Schröder, S. und Kollman, P. (1991). J. Am. Chem. Soc. **113**: 8926-8931.
- Dalbadie-McFarland, G., Cohen, L. W., Riggs, A. D., Morin, C., Itakura, K. und Richards, J. H. (1982). "Oligonucleotide-directed mutagenesis as a general and powerful method for studies of protein function." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**(21): 6409-6413.
- Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M. und Derewenda, Z. S. (1992). "Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase." Biochemistry **31**(5): 1532-1541.
- Derewenda, U., Swenson, L., Wei, Y., Green, R., Kobos, P. M., Joerger, R., Haas, M. J. und Derewenda, Z. S. (1994). "Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*." J. Lipid Res. **35**(3): 524-534.
- Derewenda, Z. S., Derewenda, U. und Dodson, G. G. (1992). "The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution." J. Mol. Biol. **227**(3): 818-839.
- Derewenda, Z. S., Lee, L. und Derewenda, U. (1995). "The occurrence of C-H...O hydrogen bonds in proteins." Journal of Molecular Biology **252**: 248-262.



- Derewenda, Z. S. und Sharp, A. M. (1993). "News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases." trends Biochim. Sci. **18**(Jan): 20-25.
- DeTar, D. F. (1981). "Computation of enzyme-substrate specificity." Biochemistry **20**(7): 1730-43.
- Dewar, M. J. S. und Thiel, W. (1977). "Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximation and parameters." J. Am. Chem. Soc. **99**: 4907-4917.
- Dewar, M. J. S. und Thiel, W. (1977). "Ground states of molecules.39. MNDO results for molecules containing hydrogen, carbon, nitrogen and oxygen." J. Am. Chem. Soc. **99**: 4899-4907.
- Dodson, G. und Wlodawer, A. (1998). "Catalytic triads and their relatives." Trends Biochem. Sci. **23**: 347-352.
- Egri, G., Baitzacs, E. und Pope, L. (1996). "Kinetic resolution of 2-acylated-1,2-diols by lipase-catalyzed enantiomer selective acylation." Tetrahedron: Asymmetry **7**: 1437-1448.
- Ema, T., Kobayashi, J., Maeno, S., Sakai, T. und Utaka, M. (1998). "Origin of the enantioselectivity of lipases explained by a stereo-sensing mechanism operative at the transition state." Bull Chem Soc Jpn **71**: 443-453.
- Faber, K. (1997). Biotransformations in organic chemistry. Heidelberg Berlin, Springer-Verlag.
- Faber, K. und Riva, S. (1992). "Enzyme-catalyzed irreversible acyl transfer." Syntheses: 895-910.
- Freeman, M., Baehler, C. und Spotts, S. (1990). "Automated laser-fluorescence sequencing." Biotechnology (N Y) **8**(2): 147-148.
- Frenken, L. G. J., Egmond, M. R., Batenburg, A. M. und Verrips, C. T. (1993). "Pseudomonas glumae lipase: increased proteolytic stability by protein engineering." Protein Eng. **6**(6): 637-642.
- Gasteiger, J. und Marsili, M. (1980). "Iterative partial equalization of orbital electronegativity - rapid access to atomic charges." Tetrahedron **36**: 3219-3288.
- Gaziola, L., Bornscheuer, U. und Schmid, R. D. (1996). "A rapid and effective separation of enantiomers of glycerol derivatives by gas chromatography and their lipase-catalyzed biotransformation." Enantiomer **1**(1): 49-54.
- Gelin, B. R. und Karplus, M. (1979). "Side-chain torsional potentials: effect of dipeptide, protein, and solvent environment." Biochemistry **18**(7): 1256-1268.
- Gilbert, E. J. (1993). "Pseudomonas lipases: Biochemical properties and molecular cloning." Enzyme Microb. Technol. **15**: 634-645.
- Gilbert, E. J., Cornish, A. und Jones, C. W. (1991). "Purification and properties of extracellular lipase from Pseudomonas aeruginosa EF2." J. Gen. Microbiol. **137**: 2223-2229.
- Goodford, P. J. (1985). "A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules." J. Med. Chem. **28**: 849-857.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B. und Cygler, M. (1993). "Insights into interfacial activation from an open structure of Candida rugosa lipase." J. Biol. Chem. **268**(17): 12843-12847.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D. und Cygler, M. (1994). "Two conformational states of Candida rugosa lipase." Protein Sci. **3**(1): 82-91.
- Gupta, A. K. und Kazlauskas, R. J. (1993). "Substrate modification to increase the enantioselectivity of hydrolases. A route to optically-active cyclic allylic alcohols." Tetrahedron: Asymmetry **4**(5): 879-888.
- Haas, M. J. und Joerger, R. D. (1995). Lipases of the Genera Rhizopus and Rhizomucor: Versatile Catalysts in Nature and the Laboratory. Food Biotechnology

Microorganisms. Y. H. Hui und G. G. Khachatourians, VCH: 549-588.

Haeffner, F., Norin, T. und Hult, K. (1998). "Molecular modeling of the enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterification reactions." Biophysical Journal **74**: 1251-1262.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.

Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M. D., Cortopassi, G. und Galas, D. J. (1989). "A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction." Nucleic Acids Res. **17**(16): 6545-6551.

Hermoso, J., Pignol, D., Kerfelec, B., Crenon, I., Chapus, C., Fontecilla-Camps, J.C. (1996). "Lipase activation by nonionic detergents. The crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol monoethyl ether complex." J Biol Chem **271** (30): 18007-18016

Holmberg, E., Holmquist, M., Hedenstrom, E., Berglund, P., Norin, T., Hoegberg, H.E., Hult, K. (1992). "Reaction conditions for the resolution of 2-methylalkanoic acids in esterification and hydrolysis with lipase from *Candida cylindracea*." Appl. Microbiol. Biot. **35**: 572-578

Holmquist, M., Martinelle, M., Berglund, P., Clausen, I. G., Patkar, S., Svendsen, A. und Hult, K. (1993). "Lipases from *Rhizomucor miehei* and *Humicola lanuginosa*: modification of the lid covering the active site alters enantioselectivity." J. Protein Chem. **12**(6): 749-757.

Holmquist, M., Norin, M. und Hult, K. (1993). "The role of arginines in stabilizing the active open-lid conformation of *Rhizomucor miehei* lipase." Lipids **28**(8): 721-726.

Holmquist, M. H., F.; Norin, T.; Hult, K. (1996). "A structural basis for enantioselective inhibition of *Candida rugosa* lipase by long-chain aliphatic alcohols." Prot. Sci. **5**: 83-88.

Holzwarth, H.-C., Pleiss, J. und Schmid, R. D. (1997). "Computer aided modeling of *Rhizopus oryzae* lipase catalyzed stereoselective hydrolysis of triglycerides." J. Mol. Catal. B: Enzym. **3**: 73-82.

Hom, S. S. M. und Mielenz, J. R. (1991). *Pseudomonas* lipase gen, vectors for the expression thereof, production of the lipase by transformed microorganisms and uses for this enzyme. EP, HENKEL RESEARCH CORP (US).

Hom, S. S. M., Scott, E. M., Atchison, R. E., Picataggio, S. und Mielenz, J. R. (1991). "Characterization and over-expression of a cloned *Pseudomonas* lipase gene." GBF Monogr. **16**: 267-270.

Hu, C.-H., K. Hult (1998). "Ab initio and density functional theory studies of the catalytic mechanism for ester hydrolysis in serine hydrolases." International Journal of Quantum Chemistry **69**: 889-903.

Hult, K. und Norin, T. (1993). "Enantioselectivity of some lipases, control and prediction." Indian J. Chem. B **32B**(1): 123-126.

Ihara, F., Kageyama, Y., Hirata, M., Nihira, T. und Yamada, Y. (1991). "Purification, characterization, and molecular cloning of lactonizing lipase from *Pseudomonas* species." J. Biol. Chem. **266**: 18135-18140.

Ihara, F., Okamoto, I., Nihira, T. und Yamada, Y. (1992). "Requirement in trans of the downstream *limL* gene for activation of lactonizing lipase from *Pseudomonas* sp. 109." J. Ferment. Bioeng. **73**(5): 337-342.

Iizumi, T., Nakamura, K., Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y. und Fukase, T. (1991). "Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase and its activator genes from *Pseudomonas* sp. KWI-56." Agric. Biol. Chem. **55**(9): 2349-2357.

Jaeger, K.-E., Adrian, F.-J., Meyer, H. E., Hancock, R. E. W. und Winkler, U. K. (1992). "Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* is an amphiphilic protein." Biochim. Biophys. Acta **1120**: 315-321.

Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., van Heuvel, C., Colson, M. und Misset, O. (1994). "Bacterial lipases." FEMS Microbiol. Rev. **15**(1): 29-63.

- Jandacek, R., Whiteside, J. A., Holcombe, B. N., Volpenheim, R. A. und Taulbee, J. D. (1987). "The rapid hydrolysis and efficient absorption of triglycerides with octanoic acid in the 1 and 3 positions and long-chain fatty acid in the 2 position." Am. J. Clin. Nutr. **45**: 940-945.
- Janssen, A. J. M., van der Padt, A. und Zwanenburg, B. (1991). "Resolution of secondary alcohols by enzyme-catalyzed transesterification in alkyl carboxylates as the solvent." Tetrahedron **47**: 7645-7662.
- Johnson, L. A., Beacham, I. R., MacRae, I. C. und Free, M. L. (1992). "Degradation of triglycerides by a pseudomonad isolated from milk: molecular analysis of a lipase-encoding gene and its expression in *Escherichia coli*." Appl Environ Microbiol **58**(5): 1776-9.
- Jorgensen, S., Skov, K. und Diderichsen, B. (1991). "Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes." J. Bacteriol. **173**(2): 559-567.
- Kabsch, W. und Sander, C. (1983). "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features." Biopolymers **22**(12): 2577-637.
- Karlson P., Doenecke, D. Koolman, J. (1994). "Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler" Georg Thieme Verlag
- Kazlauskas, R. J. (1994). "Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties." Trends Biotechnol. **12**(11): 464-472.
- Kazlauskas, R. J. und Bornscheuer, U. T. (1998). Biotransformations with lipases. Weinheim, New York, Wiley-VCH.
- Kazlauskas, R. J., Weissfloch, A. N. E., Rappaport, A. T. und Cuccia, L. A. (1991). "A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*." J. Org. Chem. **56**(8): 2656-2665.
- Kim, J.-H., Uzawa, H., Nishida, Y., Ohru, H. und Meguro, H. (1994). "Highly sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of the absolute configuration and the optical purity of di-O-acylglycerols using a chiral derivatizing agent, (S)-(+)-2-tert.-butyl-2-methyl- 1,3-benzodioxole-4-carboxylic acid." J. Chromatogr., A **677**(1): 35-43.
- Kim, M. J. und Cho, H. (1992). "Pseudomonas lipases as catalysts in organic synthesis: specificity of lipoprotein lipase." J. Chem. Soc., Chem. Commun.(19): 1411-1413.
- King, D. M. und Padley, F. B. (1990). Milk fat substitutes. EU, Unilever plc.
- Kohno, M., Funatsu, J., Mikami, B., Kugimiya, W., Matsuo, T. und Morita, Y. (1996). "The crystal structure of lipase II from *Rhizopus niveus* at 2.2 Å resolution." J. Biochem. (Tokyo) **120**(3): 505-510.
- Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D. und Schmid, R. D. (1991). "Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data." Journal of Bacteriology **173**(15): 4836-4841.
- Kossiakoff, A. M. und A., S. S. (1981). "Directed determination of protonation states of aspartic acid-102 and histidine-57 in tetrahedral intermediate of serine proteases: neutron structure of trypsin." Biochemistry **20**: 6462-6476.
- Krebsfänger, N., Schierholz, K. und Bornscheuer, U. T. (1998). "Enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens* towards alcohols and carboxylic acids." J. Biotechnol. **60**: 105-111.
- Kugimiya, W., Otani, Y., Hashimoto, Y. und Takagi, Y. (1986). "Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from *pseudomonas fragi*." Biochem. Biophys. Res. Commun. **141**: 185-190.
- Kurita, S. U., Yamada, T., Kuwata, S., Miyazawa, T. (1992). "Resolution of racemic carboxylic acids via the lipase-catalyzed irreversible transesterification using vinyl esters; effects of alcohols as nucleophiles and organic solvents on enantioselectivity." Biotechnol. Lett. **14**(10): 941-946.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-685.
- Lang, D. A., Mannesse, M. L., de Haas, G. H., Verheij, H. M. und Dijkstra, B. W. (1998). "Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase." Eur J Biochem **254**(2): 333-340.
- Laumen, K. E. (1987). Esterhydrolasen - Anwendung in der organischen Synthese: chirale Bausteine aus Estern prochiraler und racemischer Alkohole. Wuppertal, Bergische Universität.
- Lotti, M., Grandori, R., Fusetti, F., Longhi, S., Brocca, S., Tramontano, A. und Alberghina, L. (1993). "Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences." Gene **124**: 45-55.
- Luria, S. E., Adams, J. N. und Ting, R. C. (1960). "Transduction of lactose utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transduction phage particle." Virology **12**: 348-390.
- Lutz, D., Huffer, M., Gerlach, D. und Schreier, P. (1992). Carboxylester-lipase mediated reactions. Flavor Precursors: Thermal and Enzymatic Conversions. R. Teranishi, G. R. Takeoka und M. Guentert. Washington D.C., American Chemical Society: 32-45.
- M. Norin, K. H., A. Mattson, T. Norin (1993). "Molecular modeling of chymotrypsin-substrate interactions: calculation of enantioselectivity." Biocatalysis **7**: 131-147.
- Martinelle, M., Holmquist, H., Clausen, I. G., Patkar, S., Svendsen, A. und Hult, K. (1996). "The role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase." Protein Eng. **9**(6): 519-24.
- Martinez, C., de Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G. und Cambillau, C. (1992). "Fusarium solani cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent." Nature **356**: 615-618.
- Martinez, C., Nicolas, A., van Tilbeurgh, H., Egloff, M.-P., Cudrey, C., Verger, R. und Cambillau, C. (1994). "Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole." Biochemistry **33**(1): 83-89.
- Matsuo, T., Sawamura, N., Hashimoto, Y. und Hashida, W. (1981). The enzyme and method for enzymatic transesterification of lipid. EU, Fuji Oil Co.
- Miyazawa, T., Kurita, S., Ueji, S., Yamada, Y., Kuwata, S. (1992). "Resolution of racemic carboxylic acids via the lipase-catalyzed irreversible transesterification using vinyl esters: effects of alcohols as nucleophiles and organic solvents on enantioselectivity." Biotechnol. Lett. **14**: 941-946
- Monecke, P., Friedemann, R., Naumann, S. und Csuk, R. (1998). "Molecular modelling studies on the catalytic mechanism of *Candida rugosa* lipase." J. Mol. Model. **4**: 395-404.
- Morgenstern, B., Dress, A. und Werner, T. (1996). "Multiple DNA and protein sequence alignment based on segment-to-segment comparison." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12098-12103.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **51**(Pt 1): 263-273.
- Naemura, K. (1994). "Stereoselectivity of enzymatic hydrolyses and acylations." Yuki Gosei Kagaku Kyokaiishi.
- Naemura, K., Fukuda, R., Murata, M., Konishi, M., Hirose, K. und Tobe, Y. (1995). "Lipase YS-catalyzed enantioselective acylation of alcohols: a predictive active site model for lipase YS to identify which enantiomer of an alcohol reacts faster in this acylation." Tetrahedron: Asymm. **6**(9): 2385-2394.
- Naemura, K., Fukuda, R., Takahashi, N., Konishi, M., Hirose, Y. und Tobe, Y. (1993). "Enzyme-catalyzed asymmetric acylation and hydrolysis of cis-2,5-disubstituted tetrahydrofuran derivatives: contribution to development of models for reactions catalyzed by porcine liver esterase and porcine pancreatic lipase." Tetrahedron-Asymmetr **4**(5): 911-918.
- Naemura, K., Ida, H. und Fukuda, R. (1993). "Lipase YS-catalyzed enantioselective transesterification of alcohols of bicarbocyclic compounds." Bull. Chem. Soc. Jpn. **66**: 573-577.

- Naemura, K., Kittaka, K., Murata, M., Ida, H. und Hirose, H. (1996). "Lipase-catalyzed enantioselective alcoholysis of enol acetates: optical resolution of ketones and aldehydes using lipases in organic solvents." Enantiomer **1**(3): 219-222.
- Naemura, K., Murata, M., Tanaka, R., Yano, M., Hirose, K. und Tobe, Y. (1996). "Enantioselective acylation of primary and secondary alcohols catalyzed by lipase QL from *Alcaligenes* sp.: a predictive active site model for lipase QL to identify which enantiomer of an alcohol reacts faster in this acylation." Tetrahedron: Asymmetry **7**(11): 3285-3294.
- Nakanishi, J., Kurono, Y., Koide, Y. und Beppu, T. (1989). Recombinant manufacture of *Pseudomonas cepacia* lipase using a *Pseudomonas* host. Eur. Pat. Appl. EP, Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Japan.
- Nakanishi, Y., Watanabe, H., Washizu, K., Narahashi, Y. und Kurono, Y. (1991). "Cloning, sequencing and regulation of the lipase gene from *Pseudomonas* sp. M-12-33." GBF Monogr. **16**: 263-266.
- Nielsen, T. (1985). "Industrial application possibilities for lipase." Fette-Seifen-Anstrichm. **87**(1): 15-19.
- Nishioka, T., Chihara-Shiomi, M., Yoshikawa, K., Inagaki, M., Yamamoto, Y., Hiratake, J., Baba, N. und Oda, J. (1991). "Lipase from *Pseudomonas* sp.: Reactions, cloning, and amino acid sequence analysis." GBF Monogr. **16** (Lipasen).
- Norin, M., Haeffner, F., Achour, A., Norin, T. und Hult, K. (1994). "Computer modeling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa*, and *Candida rugosa*." Protein Sci. **3**(9): 1493-1503.
- Novo-Nordisk (1998). "LipoPrime™ works faster." BioTimes **3**(9).
- Novozymes (2000). "Annual Report 2000." Baegsvaerd, Novozymes.
- O'Hagan, D., Rzepa, H. S. (1994). "Stereolectronic influence of fluorine in enzyme resolution of  $\alpha$ -fluoroesters." J. Chem. Soc., Perkin Trans. **2**: 3-4
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J. D., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G. und Goldman, A. (1992). "The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold." Protein Eng. **5**(3): 197-211.
- Orrenius, C., van Heusden, C., van Ruiten, J., Overbeeke, P. L., Kierkels, H., Duine, J. A. und Jongejan, J. A. (1998). "Simple conformation space search protocols for the evaluation of enantioselectivity of lipases [In Process Citation]." Protein Eng. **11**(12): 1147-1153.
- Orrenius, O., Oehrner, N., Rotticci, D., Mattson, A., Hult, K. und Norin, T. (1995). "Candida antarctica lipase B catalyzed kinetic resolutions: substrate structure requirements for the preparation of enantiomerically enriched secondary alcohols." Tetrahedron-Asymmetry **6**(5): 1217-1220.
- Peled, N. und Krenz, M. C. (1981). "A new assay of microbial lipases with emulsified trioleoyl glycerol." Anal. Biochem. **112**: 219-222
- Persichetti, R., Lalonde, J. J., Govardhan, C. P., Khalaf, N. K., Margolin, A. L. (1996). "*Candida rugosa* lipase - enantioselectivity enhancements in organic solvents." Tetrahedron Lett. **37**: 6507-6510
- Peters, G. H., Olsen, O. H., Svendsen, A. und Wade, R. C. (1996). "Theoretical investigation of the dynamics of the active site lid in *Rhizomucor miehei* Lipase." Biophys. J. **71**(1): 119-129.
- Peters, G. H., Toxvaerd, S., Olsen, O. H. und Svendsen, A. (1997). "Computational studies of the activation of lipases and the effect of a hydrophobic environment." Protein Engineering **10**(2): 137-147.
- Pleiss, J. (1990). Gleichgewichtsdynamik und Konformationsübergänge helikaler Peptide. Eine moleküldynamische Untersuchung. Tübingen, Universität Tübingen.
- Pleiss, J., Fischer, M., Peiker, M., Thiele, C. und Schmid, R. D. (2000). "Lipase Engineering Database - Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships." J. Mol. Catal. B-Enzym. **10**: 491-508.

- Pleiss, J., Fischer, M. und Schmid, R. D. (1998). "Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site." Chem. Phys. Lipids **93**(1-2): 67-80.
- Pleiss, J., Scheib, H. & Schmid, R. D. (2000) The *His gap* motif - a structural determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogues, Biochimie **82**, 1043-1052.
- Powell, M. J. D. (1977). "Restart Procedures for the Conjugate Gradient Method." Mathematical Programming **12**: 241-254.
- Press, W. H., Flannery, B. P., Teukolsky, S. A. und Vetterling, W. T. (1988). Simplex. Numerical recipes in C. The art of scientific programming. Cambridge, Cambridge University Press: 312-327.
- Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A. und Baumeister, K. (1987). "A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides." Science **238**(4825): 336-341.
- Prompers, J. J., Groenewegen, A., Van Schaik, R. C., Pepermans, H. A. und Hilbers, C. W. (1997). "1H, 13C, and 15N resonance assignments of *Fusarium solani pisi* cutinase and preliminary features of the structure in solution." Protein Sci. **6**: 2375-2384.
- Quinlan, P. und Moore, S. (1993). "Modification of triglycerides by lipases: Process technology and its application to the production of nutritionally improved fats." INFORM **4**: 580-585.
- Quyen, D. T., Schmidt-Dannert, C. und Schmid, R. D. (1999). "High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid *in vitro* refolding." Appl. Environ. Microbiol. **65**(2): 787-794.
- Ransac, S., Carrière, F., Rogalska, E., Verger, R. und Marguet, F. (1996). The kinetics, specificities and structural features of lipases. Molecular Dynamics of Biomembranes. J. A. F. op den Kamp. Heidelberg; Berlin, Springer-Verlag. **H96**: 254-304.
- Rao, S. N., Singh, U. C., Bash, P. A. und A., K. P. (1987). "Free energy perturbation calculations on binding and catalysis after mutating Asn 155 in subtilisin." Nature **328**: 551-554.
- Raza, S., Fransson, L., Hult, K. (2001). "Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase: A molecular dynamic study." Prot. Sci. **10**: 329-338
- Righetti, P. G. und Drysdale, J. W. (1974). "Isoelectric focusing in gels." J. Chromatogr. **98**(2): 271-321.
- Roberts, S. M. (1989). "Use of enzymes as catalysts to promote key transformations in organic synthesis." Philos. Trans. R. Soc. London B **324**: 577-587.
- Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F. und Verger, R. (1993). "Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases." Chirality **5**(1): 24-30.
- Rotticci, D., Haeffner, F., Orrenius, C., Norin, T. und Hult, K. (1998). "Molecular recognition of sec-alcohol enantiomers by *Candida antarctica* lipase B." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **169**: 345-356.
- Rotticci, D., Orrenius, C., Hult, K. und Norin, T. (1997). "Enantiomerically enriched bifunctional sec-alcohols prepared by *Candida antarctica* lipase B catalysis. Evidence of non-steric interactions." Tetrahedron: Asymmetry **8**(3): 359-362.
- Roussel, A., Canaan, S., Egloff, M. P., Riviere, M., Dupuis, L., Verger, R. und Cambillau, C. (1999). "Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest." J Biol Chem **274**(24): 16995-7002.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**(12): 5463-5467.

Sarda, L. und Desnuelle, P. (1958). Biochim. Biophys. Acta **30**: 513.

Sariaslani, F. S., Stieglitz, B. und Witterholt, V. G. Enzymic process for the preparation of chiral .alpha.-tertiary carboxylic acid esters. 10 pp. Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 321,496, abandoned. U.S., E. I. Du Pont De Nemours and Company, USA.

Scheib, H. (1997). Molekulardynamische Simulationen und Proteindesign. Institut für Technische Biochemie. Stuttgart, Universität Stuttgart.

Scheib, H. (1999). "Untersuchungen zur Regio- und Stereoselektivität von Lipasen durch computergestütztes molecular modeling und molekularbiologische Methoden." Stuttgart, Universität Stuttgart (Doktorarbeit Fakultät Chemie).

Scheib, H., Pleiss, J., Kovac, A., Paltauf, F. und Schmid, R. D. (1999). "Stereoselectivity of Mucorales lipases - a simple solution to a complex problem." Prot. Sci. **8**(1): 215-221.

Scheib, H., Pleiss, J., Stadler, P., Kovac, A., Potthoff, A. P., Haalck, L., Spener, F., Paltauf, F. und Schmid, R. D. (1998). "Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward triacylglycerols." Protein Eng. **11**(8): 675-682.

Schmid, R. D. und Verger, R. (1998). "Lipases: interfacial enzymes with attractive applications." Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **37**: 1608-1633.

Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., McNeill, G. P. und Schmid, R. D. (1999). "Highly-selective synthesis of 1,3-oleyl-2-palmitoyl-glycerol by lipase catalysis." Biotechnol. Bioeng.

Schrag, J. D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D. A., Burgdorf, T., Schmid, H.-J., Hecht, R., Schomburg, D., Rydel, T., Oliver, J., Strickland, L., Dunaway, M., Larson, S. und McPherson, A. (1997). "The open conformation of a *Pseudomonas* Lipase." Structure **5**(2): 187-202.

Schrag, J. D., Li, Y., Wu, S. und Cygler, M. (1991). "Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*." Nature **351**(6329): 761-764.

Schulz, T., Pleiss, J. und Schmid, R. D. (2000). "Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: a quantitative model." Protein Sci(6): 1053-1062.

Sheldon, R. A. (1996). Large-scale enzymatic conversions in non-aqueous media. Enzymatic reactions in organic media. A. M. P. Koskinen und A. M. Klibanov. London, Chapman and Hall: 266-307.

Sih, C. J. (1989). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **28**: 695-708.

Soumanou, M. M., Bornscheuer, U., Menge, U. und Schmid, R. D. (1997). "Synthesis of Structured Triglycerides from Peanut Oil with Immobilized Lipase." J. Am. Oil Chem. Soc. **74**(4): 427-433.

Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Menge, U. und Schmid, R. D. (1997). "Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase." J. Am. Oil Chem. Soc. **74**(4): 427-433.

Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T. und Schmid, R. D. (1998). "Two-step enzymatic reaction for the synthesis of pure structured triglycerides." J. Am. Oil Chem. Soc. **75**: 703-710.

Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Schmid, U. und Schmid, R. D. (1998). "Synthesis of structured triglycerides by lipase catalysis." Fett/Lipid **100**: 156-160.

Sprang, J. D., Standing, T., Fletterick, R. J., Stroud, R. M., Finer-Moore, J., Xuong, N. H., Hamlin, R., Rutter, W. J. und Craik, C. S. (1987). "The three-dimensional structure of Asn102 mutant trypsin: role of Asp102 in serine protease catalysis." Science **237**: 905-909.

Stadler, P., Kovac, A., Haalck, L., Spener, F. und Paltauf, F. (1995). "Stereoselectivity of microbial lipases. The substitution at position sn-2 of triacylglycerol analogs influences the stereoselectivity of different microbial lipases." Eur. J. Biochem. **227**(1/2): 335-343.

- Stewart, J. J. P. (1989). "Optimization of parameters for semiempirical methods I. Applications." J. Comp. Chem. **10**: 221-264.
- Stewart, J. J. P. (1989). "Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications." J. Comp. Chem. **10**: 209-220.
- Sybyl6.1 (1994). Command manual. St. Louis, Tripos, Inc.
- Tafi, A., van Almsick, A., Corelli, F., Crusco, M., Laumen, K. E., Schneider, M. P. und Botta, M. (2000). "Computer simulations of enantioselective ester hydrolyses catalyzed by *Pseudomonas cepacia* lipase." J. Org. Chem. **65**: 3659-3665.
- Tan, Y. und Miller, K. J. (1992). "Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52." Appl. Environm. Microbiol. **58**: 1402-1407.
- Terao, Y., Tsuji, K. und Achiwa, K. (1988). "Highly-efficient lipase-catalyzed asymmetric synthesis of chiral glycerol derivatives leading to practical synthesis of (S)-propanolol." Tetrahedron Lett. **29**: 5173-5176.
- Thiem, J. (1995). "Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry." FEMS Microbiol. Rev. **16**: 193-211.
- Tipton, K. F. (1994). "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement: corrections and additions." Eur J Biochem **223**(1): 1-5.
- Tuomi, W. V. und Kazlauskas, R. J. (1999). "Molecular basis for enantioselectivity of lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols. Modeling, kinetics and chemical modification of Tyr29 to increase or decrease enantioselectivity." J. Org. Chem. **64** (8): 2638-2647.
- Uppenberg, J., Ohrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T. und Jones, T. A. (1995). "Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols." Biochemistry **34**: 16838-16851.
- van Gunsteren, W. F. und Berendsen, H. J. C. (1987). Groningen molecular simulation (GROMOS) Library Manual. Groningen, biosmos.
- van Gunsteren, W. F. und Berendsen, H. J. C. (1990). "Computer simulation of molecular dynamics." Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **29**: 992-1023.
- van Gunsteren, W. F. und Berendsen, H. J. C. (1990). "Moleküldynamik-Computersimulationen: Methodik, Anwendungen und Perspektiven in der Chemie." Angew. Chemie **102**: 1020-1055.
- van Tilbeurgh, H., Egloff, M. P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. und Cambillau, C. (1993). "Interfacial activation of lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by x-ray crystallography." Nature **362**(362): 814-820.
- Vasel, B., Hecht, H. J., Schmid, R. D. und Schomburg, D. (1993). "3D-structures of the lipase from *Rhizomucor miehei* at different temperatures and computer modelling of a complex of the lipase with tri-laurylglycerol." J. Biotechnol. **28**(1): 99-115.
- Verger, R. (1997). "'Interfacial activation' of lipases: facts and artefacts." Trends Biotechnol. **15**: 32-38.
- Villeneuve, T. A. F. P. (1997). "Lipase specificities: Potential applications in lipid bioconversions." Inform **8**(6): 640-650.
- Vulfson, E. N. (1994). Industrial applications of lipases. Lipases, Their Structure, Biochemistry and Application. P. Woolley und S. B. Petersen. Cambridge, Cambridge University Press: 271-288.
- Wang, L. L., Lai, Y. Tang (1998). "SCORE: a new empirical method for estimating the binding affinity of a protein-ligand complex." J. Mol. Model. **4**: 379-394.



- Weiner, S. J., Kollman, P. A., Case, D. A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G., Jr., S. P. und Weiner, P. (1984). "A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins." J. Am. Chem. Soc. **106**: 765-784.
- Weissfloch, A. N. E. und Kazlauskas, R. J. (1995). "Enantioference of Lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols." J. Org. Chem. **60**(21): 6959-6969.
- Wells, J. A., Cunnigham, B. C., Graycar, T. P. und Estell, D. A. (1986). Trans. R. Soc. London **317**: 415-420.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A. und Hunziker, W. (1990). "Structure of human pancreatic lipase." Nature **343**: 771-774.
- Winkler, U. K. und Stuckmann, M. (1979). "Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*." J. Bacteriol. **138**: 665-670.
- Wirz, B., Spurr, P. (1995). "Enantio- and regioselective monohydrolysis of diethyl-2-ethoxysuccinate." Tetrahedron Assymetrie **6**: 669-670
- Wohlfarth, S., Hoessche, C., Strunk, C. und Winkler, U. (1992). "Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." J. Gen. Microbiol **138**: 1325-1335.
- Wong, C.-H. (1995). "Enzymatic and chemo-enzymatic synthesis of carbohydrates." Pure Appl. Chem. **67**: 1609-1616.
- Xie, Z. F., Suemune, H. und Sakai, K. (1990). "Stereochemical observation on the enantioselective hydrolysis using *Pseudomonas fluorescens* lipase." Tetrahedron- Asymmetr **1**(6): 395-402.
- Zemlicka, J., Craine, L. E., Heeg, M.-J. und J.P., O. (1988). "Enantioselective Hydrolysis of Dimethyl-2a,3a-[(Dimethylmethylene)dioxy]-5b-hydroxy-1b,4b-cyclopentanedicarboxylate with Pig Liver Esterase. Stereoselective Synthesis of Methyl 2(R),3(S)-[(Dimethylmethylene)dioxy]-5(R)-hydroxy-1(S)-carboxy-4(R)-cyclopentanedicarboxylate. A Cyclopentane Synthone with All Ring Atoms Chiral." J. Org. Chem. **53**: 937-942.
- Zoete, M. C. D., Dalen, A. C. K.-V., Rantwijk, F. V. und Sheldon, R. A. (1994). "A new enzymic reaction: enzyme catalyzed ammonolysis of carboxylic esters." Biocatalysis **10**(1-4): 307-316.
- Zuegg, J., Hönig, H., Schrag, J. D. und Cygler, M. (1997). "Selectivity of lipases: Conformational analysis of suggested intermediates in ester hydrolysis of chiral primary and secondary alcohols." J. Mol. Cat. **3**: 83-98.

## 8 ANHANG

### 8.1 Sequenzen der verwendeten Mutagenese-Primer

*L287W forward*

5'-caa gtg gaa cca ttg gga cga gat caa cc-3'

*L287W revers*

5'-ggg tga tct cgt ccc aat ggt tcc act tg-3'

*L287Y forward*

5'-caa gtg gaa cca tta gga cga gat caa cc-3'

*L287Y revers*

5'-ggg tga tct cgt cct aat ggt tcc act tg-3'

*Y29W forward*

5'-gca ggt gtg ctc gag tgg tgg tac ggg atc cag-3'

*Y29W revers*

5'-ctg gat ccc gat cca cca ctc gag cac acc tgc-3'

## 8.2 Sequenzen der verwendeten Sequenzierprimer

### *PCL-1 forward*

5'-gca gga cgc act gac cac c-3'

### *PCL-2 forward*

5'-gcg gcg acg cgt tat ccg-3'

### *PCL-3 forward*

5'-gct ggc cta cgt gaa gac gg-3'

### *PCL-4 forward*

5'-gct cgc gta cga tcc gac cg-3'

### *PCL-5 forward*

5'-ccg gac gcg gca gcg gca ggc-3'

### *PCL-1 revers*

5'-cga act cgg agc cgc gat gc-3'

### *PCL-2 revers*

5'-cgt cgg cgc gcc ggt ctg gc-3'

### *PCL-3 revers*

5'-cca tca ccg tgc egg tgc cg-3'

### *PCL-4 revers*

5'-ccc ttc acg tgc cgt cat cg-3'

### *PCL-5 revers*

5'-gcc tgc cgc tgc cgc gtc egg-3'

## **LEBENS LAUF**

### **Angaben zur Person:**

Name: Christian Gentner, geb. Glauch  
Geburtsdatum/-ort: 19. Dezember 1968 in Leonberg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet

### **Schulbildung:**

1975 - 1979: Schelling-Grundschule in Leonberg  
1979 - 1981: Albert-Schweizer-Gymnasium in Leonberg  
1981 - 1986: Realschule in Leonberg; Abschluss: Mittlere Reife  
1986 – 1989: Wirtschaftsgymnasium in Leonberg  
28. April 1989: Allgemeine Hochschulreife

### **Zivildienst:**

Januar 1990 - März 1991 Mobiler sozialer Dienst beim Deutschen Roten Kreuz in Leonberg und beim Arbeiter Samariter Bund in Esslingen

### **Wissenschaftliche Ausbildung:**

1992 - 1998 Studium der Lebensmittelchemie an den Universitäten Stuttgart und Hohenheim  
April 1995 Vorprüfung, Universität Stuttgart  
März 1998 Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker (Hauptprüfung Teil A)  
Mai 1998 – April 1999 Praktisches Jahr auf dem CVUA Stuttgart  
Juni 1999 Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker (Hauptprüfung Teil B)  
Juni 1999 – September 2001: Wissenschaftlicher Angestellter der Universität Stuttgart