

**Strukturelle und kinetische Untersuchungen  
zum Mechanismus und Vorhersage der  
stereoselektiven Substraterkennung  
von Lipasen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

**Marco Bocola**

aus Lübeck

Marburg/Lahn 2002

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation am 12.2.2002 angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 12.2.2002

Erstgutachter: Prof. Dr. G. Klebe

Zweitgutachter: PD Dr. B. Hauer

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 1997 bis Februar 2002 am Institut für pharmazeutische Chemie und Biochemie der Philipps-Universität in Marburg / Lahn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Klebe durchgeführt.

Für Denise

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Klebe und Dr. Bernhard Hauer (BASF AG) für die sehr interessante Aufgabenstellung.

Herrn Dr. T. Friedrich, Andreas Schädler und Volker Wengert sowie Dr. Markus Matuschek und Silvia Volkmer-Adamy danke ich für die Ermöglichung der fruchtbaren Aufenthalte und die Unterstützung bei der Fermentation und Reinigung der Lipasen in Ludwigshafen bei der BASF AG.

Herrn Dr. M. T. Stubbs, Dr. Ulrich Graedler und Dr. Andreas Bergner danke ich für Hinweise zum kristallographischen Hintergrund der Arbeit und die anregenden, kritischen Diskussionen.

Herrn Dr. Christoph Sotriffer danke ich für die Einführung und die kritischen Hinweise zur Durchführung und Auswertung der Molekulardynamischen Simulationen und der Konformationssuche.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Klebe für die stetige Diskussionsbereitschaft sowie freundliche Unterstützung und allzeit laufende Computer während dieser Arbeit. Insbesondere allen, die durch gutes Arbeitsklima dazu beigetragen haben, auch die Klippen der Forschung zu umschiffen ohne die Motivation zu verlieren.

The World Is Made Up Of The Wills, The Won'ts, And The Cant's:

The Wills Do Everything,

The Won'ts Do Nothing,

The Can'ts Can't Do Anything.

From Walt Disney's "Black Hole"

But Be Aware Of The Coulds

The Coulds Could Model Everything

From Marco's "Moloc Md-Movie"

## Inhaltsverzeichnis :

1	Einführung.....	1
1.1	Einleitung.....	1
1.2	Motivation.....	3
2.	Biologisches System.....	4
2.1	Eigenschaften von Lipasen.....	4
2.2	Vorkommen von Lipasen.....	5
2.2.1	Lipasebildende Bakterien.....	5
2.2.1.1	Lipasen gram-negativer Bakterien.....	7
2.2.1.2	Lipasen gram-positiver Bakterien.....	7
2.3	Reinigung von Lipasen.....	7
2.4	Enzymmechanismus von Lipasen.....	8
2.4.1	Reaktionsmechanismus einer lipasekatalysierten Reaktion.....	8
2.5	Enzymkinetik.....	11
2.5.1	Kinetischer Enzymmechanismus von Lipasen.....	13
2.5.2	Burst-Kinetik.....	14
2.5.3	Grenzflächenaktivierung.....	15
2.5.4	Aktivitätsbestimmungen.....	17
2.5.5	Inhibition von Lipasen.....	19
2.6	Struktur von Lipasen.....	20
2.6.1	Gemeinsame Raumstruktur der $\alpha/\beta$ Hydrolasen.....	20
2.6.2	Offene und geschlossene Raumstrukturen von Lipasen.....	21
2.6.3	Lipasen mit bekannter Raumstruktur.....	23
3	Kenntnisstand über den Einsatz von Lipasen.....	24
3.1	Pharmazeutische und industrielle Einsatzmöglichkeiten von Lipasen.....	24
3.1.1	Waschmittel.....	24
3.1.2	Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie.....	24
3.1.3	Esterifikation und Interesterifikation.....	25
3.2	Selektivität.....	25
3.2.1	Stereospezifische Katalysen.....	26
3.2.1.1	Kinetische Racematspaltung.....	26
3.2.1.2	Stereospezifität für sekundäre Alkohole.....	29
3.3	Computergestützte Vorhersage der Enantioselektivität.....	31
3.4	Mutagenese von Lipasen.....	33
3.4.1	Gerichtete Mutagenese.....	33
3.4.2	Ungerichtete Mutagenese.....	34

4	Material und Methoden .....	36
4.1	Röntgenstrukturanalyse.....	36
4.1.1	Aufnahme von Röntgendaten.....	37
4.1.2	Erzeugung von Röntgenstrahlen .....	37
4.1.2.1	Röntgeneratore.....	37
4.1.2.2	Synchrotronstrahlung.....	38
4.1.3	Proteinkristallisation.....	39
4.1.3.1	<i>Candida antarctica</i> Lipase B .....	39
4.1.3.2	<i>Burkholderia plantarii</i> Lipase.....	39
4.1.4	Auswertung der Röntgen.....	40
4.1.5	Strukturbestimmung von kleinen organischen Molekülen.....	41
4.1.5.1	Datensammlung .....	41
4.1.5.1	Strukturlösung .....	41
4.2	Proteinreinigung.....	42
4.2.1	<i>Candida antarctica</i> Lipase B .....	42
4.2.2	<i>Burkholderia plantarii</i> Lipase .....	42
4.2.2.1	Wildtyp und Produktionsstamm .....	42
4.2.2.2	Rekombinante Lipase.....	43
4.2.2.3	Chromatofokussierung .....	44
4.2.2.4	Metall-Chelat-Chromatographie .....	44
4.3	Aktivitätsbestimmung und Inhibition.....	45
4.3.1	Tributerintest .....	45
4.3.2	Photometrisches Essay .....	45
4.3.3	Synthese der Inhibitoren.....	46
4.3.3.1	Synthese der Phosphonamide.....	46
4.3.3.2	Synthese der Phosphonester .....	47
4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	48
4.4.1	Absorption bei 280 nm.....	48
4.4.2	BCA-Mikrotiterplatten-Test.....	48
4.5	Transiente Kinetik mittels Stopped-Flow-Spektrofluorometrie .....	48
4.5.1	Aufbau des Messsystems .....	48
4.5.2	Reaktionsbedingungen .....	49
4.6	Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	51
4.6.1	Puffer für SDS-PAGE .....	51
4.6.2	Molekulargewichtsmarker.....	52
4.6.3	Coomassie-Färbung.....	52
4.7	Deglycosylierung .....	52
4.7.1	N-Glycosidase F.....	52
4.7.2	Endoglycosidase H.....	53
4.8	MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	53
4.9	Konformationsanalyse.....	54
4.9.1	Systematische Suche .....	54
4.9.2	Docking mit FLEXX.....	54
4.10	Molekulardynamische Simulationen.....	55
4.10.1	Grundlagen.....	55
4.10.2	Kraftfelder.....	56
4.10.3	Durchführung von Simulationen.....	57
4.10.3.1	Simulation mit MOLOC und MAB .....	57
4.10.4	Auswertung von MD-Simulationen .....	57
4.11	Homologiemodellierung.....	58

5.	Ergebnisse Teil I <i>Candida antarctica</i> Lipase B .....	59
5.1.	Proteinreinigung und Charakterisierung .....	59
5.2	Enzymkinetik .....	62
5.2.1	Michaelis-Menten-Kinetik .....	62
5.2.2	Lösungsmittelabhängigkeit .....	62
5.2.3	Aktivierung von Lipasen durch Detergenzien.....	63
5.2.4	Burst-Kinetik.....	64
5.3	Kinetische Racematspal-tung von Phenylethyl-amin mit CaL B .....	65
5.3.1	Temperaturabhängigkeit der kinetischen Racematspaltung .....	65
5.4	Kovalente Inhibition von Lipasen .....	67
5.4.1	Inhibition von CaL B.....	67
5.4.2	Nachweis der Inhibition von CaL B durch MALDI-TOF MS .....	68
5.5	Kristallstrukturen.....	71
5.5.1	Struktur der Phenylethylamid-Inhibitoren.....	71
5.5.1.1	Struktur des R <sub>p</sub> S <sub>c</sub> -Phenylethylamid-Inhibitor .....	71
5.5.1.2	Struktur des S <sub>p</sub> S <sub>c</sub> -Phenylethylamid-Inhibitor .....	72
5.5.2	Kristallstruktur der CaL B.....	74
5.5.2.1	Apo-Struktur CaL B.....	74
5.5.2.2	Komplex von S <sub>p</sub> R <sub>c</sub> -Phenylethylamid-Inhibitor mit CaL B .....	76
5.5.2.4	Komplex von S <sub>p</sub> S <sub>c</sub> -Phenylethylamid-Inhibitor mit CaL B.....	79
5.6.1	Kraftfeldrechnungen.....	82
5.6.2	Systematische Suche .....	83
5.6.3	Docking mit FLEXX.....	85
5.7	Molekulardynamische Simulationen.....	87
5.7.1	Michaelis-Komplex.....	87
5.7.2	Acyl-Enzym und Amin .....	89
5.7.3	Tetraedrisches Intermediat .....	90
6	Diskussion und Ausblick <i>Candida Antarctica</i> Lip B .....	92
6.1	Reinigung und Kristallisation.....	92
6.2	Untersuchungen zum Katalysemechanismus .....	94
6.3	Komplex-Strukturen mit enantiomerenreinen Inhibitoren .....	98
6.4	Computergestützte Konformationssuche und MD-Simulationen.....	101
6.5	Ausblick .....	102



7	Ergebnisse Teil II <i>Burkholderia plantarii</i> Lipase .....	103
7.1.	Proteinreinigung und Charakterisierung der BpL .....	103
7.1.1	BASF Produktionsstamm .....	103
7.1.2	Wildtyp.....	109
7.1.3	Rekombinante Bpl-Mutante F142W .....	113
7.2	Enzymkinetik .....	115
7.2.1	Michaelis-Menten-Kinetik .....	115
7.2.2	Lösungsmittelabhängigkeit .....	115
7.2.3	Aktivierung durch Detergenzien .....	115
7.2.4	Burst-Kinetik.....	116
7.2.5	Fluoreszenzuntersuchung der BpL F142W .....	116
7.3	Kovalente Inhibition von BpL.....	117
7.4	Röntgenstruktur der BpL Mutante F142W .....	118
7.4.1	<i>Burkholderia plantarii</i> Lipase F142W .....	118
7.5	Homologiemodellierung.....	120
7.5.1	Homologiemodellierung mit MODELLER 4.....	122
7.5.2	Manuelle Homologie-Modellierung.....	122
7.5.3	Homologiemodellierung mit MODELLER 6.....	122
7.6	Strukturbasierte fokussierte Mutagenese von BpL.....	123
7.6.1	Rationale Auswahl relevanter Aminosäuren .....	123
7.6.2	Auswahlstrategie für substratspezifisch fokussierte Mutationen .....	126
7.6.2.1	Mutanten zur Aktivitätssteigerung gegenüber Phenyllessigsäure-Estern.....	127
7.6.2.2	Mutanten zur Enantiomerentrennung von Methoxycyclohexanol .....	130
8	Diskussion und Ausblick <i>Burkholderia plantarii</i> Lipase.....	131
8.1	Reinigung und Kristallisation.....	131
8.2	Kinetik und Inhibition .....	134
8.3.	Struktur und Homologiemodellierung.....	135
8.4.	Strukturbasierte Vorhersage von Mutanten.....	136
8.5	Ausblick .....	138
9	Zusammenfassung .....	140
Anhang A	Literaturverzeichnis .....	143
Anhang B	Abkürzungsverzeichnis.....	152

# 1 EINFÜHRUNG

## 1.1 Einleitung

Enzyme sind als Biokatalysatoren für die meisten biochemischen Umsetzungen im Organismus verantwortlich. Damit ist es möglich, bioorganische Reaktionen im physiologischen Medium bei niedriger Temperatur durchzuführen. Sie sind chirale Polypeptide aus stereochemisch einheitlichen L-Aminosäuren und daher prinzipiell in der Lage, Reaktionen stereoselektiv zu katalysieren.

Jeder Organismus hat im Verlauf der Evolution einen perfekt an seine Lebensbedingungen angepassten Satz von Proteinen entwickelt (Proteom). Vergleicht man Enzyme gleicher Funktion aus verschiedenen Organismen, so gibt es viele in der Aminosäuresequenz mehr oder weniger stark abweichende, aus einem gemeinsamen Vorläufer entstandene (homologe) Enzyme. Die unterschiedliche Spezifität und Aktivität dieser Enzyme spiegelt die Anpassung an die Umgebung und den speziellen Metabolismus des jeweiligen Organismus auf Aminosäureebene wider.

Viele Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung homologer Enzyme haben zum Verständnis der Grundprinzipien beigetragen, wie die Natur ein Enzym auf sein Substrat abstimmt.

In jüngerer Zeit werden diese Vergleiche durch Mutationsstudien ergänzt, wie z. B. das sukzessive Ersetzen aller Aminosäuren durch Alanin (Alanin-Scan) oder einzelne zielgerichtete Mu-

tationsanalysen mit anschließender Aktivitäts- und Stabilitätsuntersuchung.

Durch die wachsende Zahl von Röntgenstrukturen homologer Enzyme ist auch ein struktureller Vergleich möglich geworden. Diese Studien führen zum Auffinden der essentiellen Aminosäuren für die Stabilität eines Faltungsmusters bzw. die katalytische Funktion im aktiven Zentrum. In vielen Fällen kann sogar ein Einblick in die molekularen Mechanismen der Evolution gewonnen werden und eine Basis für das Verständnis der Substratspezifität und Produkt-Selektivität unterschiedlicher Enzyme innerhalb einer Enzymklasse, wie z. B. den Serinhydrolasen, gewonnen werden.

Aufgrund ihrer herausragenden Fähigkeiten als Katalysatoren und dem zunehmenden Verständnis über die beschleunigten molekularen Elementarschritte haben Enzyme in der präparativen organischen Chemie zunehmend an Bedeutung gewonnen (Liese & Filho, 1999; Schmid *et al.*, 2001).

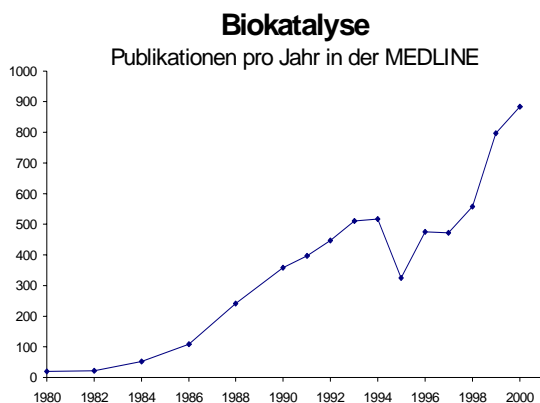
Erste Bestrebungen, diese herausragenden Fähigkeiten in der Biokatalyse einzusetzen, wurden Anfang der 1980er Jahre unternommen. Seitdem ist die Zahl der Veröffentlichungen stark angestiegen und die Zahl der Publikationen entwickelt sich nahezu exponentiell, wie in Abbildung 1.1 anhand der in der MEDLINE abgelegten Literaturstellen exemplarisch dargestellt ist.

Die Steigerung der Selektivität bei der Produktbildung großtechnisch angewandter, organischer Reaktionen ist ein wichtiges Forschungs-

ziel in der modernen organischen Synthese. Im Rahmen der stereoselektiven Synthese haben sich Enzyme als chemo-, regio- und enantioselektive Katalysatoren in den vergangenen zehn Jahren vielfach bewährt.

Enzymatische geführte Reaktionen erfüllen den Anspruch, ökologisch vorteilhafte Katalysatoren einzusetzen (grüne Chemie). Die Reaktionen können selektiv und bei niedrigen Temperaturen durchgeführt werden.

Ihr weltweiter Einsatz in der chemischen Synthese hat 1995 die Grenze von 1 Milliarde US Dollar überschritten (Jaeger & Reetz, 1998). Eine herausragende Rolle spielen dabei Hydrolasen (65 %) und Oxidoreduktasen (25 %) (Theil, 1997), wobei der Enzymklasse der Lipasen die größte Bedeutung innerhalb der Hydrolasen zukommt, wie im Abbildung 1.2 veranschaulicht ist (Faber, 1997).

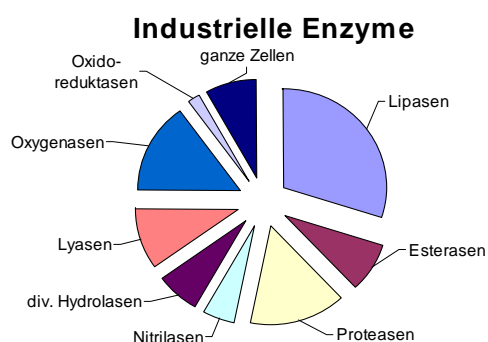


**Abb. 1.1:** Jährliche Publikationen zum Thema Biokatalyse, Biotransformation und Biotechnologie in der MEDLINE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Lipasen sind Serinhydrolasen, die in der Lage sind, langkettige Fettsäureester regio- und stereospezifisch zu spalten. Gleichzeitig haben einige Lipasen ein relativ weites Substratspekt-

rum gegenüber nicht natürlichen Substraten, sie sind nicht auf die Spaltung von Triglyceriden in wässrigen Medium beschränkt, sondern sind auch in organische Lösungsmitteln aktiv.

Moderne Verfahren setzen zunehmend immobilisierte Lipasen als heterogene Katalysatoren ein. Dies verbessert ihre Applikation, die Stabilität der Enzyme und vereinfacht die Aufarbeitung der Produkte.



**Abb. 1.2:** Häufigkeit des Einsatzes verschiedener Enzyme in Biotransformationen entnommen aus (Faber 1997)

Viele Lipasen aus Bakterien und Pilzen sind kommerziell erhältlich und werden in großen Mengen, bis zu einhundert Tonnen jährlich, in der Leben- und Waschmittelherstellung zur Fettspaltung bei niedrigen Temperaturen eingesetzt. Heute befinden sich in nahezu allen Waschmitteln rekombinante, durch Mutagenese auf die Anforderungen in der Waschflotte optimierte Lipasen.

Neuere Anwendungen im Tonnenmaßstab wurden in der Esterifikation von Biodiesel (Shimada *et al.*, 1999) und in der Papierindustrie bei der Entfernung von Triglyceriden aus Zellulose gefunden (Nihon Seishi Co, Japan).

Besonders in der Synthese von enantiomerenreinen Wirkstoffen und deren Vorstufen ist die kinetische Racematspaltung mit Hilfe von Lipasen ein beliebtes Werkzeug in der präparativen Chemie, da auch heute noch die Mehrzahl aller Pharmaka und Agrochemikalien, die ein oder mehrere stereogene Zentren enthalten, als Racemate oder Stereoisomergemische verkauft werden (Winkler, 1995).

Die Optimierung einer enzymatischen Synthese eines nicht natürlichen Substrats erfordert jedoch ein breites Screening nach dem jeweils geeigneten Biokatalysator für die gewünschte Reaktion und die Suche nach den besten Reaktionsbedingungen. Dieser Prozess ist zum heutigen Zeitpunkt der arbeitsintensivste Schritt bei der geplanten Einführung enzymatischer Methoden in die chemische Synthese.

Um eine wissensbasierte Optimierung eines Prozesses zu erreichen, steht daher das Verständnis der verschiedenen Einflussgrößen wie Enzymstruktur, Lösungsmittel und Immobilisierung auf die Stereoselektivität und Reaktivität im Mittelpunkt des Interesses. Eine Hoffnung für die Zukunft ist es, dass die Suche nach einer geeigneten Lipase für ein nicht natürliches Substrat durch das gezielte Maßschneidern einer rekombinanten Lipase auf die vorgegebene Reaktion erfolgen kann (Svendsen, 2000).

Gezielte Veränderungen eines Enzyms setzen ein detailliertes Wissen über den Mechanismus der Enzymkatalyse und über die Substratspezifität voraus. Daher hat die ungerichtete Zufallsmutagenese mit anschließendem Screening mit Hilfe von Hochdurchsatzmethoden nach der

gewünschten Eigenschaft zunehmende Bedeutung erlangt (Jaeger & Reetz, 2000).

Die kombinatorischen Möglichkeiten, ein Enzym zufällig zu verändern, sind jedoch nahezu unendlich groß. Daher ist es wünschenswert, mit den Methoden der Enzymkinetik und der Strukturaufklärung erkenntnisgetrieben bestimmte Bereiche im Enzym systematisch oder auch zufällig zu verändern, um so ein stärker gerichtetes Anpassen des Enzym auf eine spezielle Anforderung zu ermöglichen (Cedrone, Menez & Quemeneur, 2000).

## 1.2 Motivation

Ziel dieser Arbeit ist es, Lipasen aus verschiedenen bakteriellen und eukariotischen Organismen aufzureinigen, zu kristallisieren und mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse Lipasen im Komplex mit enantiomerenreinen, kovalent gebundenen Übergangszustandsanaloga aufzuklären und mit enzymkinetischen Methoden den Enzymmechanismus und die Enantioselektivität der kinetischen Racematspaltung mit Lipasen besser zu verstehen. Mit Hilfe von molekular-dynamischen Kraftfeldrechnungen, die sich an Schnitten entlang des Enzymmechanismus orientieren wurden Abschätzungen über den entropischen und enthalpischen Anteil der chiralen Diskriminierungen zu erhalten.

Mit Hilfe dieses grundlegenden Verständnisses wurde dann eine gezielte Strategie zur Anpassung einer Lipase an ein nicht natürliches Substrat entwickelt.

## 2. BIOLOGISCHES SYSTEM

### 2.1 Eigenschaften von Lipasen

Lipasen sind Triacylglycerol-Hydrolasen (EC 3.1.1.3) und kommen als zelluläre und extrazelluläre Enzyme in allen Zelltypen und Organismen vor. Sie sind essentieller Bestandteil des Fettstoffwechsels. Ihre natürlichen Substrate sind langkettige Triacylglyceride, die neben den Kohlenhydraten zu den wichtigsten Speicherstoffen in der Natur zählen.

Hefen können beispielsweise bis zu 80 % ihrer Trockenmasse als Fette enthalten (*Candida spec.*, *Rhodotorula spec.*), in pflanzlichen Samen sind es bis zu 70 %. Bakterien können Lipide im umgebenden Medium nur als Kohlenstoffquelle nutzen, indem sie Lipasen sekretieren.

Ihre physiologische Bedeutung besteht in der Bereitstellung von freien Fettsäuren aus dem umgebenden Medium der Zelle. Triglyceride selbst können nicht durch die Zellmembran aus dem Medium aufgenommen, bzw. aus dem Darm resorbiert werden. In der Natur wirken Lipasen an der Grenzfläche zwischen Wasser und Fett oder direkt an der Oberfläche einer Micelle.

Der Katalysemechanismus der Carbonesterspaltung ist analog wie in der Enzymklasse der Serinproteinasen. Er benötigt eine katalytische Triade, bestehend aus einem Serin, Histidin und einer Asparagin- oder seltener einer Glutaminsäure, die untereinander durch ein Wasserstoff-

brückennetz verbunden sind. Sie binden keine Cofaktoren, benötigen aber zur ihrer Aktivierung eine Wechselwirkung mit einer hydrophoben Oberfläche oder im Falle der Pancreaslipasen zusätzlich zur Gallensäure die Bindung einer Colipase.

In der Gruppe der Serin-Hydrolasen, zu der auch die Lipasen gerechnet werden, tritt eine hochkonservierte Sequenz aus fünf Aminosäuren (G-X-S-X-G) auf. Dabei handelt es sich um einen Teil des aktiven Zentrums, um das katalytische Serin. Diese Serin-Hydrolasen bilden eine Gruppe von Enzymen mit ähnlicher Struktur; sie nehmen den sogenannten „ $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Fold“ an (Ollis *et al.*, 1992; Schrag & Cygler, 1997).

## 2.2 VORKOMMEN VON LIPASEN

### 2.2.1 Lipasebildende Bakterien

Unter den Bakterien gibt es zahlreiche Lipasebildner. Genauer bekannt sind die Lipasen der Gattungen *Pseudomonas*, *Bacillus* und *Staphylococcus* (Jaeger *et al.*, 1994).

Bakterielle Lipasen werden nur bei der Anwesenheit von Fetten als alleinige Nahrungsquelle gebildet. Sie werden in einer inaktiven Vorläuferform (Proenzym) in der Zelle aus dem Gen lip A synthetisiert und dann in ihrer aktiven Form in das umgebende Medium in einem mehrstufigen Typ-II-Secretin-Prozess abgegeben (Lazdunski *et al.*, 1990). Das Lipasegen lip A bildet zusammen mit einem weiteren Gen lip B, einer lipasespezifischen Foldase, ein Operon. Die Transkription wird über die Anwesenheit von langkettigen Fettsäureresten im Medium reguliert (Rosenau & Jaeger, 2000).

Es wird angenommen, dass die Prolipase aus der Zelle ungefaltet durch das Translokationssystem Sec, bestehend aus sieben Proteinen, in das Periplasma transportiert wird (Abbildung 2.1). Dabei wird das Propetid mit der transport-spezifischen Erkennungssequenz abgespalten. Die prozessierte Lipase kann dann mit Hilfe eines lipasespezifischen Chaperons (LipB) korrekt gefaltet werden (Frenken *et al.*, 1993b). Diese Foldase ist in der inneren Zellmembran verankert und bringt die gefaltete Lipase im Periplasma zunächst in Kontakt mit dem Multi-enzymkomplex Dsb (sieben Proteine), einer Disulfid-Reduktase. Dort werden die Disul-

fidbrücken zur Stabilisierung der Lipase gebildet.

Die Erkennung des Lipase-Foldase-Komplexes ist essentiell für die anschließende Sekretion der Lipase (Akrim *et al.*, 1993) (Martinez, Ostrovsky & Nunn, 1999) durch das Xcp-Transportersystem (zwölf Proteine).

Die Foldase Lip B verbleibt im periplasmatischen Raum und kann das nächste Lipasemolekül falten und transportieren. Dieses hochspezifische System besteht aus insgesamt 27 Proteinen und sekretiert noch weitere Proteine wie die alkalische Phosphatase, Phospholipase C, Elastase und Exotoxin A. Viele sekretierten Proteine sind als Virulenzfaktoren an der Pathogenese von Bakterien aus der Familie der Pseudomonaden beteiligt. Reguliert wird die Sekretion über das sogenannte "quorum sensing". Das bedeutet, die Zelle reagiert auf die Anwesenheit bestimmter chemischer Signale, wie z. B. auf N-Acyl-homoserin-Lactone und kann so im gesamten Zellverband synchron die Sekretine und Pilus-Gene aktivieren (Riedel *et al.*, 2001).

Zur technischen Produktion großer Mengen der Lipasen als Biokatalysator ist es daher wünschenswert, sie in weniger pathogenen Systemen zu exprimieren. Die heterologe Expression von intrazellulär korrekt gefalteten Lipasen in *E.coli* gelang jedoch nur in Anwesenheit der Foldase LipB in Verhältnis eins zu eins (Frenken *et al.*, 1993a).

Wie kürzlich gezeigt werden konnte, scheinen Coexpressionen mit Thioredoxin möglicherweise einen Ausweg zu bieten (Tang *et al.*, 2000). Aufgrund der Toxizität der aktiven Lipase in der Zelle konnten bisher nur geringe Ausbeuten erzielt werden. Die Expression in Einschlusskörpern erfordert hingegen eine aufwendige Rückfaltung *in vitro*. Ausreichende Expressionsergebnisse wurden durch die hohe Spezifität des Sekretionssystems bisher nur in homologen Systemen erreicht.

Molekulargenetische Untersuchungen wurden vor allem an *Pseudomonas*-Lipasen durchgeführt. Zu den untersuchten Lipasen gehören die Lipasen von *Ps. cepacia*, verschiedene Stämme von *Ps. species*, *Ps. aeruginosa* und *Ps. fragi*.

Die in dieser Arbeit untersuchte Lipase aus *Pseudomonas glumae* (auch *Burkholderia plantarii*) weist eine große Homologie von 84% und eine Strukturähnlichkeit mit der Lipase von *Ps. cepacia* auf.

Aus den gram-positiven Organismen wurden vor allem die *Staphylococcus*- und *Bacillus*-Arten am besten untersucht. Wie im nächsten Kapitel beschrieben, unterscheiden sich die Lipasen gram-negativer und gram-positiver Stämme deutlich voneinander.

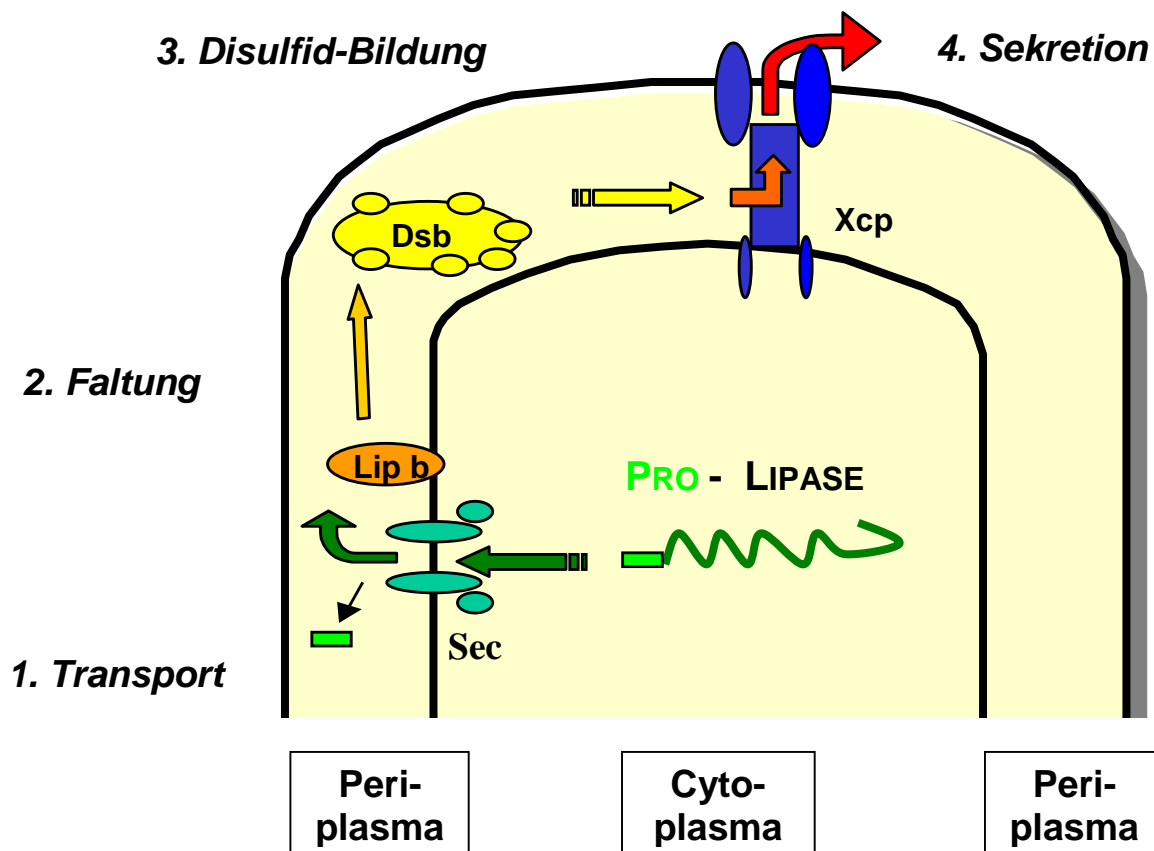


Abb. 2.1: vierstufiger Sekretionsmechanismus von Lipasen in gram-negativen Bakterien.

1. Transport durch Sec
2. Faltung durch Lip b
3. Disulfid-Bildung durch Dsb
4. Secretion durch Xcp

### 2.2.1.1 Lipasen gram-negativer Bakterien

Das durchschnittliche Molekulargewicht von *Pseudomonas*-Lipasen liegt bei ca. 30 kDa. Ihre Sequenz-Homologie untereinander übersteigt meist 60 %. Es gibt aber auch Ps.-Lipasen, die eine deutlich geringere Homologie untereinander aufweisen. Ein Stammbaum im Hinblick auf Sequenzähnlichkeit (aufgestellt auf der Basis der Swissprot-Sequenzdatenbank) von 49 Lipasen bekannter Sequenz zeigt, dass nur die Lipase von *Ps. fluorescens* keine große Sequenzähnlichkeit mit den übrigen *Pseudomonas*-Lipasen aufweist.

### 2.2.1.2 Lipasen gram-positiver Bakterien

Bis auf das aktive Zentrum und eine Region im N-terminalen Bereich zeigen die Lipasen aus gram-positiven Bakterien keine nennenswerten Homologien mit den Lipasen aus gram-negativen Bakterien.

Bei den bisher untersuchten Gattungen gibt es zwischen den einzelnen Lipasen gram-positiver Bakterien zudem deutliche Unterschiede.

Das aktive, reife Protein der Gattung *Staphylococcus* ist 44-48 kDa groß, die Sequenzhomologie der Lipasen der einzelnen Stämme im Präpro-Teil beträgt nur 25 %, die reifen Enzyme zeigen dagegen bis zu 65 %-ige Homologie zueinander.

Die Lipasen der Gattung *Bacillus* hingegen sind mit 20-22 kDa deutlich kleiner als die übrigen Lipasen. Auch in der konservierten Sequenz (G-X-S-X-G) des aktiven Zentrums gibt es Unterschiede: an Position 1 befindet sich ein

Alanin statt des sonst üblichen Glycins. Eine derartige katalytische Sequenz findet man auch bei der Protease Subtilisin.

## 2.3 Reinigung von Lipasen

Lipasen werden als sekretierte Enzyme aus dem Kulturüberstand bzw. dem Pankreas des jeweiligen Organismus gewonnen. Im Überstand befinden sich normalerweise nur wenige Enzyme, was die anschließende Reinigung nach dem Abzentrifugieren des Zellmaterials vereinfacht. Probleme können durch ebenfalls sekretierte Proteasen, die die Lipasen verdauen können, auftreten.

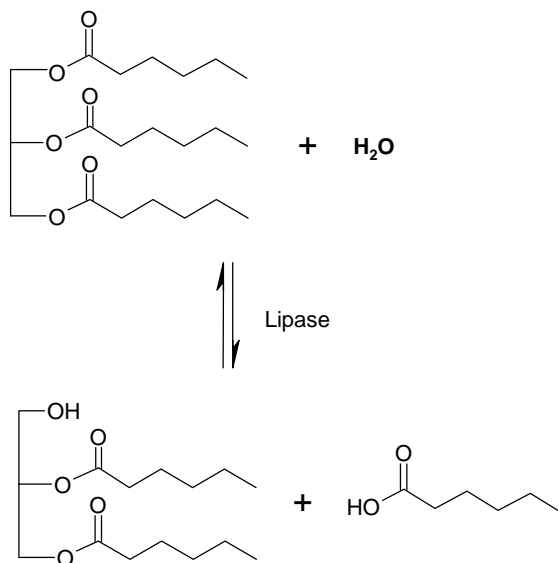
Besonderes Augenmerk gilt daher dem ersten Schritt des Reinigungsschemas, der Anreicherung der stark verdünnten Lipase und der Abtrennung vorhandener Proteasen. In vielen Fällen wird zunächst über eine Ultrafiltration die Proteinlösung ankonzentriert.

Aufgrund der lipophilen Eigenschaften von Lipasen hat sich die **Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)** als vorteilhaft herausgestellt und wird für fast alle Lipasen angewandt. Die unter Hochsalzbedingungen an das Material gebundene Lipase kann mit reinem Wasser oder bei starker Bindung an das Säulenmaterial zusätzlich mit Alkohol oder Detergenz eluiert werden. In vielen Fällen kann auf diesem Wege die vollständige Trennung von den übrigen Proteinen erreicht werden. Für die Feinreinigung sind in der Literatur viele Methoden beschrieben, wie die Gelfiltration oder Ionenaustauscherchromatographie.



## 2.4 Enzymmechanismus von Lipasen

Lipasen gehören zu den Hydrolasen und werden in die Enzymklasse 3 mit der EC-Klassifizierung 3.1.1.3. eingeordnet. Die durch diese Enzyme katalysierten hydrolytischen Reaktionen greifen u. a. Ester-, Glykosyl-, Peptid- und Säureanhydridbindungen an. Lipasen katalysieren reversibel die Hydrolyse der Esterbindung von Glycerinestern aliphatischer Fettsäuren an einer Lipid-Wasser-Grenzschicht (Abbildung 2.2).



**Abb. 2.2:** Schema einer lipasekatalysierten Esterspaltung anhand des natürlichen Substrats Triacylglycerol. In weiteren Schritten können auch die zwei verbleibenden Estergruppen gespalten werden.

### 2.4.1 Reaktionsmechanismus einer lipasekatalysierten Reaktion

Lipasen zählen zu der Klasse der Serin-Hydrolasen, da ein Serin im aktiven Zentrum für die katalytische Wirkung essentiell ist (Brady *et al.*, 1990). Dies konnte durch Hemmung mit dem serinaktiven Reagenz Diethyl-*p*-nitrophenylphosphat (E 600) nachgewiesen werden (Gilbert, 1993).

Die Spaltung der Esterbindung erfolgt über einen intermediär ausgebildeten, kovalent an das Serin gebundenen Acyl-Enzym-Komplex (Abbildung 2.3). Entwickelt wird dieser durch den nukleophilen Angriff des aktivierten Serins auf die Estercarbonylgruppe unter Abspaltung des Glycerins.

Anschließend wird das Acylenzym durch den nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls wieder deacyliert; man erhält das freie Enzym und die abgespaltene Fettsäure. Als Reaktionsprodukte entstehen Fettsäuren, Diacylglyceride, Monoacylglyceride und Glycerin. Dieser sogenannte Ping-Pong-Mechanismus ist allen Serin-Hydrolasen gemeinsam.

Neben der Spaltung von Ester- und Amidsubstraten kann auch die Übertragung von Acylresten unter Bindung kovalenter Enzym-Acyl-Intermediate in einem Zwei-Schritt-Mechanismus stattfinden. Dabei wird zunächst der Acylrest an das Serin des aktiven Zentrums gebunden und im zweiten Schritt auf ein Nucleophil überführt.

Wird der Acylrest auf Wasser als nukleophil übertragen, handelt es sich um die oben beschriebene Hydrolyse, bei einer Übertragung auf einen Alkohol um eine Umesterung, bei der Übertragung auf ein Amin um eine Amidierung.

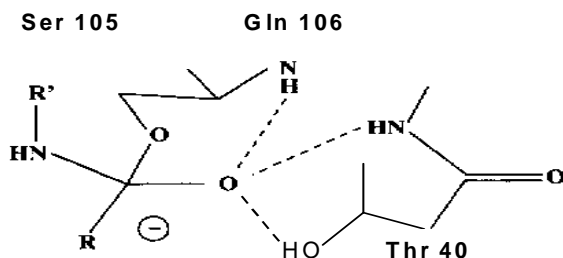
Abbildung 2.4 zeigt den detaillierten Reaktionsmechanismus der enzymatischen Hydrolyse. Zunächst wird das Substrat im Michaelis-Menten-Komplex (1) gebunden und über Wasserstoffbrücken zu Stickstoffatomen zweier Peptidbindungen der Proteinhauptkette im sogenannten "Oxyanion-hole" polarisiert. Das Serin wird über das Histidin der Triade in einer allgemeinen Basenkatalyse deprotoniert. Dann erfolgt der nukleophile Angriff des Serins entlang der Bürgi-Dunitz-Trajektorie und die gleichzeitige Umhybridisierung des  $sp^2$ -Carbonylkohlenstoff von einer planaren in eine tetraedrale  $sp^3$ -Geometrie.

Der gebildete tetraedrale Zwischenzustand (2) trägt eine negative Ladung am Carbonyl-Sauerstoff, dem "Oxyanion". Dieses besetzt eine Tasche der Substratbindungsstelle, dem erwähnten "Oxyanionhole", und wird durch mindestens zwei Wasserstoffbrücken stabili-

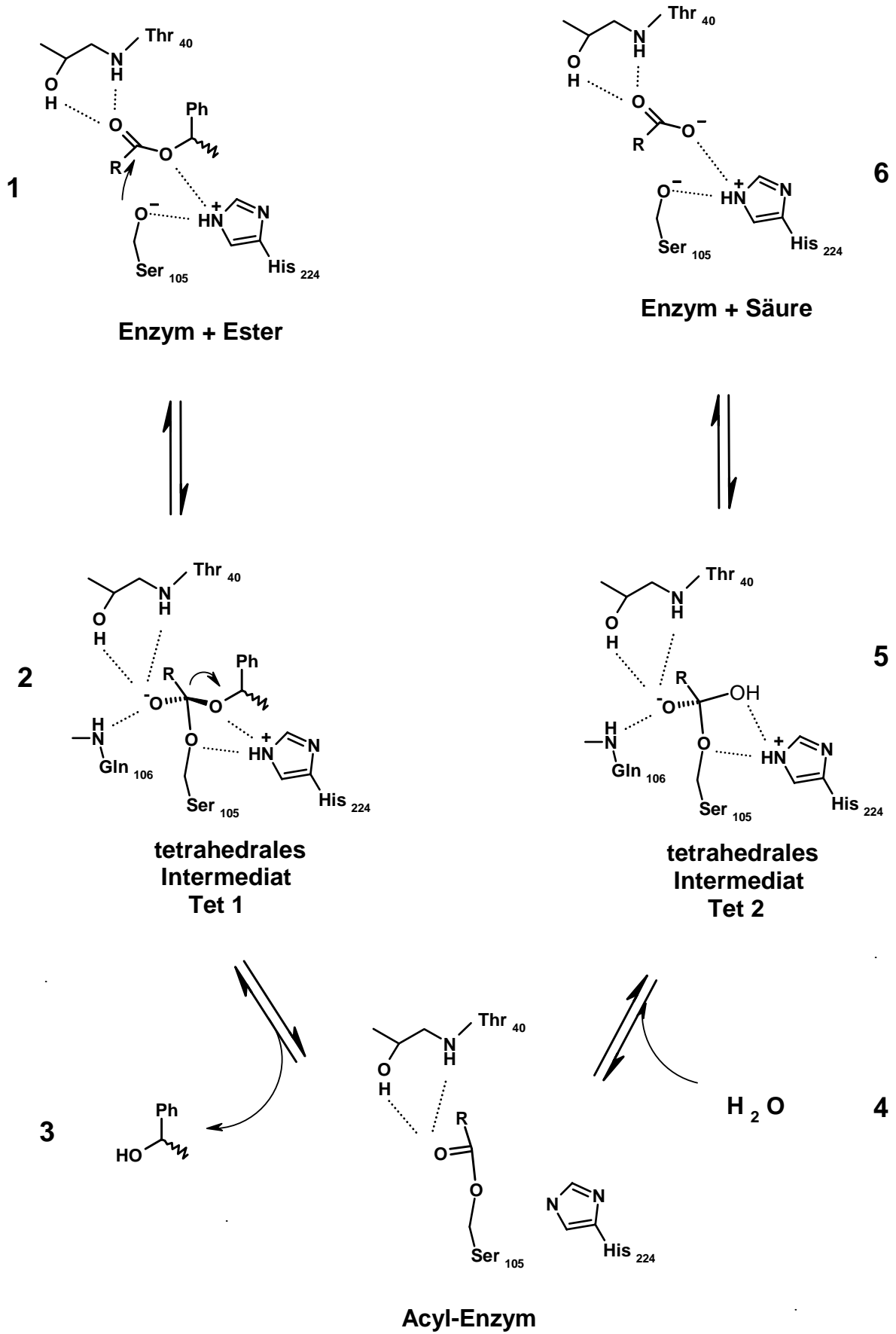
siert. Bei *Candida antarctica* Lipase B (CAL B) beispielsweise wird das "Oxyanion" von den Amidgruppen des Gln 106 und Thr 40 stabilisiert, zusätzlich interagiert die Alkoholgruppe der Seitenkette des Thr 40 mit dem Sauerstoff, wie in Abbildung 2.3 dargestellt.

Die Ausbildung des tetraedrischen "Oxyanion"-Intermediates stellt vermutlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Hydrolyse dar (Kraut, 1977).

Das vom Serin auf den Imidazolring des Histidins übertragene Proton wird im Folgenden an den Ester-O weitergegeben. Anschließend erfolgt unter Bindungsspaltung die Freisetzung des Alkohols (3). Der Enzym-Acyl-Komplex (4) wird durch einen weiteren nucleophilen Angriff eines Wassermoleküls hydrolysiert (5), wobei das Restsubstrat als Carbonsäure abgespalten wird (6).



**Abb.2.3:** Darstellung der Stabilisierung des tetraedrischen Zwischenzustands mit den Aminosäuren im oxyanion-hole von *Candida antarctica* Lipase B



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung der Esterspaltung durch Lipasen:

(1) Michaelis-Komplex mit dem Ester, (2) erster tetraedrischer Übergangszustand, (3) Bildung des Acyl-enzym und Freisetzung des Alkohols, (4) Angriff des Wassermoleküls an das Acylenzym, (5) zweiter tetraedrischer Übergangszustand, (6) Freisetzung der Fettsäure

## 2.5 Enzymkinetik

Enzyme sind in der Lage, biochemische Reaktionen extrem zu beschleunigen. Dabei spielen die Wechselwirkungen bestimmter Aminosäuren im aktiven Zentrum eine entscheidende Rolle bei der Substratbindung, der Stabilisierung eines Übergangszustandes, der anschließenden Produktbildung und der nachfolgenden Produktfreisetzung.

Chemische Reaktionen können durch Enzyme um einen Faktor von bis zu  $10^8$  beschleunigt werden und verlaufen trotzdem sehr selektiv.

Ein Enzym erniedrigt wie jeder andere Katalysator die freie Aktivierungsenthalpie einer chemischen Reaktion. Unter der Annahme eines Gleichgewichts zwischen dem Reaktanden und dem Übergangszustand gilt die Eyring-Gleichung (Eyring & Polanyi, 1931), die den Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeitskonstanten  $k_b$  einer bimolekularen Reaktion und der freien Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^*$  herstellt.

$$k_b = \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}}$$

Eyring - Gleichung

$k$ =Boltzmann-Konstante,  $h$ =Planck'sches Wirkungsquantum,  $T$ =absolute Temperatur,  $R$ =allgemeine Gaskonstante

Es wurden verschiedene Modelle entwickelt, um diese Beschleunigung zu erklären. Der erste bedeutende Beitrag wurde durch das Schlüssel-Schloß-Prinzip von E. Fischer aus dem Jahre 1894 geleistet (Fischer, 1894).

Das moderne "induced-fit"-Modell von D. E. Koshland aus den 1960er Jahren berücksichtigt zusätzlich zum starren Schlüssel-Schloß-Modell Fischers die Flexibilität im Protein bei der Bindung und damit die induzierte Anpassung an verschiedene Substrate (Koshland, 1994).

Die molekulare Erkennung ist in diesem Fall ein dynamischer Anpassungsprozess zwischen dem Substrat und den Aminosäuren in der Bindetasche.

Den Extremfall eines "induced fit" stellt die Bewegung ganzer Domänen oder Teile der Hauptkette eines Enzyms während der Katalyse dar, z. B. um das gebundene Substrat vollständig vom umgebenden Solvens abzuschirmen. Ein weiteres Modell geht auf M. J. S. Dewar aus dem Jahr 1985 zurück und versucht, den Unterschied zur Reaktion in Lösung in einem Desolvatationsmodell zu erklären (Dewar & Storch, 1985).

Diese Modelle machen verständlich, warum ein zu großes Substrat nicht umgesetzt werden kann und ein zu kleines Substrat, das das Solvens nicht vollständig aus der Bindetasche verdrängt, nur langsam reagiert. Diese ursprünglichen Modelle sind bis heute erweitert worden, aber im Grundsatz unangetastet geblieben. Angewandt auf den Übergangszustand, stabilisiert das Enzym so den produktiven Enzym-Substrat-Komplex und senkt dessen Energie. Dieser Vorgang wird in Anlehnung an die moderne stereoelektronische Orbitaltheorie der organischen Chemie "orbital steering" genannt.

Diese Theorien erklären die hohe Substrat- und Produktselektivität enzymkatalysierter Reaktionen.

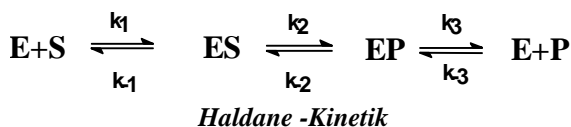
Das minimale kinetische Schema für eine enzymkatalysierte Reaktion wurde 1913 von Michaelis und Menten aufgestellt:



Aus diesem vereinfachten Schema mit irreversiblen Zerfall des ES-Komplexes, ohne Berücksichtigung der Produktbindung an das Enzym, erhält man für die kinetischen Konstanten  $k_{cat} = k_2$  und  $K_M = (k_2 + k_{-1})/k_1$ .

Eine noch weitergehende Vereinfachung stellt die Annahme dar, dass  $k_{-1} > k_2$  ist, und somit  $K_m$  direkt der Dissoziationskonstanten  $K_d$  des Enzym-Substrat-Komplex entspricht.

Ein realistischeres Schema für den kinetischen Ablauf von Haldane (1930) berücksichtigt die Reversibilität der Reaktionsschritte und ist um die Existenz eines Enzym-Produkt-Komplexes erweitert.



Die "steady-state"-Parameter für den quasi stationären Zustand im Fliessgleichgewicht er rechnen sich jetzt nach folgenden Gleichungen:

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_{-2} + k_3} \quad \text{und}$$

$$K_m = \frac{k_2 k_3 + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3}{k_1 (k_2 + k_{-2} + k_3)}$$

Daraus folgt, dass "steady-state"-Messungen nur pauschal für die Gesamtreaktion zu interpretieren sind und keine direkte Aussage über den detaillierten Reaktionsmechanismus erlauben. Die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  im "steady-state" ist für jeden Reaktionsmechanismus durch den folgenden Ausdruck bestimmt:

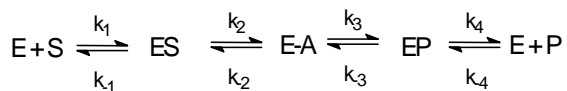
$$v/[E_0] = \frac{k_{cat} [S]}{K_m + [S]}$$

Die einzelnen kinetischen Konstanten, die den komplex zusammengesetzten Konstanten  $K_M$  und  $k_{cat}$  zugrunde liegen, können nicht bestimmt werden. Aus diesen beiden kinetischen Konstanten,  $K_M$  und  $K_{cat}$ , die experimentell aus einfachen "steady-state"-Messungen zugänglich sind, lassen sich jedoch einige Abschätzungen für die einzelnen Teilschritte eines Mechanismus ableiten. So kann kein Teilschritt der Hinreaktion langsamer sein als  $k_{cat}$ .

Der als Spezifitätskonstante bezeichnete Parameter  $k_{cat}/K_m$  definiert eine untere Grenze für eine scheinbare Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Substratbindung. Die wirkliche Geschwindigkeitskonstante muss jedoch um einen Faktor größer sein, der die Dissoziation bzw. Reaktion des ES-Komplexes in den nächsten Zustand der Gesamtreaktion beinhaltet. Daher ist die genaue Bestimmung der Substratspezifität einer enzymatischen Reaktion nur mit Hilfe transienter Methoden durch die Analyse der individuellen Reaktionsschritte unter direkter Beobachtung der intermediären Zustände vor der Einstellung des Fliessgleichgewichts möglich.

### 2.5.1 Kinetischer Enzymmechanismus von Lipasen

Betrachtet man das vereinfachte kinetische Modell für eine typische Serin-Hydrolase, das die Bildung eines Acyl-Enzyms und die Reversibilität der einzelnen Reaktionsschritte beinhaltet, so erhält man folgendes Schema :



$E = \text{Enzym}$                        $S = \text{Substrat}$   
 $E-A = \text{Acyl-Enzym}$              $P = \text{Produkt}$

Die kinetischen Konstanten  $K_m$  und  $k_{cat}$  sind in diesem Schema durch die folgenden Ausdrücke gegeben (Gutfreund):

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3 k_4}{(k_2 + k_{-2})(k_{-3} + k_4) + k_2 k_3 + k_3 k_4}$$

$$K_m = \frac{k_{-1}(k_{-2}(k_{-3} + k_4) + k_3 k_4) + k_2 k_3 k_4}{k_1((k_2 + k_{-2})(k_{-3} + k_4) + k_2 k_3 + k_3 k_4)}$$

Mit Hilfe der transienten Kinetik ist es nun möglich, einzelne Teilreaktionen zu charakterisieren, indem man die Konzentration der Zwischenprodukte ES, EF oder EP als Funktion der Zeit bestimmt.

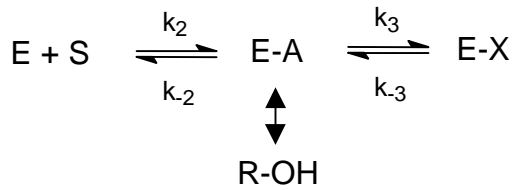
Damit werden einzelne Geschwindigkeitskonstanten innerhalb des kinetischen Mechanismus einer direkten Messung zugänglich. Interessant ist die Frage nach dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt eines solchen mehrstufigen Mechanismus.

Es wird allgemein angenommen, das der Michaelis-Menten-Komplex mit dem Ester sehr

schnell gebildet wird. Dieser Schritt ist diffusionskontrolliert und daher den normalen kinetischen Methoden nicht zugänglich. Ultraschnelle kinetische Methoden im Mikrosekundenbereich wie z. B. Temperatur-Sprung- oder Druck-Sprung-Techniken haben jedoch gezeigt, dass dieser Schritt für die meisten Enzyme nur von der Viskosität des Lösungsmittels bzw. von der Temperatur (Cryoenzymologie) abhängt (Gutfreund, 1996).

Im zweiten Schritt wird das Enzym acyliert und der Alkoholrest abgespalten. Die Geschwindigkeit der Alkoholfreisetzung ist daher eine direkte Observable für die transiente Kinetik der Reaktion. Betrachtet man den Verlauf der Alkoholbildung vor der Ausbildung eines Fließgleichgewichts mit Hilfe geeigneter kinetischer Methoden, so erhält man Aufschluss über die Geschwindigkeit der Acylierung und des nachfolgenden Schrittes.

Beobachtet man die transiente Kinetik der Alkoholbildung und damit die Bildung von E-A, so können entsprechend dem nachfolgend angegebenen Schema getrennt die Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$ ,  $k_{-2}$ ,  $k_3$  und  $k_{-3}$  bestimmt werden. Mit dieser Methode ist es möglich, die Bindung verschiedener Substrate sowie den Einfluss von Mutationen im aktiven Zentrum direkt miteinander zu vergleichen, ohne auf die pauschalen Konstanten  $K_M$  und  $k_{cat}$  angewiesen zu sein.



$E + S = \text{Enzym} + \text{Substrat}$   $E-A = \text{Acyl Enzym}$   
 $E-X$  nichtaufgelöste Teilschritte

Essentiell für die Rückgewinnung aktiven Enzyms ist die schnelle Freisetzung des Produkts.

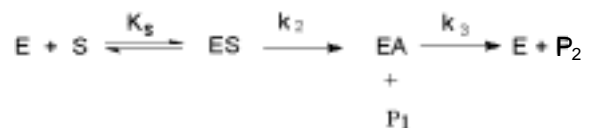
Aktuelle theoretische Untersuchungen der Partialladungen an der solvens-zugänglichen Oberfläche im aktiven Zentrum von Esterasen und Lipasen verweisen auf ein negatives elektrostatisches Potential in der Bindetasche am pH-Optimum der untersuchten Enzyme.

Dieses negative Potential würde eine negativ geladene Säure, die als Produkt entsteht, abstoßen, und somit sollte eine Rückbindung des Produkts effizient verhindert werden ("product-catapult-model") (Neves Petersen, Fojan & Petersen, 2001).

### 2.5.2 Burst-Kinetik

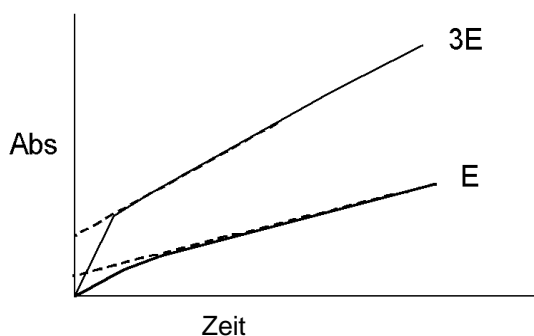
Eine spezielle Variante der transienten Kinetiken sind die sogenannten "Burst"-Kinetiken. Der Name dieser Messungen resultiert aus der Tatsache, dass Enzyme, deren langsamster Schritt die Deacylierung des E-A Komplexes ist, zunächst schnell ein Äquivalent Alkohol freisetzen und sich damit zu Beginn der Reaktion fast vollständig im acylierten Zustand befinden, bevor sich anschliessend ein Fließgleichgewicht einstellt. Der typische Verlauf einer "Burst"-Kinetik ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

Aus der Grösse und der Geschwindigkeit des sogenannten "Bursts" können dann unter Annahme des unten aufgestellten minimalen kinetischen Schemas die Enzymmenge und die kinetischen Parameter  $K_s$ ,  $k_2$  und  $k_3$  direkt bestimmt werden.



$E + S = \text{Enzym} + \text{Substrat}$   $E-A = \text{Acyl Enzym}$   
 $P_1 = \text{Produktalkohol}$   $E+P_2 = \text{Enzym} + \text{Produktsäure}$

Dieses Schema lässt sich unter der Annahme ableiten, dass Substratbindung als schnelles vorgelagertes Gleichgewicht mit der Dissoziationskonstanten  $K_s$  beschrieben werden kann und die Rückreaktionen  $k_{-2}$  und  $k_{-3}$  vernachlässigt werden können.

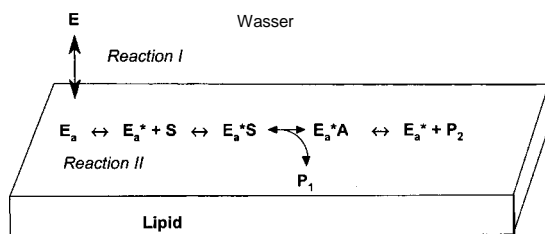


**Abb. 2.5** Typische „burst“ kinetik der Alkoholfreisetzung bei langsamer Deacylierung des Enzyms. Die Höhe des „burst“ ist von der eingesetzten Enzymmenge  $E$  abhängig.

### 2.5.3 Grenzflächenaktivierung

Lipasen unterscheiden sich von den anderen Enzymen ihrer Proteinfamilie durch ihre sogenannte Grenzflächen- oder Interphasenaktivierung. Lipasen folgen im Gegensatz zu Esterasen keiner einfachen Michaelis-Menten-Kinetik, sondern erfordern zusätzlich einen vorgelagerten Schritt zur Aktivierung des Enzyms. Abbildung 2.6 zeigt eine Gegenüberstellung der jeweiligen Kinetik.

Kinetische und thermodynamische Untersuchungen an micellären Systemen konnten diese Aktivierung durch ein einfaches Zwei-Zustands-Modell erklären (Cajal *et al.*, 2000). Die Lipase liegt in der wässrigen Phase in einer inaktiven Konformation vor und wird in einem vorgelagerten Schritt aktiviert, bevor das Substrat binden kann.



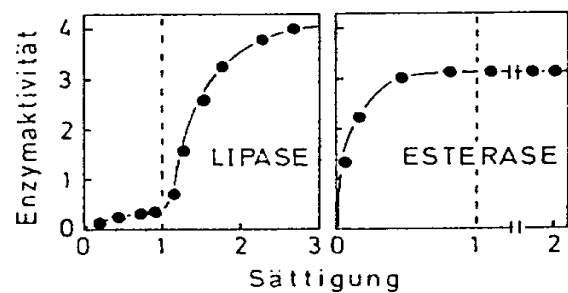
$E = \text{Enzym}$   $S = \text{Ester}$   
 $Ea = \text{adsorbiertes Enzym}$   $Ea^* = \text{offenes ads. Enzym}$   
 $P1 = \text{Produktalkohol}$   $P2 = \text{Produktsäure}$

"Steady-state"-Fluoreszenzuntersuchungen und Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie bestätigten ein solches Zwei-Zustands-Modell der Aktivierung durch Micellen oder organische Lösungsmittel (Jutila *et al.*, 2000).

Diese Aktivierung wird auf ein bewegliches Strukturelement ("flap" oder "lid") (Berg *et al.*, 1998) zurückgeführt (Abbildung 2.7), das wie

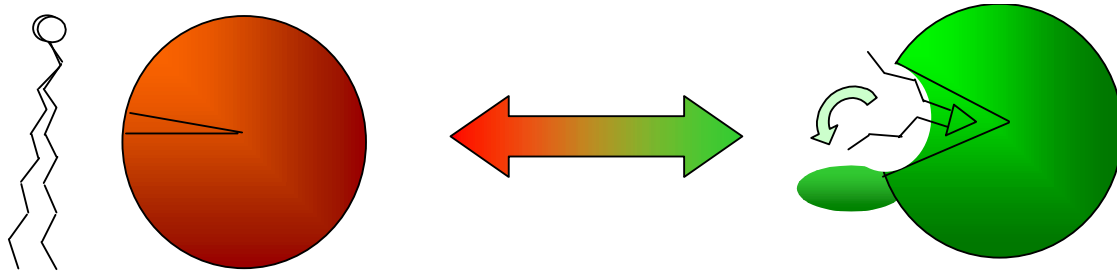
ein "Deckel" den Zugang zum aktiven Zentrum verschließt (Brzozowski *et al.*, 2000).

Je nach betrachteter Lipase besteht der "lid" aus einer (*Pseudomonas glumae*, humane Pankreaslipase) oder zwei  $\alpha$ -Helices (*Geotrichum candidum*). Die Innenseite des "lid" ist dabei lipophil, die Außenseite hydrophil, wie in Abbildung 2.8 dargestellt.



**Abb. 2.6:** Interphasenaktivierung einer Lipase im Vergleich mit einer Esterase; aufgetragen ist die jeweilige Enzymaktivität als Funktion der Substratkonzentration, die in Vielfachen der Substratlöslichkeit angegeben ist. Die gestrichelten Linien zeigen die Micellenbildung an (aus: Jaeger und Wohlfarth, 1993).

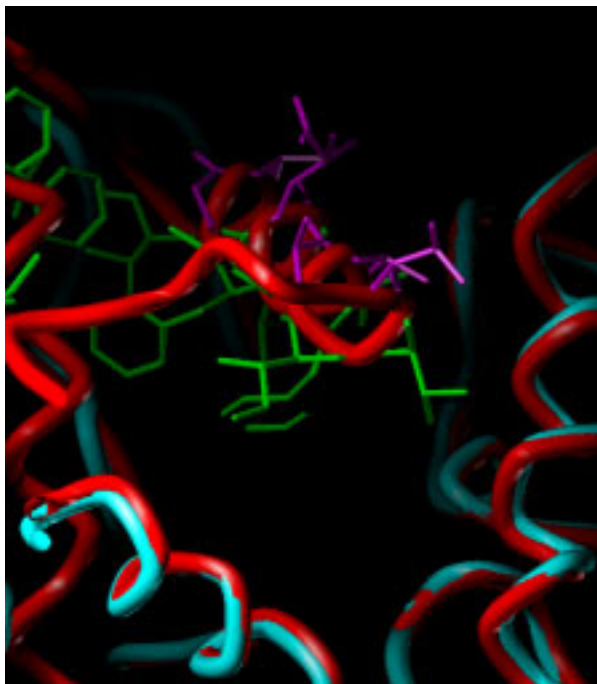




**Abb. 2.7:** Schema der Lipaseaktivierung. Gezeigt ist eine Lipase mit Substrat links in der geschlossenen und rechts in der aktiven, geöffneten Konformation.

Durch das Öffnen des "lid" vergrößert sich daher die lipophile Oberfläche des Proteins, das Enzym kann besser an die Lipid-Wasser-Grenzschicht anlagern und ermöglicht gleichzeitig einen Zugang zum aktiven Zentrum.

Dieses Phänomen der Grenzflächenaktivierung (engl. "interfacial activation") konnte erstmals 1993 durch Röntgenstrukturanalyse der beiden



**Abb 2.8:** Seitenansicht der geschlossenen amphiphilen 'lid' Helix in *Pseudomonas glumae* über dem aktiven Zentrum. Die Aminosäuren des 'Lids' sind nach ihrer Eigenschaft farbig markiert: grün=lipophil, magenta = hydrophil. Die hydrophilen Seitenketten weisen in der geschlossenen Konformation zum Solvens.

Konformationen der *Candida Rugosa* Lipase aufgeklärt werden (Grochulski *et al.*, 1993). Weitere Untersuchungen an verschiedenen Lipasen bestätigten diesen Mechanismus (Brzozowski *et al.*, 2000). Pancreaslipasen benötigen zusätzlich zur Grenzflächenaktivierung mittels Gallensäuren noch eine Colipase (Hermoso *et al.*, 1997) (Egloff *et al.*, 1995).

Die zugängliche Oberfläche ändert sich z. B. bei der *Rhizomucor miehei*-Lipase von 10560 Å<sup>2</sup> im geschlossenen Zustand auf 11816 Å<sup>2</sup> in der offenen Form (Vasel *et al.*, 1993). Gleichzeitig entsteht ein ausgedehnter hydrophober Bereich um das katalytische Zentrum herum.

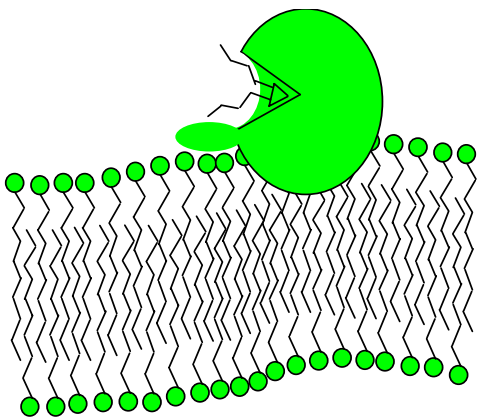
Der "Lid" scheint somit die Aktivität der Lipase zu kontrollieren; wenn keine hydrophobe Umgebung zugegen ist, bleibt er geschlossen und die Lipase ist nicht aktiv. In Gegenwart einer Phasengrenzfläche wird die katalytische Triade durch die Bewegung des helikalen „Lid“-Abschnitts zugänglich und die Lipase wird aktiviert.

Da die Substratmoleküle an der Phasengrenzfläche eine gewisse Orientierung und somit eine Ordnung vorweisen und zudem die Diffusion in das aktive Zentrum auf eine zweidimensionale Oberfläche reduziert wird (Abbildung 2.9), erklären sich die hohen Umsatzzahlen für Lipasen an Micellen (Brown, Yada & Marangoni, 1993; Chapus *et al.*, 1978; Ferrato *et al.*, 1997).

#### 2.5.4 Aktivitätsbestimmungen

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurden eine Reihe von Methoden entwickelt. Man unterscheidet direkte Methoden, die unabhängig von der chemischen Natur des Substrats sind, chromogene und fluorogene Nachweisverfahren, die auf der Anwesenheit von bestimmten chromophoren Gruppen im Substrat beruhen. Diese verändern ihr Absorptions- oder Emissionsspektrum durch die enzymatische Spaltung signifikant.

Die erste veröffentlichte Methode zu Aktivi-



**Abb. 2.9** :Modell der Grenzflächenaktivierung von Lipasen. Der „Lid“ Wechselwirkt mit der Oberfläche einer Micelle und stabilisiert die aktive Konformation.

tätsbestimmung von Lipasen gegenüber Membranlipiden beruht auf der Messung der Oberflächenspannung eines monomolekularen Triglyceridfilmes mittels eines Tensiometers (Ransac *et al.*, 1999; Verger, 1976). Die fortschreitende Hydrolyse der Triglyceride durch die Lipase führt zur Abnahme der Oberfläche des Films.

Die pH-Methode zur Aktivitätsbestimmung der Esterspaltung von Triacylglyceriden beruht auf der Quantifizierung der freigesetzten Fettsäuren mittels kontinuierlicher pH-Messung. Man unterscheidet zwei Methoden, die pH-statische Messung, bei der die frei werdende Säure mit einer Base gegentitriert wird und der Verbrauch der Base ein direktes Maß für die Aktivität darstellt, sowie die Messung der pH-Erniedrigung in ungepufferter Lösung durch die freigesetzte Säure (Schmid & Verger, 1998).

Am häufigsten wird die pH-Stat-Methode angewandt, da unter definierten pH-Bedingungen sowohl in homogener Phase als auch mit micellären Substraten gemessen werden kann. Der Nachteil dieser beiden Methoden ist jedoch die Dauer eines Experimentes und der apparative Aufwand für die exakte pH-Bestimmung.

Die pH-Drop-Methode ist durch die Firma Thermogen in jüngerer Zeit für Hochdurchsatz-Aktivitätsmessungen als Methode zur Enantioselektivitätsbestimmung mit chromogenen Indikatoren als pH-Sonden kombiniert worden, um in Mikrotiterplatten mit Hilfe von Absorptionsmessung den pH-Verlauf vieler Reaktion parallel verfolgen zu können (Moris-Varas *et al.*, 1999). Dieses Messprinzip unterliegt jedoch der

Beschränkung auf homogene, wässrige und schwachgepufferte Systeme. Ein Problem bei der quantitativen Auswertung ist die nichtlineare Abhängigkeit der Indikatorabsorption vom pH-Verlauf.

Weitere direkte Methoden beruhen auf der diskontinuierlichen Messung des Gehalts an Produkt durch analytische Verfahren, wie z. B. HPLC, Gaschromatographie oder NMR. Durch Wahl von geeigneten enantioselektiven Trennmethode ist auch die Unterscheidung von Stereoisomeren im Produkt möglich. Um den kompletten Verlauf einer Reaktion zu erfassen, ist die Entnahme und Aufbereitung von vielen Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten und ein hoher apparativer Aufwand nötig. Ein Vorteil dieser Methode ist die generelle Anwendbarkeit, die Unabhängigkeit von der speziellen Substratstruktur und von dem verwendeten Lösungsmittel.

Chromogene Substrate, wie z. B. para-Nitrophenyl-Ester mit Carbonsäuren unterschiedlicher Kettenlänge, sind kommerziell erhältlich und erlauben die kontinuierliche Aktivitätsmessung durch die einfache Quantifizierung des abgespaltenen para-Nitrophenolat-Ions durch die Absorptionmessung bei 405 nm. Der Alkoholteil des Ester ist somit für dieses Essay festgelegt und nur die Säure kann variiert werden. Durch die Kombination mit chiralen Carbonsäuren ist die direkte Bestimmung der Aktivität gegenüber Estern mit vorgegebener Stereochemie im Säureteil möglich, da Lipasen aber nur langkettige, unverzweigte Fettsäuren als Substrate akzeptieren, ist

die Anwendbarkeit dieser Methode begrenzt.

Das Gleiche gilt für hochempfindliche fluorogene Substrate wie Umbelliferon-Carbonsäure-Ester (Simons *et al.*, 1996), die zur Freisetzung von fluoreszierendem Umbelliferon führen.

Zur Aktivitätsmessung von Glycerol-Estern wurden spezielle Methoden entwickelt, von denen der Rosorufin-Test (Cardenas *et al.*, 2001) (1,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-Glutarsäure-Resorufinylester) kommerziell erhältlich ist.

Weitere Aktivitätsmessungen beruhen auf speziell synthetisierten fluorogenen Fettsäuren in Kombination mit fluoreszenzunterdrückenden Fettsäuren im Triacyl-glycerolester. Bei der Hydrolyse wird die fluorogene Fettsäure abgespalten und so eine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften erreicht. Diese Methode ist besonders empfindlich, wenn die verbleibenden fluoreszenzunterdrückenden Diacyl- und Triacylglycerole in Micellen gebunden bleiben.

### 2.5.5 Inhibition von Lipasen

Als nichtkovalente Inhibitoren von Lipasen sind vor allem Substratanaloga mit nichthydrolysierbaren Amido- oder Keto-Gruppen, wie z. B. alpha-Keto-triacylglycerol-Derivate bekannt (Simons *et al.*, 1999).

Als kovalent bindende Liganden sind Inhibitoren wie das serinaktive Diethyl-*p*-nitrophenylphosphat sowie Histidin-modifizierende Sulfone bekannt. Der prominenteste Inhibitor, das Tetrahydro-Lipstatin wird als Orlistat™ therapeutisch eingesetzt.

Die ersten lipasespezifische Inhibitoren waren langkettige Phosphonsäure-Derivate der in Abbildung 2.10 gezeigten Grundstruktur, die analog dem tetraedrigen Übergangszustand an das katalytische Serin binden.

In den letzten Jahren gelang auch die Synthese von Phosphonsäurederivaten mit enantiomerenreinen chiralen Alkoholen. Zu beachten ist, dass bei asymmetrischer Substitution am Phosphor ein Stereozentrum auftritt, so dass Diastereomere erhalten werden.

Zur Untersuchung der Enantioselektivität gegenüber Acyl-glycerolen bzw. sekundären Alkoholen sind Diacylglycerophosphonate (Stadler *et al.*, 1996) und Menthylalkohol-derivate (Grochulski *et al.*, 1994a) synthetisiert worden.

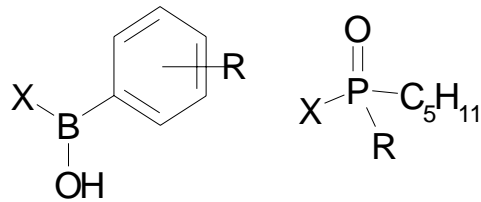


Abb. 2.10: typische kovalente Inhibitoren von Lipasen, links Boronsäure, rechts Phosphonsäure-Derivate, abgeleitet vom Herbizid E605  
X = *para*-nitro-Phenyl als Abgangsgruppe

## 2.6 Struktur von Lipasen

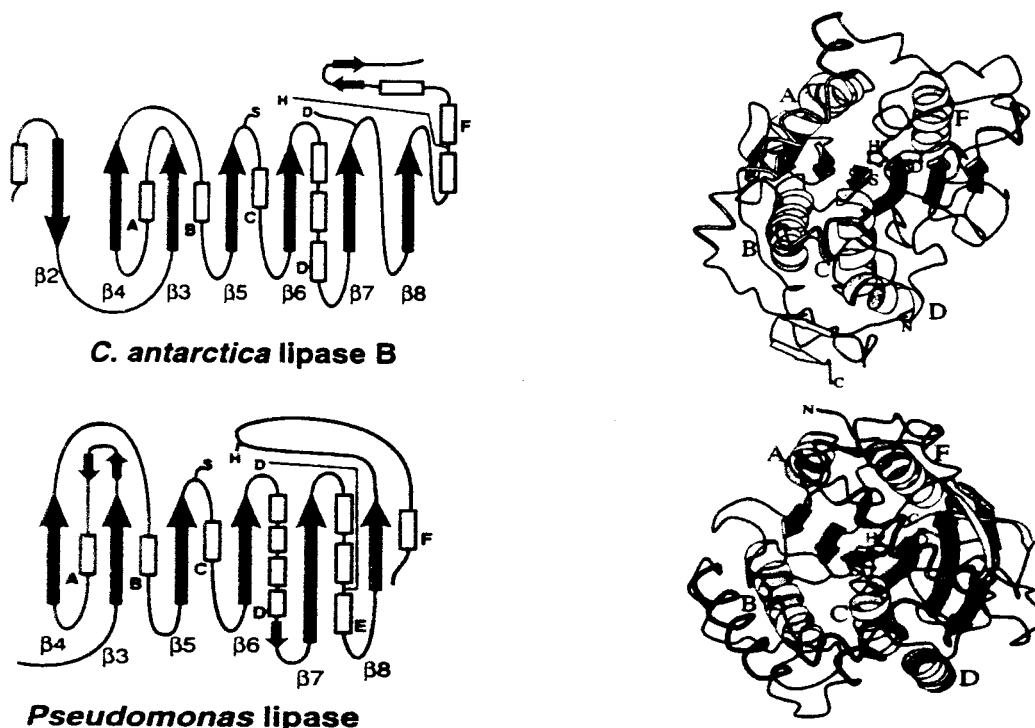
### 2.6.1 Gemeinsame Raumstruktur der $\alpha/\beta$ Hydrolasen

Lipasen haben zusammen mit Esterasen und Hydrolasen ein gemeinsames Faltungsmuster, die sogenannte  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Faltung. Der innere Aufbau ist ein mehrsträngiges  $\beta$ -Faltblatt, das von den verknüpfenden  $\alpha$ -Helices umgeben ist.

Das Serin der katalytischen Triade liegt in einer Haarnadelschleife zwischen einer  $\alpha$ -Helix und einem  $\beta$ -Strang mit der hochkonservierter Sequenz aus den fünf Aminosäuren (G-X-S-X-G). Bei einer Überlagerung der Raumstrukturen

verschiedener Lipasen ist die relative Lage der Aminosäuren der katalytischen Triade im Raum sehr ähnlich, selbst bei fehlender Sequenzähnlichkeit und wenn die verbleibende Struktur deutliche Unterschiede aufweist (Abb. 2.11).

Es gibt vier Gruppen von Enzymen, die eine solche katalytische Triade enthalten und durch konvergente Evolution eines stabilen und funktionellen aktiven Zentrums als strukturell verwandt angesehen werden können: eukaryotische Serin-Proteasen, Cystein-Proteasen, Subtilisine und  $\alpha/\beta$ -"Hydrolase-fold" Enzyme.



**Abb. 2.11:** Vergleich des  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Faltungsmusters von *Ca L B* und *Ps. Lipase* (schwarz  $\beta$ -Faltblatt) aus (Theil, 1997).

### 2.6.2 Offene und geschlossene Raumstrukturen von Lipasen

Für verschiedene Lipasen gelang es inzwischen, röntgenstrukturanalytisch hochaufgelöste Raumstrukturen zu ermitteln. Die meisten dieser Strukturen liegen im geschlossenem Zustand vor, einige wenige vermitteln aber auch Einblicke in den offenen oder halboffenen Zustand.

Der offene Zustand kann durch den Einbau eines kovalent gebundenen Inhibitors (z. B. Diethylphosphat) erzwungen werden, der eine ähnliche Geometrie wie das Substrat im tetrahedralen Zwischenzustand besitzt. Von CRL und CAL B gibt es offene Strukturen sowohl

mit und ohne kovalent gebundenem Inhibitor. Es ist nicht bekannt, welche Faktoren den offenen Zustand ohne gebundenen Liganden im Kristall stabilisieren können (Cygler et al., 1994).

Abbildung 2.12 zeigt eine Überlagerung der experimentell bestimmten Strukturen der Lipase aus *Rhizomucor miehei* in offener (gelb) und geschlossener (orangerot) Konformation. Die katalytische Triade ist in rot dargestellt, vom verbleibenden Protein ist schematisch nur der Verlauf der ProteinHauptkette dargestellt.

Das Vorliegen und die Bedeutung eines solchen beweglichen Strukturelements über dem aktiven Zentrum wurde inzwischen auch für die

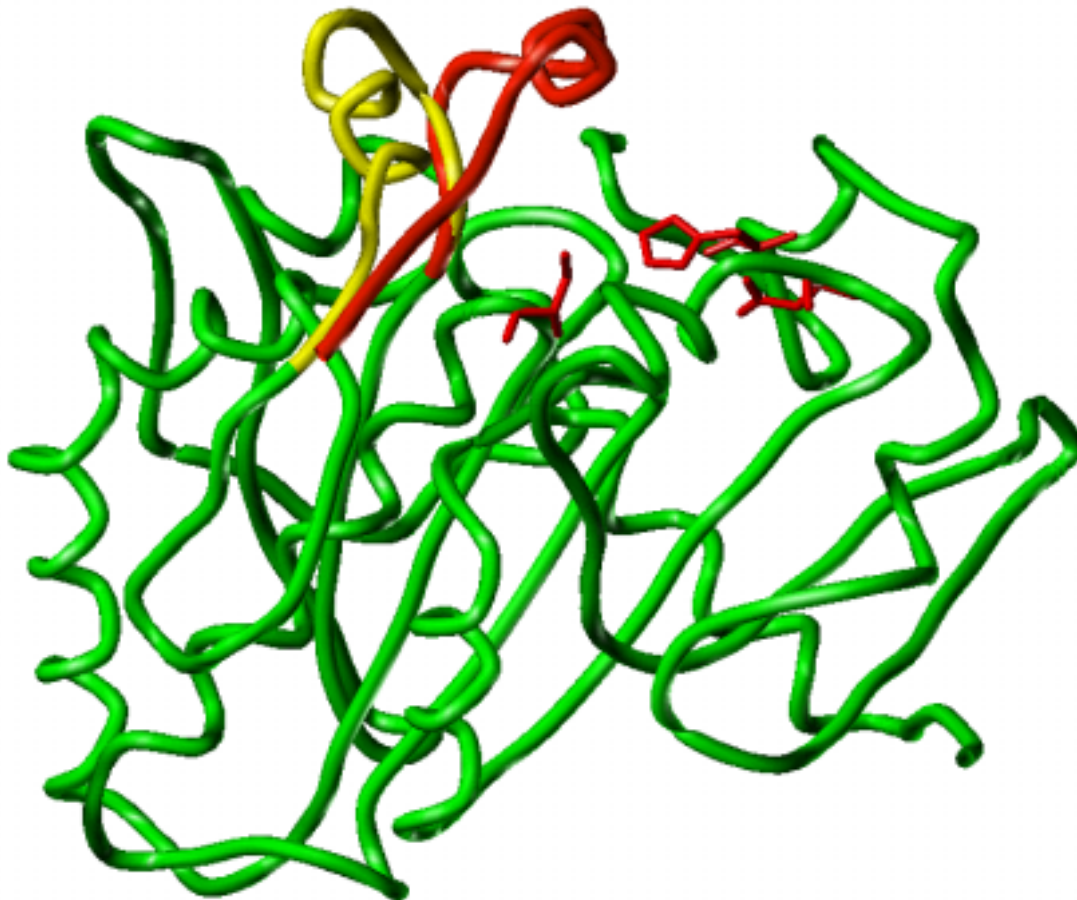


Abbildung 2.12: offene („Lid“ gelb) und geschlossene („Lid“ orangerot) Struktur von RML, akt. Zentrum rot

Lipasen aus *Geotrichum candidum* (Schrag & Cygler, 1993), *Candida rugosa* (Grochulski *et al.*, 1993; Grochulski *et al.*, 1994b) *Candida antartica* B (Uppenberg *et al.*, 1995), *Pseudomonas glumae* (Noble *et al.*, 1993), *Rhizopus delemar*, *Penicillium camembertii* (Derewenda *et al.*, 1994) und *Humicola lanuginosa* (Brzozowski *et al.*, 2000; Lawson *et al.*, 1994) nachgewiesen.

Am Beispiel der *Humicola lanuginosa*-Lipase konnte mit Hilfe von mehreren geschlossenen, halboffenen und offenen Strukturen unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen ein Mechanismus für die Bewegung des "Deckels" postuliert werden, der über die Isomerisierung einer Disulfid-brücke und die Konformationsänderung eines Arginins ausgelöst wird (Brzozowski *et al.*, 2000). Ein besonderer Mechanismus, der die Anwesenheit einer Colipase erfordert, konnte für die humane Pankreaslipase (van Tilbeurgh *et al.*, 1993), die Pankreaslipase des Pferdes (Bourne *et al.*, 1994), und Lipoprotein-Lipase (Dugi *et al.*, 1992) nachgewiesen werden.

Ob dabei auch weitere Konformationsänderungen im Inneren des aktiven Zentrums stattfinden, scheint für jede Lipase unterschiedlich sein. Für RML (*Rhizomucor miehei*) und *Pseudomonas glumae* wurden solche Veränderungen im Vergleich zu den offenen Strukturen homologer Lipasen beobachtet.

Im Fall der CrL (*Candida rugosa*) (Grochulski *et al.*, 1994a) und CaL B (*Candida antartica* B) (Uppenberg *et al.*, 1995) scheint dagegen keine Konformationsänderung in der Anordnung der katalytischen Reste und des "Oxyanion-hole" stattzufinden.

Für CAL B wird aufgrund von kinetischen Untersuchungen, die keine Interphasenaktivierung nachweisen konnten, die Funktionalität des "Lid" in Frage gestellt (Martinelle, Holmquist & Hult, 1995). Bei der Cutinase, die Triglyceride hydrolysiert, aber keinen "Lid" besitzt und so als eine Art Zwischenstufe zwischen Lipasen und Esterasen angesehen werden kann, zeigen Strukturuntersuchungen, dass sich die Konformation der katalytischen Reste nicht ändert (Martinez *et al.*, 1994; Prompers *et al.*, 1999).

In Anwesenheit eines kovalent gebundenen Inhibitors wurde jedoch eine Anpassung der übrigen Reste in der Bindungstasche der Cutinase (Carvalho, Aires-Barros & Cabral, 1999) ("induced fit") festgestellt. Untersuchungen der Dynamik mit Hilfe der NMR-Spektroskopie am Protein-Rückrat der Cutinase (Prompers *et al.*, 1999) zeigen eine erhöhte Mobilität der Reste in der Bindetasche auf einer Zeitskala im Millisekundenbereich, d. h. Bewegungen, die in der Größenordnung der Katalysegeschwindigkeit für einen Substratwechsel liegen.

### 2.6.3 Lipasen mit bekannter Raumstruktur

In der folgenden Auflistung (Tabelle 2.1) sind die bakteriellen und pilzlichen Lipasen, von denen bis zum Jahr 2000 die Raumstruktur aufgeklärt und veröffentlicht wurde, zusammengefasst. Zusätzlich ist die humane Pankreaslipase, die im Komplex mit einer Colipase aufgeklärt werden konnte und die Cutinase, von der eine Reihe Mutanten untersucht wurden, aufgeführt.

Angegeben ist der jeweilige PDB-Code aus der Proteindatenbank sowie die vorliegende "Lid"-Konformation zusammen mit der gegebenenfalls möglichen Präsenz eines kovalent gebundenen Inhibitors.

Trotz der grossen Zahl an Strukturen mit gebundenen Inhibitoren ist bisher nur ein Beispiel (*Candida rugosa: 1lps/1lpo*) mit chiralen Inhibitoren bekannt, die einen direkten Vergleich der beiden Bindungsmoden der gebundenen Enantiomere ermöglichen.

Tab. 2.1: Vorliegende Lipasestrukturen mit Abkürzung und PDB-Einträgen

Name	Organismus	geschlossen	offen	mit Inhibitor (fett = chiral)
CaL	<i>Candida antarctica</i> B	-	1tca 1tcb1tcc	1lbs Tween80 1lbt n-Hexyl-ethyl-phosphonat
CrL	<i>Candida rugosa</i>	1lpp	1crl	1lpn Dodecane-sulfonat <b>1lps (1S)-Menthyl hexyl phosphonat</b> <b>1lpo (1R)-Menthyl hexyl phosphonat</b>
GcL	<i>Geotrichum candidum</i>	1thg	-	
HIL	<i>Humicola lanuginosa</i>	1tüb 1du4 1dte 1dt3 1dt5	1tic,1dt5	1ein Polyoxyethylen-5-octyl-ether
PcL	<i>Pseudomonas cepacia</i>		1oil 2lip 3lip	<b>4lip R-Dioctylglycero-3octylphosphonat</b> <b>5lip R-Dibutylglycero-3butylphosphonat</b> <b>1hqd 1-Phenoxy-2-acetoxy butan</b>
PgL (BpÖ)	<i>Pseudomonas glumae</i> ( <i>Burkholderia plantarii</i> )	1tah 1qge 1cvl <i>C. viskosum</i>	-	
PaL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<b>1ex9 R-dioctylglycero-3octylphosphonat</b>
RdL	<i>Rhizopus delemar</i>		1tic	
RmL	<i>Rhizomucor miehei</i>	1tgl 2tgl 3tgl	-	4tgl Diethylphosphonat 5tgl n-Hexyl-ethyl-phosphonat
HuPL	human pancreatic Lipase + <i>sus scrofa</i> Colipase (pig)			1lpa Diundecyl phosphatidyl cholin 1lpb Undecane-methyl phosphonat
FsC	<i>Fusarium solani</i> Cutinase	1agy 1cex 1oxm 33 Cutinase-Mutanten 1cuu-1cuz 1ffa-1ffe 1xza-1xzj	(no LID)	2cut Diethyl-para-nitrophenyl phosphonat 1xzk Di(isopropyl) phosphonat 1xzl n- Hexyl-ethyl-phosphonat



### **3 KENNTNISSTAND ÜBER DEN EINSATZ VON LIPASEN**

#### **3.1 Pharmazeutische und industrielle Einsatzmöglich- lichkeiten von Lipasen**

Lipasen sind vor allem aus zwei Gründen interessante Untersuchungsobjekte: Zum einen liegt ihre Bedeutung im medizinischen Bereich. Im Lipidstoffwechsel steuern sie den Abbau von Fetten und werden dabei durch Gallensäuren aktiviert. Störungen im Lipidstoffwechsel führen zu Krankheiten. In Hinblick auf diesen Aspekt werden diagnostische Systeme, Hemmstoffe oder Aktivator entwickelt. lipasehaltige Substitutionspräparate und Lipase-Inhibitoren haben deshalb auch pharmakologische Bedeutung erlangt. Prominentester Hemmstoff ist Tetrahydrolipstatin (Orlistat, Xenical®), das die Fettspaltung im Darm durch die irreversible Hemmung der Pancreaslipase unterbindet und von Roche als Schlankheitsmittel auf den Markt gebracht wurde.

Zum Anderen sind aber die katalytischen Fähigkeiten für ihre Bedeutung verantwortlich. Lipasen haben ein relativ weites Substratspektrum; sie sind nicht auf die Spaltung von Triglyceriden beschränkt. Es gibt hochselektive Lipasen, die zwischen Enantiomeren eines Substrats unterscheiden können. Viele Lipasen sind auch in organischen Lösungsmitteln stabil und aktiv, wodurch sich weitere Einsatzmöglichkeiten ergeben.

#### **3.1.1 Waschmittel**

Der größte Einzelmarkt für Lipasen ist ihr Einsatz als Waschmittelzusatz (Arbige und Pitcher, 1989). Hier werden sie zusammen mit anderen mikrobiellen Enzymen (Proteasen, Amylasen, Cellulasen) zum Erreichen gleicher Waschleistung bei niedrigerer Temperatur und besserer Umweltverträglichkeit eingesetzt. Dazu werden Lipasen beispielsweise aus *Pseudomonas spec.*, vertrieben von den Firmen Genencor und Gist-Brocades, eingesetzt. (Boston *et al.*, 1993; Lentius *et al.*, 1993). Novo Nordisks "Lipolase®", eine Lipase aus *Humicola lanuginosa*, exprimiert in *Aspergillus oryzae*, ist seit vielen Jahren als Waschmittelzusatz auf dem Markt und wird in Mengen von mehreren 100 Tonnen eingesetzt. Damit ist es das erste rekombinante Enzym, dessen Verwendung im Haushaltsprodukten und Freisetzung in die Umwelt von den EU-Mitgliedsstaaten genehmigt wurde (Schmid & Verger, 1998).

#### **3.1.2 Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie**

Die industrielle Hydrolyse von Fetten ist von großem wirtschaftlichen Interesse. Lipasekatalysierte Reaktionen können bei normalem Druck am Temperaturoptimum des Enzyms von ca. 30 - 60°C durchgeführt werden. Dadurch ergibt sich eine Energieersparnis und durch die größere Selektivität eine vereinfachte Aufarbeitung der Produkte. Eine weitere Einsatzmöglichkeit von Lipasen ist die enzymatische Herstellung von Monoacylglyceriden als Detergenzien und Emulgatoren.

### 3.1.3 Esterifikation und Interesterifikation

Esterifikation ist die Umkehrreaktion der Hydrolyse. In einem System mit niedriger Wasseraktivität kann eine Lipase die Esterverknüpfungen von freien Fettsäuren und Alkoholen katalysieren. Die Hauptanwendung von Lipasen ist die kinetische Racematspaltung durch Esterifikation in organischem Medium. Die Esterifikation ist leichter steuerbar als die Hydrolyse, da durch stetiges Entfernen des Produkts eine vollständige Umsetzung erreicht werden kann. Eine weitere elegante Methode zur Vermeidung der Rückreaktion ist der Einsatz von Estern des Vinylalkohols zur Präacylierung des Enzyms, da der freiwerdende Vinylalkohol spontan zum Ethanal (Acetaldehyd) weiterreagiert (Martinelle & Hult, 1995).

Ein vielversprechendes Einsatzgebiet von Lipasen ist die Interesterifikation, d. h. der Austausch einer Alkoholgruppe gegen eine andere. Speziell in der Nahrungsmittelindustrie ist ein solcher selektiver Austausch zur Fettveredelung von Interesse.

Für die Esterifikation gibt es zwei Probleme:

a) Um einen niedrigen Wassergehalt des Reaktionssystems über die Dauer der Reaktion zu gewährleisten, muss Wasser im gleichem Maß abgezogen werden, wie es durch die Reaktion gebildet wird.

b) Die Konzentration der freien Fettsäuren muss niedrig gehalten werden, um den pH-

Wert nicht in einen Bereich zu verschieben, in dem die meisten Lipasen inaktiviert werden.

## 3.2 Selektivität

Organisch-chemischen Reaktionen können oftmals zu verschiedenen Endprodukten führen. Je nach Reaktionsführung ist es möglich, die Nebenreaktionen zu unterdrücken und selektiv ein Produkt zu erhalten. Angesichts der großen Vielfalt chemischer Reaktionen wurde der Begriff der Selektivität weiter spezifiziert. Man unterscheidet drei verschiedene Aspekte:

### *I. Chemoselektivität:*

Die Stöchiometrie der konkurrierenden Reaktionen ist unterschiedlich und die Summenformeln der möglichen Produkte sind verschieden. Ein Beispiel bietet die Reduktion von Trichlorethanal, die zu Acetaldehyd oder zu 2,2,2-Trichlorethanol führen kann.

### *II. Regioselektivität:*

Die konkurrierenden Reaktionen haben die gleiche Stöchiometrie, die Produkte sind Konstitutionsisomere, z. B. 1-Chlorpropan und 2-Chlorpropan bei der Addition von Chlorwasserstoff an Propen. Im Bereich der Lipasen bedeutet Regioselektivität, dass bevorzugt an Position 1 oder 3 von Triacylglycerolen gespalten wird, nicht aber an Position 2.

### *III. Stereoselektivität:*

Die entstehenden Produkte sind Stereoisomere.

Man klassifiziert weiter in Diastereoselektivität und Enantioselektivität.

In dieser Arbeit wird eine stereoselektive, enzymatisch katalysierte Reaktion untersucht.

### 3.2.1 Stereospezifische Katalysen

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur stereospezifischen Katalyse können mit Hilfe von Lipasen auch optisch reine Produkte hergestellt werden, die synthetisch nur unter erheblich grösserem Aufwand hergestellt werden könnten, z. B. enantiomerenreine sekundäre Alkohole.

Die Mehrzahl von Pharmazeutika und Agrochemikalien, die chirale Zentren enthalten, werden heute als racemische Gemische verkauft (Bommarius, Schwarm & Drauz, 1998). Lipasen können aufgrund ihrer Stereospezifität in Verfahren eingesetzt werden, die dann nur die gewünschten Enantiomere liefern (Mochizuki *et al.*, 1993). Die Entwicklung in diesem Bereich ist mittlerweile so weit fortgeschritten, dass Lipasen inzwischen zu einem beliebten, häufig verwendeten Werkzeug in vielen organisch-chemischen Laboratorien geworden sind.

Folglich werden lipasekatalysierte Reaktionsschritte, insbesondere in organischen Lösungsmitteln, immer mehr in Syntheserouten eingebaut, vor allem dann, wenn die optische Reinheit des Produktes von essentieller Bedeutung ist (Jaeger & Reetz, 1998; Kazlauskas, 1993).

#### 3.2.1.1 Kinetische Racematspaltung

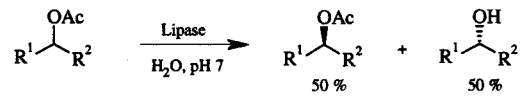
Eine der Hauptanwendungen von Lipasen die Trennung von Enantiomergemischen.

Typische Substrate für lipasekatalysierte Racematspaltungen sind Ester oder Amide unverzweigter Carbonsäuren mit stereogenem Zentrum oder Carbonsäureester gebildet mit chiralen primären oder sekundären Alkoholen. Weiterhin wird sogar die Hydrolyse von Carbonsäureamiden zu Aminen durchgeführt (Balkenhohl *et al.*, 1997; Gotor, 1999; Reetz & Dreisbach, 1994).

Das Enzym ist als enantiomerenreiner Katalysator in der Lage, mit den spiegelsymmetrischen Formen eines chiralen Substrates zueinander diastereomere Enzym-Substrat-Komplexe auszubilden. Wenn die Bildung dieser Komplexe dem geschwindigkeitsbestimmenden Übergangszustand der enzymkatalysierten Reaktion entspricht, werden die beiden Substratenantiomere mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt. Die Differenz der freien Enthalpie  $\Delta\Delta G^*$  der diastereomeren Übergangszustände und das daraus resultierende Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten  $k_1/k_2$  ist ein Maß für die Stereoselektivität dieser Reaktion.

Das Racemat eines Esters mit einem stereogenen Zentrum im Alkoholteil kann enzymatisch hydrolysiert werden. Unter der Voraussetzung, dass die Lipase den gewählten Carbonsäureester als Substrat mit ausreichend hoher Aktivität umsetzt, wird im Idealfall nur ein Stere-

oisomeres des Racemats vollständig zum Alkohol hydrolysiert; das andere Enantiomer bleibt unverändert als Ester zurück. Der enantiomerenreine freie Alkohol kann dann mit physikalischen Methoden vom Ester abgetrennt werden.



Als Kenngröße der Enantioselektivität einer Reaktion kann dann der sogenannte ee-Wert (Enantiomerenüberschuss, enantiomeric excess, % ee) der Produkte bestimmt werden. Er ist ein Maß für das Enantiomerenverhältnis in einer Mischung zweier Enantiomere. Definiert ist er als:

$$ee \text{ des Produkts: } \% ee_P = \frac{X_A - X_B}{X_A + X_B} \times 100$$

$X_A, X_B$ : molare Fraktionen der Produkt-Enantiomer (Chen & Tsai, 2000; Xie, Liu & Chen, 1998).

Beide Enantiomere können in einer Ausbeute von maximal 50 % und mit einem ee von 100 % anfallen, wenn der Umsatz des langsameren Enantiomers praktisch gleich null ist und das schnellere Enantiomer vollständig hydrolysiert wird. In der Realität wird dieser Idealfall selten erreicht, da auch das weniger reaktive Enantiomer teilweise hydrolysiert wird und die Reaktion abgebrochen wird, bevor das schnelle Enantiomer vollständig umgesetzt ist. Die Enantiomerenreinheit der Produkte und der verbleibenden Edukte ist daher auch vom Umsatz der Reaktion zum Zeitpunkt des Abbruchs abhängig.

Um Reaktionen ohne Angabe von kinetischen Parametern vergleichen zu können, wurde von Sih der E-Wert (enantiomeric ratio) eingeführt. Dieser Wert gibt das Verhältnis der Anfangsgeschwindigkeiten beider Enantiomere an. Er ist für jede biochemische Reaktion eine Konstante für die gewählten Reaktionsbedingungen.

$$E = \frac{k_1(R)}{k_2(S)} = \frac{K_{kat}/K_M(R)}{K_{kat}/K_M(S)} = k \cdot \exp\left(-\frac{\Delta\Delta G^*}{RT}\right)$$

gen.

Kennt man den E-Wert einer Reaktion, kann man den Enantiomerenüberschuss zu einem bestimmten Zeitpunkt bei gegebenem Umsatz  $c$  theoretisch berechnen. Umgekehrt ist es möglich, aus dem gemessenen Umsatz und dem experimentell bestimmten Enantiomerenüberschuss des Produkts P oder des verbliebenen Substrates S den E-Wert zu bestimmen.

$$E = \frac{K_{kat}/K_M(R)}{K_{kat}/K_M(S)} = \frac{\ln[1 - c(1 + ee_P)]}{\ln[1 - c(1 - ee_P)]}$$

$$c = \frac{ee_S}{ee_S + ee_P}$$

Ein Beispiel für die technische Anwendung und Optimierung im Rahmen der Synthese eines Arzneistoffes ist die durch *Candida antarctica* Lipase B (NOVOZYM 435, Novo Nordisk A/S) katalysierte Racematspaltung von (R,S)-Ibuprofen-2-Chlorethylester (Mustranta, 1992). Im Laufe der Entwicklung konnte die Stereoselektivität durch geeignete Lösungsmittel mit definiertem Wassergehalt auf über 98% ee S(-)-Ibuprofen erhöht werden.

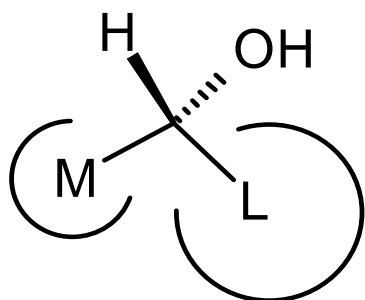
Eine weitere Optimierung des Verfahrens gelang durch den Einsatz einer Lipase aus *Candida rugosa* und durch Verwendung des Butylesters in Hexan unter Zusatz von Phosphorpenoxid als Trocknungsmittel, um das bei der Esterhydrolyse entstehende Reaktionswasser aus dem Gleichgewicht zu entfernen (Lakshmi *et al.*, 2000). Dadurch konnte die Ausbeute an (S)-Ibuprofen aus dem Racemat auf 49 % gesteigert werden.

### 3.2.1.2 Stereospezifität für sekundäre Alkohole

Zur Vorhersage der bevorzugt umgesetzten Form eines chiralen Substrates hat Kazlauska eine empirische Regel für sekundärer Alkohole aufgestellt, die für viele Lipasen und Esterasen gilt (Cygler et al., 1994). Später wurde sie auf  $\alpha$ -substituierte, chirale Carbonsäuren erweitert (Ahmed et al., 1994).

Diese Regel besagt, dass das in Abbildung 3.1 abgebildete Enantiomer bevorzugt umgesetzt wird, wenn M ein Substituent mittlerer Größe ist und L ein größerer Substituent, der typischerweise mindestens fünf Kohlenstoffatome umfaßt, und dabei auch verzweigt sein kann. Eine Erklärung dieser Regel durch Kazlauska et al. basiert auf der relativen Größe der Substituenten am Stereozentrum.

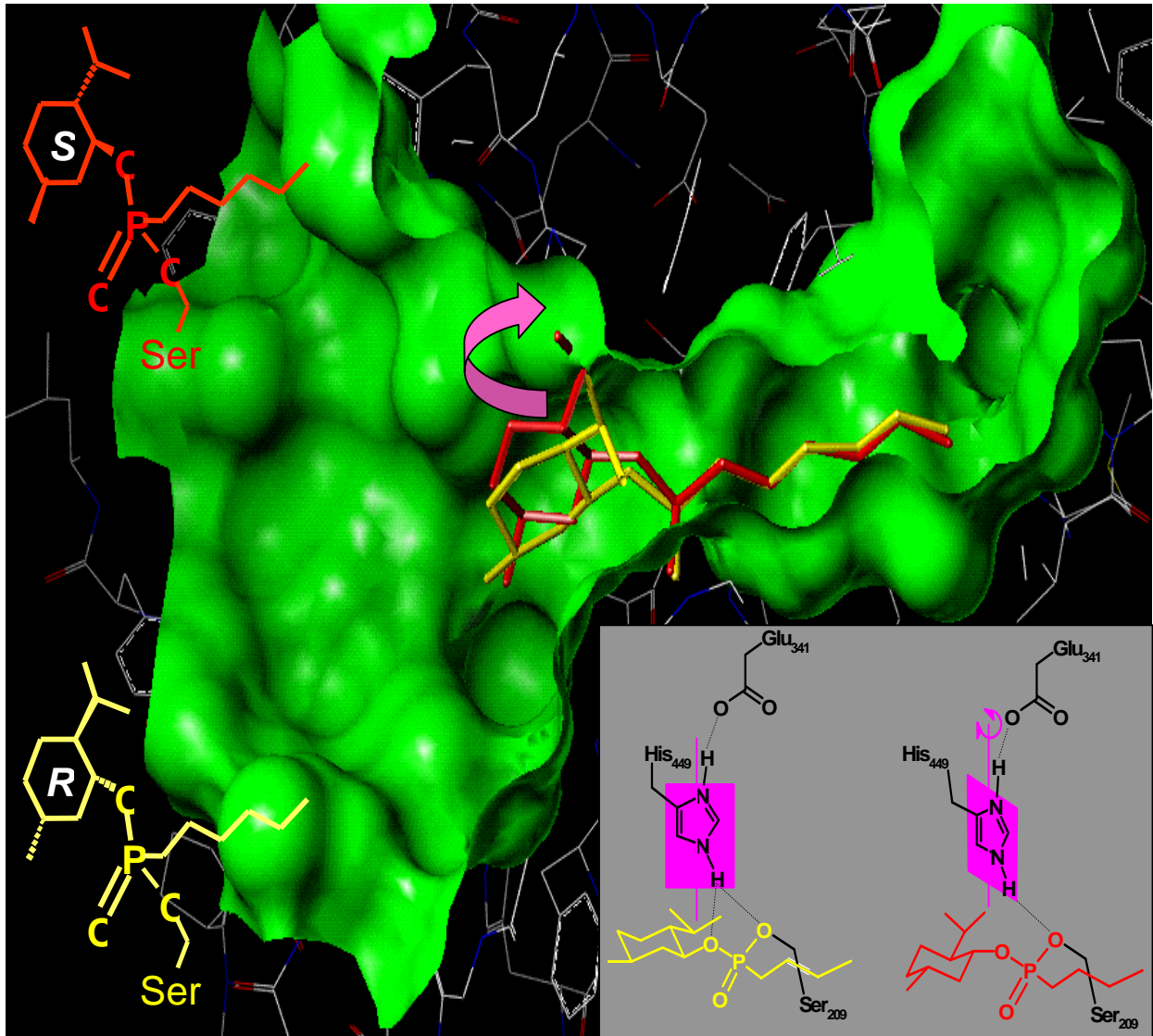
Eine Teil der untersuchten Enzyme und Substrate läßt sich nicht nach dieser Regel klassifizieren. Dies führt oft zu einer falschen Vorhersage der Enantiopräferenz. Insbesondere die in dieser Arbeit untersuchten Stereopräferenzen von *Candida antarctica* Lipase B gegenüber sekundären Aminen und Alkoholen folgen nicht der Kazlauskas-Regel.



**Abb. 3.1:** Kazlauskas Regel zur Enantiopräferenz von sekundären Alkoholen mit Lipasen

Cygler et al. erklären die Substratspezifität anhand der räumlichen Geometrie der Enzym-Substrat-Komplexe. Sie benutzten dazu die Kristallstrukturen der Lipase von *Candida rugosa* mit kovalent gebundenen Inhibitoren, die als Substratanaloga den Übergangszustand imitieren. Die Inhibitoren wurden von beiden enantiomeren Formen des chiralen Menthol abgeleitet, um die Gültigkeit der Kazlauska-Regel für die kinetischen Racematspaltung strukturell zu untersuchen. (Cygler et al., 1994)

Wie aus der Abbildung 3.2 hervorgeht, ist die Raumstruktur des langsamer reagierende (1S)-Enantiomers durch eine Störung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Histidin des aktiven Zentrums und dem Substrat im tetraedrischen Übergangszustand gekennzeichnet, womit die geringe katalytische Aktivität in Verbindung gebracht wird. Die Enantiopräferenz wird in diesem Modell nicht durch eine vom katalytischen Zentrum getrennte Bindungsstelle für sekundäre Alkohole erklärt, sondern durch die Interaktion mit den essentiellen Teile des katalytischen Apparates. Da die räumliche Anordnung der katalytischen Reste für viele Lipasen und Esterasen sehr ähnlich ist, lässt sich eine allgemeine Gültigkeit der Kazlauskas-Regel ableiten (Kazlauskas, 1994). Warum sie in manchen Fällen nicht anwendbar ist, ist aus diesem Modell heraus nicht zu verstehen.



**Abb. 3.2** : Kristallstruktur der Bindetasche von *Candida Rugosa* Lipase mit gebundenem R-Mentyl-Phosphonat-Inhibitor (gelb, schnelleres Enantiomer). Zusätzlich ist der S-Mentyl-Phosphonat-Inhibitor (rot, langsames Enantiomer) aus einer zweiten Röntgenstruktur überlagert. Die Oberfläche des Enzyms wurde aus der Struktur mit gebundenem R-Menthyl berechnet. Es ist deutlich zu erkennen, wie die Isopropylgruppe des S-Mentyl-Restes mit dem Enzym in seiner aktiven Konformation kollidieren würde. Unten rechts ist der Unterschied der beiden Röntgenstrukturen als Schema wiedergegeben. Um die oben verdeutlichte Kollision zu vermeiden, liegt Histidin 449 in der Raumstruktur mit dem S-Mentyl Inhibitor in einer vom Substrat weggedrehten Konformation vor und verliert so die Wasserstoffbrücke zum Ester-Sauerstoff. Dies wird mit der geringeren katalytische Aktivität bei der Esterspaltung in Verbindung gebracht. (Cygler et al., 1994)

### 3.3    Computergestützte Vorhersage der Enantioselektivität

Einfache quantitative Modelle und die Raumstrukturen mit gebundenen Inhibitoren haben viel zum Verständnis der Stereoselektivität lipasekatalysierter Reaktionen und den zu Grunde liegenden Mechanismen beigetragen (Kazlauskas, 2000).

Für Enzyme mit bekannter Raumstruktur wurde ein Modell des tetraedrischen Übergangszustandes für beide Enantiomere modelliert und dann die sterischen und geometrischen Eigenschaften der beiden statischen Komplexe verglichen (Uppenberg *et al.*, 1995).

Eine qualitative Abschätzungen der Enantioselektivität mit computergestützten Methoden konnte durch Abschätzung der relativen potentiellen Energie des tetraedrischen Substrat-Enzym-Komplexes in der Bindetasche mit Hilfe von Kraftfeldrechnungen erzielt werden (Haeffner, Norin & Hult, 1998).

Die unterschiedlichen Konformationen für die jeweiligen Enantiomere wurden aus molekulardynamischen Simulationen oder Docking-Experimenten erhaltenen (Tafi *et al.*, 2000).

Da die Energiewerte aus den Kraftfeldrechnungen des gesamten simulierten Enzym-Substrat-Komplexes die zu bestimmende Energiedifferenz zwischen den beiden Enantiomeren um mehrere Größenordnungen übersteigt, kann jedoch die Gesamtenergie des Systems nicht zur quantitativen Vorhersage

herangezogen werden (Orrenius *et al.*, 1998b; Raza, Fransson & Hult, 2001).

Andere Untersuchungen konnten zeigen, dass bereits die Analysen eines Torsionswinkels der sn2-Fettsäurekette in Triacylglycerolen die korrekte Stereoselektivität im Hinblick auf sn1 oder sn3 für alle untersuchten Lipasen und Triacylglycerole vorhersagen konnte (Scheib *et al.*, 1999).

Die momentan zur Verfügung stehenden Methoden der computergestützten Modellierung von Enzymreaktionen sind aber noch nicht in der Lage, eine quantitative Vorhersage der Stereoselektivität zu gewährleisten (Kazlauskas, 2000).

Es gibt lediglich zwei Beispiele in der Literatur, die Stereoselektivität einer kinetischen Racematspaltung auch quantitativ korrekt vorhersagen, die im folgenden näher erläutert werden.

Eine semiquantitative Methode zur Vorhersage der Stereoselektivität der Lipase *Pseudomonas cepacia* gegenüber chiralen sekundären Alkoholen wurde von T. Schulz *et al.* vorgeschlagen (Schulz, Pleiss & Schmid, 2000). Die Autoren untersuchten das für die Katalyse essentielle Wasserstoffbrückennetz zwischen dem Substrat im tetraedrischen Übergangszustand und dem benachbarten Histidin der katalytischen Triade.



Die Korrelation der Länge der modellierten Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoff der zu spaltenden Esterbindung und dem Stickstoff des Histidins für das langsamere Enantiomer dient bei dieser Abschätzung zur Unterscheidung von stark und wenig enantioselektiven Reaktionen.

Ein anderer Ansatz verfolgt die Simulation des tetradrischen Übergangszustandes in *Candida antactica* Lipase B mit aufwendigeren molekulardynamischen Methoden. Es wurde ebenfalls nur eine Auswahl von essentiellen Wechselwirkungen zur Energiebetrachtung verwendet. Durch eine geeignete Zahl von Parametern konnte der enthalpische Beitrag zur Enantioselektivität quantitativ richtig abgeschätzt werden (Raza *et al.*, 2001). Sie stimmen mit den am gleichen System gemessenen experimentellen Daten für die Aktivierungsenthalpie überein. (Ottosson & Hult, 2001). Diese Untersuchungen der Temperaturabhängigkeit der kinetischen Racematspaltung und die Auswertung der Aktivierungsentropie und -enthalpie konnten zeigen, dass die erzielte Enantioselektivität auch von einem entropischen Faktor abhängen muss.

Da dieser Faktor in der energetischen Auswertung der molekulardynamischen Simulation des tetradrischen Intermediates bisher nicht berücksichtigt wurde, war eine quantitative Vorhersage der Enantioselektivitäten nur eingeschränkt möglich.

Eine weitere Grundannahme, deren Gültigkeit bisher nicht eindeutig bewiesen ist, beruht in der Vermutung, dass das tetraedrische Intermediat dem die Enantioselektivität bestimmenden Übergangszustand der Reaktion entspricht.

Der tatsächliche Übergangszustand der Reaktion im Verlauf der Bindungs-spaltung oder -verknüpfung ist mit den bisher angewandten Kraftfeldrechnungen prinzipbedingt nicht zugänglich (Wang *et al.*, 2001). Die Simulation des gesamten Reaktionspfades erfordert die Anwendung quantenmechanischer Rechnungen auf das Enzym-Substrat-System. Diese Rechnungen bedeuten allerdings einen extremen Rechenaufwand für enzymatische Systeme.

Eine erfolgsversprechende Methode scheint daher die Entwicklung kombinierter Anwendung molekülmechanischer (MM) Methoden für das Enzym und quantenmechanischer Berechnungen (QM) für die Atome des Reaktionszentrums zu sein (Kollman *et al.*, 2001).

### 3.4 Mutagenese von Lipasen

Rekombinant hergestellte Lipasen können durch gezieltes Einbringen von Punktmutationen in das zugehörige Gen und damit den gerichteten Austausch von Aminosäuren abgewandelt werden.

Diese Technik wurde zunächst zur Identifikation von katalytischen Aminosäuren (Ser, His, Asp) eingesetzt (Frenken *et al.*, 1992), wobei die Austausche der katalytisch essentiellen Aminosäuren eine deutliche Reduktion der Aktivität bedingen.

Erst später gelang es, die Stabilität und katalytische Aktivität durch gezielte Veränderungen zu optimieren und eine Verbesserung der Enzymeigenschaften auf einen bestimmten Anwendungszweck hin zu erreichen.

Erste anwendungsbezogene Erfolge waren die Verbesserung von Proteaseresistenz und Enzymstabilität in peroxidhaltigen Waschflotten. Dabei gelang es NOVO NORDISK AS mit der Lipase aus *Humicola lanuginosa* und UNILEVER mit einer bakteriellen Lipase aus *Pseudomonas glumae* gezielte, stabilitätsverbessernde Mutationen einzubringen.

Zum Erhöhen der Proteasestabilität wurde gezielt die Umgebung der Spaltstellen durch Einführung von Prolinen und geladenen Aminosäuren verändert. Der Austausch kurzer Loops gegen solche mit bekannter Proteasenempfindlichkeit führte ebenfalls zum Erfolg. Im Falle der Lipase aus *Ps. glumae* befand sich eine Protease-Spaltstelle genau im Ankerpunkt

des beweglichen "Lids". Die Mutationen wirkten sich jedoch negativ auf die katalytischen Eigenschaften des Enzyms aus.

Die Verbesserung der Oxidationsempfindlichkeit von Lipasen gelang durch den konservativen Austausch aller oxidierbaren Aminosäuren wie z.B. Methionin gegen Leucin (Patkar *et al.*, 1998).

Die Temperaturstabilität von Lipasen konnte nach Bekanntwerden der dreidimensionalen Struktur durch die Einführung zusätzlicher Disulfidbrücken (Yamaguchi *et al.*, 1996) an Positionen, die analog zu bekannten Disulfidbrücken in homologen Enzymen waren, erhöht werden.

#### 3.4.1 Gerichtete Mutagenese

Mit zunehmendem Verständnis der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, der Reaktionsmechanismen und der Selektivitätskriterien von Lipasen ist es möglich geworden, die Lipasen erkenntnisgetrieben an ein bestimmtes Substrat oder eine Funktion anzupassen (Svendsen, 2000).

Zahlreiche Veröffentlichungen adressieren die direkte Umgebung der katalytischen Aminosäuren in der Bindetasche, um die Acylkettenlängenspezifität gegenüber Triacylglyceriden oder Acyl-p-Nitrophenolestern zu verändern (Joerger & Haas, 1994; Mannesse *et al.*, 1995b; Martinelle *et al.*, 1996). Diese Mutationsstudien verfolgen zum Teil gegensätzliche Strategien.

Zum Einen werden die oben erwähnten Erfolge in der Modellierung von Lipasen direkt zur gezielten Vorhersage von Mutanten mit veränderter Acylkettenlängenspezifität genutzt, um gezielt Mutationen einzubringen (Klein *et al.*, 1997; Manetti *et al.*, 2000; Scheib *et al.*, 1998). Zum Anderen wird das strukturelle Wissen erfolgreich eingesetzt, um Aminosäuren im aktiven Zentrum (Boston *et al.*, 1997) durch die Anwendung aminosäurespezifischer PCR-Mutagenese auszutauschen (Chang, Chen & Shaw, 1996).

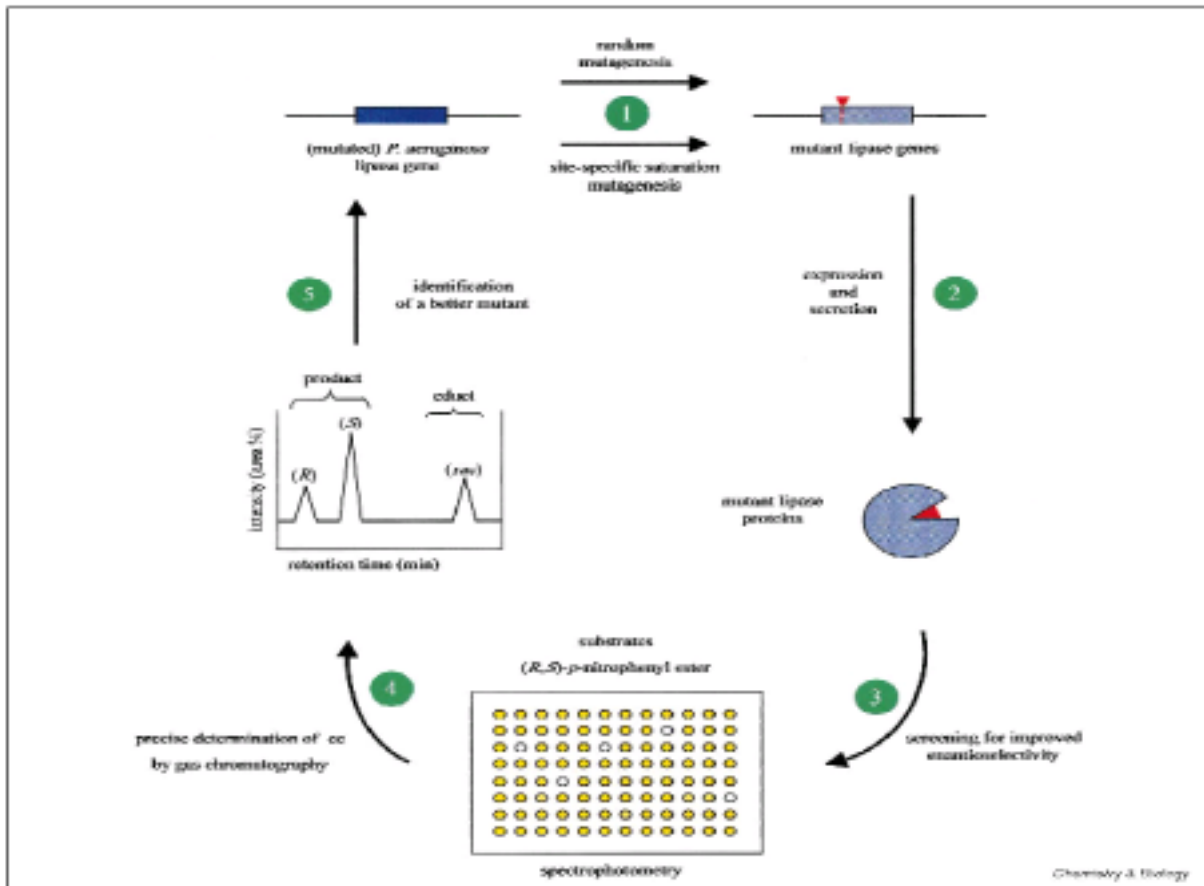
Auf diesem Wege ist es der Firma Genencor International gelungen, mit Hilfe von aminosäurespezifisch degenerierten Primern eine Bibliothek von ca. 14.000 zufälligen Lipasenmutanten einer *Pseudomonas mendocina* Lipase/Cutinase (LUMAFast®) aufzubauen und mit einem automatisierten zweistufigen Essay die verbesserten Mutanten zu identifizieren.

Im ersten Schritt wird in einem Essay die Aktivität des Enzyms qualitativ bestimmt. Erst in einem zweiten Essay werden die als aktiv indentifizierte Enzyme quantitativ auf ihre Kettenlängenspezifität gegenüber Acyl-p-Nitro-phenolaten in einem photometrischen Aktivitätstest untersucht (Boston *et al.*, 1997).

Eine gezielte Anpassungen einer Lipase im Hinblick auf eine Erhöhung der Enantioselektivität gegenüber primären oder sekundären Alkoholen wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Es wurde gezeigt, dass auch Mutationen ausserhalb des aktiven Zentrums im "Lid" des Enzyms einen starken Einfluss auf die Enantioselektivität kinetischer Racematspaltungen haben können (Reetz, 2000). Die Gründe für dieses Verhalten können aber beim derzeitigen Kenntnisstand über die enzymatischen Vorgänge auf molekularer Ebene noch nicht angegeben werden.

### 3.4.2 Ungerichtete Mutagenese

Wenn nur wenig über die genauen Ansatzpunkte bekannt ist, gewinnen Ansätze zur Zufallsmutagenese mit anschliessender Selektion der Mutanten nach den gewünschten Eigenschaften (gesteuerte Evolution) an Bedeutung. Mit Hilfe von Hochdurchsatz-Aktivitäts- und – Enantioselektivitäts-Bestimmungen in Kombination mit automatisierter Proteinexpression, wie sie aus der Genomforschung bekannt ist, ermöglicht es, mehrere hunderttausend Proteinmutanten durchzumustern und die erhaltenen, verbesserten Mutanten der ersten Generation einer erneuten Zufallsmutagenese zuzuführen (Abbildung 3.3) (Gaskin *et al.*, 1997; Rubingh, 1997).



**Abb 3.3** Flusschema der Optimierung einer Lipase durch gerichtete Evolution (aus(Liebeton et al., 2000))

- 1 Erzeugung von rekombinanten Enzymvarianten durch Zufallsmutagenese
- 2 Expression und Reinigung der Enzymvarianten
- 3 Hochdurchsatzaktivitätstest zur Vorauswahl
- 4 Quantitativer Selektivitätstest
- 5 Selektion und Klonierung der besten Enzymvariante

Die ersten Erfolge dieser Methode, der sogenannten gerichteten Evolution, bestanden in der Anpassung der Enzyme an organische Lösungsmittel (Moore & Arnold, 1996). Da Enzyme von der Natur auf eine wässrige Umgebung selektiert wurden, konnte in vielen Fällen eine drastische Steigerung der Enzymaktivität unter diesen nicht natürlichen Bedingungen erzielt werden (Arnold et al., 2001).

Dieser Ansatz erfordert in Gegensatz zur gerichteten Mutagenese keine Informationen, wie die Aminosäuren zur gewünschten Eigenschaft beitragen, oder welche Substitutionen von

Vorteil sein könnten. Die Auswahl des Essays zur Selektion der Mutanten ist die einzige Möglichkeit, das Ergebnis rational zu beeinflussen. Auf diese Weise konnte erstmals auch die Enantioselektivität gegenüber einer chiralen Säure gesteigert werden. Zur einfachen Analyse der Aktivität wurde die 2-Methyldecansäure als p-Nitrophenylester eingesetzt (Liebeton et al., 2000; Reetz, 2000). Die nachträgliche Analyse der Mutationen zeigte, dass keiner der ausgetauschten Reste im aktiven Zentrum lokalisiert ist (Nardini et al., 2000).

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Röntgenstrukturanalyse

Die Röntgenstrukturanalyse ist neben der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie eine etablierte Methode zur Aufklärung der 3D-Struktur von kleinen organischen Molekülen bis hin zu Proteinen. Eine notwendige Voraussetzung für die Strukturbestimmung mittels Röntgenbeugung ist die Züchtung geeigneter Kristalle eines Moleküls oder Proteins.

Während die NMR-Spektroskopie in Lösung auf „kleinere“ Proteinstrukturen bis derzeit maximal 40 kDa limitiert ist, gibt es im Falle der Röntgenkristallographie keine obere Grenze für die Masse der untersuchbaren Proteine.

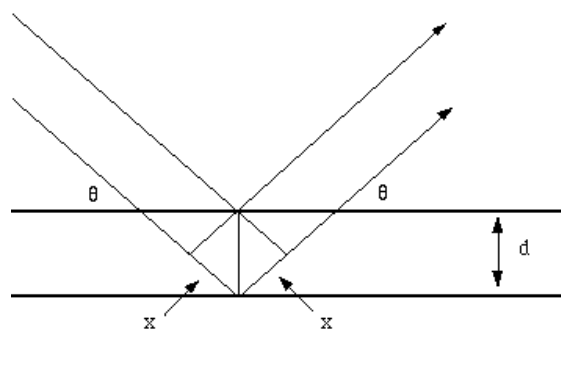
In einer Röntgenstruktur ist die Betrachtung des Systems nur als einer über alle Konfiguration der Moleküle im Kristall gemittelten Struktur möglich. Bewegliche Bereiche, die von Elementarzelle zu Elementarzelle nicht immer wieder die gleichen Konformationen annehmen, können so prinzipbedingt nicht in der Elektronendichte wiedergegeben werden. In der NMR-Spektroskopie stellt sich dieses Problem anders, da es davon abhängt, ob im Rahmen der Zeitauflösung des NMR-Experiments multiple Konformationen als getrennte Signale auflösbar sind.

Die 3D-Strukturen von organischen und metallorganischen Molekülstrukturen werden in der CSD (Cambridge Structural Databank), Proteinstrukturen in der PDB (*Protein Data Bank*) (Sussman *et al.*, 1998) gesammelt.

Grundlage der Röntgenstrukturanalyse ist die Beugung und Interferenz von Röntgenstrahlen an den Atomen genau genommen ihren Elektronen. Die Beugung erfolgt nach dem Bragg'schen Gesetz:

$$2d \sin \Theta = \lambda$$

an den Gitterebenen eines mit einem Abstand  $d$  regelmäßig aufgebauten Einkristalls. Der minimale Abstand  $d_{\min}$  zwischen Gitterebenen eines Kristalls, der zur Beugung mit dem größten Winkel  $\Theta_{\max}$  führt, wird als Auflösung einer Röntgenstruktur bezeichnet.



**Abb. 4.1** Schema der Beugung an zwei Ebenen eines Gitters mit dem Abstand  $d$  unter dem Winkel  $\Theta$ . Konstruktive Interferenz entsteht bei einem Gangunterschied  $2x = n\lambda$ .

### 4.1.1 Aufnahme von Röntgendaten

Durch die Drehung des Kristalls im Röntgenstrahl werden sukzessive alle reziproken Gitterebenen in Reflektionsstellung gebracht. Man erhält das vollständige Beugungsmuster aller Gitterebenen des Kristalls. Durch die Auswertung der Intensitäten aller Reflexe in den Beugungsbildern können mit Hilfe der Gitterkonstanten und der Symmetrie der Einheitszelle die Strukturfaktoren bestimmt werden. Prinzipiell kann aus den Strukturfaktoren  $F_{\text{obs}}$  und den Phaseninformationen  $\alpha$  die Lage der streuenden Atome im Raum berechnet werden. Da jedoch nur die Intensitäten und nicht die absoluten Phasen am Detektor aufgezeichnet werden, muss die fehlende Phaseninformation errechnet werden. Dies ist für sehr gut aufgelöste Röntgenstrukturen mit Hilfe von direkten Methoden möglich.

Für Proteinstrukturen kann alternativ ein homologes Modell des Proteins zur Strukturlösung verwendet werden (molecular replacement MR). Aus dieser Modellstruktur kann die benötigte Phaseninformation über eine inverse Fourier-Transformation berechnet werden, wenn die richtige Orientierung im Patterson-Raum gefunden wurde.

Für unbekannte Proteinstrukturen, für die noch kein homologes Modell bekannt ist, existieren weitere Techniken, wie das Einbringen von Schwermetallionen in den Kristall oder den Einbau von Selenomethionin in das Protein durch rekombinante Methoden.

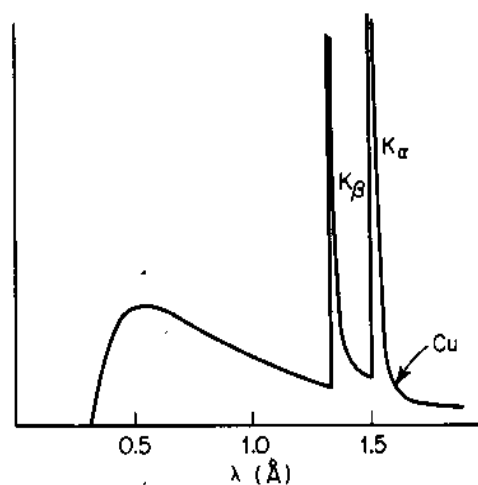
Die Auswertung mehrerer Derivatkristalle

(multiple isomorphous replacement MIR) oder die Messung vollständiger Datensätze eines Kristalls bei verschiedenen Wellenlängen (multiple wavelength anomalous dispersion MAD) kann dann zur Berechnung der initialen Phaseninformation verwendet werden.

### 4.1.2 Erzeugung von Röntgenstrahlen

#### 4.1.2.1 Röntgengenerator

Die Strahlung in einem Röntgengenerator wird nach dem Prinzip der Kathodenstrahlröhre erzeugt, wobei die Kathode aufgeheizt wird, bis Elektronen austreten können. Diese werden dann im Hochvakuum entlang eines angelegten, elektrischen Feldes zur Anode hin beschleunigt. Beim Aufprallen auf die Anode werden die Elektronen abgebremst. Hierbei entsteht die charakteristische Röntgenstrahlung (Abbildung 4.2) und ein kontinuierlicher Anteil, die sogenannte Bremsstrahlung.



**Bild 4.2:** Charakteristische Strahlung für eine Kupferanode

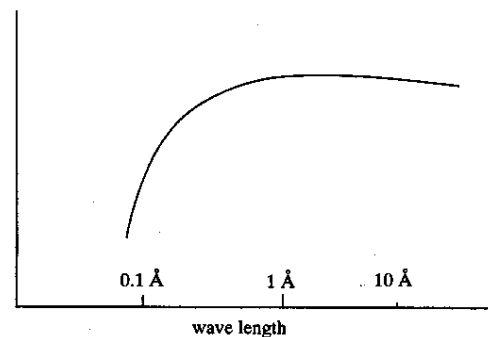
Der Primärstrahl (CuK $\alpha$ -Strahlung,  $\lambda=1,543$  Å, Ni-Filter für  $\lambda \leq 1.5$  Å) wurde mit einem Drehanoden-Generator (Rigaku RU300, MSC, USA) erzeugt, der auf eine Leistung von 50 kV und 100 mA eingestellt und mit einem Spiegelsystem (Yale Mirrors, MSC, USA) auf den Kristall fokussiert wurde. Die Detektion der Intensitäten abgebeugter Reflexe erfolgte elektronisch (RAXIS-IV Image Plate System, MSC, USA), wobei der Kristall-Detektor-Abstand 100 - 150 mm betrug.

#### 4.1.2.2 Synchrotronstrahlung

Für die Messung von kleinen Kristallen oder zum Erreichen hoher Auflösungen kann besser intensive, kohärente Röntgenstrahlung mit Hilfe eines Elektronenspeicherrings (Synchrotron) erzeugt werden. Kontinuierlich beschleunigte Elektronen werden durch Magnete auf einer Kreisbahn geführt und geben durch Änderung ihrer Bewegungsrichtung sogenannte Bremsstrahlung ab. Bei ausreichend hoher Geschwindigkeit der Elektronen ist ein Teil dieser Strahlung im Wellenlängenbereich der Röntgenstrahlung (Abbildung 4.3) und kann zu Beugungsexperimenten verwendet werden. Die Wellenlänge kann durch Monochromatoren für den jeweiligen Anwendungszweck (MR, MIR, MAD) abgestimmt werden.

Die Aufnahmen erfolgten am HASYLAB des DESY, Hamburg an der Beamline BW6 der Max-Planck-Gesellschaft. Die Wellenlänge betrug 1,1 Å.

Die Detektion der Intensitäten abgebeugter Reflexe erfolgte über ein CCD-Detektorsystem (Marresearch), wobei der Kristall-Detektor-Abstand 150 - 250 mm betrug. Aufgrund der hohen Mosaizität der Kristalle wurde für CaL B eine Drehung um 0,5° pro Aufnahme durchgeführt, um die Zahl der Reflexe pro Bild zu verringern und Überlagerungen benachbarter Reflexe zu vermeiden.

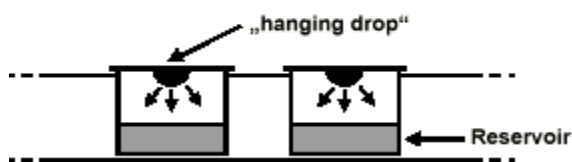


**Abb. 4.3:** Typische Intensitätsverteilung der Synchrotronstrahlung (Bremsstrahlung)

### 4.1.3 Proteinkristallisation

Zur Kristallisation wurde die Methode des hängenden Tropfens (hanging drop) über einer konzentrierten Reservoirlösung in einem abgeschlossenen System angewandt. Alle Lösungen wurden steril filtriert.

Auf einem runden Deckglas wurden je 2  $\mu$ l der Proteinlösung mit 2  $\mu$ l Reservoirlösung verdünnt und das Deckglas umgedreht über dem Reservoir platziert (Abbildung 4.4). Die so gebildete Kammer wurde mit Silikonfett (BayCon mittelviskos) abgedichtet.



**Abb.4.4:** Die gepufferte Proteinlösung hängt als Tropfen („hanging drop“) über einer konzentrierteren Reservoirlösung. Die beiden Lösungen stehen über die Dampfphase miteinander in Kontakt. Nach außen hin ist das System abgeschlossen

Durch Dampfdiffusion erhöhte sich dann die Konzentration des anfangs verdünnten Präzipitanz langsam, wodurch die kontrollierte Kristallisation des Proteins erreicht werden konnte. Dabei durfte die Konzentration des Präzipitanz in der Reservoirlösung nicht zu groß gewählt werden, damit in der langsam ankonzentrierenden, übersättigten Lösung nur wenig Kristallisationskeime entstanden, die dann geordnet zu Einkristallen ausreichender Größe heranwachsen konnten.

#### 4.1.3.1 *Candida antarctica* Lipase B

Die Proteinlösung enthielt 10 mg/ml der gefriergetrockneten *Candida antarctica* Lipase B (CaL B) in 0,1 M Citrat bei pH 3,6. Als Kristallisationsvermittler diente  $\beta$ -Octylglycopyranosid (SIGMA, in iso-Propanol), das in einer Endkonzentration von 0,6 % vorlag. Die Reservoirlösung enthielt 20 % PEG 4000, 20 % iso-Propanol und 0,1 M Citrat bei pH 3,6 (Uppenberg *et al.*, 1994b). Die Kristalle bildeten sich nach einigen Monaten bei 20° C und wuchsen bis zu einer Größe von 0,1 x 0,1 x 0,02 mm als hexagonale Plättchen.

#### 4.1.3.2 *Bugkholderia plantarii* Lipase

Die verdünnte, wässrige Proteinlösung der rekombinant exprimierten *Bugkholderia plantarii* Lipase (Bpl) wurde mit einem Amicon Mikrokonzentration auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml aufkonzentriert. Die Präzipitanzlösung enthielt 0,1 M HEPES pH 7,5 und 10 % v/v iso-Propanol, 20 % w/v Polyethylene Glycol 4000 (Hampton Screen Lsg. 41). Als Kristallisationsvermittler diente in diesem Fall 0,8 %  $\beta$ -Dodecylglycopyranosid (SIGMA, in DMSO). Die erhaltenen Kristallnadeln konnten aufgrund ihrer geringen Größe nur am Synchrotron gemessen werden.



#### 4.1.4 Auswertung der Röntgendaten

Zur Aufnahme eines Beugungsbildes am Röntgengenerator wurde der Kristall für 10-25 min mit dem Cu K $\alpha$  Primärstrahl bestrahlt und dabei schrittweise um 1° gedreht. Aufnahmen am DESY wurden bei einer Wellenlänge von 1,05 Å mit einer Bestrahlungsdauer von 10-100 sec und einer Drehung um 0,5° oder 1° gesammelt. Die Bestimmung der Kristallsymmetrie und die Datenreduktion erfolgte mit den Programmen DENZO und SCALEPACK (Otwinowski & W. Minor, 1997). Mit Hilfe des Programms STRATEGY wurde aus der Kristallsymmetrie der beste Startwinkel sowie die benötigte Gradzahl für einen kompletten Datensatz bestimmt.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Methode des molekularen Ersatzes (MR) angewendet, um die Proteinstruktur mit Hilfe von bereits bekannten Modellstrukturen aus der PDB zu bestimmen.

Da die Orientierung des Proteins in der neuen Einheitszelle unbekannt war, musste das Strukturmodell zunächst korrekt in der neuen Kristallzelle durch Rotation und Translation platziert werden. Dies wurde mit Hilfe des Programms AMoRe (Automated Molecular Replacement) (J.Navaza, 1994) aus dem CCP4 Programmpaket durchgeführt.

Nachdem das Suchmodell in der Einheitszelle platziert worden war, konnte eine erste Elektronendichte mit dem Programm CNS (Brunger *et al.*, 1998) / XPLOR (Brunger, 1992) berech-

net werden. Die Interpretation der Elektronendichtekarten erfolgte durch die manuellen Korrektur der Aminosäurepositionen im Programm O. Die jeweils günstigsten Seitenkettenkonformationen wurden mit der Funktion "LEGO sidechain" aus einer Rotamerbibliothek ausgewählt.

Mit Hilfe dieses verbesserten Modells wurde erneut das Programm CNS/XPLOR aufgerufen, um die Differenz zwischen den gemessenen Strukturfaktoramplituden  $F_{obs}$  und den für das aktuelle Modell berechneten  $F_{calc}$  zu minimieren. Die Übereinstimmung zwischen  $F_{obs}$  und  $F_{calc}$  wird durch den kristallographischen R-Faktor ausgedrückt.

$$R = \frac{\sum (|F_{obs}| - |F_{calc}|)}{\sum |F_{obs}|}$$

Die Abweichung des Modells von der beobachteten Elektronendichte wird durch die Änderung der Atomkoordinaten solange minimiert, bis die Differenz der gemessenen und den aus dem Modell berechneten Strukturamplituden möglichst klein geworden ist.

Gleichzeitig wird ein Energieterm minimiert, der die Struktur in der Nähe von Standardwerten hält. In einem Kraftfeld sind neben Bindungslängen und Bindungswinkeln noch weitere energetische Wechselwirkungen parametrisiert. Das in CNS/XPLOR implementierte Kraftfeld CHARMM greift auf Parametersätze zu, die aus hochaufgelösten niedermolekularen Kristallstrukturen abgeleitet wurden (Engh & Huber, 1991).

Zusätzlich wurden 10 % der gemessenen Strukturfaktoren zur Validierung der kristallographischen Verfeinerung eingesetzt und mit Hilfe dieser, nicht in die Anpassung des Modells eingehenden, Strukturfaktoren analog zum R-Faktor der sogenannte  $R_{\text{free}}$  berechnet. Dieser Prozess der kristallographischen Verfeinerung (Kleywegt, 2000; Kleywegt & Brunger, 1996) wurde iterativ über mehrere Zyklen durchgeführt, bis der R-Faktor und der freie R-Faktor nicht mehr verringert werden konnten. Der Wert von  $R_{\text{free}}$  sollte je nach Auflösung nicht mehr als 5 - 10 % über dem R-Wert liegen, da sonst ein zu starkes Anpassen des Modells (overfitting) vorliegen könnte.

#### **4.1.5 Strukturbestimmung von kleinen organischen Molekülen**

##### **4.1.5.1 Datensammlung**

Die Datensammlung erfolgte bei 23° C auf dem hauseigenen Vierkreis-Diffraktometer (AFC5R, Rigaku). Der Primärstrahl ( $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung,  $\lambda=1,543 \text{ \AA}$ , Ni-Filter für  $\lambda \leq 1.5 \text{ \AA}$ ) wurde mit einem Drehanoden-Generator (Rigaku RU300, MSC,) erzeugt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programmpaket teXsan (MSC).

Weitere Tieftemperatur-Messungen erfolgten an einem Vierkreis-Diffraktometer (Stoe) mit einem CCD-Flächendetektor (Siemens) an der Universität Marburg (FB Chemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Massa). Als Messbedingungen wurden gewählt: Primärstrahl-Wellenlänge  $0,71073 \text{ \AA}$  ( $\text{Mo-K}\alpha$ , Kristall-Detektor-Abstand

50 mm, Belichtungszeit 120 s, Messtemperatur  $-140^\circ\text{C}$ ). Zur Datensammlung wurden jeweils vier Phi- und Omega-Scans (Drehwinkel  $0,5^\circ$ ) mit dem Programm SMART der Firma Siemens durchgeführt. Die Datenreduktion und Zellverfeinerung erfolgte mit dem Programm AXS SAINT Bruker (Madison 1997), eine Absorptionskorrektur mit dem Programm PLATON.

##### **4.1.5.1 Strukturlösung**

Für kleine, organische Moleküle erreicht man in der Regel Auflösungen, bei denen die Atome als getrennte Maxima in der Elektronendichte identifizierbar sind. Hier sind direkte Methoden das am häufigsten angewandte Verfahren zur Strukturlösung. Nach Zuordnung von einzelnen Atomen zu diskreten Maxima im Patterson-Verfahren werden in verschiedenen Verfeinerungsstufen Auflösungen erreicht, die eine weitgehend gesicherte strukturelle Zuordnung der Protonen erlauben.

Die Raumgruppenbestimmung wurde mit dem Programm Bruker/AXS-SHELXTL durchgeführt, die Strukturlösung durch direkte Methoden mit dem Programm SHELXL-97, die Verfeinerung erfolgte mit dem Programm SHELXS-97 (Sheldrick, 1990).

## 4.2 Proteinreinigung

### 4.2.1 *Candida antarctica*

#### Lipase B

Die kommerziell erhältliche, gefriergetrocknete Rohlipase (NOVOZYM 525) mit darin enthaltener *Candida antarctica* Lipase B wurde zunächst in 25 mM TRIS/Acetat (Ac) pH 7,0 gelöst, (10,4 g/ 280ml), so dass die Leitfähigkeit 3 mSi/cm betrug. Die enthaltenen Verunreinigungen wurden mit Whatman<sup>®</sup> DE52 Sepharose gebunden (Patkar *et al.*, 1993). Nach 30 min Rühren wurde der lipasehaltige Überstand abfiltriert. Die Leitfähigkeit der Lösung wurde für die anschließende hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) mit Ammonium-Acetat auf 40 mSi eingestellt. Diese Lösung wurde über eine mit TOYO<sup>®</sup> TSK-Butyl gepackte Säule aufgetragen und die gebundene Lipase über einen Gradienten von 1 M NH<sub>4</sub>Ac zu demineralisiertem Wasser eluiert und dann im Vakuum gefriergetrocknet (lyophilisiert).

### 4.2.2 *Burkholderia plantarii*

#### Lipase

Die *Burkholderia plantarii* Lipase (BpL) liegt als sekretorisches Enzym (siehe Einleitung) im Medium der Fermentation vor. Die Lipase-Reinigung wurde daher aus dem Kulturüberstand der 15 L-Fermentationen in einem 20 L Fermenter (INFORS HT, wie in Abbildung 4.5 gezeigt) in Zusammenarbeit mit dem Biotechnikum im Hauptlabor der BASF AG durchgeführt. Untersucht wurde die Lipase vom BASF-Produktionsstamm, vom Wildtyp und

aus einem rekombinanten Expressionsstamm.

#### 4.2.2.1 Wildtyp und Produktionsstamm

Die Bakterienstämme (in Glycerinkultur -80° C gelagert) für die Fermenterkulturen wurden in 4 x 5 ml Vorkultur Medium mit einer sterilen Platinöse überimpft und über Nacht bei 30° C in einem Brutschrank unter Schütteln (200 U/min) angezogen und dann in 4 x 250 ml Vorkultur Medium in 1l Schikane-Kolben noch einmal 24 Stunden unter identische Bedingungen vermehrt. Mit diesen Vorkulturen konnte dann ein Fermenter (INFORS HT) mit 14 l Fermenter Medium beimpft werden. Die Fermentation wurde ebenfalls bei 30° C durchgeführt und nach ca. 24 h durch Kühlen auf 4° C abgebrochen.



Abb. 4.5 20 l Fermenter für die Lipasefermentation (INFORS HT)

Medium:	Vorkultur	(Fermenter)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6 g/l	(-)
$\text{CaCl}_2$	0,02 g/l	(0,02 g/l)
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1 g/l	(1g/l)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,5 g/l	(3,5 g/l)
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	3,5 g/l	(-)
$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$	-	5 g/l
Hefeextrakt	5 g/l	( 5g/l)
Ölsäure	5 g/l	-
(Sojaöl)		(5 g/l)

Spurensalz Lösung TRACE	10 ml/l
Titriplex III pH 4,0	45 g/l
$\text{CaCl}_2$	5,5 g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	3,75 g/l
$\text{MnSO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$	1,4 g/l
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2,2 g/l
$\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,4 g/l
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,45 g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,26 g/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,4 g/l
KJ	0,26 g/l

Nach der Fermentation im Sojaölmedium wurden die Zellen 30 min bei 10 000 g abzentrifugiert und der Überstand mit dem gleichen Volumen iso-Propanol extrahiert, um das im Medium vorhandene Sojaöl und andere hydrophobe Substanzen zu entfernen. Die wässrige Phase wurde über eine Filterfritte G3 filtriert und das gelöste iso-Propanol mit Hilfe eines Rotationsverdampfers im Vakuum (40° C, 100 Torr) entfernt. Die Leitfähigkeit der

Lösung wurde für die anschließende hydrophobe Interaktions-Chromatographie (Sugihara, Tani & Tominaga, 1991) mit Ammoniumacetat auf 40 mSi (ca. 3 Mol/l) eingestellt.

In einer ersten Reinigungsstufe wurde die Lipaselösung über Nacht mit 1 g/l TOYO® TSK-Butyl ausgerührt und über eine Filterfritte mit je einem Liter 1 M NaCl, 0,1 M NaCl und 0,01 M NaCl gewaschen, um die restliche Ölsäure zu entfernen. Die Lipase wurde dann mit reinem Wasser und 25 % iso-Propanol eluiert. Zur Feinreinigung wurde nochmals die Leitfähigkeit der Lösung mit Ammoniumacetat auf 40 mSi eingestellt. Diese Lösung wurde über eine mit TOYO® TSK-butyl gepackte Säule (1 ml/mg Lipase) aufgetragen und die gebundene Lipase über einen Gradienten von 1 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  zu demineralisiertem Wasser eluiert und dann im Vakuum gefriergetrocknet (lyophilisiert).

#### 4.2.2.2 Rekombinante Lipase

Die Fermentation des rekombinanten Wildtyp mit zusätzlichem Lipase-Gen auf einem p-Bluescript-Plasmid mit Gentamycin-Resistenz-Gen erfolgte analog zum Wildtyp in HFP-Glucosemedium mit 45 µg/ml Gentamycin.

HFP-Glucose Medium pH 7,2	
Pepton (Sojton, DIFCO)	10 g/l
Tryptone (Casein, DIFCO)	10 g/l
Hefe	5 g/l
NaCl	3 g/l
Glucose	20 g/l

Nach der Fermentation in Glucosemedium wurden die Zellbestandteile durch 20 min Zentrifugation bei 10 000 g abgetrennt und die Lösung über eine Glasfilterfritte G3 filtriert.

Zur Feinreinigung wurde die Leitfähigkeit der Lösung mit Natriumchlorid auf 40 mSi eingestellt. Diese Lösung wurde über eine mit TOYO® TSK-butyl gepackte Säule (1 ml/mg Lipase) aufgetragen und die gebundene Lipase über einen Gradienten von einem Säulenvolumen (SV) 1 M zu 0,1 M NaCl, 50 mM Tris pH 7 gewaschen und einem zweiten Gradienten über 1 SV von 0,1 M NaCl, 50 mM Tris pH 7 zu demineralisiertem Wasser eluiert. Die dann noch am Säulenmaterial gebundene Lipase konnte mit 20 % Ethanol eluiert werden.

#### 4.2.2.3 Chromatofokussierung

In einer weiteren Reinigungsstufe wurde für die BpL zusätzlich eine Chromatofokussierung im pH-Bereich von pH 10,5 - 6,5 über eine Anionentauschersäule MONO® P (1 ml, analytisch) oder PBE94® (20 ml, präparativ) (beide Pharmazia) durchgeführt.

Die Säule wird bei einem pH-Wert oberhalb des isoelektrischen Punktes equilibriert und das Protein im gleichen Puffer aufgetragen. Das deprotoniert vorliegende Protein bindet an den Anionentauscher. Die Elution des Proteins erfolgt dann über ein speziell angepasstes Puffersystem (POLYBUFFER® 94, Pharmazia) mit der gleichen Pufferkapazität wie die geladenen Gruppen des Säulenmaterials.

Der pH-Wert des Polybuffers wird auf einen Wert von 3 bis maximal 4 pH-Einheiten unter-

halb des Startpuffers eingestellt. Während der Elution bildet sich auf der Säule ein pH-Gradient aus und der pH-Wert des Eluats sinkt kontinuierlich vom Startwert bis auf den pH-Wert des Elutionspuffers ab. Das Protein wird dabei im pH-Bereich seines isoelektrischen Punktes auf der Säule fokussiert und eluiert. Die theoretische Auflösung des Säulenmaterials wird vom Hersteller mit 0,1 pH-Einheiten angegeben.

Das Säulenmaterial wurde mit einem Säulenvolumen (SV) 25 mM Ethanolamin, pH 10,5 äquilibriert und anschliessend die Lipase, im gleichen Puffer gelöst, aufgetragen. Eluiert wurde mit 10 SV PB94® / HAc pH 6,5. Die *Burkholderia plantarii* Lipase wird bei einem pH von ca. 8,5 eluiert, der gemessene isoelektrische Punkt beträgt 6,8 (IEF).

#### 4.2.2.4 Metall-Chelat-Chromatographie

Die Abtrennung von hydrophoben Proteinen, die sich nicht durch eine HIC von der Lipase trennen lassen, wurde für den Produktionsstamm mit Hilfe einer Metall-Chelat-Chromatographie durchgeführt, da die *Burkholderia plantarii* Lipase ein Calciumion enthält. Als Säulenmaterial wurde Nickel-Chelat-Sephrose verwendet. Die Lipase wurde in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst und auf eine 20 ml-Säule aufgetragen. Die Elution der Lipase erfolgte mit 1 M NaCl in 20 mM Phosphatpuffer pH 6,0 (Protokoll BASF, Labor Dr. T. Friedrich).

## 4.3 Aktivitätsbestimmung und Inhibition

### 4.3.1 Tributertest

Die Enzymaktivität der Triacylglycerolspaltung kann mit einer Emulsion von Tributerin (Tributerin-Acylglycerol) in 1 % Acetonitril, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Puffer pH 7 in einem pH-Stat (Fa. Radiometer) durch automatische Gegentitration der entstehenden Säure mit 0,5 M NaOH bestimmt werden (Jaeger *et al.*, 1994).

### 4.3.2 Photometrisches Essay

Die Enzymaktivität kann durch die photometrische Messung der Spaltung eines chromophoren p-Nitrophenylesters, bzw. p-Nitrophenylamids bestimmt werden. Detektiert wird das freie p-Nitrophenolat-anion (pNP) bei 405 nm. Es wurden verschiedene p-Nitrophenolester mit einer unterschiedlichen Kettenlänge der Säure (-Acetat C2, -Propionat C3, -Butyrat C4, -Caprylat C8, -Laurat C12 und -Palmitat C16, alle SIGMA) verwendet.

Die Substrate wurden in wasserfreiem Acetonitril in einer Stammkonzentration von 100 mM gelöst und in einer Endkonzentration von 0,01 mM bis 10 mM verwendet. Die Endkonzentration an Acetonitril (CH<sub>3</sub>CN) betrug stets 10 %. Für Inhibierungsexperimente wurden verschiedene organische Lösungsmittel und Detergenzien bis zu einer Konzentration von 40 % verwendet.

Zum Nachweis der Lipaseaktivität wurden jeweils 10 µl der Enzymlösung auf 500 µl

Substratlösung (0,1 mM pNP-Acetat, 50 mM Tris, pH 7,0, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 10 % CH<sub>3</sub>CN) versetzt und über 5 min die Absorption bei 405 nm in einer 1000 µl Mikroküvette in einem Einstrahlphotometer (Biorad) oder einer Mikrotiterplatte (BMG Polarstar) bei 25 °C verfolgt.

### 4.3.3 Synthese der Inhibitoren

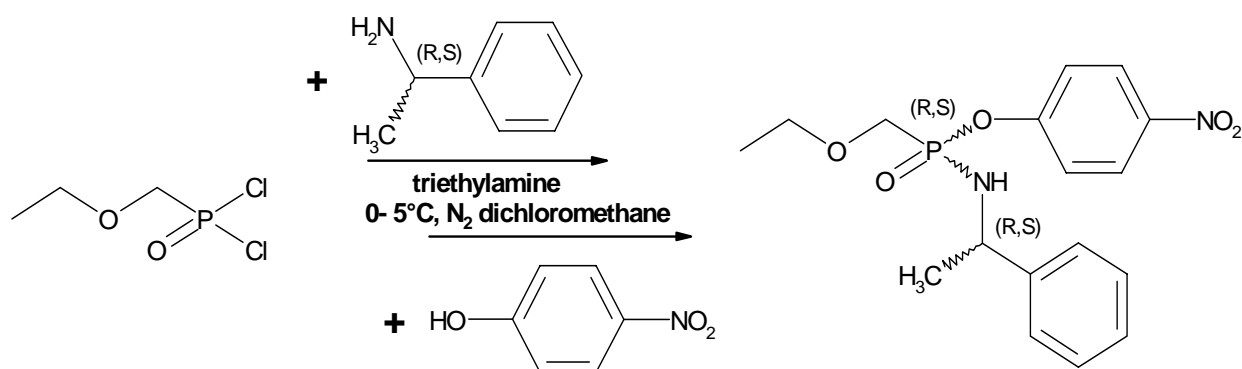
#### 4.3.3.1 Synthese der Phosphonamide

Die Synthese der Inhibitoren durch Hans Dieter Gerber erfolgte für die Phosphonamide nach der im folgenden Schema aufgezeigten Strategie:

Zur Synthese der Inhibitoren wurde zunächst aus Phosphortrichlorid und Formaldehyddiethylacetal das Ethoxymethylphosphonsäuredichlorid unter Zinkdichloridkatalyse gebildet.

Das erste Chlorsubstituent wurde in der Kälte gegen das langsam zugetropfte enantiomerenreine Phenylethylamin ersetzt. Dabei wird ein zweites Stereozentrum gebildet und man erhält Diastereomere.

Anschließend wird sofort der zweite Chlorsubstituent durch einen p-Nitrophenolatrest als Abgangsgruppe für die Reaktion mit dem Enzym ersetzt, um die Stabilität und die Kristallisationseigenschaften der Inhibitoren zu verbessern. Die Diastereomerenmischung konnte durch fraktionierte Kristallisation getrennt werden.

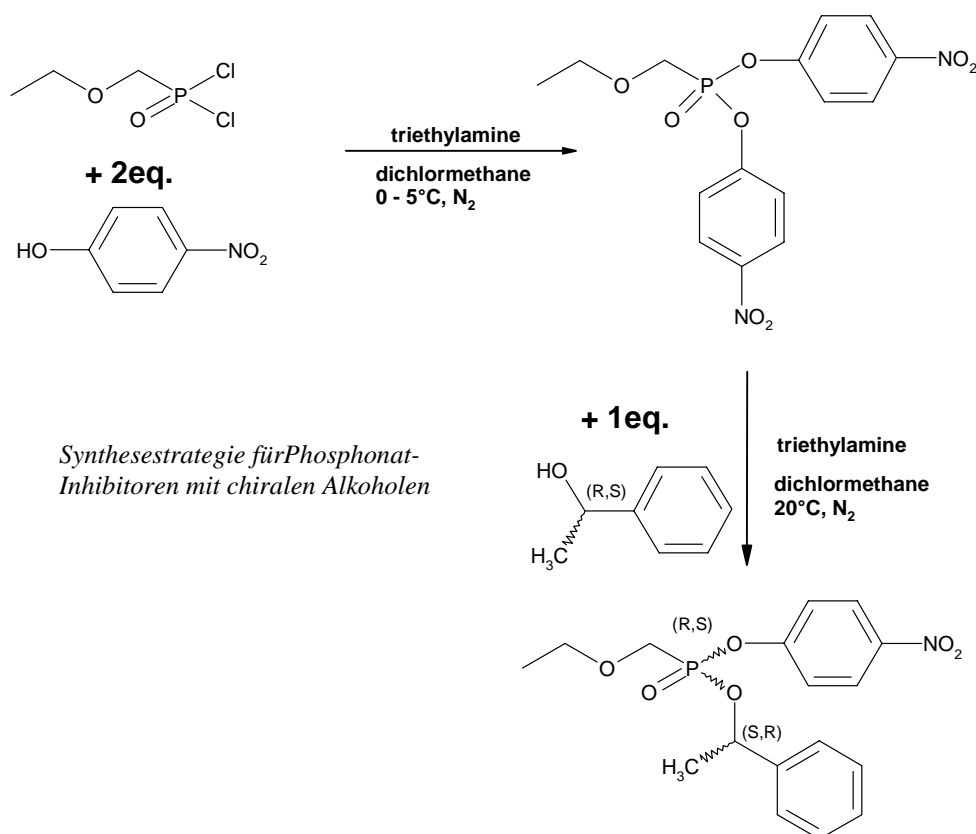


*Synthesestrategie für Phosphonat- Inhibitoren mit chiralen Amiden*

### 4.3.3.2 Synthese der Phosphonester

Die Synthese der Inhibitoren durch Hans Dieter Gerber erfolgte für die Phosphonester nach der im folgenden Schema gezeigten Strategie:

Die Synthese der Inhibitoren mit einem chiralen Alkohol erwies sich als schwieriger, da die entstehenden Produkte hydrolyseempfindlich waren, weshalb eine andere Synthesestrategie entwickelt wurde. Im Fall der Inhibitoren mit gebundenem Phenylethylalkohol bzw. Methoxycyclohexanol wurden zunächst beide Chlorsubstituenten des Phosphonsäuredichlorids durch zwei Äquivalente p-Nitrophenol ersetzt und erst im letzten Schritt ein Äquivalent des chiralen Alkohol eingebracht. Das entstehende Diastereomergemisch wurde unter Argon gelagert.



Die Diastereomerenmischung der Phosphonester-Inhibitoren konnte nicht durch fraktionierte Kristallisation getrennt werden, obwohl ein Serie von Inhibitoren mit unterschiedlichen Abgangsgruppen als Ersatz für das p-Nitrophenol gewählt wurde, um die Kristallisationseigenschaften und die Stabilität positiv zu beeinflussen.



## 4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

### 4.4.1 Absorption bei 280 nm

Die gereinigte, gefriergetrocknete Lipase wurde in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  /10 mM  $\text{CaCl}_2$ -Puffer gelöst. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Die molare Konzentration kann mit der Gleichung

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

errechnet werden, wobei  $E$ = Extinktion,  $\epsilon$ = Extinktionskoeffizient,  $c$ = Konzentration,  $d$ = Schichtdicke ist. Der Wert Epsilon beträgt für CaL B 40330  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (1 mg/ml = 1.22  $\text{OD}_{280}$ ) und für Bgl 29990  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (1 mg/ml = 0.906  $\text{OD}_{280}$ ).

### 4.4.2 BCA-Mikrotiterplatten-Test

Alternativ kann die Proteinmenge für geringe Konzentrationen auch über einen photometrischen Test (Pierce BCA Protein-Essay-Kit) ermittelt werden. Im Gegensatz zum Lowry- oder Bradford-Test ist der BCA-Test auch für hydrophobe Proteine geeignet. Der hierbei verwendete Farbstoff BCA (Bicinchoninsäure) ergibt nach Inkubation mit dem Protein eine konzentrationsabhängige, tiefblaue Färbung, die bei 562 nm über eine Verdünnungsreihe mit bekannter Proteinkonzentration von 0 - 60  $\mu\text{g/ml}$  BSA (Bovines Serum Albumin, Sigma) mit Hilfe einer Eichgerade quantifiziert wird.

Eine Probe von je 50  $\mu\text{l}$  Lipaselösung unbekannter Konzentration und mehrere BSA Standardkonzentrationen werden mit je 200  $\mu\text{l}$  frisch angesetzter BCA-Lösung (Lösung A+B im Verhältnis 1/50) gemischt und 30 min bei 60 °C inkubiert. Danach wird die Absorption bei 562 nm gemessen.

## 4.5 Transiente Kinetik mittels Stopped-Flow-Spektrofluorometrie

### 4.5.1 Aufbau des Messsystems

Alle Stopped-flow-spektrofluorometrischen Untersuchungen wurden an einem Stopped-flow Spektrofluorometer der Firma Hi-Tech-Scientific durchgeführt.

#### *Lichtquellen:*

Hg-Arc-lamp 100 W; Xe-Arc-lamp 75 W  
PSU 675 Stromquelle mit Zündspule  
2x Glasfaser Lichtleiter OPL 61

#### *Monochromator:*

Bentham M 300 Gitter-Monochromator  
(1800 Linien/mm)

#### *Mischeinrichtung:*

SHU 61 multimixing sample handling unit  
SSU 60 Control unit

#### *Detektionssystem:*

PM 60s side-on Photomultiplier

#### *Hochspannungsquelle:*

PSU 60/SC 60 (300-1200 V)

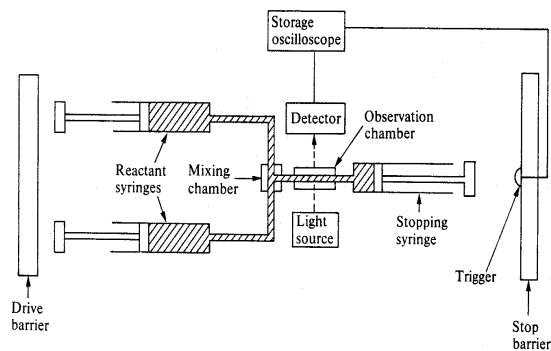
#### *Digital-Analog-Wandler:*

CI 60 I/O -Unit, und Computer 486/66 mit  
ICS 486 Data Aq. System D/A Wandler  
CIO-CTR -board (sampling rate 1MHz)

#### *Software:*

Hi-Tech IS-2 Rapid kinetics V2.3b6

Die Reaktion wird gestartet, indem die beiden Reaktandenspritzen über ein Hochdruckzylinder-



**Abb. 4.6:** Schema einer Stopped-Flow Apparatur (Price and Stevens, 1988)

der pneumatisch bewegt werden. Dadurch werden die beiden Lösungen in die Mischkammer injiziert und verdrängen die alte Lösung aus der Messzelle in die Stopspritze. Wenn die Stopspritze gefüllt ist und auf den Stopblock trifft, löst sie ein elektrisches Signal (Trigger) aus, das den Nullpunkt der Reaktion ( $t_0$ ) anzeigt und den Messvorgang startet (Abbildung 4.6). Die Messzelle ist nun vollständig mit der gerade gemischten Reaktionslösung gefüllt und die Kinetik kann beobachtet werden.

Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Reaktionslösung auf dem Weg von der Mischkammer in die Messzelle bereits reagiert hat und so zum Zeitpunkt  $t_0$  ein Teil der Reaktion bereits stattgefunden hat. Dies ist die sogenannte Totzeit eines Stopped-Flow-Systems, die vom apparativen Aufbau der Messzelle und dem Druck der Reaktandenspritzen, d.h. der Fließgeschwindigkeit der Lösung abhängt.

## 4.5.2 Reaktionsbedingungen

Die Totzeit des verwendeten Systems beträgt 1 ms, das kleinste vom D/A - Wandler aufgelöste Zeitintervall beträgt 0,1 ms. Zur Rauschunterdrückung wurde ein bis zu 18-faches "Oversampling" durchgeführt, d.h. 18 "Subsamples" wurden zu einem Messpunkt zusammengefasst. Es wurden typischerweise 512 Messpunkte pro Messung aufgenommen. Zusätzlich wurde jede Messung mindestens viermal mit gleicher Einstellung aufgenommen und die Spektren digital gemittelt. Um die Anfangszeit der Kinetik besser aufzulösen, wurden z. T. zwei verschiedene "Samplingraten" im Zeitintervall 0-200 ms und 200 ms–200 s verwendet. Die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz wurde mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 285$  nm entlang der Hochachse der Messzelle angeregt. Die Fluoreszenz wurde im  $90^\circ$  Winkel dazu mit einem Photomultiplier mit gegenüberliegendem Spiegel detektiert. Um den Einfluss von Streulicht auszuschalten, wurde ein  $< 320$  nm „cut-off“-Filter vor dem Photomultiplier (PM) verwendet. Die Spannung am PM betrug mit der Xe-Lampe ca. 1000 V und bei Verwendung der Hg-Lampe zwischen 400 und 500 Volt. Zur Unterdrückung des Rauschens wurde ein elektronischer Filter mit einer Zeitkonstante von 0.1 ms eingesetzt. Die Software zeichnet die Fluoreszenzintensität in einer oszilloskopischen Skala von 0 bis 5 Volt auf, wobei 5 Volt keine gemessene Fluoreszenz bedeuten und die am A/D-Wandler anliegende Spannung bei einer Fluoreszenzserhöhung sinkt.

Die Absorptionsmessungen wurden für die verwendeten p-Nitrophenyl-Substrate bei 407 nm (Hg-Linie) und einer Photomultiplier-Spannung von 200-300 Volt durchgeführt. Zur Berechnung der absoluten Absorption aus den Messdaten muss das Messgerät zu Beginn jeder Serie auf 0 % Absorption mit dem verwendeten Messpuffer und 100 % Absorption durch Verschließen des Shutters am Photomultiplier abgeglichen werden. Die Stopvolumen pro Injektion betrug 120 µl.

### **Verwendete Lösungen:**

#### *Puffer:*

50 mM TRIS (pH 7-8)

#### *Substrate:*

0.01 - 20 mM p-Nitrophenolacetat

0,5 µM - 1 mM p-Nitrophenolacetamid

#### *Enzyme für Fluoreszenzmessungen:*

0.3 -1 mg/ml Bpl sowie Mut Y142W

#### *Enzyme für Absorptionsmessung:*

0.001- 0,01 mg/ml CaL B,

BpL , sowie Mut Y142W

Alle verwendeten Lösungen wurden durch Ultraschall entgast und über einen Sterilfilter (25µm, Biorad) filtriert. Alle Enzyme wurden in dem entsprechendem Puffer gelöst, unlösliches Protein abzentrifugiert und ebenfalls über einen Sterilfilter filtriert.

Zu Beginn jeder Messreihe wurden die Spritzen mit filtriertem und entgastem destillierten

Wasser gefüllt und das Gerät gespült. Falls das erhaltene Signal bei jedem Schuss nicht konstant blieb, musste die Messkammer mit 1 M Salzsäure , 1 M Natronlauge und anschließend wieder 1 M Salzsäure für je 1 Minute inkubiert und anschließend mit 20 ml Wasser gespült werden, um anhaftende Luftblasen zu entfernen.

Danach wurde der Puffer in beide Spritzen gefüllt und das Mess-System nochmals gespült. Für jeden pH-Wert wurde eine vollständige Messreihe mit dem jeweiligen Substrat, bestehend aus ca. 50-100 Stopped-Flow-Messungen aufgenommen.

Die Konzentration der Enzymlösung in der ersten Spritze bleibt konstant. Beginnend mit reinem Puffer in der zweiten Spritze wurde die Versorgungsspannung am Photomultiplier so justiert, dass für die Enzymfluoreszenz in der IS 2-Software ca. 3 Volt angezeigt wurden.

Durch Austausch der Substratlösung in der zweiten Spritze wurde das Enzym mit verschiedenen Substratkonzentrationen gemischt und die Stopped-Flow-Messung nach jedem Schuss auf der entsprechenden Zeitskala aufgezeichnet. Die verwendeten Substratkonzentrationen wurden für jede Messreihe so gewählt, dass zwischen Substratsättigung und Single-Turnover-Experimenten mit Substrat im Unterschuß mindestens fünf dazwischenliegende Konzentrationen gemessen werden konnten.

## 4.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine und Molekulargewichtsmarker wurden in 15 %igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösungen	Trenngel (für zwei Gele)	Sammelgel (für zwei Gele)
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	4,2 ml	0,88 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,1 ml	-----
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-----	0,8 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	0,9 ml	2,4 ml
10 % SDS	60 µl	50 µl
10 % APS	60 µl	50 µl
TEMED	4 µl	3 µl

### 4.6.1 Puffer für SDS-PAGE

Proben und Probenpuffer wurden in gleicher Menge zusammengegeben, vor dem Auftragen 5 min bei 100°C gekocht, zentrifugiert und auf Eis gekühlt. In einer vertikalen Elektrophoreseapparatur liess man die Proben bei 80 Volt einlaufen, dann wurden sie bei 120 V ca. 2 Stunden aufgetrennt.

*Elektrophoresepuffer (Lämmli):*

25 mM Tris-HCl

250 mM Glycin

0,1 % SDS

*Probenpuffer:*

50 mM 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

2 % SDS

0,1 % Bromphenolblau (50 mg/ml)

10 % Glyzerin

ad 9 ml H<sub>2</sub>O bidest. + 100 mM DTT

### 4.6.2 Molekulargewichtsmarker

Roche Diagnostics, Molekulargewichtsmarker für SDS-Gelelektrophorese, 14.4 kD-97.4 kD , 10µg Protein/10µl.

Protein	Molekulargewicht
Phosphorylase B	97.4 kD
Bovine serum albumin	66.2 kD
Aldolase	39.2 kD
Triosephosphate isomerase	26.6 kD
Trypsin inhibitor	21.5 kD
Lysozyme	14.4 kD

### 4.6.3 Coomassie-Färbung

Zur Färbung von Proteinen und Peptiden wurde die Coomassie-Blau-Lösung verwendet. Das Gel wurde in der Färbelösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,1 % Coomassie R-250) kurz erhitzt und unter Schütteln ca. 30 min. inkubiert. Anschliessend erfolgte die Entfärbung in einer Lösung aus 40 % Methanol und 10 % Essigsäure, wobei die Lösung regelmäßig ausgetauscht wurde. Das entwickelte Gel wurde in 20 - 30 % Ethanol aufbewahrt.

## 4.7 Deglycosilierung

### 4.7.1 N-Glycosidase F

Die analytische Deglycosilierung der CaL B wurde mit einem N-Glycosidase F Deglycosilations-Kit der Fa. Boehringer Mannheim (jetzt Roche Molecular Biochemicals) durchgeführt. N-Glycosidase F ist keine Glycosidase sondern eine Amidase. Die Deglycosilierung erfolgt durch hydrolytische Spaltung der N-glycosidischen Bindung des Asparagin-N-glycosids zum Aspartat.

Lösungen:

- 1 rekombinante N-Glycosidase F
- 2 Denaturierungs-Puffer pH 8,6 (PO<sub>4</sub>-Puffer, ionisches Detergenz)
- 3 Kontroll Glycoproteine (hum.Transferrin, Ribonuklease B , α<sub>1</sub>-saures Glycoprotein )
- 4 Reaktionspuffer pH 7,2 (PO<sub>4</sub>-Puffer, nichtion. Detergenz)

Die Enzyme 1 und 3 wurden nach Herstellerangaben in Wasser gelöst. Zur Lösung 2 wurde 1 % β-Mercaptoethanol zugegeben.

Die maximale Proteinmenge zur Deglycosilierung beträgt 100 µg pro Ansatz. Nach jedem Schritt wurden die Lösungen im Vortexer gut vermischt. Im ersten Schritt wurde je 5 µl der Proteinlösung mit 5 µl Denaturierungspuffer (Lösung 2) versetzt und 3 min bei 95 °C inku-

biert, danach kurz zentrifugiert. Im zweiten Schritt wurden je 10  $\mu$ l Reaktionspuffer (Lösung 4) und 10  $\mu$ l N-Glycosidase F (Lösung 1) hinzugegeben. Für den Kontrollversuch wurden je 20  $\mu$ l Reaktionspuffer (Lösung 4) hinzugegeben. Anschliessend wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Die native Deglycosilierung erfolgte analog ohne Zugabe des Denaturierungspuffers (Lösung 2) durch eine Inkubation über 24 Stunden bei 37 °C.

#### 4.7.2 Endoglycosidase H

Die präparative Deglycosilierung erfolgte mit dem Enzym Endoglycosidase H (Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H, EC 3.2.1.96) von Roche Molecular Biochemicals. Die Deglycosilierung von mannosereichen N-glycosidisch gebundenen Oligosacchariden erfolgt durch Spaltung der ersten Zucker-Zucker-Verknüpfung im Glycosid und belässt eine N-Acetylglucosamin-Einheit am Protein gebunden.

Die präparative native Deglycosilierung von 1 mg Lipase in 500  $\mu$ l 50 mM Citratpuffer pH 5,5 erfolgte durch Zugabe von 100 mU Endoglycosidase H und anschliessender Inkubation über 48 h bei 37 °C.

## 4.8 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die kovalente Inhibition der CaL B mit den Phenylethylamid-Phosphonat-Inhibitoren wurde durch massenspektrometrische Untersuchung an einem Voyager MALDI-TOF System 2048 (Applied Biosystems) durch Laserdesorption mit Hilfe einer Sinadipin-Säure-Matrix (67 % Acetonitril) festgestellt.

Die deglycosilierte Enzympräparation von CaL B wurde mit 10 % einer Inhibitorlösung (10 mg/ml Inhibitor in Acetonitril) und 10 % Acetonitril versetzt. Die Inkubationszeit bei 25 °C betrug für den R-Phenylethylamin-Inhibitor 2 Stunden und für den S-Phenylethylamin-Inhibitor 48 Stunden. Danach wurde der im Überschuss eingesetzte, nicht umgesetzte Inhibitor durch eine zweimalige Dialyse in einem 50  $\mu$ l Dialyse-Knopf (Hampton Research) mit aufgespannter Dialysefolie, Ausschlussgrösse 12-14 kDa (SpectraPor<sup>®</sup> 2, Roth), gegen das hundertfache Volumen einer 10 % Acetonitrillösung herausdialysiert und anschliessend noch zweimal gegen reines Wasser dialysiert, um den Puffer und das Acetonitril vor den massenspektrometrischen Messungen zu entfernen.

## 4.9 Konformationsanalyse

Als Startgeometrie wurde die experimentell bestimmte Geometrie des Phosphonat-Inhibitors aus der Röntgenstruktur im Komplex mit CaL B verwendet. Die analogen Strukturen des tetrahedralen Kohlenstoff-Intermediates wurden mit Hilfe des Programmes MOLOC erzeugt.

### 4.9.1 Systematische Suche

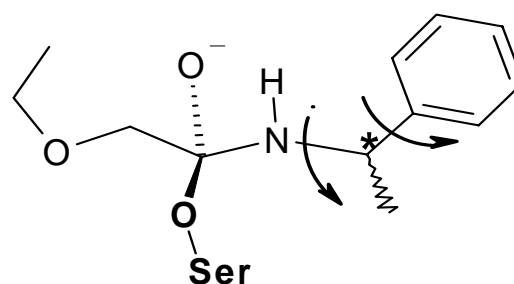
Die systematische Suche nach möglichen Konformationen des Substrats im kovalent gebundenen tetrahedralen Intermediat wurde mit dem Programm SYBYL (TRIPOS) durchgeführt. Als drehbare Bindungen wurden die beiden rotierbaren Bindungen (Abbildung 4.7) des Phenylethylamin-Restes gewählt und in 30° Schritten gedreht.

### 4.9.2 Docking mit FLEXX

Eine weitere Methode zur Generierung der möglichen Bindungsmoden stellt das Docking eines Liganden in die Proteinbindetasche dar. Diese Suche wurde mit dem Programm FLEXX durchgeführt. Der Docking-Algorithmus innerhalb von FLEXX (Rarey *et al.*, 1996) verfolgt eine sequentielle Strategie zum Einpassen eines Liganden in die Bindetasche. Ausgehend von einem Basisfragment, das in diesem Fall immer das kovalent gebundene, tetrahedrale Kohlenstoff oder Phosphoratom darstellt, wird der Ligand unter der Berücksichtigung einer Vielzahl von alternativen Torsionswinkel schrittweise aufgebaut, bis alle Ligandatome platziert sind. Die starren Frag-

mente werden an der Verknüpfungsstelle mit Hilfe von Torsionswinkelbibliotheken (Klebe & Mietzner, 1994) und direktionalen Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen) in die Bindetasche eingepasst. Die sterische Überlappung mit den räumlich fixierten Proteinatomen wird dabei ausgeschlossen.

Anschliessend werden ähnliche Geometrien zusammengefasst und die freie Bindungsenthalpie mit Hilfe einer empirischen Bewertungsfunktion abgeschätzt. Alle gefundenen Geometrien wurden zusätzlich mit der aus Strukturdaten abgeleiteten Scoringfunktion DrugScore (Gohlke, Hendlich & Klebe, 2000) bewertet. Die gefundenen Resultate wurden dann in einer Liste sortiert. Zusätzlich wurde die RMS-Abweichung zu der Startstruktur (s.o.) berechnet.



**Abb. 4.7:** Systematische Suche der möglichen Konformationen des Phenylethyl-Restes in der Bindetasche der CaL B.

## 4.10 Molekulardynamische Simulationen

### 4.10.1 Grundlagen

Die Eigenschaften eines chemischen Systems sind grundsätzlich nicht nur durch das globale Energieminimum, sondern auch durch alle bei einer vorgegebenen Energie mögliche Konfigurationen bestimmt (Zustandssumme). Die chemischen Eigenschaften werden in erster Linie durch die Konfigurationen des Ensembles bestimmt, die am wahrscheinlichsten sind und damit auch am häufigsten eingenommen werden. Aufbauend auf diesen Grundlagen der statistischen Thermodynamik kann ein System durch die thermodynamische Zustandssumme aller in einem Gleichgewichtszustand signifikanten Konfigurationen beschrieben werden.

Insbesondere Proteine sind in ihrer nativen Funktion auf eine wässrige Umgebung und eine Temperatur von ca. 300 K optimiert, so dass die Betrachtung von statistischen Fluktuationen und molekularen Bewegungen zum Verständnis ihrer Funktion sinnvoller erscheint als die alleinige Betrachtung des globalen Minimums.

Das Ziel einer molekulardynamischen (MD) Simulation ist es, ausgehend von einer Startkonfiguration des Systems mit Hilfe der Newton'schen Bewegungsgleichungen dessen zeitliche Entwicklung in einem vorgegebenen Kraftfeld zu berechnen. Über das Kraftfeld wird dann ein Potential abgeleitet, in dem sich die Atome von einer Startgeometrie mit einer

Startgeschwindigkeit fortbewegen. Berechnet man der Kräfte im Potentialfeld, erhält man die Beschleunigungen, die auf einzelne Teilchen wirken. Durch Integration der Newton'schen Bewegungsgleichung wird dann die nächste Position zu einem kurz darauffolgenden Zeitpunkt  $t_1 = t_0 + \Delta t$  bestimmt. Dieser Zeitschritt  $\Delta t$  muss so gewählt werden, dass auch die Bewegungen mit der höchsten Frequenz noch in einer kontinuierlichen Form (Abbildung 4.5) erfasst werden.

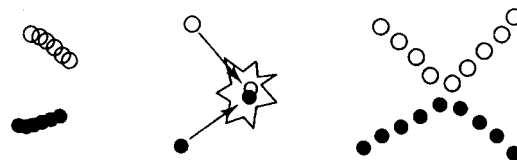


Abb. 4.5: Einfluss des Zeitschrittes auf die Stabilität und Zeitdauer einer MD-Simulation (links: zu klein, mitte: zu groß, rechts: optimal) aus Leach, A. 2001.

Die schnellsten Bewegungen sind Valenzschwingungen, die jedoch nur wenig mit den übrigen in Biomolekülen interessanten Freiheitsgraden, wie z. B. Torsionen, gekoppelt sind. Fixiert man die Bindungslängen, werden Zeitschritte von 1 - 2 fs möglich, wodurch Simulationen über längere Zeiträume erreichbar werden.

Eine konsekutiv durchlaufene Serie von Konfigurationen wird als Trajektorie bezeichnet. Sofern die Startkonfiguration repräsentativ für die gewählten Gleichgewichtsbedingungen ist, sollen die erzeugten Konfigurationen stabil um diese Konfiguration fluktuieren. Die statistische Auswertung einer ausreichend langen Trajektorie beschreibt in diesem Fall alle statistisch relevanten Konfigurationen und damit



die Eigenschaften des Gesamtsystems im gewählten Kraftfeld. Aus diesem Grund kann die Methode der MD-Simulation immer dann vorteilhaft eingesetzt werden, wenn experimentelle Strukturdaten aus Gleichgewichtsexperimenten durch dynamische Informationen ergänzt werden sollen.

Grundsätzlich können mit Kraftfeldbeschreibungen ohne spezielle Parameterisierung keine chemischen Veränderungen eines Systems erfasst werden, wie z. B. Reaktionen unter Bindungsbruch und Neubildung oder die Ausbildung von Übergangszuständen. Dies können neuere Methoden, wie die kombinierten quantenmechanischen und molekülmechanischen Simulationen (Bruice & Kahn, 2000; Gogonea *et al.*, 2001), für biomolekulare Systeme leisten, wie für andere Enzyme in der Literatur (Kollman *et al.*, 2001) gezeigt werden konnte.

Die Zeitskala heutiger MD-Simulationen von komplexen biochemischen Systemen beschränkt sich auf Bereiche von einigen Nanosekunden, so dass viele komplexe dynamische Eigenschaften, die über die Bewegung von Seitenketten und kleineren Bereichen der Hauptkette hinausgehen, nicht ausreichend simuliert werden können. Insbesondere Proteine mit beweglichen Strukturelementen stehen im Fokus des allgemeinen Interesses, daher ist es wünschenswert, durch Weiterentwicklungen der Methode und durch den zunehmenden Einsatz schnellerer Rechner auch längere Zeiträume zu simulieren.

#### 4.10.2 Kraftfelder

Eine weitere Einschränkung ist die Wahl des Kraftfeldes zur Beschreibung des Systems und des Solvens. Es gibt heute mehrere etablierte Kraftfelder, die zur korrekten Beschreibung von Biomolekülen parametrisiert worden sind, wie z. B. AMBER, GROMOS, CHARMM. oder CFF.

Schwierig ist die korrekte Beschreibung der nicht kovalenten Wechselwirkungen und der weitreichenden elektrostatischen Wechselwirkungen des Proteins und des Solvens. Die korrekte Berücksichtigung der Ladungen und der induzierten Partialladungen sowie die Beschreibung von Wasserstoffbrückenbindungen im System ist daher von besonderem Interesse.

Zur Beschreibung des umgebenden Solvens existieren spezielle Kraftfeldmodelle wie z. B. TIP3P, die es erlauben, das Protein in einer Wasserhülle (Box) vollständig oder mit einer Wasserkappe (Cap) über dem aktiven Zentrum zu beschreiben. Um Randeffekte zu minimieren, muss die Wasserumgebung ausreichend gross gewählt werden, was die Zahl der expliziten Wassermolekülen in die Grössenordnung von mehreren Tausend ansteigen lässt.

Die Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen kann in diesen Kraftfeldern ein Problem darstellen, da die chemischen Eigenschaften der vielfältigen funktionellen Gruppen von Ligandmolekülen oft nicht in den Kraftfeldern vorparametrisiert sind.

Ein alternativer Ansatz ist der Einsatz von generischen Kraftfeldern, wie z. B. das MAB aus dem Programm MOLOC, das in der Lage ist, sowohl die Solvatisierung als auch die korrekte Ausbildung von Wasserstoffbrücken für Biomoleküle und für eine breite Palette kleiner Moleküle implizit zu approximieren.

#### 4.10.3 Durchführung von Simulationen

Mit Hilfe der MD Simulation wurde die Dynamik verschiedener Lipase-Ligand-Komplexe unterschiedlicher Zustände entlang des Reaktionspfades untersucht und die Unterschiede im Hinblick auf die Stereochemie der Liganden analysiert. Die Startstrukturen für beide Enantiomere wurden, ausgehend von der Geometrie der kovalent gebundenen experimentell bestimmten Inhibitorstruktur, durch Minimierung in der Bindetasche mit dem Programm MOLOC generiert.

##### 4.10.3.1 Simulation mit MOLOC und MAB

Für die MD-Simulation wurde das Protein in einem Radius von 12 Å um den Liganden berücksichtigt, ausserhalb dieses Bereiches wurden die Proteinatome räumlich fixiert. Zur Energieberechnung des Wasserstoffbrückennetzes wurde ebenfalls nur dieser ausgewählte Bereich berücksichtigt. Als Zeitschritt wurde 1 fs gewählt und die Simulation bei 300 K über einen Zeitraum > 1,5 ns durchgeführt. Die erste Phase der Simulation (100 ps) diente der Equilibrierung der Gesamtenergie und der Geometrie des Systems. Die Trajektorie wurde in Abständen von 1 ps aufgenommen.

#### 4.10.4 Auswertung von MD-Simulationen

Die Analyse der Trajektorie wurde durch die statistische Auswertung einzelner geometrischer Parameter, wie z. B. interatomarer Abstände von potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen sowie intramolekularer Größen wie Torsionswinkel durchgeführt. Für diese Größen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und zusätzlich der Verlauf und die statistische Häufigkeitsverteilung über die gesamte Trajektorie ausgewertet.

Bei der Auswertung von Trajektorien muss die Zeitskala berücksichtigt werden, auf der eine beobachtete Veränderung stattfindet. Schwieriger zu beschreiben sind Prozesse, die über den Simulationszeitraum einen "Drift" zeigen, also eventuell langsamer ablaufen als der Simulationszeitraum berücksichtigt oder deren Gleichgewichtsgeometrie nicht durch die Startstruktur beschrieben wurde. Problematisch in ihrer statistischen Interpretation sind auch schnelle Vorgänge, die nur selten eintreten, d. h., wenn das System zufällig zwischen zwei möglichen Zuständen wechselt.

Grundsätzlich gilt, dass Trajektorienmittelwerte nur repräsentativ sind, wenn die Beobachtungszeit der Simulation deutlich grösser ist als die Relaxationszeit dieser bestimmten Eigenschaft. Die statistische Auswertung der Trajektorie kann wertvolle Aufschlüsse über die dynamischen Eigenschaften des Systems geben.

## 4.11 Homologiemodellierung

Zur Erzeugung eines Homologiemodells der *Burkholderia plantarii* Lipase in der offenen Konformation wurde das Programmpaket MODELLER (Sanchez & Sali, 2000) in den Versionen 4 und 6a eingesetzt.

Das Sequenzalignement wurde mit dem über das Internet zugänglichen SAS-FASTA Algorithmus durchgeführt, der für Proteine mit bekannter Struktur ein Alignment basierend auf der Aminosäurehomologie und dem Faltungsmuster durchführt. Dadurch ist sichergestellt, dass alle bekannten Informationen, wie

z.B. konservierte Aminosäuren und konservierte Strukturbereiche wie Loops, Turns und Sekundärstrukturmuster bestmöglich übereinstimmen. Das verwendete Alignment ist in der Tabelle 4.1 abgebildet.

Als Basis wurde die Röntgenstruktur der *Burkholderia plantarii* Lipase (1tah) in einer geschlossenen Konformation verwendet. Die homologen Templatstrukturen in der offenen Konformation sind *Pseudomonas cepacia* Lipase (84.0 % Sequenzhomologie, 5lip) und *Pseudomonas aeruginosa* Lipase (41.0 % Sequenzhomologie, 1ex9).

### 1tah *Burkholderia plantarii* Lipase, geschlossen

```
-DTYAATRYPVILVHGLAGTDKFNANVVDYWYGIQSDLQSHGAKVYVANLSGFQSDDGPNQ
RGEQLLAYVKQVLAATGATKVNLIHGSQGGLTSRYVAAVAPQLVASVTTIGTPHRGSEFA
DFVQDVLKTDPTGLSSTVIAAFVNVFVGTLSV--SSHNTD-QDALAALRTLTTAQTATYNR
NFPSAGLGAPGS-CQTGAATETVGGSQHLLYSWGGTAIQPTSTVLGVTGATDSTGTGL-D
VANVTDPSTLALLATGAVMINRASGQNDGLVSRCSLFGQVISTSYHWNHLDEINQLLGV
RGANAEDPVAVIRTHVNRLKLAGV*
```

### 5lip *Pseudomonas cepacia* Lipase, offen 84.0 % Sequenzhomologie

```
ADNYAATRYPIILVHGLTGTDKYAGVLEYWYGIQEDLQQRGATVYVANLSGFQSDDGPNQ
RGEQLLAYVKTVLAATGATKVNLVHGSQGGLTSRYVAAVAPDLVASVTTIGTPHRGSEFA
DFVQGVLAYDPTGLSSTVIAAFVNVFVGTLSV--SSNNTN-QDALAALKTLTTAQAATYNQ
NYPSAGLGAPGS-CQTGAPTETVGGNTHLLYSWAGTAIQPTISVFGVTGATDSTIPLVD
PANALDPSTLALFGTGTVMVNRGSGQNDGVVSKCSALYGVVLSVSYKWNHLDEINQLLGV
RGANAEDPVAVIRTHANRLKLAGV*
```

### 1ex9 *Pseudomonas aeruginosa* Lipase, offen 41.0 % Sequenzhomologie

```
-STYTQTKYPIVLAHGMGLGFDNIGV-DYWFGIPALRRDGAQVYVTEVSQ---DTSEV
RGEQLLQVVEEIVALSQPKVNLIHSHGGPTIRYVAAVRPDLIASATSVGAPHKGSDTA
DFLRQI---PPGSAGEAVLSGLVNSLGLALISFLSSGSTGTQNSLGSLESLNSEGAARFNA
KYPQ---GIPTSACGEGAYK--VNGVSY--YSWSGSS--PLT-----
--NFLDPSDAFLGASSLTFKNGTA--NDGLVGTCSHLMVIRDNYRMNHLDEVNQVFGL
TSLFETSPVSVYRQHANRLKNASL*
```

Tab.4.1: SAS-FASTA –Sequenzalignement für die Homologiemodellierung mit MODELLER

## 5. ERGEBNISSE TEIL I

### **CANDIDA ANTARCTICA**

### **LIPASE B**

#### 5.1. Proteinreinigung und Charakterisierung

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Kristallisation der *Candida antarctica* Lipase im Komplex mit kovalent gebundenen Inhibitoren. Aus diesem Grund ist die Reinigung der Proteine in zur Kristallisation ausreichender Menge bis zur analytisch festgestellten Homogenität verfolgt worden.

Die Reinigung der *Candida antarctica* Lipase B (CaL B) erfolgte aus einer kommerziell erhältlichen Rohlipase-Suspension NOVOZYM 525 (NOVO Nordisk A/S), abgewandelt nach einem Protokoll von S. Patkar (Patkar *et al.*, 1993).

##### *Vorreinigung über Ionenaustausch-Chromatographie mit DE52-Sepharose*

Die verdünnte Lipaselösung wurde mit Whatman<sup>®</sup> DE 52-Sepharose versetzt und eine halbe Stunde ausgerührt, um die enthaltenen Verunreinigungen zu binden. Die DE 52-Sepharose wurde über eine Filterfritte abgetrennt, und die nicht gebundene lipasehaltige Lösung wurde zur weiteren Reinigung bei 4°C aufbewahrt.

##### *Chromatographie mit tert-Butyl-sepharose*

Die lipasehaltige Lösung wurde zur anschließenden hydrophoben Interaktions-Chromatographie (HIC) mit NH<sub>4</sub>Ac auf eine Leitfähigkeit von 40 mSi/cm eingestellt. Als Säulenmaterial wurde tert-Butyl-Sepharose (Toyo<sup>®</sup> TSK-butyl 650M) verwendet.

Das Säulenmaterial wurde mit 1 M NH<sub>4</sub>Ac equilibriert und anschliessend die Lipaselösung aufgetragen. Ungebundenes Material wurde mit 1M NH<sub>4</sub>Ac ausgewaschen. Die Lipase konnte mit reinem Wasser eluiert werden. Die so erhaltene Lipaselösung wurde im Vakuum gefriergetrocknet.

##### *Gelfiltration*

Zur Feinreinigung wurde mit einem Teil der CaL B zusätzlich eine Gelfiltration über Sephadex 60/20 durchgeführt um eventuell vorhandene Verunreinigungen abzutrennen. Es konnte nur eine Bande festgestellt werden, bei der es sich um die CaL B handelte. Die so erhaltene, feingereinigte Lipase wurde im Vakuum gefriergetrocknet.

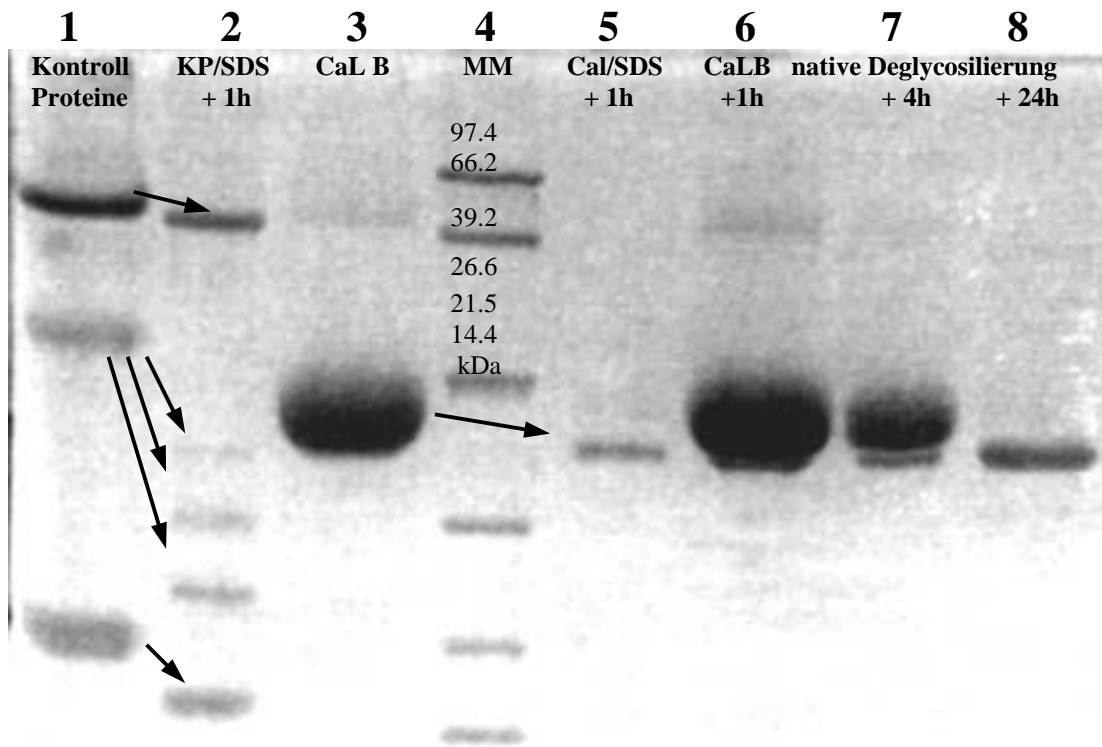


Abb. 5.1: SDS-PAGE (15 %) Kontrolle der Deglycosilierung von CaL B mit N-Glycosidase F (+) Es ist gezeigt, dass CaB L (Spur3) mit SDS nach 1h vollständig deglycosiliert werden kann (Spur 5), während die native Deglycosilierung 24 h Inkubation (Spur 8) erfordert. [1] Kontroll-Proteine (humanes Transferrin, Ribonuclease B, humanes -saurer Glycoprotein); [2] Kontroll-Proteine/SDS deglyc. (+ 1h); [3] CaL B; [4] MolMarker; [5] CaL B/SDS deglyc. (+1h) [6] CaL B nativ deglyc. (+1h); [7] CaL B nativ deglyc. (+4h); [8] CaL B nativ deglyc. (+24h)

### Analytik

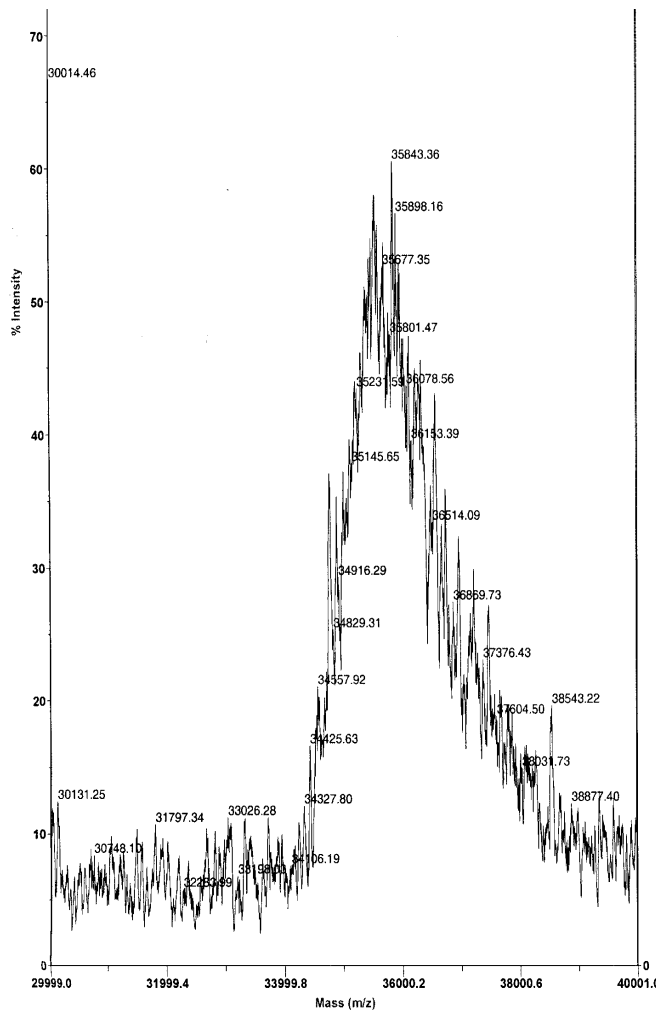
Die CaL B erwies sich in der SDS-PAGE als sehr gut mit Coomassie anfärbbar und zeigte eine sehr breite Bande (Abbildung 5.1), obwohl die Gelfiltration nur eine Bande lieferte. Daher wurde mit Hilfe eines MALDI-TOF Experimentes versucht, die Masse der Lipase genauer zu untersuchen.

Das in Abbildung 5.2 wiedergegebene Spektrum zeigt eine heterogene Massenverteilung von 34-39 kDa in der Lipase. Das theoretische Molekulargewicht beträgt 33022.4 (SWISS-PROT). Aus der Sequenz und der Röntgenstruktur ist bekannt, dass es eine Glycosilie-

rungstelle (N74-X-Thr) im Enzym gibt (Uppenberg *et al.*, 1995). Frühere Untersuchungen anderer Lipasen zeigten, dass eine solche heterogene Massenverteilung möglicherweise auf eine Glycosilierung zurückzuführen sein kann (Hedrich *et al.*, 1993).

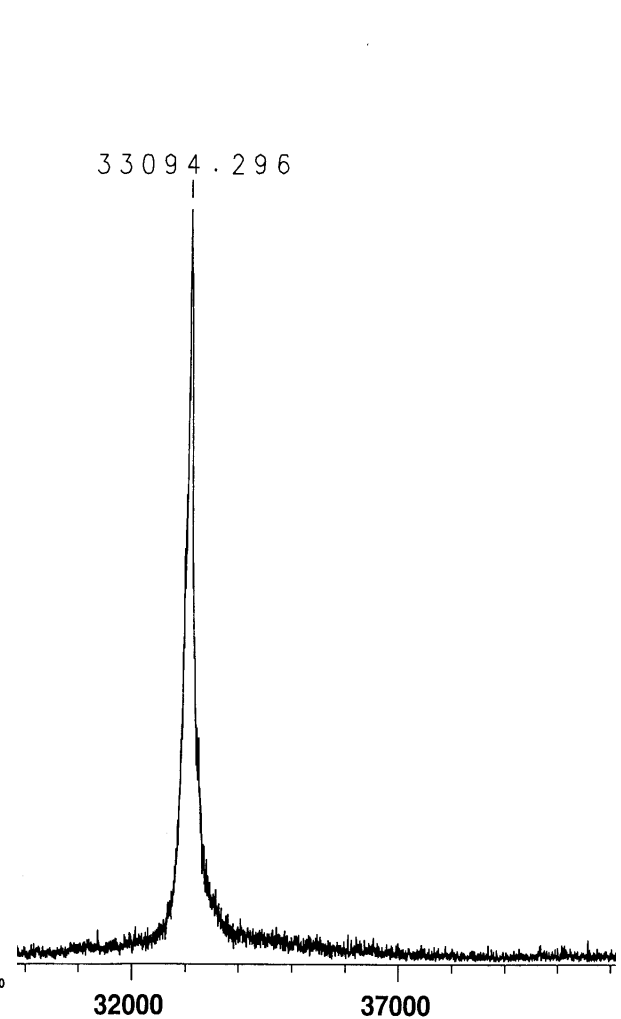
### Deglycosilierung

Aufgrund der heterogenen Massenverteilung im Massenspektrum im MALDI-TOF (Abb. 5.2a) wurde überprüft, ob die CaL B glycosiliert vorliegt.



**Abb. 5.2a:** MALDI-TOF-MS der glycosylierten CaL B. Die ermittelte Masse ist über einen Bereich von 34-40 kDa verteilt. Die theoretische Masse sollte dagegen 33 kDa betragen.

Dazu wurde die Lipase nach dem im Kapitel 4.7 beschriebenen Protokoll mit Hilfe eines N-Glycosidase F Deglycosilierungs-Kits (Roche Diagnostics vormals Boehringer Mannheim) behandelt. Die Lipase und die mitgelieferten Kontrollproteine wurden mit SDS denaturiert und anschliessend deglycosiliert. Die anschließende SDS-PAGE zeigt in Abbildung 5.1 deutlich, dass sich das Molekulargewicht nach der Inkubation mit der Deglycosidase verringert hat und die breit verschmierte Bande verschwunden ist.



**Abb. 5.2b:** ESI-MS der deglycosylierten CaL B nach nativer Deglycosilierung ohne SDS-Denaturierung mit N-GlycosilaseF über 24 h. Die exakte Masse beträgt 33,094 kDa.

Für die Kristallation wurde ein Protokoll zur nativen Deglycosilierung ohne SDS-Denaturierung erprobt. Die native Deglycosilierung erforderte eine längere Inkubationszeit. Nach 1 h und 4 h war ein Teil der Lipase noch glycosiliert, erst nach 24 h Inkubation gelang die vollständige Deglycosilierung. Hochaufgelöste ESI-MS (Abbildung 5.2 rechts) ergab eine nunmehr homogene Enzymmasse von 33094 Da  $\pm$  1 Da.

## 5.2 Enzymkinetik

### 5.2.1 Michaelis-Menten-Kinetik

Die steady-state-Parameter für das verwendete p-Nitrophenolat wurden bei 25°C in 5 % Acetonitril, 25 mM Tris pH 7,0 10 mM CaCl<sub>2</sub> gemessen.

Um die Reaktion zu verfolgen, wurde die Absorptionsänderung durch das bei der Hydrolyse entstehende p-Nitrophenolat in einem Photometer bei 405 nm aufgezeichnet und die Anfangsgeschwindigkeit über eine lineare Regression berechnet. Die Parameter  $K_M$  und  $k_{cat}$  wurden aus den gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten  $v$  für verschiedene Substratkonzentrationen  $S$  über eine nichtlineare Regression nach der Formel:  $v = \frac{v_{max} [S]}{K_M + [S]}$  angepasst (siehe Kapitel 2.5).

Michaelis Menten Kinetik	$K_M$ mM	$V_{max}$
CaL B pH 7	$0,36 \pm 0,04$	$34,7 \pm 2,1$

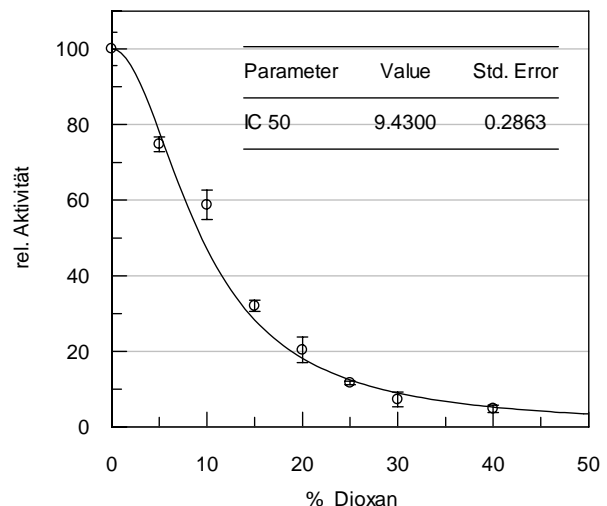
### 5.2.2 Lösungsmittelabhängigkeit

Zur Bestimmung des Einflusses organischer Lösungsmittel auf die Aktivität von Lipasen wurde die Hydrolyse von p-Nitrophenyl-Acetat in wässrigen Lösungsmittelgemischen untersucht. Die Konzentration der untersuchten Lösungsmittel variierte zwischen 5 % und 40 %.

Die Abhängigkeit der Aktivität von der Lösungsmittelkonzentration wurde durch eine nichtlineare Anpassung eines IC50-Wertes beschrieben, wobei dieser IC50 die Lösungsmittelkonzentration bestimmt, bei der 50 % relative Aktivität, verglichen mit wässriger Lösung, erreicht wird. Als Anpassungsfunktion wurde die in dem Programm GraFit implementierte IC50-Funktion verwendet.

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^2} \quad \text{Fitfunktion IC 50}$$

Der aus drei Messungen errechnete Mittelwert und Messfehler wurde dabei explizit für die Anpassung berücksichtigt. In Abbildung 5.3 ist exemplarisch die relative Aktivität bei Zugabe von Dioxan und die entsprechende Anpassung wiedergegeben.



**Abb.5.3** : Nichtlinearer Fit der Lösungsmittelabhängigkeit von CaL B mit Dioxan.

Die Aktivitätsbestimmung wurde für CaL B mit den in der folgenden Tabelle aufgeführten Lösungsmitteln bestimmt. Die Tabelle ist nach zunehmender Inhibierung geordnet.

CaL B	IC 50 (% Lsgm.)	Fehler	IC 50 mM	Fehler
Dioxan	9.4	0.28	1.03	0.03
Aceton	8.9	0.60	1.94	0.13
Acetonitril	7.6	0.31	2.36	0.10
Methanol	7.4	0.92	2.93	0.36
Ethanol	5.4	0.14	1.49	0.04
THF	4.9	0.27	0.76	0.04
iso-Propanol	4.2	0.32	0.89	0.07

Dabei wurde festgestellt, dass es möglich ist, die Aktivität von CaL B gegenüber löslichen Substraten, wie dem verwendeten p-Nitrophenylacetat, durch Zugabe von Triton X-100 oberhalb der kritischen Micellbildungs-Konzentration (CMC 0.22 - 0.24mM,  $\approx$  0.015 %) um den Faktor 3 zu erhöhen. Bei zunehmender Detergenzkonzentration sinkt die Aktivität dann wieder ab (Abb. 5.4).

Bei Messungen mit bis zu 0,2 %  $\beta$ -Octyl-glycopyranosid wurde kein Einfluss des Detergenz auf die Katalysegeschwindigkeit festgestellt.

### 5.2.3 Aktivierung von Lipasen durch Detergenzien

Analog zur Inhibierung durch organische Lösungsmittel wurden kinetische Experimente mit den nichtionischen Detergenzien Triton X 100 und  $\beta$ -Octyl-glycopyranosid durchgeführt.

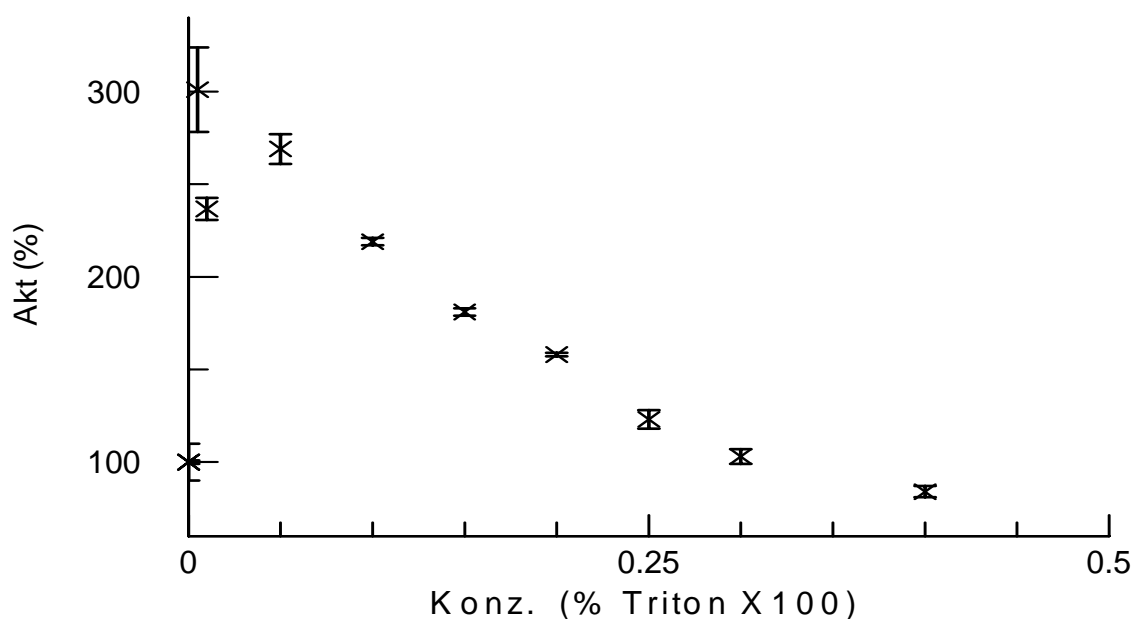


Abb. 5.4: Aktivierung von CaL B durch Zugabe von Triton X 100. Durch Zugabe von kleinen Konzentrationen wird die gemessene Aktivität auf 300 % der Anfangsaktivität erhöht und nimmt bei weiterer Zugabe wieder ab.



### 5.2.4 Burst-Kinetik

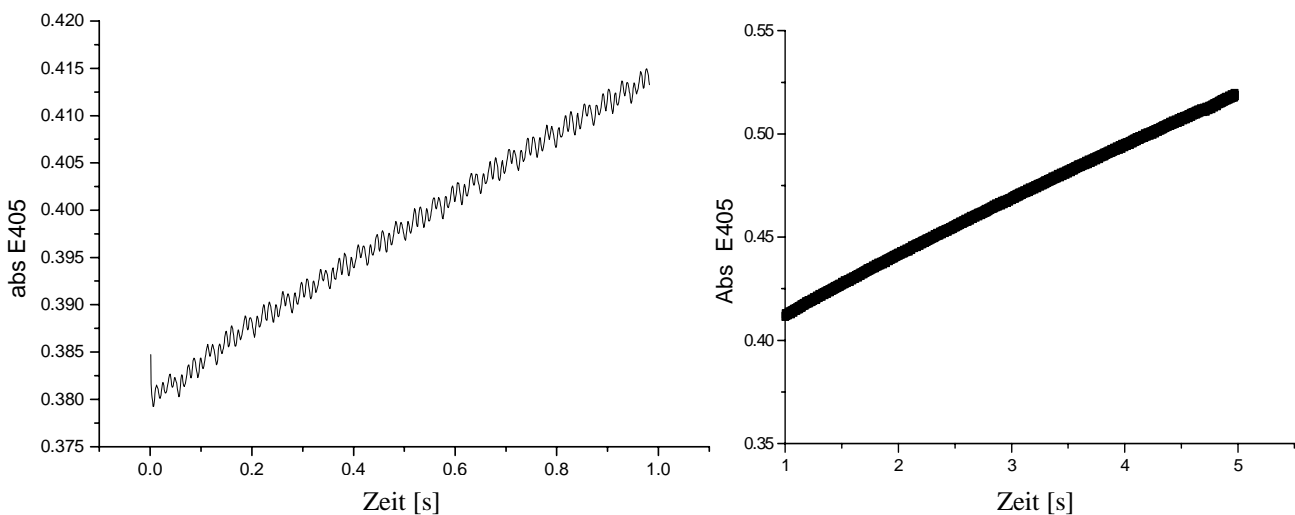
Um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Ester- bzw. der Amidspaltung durch Lipasen zu bestimmen, wurden Stopped-Flow-Experimente der Hydrolyse von verschiedenen Modellsubstraten mit einer Zeitauflösung von 1 ms bis 100 s durchgeführt.

Beobachtet wurde die Abspaltung des p-Nitrophenolat-Anions bei 405nm im pH-Bereich von 7-9 mit den Substraten p-Nitrophenyl-Acetat, -Propionat und p-Nitrophenyl-Acetamid im Konzentrationsbereich von 0,1 mM bis 2,5 mM.

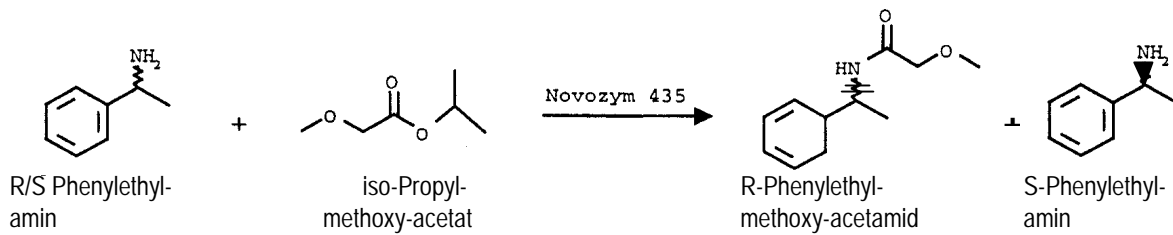
Für die untersuchten Bedingungen konnte für keines der verwendeten Substrate ein initialer "Burst" oder initialer "Lag" in der "pre-steady-state" Kinetik vor Einstellung eines Fließgleichgewichts für die Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden.

Beispielhaft ist ein nahezu linearer Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit für die Hydrolyse von p-Nitrophenyl-Acetat bei pH 7 in der Abbildung 5.5 von 0 - 1 s (links) und von 1 - 5 s (rechts) dargestellt. Nach 100 s ist das Substrat fast vollständig hydrolysiert und die Reaktionsgeschwindigkeit geht auf null zurück.

Auch bei der Zugabe von 5 % - 20 % Acetonitril bzw. iso-Propanol wurde ein linearen Reaktionsverlaufes festgestellt. Die Reaktion wurde lediglich insgesamt verlangsamt.



**Abb. 5.5:** Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von p-Nitrophenol-Acetat in der Stopped-Flow-spektrophotometrischen Beobachtung bei 405 nm. Links ist ein Zeitintervall von 0-1 s, rechts von 1-5 s aufgetragen. Reaktionsbedingungen : 0,5 mg/ml CaL B + 1mM p-NPA 10 % Acetonitril, 50mM Tris pH 7.



### 5.3 Kinetische Racematspaltung von Phenylethyl-amin mit CaL B

Die experimentellen Untersuchungen zur technischen kinetischen Racematspaltung von rac-Phenylethylamin mit iso-Propyl-methoxy-acetat als Acylierungsmittel mit immobilisierter CaL B (NOVOZYM<sup>®</sup> 435) wurden in der BASF AG (Labor Klaus Ditrich) durchgeführt.

#### 5.3.1 Temperaturabhängigkeit der kinetischen Racematspaltung

Es wurde eine starke Abnahme der Enantioselektivität mit steigender Temperatur im Bereich von 0°C - 90°C festgestellt. Die Enantioselektivität der kinetischen Racematspaltung ist durch das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden Enantiomere bestimmt. Berücksichtigt man die Eyring-Theorie des aktivierten Komplexes für diese enzymkatalysierte Reaktion, so ergibt sich das in der Abbildung 5.6 schematisierte thermodynamische Modell.

Der Unterschied der Aktivierungsenergie für die Reaktion des acylierten Enzyms mit dem jeweiligen Enantiomer ergibt die Differenz-

Aktivierungsenergie  $\Delta_{R-S} \Delta G^\ddagger$  der kinetischen Racematspaltung. Die Enantioselektivität  $E$  einer kinetischen Racematspaltung ist nach Arrhenius über die Gleichung

$$\ln E = -\frac{\Delta_{R-S} \Delta G^\ddagger}{RT}$$

mit der Differenz-Aktivierungsenergie verknüpft. Berücksichtigt man die Beiträge von Enthalpie und Entropie zur freien Energie  $G$ , so kann man über einen linearisierten van't Hoff-Auftragung die enthalpischen und entropischen Beiträge aus der Temperaturabhängigkeit von  $E$  berechnen.

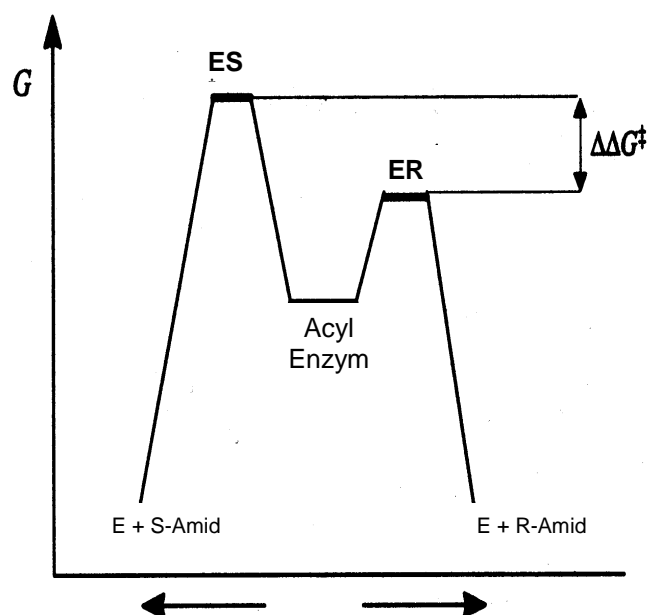


Abb. 5.6: Thermodynamisches Modell der kinetischen Racematspaltung mit Lipasen

$$\ln E = -\frac{\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger}{R}$$

Aus dem in Abbildung 5.7 gezeigten van't-Hoff-Diagramm über einen Temperaturbereich von 20° bis 90° C wurden folgende Werte für die thermodynamischen Differenz-Aktivierungs-Parameter errechnet:

$$\begin{aligned}\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger &= -4,6 \text{ kcal/mol} \\ \Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger &= -7,9 \text{ kcal/mol} \\ -T\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger &= 3,3 \text{ kcal/mol} \\ &(298\text{K})\end{aligned}$$

Daraus geht hervor, dass der enthalpische Beitrag zur Differenz-Aktivierungsenergie klar das schnellere R-Enantiomer bevorzugt, aber der entropische Beitrag dem entgegenwirkt. Die Reaktion des langsameren Enantiomers mit dem Acyl-Enzym ist also entropisch begünstigt und damit verringert sich die Enantioselektivität bei steigender Temperatur.

Die Temperaturabhängigkeit der unkatalysierten Reaktion wurde ebenfalls untersucht, um auszuschließen, dass die racemisch ablaufende Amidierung des freien Amins durch das Acylierungsmittel eine Verringerung der Enantioselektivität bei den enzymkatalysierten Reaktion verursacht.

Die nichtkatalysierte Reaktion produziert das Amid mit einer Geschwindigkeitskonstanten von  $6.0 \times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$  bei 25°C und  $6.2 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$  bei 80°C.

Bei noch höheren Temperaturen muss ein Enantioselektivitätsverlust durch die zunehmend schneller ablaufende, nicht enzymatische Nebenreaktionen berücksichtigt werden. Bei 120 °C beträgt die Geschwindigkeitskonstante bereits  $3,9 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ . Daher kann die Bildung von S-Amid im untersuchten Temperaturbereich vernachlässigt werden.

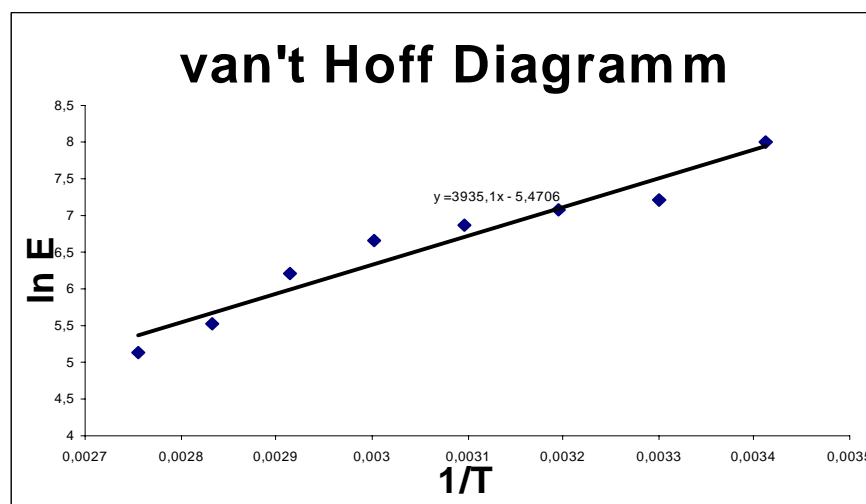


Abb. 5.7: Auswertung der experimentellen Temperaturabhängigkeit der kinetischen Racematspaltung von Phenylethylamin mit CaL B.

## 5.4 Kovalente Inhibition von Lipasen

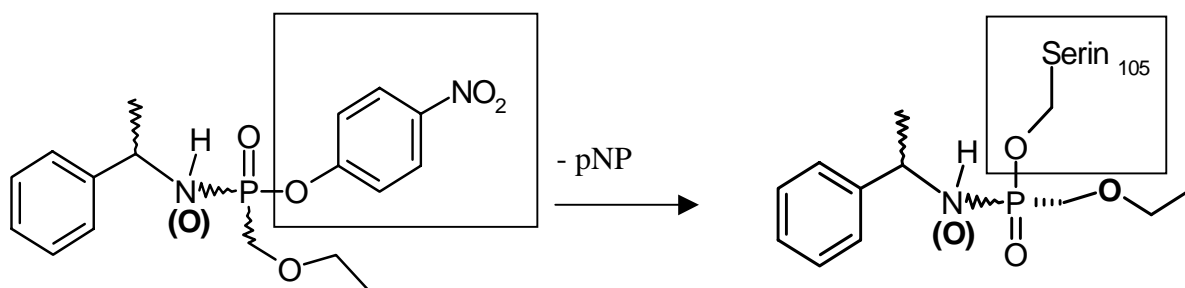
In Zusammenarbeit mit der BASF AG, Labor Dr. Ditrich, wurden von Hans Dieter Gerber verschiedene enantiomerenreine, diastereomere Phosphonat-inhibitoren des in Abbildung 5.8 gezeigten Typs synthetisiert, die irreversibel mit dem nukleophilen Serin im aktiven Zentrum reagieren und einen kovalenten Komplex mit der Lipase ausbilden.

Ziel war die Bestimmung der Kristallstruktur einer Lipase im Komplex mit den stereochemisch einheitlichen Phosphonat-inhibitoren, um die Wechselwirkungen der beiden Stereoisomere mit dem Enzym strukturell zu untersuchen.

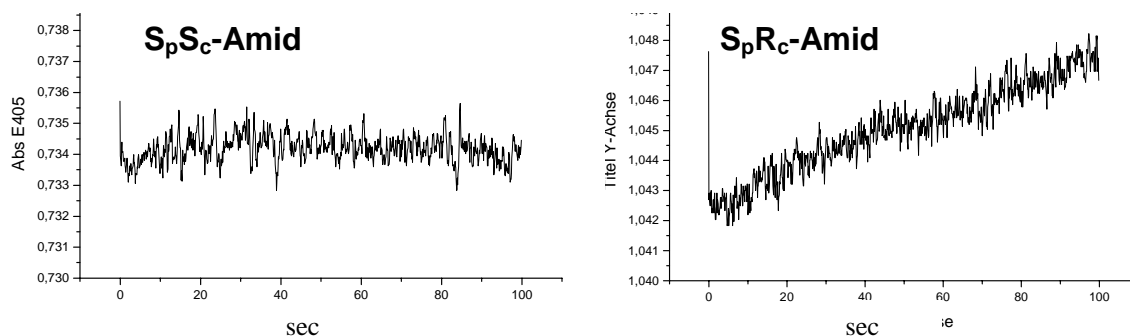
### 5.4.1 Inhibition von CaL B

Es zeigte sich, dass die Geschwindigkeit der in Abbildung 5.8 gezeigten irreversiblen Inhibierungsreaktion von der Stereochemie des Inhibitors abhängt. Im Inhibitor liegen zwei Stereozentren vor: eines am Phosphor und ein zweites im Amid bzw. Alkoholrest. Nur die Diastereomere mit S-Konfiguration am Phosphor waren in der Lage, das Enzym nach 24 h vollständig zu inhibieren.

Interessant ist die Beobachtung, dass im direkten Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden Phosphonsäure-Amide die gleiche Stereopräferenz in der kinetischen Racematspaltung wie bei der Reaktion der Carbonsäure-Amide beobachtet wurde. In beiden Fällen reagiert das  $S_pR_c$ -Amid schneller als die Verbindung mit dem  $S_pS_c$ -Amid.



**Abb. 5.8:** kovalente Inhibierung von Lipasen durch Phosphonat-inhibitoren unter Abspaltung von *p*-Nitrophenol



**Abb. 5.9:** Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten des  $S_c$ -Phenylethylamido-Phosphonat-Inhibitors (links) und des  $R_c$ -Phenylethylamido-Phosphonat-Inhibitors (rechts) mit CaL B im photometrischen Assay bei 405 nm

In Abbildung 5.9 ist beispielhaft der Verlauf der Anfangsgeschwindigkeit für beide Diastereomere eines  $S_p$ -Phosphonat-Phenylethylamid-Inhibitors im photometrischen Assay gezeigt. Die Auswertung der Reaktionsgeschwindigkeit durch eine lineare Regression ergab eine um den Faktor 1000 verlangsamte Reaktion des  $S_c$ -Phenylethylamid-Inhibitors mit CaL B gegenüber der Reaktion mit dem schnellen  $R_c$ -Amid.

Die Vollständigkeit der Inhibierung wurde durch Inkubation der Lipase über 24 h mit einem hundertfachen Überschuss des Inhibitors in einem Puffer mit 50 % Aceton untersucht (BASF Labor Dr. Friedrich, Volker Wengert). Anschliessend wurde der ungebundene Inhibitor durch mehrmalige Dialyse gegen Puffer entfernt und die Restaktivität nach der Dialyse untersucht. In Diagramm 5.10 sind die Ergebnisse der Inhibierung für die Lipase CaL B bei pH 5,5 und pH 7 zusammengefasst. Die Nomenklatur der Stereozentren benennt immer zunächst das Stereozentrum am Phosphor und dann das Stereozentrum des Amins bzw. des Phenylethylalkohols. Die vollständige Inhibierung innerhalb von 24 h gelang nur mit Inhibitoren, die am Phosphoratom  $S_p$ -Konfiguration aufweisen oder racemisch vorliegen.

Die Geschwindigkeit der Inhibierung ist im Fall des  $S_pR_c$ -Phosphonamid deutlich schneller (10-15 min) als im Fall des  $S_pS_c$ -Phosphonamid (3 h). Die gleiche Präferenz konnte auch für die Inhibitoren mit gebundenem Phenylethylester festgestellt werden. Die Reaktion der Inhibitoren mit p-Nitro-Naphthylalkohol

als Abgangsgruppe war dagegen für beide Alkoholentiomere gleich langsam.

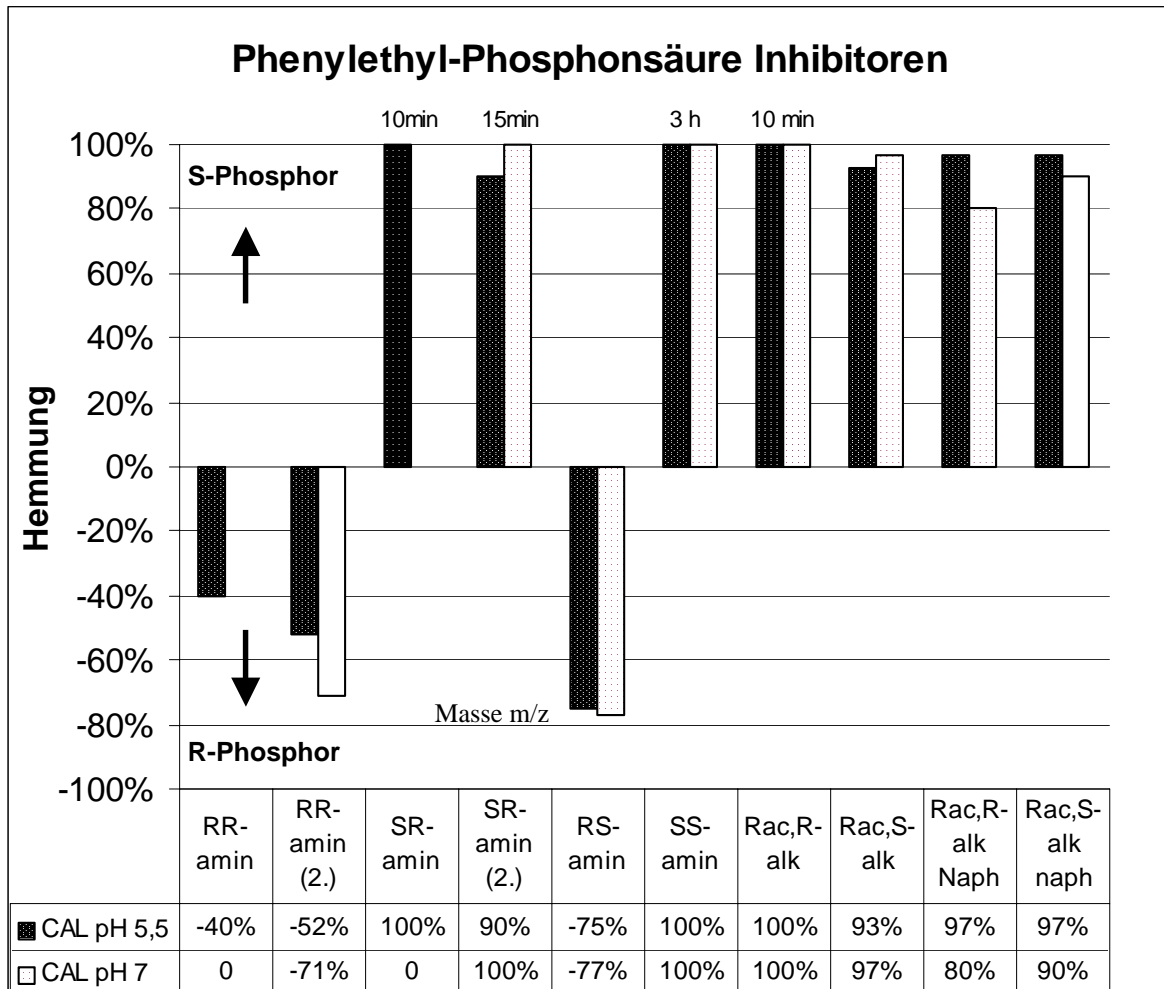
#### 5.4.2 Nachweis der Inhibition von CaL B durch MALDI-TOF MS

Der Nachweis der direkten kovalenten Bindung des Inhibitors an die *Candida antarctica* Lipase B konnte mit Hilfe der Massenspektrometrie erbracht werden.

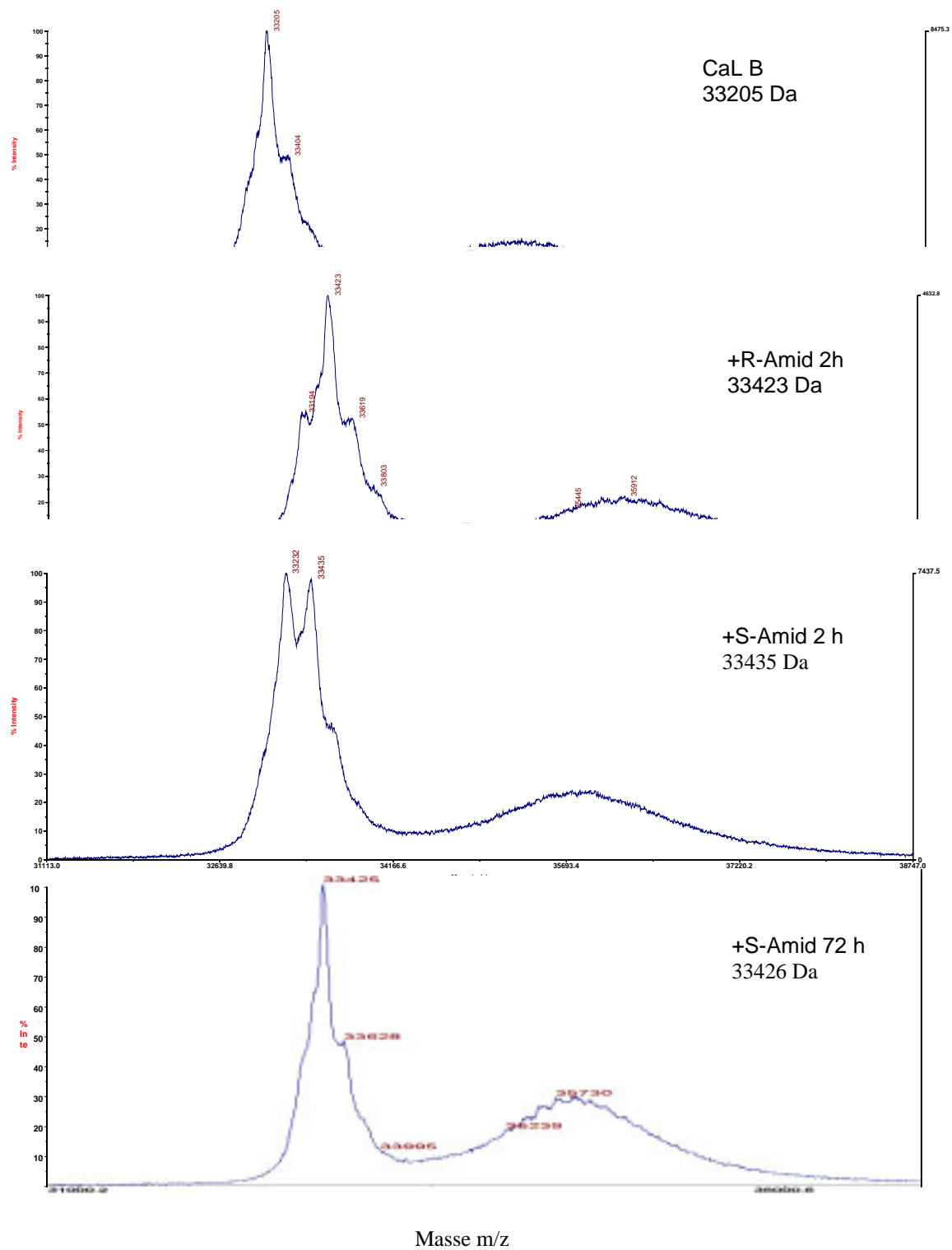
Die Masse der mit Endo-H deglycosilierten CaL B beträgt im MALDI-TOF  $33205 \text{ Da} \pm 10 \text{ Da}$ . Die zusätzliche Masse des gebundenen Inhibitors beträgt theoretisch  $224,25 \text{ Da}$ .

Diese Massendifferenz konnte nach Inkubation der Lipase mit dem Inhibitor und anschliessender Dialyse mit Hilfe von MALDI-TOF Massenspektren (Abbildung 5.11) nach dem in Abschnitt 4.8 beschriebenen Protokoll eindeutig aufgelöst werden. Die Massendifferenz betrug  $230 \text{ Da} \pm 10$  für den  $S_pR_c$ -Phosphonamid-Inhibitor bzw.  $218 \pm 10 \text{ Da}$  für den  $S_pS_c$ -Phosphonamid-Inhibitor.

Die langsamere Inhibierungsgeschwindigkeit des  $S_c$  Phosphonamids wurde auch im MALDI-TOF (Abbildung 5.11, unten) beobachtet. Die vollständige Inhibierung durch das  $S_c$  Phosphonamid wurde erst nach 48 h festgestellt.



**Abb. 5.10:** Ergebnisse der Inhibierung von CaL B bei pH 5,5 und 7 in Abhängigkeit von der Stereochemie der diastereomeren Inhibitoren. Nach maximal 24 h konnte die Lipase nur von Inhibitoren mit  $S_p$ -Konfiguration am Phosphor (nach oben aufgetragen) vollständig inhibiert werden. Die Inhibitoren mit  $S_pR_c$ -Konfiguration am Amid oder Alkohol zeigten schon nach geringerer Zeit vollständige Inhibition. (kürzere Zeiten bis zur vollständigen Inhibierung sind jeweils oben am Balken indiziert)



**Abb. 5.11:** MALDI-TOF Massenspektren von deglycosilierter CaL B (oben) nach Inkubation über 2 h mit R-Phosphonamid (mitte) bzw. mit S-Phosphonamid nach 2 h und nach 72 h (unten). Die Inhibierung ist im Fall des S-Amids nach 2 h noch nicht vollständig.

## 5.5 Kristallstrukturen

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, Kristallstrukturen der *Candida antarctica* Lipase B in der nativen, offenen Konformation und im Komplex mit beiden Enantiomeren eines Phenylethylamid-Inhibitors zu bestimmen. Die Identität und Stereochemie der synthetisierten enantiomerenreinen Phenylethylamid-Inhibitoren konnte ebenfalls durch Röntgenstrukturanalyse gesichert werden.

### 5.5.1 Struktur der Phenylethylamid-Inhibitoren

Die von Hans Dieter Gerber synthetisierten Diastereomergemische der  $P_{rac}R_c$ - bzw.  $P_{rac}S_c$ -Phenylethyl-Phosphonamid-Inhibitoren konnten durch fraktionierte Kristallisation in  $CCl_4$  oder tert-Butylmethylether im Gemisch mit Cyclohexan durch fraktionierte Kristallisation getrennt werden.

Im NMR-Experiment (JEOL 400 MHz, Labor Dr. Kämpchen, FB Pharmazie) konnte keine Verunreinigung mit dem jeweils anderen Diastereomer nachgewiesen werden (Reinheit laut NMR > 95 %).

Die so erhaltenen Einkristalle der beiden getrennten Diastereomere konnten zur Röntgenstrukturbestimmung verwendet werden, um deren absolute Konfiguration und Konformation aufzuklären.

#### 5.5.1.1 Struktur des $R_pS_c$ -Phenylethylamid-Inhibitor

Für das  $R_pS_c$ -Diastereomer wurden nach dem Umkristallisieren blaß beigefarbene rhomboedrische Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 105-106,5 °C erhalten. Unter dem Polarisationsmikroskop wurden geeignete Einkristalle ausgewählt. An einem Vierkreisdiffraktometer wurde ein Datensatz mit der Raumgruppe  $P2_1$  bei Raumtemperatur am Fachbereich Pharmazie, Labor Dr. Milton T. Stubbs, und zusätzlich unter cryogenen Bedingungen im Stickstoffstrahl bei 100K am Fachbereich Chemie, Labor Prof. Dr. Werner Massa, aufgenommen.

Statistik	$R_pS_c$ -Amid Inhibitor (RT)	$R_pS_c$ -Amid Inhibitor (cryo)
Temperatur (K)	298	100
Auflösung (Å)	7,4 - 0,89	14,23-0,87
Wellenlänge (Å)	1,54178	0,71073
Raumgruppe	$P2_1$	$P2_1$
Zellparameter (Å)		
a	7,6042	7,4490
b	10,2113	10,2011
c	12,1265	24,0612
(°) $\beta$	96,927	95,969
Zahl der Reflexe mit $F_o > 4 \sigma F_o$	1486 1454	5558 4669
R-Faktor (alle / $4 \sigma F_o$ )	6,46 / 6,54	3,07 / 3,75

Die mit SHELLX verfeinerte Struktur des  $R_pS_c$ -Diastereomers weist in der Hochtemperatur-Modifikation eine fast ideale periplanare Anordnung der aromatischen Ringe der Phenylethylamid- und der 4-Nitrophenyl-Seitenkette auf, wie in Abbildung 5.12 gezeigt ist.

Im Vergleich zur Hochtemperatur-



Modifikation zeigt die Tieftemperatur-Modifikation eine Verdopplung der *c*-Achse durch die Unterscheidung von zwei sehr ähnlichen periplanaren Geometrien. Die aromatischen Ringsysteme sind leicht gegeneinander verdreht. In der Hochtemperaturphase wird die *c*-Achse halbiert. Die verdoppelte Zelle ist in Abbildung 5.14 gezeigt. Die beiden in der Tieftemperaturphase symmetrieunabhängigen Moleküle sind durch eine Translation um die halbe Länge der *c*-Achse voneinander getrennt. In der Hochtemperaturphase wird aus dieser Verschiebung eine echte Translation entlang der halbierten *c*-Achse. Um die PO-NH Bindung bildet sich eine *s-trans* Konformation aus. Durch die entgegengesetzte Orientierung der P=O bzw. NH Gruppen ergibt sich eine Verkettung der Moleküle entlang der parallel zur *b*-Achse verlaufenden  $2_1$ -Achse.

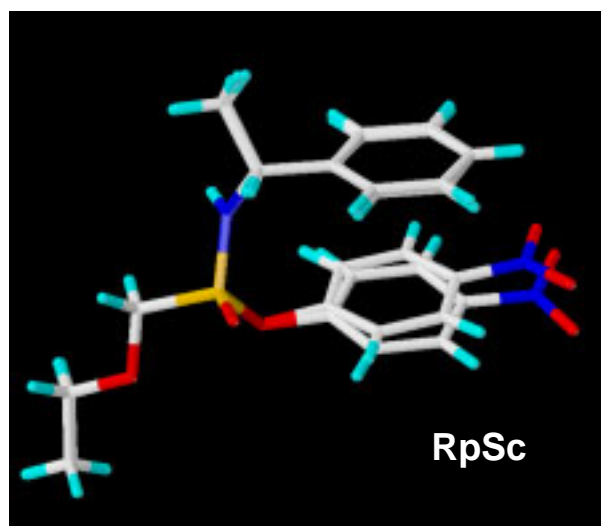
### 5.5.1.2 Struktur des $S_pS_c$ -Phenylethylamid-Inhibitor

Für das  $S_pS_c$ - Diastereomer und entsprechend auch für das enantiomere  $R_pR_c$ -Diastereomer wurden nach dem Umkristallisieren farblose Nadeln mit einem Schmelzpunkt von 86,5 - 87 °C erhalten. Unter dem Polarisationsmikroskop wurden geeignete Einkristalle ausgewählt und an einem Vierkreisdiffraktometer ein Datensatz in der orthorhombischen Raumgruppe  $P2_12_12_1$  bei Raumtemperatur am Fachbereich Pharmazie, Labor Dr. Milton T. Stubbs aufgenommen. Diese Zelle bleibt bis 100K bestehen.

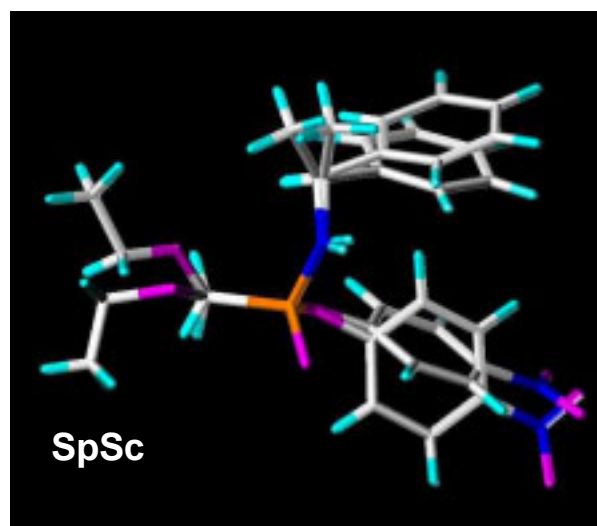
	(RT)
Temperatur (K)	298
Auflösung (Å)	7,4 - 0,89
Wellenlänge (Å)	1,54178
Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Zellparameter (Å)	18.49150 26.92420 7.42070
(°)	90.00 90.00 90.00
Gesamtzahl der Reflexe mit $F_o > 3 \sigma F_o$	3185 2182
R-Faktor (alle / $3 \sigma F_o$ )	5,9 / 6,0

Die verfeinerte Struktur des  $S_pS_c$ -Phenylethylamid-Inhibitors weist für die beiden symmetrieunabhängigen Moleküle in der Elementarzelle zwei völlig verschiedene Anordnungen der aromatischen Ringe der Phenylethylamid- und der 4-Nitrophenyl-Seitenkette auf, wie in Abbildung 5.13 gezeigt ist. Ein Monomer liegt, ähnlich wie im  $R_pS_c$ -Diastereomer, in einer periplanaren Geometrie vor, das benachbarte Molekül zeigt jedoch eine nahezu senkrechte Stellung der aromatischen Ringe zueinander.

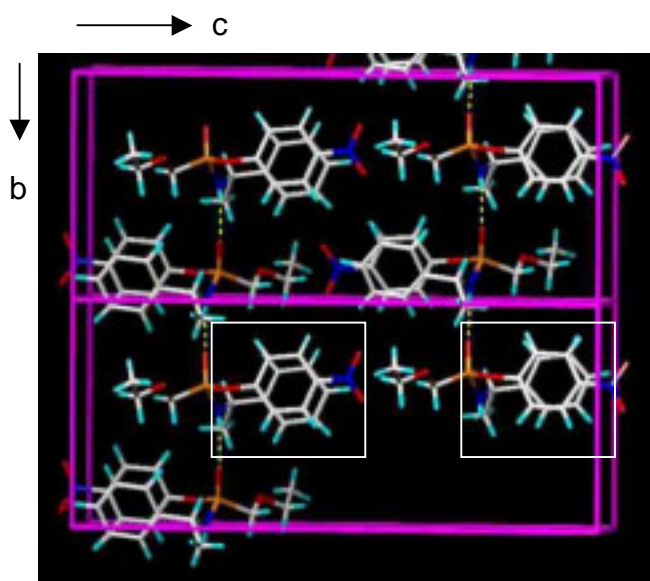
Auch das Wasserstoffbrückennetz wird deutlich anders ausgebildet, wie in der Abbildung 5.15 zu erkennen ist. Hier liegt die PO-NH Bindung in einer *S-cis* Geometrie vor, so dass beide funktionellen Gruppen ihre Wasserstoffbrücken zur gleichen Seite ausbilden. Dadurch ergibt sich eine zickzack-förmige Packung der unterschiedlichen Moleküle entlang der *a*-Achse.



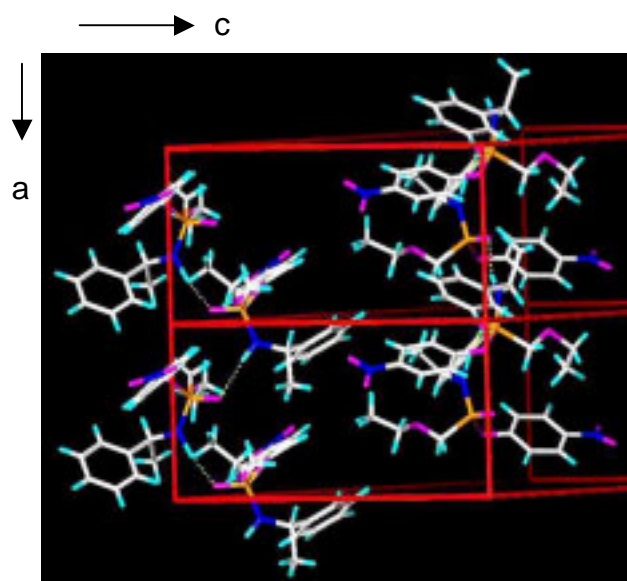
**Abb. 5.12:** Konformationen des  $R_pS_c$ -Phenylethylamid-Inhibitors in der Tieftemperatur-Modifikation. Die aromatischen Seitenketten zeigen eine nahezu perfekte periplanare Anordnung zueinander. Die PO-NH Bindung liegt in einer *s-trans* Geometrie vor.



**Abb. 5.13:** Konformationen des  $S_pS_c$ -Phenylethylamid-Inhibitors. Die Überlagerung der beiden Moleküle zeigt die periplanare bzw. perpendikuläre Anordnung der aromatischen Ringe. Die PO-NH Bindung liegt in einer *s-cis* Geometrie vor.



**Abb. 5.14:** Elementarzelle des  $R_pS_c$ -Phenylethylamid-Inhibitors in der Tieftemperatur-Modifikation. Die Moleküle in der linken Hälfte der Zelle zeigen periplanare Geometrie, die Moleküle in der rechten Teil der Elementarzelle eine leicht verdrehte Anordnung der aromatischen Ringe zueinander. Durch beide Hälften läuft je eine Wasserstoffbrückenkette entlang der parallel zur *b*-Achse verlaufenden  $2_1$ -Achse.



**Abb. 5.15:** Elementarzelle des  $S_pS_c$ -Phenylethylamid-Inhibitors. Die beiden symmetrieunabhängigen Moleküle mit unterschiedlicher Geometrie sind versetzt entlang der *a*-Achse angeordnet. Die direkt benachbarten Moleküle sind über eine Wasserstoffbrücke von der Amidgruppe eines Moleküls zum Phosphonat-Sauerstoff eines benachbarten Moleküls verbunden.

## 5.5.2 Kristallstruktur der CaL B

### 5.5.2.1 Apo-Struktur CaL B

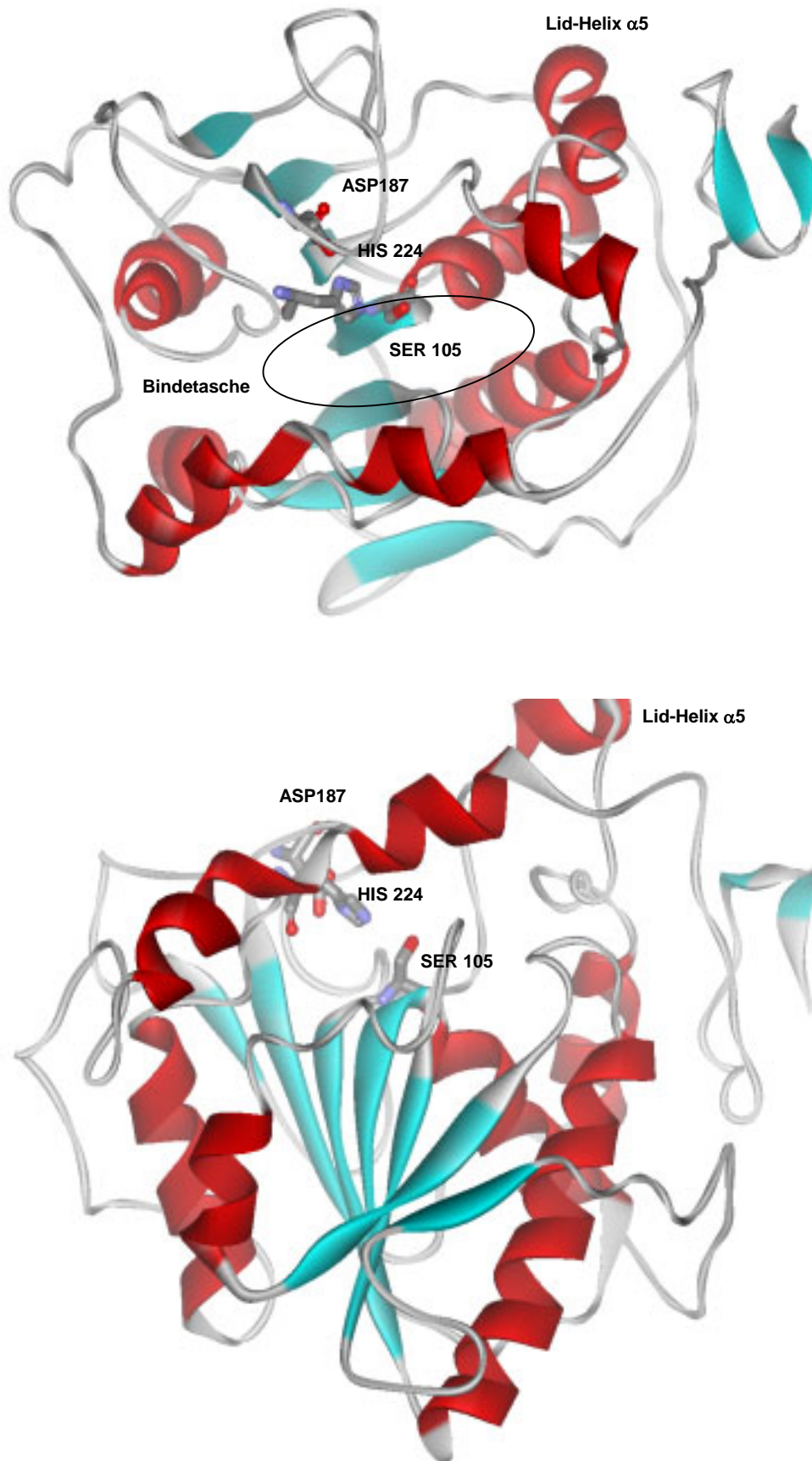
Die Struktur der nativen Lipase wurde aus Kristallen der hexagonalen Raumgruppe  $P6_322$  durch die Methode des molekularen Ersatzes mit Hilfe des Programms AMORE gelöst. Die Rotations- und Translationsfunktionen wurden mit AMoRe auf der Basis einer bekannten Struktur der CaL B (1tca) berechnet.

Statistik	native Struktur Marburg	native Struktur DESY
Auflösung (Å)	35-2,6	16-1,8
Wellenlänge (Å)	1,541	1,05
Raumgruppe	$P6_322$	$P6_322$
Zellparameter (Å)	a = 88,97 b = 88,97 c = 136,31	a = 89,25 b = 89,25 c = 136,59
(°)	$\gamma = 120$	$\gamma = 120$
Gesamzahl beob. Reflexe	316712	688694
Gesamzahl symmetrie-unabh. Reflexe	9926	25445
Vollständigkeit (%) insgesamt	95,3	83,5
äußere Schale	88,3	83,8
$R_{\text{sym}}$ -Faktor insgesamt	10,2	5,8
äußere Schale	46,0	29,7
R-Faktor	20,7	19,2
RMS der Bindungslängen	0,008	0,009
RMS der Bindungswinkel	1,442	1,421
Zahl der Wassermoleküle	35	112

Die gesamte Struktur unterscheidet sich nur sehr wenig von der Geometrie in der CaL B Referenzstruktur (1tca, 1,55Å), das  $\alpha/\beta$  Hydrolyase Faltungsmuster (Abbildung 5.16) ist identisch. Die RMS-Abweichung der überlagerten Hauptkette beträgt 0,5 Å. Da es sich um eine Raumgruppe handelt, in der CaL B bisher nicht

beobachtet wurde, differiert die Struktur im Bereich der Kristallkontakte von den bekannten Strukturen der CaL B mit orthorhombischer (1tca, 1lbs) oder monokliner Symmetrie (1tcb, 1tcc). Die abweichenden Aminosäuregeometrien wurden manuell mit dem Programm O (Version 6.2) in die Elektronendichte eingepasst. Der in Marburg mit Hilfe eines Drehanoden-Generators mit einem MSC R-AXIS 4 Image-Plate-System bis 2,6 Å aufgenommene Datensatz der nativen CaL B zeigt keine signifikanten Abweichungen in den ermittelten Atomkoordinaten zu dem ein Jahr später unter Verwendung von Synchrotronstrahlung am DESY aufgenommenen, bis 1,8 Å aufgelösten Datensatz, obwohl sie unabhängig voneinander verfeinert wurden. In der asymmetrischen Einheit befindet sich ein Lipasemonomer, jeweils drei Lipasemonomere bilden ein Trimer. Die Bindetasche ist zur dreizähligen Achse eines Trimers orientiert und über einen Solvenskanal mit dem umgebenden Kristallwasser verbunden.

Das aktive Zentrum liegt ca. 12 Å tief am Ende einer schmalen Kavität (Abbildung 5.18). Am Boden der Bindetasche befindet sich die katalytische Triade, gebildet aus Ser105, His224 und Asp187 (Abbildung 5.16). Das katalytische Ser105 befindet sich an der Spitze des mittleren Faltblatts im Übergang zu einer im spitzen Winkel zurückgefalteten Helix. Dieses Strukturmerkmal wird als "nukleophiler Ellenbogen" bezeichnet und ist durch die konservierte Sequenz GX SXG gekennzeichnet. Die konservierten Glycine begünstigen den direkten Übergang vom Faltblatt in die Helix.



**Abb. 5.16:** Schematischer Verlauf der Hauptkette, dargestellt durch ein Bändermodell der *Candida antarctica* Lipase B, oben in einer Sicht auf das aktive Zentrum, unten in einer Seitenansicht. Das katalytische Ser 105 der katalytischen Triade liegt am Boden einer schmalen Bindetasche. Die "Lid"-Helix zeigt eine offene Konformation und befindet sich rechts oberhalb der Bindetasche.

Alle Aminosäuren in der als flexibel angenommenen "Lid"-Region über dem aktiven Zentrum konnten mit niedrigen Temperaturfaktoren eindeutig in die Elektronendichte eingepasst werden. Insbesondere die "Lid"-Helix  $\alpha 5$  zeigte eine definierte, offene Konformation, die über Kristallkontakte stabilisiert wird.

Diese Packung ermöglicht es, Inhibitoren in native Kristalle einzudiffundieren ("Soaking") und so aus den ohne Gegenwart eines Inhibitors gewachsenen Kristallen Komplexstrukturen mit gebundenem Inhibitor zu erhalten.

Eine weiterer Unterschied zu den bisher gelösten Strukturen ist die Art der Glycosilierung am Asparagin 74, die eine deutlich abweichende Geometrie zeigt (Abbildung 5.17).

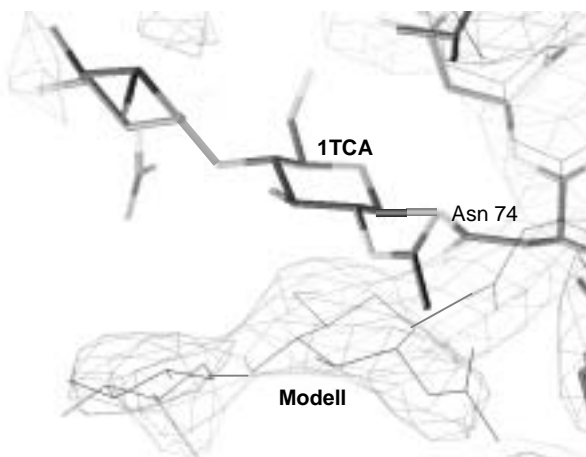


Abb. 5.17:  $2F_o - F_c$  Elektronendichte in der Umgebung der Glycosilierungsstelle am Asparagin 74. Gezeigt ist die Referenzstruktur *1tca* (Stabmolekül) und das manuell in die Elektronendichte eingepasste Modell (Linienmolekül) der Strukturbestimmung in dieser Arbeit.

### 5.5.2.2 Komplex von $S_pR_c$ -Phenylethylamid-Inhibitor mit CaL B

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Komplexstruktur von CaL B mit dem  $S_pR_c$ -Phenylethylamid-Inhibitor sowohl durch Kokristallisation mit dem Inhibitor als auch durch Eindiffundieren ("Soaking") des Inhibitors in native Kristalle erhalten.

Der auf dem hauseigenen Drehanodengenerator in Marburg aufgenommene Datensatz dieser Komplexstruktur aus der Kokristallisation von CaL B mit Inhibitor erreichte nur eine kristallographische Auflösung von 3,5 Å.

Statistik	$S_pR_c$ -Amid Komplex Marburg	$S_pR_c$ -Amid Komplex DESY
Auflösung (Å)	10-3,5	16-2,0
Wellenlänge (Å)	1,5418	1,05
Raumgruppe	P6 <sub>3</sub> 22	P6 <sub>3</sub> 22
Zellparameter (Å)	a = 88,43 b = 88,43 c = 137,76	a = 89,62 b = 89,62 c = 137,39
(°)	$\gamma = 120$	$\gamma = 120$
Gesamzahl beob. Reflexe	149947	1249255
Gesamzahl symmetrie-unabh. Reflexe	4505	22182
Vollständigkeit (%) insgesamt	97,2	97,8
äußere Schale	97,3	97,5
$R_{sym}$ -Faktor insgesamt	20,1	7,9
äußere Schale	40,1	44,7
R-Faktor	16,1	17,9
RMS der Bindungslängen	0,007	0,008
RMS der Bindungswinkel	1,400	1,408
Zahl der Wassermoleküle	0	134

Die niedrige Auflösung und die schlechte Qualität der initialen  $F_o-F_c$  Differenz-Elektronendichte im aktiven Zentrum war unzureichend, die am Chiralitätszentrum befindliche Methylgruppe konnte nicht in der  $2F_o-F_c$  Elektronendichte lokalisiert werden.

Um die Aussagekraft dieser Strukturbestimmung im Hinblick auf die Bindung des Inhibitors genauer zu erfassen, wurde eine hochaufgelöste Strukturbestimmung an der Messstation der Max-Planck Gesellschaft am Synchrotron DESY in Hamburg durchgeführt.

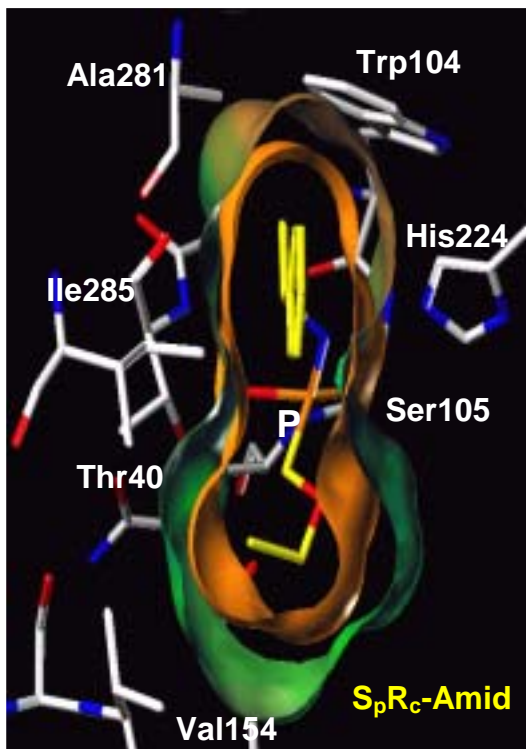
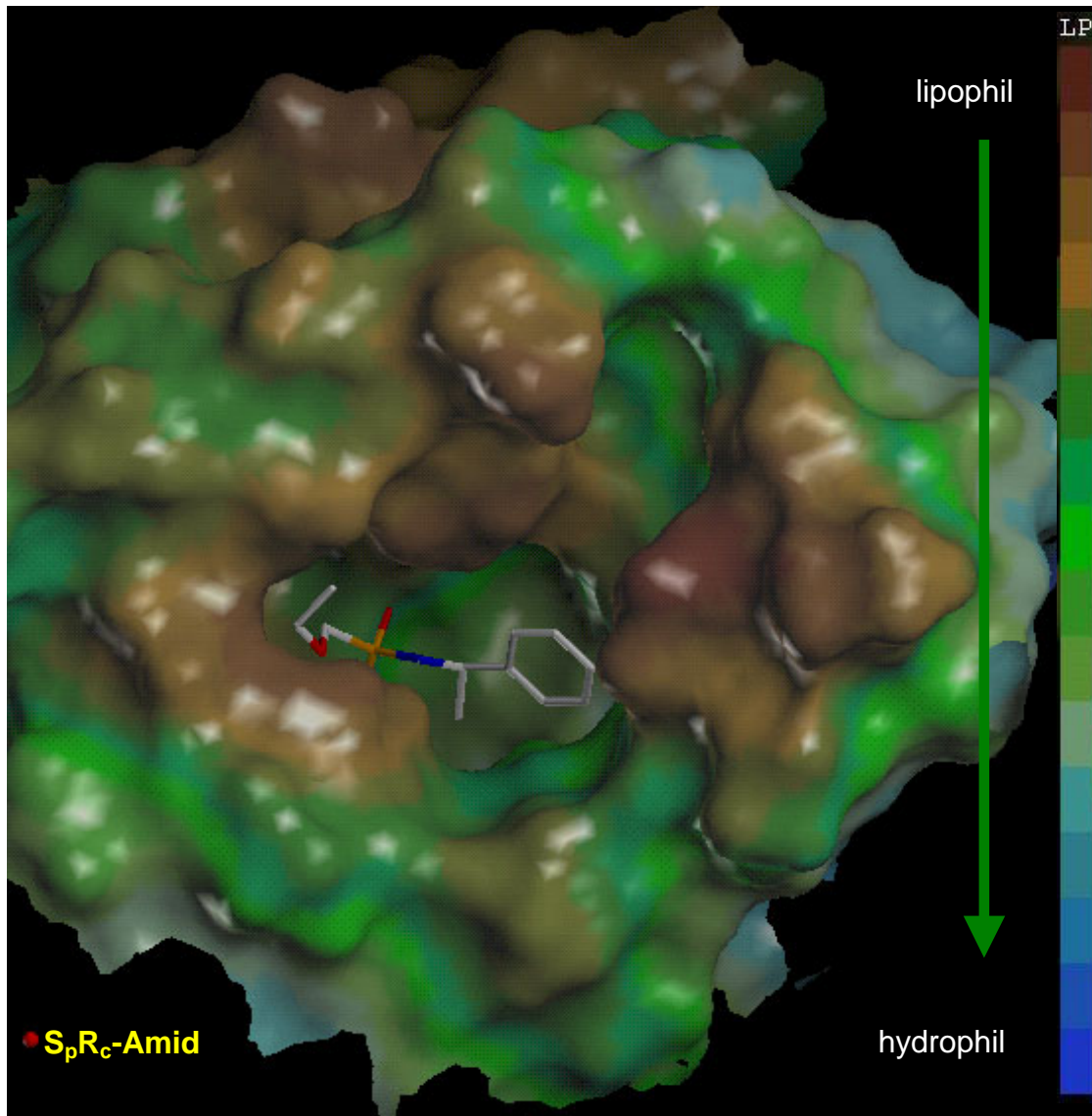
Die besten Messdaten konnten mit deutlich grösser gewachsenen und besser streuenden nativen Kristallen erzielt werden, die erst einen Tag vor der Messung mit dem Inhibitor versetzt ("gesoakt") worden waren.

Die am DESY vermessene Röntgenstruktur der CaL B mit dem in den nativen Kristall eindiffundierten  $S_pR_c$ -Phenylethylamid-Inhibitor zeigt in der  $F_o-F_c$  Differenzelektronendichte deutlich das kovalent an das Serin 105 im aktiven Zentrum gebundene Phosphoratom des Inhibitors. Die Elektronendichte in der Binde-tasche ist in Übereinstimmung mit der erwarteten Position des Phosphonat-Sauerstoff-Atoms in der Oxyanionen-Höhle. Ein langgestreckter Bereich der  $2F_o-F_c$  Elektronendichte für den Ethoxymethylrest in der Säurebindetasche erlaubt die eindeutige Positionierung des Inhibitors im aktiven Zentrum. Die Position des chiralen Phenylethylaminrestes ist ebenfalls zweifelsfrei durch einen durchgehenden Elektronendichtebereich gekennzeichnet (Abbildung 5.21 rechts). Alle Atome des Inhibitors konn-

ten während der Verfeinerung mit niedrigen individuellen Temperaturfaktoren lokalisiert werden.

Die übrige Struktur ist mit der nativen Struktur nahezu identisch und zeigt nur in direkter Umgebung des Inhibitors kleine Veränderungen, die auf die Bindung des Inhibitors zurückzuführen sind. Die Aminosäuren Trp104 und Leu278 im aktiven Zentrum, die im direkten Kontakt mit der Methylgruppe am stereogenen Zentrum des Phenylethylamins stehen, zeigen, im Vergleich zur nativen Struktur ohne Inhibitor, eine leicht abweichende Geometrie. Beide Aminosäuren sind nach Bindung des Inhibitors im direkten van-der-Waals-Kontakt mit dessen Phenylethylaminrest (Abbildung 5.19). Sie sind durch eine induzierte Anpassung aus ihrer ursprünglichen Position weggerückt worden. Leu 278 steht im van-der-Waals Kontakt mit dem Phenylring des Inhibitors, während im Trp104 durch die direkt auf das Indolssystem ausgerichtete Methylgruppe des R-Amids der Ring um  $25^\circ$  (Torsionswinkel über  $C_\alpha-C_\beta-C_\gamma-C_\delta$ ) nach hinten weggedreht wird, wie in Abbildung 5.20 in der Überlagerung mit der Apo-Struktur dargestellt ist.

Die Aminofunktion des Inhibitors bildet eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoff des katalytischen His224 aus. Das Sauerstoffatom des Phosphonats wird in der Oxyanionen-Höhle durch Wasserstoffbrücken zur Amidfunktion des Proteinrückrats der Reste Gly 103 und Thr 40 und zusätzlich zur Alkoholfunktion der Seitenkette des Thr 40 stabilisiert.



**Abb. 5.18:** Oberflächendarstellung der Bindetasche von CaL B mit gebundenem Inhibitor. Die Farbcodierung nach steigender Lipophilie von blau bis braun ist am rechten Bildrand gezeigt.

Die Connolly-Oberflächen wurde mit MOLCAD in SYBYL 6.2 erstellt.

**Abb. 5.19:** Schnittbild der Umgebung des Inhibitors in der Bindetasche von Cal B. Die Oberfläche des Inhibitors (orange) ist nahezu komplementär zur Oberfläche des Proteins.

Der Ethoxymethylrest passt sich ideal der Form der hydrophoben Säurebindetasche an. Die Seitenkette knickt an der Position 2 in einer gauche-Konformation zur Proteinoberfläche ab.

#### 5.5.2.4 Komplex von S<sub>p</sub>S<sub>c</sub>-Phenylethylamid-Inhibitor mit CaL B

Die Komplexstruktur von CaL B mit dem S<sub>p</sub>S<sub>c</sub>-Phenylethylamid-Inhibitor wurde durch das Eindiffundieren ("Soaking") des Inhibitors in Apo-Kristalle erhalten.

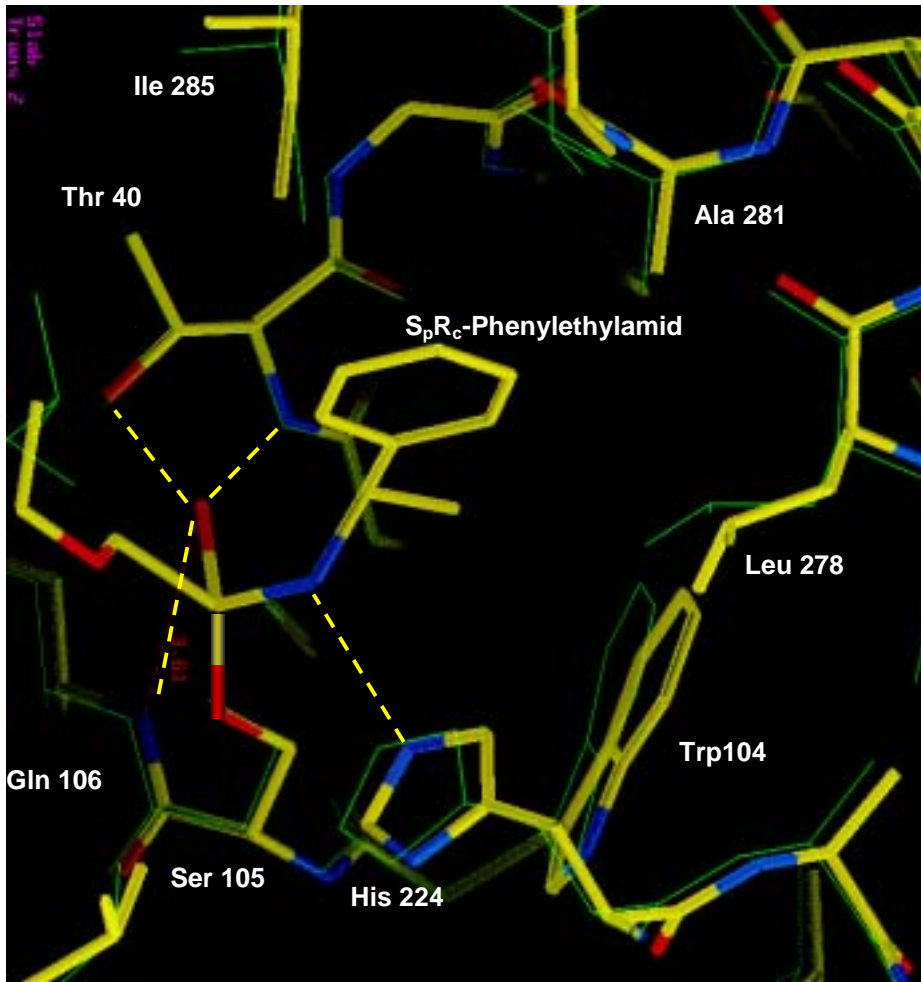
Statistik	S <sub>p</sub> S <sub>c</sub> -Amid Komplex Marburg	S <sub>p</sub> S <sub>c</sub> -Amid Komplex DESY
Auflösung (Å)	34-3,2	16-2,5
Wellenlänge (Å)	1,5418	1,05
Raumgruppe	P6 <sub>3</sub> 22	P6 <sub>3</sub> 22
Zellparameter (Å)	a = 89,45 b = 89,45 c = 137,29	a = 89,37 b = 89,37 c = 137,70
(°)	90 90 120	90 90 120
Gesamzahl beob. Reflexe	102679	261866 +355838
Gesamzahl symmetrie-unabh. Reflexe	8857	11248
Vollständigkeit (%) insgesamt	85,6	98,8
äußere Schale	76,3	94,3
R <sub>sym</sub> -Faktor insgesamt	24,0	14,6
äußere Schale	53,2	62,7
R-Faktor	17,3	18,9
RMS der Bindungslängen	0,007	0,007
RMS der Bindungswinkel	1,421	1,301
Zahl der Wassermoleküle	0	33

Der auf dem hauseigenen Drehanodengenerator in Marburg aufgenommene Datensatz der Komplexstruktur von CaL B mit dem S<sub>p</sub>S<sub>c</sub>-

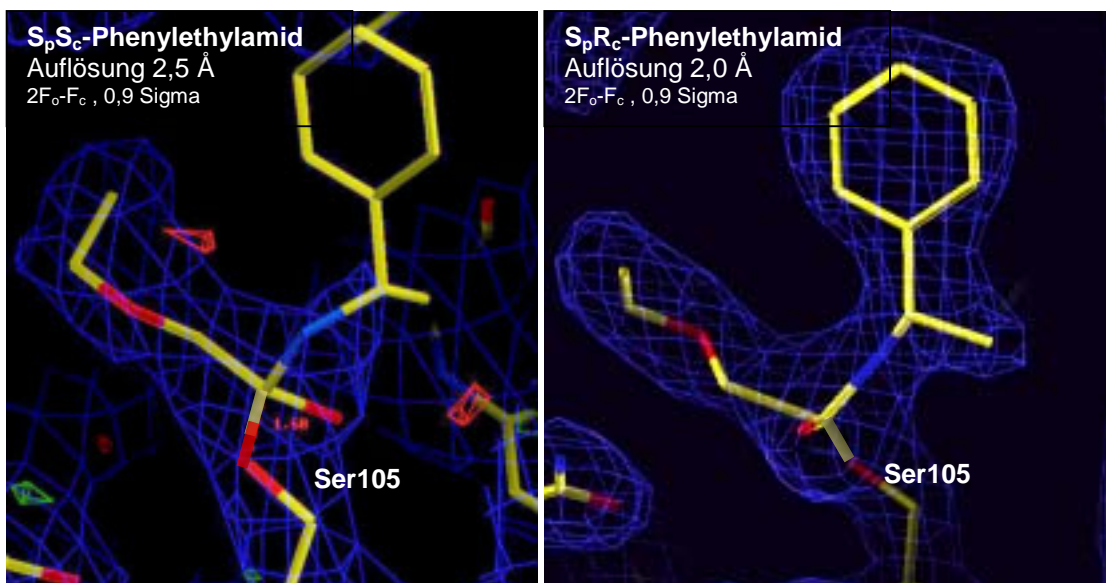
Phenylethylamid-Inhibitor erreichte nur eine kristallographische Auflösung von 3,2 Å. Die Qualität der initialen Dichte im aktiven Zentrum war leider unzureichend, lediglich das Phosphoratom konnte zugeordnet werden. Daher wurde auch hier der Versuch unternommen, einen besser aufgelösten Datensatz mit Synchrotronstrahlung am DESY in Hamburg zu erhalten. Es wurden mehrere mit dem S<sub>p</sub>S<sub>c</sub>-Inhibitor "gesoakte" Kristalle vermessen und aus den beiden besten Datensätzen (SS 03, SS 07) durch die gemeinsame Skalierung mit dem Programm SCALEPACK ein Datensatz mit verbesserter Statistik gewonnen, der bis 2,7 Å ausgewertet werden konnte.

Die erfolgreiche Inhibierung des Proteins kann durch die Lokalisation des kovalent mit dem Ser105 verbundenen Phosphoratoms des Inhibitors in der F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> Differenzelektronendichte eindeutig nachgewiesen werden. Im Unterschied zur Komplexstruktur des S<sub>p</sub>R<sub>c</sub>-Phenylethylamid-Inhibitors können aber nur die Position des Phosphonat-Sauerstoffatoms in der Oxyanionen-Höhle und die Ethoxymethyl-Seitenkette in der Säurebindetasche eindeutig der Differenzelektronendichte zugeordnet werden. Für den S<sub>p</sub>S<sub>c</sub>-Phenylethylamid-Rest ist weder in der F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> Differenzelektronendichte, noch in der 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> Elektronendichte in diesem Bereich ein Streubeitrag zu erkennen, wie in Abbildung 5.21 links gezeigt ist. Die Temperaturfaktoren für den nicht zuweisbaren S<sub>c</sub>-Phenylethylamin-Rest sind gegenüber den übrigen Inhibitoratomen während der Verfeinerung mit XPLOR von 40 Å<sup>2</sup> auf über 60 Å<sup>2</sup> angestiegen.

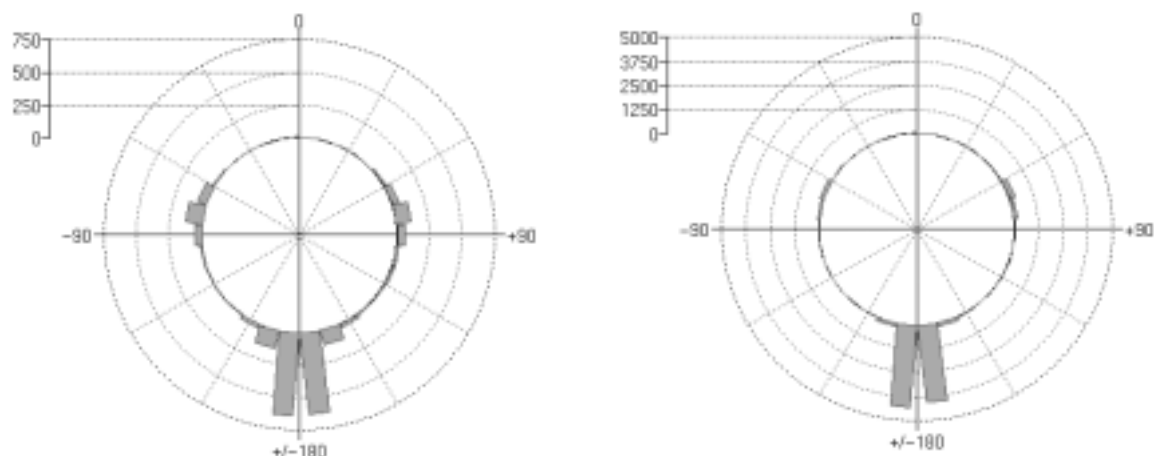




**Abb. 5.20:** Vergleich der Apo-Struktur (grün) mit der des  $S_pR_c$ -Phenylethylamid-Komplexes (gelb). Die Aminosäuren Trp104 und Leu278 in der Stereospezifitätstasche sind durch die Wechselwirkung mit der Methylgruppe des Inhibitors leicht verschoben worden. Das Amid zeigt eine Wasserstoffbrücke zum His224. In der Oxyanionen-Höhle werden drei H-Brücken zum Phosphonatsauerstoff ausgebildet.



**Abb 5.21** Die Elektronendichte für den Komplex mit dem  $S_pR_c$ -Phosphonamid-Inhibitor (links) ist nur teilweise definiert. Für den  $S_pR_c$ -Phosphonamid-Inhibitor (rechts) sind alle Inhibitoratome eindeutig in der Elektronendichte definiert.



**Abb. 5.22:** Histogramm der Torsionswinkelverteilung für eine Ethergruppe (links) bzw. eine n-Butylgruppe aus der CSD. Die Suche wurde mit dem Programm ConQuest (CCDC) durchgeführt. Für die Ethergruppe wurde ein vermehrtes Auftreten der gauche-Konformation in den untersuchten Kristallstrukturen festgestellt.

Das legt den Schluss nahe, dass aus irgendeinem Grund der Streubeitrag stark reduziert ist. In aller Regel ist dies auf eine Unordnung in einem solchen Molekülteil zurückzuführen. Partielle Besetzung der Bindetasche kommt nicht in Frage, da der Bereich um das Phosphoratom und die Ethoxymethylseitenkette gut zu lokalisieren sind. Die massenspektrometrische Untersuchung hat zudem gezeigt, dass das Protein durch den vollständigen  $S_pS_c$ -Phenylethylamid-Inhibitor blockiert wird.

Die beobachtete Unordnung in dem Phenylethylteil könnte mit mehreren Konformationen im Zusammenhang stehen, die, gemittelt über den gesamten Kristallverband, von diesem Molekülteil eingenommen werden. Die Geometrie der Aminosäure-Seitenketten in unmittelbarem Kontakt mit dem  $S_c$ -Phenylethylamid ist unverändert zur Apo-Struktur. Aufgrund der Stereochemie im  $S_pS_c$ -Phenylethylamid-Inhibitor ist nicht die Methylgruppe am chiralen Zentrum auf das Trp104 in der Stereospezifitätstasche ausgerichtet, sondern das Wasserstoffatom. Die Konformation des Phenylethylamid-Restes kann daher nicht ausreichend

stabilisiert werden. Die Seitenkette des Ethoxymethylrestes knickt an der Position 2 in einer gauche Konformation zum Solvens hin ab, wie bereits in der Komplexstruktur mit dem  $S_pR_c$ -Isomer beobachtet wurde. Diese bevorzugte Konformation in der Säurebindetasche wird vermutlich durch das Sauerstoffatom an dieser Position zusätzlich begünstigt, da eine gauche Konformation im Vergleich zur trans Anordnung für eine Ether-Funktion energetisch eher begünstigt ist als für eine n-Butyl-Seitenkette, die deutlich bevorzugt in der all-trans Konformation vorliegen sollte. Auswertungen von Statistiken aus der CSD mit ConQuest (CCDC, Cambridge) von 2250 linearen Fragmente  $X-CH_2-CH_2-O-CH_2-X$  und 10.000 linearen n-Butyl-Fragment ( $X-CH_2-CH_2-CH_2-X$ ) zeigen (Abbildung 5.22), dass nur für die Ethergruppe eine signifikante Häufigkeit von 1 zu 3 für einen gauche-Torsionswinkel von  $60-90^\circ$  bzw.  $-60 - -90^\circ$  gegenüber einer Häufigkeit von 1 zu 10 für n-Butyl gefunden wird.

## 5.6 Konformationsanalyse in der Bindetasche

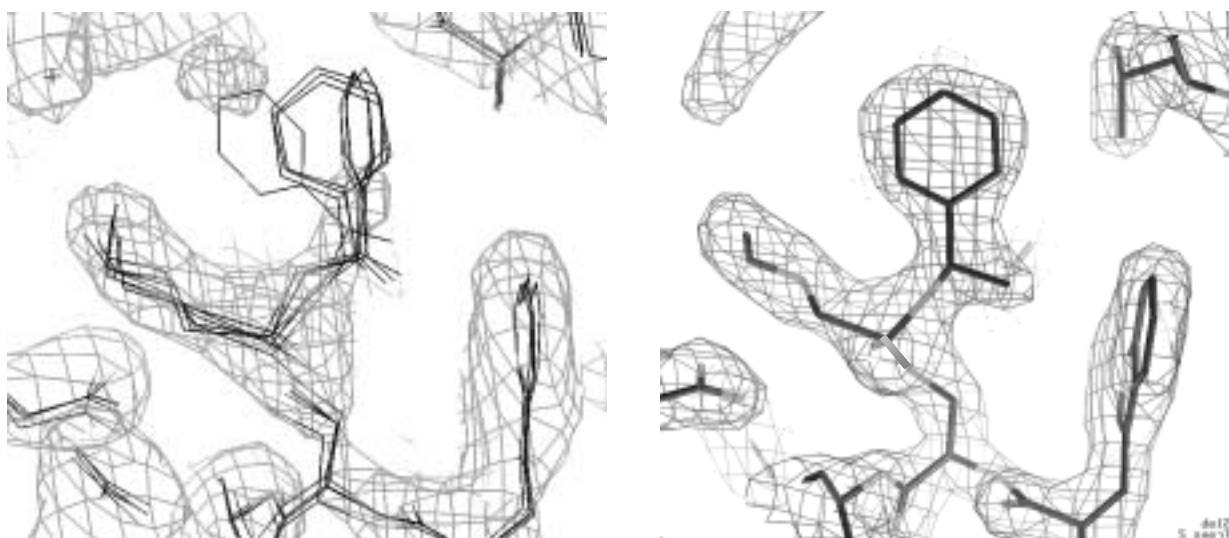
Da die Elektronendichte aus der röntgenstrukturanalytischen Untersuchung des Komplexes der Lipase mit dem  $S_pS_c$ -Phenylethylphosphonamid keinen eindeutigen Nachweis einer einzigen definierten Konformation des Inhibitors in der Bindetasche zuläßt, wurden unterschiedliche Methoden zur Suche nach denkbaren Konformationen bzw. Bindungsmoden des offensichtlich ungeordneten Molekülteils eingesetzt. Um die in der experimentellen Kristallstruktur gefundenen Unterschiede zu dem  $S_pR_c$ -Phenylethylphosphonamid herauszuarbeiten, wurden die gleichen Rechnungen auch an diesem Lipase-Komplex durchgeführt.

### 5.6.1 Kraftfeldrechnungen

Eine erste Suche nach möglichen Konformationen der beiden Inhibitoren in der Bindetasche wurde durch die Minimierung mit dem Kraft-

feld MAB im Programm MOLOC durchgeführt. Als Ausgangsstrukturen dienten dabei die kristallographisch bestimmten Bindungsmoden der Komplexe. Für beide Inhibitoren wurden mehrere denkbare Orientierungen (Orrenius *et al.*, 1998a; Schulz *et al.*, 2000; Uppenberg *et al.*, 1995) des Phenylethylbausteins in der Bindetasche manuell eingestellt. Diese wurden als Startgeometrien für die Kraftfeldrechnung verwendet.

Für das  $S_pR_c$ -Phenylethylphosphonamid laufen alle Minimierungen von unterschiedlichen Startgeometrien in das gleiche lokale Minimum, dessen Bindungsmodus analog zur experimentell eindeutig bestimmten Elektronendichte ist, wie in Abbildung 5.23 rechts gezeigt wird. Für das  $S_pS_c$ -Phenylethylphosphonamid konvergieren die Startgeometrien in mehrere lokale Minima, die sich deutlich unterscheiden, wie in Abbildung 5.23 links in der Überlagerung mehrerer Bindungsmoden zusammen mit der experimentellen Elektronendichte veranschaulicht wird. Insbesondere in dem Bereich,



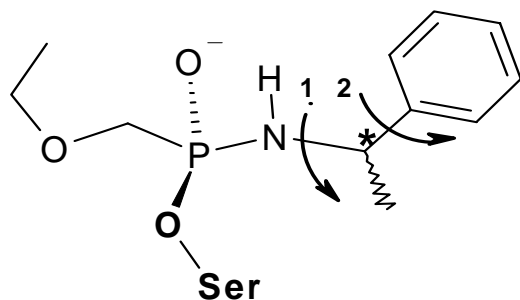
**Abb.5.23:** Vergleich der experimentellen Elektronendichte mit den durch Minimierung des manuell platzierten Inhibitors in der Bindetasche mit dem Kraftfeld MAB im Programm MOLOC vorgeschlagenen Geometrien.  
 $S_pS_c$ -Phosphonamid: viele lokale Minima  
 $S_pR_c$ -Phosphonamid: stabiles globales Minimum

in dem die Elektronendichte auf dem  $0.9 \sigma$ -Konturniveau keinen Streubeitrag zuweist, werden mehrere mögliche Orientierungen vorgeschlagen.

## 5.6.2 Systematische Suche

Eine systematische Konformationssuche wurde mit dem Programm SYBYL (Tripos) nach dem im Methodenteil im Kapitel 4.10 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die in der Elektronendichte beider Komplexstrukturen eindeutig definierte Geometrie des Methoxyethylrestes und das Protein wurden während der Suche als starr angenommen.

Die beiden verbleibenden frei drehbaren Bindungen des Phenylethylrestes (Abbildung 5.24) wurden in der Suche berücksichtigt, um so mögliche Konfigurationen dieses Restes in der Bindetasche aufzufinden. Die Suche wurde für beide diastereomeren Formen mit identischen Parametern durchgeführt. Als Startstruktur diente im Falle des  $S_pR_c$ -Phenylethylphosphonamid die experimentell bestimmte Komplexstruktur, für das  $S_pS_c$ -Isomere wurde eine günstige Orientierung des Phenylethylrestes verwendet.



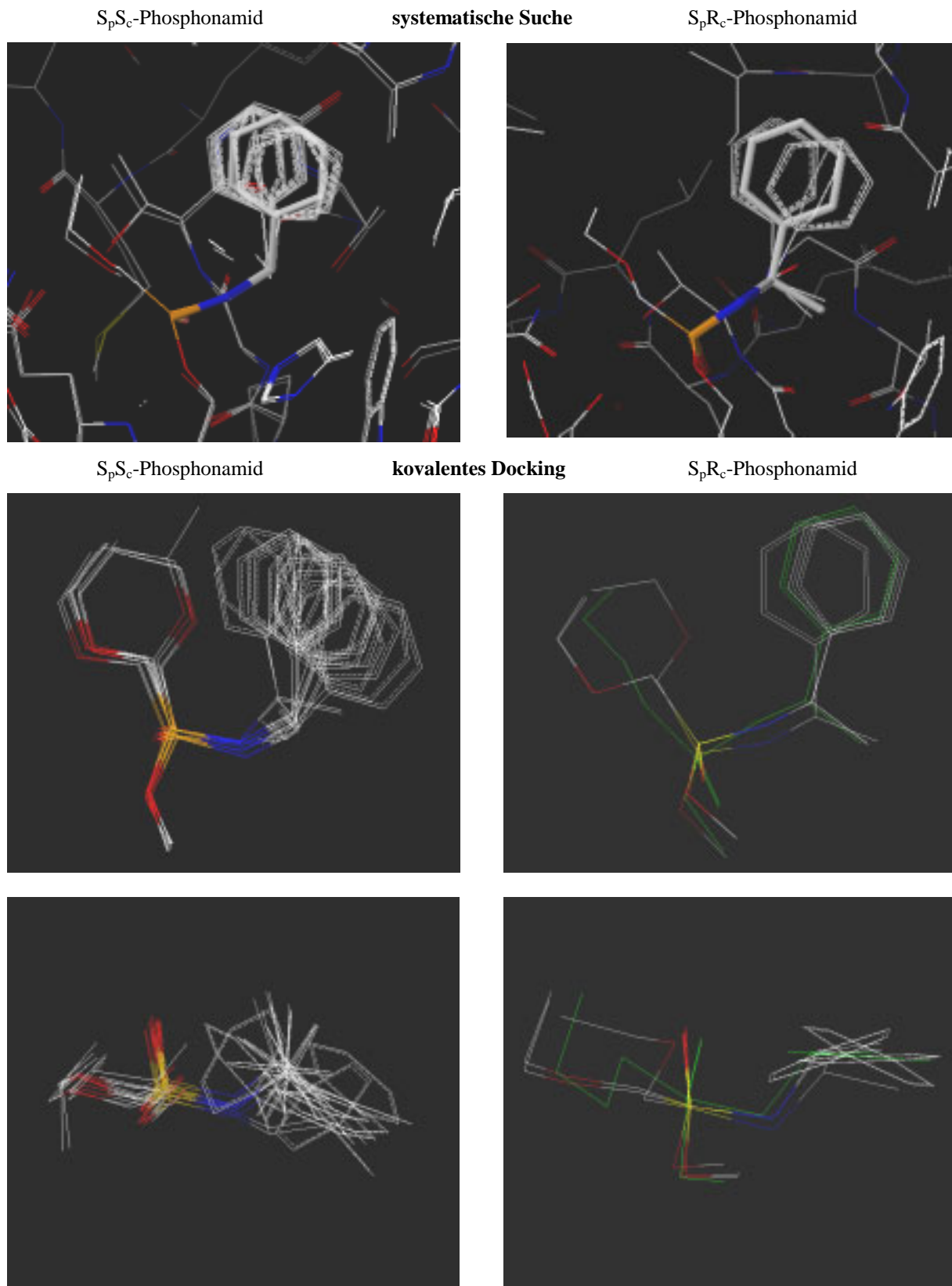
**Abb. 5.24:** Systematische Suche der möglichen Konformationen des Phenylethyl-restes in der Bindetasche der CaL B.

Die systematische Suche führte im Fall des  $S_pR_c$ -Phenylethylphosphonamids zu 6 Lösungen, wobei jeweils 3 paarweise zueinander durch eine Drehung des Phenylrings um  $180^\circ$  ineinander übergehen, d.h. symmetriebedingt sind nur 3 unabhängigen Konfigurationen nachzuweisen (Abbildung 5.25 oben rechts). Alle drei Orientierungen liegen strukturell eng beieinander und stehen mit der experimentell ermittelten Elektronendichte im Einklang.

R-Amid	1 NH-CH	2 CH-C <sub>Phenyl</sub>
Konf 1/2	150	120 / 300
Konf 3/4	150	30 / 210
Konf 4/5	120	150 / 330

Für das  $S_pS_c$ -Phenylethylphosphonamid wurden 18 erlaubte Konfigurationen generiert. Aus den gleichen lokalen Symmetriegründen leiten sich daraus 9 unabhängige Konfigurationen ab. Besonders hervorzuheben ist, dass die Drehung um die Achse des Phenylrings (Abbildung 5.25 oben links) eine nahezu uneingeschränkte Einstellung aller möglichen Winkel erlaubt. Die freie Rotation des Rings scheint somit aus sterischen Gründen in der Bindetasche möglich.

S-Amid	1 NH-CH	2 CH-C <sub>Phenyl</sub>
Konf 1/2	120°	90° / 270°
Konf 3/4	120°	120° / 300°
Konf 5/6	120°	150° / 330°
Konf 7/8	90°	30° / 210°
Konf 9/10	90°	60° / 240°
Konf 11/12	90°	90° / 270°
Konf 13/14	90°	120° / 300°
Konf 15/16	90°	150° / 330°
Konf 17/18	90°	180° / 360°



**Abb. 5.25:** Ergebnisse der Konfigurationssuche für beide Phenylethyl-Phosphonamid-Enantiomere in der Binde-tasche. Oben ist die Überlagerung der systematischen Suche dargestellt, in der Mitte und unten die Überlagerung der Ergebnisse aus dem kovalenten Docking in Seitenansicht und Aufsicht. In beiden Fällen wurden für das S<sub>c</sub>-Phenylethylphosphonamid mehr mögliche Konfigurationen vorgeschlagen. Die vorgeschlagenen Konformationen aus dem kovalenten Docking mit FLEXX sind deutlich diverser, und es wurden beim Aufbau des Inhibitors in der Bindetasche auch abweichende Geometrien des Amids am Phosphorzentrum generiert.

### 5.6.3 Docking mit FLEXX

Eine weitere Möglichkeit zum Auffinden von denkbaren Konfigurationen der kovalent gebundenen Inhibitoren in der Bindetasche bietet ein Docking mit FLEXX. Die Bindetasche wird als starr angenommen und die Inhibitoren werden, beginnend mit der kovalent an das Protein gebundenen Gruppe, fragmentweise, wie im Methodenteil unter 4.9.2 beschrieben, aufgebaut.

Die gefundenen Lösungen wurden mit der regressionsbasierten Bewertungsfunktion in FLEXX und mit DRUGSCORE nach ihrer abgeschätzten Bindungsenergie bewertet und so in eine energetische Rangfolge gebracht.

Für den  $S_pR_c$ -Phenylethylamid-Inhibitor wurden nach einem automatischen Zusammenfassen von ähnlichen Lösungen drei Docking-Konformationen erzeugt, die in Abbildung 5.25 unten rechts gezeigt sind. Von den drei generierten Konfigurationen sind zwei mit der beobachteten Kristallstruktur nahezu identisch und die dritte Lösung ist durch einen ungünstigen Winkel entlang der Amidbindung unwahrscheinlich. Die Energiebewertung (bzw. Score) für diese Lösung ist für beiden Bewertungsfunktionen deutlich von den beiden anderen Konfigurationen separiert.

Rang $S_pR_c$	FLEXX-Score	DRUGSCORE	RMS (Kristall-Struktur)
1 / 1	3.399	-360735	0.556
2 / 2	3.741	-357341	0.513
3 / 3	9.527	-320984	0.903

Für den  $S_pS_c$ -Phenylethylamid-Inhibitor wurden nach dem gleichen Protokoll 14 Docking-Lösungen erzeugt.

Die generierten Lösungen sind deutlich diverser, wie in Abbildung 5.25 unten gezeigt. Besonders auffällig ist die in zwei Lösung (Rang 13 und 14) vorgeschlagene invertierte Geometrie der Amid-Bindung. In dieser invertierten Geometrie geht die Wasserstoffbrücke der NH-Funktion zum His224 verloren, da die NH-Funktion in die Richtung der Oxyanionen-Höhle weist. Die Methyl-Gruppe des stereogenen Zentrums zeigt hingegen auf das Trp104 in der Stereospezifitätstasche.

Beide Bewertungsfunktionen setzen diese zwei Geometrien jedoch deutlich von den anderen gefundenen Lösungen ab. Die Bewertung der übrigen Geometrien von Rang 1 bis 12 ist uneinheitlich; sie unterscheiden sich hauptsächlich in der Geometrie des Phenylrings.

Rang $S_pS_c$	FLEXX-Score	DRUGSCORE	RMS (Modell-Struktur)
1 / 8	1.333	-357836	0.741
2 / 4	1.731	-366497	0.751
3 / 2	2.164	-370608	0.808
4 / 7	2.635	-360018	0.994
5 / 12	3.252	-351766	1.138
6 / 3	3.744	-368515	1.046
7 / 1	4.112	-380237	1.174
8 / 6	4.487	-361643	1.182
9 / 5	5.493	-363179	1.232
10 / 10	6.082	-354633	1.258
11 / 11	6.322	-353845	1.245
12 / 9	6.552	-356531	1.389
13 / 13	9.717	-315569	1.809
14 / 14	11.646	-304527	1.738

Um zu evaluieren, ob die modellierten Geometrien der beiden tetrahedralen "Transition-State"-analogen Phosphonamid-Inhibitoren für die betrachtete kinetische Racematspaltung von Phenylethyl-ethoxyacetamid repräsentativ sind, wurde das gleiche Protokoll auch für das tetrahedrale Intermediat der entsprechenden Carbonylverbindung angewendet.

Für das R-Phenylethyl-ethoxyacetamid-Intermediat wurden 17 Lösungen gefunden. Die ersten 13 sind wiederum der aus der Kristallstruktur direkt modellierten Referenzstruktur sehr ähnlich (durchschnittlicher RMS-Wert  $< 1 \text{ \AA}$ ).

Für das S-Phenylethyl-ethoxyacetamid-Intermediat wurden 29 Lösungen gefunden, die sich hauptsächlich durch die Position des Phenylrings in der Bindetasche unterscheiden oder einen Verlust der Wasserstoffbrücke zum His224 zeigen. Auch hier ergaben sich ähnliche Hinweise auf einen Unterschied im möglichen Konfigurationsraum zwischen beiden Enantiomeren.

Das nicht-kovalente Docking zur Platzierung des planaren Substrates der Amidhydrolyse, des Phenylethyl-ethoxyacetamids in der Bindetasche führt für beide Enantiomere zu einem sehr ähnlichen Satz von 50 bis 70 Lösungen. Als Basisfragment wurde die Carbonylgruppe verwendet, die in allen Fällen korrekt in die Oxyanionen-Höhle platziert wurde. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den modellierten Geometrien der beiden Enantiomere für den nichtkovalenten Michaelis-Menten-Komplex festgestellt werden.

Dies steht im Einklang mit den experimentellen Befunden aus den im Kapitel 5.2.4. vorgestellten "Burst"-Kinetiken, die eine Beteiligung des tetrahedralen Intermediates am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion zeigen.

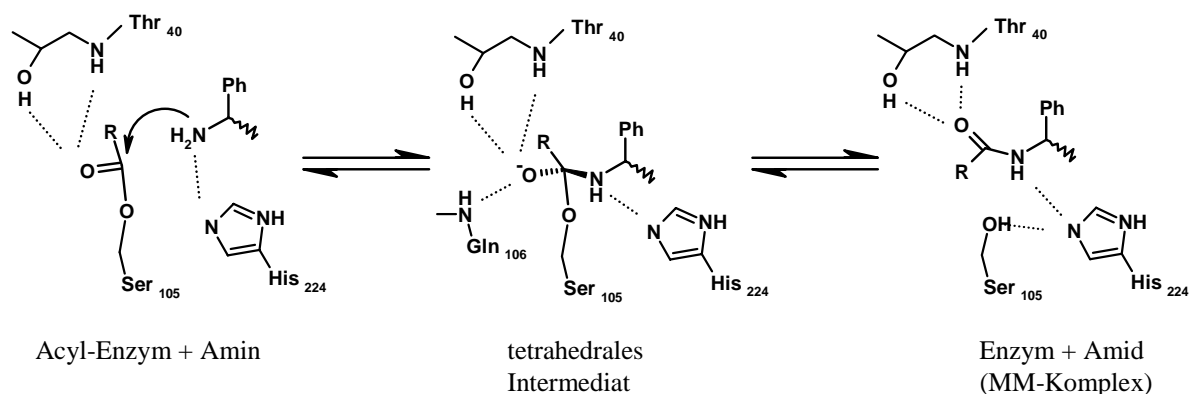
Es erscheint somit gerechtfertigt die Betrachtung aus dem "Transition state"-analogen Inhibitor als repräsentativ für den tatsächlichen Übergangszustand der Reaktion anzunehmen

## 5.7 Molekulardynamische Simulationen

Um die Frage nach den statistisch relevanten Bindungsmoden der beiden Enantiomere in der Bindetasche weiter zu untersuchen, wurde die Methode der molekulardynamischen (MD) Simulation verwendet.

Dazu wurde auf das bereits weiter vorne für die Energieminimierung verwendete generische "united atom" Kraftfeld MAB in der Variante DAB für die in MOLOC implementierte MD-Simulation zurückgegriffen.

Untersucht wurden die drei in Abbildung 5.26 gezeigten, mit Kraftfeldmethoden zugänglichen Komplexe entlang des Reaktionspfades der kinetischen Racematspaltung, in denen für beide Stereoisomere der Phenylethyl-Gruppe eine Analyse der enantioselektiven Substraterkennung durchgeführt werden konnte.



**Abb. 5.26:** Katalyseschema der kinetischen Racematspaltung von Phenylethylamin mit CaL B. Gezeigt ist das Reaktionsschema mit den für die chirale Erkennung relevanten Spezies, beginnend mit dem präacylierten Acyl-Enzym im Komplex mit dem freien Amin über das tetraedrische Intermediat zum Amid.

Die jeweils verwendeten Startstrukturen und Parameter sind im Methodenteil im Kapitel 4.10 ausführlich beschrieben. Die Auswertung erfolgte mit den im Programm MOLOC zur Verfügung stehenden Werkzeugen.

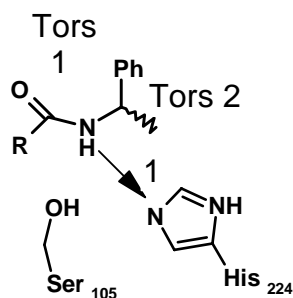
### 5.7.1 Michaelis-Komplex

Die Simulationen wurden mit dem nichtkovalenten Michaelis-Komplex (Abbildung 5.26 rechts) mit beiden enantiomeren Formen des Phenylethyl-ethoxy-acetamids in der Bindetasche der CaL B durchgeführt.

Die Trajektorie wurde über einen Zeitraum von 2,3 ns für den R-Amid-Komplex bzw. 3,9 ns für den S-Amid-Komplex im Abstand von 1 ps gesammelt, um eine möglichst vollständige Abdeckung des erreichbaren Konfigurationsraumes zu gewährleisten.

Die Simulation verhielt sich über den gesamten simulierten Zeitraum stabil. Die Fluktuation der Gesamtenergie und auch die RMS-Abweichung zur Startstruktur waren gering.





Statistik		Mittelwert	Standard- Abweichung
MM-Komplex		Å	
Abstand 1	R	2.910	0.118
	His224 -Amid NH S	2.824	0.086
Torsion-Amid	R	7.577	7.221
	C-NH=C=O S	8.748	8.070
Torsion -Phenyl	R	127.030	15.148
	NH-C-C <sub>ar</sub> =C <sub>ar</sub> S	95.545	85.825

Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der geometrischen Parameter zwischen der Simulation von CaL B im Komplex

mit dem R-Amid und dem S-Amid festgestellt werden. Einzig die Standardabweichung der Rotation um die Achse des Phenylrings (Torsion-Phenyl, NH-C-C<sub>ar</sub>=C<sub>ar</sub>) war im Fall des S-Amids sehr groß, was auf eine weitgehend ungehinderte Drehbarkeit des Phenylrings hinweist, die für das R-Amid nicht gegeben zu sein scheint.

In Abbildung 5.27 ist der zeitliche Verlauf der beiden ausgewerteten Torsionswinkel abgebildet. Es ist zu erkennen, dass für den Phenylring zwei statistisch relevante Konformationen auftreten, die über den Zeitraum der Simulation wieder ineinander übergehen können.

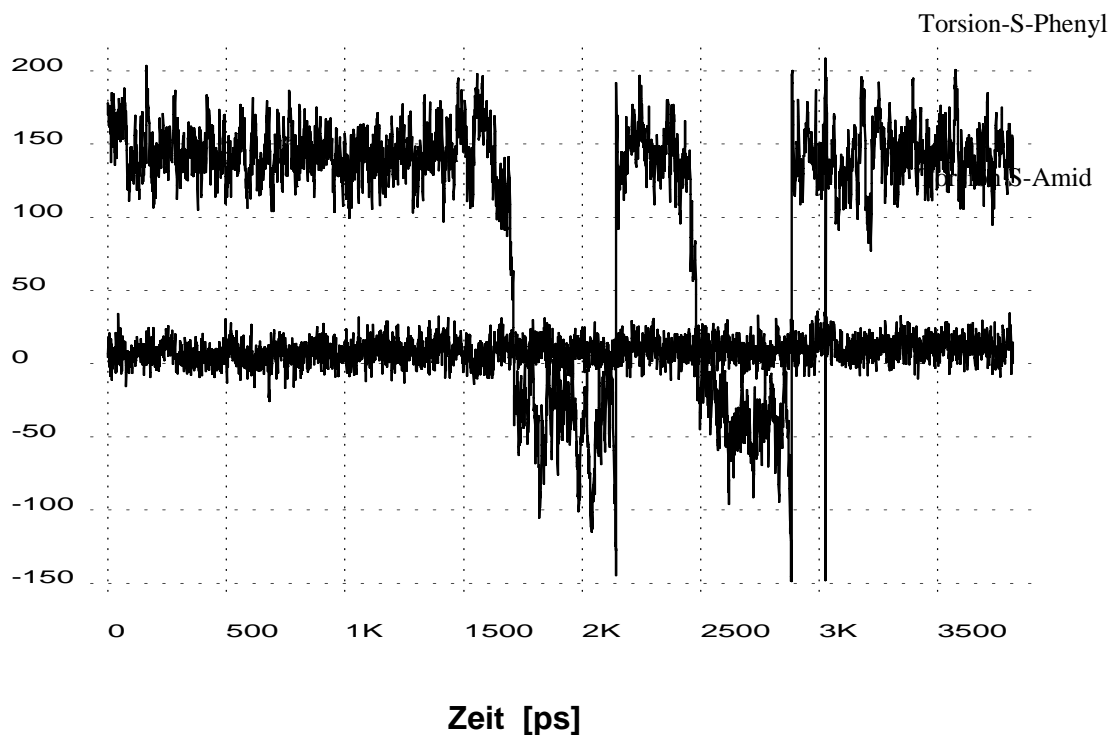
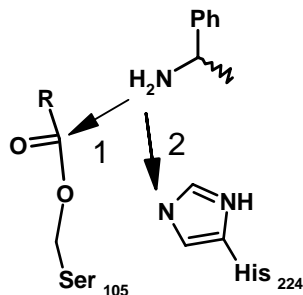


Abb. 5.27: Zeitlicher Verlauf der Torsionswinkel für das S-Phenylethyl-ethoxyamid über die Trajektorie. Für den Phenylring wurde ein Übergang zwischen zwei statistisch relevante Konformationen gefunden.

### 5.7.2 Acyl-Enzym und Amin

Analoge Simulationen wurden mit dem Acyl-Enzym im Komplex mit dem nicht kovalent gebundenen Amin (siehe Abbildung 5.26 links) mit beiden enantiomeren Formen des Phenylethylamins in der Bindetasche der CaL B durchgeführt.

Die Trajektorie wurde über einen Zeitraum von 289 ps für den R-Amin Acyl-Enzym-Komplex bzw. 420 ps für den S-Amin Acyl-Enzym-Komplex gesammelt.



gewertet. Es zeigte sich, dass kein Unterschied im Abstand des Amin-NH<sub>2</sub> zum Carbonyl-Kohlenstoff bzw. zum His224 N $\epsilon$  zwischen den Enantiomeren festgestellt werden konnte.

Statistik	Mittelwert	Standard-Abweichung
Acyl-Enzym + Amin	Å	
Abstand 1 R C- <sub>Acyl</sub> -Amin NH S	3.777	0.239
Abstand 2 R His224 -Amin NH S	3.123	0.205
	3.099	0.182

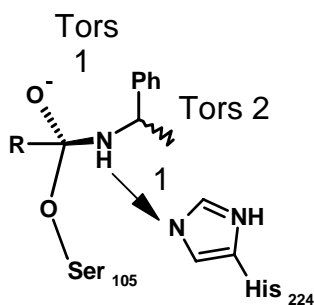
Die Simulation verhielt sich über den gesamten untersuchten Zeitraum stabil. Die Fluktuation der Gesamtenergie und auch die RMS-Abweichung zur Startstruktur waren gering.

Die Position desamins in der Bindetasche relativ zu den katalytisch relevanten Gruppen His224 und dem Carbonyl-Kohlenstoff der Acylgruppe am Ser105 wurde statistisch aus-

### 5.7.3 Tetraedrisches Intermediat

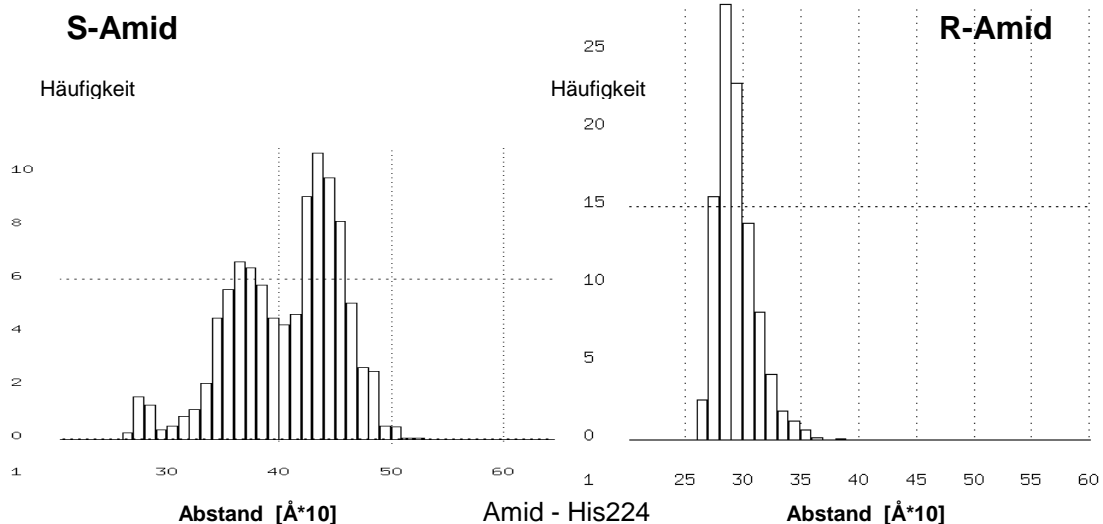
Analoge Simulationen wurden mit dem kovalent an das Serin 105 gebundenen tetraedrischen Intermediat (siehe Abbildung 5.26, Mitte) der Amidhydrolyse mit beiden enantiomeren Formen des Phenylethyl-ethoxy-acetamids durchgeführt.

Die Trajektorie wurde über einen Zeitraum von 2,2 ns für das R-Amid bzw. 3,2 ns für das S-Amid gesammelt.



Statistik	Mittel wert	Std-Abw.
TeT1-Komplex	Å	
Abstand 1 [Å] R	2.943	0.171
His224 -Amid NH S	4.174	0.427
Torsion -Phenyl ° R	99.048	54.054
NH-C-C <sub>ar</sub> =C <sub>ar</sub> S	-101.56	95.019
Torsion -Amid ° R	-7.870	17.390
O-C-NH-C S	-147.310	49.557

Die statistische Auswertung der Häufigkeitsverteilung für die Wasserstoffbrückenbindung vom His224 zur NH-Funktion des Intermediates zeigt deutliche Unterschiede im Verhalten beider Enantiomere auf, wie in Abbildung 5.28 im Histogramm zu erkennen ist. Während die Wasserstoffbrücke vom His224 zum Amin (Abstand 1) im R-Intermediat stabil bleibt, ist sie in den meisten gesammelten Konformationen für das S-Intermediat verloren gegangen.



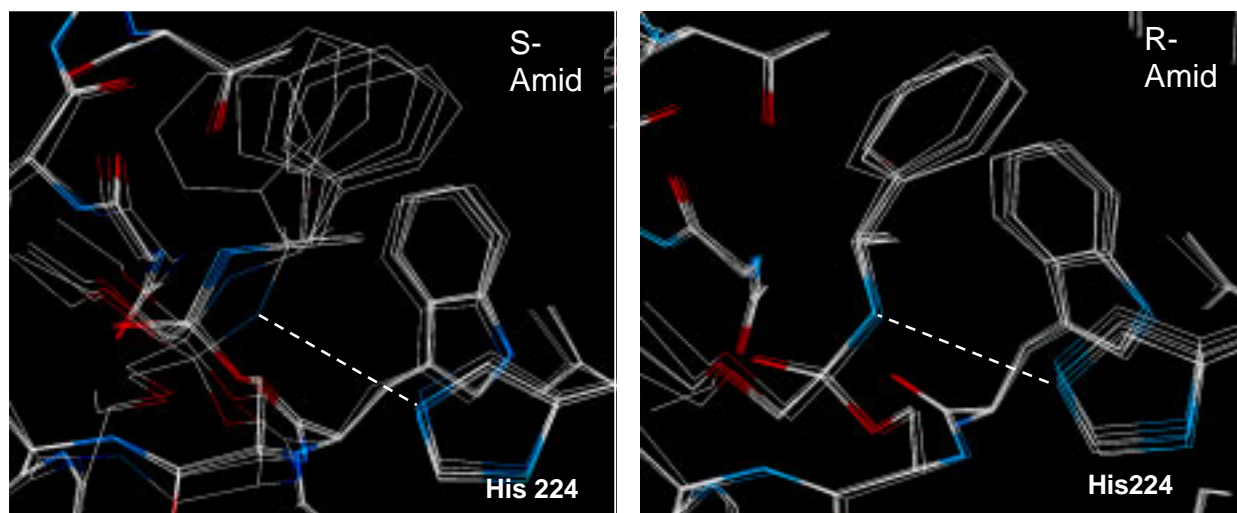
**Abb. 5.28:** Häufigkeitsverteilung des Abstands 1 (His224 -Amid NH), der katalytischen Wasserstoffbrücke vom His224 zum Amid. Es wurden drei statistisch relevante Konformationen für das S-Amid (links) beobachtet. Die Wasserstoffbrücke zu dem S-Amid (links) geht verloren. Das R-Amid (rechts) zeigt nur eine stabile Wasserstoffbrücke.

Die unterschiedliche Geometrie der  $\alpha$ -Hydroxy-Amin-Funktion im tetraedrischen Zustand zeigt sich auch im Torsionswinkel über die Amin-Bindung ( $O-C-NH-C$ ), der für das R-Phenylethylamid nahe  $0^\circ$  bleibt, aber im Fall des S-Phenylethylamids mit einem Mittelwert von  $-147,3 \pm 49^\circ$ , deutlich abweicht.

In dieser sogenannten unproduktiven Geometrie kann die Wasserstoffbrücke zum katalytischen His224 nicht ausgebildet werden, aber die chirale Methylgruppe ist von der Oxyanionen-Höhle weg in die Stereospezifitätstasche des Trp104 ausgerichtet.

In Abbildung 5.29 ist die Überlagerung der statistisch relevanten Geometrien für das tetraedrische Intermediat für das S-Enantiomer (links) bzw. das R-Enantiomer (rechts) gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die stereogene Methylgruppe des R-Phenylethylamid-Intermediates ideal in der Stereospezifitätstasche durch das Trp104 stabilisiert werden kann.

Dieser Unterschied in der Stabilisierung des tetraedrischen Intermediates in der Bindetasche von CaL B konnte auch für die Rotation des Phenylrings (Torsion Phenyl) beobachtet werden.



**Abb. 5.29:** Überlagerung der statistisch relevanten Konformationen des tetraedrischen Intermediates aus der MD-Simulation des S-Amids (links),

Wasserstoffbrücke vom Amid zum unprotonierten Ne des His224 geht im Verlauf der Simulation im S-Amid verloren.

## 6 DISKUSSION UND AUSBLICK *CANDIDA ANTARCTICA* LIP B

In dieser Arbeit ist es gelungen, Einblick in die strukturellen und kinetischen Determinanten für die beeindruckende Enantioselektivität von 99,9 % ee der immobilisierten *Candida antarctica* Lipase B (NOVOZYM 435) für die kinetischen Racematspaltung (siehe Einleitung Kapitel 3.5.1) von Phenylethylamin (Balkenhohl *et al.*, 1997; Reetz & Dreisbach, 1994) zu gewinnen.

Diese enzymatisch katalysierte Reaktion wird bei der BASF AG am Standort Ludwigshafen im technischen Maßstab mit mehreren hundert Tonnen Produkt/Jahr zur Produktion von optisch reinen Aminen durchgeführt.

### 6.1 Reinigung und Kristallisation

Die Grundvoraussetzung jeder Proteinstrukturbestimmung ist die erfolgreiche Kristallisation des Proteins.

Die Reinigung des Enzyms aus einer kommerziell erhältlichen Rohlipase (NOVOZYM 525, Novo Nordisk AS) führte in zwei Reinigungsstufen zu einer aktiven Lipase, die kein weiteres Fremdprotein enthält.

Die Kristallstruktur der *Candida antarctica* konnte bereits 1994 im Labor von Alwyn T. Jones (Uppenberg *et al.*, 1994a) erfolgreich

gelöst werden. Leider konnten die veröffentlichten Protokolle zur Kristallisation aus diesen Arbeiten (Uppenberg *et al.*, 1994b) nicht erfolgreich auf das vorhandene Proteinmaterial der CaL B übertragen werden.

Die Diskussion mit den Autoren dieser Arbeiten (S. Patkar Novo Nordisk, T.A. Jones, Uppsala University, pers. Mitteilung) führte zu dem Schluss, dass die Aufreinigung des Proteinmaterials für die veröffentlichten Arbeiten aus dem Wildtypstamm der Hefe *Candida antarctica* erfolgten (Patkar *et al.*, 1993). Dieses Protein ist nicht mehr von der NOVO NORDISK erhältlich. Das in dieser Arbeit verwendete, kommerziell erhältliche Material NOVOZYM 525 stammt hingegen aus der heterologen, rekombinanten Expression der CaL B in *Aspergillus oryzae* (S. Patkar, pers. Mitteilung). Da Unterschiede in der Sequenz ausgeschlossen werden konnten, wurde vermutet, dass die N-glycosidische Modifikation sich vom damals verwendeten Wildtypenzym unterscheiden könnte.

Aus diesem Grund wurde ein Protokoll zur Deglycosilierung des Enzyms entwickelt (siehe Kapitel 5.1) und die exakte Masse des deglycosilierten und glycosilierten Proteins mit MALDI-TOF- und ESI-Massenspektrometrie bestimmt und verglichen (Abbildung 5.2a bzw. b S.70). Es konnte gezeigt werden, dass eine extreme Hyperglycosilierung des Proteins vorliegt, die bis zu 10 % der Enzymmasse ausmacht.

Frühere MALDI-TOF Untersuchungen an pilzlichen Lipasen aus unterschiedlichen Organismen (Hedrich *et al.*, 1993) zeigten dagegen ein definiertes Glycosilierungsmuster der Glycoproteine in Abhängigkeit vom untersuchten Organismus. Es ist anzunehmen, dass die heterologe Expression der *Candida antarctica* Lipase in *Aspergillus Oryzae* mit hoher Wahrscheinlichkeit Ursache dieses "Unfalles" bei der Überexpression sein kann, da bekannt ist, dass sekretierte Fremdproteine im Golgi-Apparat oft mit einem mannosereichen Glycan versehen werden (Cereghino & Cregg, 2000).

Der deutliche Einfluss einer solchen Hyperglycosilierung auf die Kristallisation von Proteinen konnte bereits in vergleichenden Studien am Beispiel des HIV-Glycoprotein 1 gezeigt werden (Kwong *et al.*, 1999), da ein hochflexibler Rest aus Kohlenhydraten die Löslichkeit und das Aggregationsverhalten sehr stark beeinflussen kann.

Die Entwicklung eines Protokolls zur quantitativen nativen Deglycosilierung der CaL B ohne Denaturierung führte allerdings nicht zum gewünschten Erfolg, da das deglycosilierte Protein nicht erfolgreich kristallisiert werden konnte.

Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit allen bereits gelösten Raumstrukturen der CaL B (Uppenberg *et al.*, 1994a), die an Asn74 eine kovalente Glycosilierung über zwei in der Raumstruktur sichtbare Glucosaminreste zeigt.

Die parallel verfolgte Suche nach neuen Kristallisationsbedingungen für die hyperglycosi-

lierte CaL B führte unter den im Methodenteil genannten Bedingungen (20 % PEG 4000, 20 % iso-Propanol und 0,1 M Citrat bei pH 3,6) nach 12 Monaten Kristallwachstum zu geeigneten Kristallen in der bisher nicht veröffentlichten hexagonalen Raumgruppe  $P6_322$ . Die so ermittelte Struktur zeigt tatsächlich Abweichungen in der Geometrie des in Abbildung 5.17 abgebildeten kovalent an Asn 74 gebundenen Glycosids. Es kann aber nur spekuliert werden, ob die Kristallisation in der neuen Raumgruppe oder die mannose-reiche Hyperglycosilierung für die abgewandelte Konformation der N-glycosidisch gebundenen N-Acetyl-Glucosamid-Linker verantwortlich ist.

## 6.2 Untersuchungen zum Katalysemechanismus

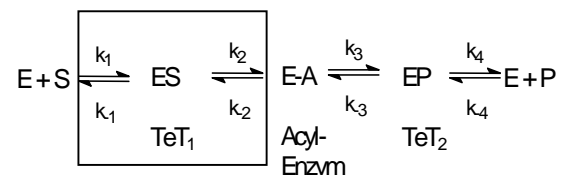
Die *Candida antarctica* Lipase B (EC 3.1.1.3) ist eine Serinhydrolase (Brady *et al.*, 1990; Dodson, Lawson & Winkler, 1992) und besitzt wie alle Triacylglycerol-Lipasen eine klassische katalytische Triade (Blow, 1990; Dodson & Wlodawer, 1998), gebildet aus Ser105, His224 und Aspartat187 (Uppenberg *et al.*, 1994a). Der Mechanismus der enzymatischen Hydrolyse von Estern bzw. Amiden durch Serinhydrolasen wurde mit zahlreichen Methoden von der Enzymkinetik (Gutfreund & Sturtevant, 1956) über Strukturuntersuchungen (Alden, Wright & Kraut, 1970; Wright, Alden & Kraut, 1969) bis hin zu quantenmechanischen ab initio molekulardynamischen Methoden (De Santis & Carloni, 1999) untersucht und ist in der Einleitung zusammengestellt.

Für die detaillierte Analyse der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ist es jedoch nötig, den tatsächlich geschwindigkeitsbestimmenden Elementarschritt der Katalyse für das untersuchte Enzym und Substrat zu kennen.

In dieser Arbeit konnte die Methode der transienten Kinetik durch "stopped-flow" Untersuchungen der "burst" Kinetik (siehe Einleitung, Kapitel 2.5.2) erfolgreich eingesetzt werden, um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Katalysemechanismus von CaL B eingehend zu untersuchen. Das Ergebnis dieser erstmals für Lipasen durchgeführten Studien (Kapitel 5.2.4, Abbildung 5.5) ist, dass die CaL B, im Gegensatz zu den klassischen Se-

rinproteasen wie Chymotrypsin oder Trypsin, keinen "Burst" unter den untersuchten Bedingungen aufweist. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass die Deacylierung des Acyl-Enzyms der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der lipasekatalysierten Hydrolyse ist.

Da auch kein "initial Lag" beobachtet wurde, ist weiterhin unwahrscheinlich, dass die Substratbindung an die Lipase geschwindigkeitsbestimmend ist. Der langsamste Elementarschritt der Katalyse muss also nach der Substratbindung und vor der Deacylierung im kinetischen Fließschema liegen



Es wird daher eine direkte Beteiligung des tetraedrischen Intermediates  $\text{TeT}_1$  beim Aufbau des Acyl-Enzyms am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt postuliert. Es kann aber nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, welcher Elementarschritt der Katalyse, der nukleophile Angriff des Serins auf das planare Carbonyl ( $k_1/k_{-1}$ ) zum Ausbilden des tetraedrischen Intermediates oder die Abspaltung der Alkoholgruppe aus dem tetraedrischen Intermediat ( $k_2/k_{-2}$ ) unter Ausbildung des Acyl-Enzym-Komplex, der tatsächlich geschwindigkeitsbestimmende und damit auch der enantioselektivitätsbestimmende Schritt für die Umsetzung von chiralen Alkoholen oder Amiden ist.

Diese Vermutung wird auch durch kinetische Untersuchungen der Acylübertragung mit CaL B in wasserfreien organischen Lösungsmitteln bestätigt (Ema *et al.*, 1998; Martinelle & Hult, 1995).

Die Untersuchungen zur irreversiblen Inhibierung von CaL B mit Phosphonamiden bzw. Phosphoestern zeigen interessanterweise eine direkte Abhängigkeit der Bildung des tetraedrischen Phosphonamid-Komplexes sowohl von der Stereochemie des Phosphorzentrums, als auch von der Stereochemie der untersuchten chiralen Phenylethylamide bzw. Alkohole. Es ist bereits bekannt (Mannesse *et al.*, 1995a), dass nur das  $S_p$ -Phosphonamid in der Lage ist, das sterisch anspruchsvolle Phenylethylamid in die Alkoholbindetasche zu platzieren und gleichzeitig den Phosphonat-Sauerstoff korrekt in die Oxyanionen-Höhle zu orientieren. Bisher wurde nicht untersucht, ob es auch eine Korrelation der Reaktionsgeschwindigkeit der Inhibitoren mit der Stereochemie des Alkohol-Substituenten, bzw. der in dieser Arbeit erstmals synthetisierten Amid-Substituenten gibt.

Die gute Übereinstimmung der Enantioselektivität in der kinetischen Racematspaltung mit den beobachteten Enantiopräferenzen für die irreversible Inhibierung der CaL B mit den diastereomeren  $S_p$ - $R_c$ - bzw.  $S_p$ - $S_c$ -Inhibitoren zum tetraedrischen "Transition-State"-analogen Komplex ist ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des tetraedrischen Intermediats für die Struktur-Aktivitäts-Beziehung der CaL B.

Die Geometrie der tetrahedralen, aber ungeladenen Phosphonamid-Komplexe entspricht vermutlich der Geometrie des Übergangszustandes vom planaren Amid zum (am Carbonylsauerstoff negativ geladenen) tetrahedralen Intermediat entlang der Reaktionskoordinate.

Inhibitoren, deren Abgangsgruppe bei der Reaktion mit dem Enzym einen Chromophor (p-Nitrophenolat) oder Fluorophor (Umbelliferon) freisetzen, können so zum direkten photo- oder fluorometrischen Nachweis der Enantioselektivität verwendet werden. Allerdings muss erwähnt werden, dass die Inhibitoren mit dem deutlich grösseren p-Nitro-Naphthylalkohol als Abgangsgruppe insgesamt nur sehr langsam mit dem Enzym reagierten und keine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Stereochemie des Phenylethylalkohols mehr festgestellt werden konnte. Hier scheint die Bindung des p-Nitro-Naphthyl-Inhibitors der langsamste Schritt zu sein.

Es ist prinzipiell für jedes Substrat neu zu prüfen, welcher Schritt unter den gewählten Bedingungen wie Substrat, pH, Ionenstärke, Kofaktoren etc. den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.

Das klassische Beispiel des Chymotrypsins zeigt dieses gravierende Problem bei der Verallgemeinerung von kinetischen Daten ebenfalls auf. Es konnte gezeigt werden, dass für die Hydrolyse von Estern, wie z.B. des auch in dieser Arbeit verwendeten p-Nitrophenylacetats (Gutfreund & Sturtevant, 1956), die Deacylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Spätere Messungen mit p-



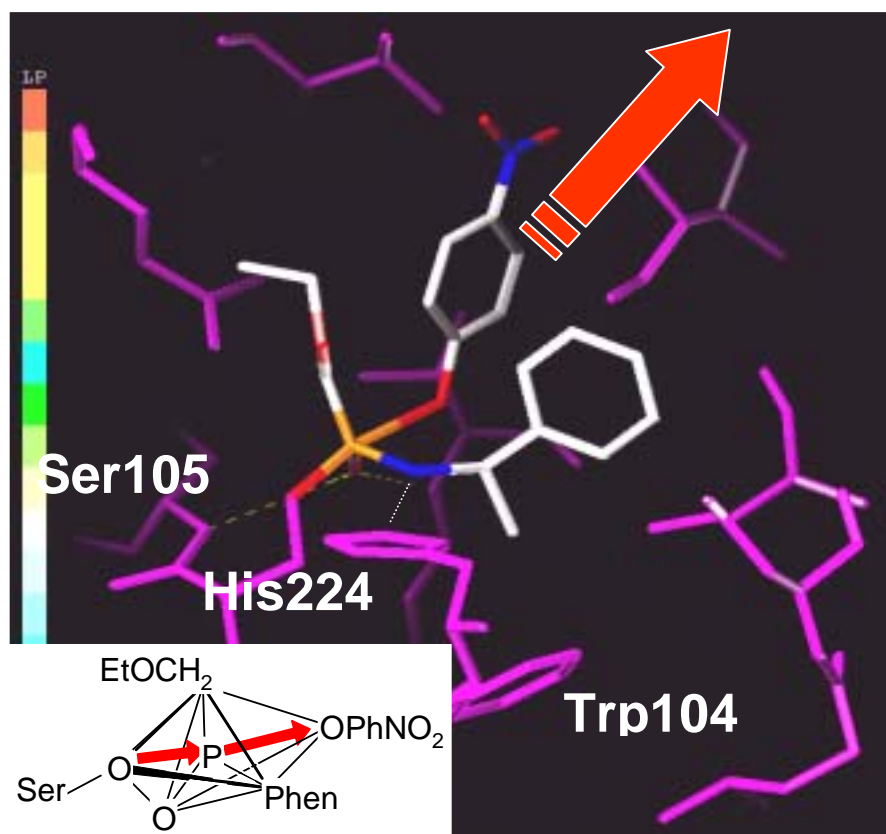
Nitroanilid widerlegten aber diesen Schluss für die Hydrolyse von Amiden.

Es ist daher unabdingbare Voraussetzung, diesen Schritt für die Diskussion eines Katalysemechanismus' für ein bestimmtes Substrat zu kennen, um die experimentellen Daten richtig interpretieren zu können.

Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt sowohl für verschiedene p-Nitrophenylester, als auch für p-Nitrophenylanilid gemessen, um eine möglichst gute Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das in der indus-

triellen Biokatalyse mit CaL B verwendete Substrate wie das Phenylethylamid annehmen zu können. Auch die Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln wurde untersucht.

Ein weiterer Faktor, der zur Interpretation der thermodynamischen Daten zur kinetischen Racematspaltung nicht unterschätzt werden sollte, ist der Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Katalyse. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass CaL B in der biokatalytisch genutzten Acylübertragung (siehe Kenntnisstand Kapitel 3.1.3) auf chirale sekundäre Alkohole und Amine (Garcia-Alles



**Abb. 6.1:** Modellierter, am Phosphor (orange) pentakoordinierter Übergangszustand bei der Reaktion des p-Nitrophenyl-Phenylethylamid-Inhibitors mit dem Serin105 in der Bindetasche von CaL B. Nur die S-Phosphor konfigurierten Inhibitoren platzieren den Phenylethylaminrest korrekt in der Stereospezifitätstasche zum Trp104 und können alle Wasserstoffbrückenbindungen vom kat. His 224 zum Amid und vom Phosphorsauerstoff in die Oxyanionen-Höhle ausbilden. Gleichzeitig wird das p-Nitrophenol als Abgangsgruppe zum Solvens ausgerichtet (roter Pfeil).

& Gotor, 1998; Martinelle & Hult, 1995) sowohl durch das Substrat, als auch durch den bei der Acylierung freigesetzten Alkohol, wie z.B. Ethanol, bei der Acylübertragung kompetitiv gehemmt wurde (Garcia-Alles & Gotor, 1998; Martinelle & Hult, 1995).

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Ansatz zum Studium der Lösungsmittelabhängigkeit Lipase-katalysierter Reaktionen in einem einfach durchzuführenden photometrischen Test sollte untersucht werden, ob es möglich ist, auch für die Hydrolyse von löslichen Standardsubstraten, wie dem verwendeten p-Nitrophenylacetat, eine ähnliche Hemmung nachzuweisen. Die in Kapitel 5.2.2 vorgestellten Daten zur Inhibierung durch wasserlösliche organische Lösungsmittel legen den Schluss nahe, dass es in der Bindetasche tatsächlich eine bevorzugte Bindungsstelle für iso-Propanol geben könnte, da diese Substanz die stärkste Inhibierung zeigt.

In der Elektronendichte des nativen Enzyms konnte bei der Verfeinerung ein Bereich ausgemacht werden, der entweder von zwei Wassermolekülen oder aber von einem iso-Propanol Molekül (es befanden sich 20 % iso-Propanol in der Präzipitans-Lösung) besetzt werden könnte. Diese putative Bindungsstelle befindet sich direkt im aktiven Zentrum zwischen den Restes Ile 285 und Leu 278, also exakt an der Position des Phenylrings des Phenylethylamid-Inhibitors in der Bindetasche (siehe Abbildung 5.20). Diese Vermutung einer Bindung von iso-Propanol wurde bereits in der 1994 veröffentlichten nativen Struktur

der CaL B (1tca Auflösung 1,55 Å) diskutiert.

Für die *Thermomyces lannuginosa* Lipase wurde hingegen in Anwesenheit von iso-Propanol, sowie mit Detergenzien die Aktivierung des Enzyms durch die Stabilisierung der "Lid"-Region in der offenen Konformation berichtet (Jutila *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001b). Erst bei einer Konzentration von über 30 % wird diese Lipase durch iso-Propanol inhibiert. Es konnte nach dem heutigen Kenntnisstand kein enzymunabhängiges Modell des Solvenseinfluss durch die Analyse der physikochemischen Eigenschaften aufgestellt werden (Carrea & Riva, 2000). Die Aktivität von Lipasen korreliert weder mit logP noch mit der Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon$ , sondern die aufgestellten Modelle scheinen nur für jeweils ein Enzym gültig zu sein. Daher kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der beobachteten Inhibition von CaL B um einen Enzym-unabhängigen Effekt wie die Solvatisierungseigenschaften des Substrates oder die Verringerung der Wasseraktivität im Lösungsmittelgemisch handelt. Die beobachtete Aktivierung von CaL B durch Triton X 100 kann ebenfalls durch die bereits erfolgte Röntgenstrukturanalyse in Anwesenheit von Tween 80 (Uppenberg *et al.*, 1994a) strukturell interpretiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein Tween 80 Molekül an die "Lid"-Helix  $\alpha 5$  bindet und die offene Form stabilisiert. In Strukturen ohne zugesetztes Detergens ist die "Lid"-Helix dagegen ungeordnet und in der Elektronendichte nicht sichtbar, wenn sie nicht durch Kristallkontakte stabilisiert werden kann, wie z.B. in der vorliegenden Arbeit in

Kapitel 5.4 für die native Lipase gezeigt werden konnte.

### 6.3 Komplex-Strukturen mit enantiomerenreinen Inhibitoren

Die erfolgreiche Strukturbestimmung der CaL B im Komplex mit beiden diastereomeren Formen des tetraedrischen  $S_p(R_c/S_c)$ -Phenylethylamid-Inhibitor Komplexes in der Bindetasche der CaL B sollte Informationen über die tatsächlichen Struktur-Aktivitätsbeziehungen liefern, da alle kinetischen Daten auf die Beteiligung des tetraedrischen Intermediates am enantioselektiven Schritt der Katalyse hindeuten. Nach einigen Schwierigkeiten bei der Züchtung von Kristallen in ausreichender Qualität (siehe Abschnitt 1 der Diskussion) und der Gewinnung von Messdaten geeigneter kristallographischer Auflösung ist es gelungen, unter Verwendung von hochenergetischer Synchrotronstrahlung drei ausreichend aufgelöste Datensätze für das native Enzym und beide Komplexstrukturen am DESY in Hamburg aufzunehmen. Die Auswertung lieferte allerdings ein unerwartetes Ergebnis.

Obwohl mit Hilfe massenspektrometrischer Untersuchungen eindeutig nachgewiesen wurde, dass beide Inhibitoren kovalent an das Enzym binden, kann ein Teil des  $S_c$ -Inhibitors in der auf  $0,9 \sigma$  konturierten  $2F_o - F_c$  Elektronendichte (Abbildung 5.21) nicht zugewiesen werden. Das langsamere Enantiomer scheint demnach eine Unordnung über mehrere Konformationen in diesem Molekülteil in der Bin-

detasche anzunehmen. Daher liefert dieses Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse den Hinweis, dass die CaL B vermutlich nicht oder zumindest deutlich schlechter in der Lage ist, das langsamere reagierende S-Enantiomer im tetraedischen Zustand zu stabilisieren. Diese Hypothese steht im Einklang mit dem klassischen Modell des Schlüssel-Schloss Prinzips von Emil Fischer der enzymatischen Katalyse, wonach die Stabilisierung des Übergangszustands entscheidend für die Erniedrigung der Aktivierungsenergie ist.

In Abbildung 6.2 ist die optimale Einpassung der Methylgruppe am stereogenen Zentrum des  $R_c$ -Phenylethylamid-Inhibitors (rechts) in der Stereospezifitätstasche gezeigt. Im Vergleich dazu ist in der linken Bildhälfte eine Überlagerung von zwei denkbaren Konformationen des langsamere reagierenden  $R_c$ -Phenylethylamid-Inhibitors gezeigt.

Die Auswertung der von Dr. K. Ditrich (BASF AG, Hauptlabor) zur Verfügung gestellten Daten zur Temperaturabhängigkeit der kinetischen Racematspaltung von Phenylethylamin zeigt in der Summe der freien Differenzaktivierungsenergie die Bevorzugung des  $R_c$ -Enantiomers um  $-4,6 \text{ kcal/mol}$ . Noch erstaunlicher ist die Absenkung des Übergangszustands um  $-7,9 \text{ kcal/mol}$  durch den enthalpischen Beitrag, d.h. die Katalysegeschwindigkeit wird durch die korrekte Konfiguration der chiralen Methylgruppe theoretisch um einen Faktor von  $10^5$  beschleunigt, wenn angenommen wird, dass der entropische Einfluss vernachlässigt werden könnte. Eine Reihe von Untersuchun-

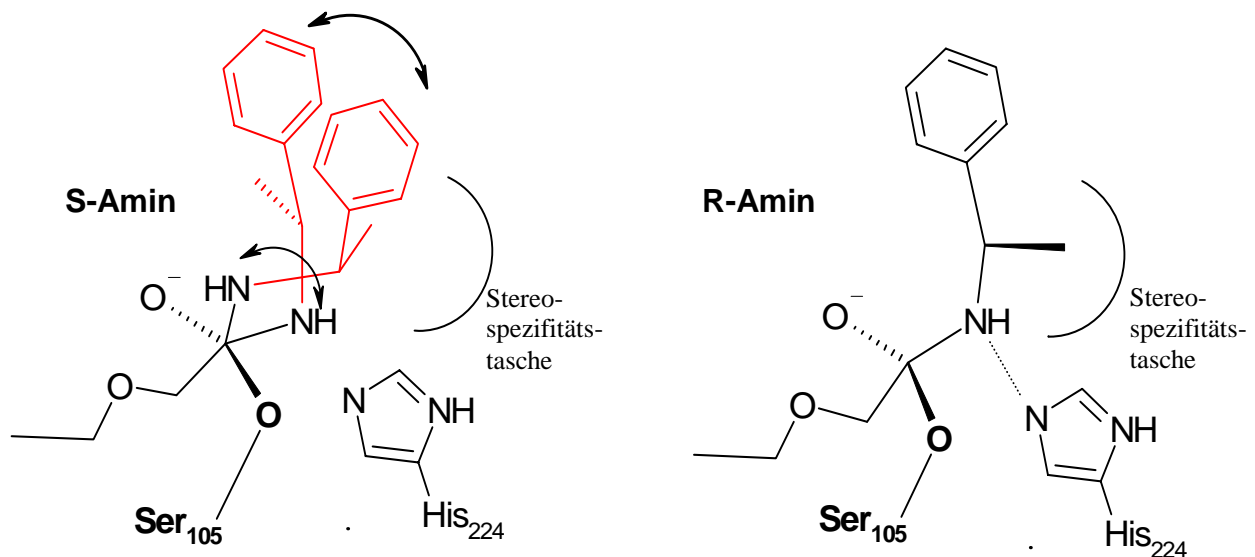
gen in der neueren Literatur zeigen, dass für das Beispiel der CaL B gerade der entropische Faktor einen grossen, negativen Einfluss auf die Enantioselektivität nimmt (Haeffner *et al.*, 1998; Ottosson & Hult, 2001). Bei der im Kapitel 5.2 beschriebenen Auswertung des entropischen Anteils an der freien Differenzaktivierungsenthalpie  $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$  mit einem experimentell bestimmten Wert von  $-T\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger = 3,3$  kcal/mol bei 25°C zeigt sich, dass dieser Teil dem enthalpischen Beitrag entgegenwirkt.

Dies kann so interpretiert werden, dass bei der Bildung des tetraedrischen Intermediates des langsamer reagierenden S-Substrats weniger Entropie verloren geht und damit die Bindung des S-Substrats entropisch begünstigt wird. Dies korreliert mit der höheren Restmobilität dieses Substrats in der Bindetasche, was sich in der schlecht definierten Elektronendichte

eines Teils der "Transition-State"-analogen Inhibitoren andeutet und durch verschiedene Computersimulationen untermauert wird.

Insgesamt wird aber der entropische Teil durch den enthalpischen Teil überkompensiert. Es wird ein Wert von -4,6 kcal für die freie Differenzaktivierungsenergie  $\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$  bestimmt. Die optimale Passform, die zu einer enthalpischen Begünstigung des R-Substrates führt, kostet ihren Preis in einem hohen entropischen Verlust durch die starke Fixierung dieses Substrats im tetraedrischen Intermediat.

Die Bedeutung der Konformation des tetraedrischen Übergangszustandes für die weitere Reaktion wird auch durch die Betrachtung der stereoelektronische Eigenschaften verdeutlicht (Ema *et al.*, 1998). Hierbei ist es günstig, wenn der Sauerstoff in der Oxyanionenhöhle in einer anti-Geometrie zur Methyl-



**Abb. 6.2:** Hypothese zur unterschiedlichen Stabilisierung des kovalent an Ser 105 gebundenen tetraedrischen Phosphoramid-Inhibitors. Rechts ist die ideale Geometrie aus der experimentellen Röntgenstruktur der CaL B im Komplex mit dem R-Amid-Inhibitor gezeigt. Die chirale Methylgruppe wird in der Stereospezifitätstasche gebunden und das Amid bildet ein Wasserstoffbrücke zum katalytischen His224 aus. Links ist ein Ensemble aus unterschiedlichen Konformationen angedeutet, das in der Röntgenstrukturanalyse nicht aufgelöst werden konnte.

gruppe am stereogenen Zentrum steht, da sonst ungünstige Wechselwirkungen auftreten.

## 6.4 Computergestützte Konformationssuche und MD-Simulationen

In dem Bereich, in dem der S<sub>c</sub>-Inhibitor mit einem Phenylethylrest binden sollte, ist die Elektronendichte nur schlecht definiert. Zusammen mit den kinetischen und thermodynamischen Daten ergibt sich daraus die Hypothese, dass dieser Molekülteil im Protein eine hohe Mobilität zeigt. Dies wird durch alle verwendeten, computergestützten Methoden zur Konformationsanalyse untermauert. Sowohl Docking Methoden (FLEXX) als auch die systematische Suche nach möglichen Konfigurationen durch die Rotation um die drehbaren Bindungen im tetraedrischen Intermediat weisen darauf hin, dass es deutliche Unterschiede im zugänglichen Konfigurationsraum der beiden enantiomeren Substrate in der Bindetasche gibt. Insbesondere die aus der MD-Simulation aller beteiligten Spezies gezogene Schlussfolgerung, dass hauptsächlich das tetraedrale Intermediat am geschwindigkeits- und selektivitätsbestimmenden Schritt der kinetischen Racematspaltung beteiligt ist, wird auch durch die experimentellen "Burst"-Kinetiken und die Geschwindigkeit der Inhibition durch die "Transition-State"-analogen Phosphonamide in Abhängigkeit der Stereochemie des Phenylethylamids gestützt.

Insgesamt zeichnet sich ein differenzierteres Bild der enantioselektiven Substraterkennung ab. Die Bedeutung der katalytischen Wasserstoffbrücke vom Histidin zum Amid bzw. Ester, deren Länge bereits in einer anderen Studie

zur qualitativen computergestützten Vorhersage der Enantioselektivität einer kinetischen Racematspaltung von sekundären Alkoholen mit *Ps. cepacia* Lipase (Schulz *et al.*, 2000) bzw. *Candida rugosa* Lipase (Schulz, Schmid & Pleiss, 2001) korreliert werden konnte, gewinnt im Zusammenhang mit der Restmobilität des tetraedralen Intermediats in der Bindetasche und dem postulierten Verlust eben dieser Wasserstoffbrücke noch mehr an Bedeutung.

Gegenüber dem in der Literatur anhand von Strukturen der *Candida rugosa* Lipase im Komplex mit R- bzw. S-Menthyl-Inhibitoren (Cygler *et al.*, 1994) abgeleitetem Modell der "Kollision" der chiralen Gruppe mit dem katalytischen Histidin (Abb.3.2) als enantioselektivitätsbestimmendem Faktor kann unter Einbeziehung aller experimentellen Ergebnisse ein erweitertes Modell aufgestellt werden. Dieses Modell, das nicht nur die statische, durch die Bindungsenergie festgelegte Struktur des tetraedralen Intermediates berücksichtigt, sondern auch den Einfluss der durch die Restmobilität bestimmten Entropiebeitrags berücksichtigt, gibt die experimentell bestimmten thermodynamischen Parameter qualitativ richtig wieder.

Interessant ist vor allem die Tatsache, dass die erst im September 2001 erschienene Analyse der experimentellen thermodynamischen Daten einer bereits lange bekannten Mutation Trp104His (Patkar *et al.*, 1998) einen extremen Anstieg des entropischen Beitrags zur Enantioselektivität (Ottosson *et al.*, 2001) zeigen. Da dieser Term, wie oben ausgeführt, die tatsäch-

lich beobachtete Enantioselektivität negativ beeinflusst, sinkt der gemessene E-Wert des Enzyms folglich von 970 auf 150 ab. Dieses Verhalten kann im Rahmen des postulierten Modells zwanglos erklärt werden, denn die leichte Vergrößerung der Stereospezifitätstasche führt vermutlich zu einer deutlichen Vergrößerung des zur Verfügung stehenden Konfigurationsraumes für das S-Enantiomer.

## 6.5 Ausblick

Das vorgeschlagene Modell der enantioselektiven Substraterkennung zeigt, dass selbst ein vermeintlich gut untersuchter Enzymmechanismus, wie der Mechanismus der Serinhydrolasen, im Detail schwer zu interpretieren ist. Insbesondere die bisherigen Arbeiten zur Computer-gestützten Vorhersage der Enantioselektivitäten müssen neben den enthalpischen Beiträgen auch den Einfluss der Entropie einbeziehen, damit quantitative Vorhersagen getroffen werden können (Kazlauskas, 2000; Rotticci *et al.*, 2001)

Selbst wenn alle verfügbaren Informationen gesammelt werden und zusätzlich zur Strukturbestimmung der Einsatz von Computersimulationen vorangetrieben wird, kann nur qualitativ erklärt werden, aus welchen Gründen die Konfiguration einer Methylgruppe die kinetische Diskriminierung in der Katalysege-

schwindigkeit um einen Faktor von >1000 bewirkt. Die aufgestellte Hypothese, dass die chirale Gruppe in diesem Beispiel direkt auf das katalytische His224 zeigt, konnte durch die gut aufgelöste Röntgenstruktur des R-Phenylethylamid-Inhibitors bestätigt werden.

Dies steht im Gegensatz zu den aus der Röntgenstruktur der *Candida rugosa* Lipase im Komplex mit beiden enantiomeren Formen des Menthyl-Inhibitors gezogenen Schlussfolgerung, dass die unvorteilhafte sterisch repulsive Interaktion des langsameren Stereoisomers mit der katalytischen Triade die Stereoselektivität determiniert. Dieses Modell erscheint aus geometrisch-enthalpischen Gründen sehr plausibel.

Im vorliegenden Beispiel ist aber keine Interaktion des kleinen Methylrestes mit Resten der Triade möglich, sondern es wurde die gegenteilige Beobachtung gemacht, dass gerade im schneller reagierenden R-Enantiomer die Methylgruppe zum His224 in die Stereospezifitätstasche auf das Trp104 hin ausgerichtet ist. Aus diesem Grund müssen, wie in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der CaL B gezeigt, auch weitere Kriterien wie der zugängliche Konfigurationsraum und die korrekte Ausbildung des für die Katalyse erforderlichen Wasserstoffnetzes sowie die stereoelektronischen Eigenschaften für die chirale Diskriminierung verantwortlich gemacht werden

## **7 ERGEBNISSE TEIL II BURK- HOLDERIA PLANTARII LIPA- SE**

### **7.1. Proteinreinigung und Charakterisierung der BpL**

Ziel dieser Arbeiten war die Expression und Reinigung der BpL zur anschliessenden Kristallisation Proteine.

Die Fermentation erfolgte in Kooperation mit der BASF (Dr. T. Friedrich) in einem 20 l Fermenter (INFORS HT) im Biotechnikum des zentralen Hauptlabors, Ludwigshafen. Die sekretierte Lipase befand sich dabei nach 24 Stunden stets im Medium der Fermentation und wurde durch Zentrifugation von den Zellen abgetrennt.

#### **7.1.1 BASF Produktionsstamm**

Die Fermentation erfolgte mit Sojaöl als Kohlenstoffquelle im Nährmedium, um die Induktion der Lipasesekretion zu erreichen. Die Reinigung erfolgte nach dem in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Reinigungsprotokoll. Die Kristallisation der BpL konnte mit keiner der aufgereinigten Lipasepräparation aus dem BASF Produktionsstamm erreicht werden.

#### *Analytik :*

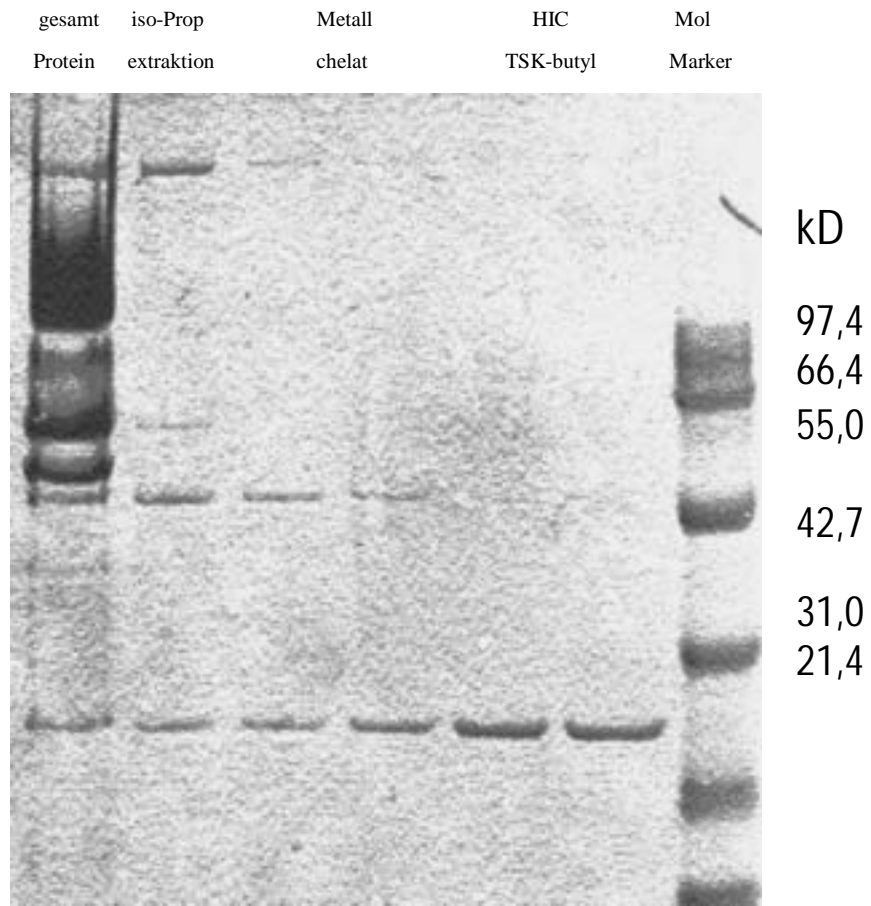
Die Aktivität der Fraktionen wurde mit dem Tributeryntest bzw. mit p-Nitrophenyl-Acetat (siehe Kapitel 4.3) festgestellt. Zur Kontrolle der Reinheit wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt (Abbildung 7.1). Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht ergab eine einzelne Proteinbande mit dem Molekulargewicht von ca. 33 kDa. Das theoretische Molekulargewicht beträgt 33091.8 Da.

Der isoelektrische Punkt der Lipase wurde mit Hilfe einer nativen isoelektrischen Gelelektrophorese (Pharmazia-IEF 5000V, pH 3-10) untersucht. Die Auftrennung ergab eine Hauptbande bei einem pH-Wert von ca. 6,8 (Abbildung 7.2). Wird die gereinigte Lipase in einer höheren Konzentration auf das Gel aufgetragen, so sind eine Reihe von schwächeren Banden im pH-Bereich von ca. 6,5 bis 6,8 zu erkennen.

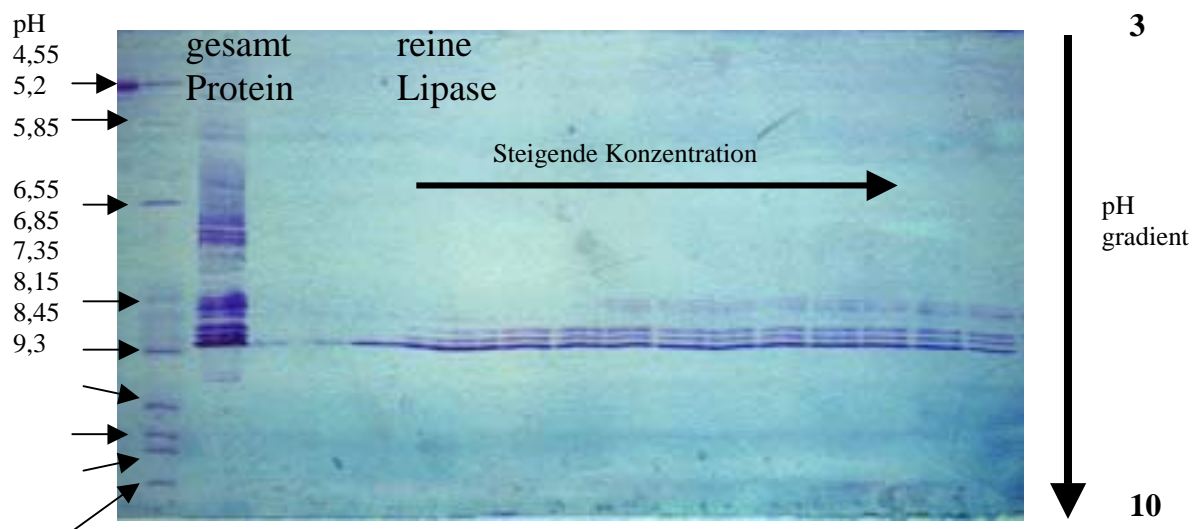
#### *Iso-Propanol Extraktion:*

Das nach der Fermentation und anschliessender Zentrifugation noch im Medium vorhandene Sojaöl, die hydrolysierten Fettsäuren und andere hydrophobe Bestandteile wurde durch eine Extraktion des zentrifugierten Mediums mit iso-Propanol entfernt. Das in der wässrigen Phase gelöste iso-Propanol konnte durch vorsichtiges Destillieren im Rotationsverdampfer entfernt werden.





**Abb. 7.1:** SDS-Gelelektrophorese der Lipase des Produktionsstammes in verschiedenen Reinigungsstufen.



**Abb. 7.2:** Isoelektrische Fokussierung der Lipase des Produktionsstammes Pharmazia IEF, 5000V, pH 3- pH 10.

### *Bindung an tert-Butyl-sepharose*

Die Lipaselösung wurde mit  $\text{NH}_4\text{Ac}$  versetzt und durch vorsichtiges Ausrühren über Nacht an das hydrophobe Chromatographiematerial tert-Butyl-sepharose (Toyo<sup>®</sup> TSK-Butyl 650 M) gebunden. Im Überstand konnte nach 12 Stunden nur noch geringe Lipaseaktivität nachgewiesen werden. Der Überstand wurde verworfen und die Lipase im Batchverfahren mit 25 % iso-Propanol-Lösung vom Säulenmaterial abgelöst.

### *Chromatographie mit tert-Butyl-sepharose*

Die vorgereinigte Lipaselösung wurde erneut mit  $\text{NH}_4\text{Ac}$  versetzt und einer hydrophoben Interaktions-Chromatographie (HIC) unterworfen. Als Säulenmaterial wurde wiederum tert-Butyl-sepharose (Toyo<sup>®</sup> TSK-Butyl 650M) verwendet. Das Säulenmaterial wurde mit 3 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  äquilibriert und anschliessend die Lipaselösung aufgetragen. Ungebundenes Material wurde mit 1M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  ausgewaschen. Die Lipase konnte mit einem Gradienten von 1 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  zu reinem Wasser eluiert werden. Der Verlauf der Elution ist im Diagramm 7.1 dargestellt. Die so erhaltene Lipaselösung wurde im Vakuum gefriergetrocknet.

### *Metall-Chelat-Chromatographie*

Die *Burkholderia plantarii* Lipase enthält ein Calciumion und kann daher über eine Metall-Chelat-Chromatographie von anderen hydrophoben Proteinen abgetrennt werden. Die Reinigung erfolgte über eine Nickel-Chelat-Sephrose. Das lyophilisierte Protein wurde in

20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst und auf eine 20 ml-Säule aufgetragen. Die Elution der Lipase erfolgte mit 1 M NaCl in 20 mM Phosphatpuffer pH 6,0 (Protokoll BASF).

### *Isoelektrische Chromatofokussierung:*

Zur Charakterisierung der im IEF entdeckten Proteinmischung wurde ein Protokoll zur Auftrennung der einzelnen Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt entwickelt. Die chromatographische Auftrennung erfolgte über eine zur isoelektrischen Chromatofokussierung (ICF) geeignete Anionenaustauschersäule (Mono<sup>®</sup>P, Pharmazia).

Die Optimierung der analytische Auftrennung erfolgte mit einer vorgepackten 1 ml Chromatographiesäule MONO<sup>®</sup>P (Pharmazia) an einem ÄCTA<sup>®</sup> FPLC System (Pharmazia) mit der Software UNICORN<sup>®</sup> (Pharmazia). Dabei wurde der pH-Wert des Startpuffers von pH 8 langsam auf pH 10,5 angehoben, bis das gesamte Protein an das Säulenmaterial gebunden werden konnte. Die Elution erfolgte mit 20 ml Polybuffer<sup>®</sup>94 (1 zu 13 verdünnt), pH 5-6,5 (HAc). Die Lipasekonzentration betrug 0,1 mg Lipase, gelöst im entsprechenden Startpuffer. Während der Chromatographie wurde die UV-Absorption bei 280 nm aufgezeichnet und der pH-Wert der Fraktionen von je 1 ml mit einem pH-Meter bestimmt.

Die Auswertung des Chromatogramms erfolgte mit der Software UNICORN. Die detektierten Absorptionspeaks wurden integriert, um den Proteingehalt abzuschätzen.

1. Lauf : (Diagramm 7.2)

Startpuffer	25mM TRIS pH 8
Elutionspuffer	PB94 pH 5
Durchlauf :	2 Peaks
Elution :	2 Peaks

2. Lauf : (Diagramm 7.3)

Startpuffer	25mM TRIS pH 9
Elutionspuffer	PB94 pH 6
Durchlauf :	2 Peaks
Elution :	5 Peaks

3. Lauf : (Diagramm 7.4)

Startpuffer :	25mM Ethanolamin pH 10,5
Elutionspuffer	PB94 pH 6,5
Durchlauf :	0 Peaks
Elution :	7 Peaks

Nach der gelungenen analytischen Proteintrennung wurde versucht, eine Menge von insgesamt 4 mg Lipase zur Kristallisation mit dieser Methode aufzutrennen.

4. Lauf: (Diagramm 7.5)

Startpuffer	25mM Ethanolamin pH 10,5
Elutionspuffer	PB94 pH 6,5
Durchlauf :	0 Peaks
Elution :	4 Peaks

Durch die insgesamt höhere Beladung der Säule und der damit verbundenen Verbreiterung der eluierten Proteinbanden konnten nur noch vier Proteinfractionen voneinander getrennt werden. Der Durchlauf zeigte keinen Durchbruch von nicht gebundenem Protein, so dass insgesamt die Kapazität des Säulenmaterials nicht überschritten wurde.

Aktivitätsmessungen zeigten, dass es sich bei allen vier Proteinen um Iso-Lipasen handelte, da jeweils dieselbe Aktivität festgestellt wurde. Das Molekulargewicht der so aufgetrennten Iso-Lipasen ist auf einem SDS-Gel nicht unterscheidbar.

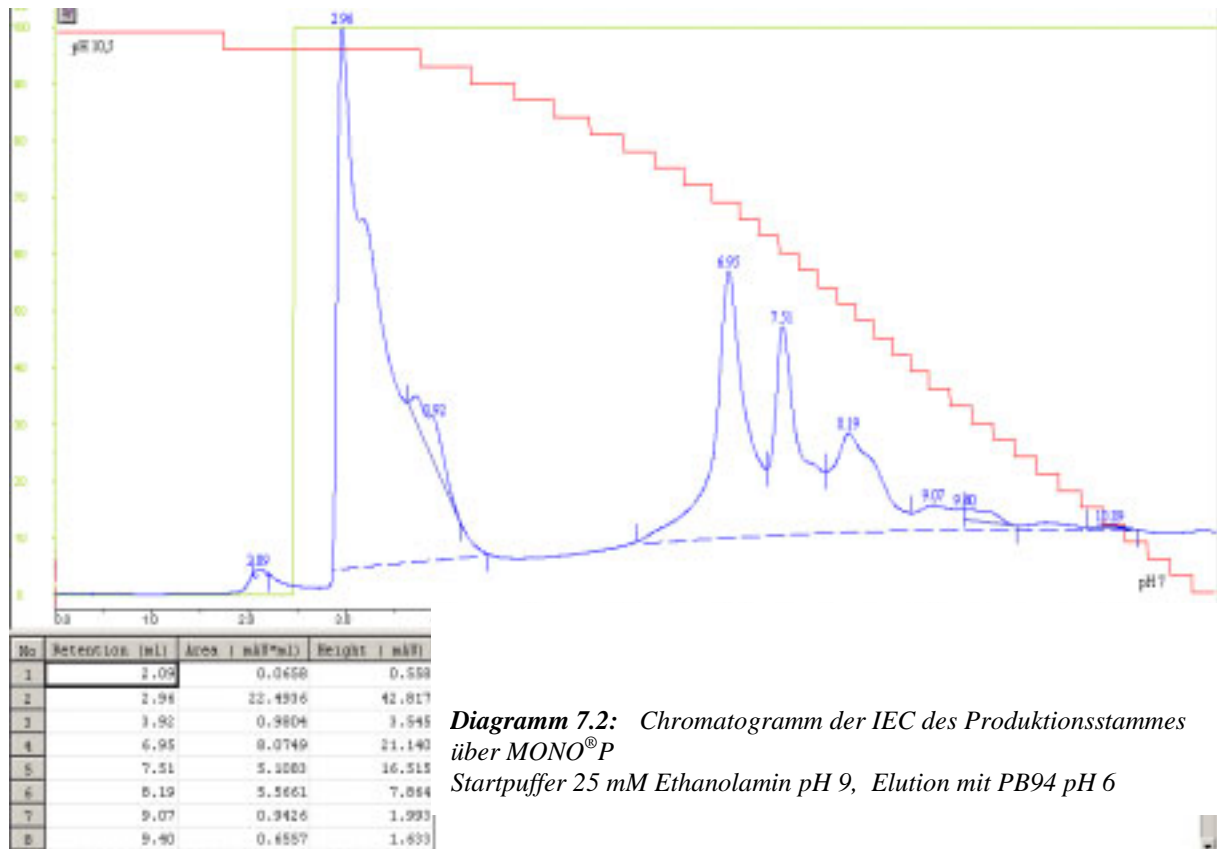
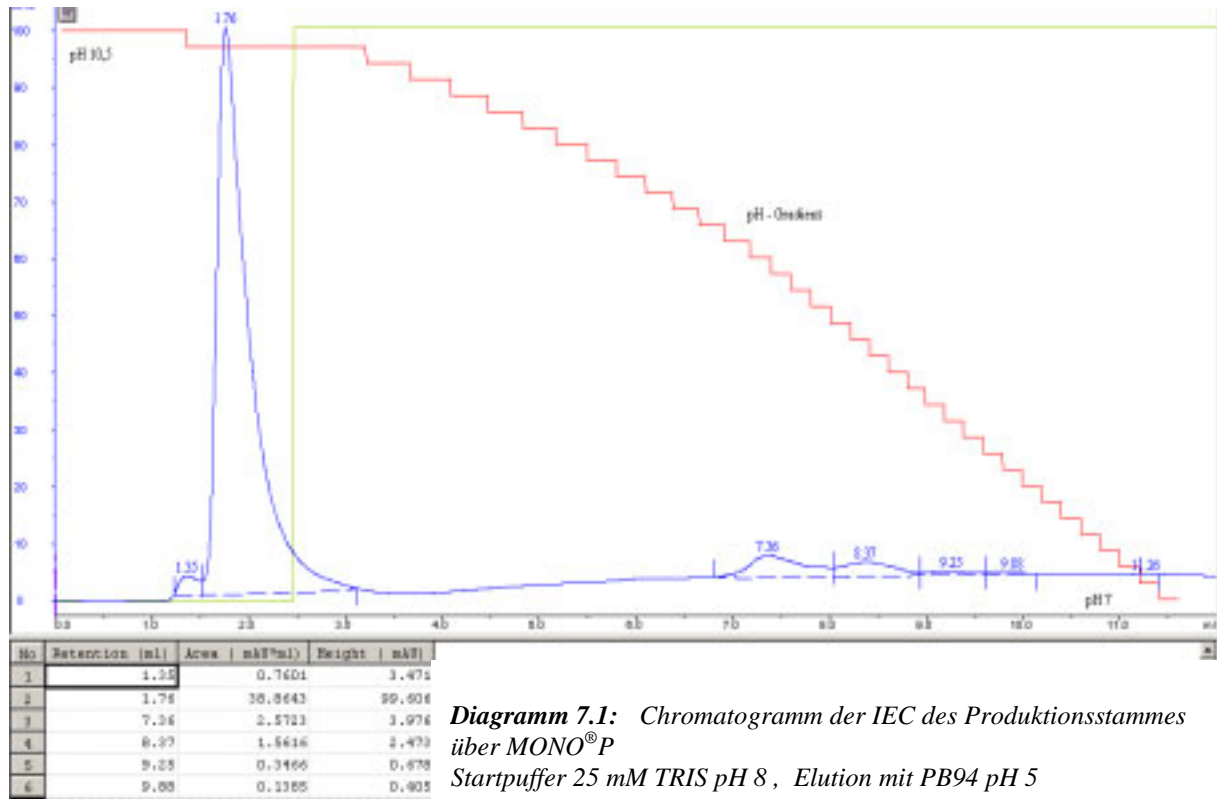
Die N-terminale Ansequenzierung der Proteine im Proteinlabor der BASF (T. Brugger) zeigte in allen untersuchten Fraktionen die für die *Burkholderia plantarii* Lipase erwartete Sequenz.

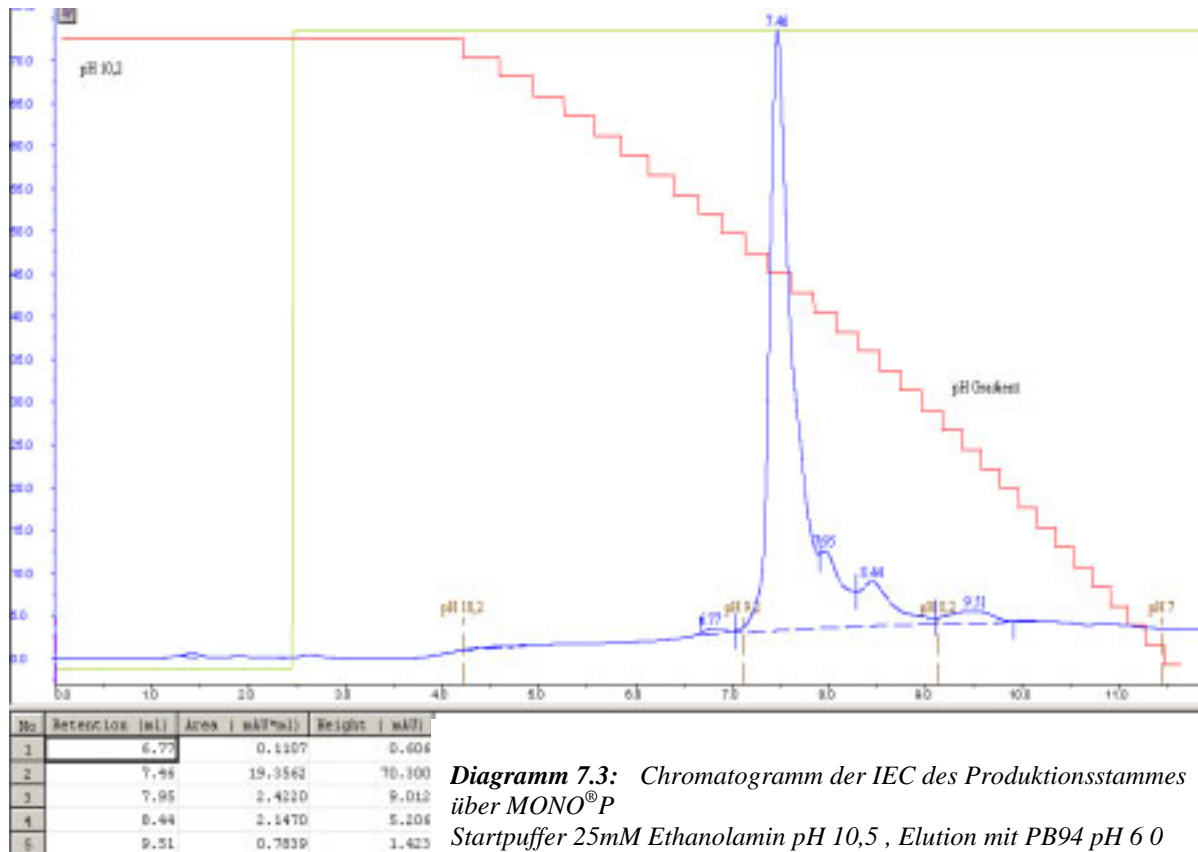
***N-terminale Sequenzierung Ipmol (BASF)***

SDS- Bande ca. 33kDa , 25AS

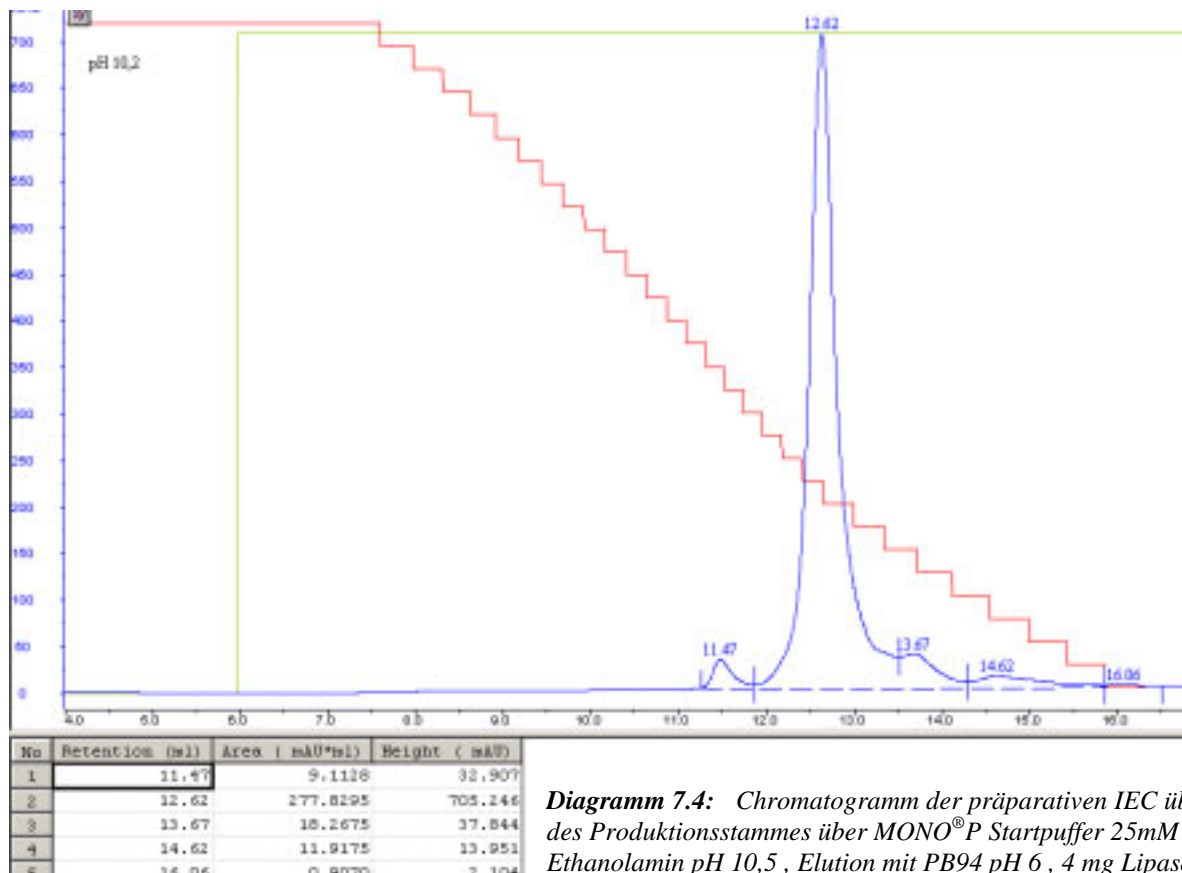
ADTYAATRYPVILVHGLAGTDKFAN

Angegeben ist jeweils die N-terminale AS-Sequenz im Einbuchstabencode.





**Diagramm 7.3:** Chromatogramm der IEC des Produktionsstammes über MONO®P  
Startpuffer 25mM Ethanolamin pH 10,5 , Elution mit PB94 pH 6 0



**Diagramm 7.4:** Chromatogramm der präparativen IEC über des Produktionsstammes über MONO®P Startpuffer 25mM Ethanolamin pH 10,5 , Elution mit PB94 pH 6 , 4 mg Lipase

### 7.1.2 Wildtyp

Die Fermentation des Wildtyps erfolgte mit Sojaöl als Kohlenstoffquelle im Medium, um die Induktion der Lipasesekretion zu erreichen. In 14 l Medium waren ca. 300 mg Lipase enthalten aus dem nach vier Reinigungsschritten noch 60 mg Lipase erhalten wurde. Die Reinigung erfolgte nach dem in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Reinigungsprotokoll.

Auch mit der aus dem Wildtypstamm gereinigten Lipase konnten in keiner Reinigungsstufe Kristalle erhalten werden.

#### *Analytik*

Die Aktivität der Fraktionen wurde mit dem Tributeryntest bzw. mit p-Nitrophenyl-Acetat festgestellt. Zur Kontrolle der Reinheit wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt (Abbildung 7.3). Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht ergab zwei einzelne Proteinbanden mit dem Molekulargewicht von ca. 33 kDa und ca. 60 kDa. Das theoretische Molekulargewicht der BpL beträgt 33091.8 Da.

Die exakte Masse wurde in der massenspektrometrischen Abteilung der BASF (Dipl. Ing. Sabine Bomm) mit der Methode der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) untersucht. In Abbildung 7.4 ist das Massenspektrum einer Lipase dargestellt. Mit Hilfe dieser Methode konnten innerhalb der Auflösungsgrenzen von ca. 5 Da zwei verschiedene Lipasen mit einer Masse von 33094 und 33168 identifiziert werden. Die errechnete

Molekulargewichtsdifferenz von 74 Da könnte durch eine Abspaltung des N-terminalen Alanins (71 Da) bei einem Teil der Proteinmenge hervorgerufen worden sein.

Die N-terminale Ansequenzierung nach dem Blot auf eine PVDF-Membran ergab die eindeutige Identifizierung der Bande bei 33 kDa als *Burkholderia plantarii* Lipase. Die N-terminale Sequenz des zweiten Proteins mit einem Gewicht von ca. 60 kDa konnte durch Sequenzvergleiche in der Swiss-Prot Datenbank nicht eindeutig zugeordnet werden.

#### *N-terminale Sequenzierung Ipmol*

##### *(BASF)*

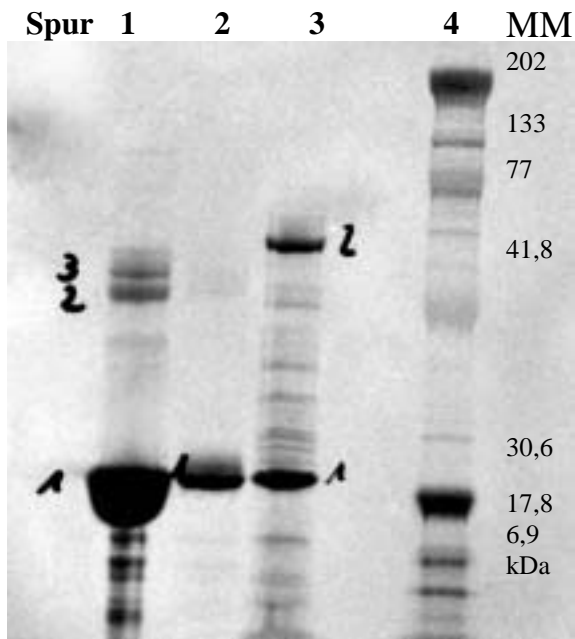
Erste Bande ca. 33kDa, 25AS

ADTYAATRYPVILVHGLAGTDKFAN

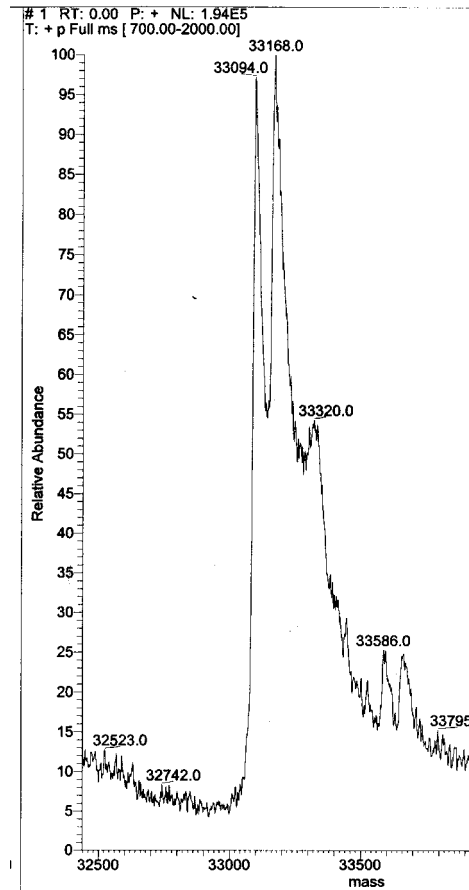
Zweite Bande ca. 60kDa 25 AS

STPDFTNFPPTSFDVAVASVTG - LRM  
KP            L    AY    T A  
                  G

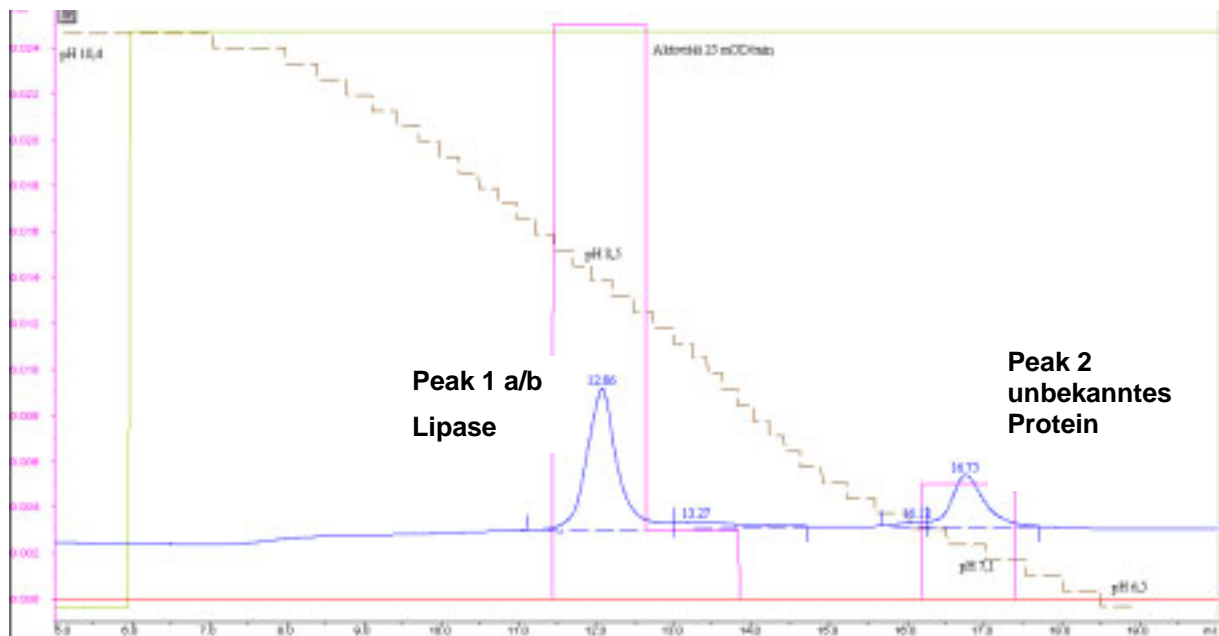
Angegeben ist jeweils die N-terminale AS-Sequenz im Einbuchstabencode. Nicht eindeutig bestimmbare AS sind durch ein Minus gekennzeichnet, alternative Aminosäuren sind untereinander aufgeführt.



**Abb. 7.3:** SDS- PA-Gel-Elektrophorese : Gezeigt ist die SDS-PAGE von verschiedenen Lipasepräparationen aus dem Expressionstamm Spur (1) ungereinigt (2) hochgereinigt und dem Wildtyp in Spur (3) ungereinigt. In Spur (4) ist ein pH Marker (Biorad Kaleidoscope).



**Abb. 7.4:** ESI-MS der BpL nach der IEC Peak 1b Fraktion 4 bei 13,27 ml



No	Retention (ml)	Area (mAU*min)	Height (mAU)
1	1.23	33.8105	16.930
2	12.06	17.3132	36.632
3	13.27	1.7703	1.824

**Diagramm 7.5:** Chromatogramm der IEC des Wildtyps über MONO<sup>®</sup>P Startpuffer 25mM Ethanolamin pH 10,5 , Elution mit PB94 pH 6 0,1 mg Lipase  
**Peak 1** bei 12,06ml pH 8,5 Lipase  
**Peak 2** bei 16,75ml pH 7,1 unbekanntes Protein

### *Iso-Propanol Extraktion*

Das nach der Fermentation noch im Medium vorhandene Sojaöl, die hydrolysierten Fettsäuren und andere hydrophobe Bestandteile wurden durch eine Extraktion des zentrifugierten Mediums mit iso-Propanol entfernt. Das in der wässrigen Phase gelöste iso-Propanol konnte durch vorsichtiges Destillieren im Rotationsverdampfer entfernt werden.

### *Bindung an tert-Butyl-sepharose*

Die Lipaselösung wurde mit NH<sub>4</sub>Ac versetzt und durch vorsichtiges Ausrühren über Nacht an das hydrophobe Chromatographiematerial tert-Butyl-sepharose (Toyo<sup>®</sup> TSK-butyl) gebunden. Im Überstand konnte nach 12 Stunden nur noch geringe Lipaseaktivität nachgewiesen werden. Der Überstand wurde verworfen und die Lipase im Batchverfahren mit 25 % iso-Propanol vom Säulenmaterial abgelöst und das iso-Propanol abdestilliert.

### *Chromatofokussierung:*

Die analytische Chromatofokussierung erfolgte nach dem für den Produktionsstamm etablierten Protokoll. Als Startpuffer wurde 25 mM Ethanolamin pH 10,5 verwendet. Eine Probe der aus dem vorangegangenen Schritt erhaltene Lipaselösung wurde 1:10 mit dem Startpuffer verdünnt und auf ein 1 ml Säule MONO<sup>®</sup>P (Pharmazia) aufgetragen. Anschliessend wurde mit 1 ml Startpuffer ungebundenes Material ausgespült und mit 20 ml PB94 pH 6,5 das Protein eluiert. Wie aus dem Chromatogramm in Abbildung 5.6 ersichtlich, konnten zwei

Proteine mit deutlich abweichendem isoelektrischen Punkt getrennt werden. Auch in der aus dem Wildtyp gereinigten Lipase wurde ein kleiner Peak in einem Abstand von ca. 0.5 pH-Einheiten in der analytischen IEC festgestellt.

Peak 1	pH 8,5	Lipase
Peak 2	pH 7,1	unbekanntes Protein

Die präparative Chromatofokussierung konnte aufgrund des deutlichen Unterschieds der isoelektrischen Punkte der zu trennenden Proteine mit Hilfe einer selbstgepackten Säule (XK16, 20 ml) mit Polybuffer<sup>®</sup>Exchanger (PBE<sup>®</sup>) erfolgen (Diagramm 5.5). Dieses Säulenmaterial besitzt die gleichen Eigenschaften wie das vorher verwendete MONO<sup>®</sup>P, lediglich die erreichbare analytische Trennschärfe ist laut Herstellerangaben mit max. 0,2 pH Einheiten Auflösung geringer.

### *Chromatographie mit tert-Butyl-sepharose*

Die vorgereinigte Lipaselösung wurde erneut mit 1 M NaCl versetzt und einer hydrophoben Interaktions-Chromatographie (HIC) unterworfen, um den Polybuffer 94 zu entfernen. Als Säulenmaterial wurde wiederum tert-Butyl-sepharose (Toyo<sup>®</sup> TSK-butyl) verwendet. Das Säulenmaterial wurde mit 1M NaCl äquilibriert und anschliessend die Lipaselösung aufgetragen. Ungebundenes Material wurde mit einem Gradienten von 1 M zu 0,1 M NaCl ausgewaschen. Die Lipase konnte mit einem Gradienten von 0,1 M NaCl zu reinem Wasser eluiert werden. Der Verlauf der Elution ist im Diagramm 7.5 dargestellt.



Die so erhaltene 30 ml Lipaselösung mit einem Gehalt von 2 mg/ml *Burkholderia plantarii* Lipase und einer Aktivität von 0,1 mOD<sub>405</sub>/min gegen p-Nitrophenylacetat wurde zur weiteren Verwendung bei 6°C gelagert.

Die aus dem Wildtyp erhaltenen Lipasepräparationen konnten nicht kristallisiert werden.

#### *Fermentationsbedingungen:*

Da die Ausbeute an Protein mit 300 mg aus 14 l Medium um eine Größenordnung geringer war als die aus dem Produktionsstamm erhaltenen Menge, wurde versucht, die Lipaseproduktion zusätzlich zu induzieren. Es konnte gezeigt werden (Riedel *et al.*, 2001), dass insbesondere langkettige N-Acyl-homoserinlactone (HSL) als Signalmolekül im "Quorum-Sensing" die Sekretion von Lipasen induzieren können. Analog dazu wurde versucht, die Proteinmenge im Medium zu steigern, indem zusätzlich zum Ölsäuremedium N-Acyl-HSL mit verschiedenen Acyl-Kettenlängen (C4, C6 und C8) zugegeben wurden.

Gleichzeitig wurde der Einfluss der Anwesenheit von Palmitinsäure (Bestandteil des Sojaöls) im Medium untersucht.

Die Ergebnisse von verschiedenen 100 ml Testkulturen, die jeweils über 24 h bei 30 °C bei 200 U/min fermentiert wurden, sind in der nachfolgenden Tabellen zusammengefasst. Die Zelldichte wurde über die OD<sub>600</sub> bestimmt, die Aktivität in Tributerin-Units (siehe 4.3.1).

#### a) Ölsäure Vorkultur-Medium

Zusatz	OD <sub>600</sub> (12 h)	Aktivität U/ml (24h)
--	0,34	8
C4+C6+C8+Palm.	0,67	13
C4 (nicht gewachsen)	--	--
C4 + Palm	0,93	20
C6	0,58	3
C6 + Palm	2,35	20
C8	1,27	3
C8 + Palm	2,0	42

C4-8 = N-Acyl-Homoserinlacton mit Acylkettenlänge 4-8

Palm = Palmitinsäure

#### b) Sojaöl Fermenter-Medium

Zusatz	OD <sub>600</sub> (24 h)	Aktivität U/ml (24h)
--	0,8	14
C4+C6+C8+Palm.	1,8	6
C4	1,2	20
C4 + Palm	1,2	9,5
C6	0,9	11
C6 + Palm	0,9	9,6
C8	1,1	11
C8 + Palm	1,1	7

C4-8 = N-Acyl-Homoserinlacton mit Acylkettenlänge 4-8

Palm = Palmitinsäure

Die Erhöhung der Aktivität in den Versuchen im Vorkultur-Medium (a) zeigt Palmitinsäure als essentiellen Faktor; das konnte in den Expressionen im Fermentationsmedium mit Sojaöl (b) nicht bestätigt werden. Sojaöl enthält bereits 5 – 10 % veresterte Palmitinsäure, so dass vermutlich diese Komponente eine Steigerung der Sekretion im Fermenter-Medium bewirkt. Durch Zugabe von C4-N-Acyl HSL konnte die Lipaseausbeute nochmals um den Faktor 1,5 gesteigert werden. Bei der Testfermentation in 14 l Medium wurde nahezu eine Verdopplung der Aktivität festgestellt.

### 7.1.3 Rekombinante Bpl-Mutante F142W

Die Fermentation der rekombinant, homolog im Wildtyp exprimierten Lipase erfolgte mit Glucose als Kohlenstoffquelle im Medium.

Das Lipase-Gen Lip A wurde von Dr. Markus Matuschek (BASF AG, ZHF) auf einem von pML131 abgeleitetem Plasmid (Labes, Puhler & Simon, 1990) mit einem zusätzlichen Gentamycin-Resistenzgen in den Wildtyp eingebracht. Die Induktion der Lipasesekretion erfolgte konstitutiv, das chromosomale Wildtyp-Gen wurde ohne Anwesenheit von Fettsäuren nicht exprimiert. In 14 l Medium waren ca. 30 mg Lipase enthalten, woraus nach zwei Reinigungsschritten noch ca. 10 mg der Lipase-Mutante F142W erhalten wurde. Die Reinigung erfolgte nach dem in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Reinigungsprotokoll. Mit der rekombinanten, homolog im Wildtypstamm ohne Zugabe von Fettsäuren exprimierten Lipase-Mutante konnten nach zwei Reinigungsstufen Kristalle erhalten werden.

#### *Analytik*

Die erhaltenen Lipase wurde anhand der SDS-Gelelektrophorese als homogenes Protein mit einem Molekulargewicht von 32 kDa identifiziert (Abbildung 7.5). Die analytische Chromatofokussierung über MONO<sup>®</sup> P zeigte ebenfalls nur eine Bande bei einem pH-Wert von 8,5. Dies entspricht dem erwarteten Wert für die *Burkholderia plantarii* Lipase.

Es konnte kein Unterschied zum Wildtypenzym festgestellt werden.

#### *7.1.2.1 Abtrennung der Zellen*

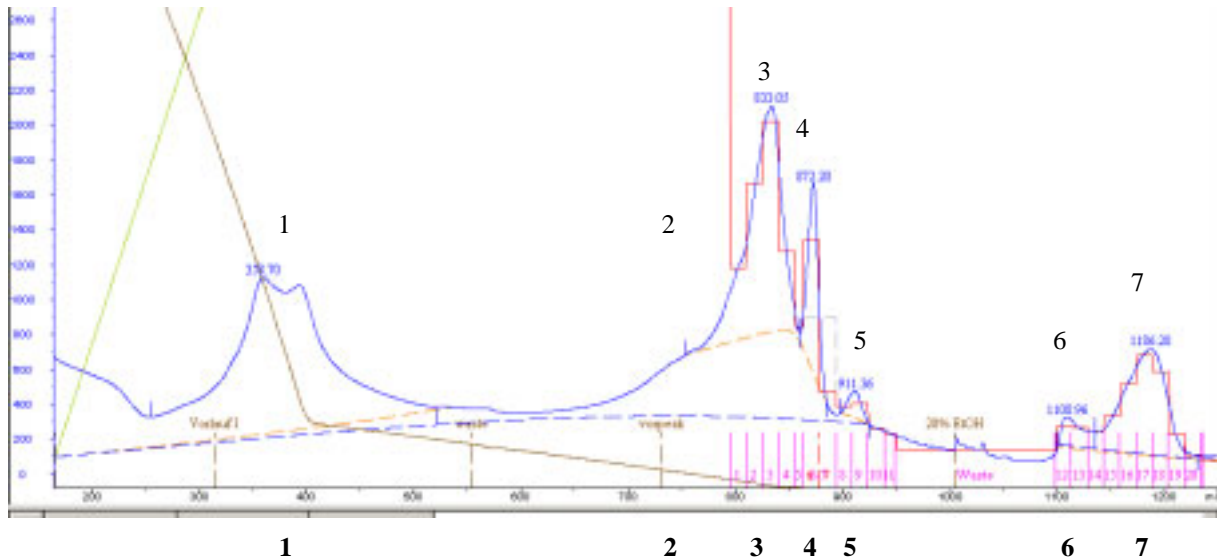
Die Zellbestandteile wurden durch eine Zentrifugation des Fermentermediums und eine anschließende Filtration über eine Filterfritte erreicht. Die Lipase verbleibt im Medium.

#### *7.1.2.2 Hydrophobe Interaktions-*

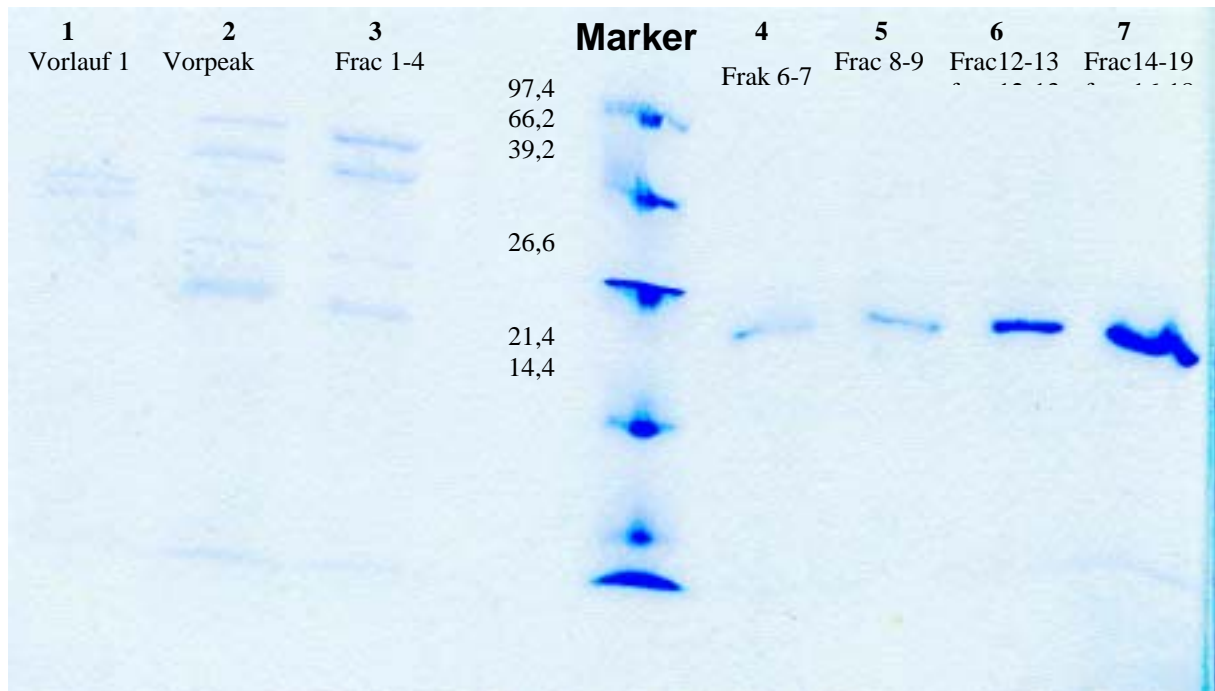
##### *Chromatographie über TSK-butyl*

Der Fermenterüberstand wird mit 1 M NaCl versetzt und einer hydrophoben Interaktions-Chromatographie (HIC) unterworfen. Als Säulenmaterial wurde tert-Butyl-sepharose (Toyo<sup>®</sup> TSK-Butyl 650 M) verwendet. Das Säulenmaterial wurde mit 1 M NaCl äquilibriert und anschließend die Lipaselösung aufgetragen. Ungebundenes Material wurde mit 1 M NaCl ausgewaschen. Die Lipase konnte mit einem Gradienten von 1 M NaCl zu reinem Wasser eluiert werden. Die noch am Material gebundene Lipase konnte mit 20 % Ethanol eluiert werden. Der Verlauf der Elution ist im Diagramm 7.6 dargestellt. Insgesamt wurden aus 10 l Fermenterüberstand ca. 10 mg Lipase isoliert.

Die so erhaltene Lipaselösung wurde bei 6°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.



**Diagramm 7.6:** Elutionsdiagramm der Enzymreinigung von BPL F142W über TSK-butyl. Die Absorption bei 280nm wurde kontinuierlich aufgezeichnet (blaue Kurve). Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 1M NaCl zu 0,1M NaCl und zu reinem Wasser (braune Kurve). Ab einem Volumen von 1000ml wurde mit 20 % EtOH die gebundene Lipase eluiert. Insgesamt wurden 20 Fraktionen gesammelt (magenta markiert). Die mit 1-7 markierten Banden wurden über das in Abb 7.5 gezeigte SDS-Gel charakterisiert.



**Abb. 7.5:** SDS- Page (10 % Polyacrylamid, Coomassie) der Enzymreinigung von BPL F142W über TSK-Butyl Auftrag : je 5 µl Protein-Lösung + 10 µl SDS Probenpuffer, Marker Roche, 10 µl (10 µg pro Protein).

## 7.2 Enzymkinetik

Die im Kapitel 5.2 für die CaL B beschriebenen Methoden konnten auch für die Bestimmung der kinetischen Parameter der *Burkholderia plantarii* eingesetzt werden.

### 7.2.1 Michaelis-Menten-Kinetik

Die steady-state-Parameter für das verwendete p-Nitrophenolat wurden bei 25 °C mit 10 % Acetonitril, 25 mM Tris pH 7,5 10 mM CaCl<sub>2</sub>, wie bereits in Kapitel 5.2 für die CaL B gemessen.

	$K_M$	$V_{max}$
	mM p-NPA	Ans 405/min
BpL	0.167 ± 0.036	0.080 ± 0.0056

### 5.2.2 Lösungsmittelabhängigkeit

Zur Bestimmung des Einflusses organischer Lösungsmittel auf die Aktivität von Lipasen wurde die Hydrolyse von p-Nitrophenyl-Acetat in wässrigen Lösungsmittelgemischen untersucht. Die Konzentration der untersuchten Lösungsmittel variierte zwischen 5 % und 40 %. (Volumenprozent)

Die Aktivitätsbestimmung wurde für BpL und die Mutante BpL F142W für die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Lösungsmittel bestimmt. Die Tabelle ist nach zunehmender Inhibierung geordnet.

BpL	IC 50 % Lsgm.	Fehler	IC 50 mM	Fehler
Methanol	17	0.29	6.74	0.12
Ethanol	14.2	1.00	3.93	0.28
Acetonitril	10.6	0.78	3.30	0.24
Aceton	14.1	0.76	3.07	0.17
iso-Propanol	12	0.64	2.54	0.14
THF	11.1	0.46	1.73	0.07
Dioxan	14.1	0.81	1.55	0.09

BpL F142W	IC 50 % Lsgm.	Fehler	IC 50 mM	Fehler
Acetonitril	11.2	1.17	3.48	0.36
Aceton	15.3	0.95	3.33	0.21
Ethanol	11.9	0.9	3.29	0.25
Methanol	7.9	2.09	3.13	0.83
Dioxan	18.4	0.9	2.02	0.10
THF	11.8	0.6	1.84	0.09
iso-Propanol	5.5	0.63	1.16	0.13

### 7.2.3 Aktivierung durch Detergenzien

Analog zu der oben beschriebenen Aktivitätsbestimmung unter Zugabe von organischen Lösungsmitteln wurde der Einfluss von Detergenzien auf die Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat untersucht.

Für die BpL war keine Aktivierung durch die Anwesenheit der nichtionischen Detergenzien Triton X 100 und  $\beta$ -Octyl-glycopyranosid festzustellen. Die Zugabe beliebiger Konzentrationen von Triton X 100 im Bereich von 0,01-0,5 % führte zu einer Verringerung der Aktivität um den Faktor 10,  $\beta$ -Octyl-glycopyranosid zeigte keinen Einfluss.

## 7.2.4 Burst-Kinetik

Um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Ester- bzw. Amidspaltung durch Lipasen zu bestimmen, wurden für die BpL Stopped-Flow-Experimente der Hydrolyse von verschiedenen Modellsubstraten mit einer Zeitauflösung von 1 msec bis 100 sec durchgeführt, wie bereits für die CaL B in Kapitel 5.2 beschrieben wurde. Für die untersuchten Bedingungen konnte für keines der verwendeten Substrate ein initialer "Burst" oder initialer "Lag" in der "pre-steady-state"-Kinetik für die Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden. Die ebenfalls untersuchte BpL-Mutante F142W zeigte keine signifikanten Unterschiede im Reaktionsverlauf; es konnte kein initialer "Burst" oder "Lag" festgestellt werden.

Wie in der Einleitung in Abschnitt 2.5.2 ausgeführt wurde, kann damit ausgeschlossen werden, dass die Deacylierung des Acyl-Enzyms unter den untersuchten Reaktionsbedingungen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der lipasekatalysierten Hydrolyse ist. Da auch kein "initial Lag" beobachtet wurde, ist unwahrscheinlich, dass die Substratbindung bzw. ein vorhergehender Isomerisierungsschritt wie z.B. die Überführung der Lipase vom geschlossenen in den offenen Zustand der Lipase geschwindigkeitsbestimmend ist.

## 7.2.5 Fluoreszenzuntersuchung der BpL F142W

Die Mutante F142W der *Burkholderia plantarii* Lipase enthält ein zusätzliches Tryptophan in der "Lid-Region" (siehe auch Kapitel 7.4 Röntgenstruktur der BpL Mutante F142W).

Durch die Mutation in der "Lid"-Region sollte es ermöglicht werden, die Konformationsänderung des Deckels der Lipase von der geschlossenen in die offenen Konformation der "Lid"-Helix durch eine Änderung im Fluoreszenzspektrum beim Übergang vom Trp142 in eine solvensexponierte Lage (Aung *et al.*, 2000) in der offenen Konformation zu beobachten. Untersuchungen des Fluoreszenz-Emissionsspektrums zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtypenzym. Das Fluoreszenz-Emissionsspektrum bei der Anregungswellenlänge von 280nm wird durch die Anwesenheit eines zusätzlichen Tryptophanrings nicht ausreichend verändert. Die Gesamtfloreszenz verändert sich durch das Einbringen eines zusätzlichen Tryptophans nicht, da bereits 3 Tryptophanreste und 10 Tyrosinreste im Wildtypenzym vorhanden sind. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass sich die Konformation des Enzyms in Lösung in der Umgebung dieser 3 Tryptophane im Vergleich zum Wildtyp durch die Mutation nicht verändert hat. Einen Ansatz, die Veränderung der Fluoreszenz des zu beobachten, wäre daher das Einbringen von zusätzlichen Mutationen, um die im Wildtypenzym vorhandenen Tryptophanreste gegen nichtfluoreszierende Phenylalaninreste auszutauschen, so dass nur das gewünschte Trp142 im Enzym vorhanden ist. Diese Strategie konnte bereits erfolgreich mit einer anderen Lipase für Untersuchungen der Fluoreszenzlebensdauer-änderung eines Tryptophanrestes in der "Lid"-Region beim Übergang in die offene Konformation angewandt werden (Zhu, Jutila & Kinnunen, 2000; Zhu *et al.*, 2001a).

### 7.3 Kovalente Inhibition von BpL

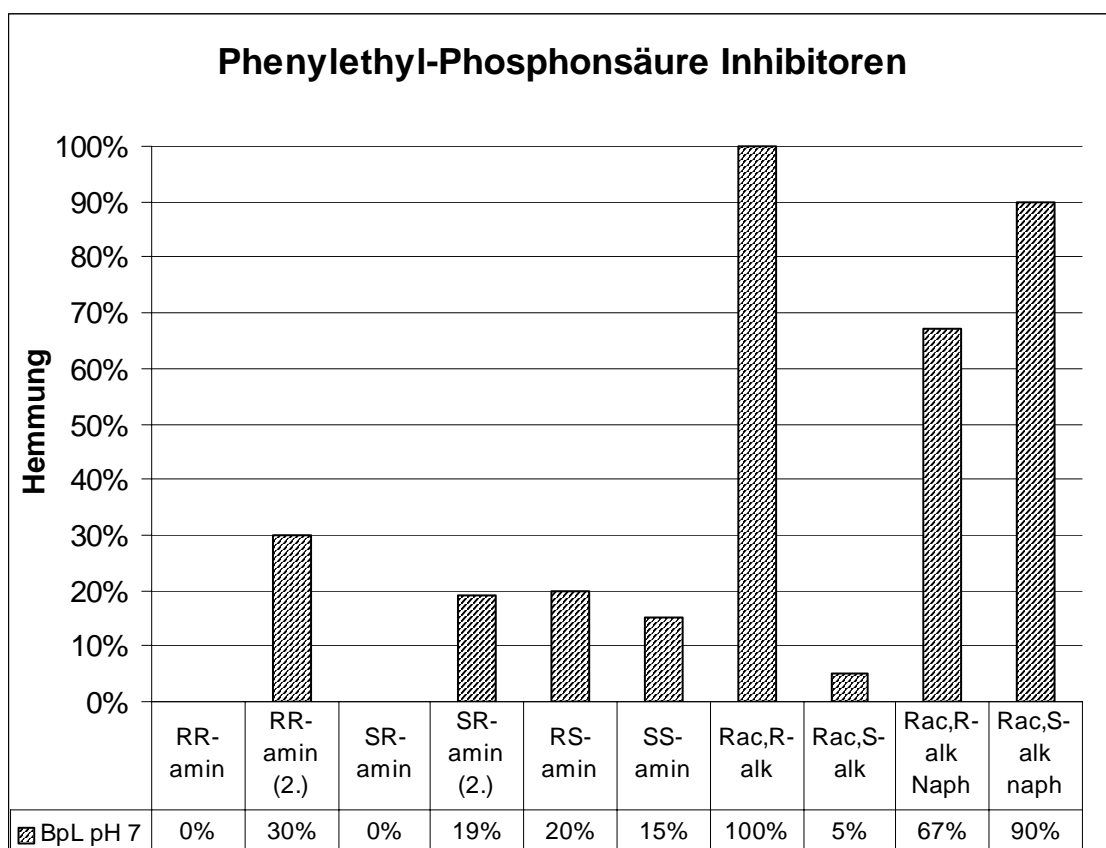
Die im Kapitel 5.3. beschriebenen Phosphon-Inhibitoren wurden nach dem gleichen Protokoll ebenfalls zur Inhibition der *Burkholderia plantarii* Lipase eingesetzt.

Es zeigte sich, dass die Geschwindigkeit der Inhibierungsreaktion von der Stereochemie des Inhibitors abhängt. Im Inhibitor liegen zwei Stereozentren vor, eines am Phosphor und ein zweites im Amid-bzw. Alkoholrest. Im Fall der Alkohole konnten die Diastereomergemische nicht getrennt werden und es wurden am Phosphor racemische Gemische eingesetzt. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass, wie im Kapitel 5.3 gezeigt, nur das Diastereo-

mer mit Sp-Konfiguration aus dem Gemisch mit dem Enzym reagiert.

Nur die Diastereomergemische mit racemischer Konfiguration am Phosphor und R-Konfiguration des Phenylethylalkohol-rests waren in der Lage, das Enzym vollständig zu inhibieren. Die Phenylethylamid-Inhibitoren zeigten nur schwache Inhibierung, wie im Diagramm 7.6 dargestellt ist.

Inhibitoren mit Naphtylamin reagieren in 24 h nicht vollständig mit dem Enzym und es wurde keine Abhängigkeit von der Stereochemie des Alkohol-Rests beobachtet.



**Diagramm 7.6:** Ergebnisse der Inhibierung von BpL bei pH 7 in Abhängigkeit von der Stereochemie der diastereomeren Inhibitoren. Nach maximal 24h konnte die Lipase nur von Inhibitoren mit S<sub>c</sub>-Konfiguration am Phenylethylalkohol vollständig inhibiert werden. (0% = nicht detektiert)

## 7.4 Röntgenstruktur der BpL Mutante F142W

In dieser Arbeit ist es gelungen, Röntgenstrukturen einer Mutante (F142W) der *Burkholderia plantarii* Lipase in der geschlossenen Konformation zu bestimmen.

### 7.4.1 *Burkholderia plantarii* Lipase F142W

Die Mutante F142W war die erste Lipase aus dem rekombinanten Wildtypstamm, die in ausreichenden Mengen fermentiert, gereinigt und kristallisiert werden konnte.

Die Struktur des am DESY (Beamline BW7 des EMBL) aufgenommenen Datensatzes konnte bis zu einer Auflösung von 4,0 Å vermessen werden. Die Struktur der nativen Lipase wurde aus Kristallen in der Raumgruppe C2 mit der Methode des molekularen Ersatzes durch eine bekannte Modellstruktur der BpL in der Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> (1tah) mit dem Programm CNS gelöst.

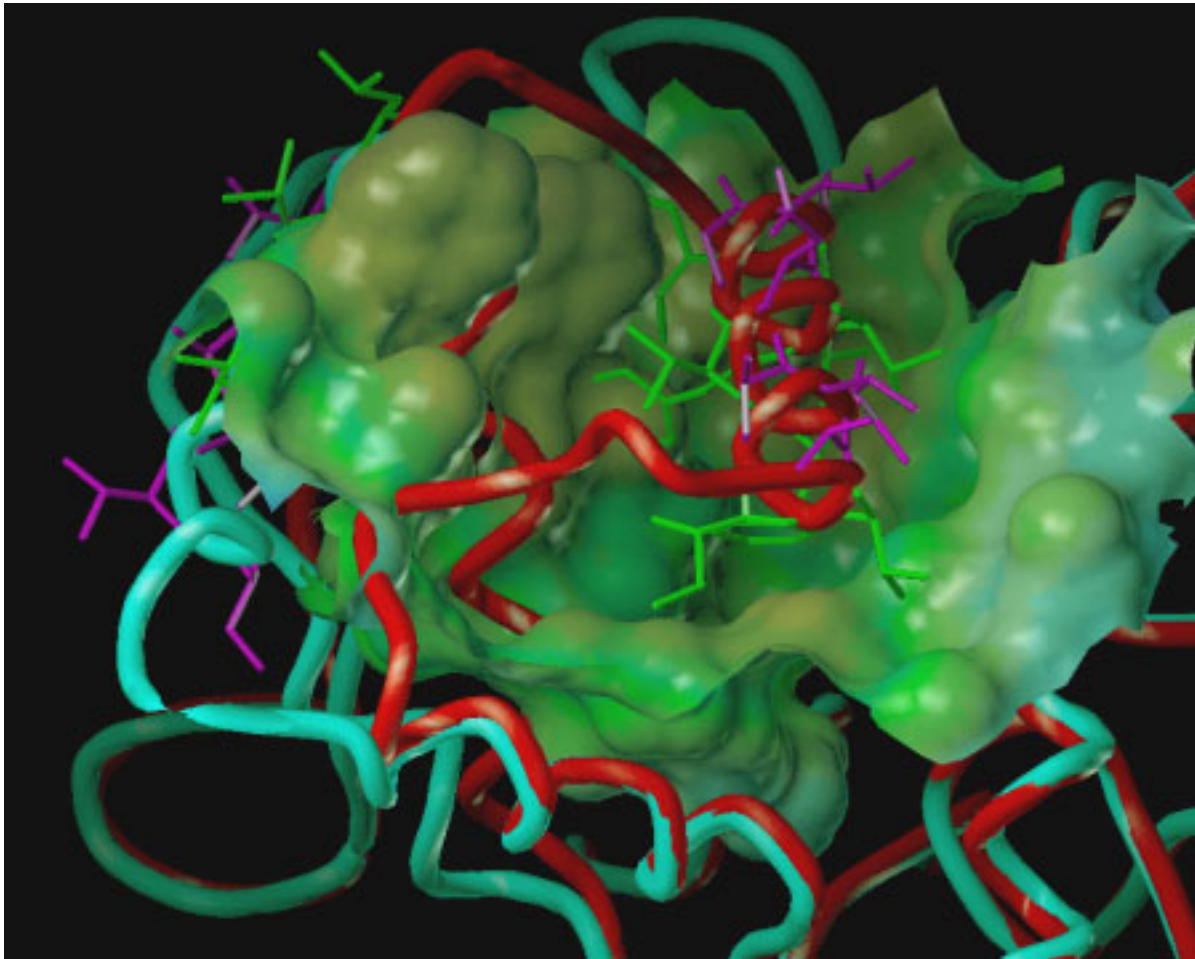
In der Einheitszelle befindet sich ein Dimer aus zwei, leicht unterschiedlichen Lipasemonomeren. Die Mittelungen aufgrund einer nichtkristallographischen Symmetrie erbrachte aber keine Verbesserung des Modells. Zur weiteren Verbesserung der initialen Phasen wurde eine Maske mit den Modellkoordinaten generiert, um durch die Kombination aus den Modellphasen und den experimentellen Phasen eine verbesserte Elektronendichte zu erhalten.

Die Kristallstruktur der Mutante F142W zeigt

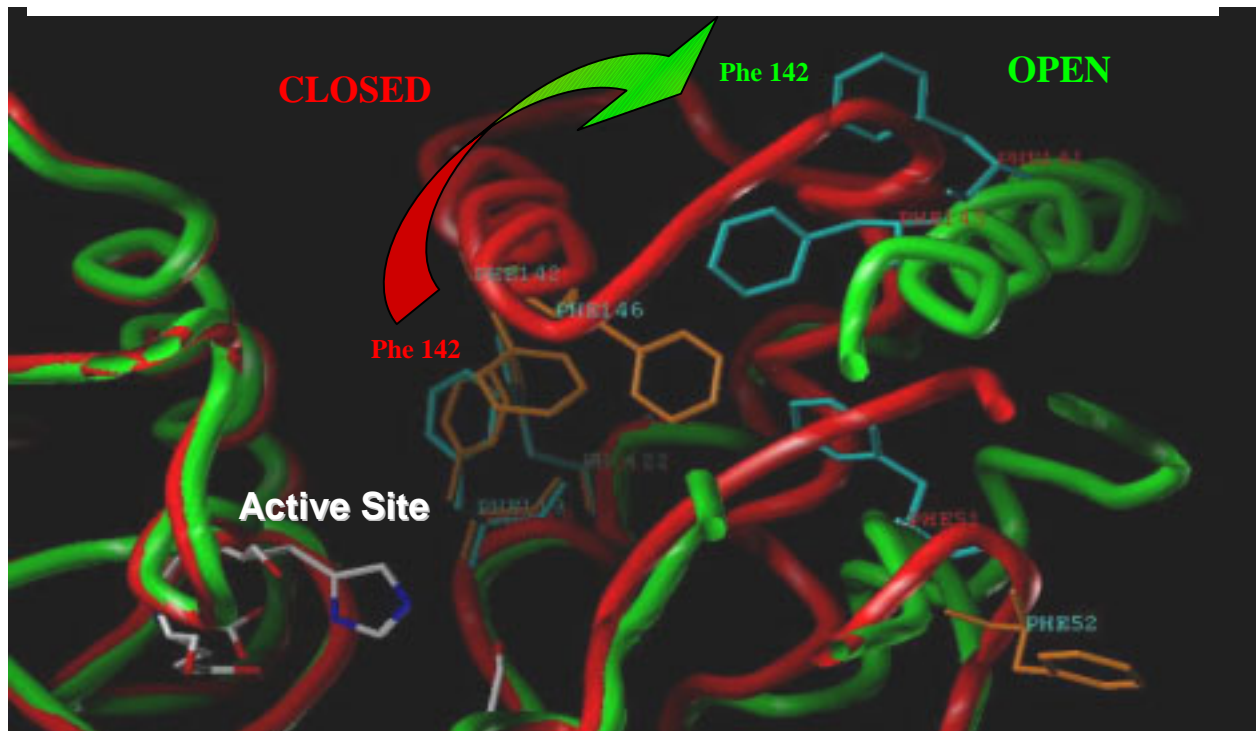
gute Übereinstimmung mit der bereits bekannten Struktur des Wildtyps (Abbildung 7.10a). Die Mutation in der "Lid Helix" hat keinen Einfluss auf das  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Faltungsmuster. Es wurde, analog zum Wildtyp, die geschlossene Konformation erhalten.

Statistik	BpL F142W DESY
Auflösung (Å)	30-4,0
Wellenlänge (Å)	0,90497
Raumgruppe	C2
Zellparameter (Å)	168.260 42.240 123.180
(°)	90 92,4 90
Gesamzahl beob. Reflexe	80552
Gesamzahl symmetrie-unabh. Reflexe	7526
Vollständigkeit (%) insgesamt	99,6
äußere Schale	98,9
R <sub>sym</sub> -Faktor insgesamt	22,6
äußere Schale	34,6
R-Faktor	38,1
RMS der Bindungslängen	0,011
RMS der Bindungswinkel	1,995
Zahl der Wassermoleküle	0

Die Unterschiede zum Wildtyp werden durch kleine Änderung der Kristallkontakte in der neuen Raumgruppe C2 der Mutante im Vergleich zu P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> im Wildtyp bedingt. Der Erfolg der Mutation kann durch die Differenzelektronendichte an der Aminosäureposition 142 identifiziert werden. Der Einfluss der Mutation auf die lokale Geometrie der "Lid"-Region ist nur gering. Die Elektronendichte der solvensexponierten Seite der "Lid"-Helix von AS 151-160 ist jedoch nur sehr schlecht definiert und diese Aminosäuren scheinen einen reduzierten Ordnungsgrad zu besitzen.



**Abb. 7.8:** Lage der "Lid"-Helix in der geschlossenen Kristallstruktur der BpL Mutante F142W (rot). Das aktive Zentrum wird durch die "Lid"-Helix vollständig ausgefüllt. Zur Orientierung ist die lösungsmittelzugängliche Oberfläche des Bindetasche aus der offenen Struktur von PcL (2lip, grün). eingezeichnet.



**Abb. 7.9:** Lokale Umgebung des Phe142 in der geschlossenen und offenen Konformation der BpL. Durch die Rotation der "Lid"- Helix wird der Rest Phe 142 an die Oberfläche des Proteins gebracht.



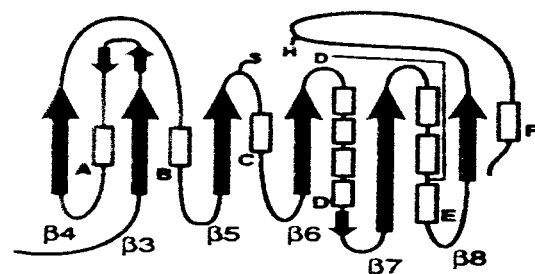
Durch die insgesamt sehr schlechte Auflösung und einen sehr hohen R-Faktor von 38 % nach der Verfeinerung ist die Aussagekraft dieser Struktur im Detail als gering einzuschätzen. Da es sich im Kristall um die geschlossenen Konformation handelt, können keine Aussagen über die Bindetasche des aktiven, offenen Enzyms getroffen werden.

## 7.5 Homologiemodellierung

Die Röntgenstruktur der *Burkholderia plantarii* Lipase ist in Oxford im Labor von Louise Johnson (Noble *et al.*, 1993) gelöst worden. Die "Lid"-Helix zeigt in dieser Röntgenstruktur eine geschlossene, katalytisch inaktive Konformation. Die in der vorliegenden Arbeit gelöste Struktur der Mutante F142W zeigt ebenfalls die geschlossene Konformation. Für die Betrachtung der Protein-Ligand-Wechselwirkungen ist jedoch die Geometrie der Aminosäuren in der offenen, aktiven Konformation nötig. Um dennoch Einblicke in eine mögliche Geometrie der Bindetasche in der offenen Konformation zu erhalten, bietet sich die Homologiemodellierung der auf der Basis der Röntgenstruktur hinreichend ähnlicher Proteine in der offenen Konformation an. Wie in der Einleitung im Kapitel 2.6 ausgeführt wurde, konnte die Kristallstruktur einer bakteriellen Lipase der Lipase-Klasse I.2 von *Pseudomonas cepacia* (PcL) in der offenen Konformation gelöst werden (Kim *et al.*, 1997; Schrag *et al.*, 1997). Diese Lipase zeigt eine bemerkenswerte Sequenzhomologie von 84 % mit BpL und die Überlagerung der Proteinstrukturen (siehe Einleitung Abbildung 2.12)

verweist mit Ausnahme der "Lid"-Region auf gute Übereinstimmung im  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungsmuster.

Neuere Untersuchungen konnten die Struktur der offenen PcL auch im Komplex mit verschiedenen, kovalent gebundenen Triacylglycerol-Inhibitoren (Lang *et al.*, 1998) oder chiralen sekundären Alkohol-Phosphonat-Inhibitoren (Luic *et al.*, 2001) lösen. Kürzlich ist die Struktur einer weiteren homologen Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* (PaL) im Komplex mit einem Triacylglycerol veröffentlicht worden (Nardini *et al.*, 2000). Diese Lipase gehört jedoch zu der Klasse I.1 der bakteriellen Lipasen. Sequenzvergleiche mit FASTASAS zeigen eine Homologie von 41 % mit BpL. Die Länge der Aminosäurekette ist mit 284 Aminosäuren in dieser Lipase deutlich geringer, so dass nicht alle Bereiche des Faltungsmusters überlagert werden können. Es fehlen die  $\beta$ -Faltblattbereiche  $\beta_3$  und  $\beta_4$  und die  $\alpha$ -Helix E im kanonischen  $\alpha/\beta$  Hydrolase Faltungsmuster (Abbildung 7.12). Auf der Grundlage dieser Röntgenstrukturen von zwei homologen Lipasen (PcL, 5lip und PaL, 1ex9) in der offenen Konformation mit gebundenem Inhibitor wurde versucht, ein Homologiemodell der offenen Form von BpL zu erstellen.



**Abb. 7.12** : Kanonisches  $\alpha/\beta$  Hydrolase Faltungsmuster für bakterielle Typ I.2 Lipasen

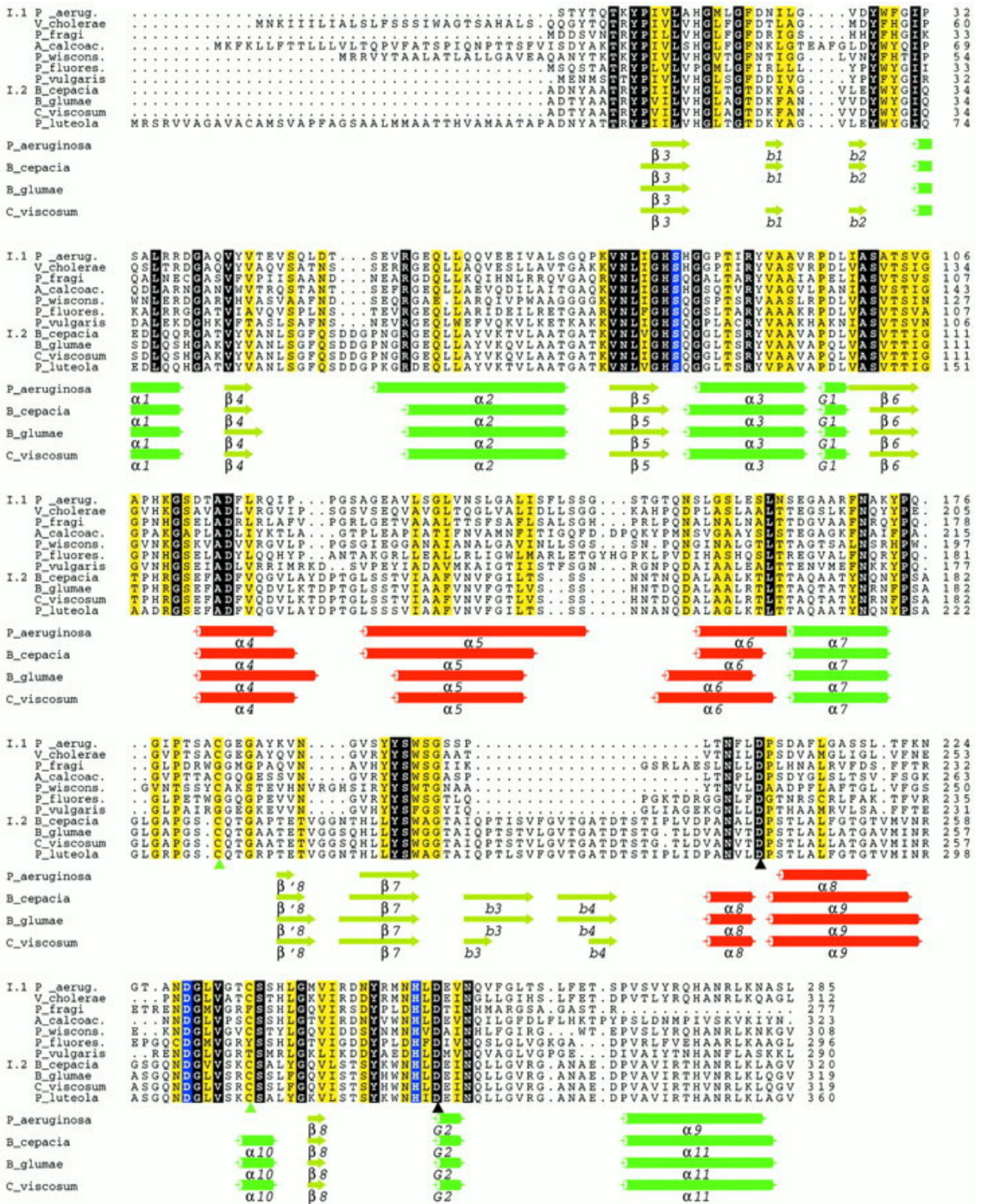


Abb. 7.13: Sequenzalignment bekannter bakterieller Lipasen der Klasse I.1 und I.2. Dunkel hervorgehoben sind identische Aminosäuren (blau = katalytische Triade), gelb unterlegt konservierte Austausche von ähnlichen Aminosäuren. Für Lipasen mit bekannter Röntgenstruktur sind zusätzlich die Sekundärstrukturen annotiert. (aus Nardini et al. 2000)

### 7.5.1 Homologiemodellierung mit MODELLER 4

Aufgrund der hohen Homologie und des strukturell abgesicherten Sequenzalignment (Abbildung 7.15) war es möglich, ein Strukturmodell für die BpL in der offenen Konformation zu erstellen.

Es zeigte sich jedoch, dass MODELLER in der Version 4 nicht in der Lage war, die Aminosäuren korrekt auf das Faltungsmuster abzubilden. Visuelle Analyse der Homologiemodelle zeigte, dass die Probleme in der korrekten Modellierung von Schleifen auf der Oberfläche der Lipase auftraten. Das Programm MODELLER in der Version 4 benötigte zum Aufbau von zwei Loops jeweils eine Aminosäure mehr, und begann das jeweils nächste Strukturelement mit einem Versatz um eine Aminosäureposition. Das mit MODELLER 4 erstellte Homologiemodell erwies sich durch diesen "Frameshift" als gänzlich unbrauchbar für die Modellierung der Bindetasche in der offenen Konformation.

### 7.5.2 Manuelle Homologiemodellierung

Da mit dem zum Beginn der Arbeit verfügbaren Programm MODELLER 4 kein geeignetes Homologiemodell für die BpL erhalten werden konnte, wurde durch die manuelle Überlagerung mit den homologen Proteinen (PcL, 5lip und PaL, 1ex9) unter Verwendung des Programms O erstellt.

Die offene Konformation des "Lid"-Bereichs

wurde analog zu Geometrien in den homologen Strukturen aufgebaut. Die Konformationen der abweichenden Seitenketten wurden mit der Rotamerbibliothek "LEGO sidechain" erstellt und deren Geometrie mit Hilfe des "REFI zone"-Befehls minimiert. Das so erhaltene Modell wurde für die im folgenden Teil durchgeführte Modellierung der Substratbindung verwendet.

### 7.5.3 Homologiemodellierung mit MODELLER 6

Die Autoren des Programms MODELLER haben Ende 2000 darauf hingewiesen, dass die Probleme bei der Modellierung von "Loop"-Geometrien (Sanchez & Sali, 1997) an der Oberfläche von Proteinen durch die Verwendung verbesserter Bibliotheken behoben werden konnten (Fiser, Do & Sali, 2000). Daher wurde zum Ende dieser Arbeit nochmals versucht, ein Homologiemodell durch die automatische Modellierung mit dem Programm MODELLER 6a zu erstellen.

Die Homologiemodellierung wurde mit identischen Sequenzalignment und unter Verwendung von Standardparametern durchgeführt. Die so erhaltenen Homologiemodelle zeichneten sich durch die korrekte Wiedergabe der Geometrie aus den Kristallstrukturen der homologen Proteine in den kritischen "Loop"-Bereichen aus. Das aktive Zentrum konnte zufriedenstellend modelliert werden.

Die Überlagerung der Bindetasche des manuell unter Berücksichtigung des in der Referenzstruktur gebundenen Liganden aufgebaut

ten Homologiemodells zeigt noch bestehende Limitierungen der Homologiemodellierung. Die Seitenketten der Aminosäuren in der Bindetasche wurden von der im Programm MODELLE implementierte Version des CHARMM-Kraftfelds so ausgerichtet, dass der Platz in der als leer angenommene Bindetasche bestmöglich ausgefüllt wird. Die so modellierte Bindetasche ist daher nicht optimal geeignet, um die Umgebung eines möglichen Liganden zu beschreiben.

Dieses prinzipielle Problem lässt sich nur durch einen kombinierten Ansatz umgehen, der automatisch sowohl Protein- als auch Ligandinformation bei der Homologiemodellierung berücksichtigen kann (Schafferhans & Klebe, 2001).

## 7.6 Strukturbasierte fokussierte Mutagenese von BpL

### 7.6.1 Rationale Auswahl relevanter Aminosäuren

Das modellierte Strukturmodell der *Burkholderia plantarii* Lipase in der offenen Konformation wurde verwendet, um die möglichen Wechselwirkungen einzelner Aminosäureseitenketten mit potentiellen Substratmolekülen zu untersuchen.

Die strukturelle Untersuchung der Aminosäuren im Hinblick auf ihre Orientierung zum aktiven Zentrum der BpL hebt interessante Positionen in der Umgebung des Alkohol- bzw. des Acylrestes des Substrats in der Bindetasche hervor. Zusätzlich wurden bekannte Aminosäurepositionen im "Lid"-Bereich aus Ergebnissen der gesteuerten Evolution einer homologen Lipase (PaL, (Liebeton *et al.*, 2000)) hinzugenommen.

Basierend auf Sequenzalignments und der Strukturüberlagerung aller Lipasen mit bekannter Raumstruktur in offener Konformation mit gebundenem Inhibitor aus der PDB (Tabelle 2.1) wurde das aktive Zentrum der Lipasen mit bekannter Raumstruktur verglichen. Zusätzlich wurden die beiden Komplexstrukturen der CaL B verwendet. Die Überlagerung erfolgt mit Hilfe der drei hochkonservierten Aminosäuren der katalytischen Triade im Programm SYBYL.

Die Substitutionsmuster der Acyl-Bindetasche und der Stereospezifitätstasche in der Alkohol-Binderegion in einer Vielzahl Lipasen wurden im Hinblick auf die Substraterkennung und die mögliche Differenzierung der Substratspezifität ausgewertet. Besonderes Augenmerk wurde auf Positionen gerichtet, die im Sequenzalignment (Abb. 7.13) über verschiedene Lipasen wenig konserviert sind. Durch die Analyse der Daten aus einer Vielzahl verwandter Lipasen erscheint es unwahrscheinlich, dass die Stabilität dieser Enzyme durch Mutationen an diesen Positionen stark beeinträchtigt wird, da diese Aminosäurepositionen nicht über alle

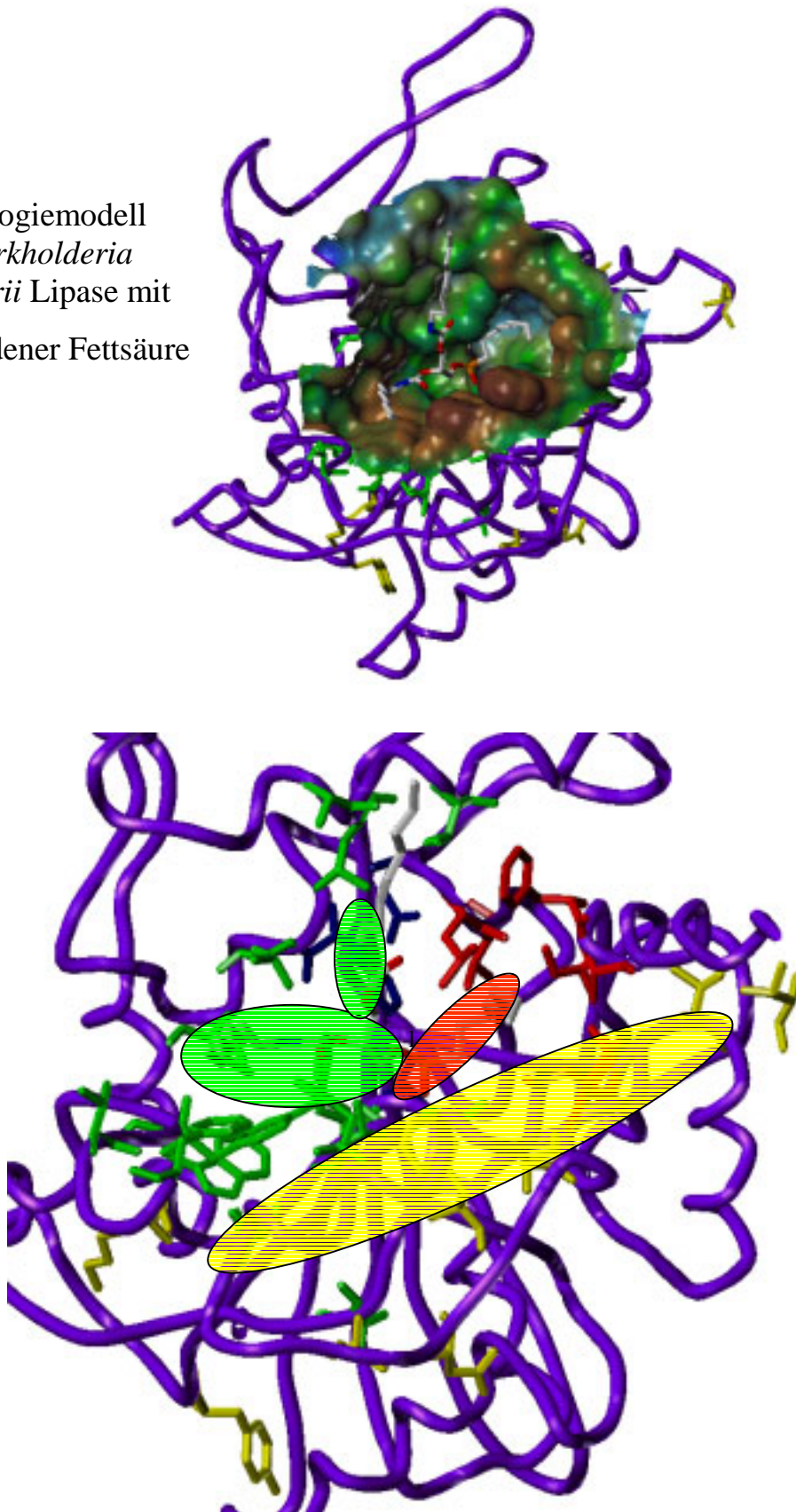
bekanntesten Lipasen konserviert sind. Sie sollten daher für eine Differenzierung der Substratspezifität mögliche Angriffspunkte darstellen. In der hochkonservierten Säure-Bindetasche wurden die Aminosäuren so ausgewählt, dass es durch den Austausch möglich sein sollte, Lipasen auch für nichtgeradkettige Säuren als potentiell Substrate masszuschneiden. Nach den oben beschriebenen Auswahlkriterien wurden die in der folgenden Tabelle markierten Aminosäurepositionen als besonders kritisch für die Substraterkennung und Bindung ausgewählt.

	a	aA A	aA A AA		A	a
1	ADTYAATRY <b>P</b>	VILVHGL <b>LAGT</b>	<b>DKFANVVDYW</b>	YGIQSDLQSH	GAKVYVAN <b>LS</b>	<b>GFQ</b> SDDGPNG
			A			a aa
61	RGEQLLAYVK	QVLAATGATK	<b>VN</b> LIGHSQGG	LTSRYVAAVA	PQLVASVT <b>TI</b>	<b>GTPHR</b> GSEFA
		l	A	l l l	la a l	
121	DFVQDVLKTD	PT <b>GL</b> SSTVIA	AFVNV <b>F</b> GTLV	SSSH <b>NTDQDA</b>	<b>LAALRTLT</b> TA	QTATYNRN <b>FP</b>
181	SAGLGAPGSC	QTGAATETVG	GSQHLLYSWG	GTAIQPTSTV	LGVTGATDTS	TGTLDVANVT
	AA A		aa		A A	
241	DPSTL <b>ALLAT</b>	GAVMINRASG	QND <b>GLV</b> SRCS	SLFGQVISTS	YHWNHLDE <b>IN</b>	QLLGVRGANA
301	EDPVAVIRTH	VNRLKLQGV				

**Tab. 7. 5:** Strukturbasierte Auswahl der 31 Aminosäureposition zur Mutagenese aus der Sequenz von BpL.

Klassifizierung : A=Alkohol-Bindetasche, a=acyl-Bindetasche, l="Lid"-Region

Homologiemodell  
der *Burkholderia*  
*plantarii* Lipase mit  
gebundener Fettsäure



**Abb. 7.15:** Strukturbasierte Auswahl von 31 Aminosäurepositionen zur fokussierten Mutagenese  
oben : Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums;  
unten: Detailansicht der ausgewählten Aminosäuren;

grün: Alkohol-Bindetasche, rot: Acyl-Bindetasche, gelb: "Lid"-Region

## 7.6.2 Auswahlstrategie für substratspezifisch fokussierte Mutationen

Anhand der vorgeschlagenen Positionen wurde eine fokussierte Mutagenese erprobt, um die BpL für ein bestimmtes Substrat maßzuschneidern. Im Gegensatz zur ungerichteten Mutagenese kann durch eine rationale Auswahl der Aminosäuren die Zahl der möglichen Mutanten stark verringert werden, um eine kombinatorische Explosion der möglichen Mutationsvarianten zu vermeiden. Bereits für ein Protein mit 200 AS gibt es mehr Möglichkeiten die Sequenz aus den 20 proteinogenen Aminosäuren aufzubauen, als Atome im Universum zur Verfügung stehen. Da es für die 31 ausgewählten Aminosäuren aber rechnerisch immer noch  $20^{31}$  Möglichkeiten gibt, mußte die Zahl der relevanten Positionen möglicher Austausch weiter eingeschränkt werden.

Zur Auswahl der interessantesten Aminosäurepositionen in der Alkohol- und der Acyl-Bindetasche wurde der tetrahedrale Komplex des jeweiligen Substrats mit dem Homologie-modell der BpL unter Verwendung des Programms MOLOC aufgebaut und mit dem Kraftfeld MAB minimiert. Die Startgeometrie des kovalent am Ser87 gebundenen, tetrahedralen Intermediats wurde auf der Basis der experimentellen Strukturen von Lipasen mit tetrahedralen Phosphonat-Inhibitoren manuell aufgebaut.

Aminosäuren, deren Austausch die katalytische Aktivität erhöhen sollen, betreffen die Umgebung der Oxyanion-Höhle, die essentiell

zur Stabilisierung des negativ geladenen tetraedrischen Intermediats beiträgt.

Mit Hilfe dieses Modells der Substratbindung im vermuteten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (siehe Kapitel 7.2.4) wurden für jede der 31 ausgewählten Aminosäurepositionen die zu erwartenden Wechselwirkungen mit dem jeweiligen Substrat qualitativ abgeschätzt. Aus dieser Betrachtung resultierte dann für jedes Substrat eine Priorisierung der auszutauschenden Aminosäuren. So konnte die Zahl der Möglichkeiten an jeder individuellen Position unter Berücksichtigung der Ladung, des lokalen Wasserstoffbrückennetzes und des zur Verfügung stehenden Raums weiter eingeschränkt werden.

Die so aus den 31 betrachteten Aminosäuren ausgewählten Reste im Hinblick auf substratspezifisch fokussierte Mutationen befinden sich direkt in der relevanten Bindetasche für das jeweilige Substrat oder sind an der Positionierung dieser Seitenketten beteiligt.

Ein weiterer Ansatz ist die Auswahl von Aminosäuren, die aufgrund ihrer Position am Deckel über dem aktiven Zentrum die Beweglichkeit dieses Strukturelements erhöhen und damit potentiell die offene, katalytisch aktive Konformation begünstigen. Es ist zu vermuten, dass dieser Aktivierungsschritt durch die Deckelbewegung unabhängig von der Stereochemie des Substrats ist und daher kaum diskriminierend für die Stereoselektivität sein kann. Somit kann die Selektivität allein dadurch erhöht werden, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt durch die gesteigerte Mobi-

lität des Deckels weg von diesem Schritt zur Bindung des Substrats bzw. der Ausbildung des tetrahedralen Intermediats als geschwindigkeits- bzw. selektivitätsbestimmenden Schritt verschoben wird.

### 7.6.2.1 Mutanten zur Aktivitätssteigerung gegenüber Phenyllessigsäure-Estern

Phenyllessigsäure-Ethylester sind typische Substrate von Esterasen und werden von Lipasen nicht gespalten, da die Säurebindetaschen der Lipasen zu klein sind, um den aromatischen Phenylrest des Phenyllessigsäure-Ethylesters aufzunehmen. Der Ethylrest ist zu kurz, um stabilisierende Wechselwirkungen mit den flankierenden Aminosäuren der Alkoholbindetasche auszubilden.

Die experimentell bestimmte Aktivität von BpL gegenüber diesem Substrat ist nicht messbar, so dass versucht wurde, mit Hilfe der fokussierten Mutagenese erstmals aktive Mutanten zu generieren.

Daher wurde der Austausch folgender Aminosäuren vorgeschlagen. Die räumliche Lage der Aminosäuren relativ zum Substrat ist in Abbildung 7.16 gezeigt.

BpL WT	Vorschläge Alle AS= x	Varianten		CaLB	PcL (PaL)
		min	max		
L 17	T, A,F	4	4	T 40	T 18
H 86	W Doppel S,T mutante	1	1	W104	
Y 29		3	3	S 47	
F 52	L x	2	20		L→S
S117	A,T ,M x	4	20		
L167	A,V x	3	20		
L265	A,V,M x	4	20		V 266
V266	A,L,M x	4	20		
Zahl der Mutanten		min	max		
		4608	3840000		

Der Austausch von Ser117, Val266 und insbesondere Leu265 und Leu167 gegen Aminosäuren mit kleinerer oder anders verzweigter hydrophober Seitenkette könnte mehr Raum in der Acylbindetasche schaffen, um die katalytisch aktive Konformation des Phenyllessigsäureesters zu stabilisieren. Aktivitätssteigerung könnte durch eine zusätzliche H-Brücke in der Oxyanion-Höhle erzielt werden. Analog zu CaL B könnte durch Thr in der Position 17 eine weitere OH-Gruppe platziert werden, die mit dem negativ geladenen Sauerstoff des Substrats interagiert. Die vorgeschlagene Mutation Leu17Ala sollte der Oxyanionen-Höhle die ausreichende Flexibilität zur Anpassung an das Substrat gewähren, während die Mutation Leu17Phe die Konformation im aktiven Zentrum durch Wechselwirkungen mit dem dahinterliegenden Phe52 stabilisieren könnte. Die Randomisierung der Mutation an der Position 17 in Kombination mit der Position 52 könnte die Wechselwirkung dieser benachbarten Aminosäuren optimieren, um so die Oxyanionen-Höhle optimal an das gegebene Substrat anzupassen.

Eine Doppelmutation der direkt benachbarten His86Trp und Tyr29Ser Reste reduziert das



Volumen der kleinen Alkohol-Bindetasche analog der CaL B unter Erhalt der Wasserstoffbrücke zwischen den beiden Resten. Dadurch sollte eine Stabilisierung des gebundenen Alkohols erreicht werden könnte, und so die Aktivität der Lipase gesteigert werden.

Im Zeitrahmen dieser Arbeit wurden bei der BASF (Labor Dr. M. Matuschek) die Lipase-Mutanten Leu17Ala und Leu167Ala hergestellt und die Aktivität mit dem Esterase-Substrat Phenyllessigsäure-Ethylester in einem pH-Shift Essay qualitativ untersucht (BASF AG, Labor Dr. Hauer). Dabei wurde für den Wildtyp keine, für die Mutante T17A eine geringe und für die Mutante Leu167Ala eine deutliche Aktivität nachgewiesen. Es müssen jedoch noch weitere quantitative Experimente durchgeführt werden, um diese qualitativen Ergebnisse zu verifizieren.

<b>Bp-Lipase</b>	<b>Aktivität</b>	<b>Kontrolle ohne Enzym</b>
<b>WT</b>	--	-
<b>L17A</b>	+	-
<b>L167A</b>	++	-

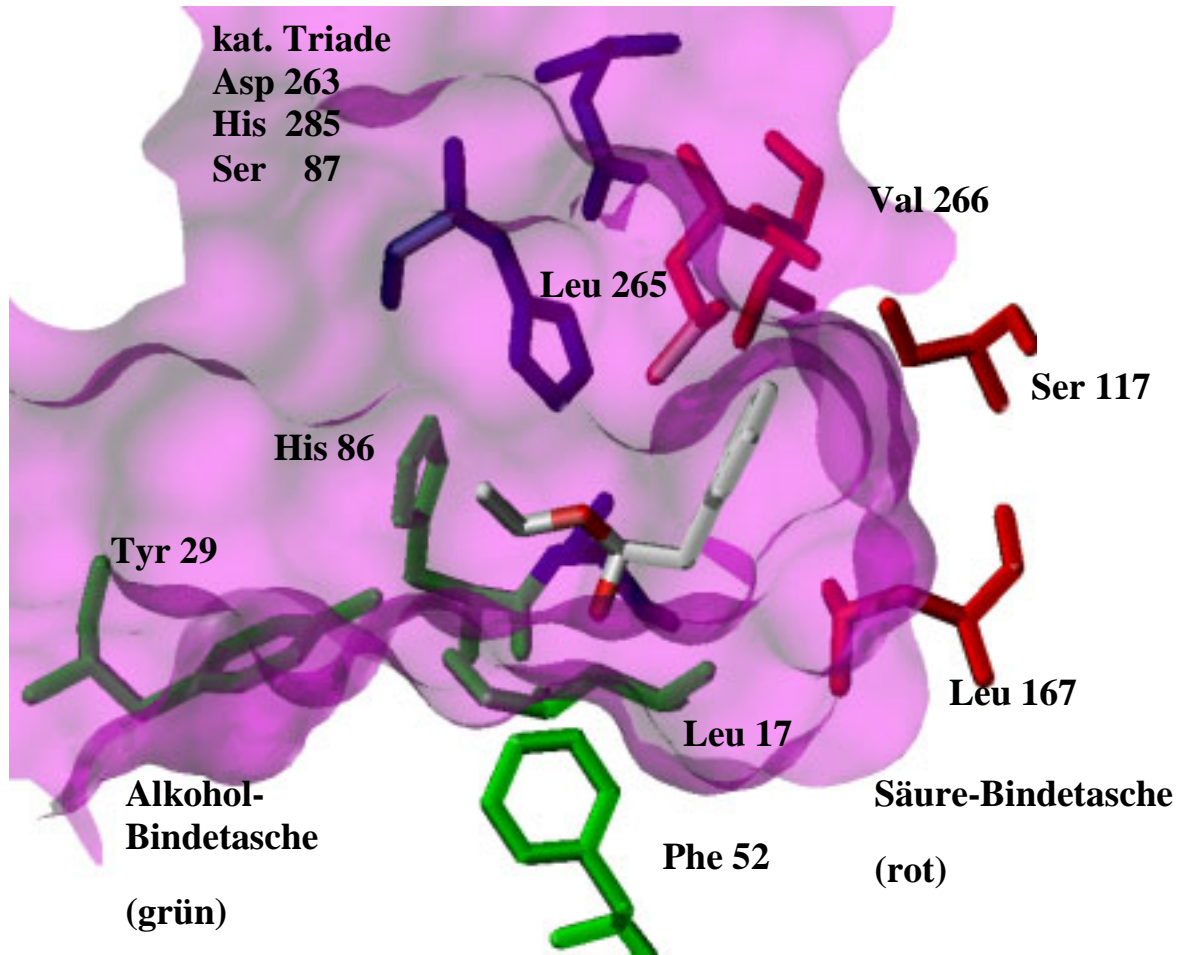


Abb. 7.16: Mutationsvorschläge zur Aktivitätssteigerung gegenüber Phenyllessigsäure-estern

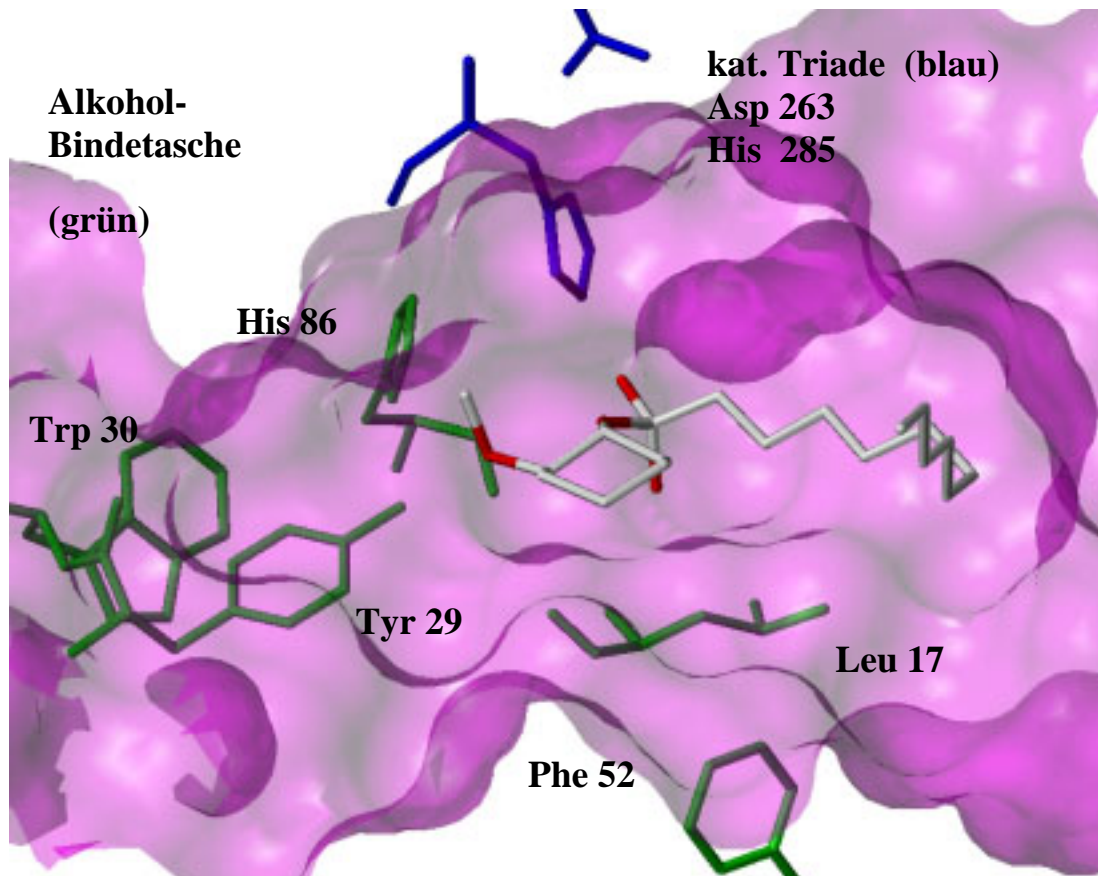


Abb. 7.17: Mutationsvorschläge zur Enantiomerentrennung gegenüber Methoxycyclohexanol

### 7.6.2.2 Mutanten zur Enantiomerentrennung von Methoxycyclohexanol

Die BpL wird von der BASF AG zur kinetischen Racematspaltung von rac-Methoxycyclohexanol mit Vinylaurat als Acylierungsmittel eingesetzt. Ziel war es daher, die Aktivität und die Selektivität des Enzyms zu optimieren. Das Wechselwirkungsmuster zwischen Protein und Ligand erscheint bereits optimal zur Enantiomerentrennung geeignet. Die Modellierung zeigt, dass das 1S,2S-Methoxycyclohexanol in der mit dem MAB-Kraftfeld minimierten Geometrie eine Wasserstoffbrücke zum Tyr29 ausbilden kann. Diese Stabilisierung könnte eine rationale Erklärung für die beobachtete Selektivität für das 1S,2S-gegenüber dem 1R,2R-Methoxycyclohexanol geben.

Es wurden folgende Aminosäuren für eine fokussierte Mutagenese ausgewählt.

BpL WT	Vorschläge random = x	Varianten		CaLB	Pcl
		min	max		
H 86	W x	2	20	W104	
Y 29	F x	2	20	S 47	
W 30	H,F	3	3		
L 17	T,A,F x	4	20	T 40	T 18
F52	S,T,Y x	4	20		
<b>Zahl der Mutanten</b>		<b>min</b>	<b>max</b>		
		192	480.000		

Die vorgeschlagene Mutation von His86Trp sollte die Selektivität noch weiter verbessern. Diese Mutation reduziert das Volumen der kleinen Alkohol-Bindetasche (Stereospezifitätstasche). Ein weiterer Vorschlag ist der gleichzeitige Austausch des räumlich hinter der Position 86 liegenden Tryptophans Trp30

gegen kleinere Aminosäuren, um so eine bessere Anpassung an das Substrat über die räumliche Fixierung der Position 86 in der Bindetasche zu ermöglichen. Eine Mutation von Tyr29Phe sollte zeigen, ob die postulierte H-Brücke vom Alkohol zur 2-Methoxygruppe tatsächlich von Bedeutung für die korrekte Substraterkennung ist.

Weitere Aktivitätssteigerungen könnten durch zusätzliche H-Brücken oder eine verbesserte Geometrie in der Oxyanionen-Höhle durch den Austausch an der Position 17 und der räumlich dahinterliegenden Aminosäure Phe52 erzielt werden, ähnlich wie dies bereits bei den Vorschlägen für eine Aktivitätssteigerung gegen das Substrat Phenylelessigsäure-Ethylester gezeigt werden konnte.

Im Zeitrahmen dieser Arbeit wurden bei der BASF (Labor Dr. M. Matuschek) die Lipase-Mutanten L17A hergestellt und die Aktivität mit dem racemischen Substrat 2-Methoxycyclohexanol mit Vinylaurat als Acylierungsmittel (im molaren Verhältnis 1:0,65 zur Racematspaltung eingesetzt) untersucht. Die spezifische Aktivität im Hinblick auf die kinetische Racematspaltung konnte für die Mutante Leu17Ala gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 7,3 gesteigert werden. In der folgenden Tabelle sind die gemessenen spezifischen Aktivitäten für die Mutante Leu17Ala gezeigt.

L17A Lipase	WT-Lipase	Leerwert (ohne Enzym)
17,6 ± 3,7	2,4 ± 0,9	0,6 ± 0,1

(Menge des gebildeten Methoxycyclohexyllaurats nach 96 h in Gew. %, Mittelwert aus 8 Messungen )

## 8 DISKUSSION UND AUSBLICK *BURKHOLDERIA PLANTARII* LIPASE

### 8.1 Reinigung und Kristallisation

Ziel dieser Arbeit war es, die *Burkholderia plantarii* Lipase zu fermentieren und soweit zu reinigen, dass eine erfolgreiche Kristallisation durchgeführt werden konnte. Dieses Ziel ist weder mit der sekretierten Lipase aus dem Produktionsstamm noch mit dem Wildtyp erreicht worden. Obwohl alle nach dem derzeitigen Stand der Technik verfügbaren Methoden angewandt worden sind, um die leicht und in großen Mengen aus der Fermentation (bis zu 2000 mg/l) zugängliche Lipase aus dem Produktionsstamm zu reinigen, ist es bisher nicht gelungen, diese Lipasepräparationen zu kristallisieren. Auch die Optimierung der Fermentation und Reinigung der Bp-Lipase aus dem Wildtypstamm brachte nicht den gewünschten Erfolg.

Erst mit der rekombinanten, homologen Expression der BpL Mutante F142W in *Burkholderia plantarii* gelang die Kristallisation der Lipase.

Da es sich nicht um eine de-novo-Strukturbestimmung, sondern um die Reproduktion einer erfolgreichen Kristallisation im Labor von Louise Johnson in Oxford handelte (Noble *et al.*, 1993), wurde Kontakt mit dieser Arbeitsgruppe aufgenommen, um weitere Infor-

mationen über die möglichen Probleme bei der Kristallisation zu erhalten.

Von Anne Cleasby, eine der Autoren der oben zitierten Arbeit, wurde die Information erhalten, dass die Homogenität in der analytischen IEF ein entscheidender Parameter für die erfolgreiche Kristallisation der BpL war.

Die im daraufhin erstellten IEF-Gel offensichtlichen Inhomogenitäten konnten durch die Chromatofokussierung mit MONO<sup>®</sup>P nur teilweise abgereinigt werden.

Bei den im analytischen IEF-Gel und in der Chromatofokussierung gefundenen Proteinen handelt es sich jedoch nach den Ergebnissen der N-terminalen Ansequenzierung und der Aktivitätsbestimmung ebenfalls um die Bp-Lipase. Diese Heterogenitäten im auf maximale Lipaseausbeute gezüchteten Produktionsstamm könnten durch Isoenzyme infolge einer Genduplikation hervorgerufen sein.

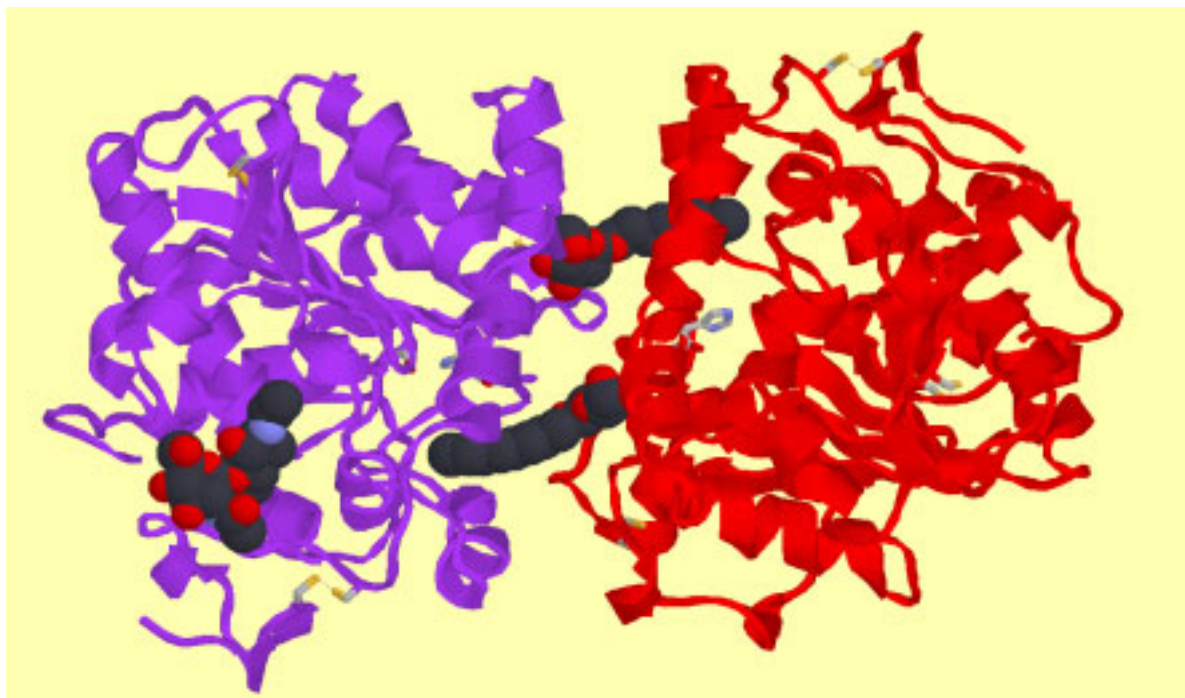
Es wurden verschiedene Versuche unternommen, die Lipasemodifikationen abzutrennen, dies konnte aber nur in analytischen Mengen erreicht werden. Eine Erklärung der unterschiedlichen isoelektrischen Eigenschaften konnte auch durch die hochaufgelöste Massenspektrometrie nicht gegeben werden.

Die Lipase aus dem Wildtyp konnte ebenfalls erfolgreich fermentiert (10 mg/l) werden, und es gelang, die Ausbeute der sekretierten Lipase durch Zugabe von N-Acyl-Homoserinlactonen zu erhöhen.

Die Rolle dieser sogenannten "quorum sensing" Signalmoleküle in der Sekretionskaskade von Lipasen und anderen hydrolytischen Proteinen ist lange bekannt und spielt u. a. eine Rolle bei der Invasion von Pseudomonaden in Eukarioten. Die Rolle der Lipasen und Cutinasen bei der Invasion dieser Bakterien in Pflanzen ist gut untersucht. Das bei der Reinigung des Wildtyps aufgefallenen, unbekanntes sekretierte Protein wurde nicht näher untersucht, es könnte aber ein interessanter Ansatzpunkt für Arbeiten zur Pathogenität dieser Bakterien sein. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass es sich bei dem erstmals in Japan (Tanaka, Katoh & Fujita, 1994) charakterisierten Bakterium *Burkholderia plantarii* um einen reispfadigen Stamm handelt.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Reinigungsprotokoll standen ca. 100 mg WT-Lipase für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung. Aber auch die weitere Reinigung

dieser Lipasepräparation führte nicht zur erfolgreichen Kristallisation der *Burkholderia plantarii* Lipase, obwohl sie nach dem heutigen Stand der Analytik bis zur Homogenität gereinigt werden konnte. Ob die sich in der analytischen IEF abzeichnenden Unterschiede für die Probleme bei der Kristallisation verantwortlich sind, kann nicht eindeutig festgestellt werden, da die Lipase aus dem Wildtyp diese Inhomogenitäten nicht zeigt und trotzdem nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Ein möglicher Ansatzpunkt für die weitere Vorgehensweise lieferte die Analyse der Kristallisationsbedingungen und die Auswertung der Kristallkontakte in Röntgenstruktur verwandten Enzyme. Nahezu alle bekannten Kristallisationsbedingungen für Lipasen enthalten nichtionische Detergenzien als Adjuvantien.



**Abb. 8.1:** Darstellung der Kontaktfläche im Dimer der Struktur 1tcb der CaL B. Die Kristallkontakte werden über zwei  $\beta$ -Octyl-Glycopyranosidmoleküle (CPK-Darstellung) vermittelt.

Typischerweise werden  $\beta$ -Octyl- oder  $\beta$ -Dodecyl-glycopyranoside in Konzentrationen zwischen 0,1 % und 0,6 % zugesetzt.

Insbesondere die Analyse der in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten Struktur der *Candida antarctica* Lipase B lieferte wertvolle Hinweise. Die Kristallisationsbedingungen für CaL B enthalten  $\beta$ -Octyl-glycopyranosid. Weder in der im Kapitel 5 vorgestellten Struktur, noch in der mit 1,5 Å am höchsten aufgelösten Struktur der CaL B ist jedoch dieses Molekül in der Kristallstruktur zu finden (Uppenberg *et al.*, 1994a). Die in der PDB abgelegte Struktur der CaL B 1tcb (2,1Å) zeigt jedoch die Positionen von zwei  $\beta$ -O-Glycopyranosid-Moleküle an der Grenzfläche eines engen Dimers in der asymmetrischen Einheit. Der Kristallkontakt wird über den lipophilen Schwanz und die Kopfgruppe des Glycosids vermittelt, wie in Abbildung 8.1 dargestellt ist.

Die Fermentation der Lipase im Sojaölmedium kann also bereits die Ursache dafür sein, dass diese essentiellen Interaktionsstellen teilweise von Fettsäuren blockiert sind, die auch durch die sorgfältige Proteinreinigung nicht mehr entfernt werden können. Das in Abb. 7.4 gezeigte Massenspektrum zeigt mehrere Banden mit höherem Molekulargewicht, die auf fest gebundene Fettsäure-Moleküle hindeuten können, wie bereits aus früheren massenspektrometrischen Untersuchungen an *Pseudomonas* Lipasen (Hedrich *et al.*, 1993) bekannt ist.

Die Fermentation in einem sojaölfreien Medium kann nur mit Hilfe rekombinanter Methoden erzielt werden, da die Genregulation der genomischen Lipase über das Wachstum auf Fettsäuren als alleinige Kohlenstoffquelle beruht.

Die Analyse der bisher erfolgreich kristallisierten bakteriellen Lipasen und ihrer Reinigung und Expression bestätigt diese Vermutung. Auch die erstmalige Kristallisation der BpL ist aus rekombinatem Material durchgeführt worden. Am Ende dieser Arbeit ist es im Labor Dr. Matuscheck (BASF AG, ZHF) gelungen, rekombinantes Protein in geringen Mengen zur Verfügung zu stellen. Es wurde ein vereinfachtes Reinigungsprotokoll mit hoher Ausbeute entwickelt, mit dem eine Menge von ca. 10 mg einer BpL-Mutante für die initiale Strukturbestimmung bereitgestellt werden konnte.

## 8.2 Kinetik und Inhibition

Die technische Bedeutung der hier untersuchten BpL liegt in ihren katalytischen Eigenschaften, die vorteilhaft in der kinetischen Racematspaltung von sekundären Alkoholen eingesetzt werden können (Jaeger & Reetz, 1998).

Die Vorhersage der katalytischen Eigenschaften gegenüber einem gegebenem Substrat erfordert allerdings detaillierte Kenntnis über den zu Grunde liegenden Katalysemechanismus, wie bereits in der Diskussion zum Mechanismus der CaL B in Kapitel 6 ausgeführt wurde.

Erschwerend kommt hinzu, dass bakterielle Lipasen in wässriger Umgebung meist in einer geschlossenen, inaktiven Konformation vorliegen (Berg *et al.*, 1998). In Abbildung 8.2 ist der für Lipasen angenommenen Mechanismus gezeigt. Die in dieser Arbeit auf die BpL angewandten, transienten kinetischen Methoden können das Fehlen eines initialen "Bursts" nachweisen, so dass nicht die Deacylierung (Schritt 5), sondern, wie bei der CaL B einer der vorherigen Schritte für die Gesamt-

geschwindigkeit bestimmend sein muss. Dies konnte für bakterielle Lipasen bisher nicht eindeutig gezeigt werden.

In Analogie zu den Untersuchungen an der *Candida antarctica* Lipase B läßt sich daher die Annahme aufstellen, dass die Schritte zum Aufbau des Acyl-Enzyms über das tetraedrische Intermediat die Geschwindigkeit und damit auch die Selektivität der Enzymkatalyse bestimmen.

Unterstützt wird dieser experimentelle Befund durch aktuelle Theorien aus der elektrostatischen Betrachtung von Lipasen und Esterasen (Fojan *et al.*, 2000). Berechnungen des elektrostatischen Potentials in der Bindetasche aus Strukturdaten zeigen, dass Lipasen, im Vergleich zu Esterasen, in der Nähe ihres pH-Optimums vermutlich ein stark negatives Potential in der Bindetasche aufweisen. Dadurch wird das Produkt der Deacylierung, eine negativ geladenen Fettsäure, elektrostatisch abgestoßen. Dieses Modell wird daher als "elektrostatisches Katapult" bezeichnet (Fojan *et al.*, 2000; Neves Petersen *et al.*, 2001).

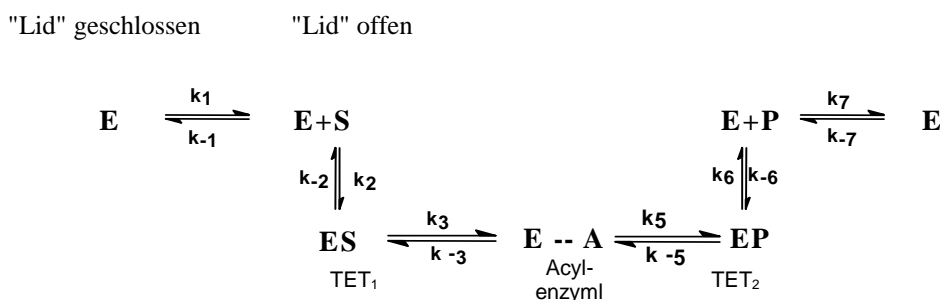


Abb. 8.2: Kinetisches Schema der Hydrolyse von Ester durch Lipasen. Im Schritt 1 erfolgt der Übergang von der geschlossenen in die offenen, aktive Form mit gebundem Substrat. ES = tetraedrisches Intermediat TET<sub>1</sub> E--A = Acyl-Enzym EP = tet. Intermediat TET<sub>2</sub>

Auch in der untersuchten BpL befindet sich in der Bindetasche in der Nähe der Triade ein Glutamat-Rest. Aufgefallen ist dieser Rest bereits durch die durchgeführten Mutagenesestudien, da dieser Rest in der Lage ist die Mutation des katalytischen Aspartats der Triade teilweise zu kompensieren (Noble *et al.*, 1993).

Interessanterweise zeigen auch die Versuche zur irreversiblen Hemmung dieser Lipase eine ausgeprägte Stereopräferenz des Phenylethylalkohols bei der irreversiblen Bildung des tetraedrischen Inhibitor-Komplexes. Diese Tatsache deutet ebenfalls darauf hin, dass es sich beim Aufbau des tetraedrischen Intermediats, auch bei der BpL, um den geschwindigkeits- und selektivitätsbestimmenden Schritt der Katalyse handelt.

Die Instabilität der Phosphonester im Vergleich zu den für die CaL B benötigten Phosphonamiden erforderte die Entwicklung einer abgewandelten Synthesestrategie. Die synthetisierten Inhibitoren konnten nicht fraktioniert kristallisiert werden, daher konnten sie nur als Mischung aus den  $S_p$ - und  $R_p$ -Diastereomeren mit definierter Stereochemie am Alkoholrest isoliert werden.

### 8.3. Struktur und Homologie-modellierung

Zur Klärung der geometrischen Beiträge zur Enantioselektivität lipasekatalysierter Reaktionen sollte ebenfalls die Kokristallisation der BpL mit den dafür synthetisierten Phosphonat-Inhibitoren angestrengt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nur die Struktur der BpL-Mutante F142W ohne Inhibitor in einer geschlossenen Konformation gelöst werden. Die Qualität der Struktur ist jedoch unzureichend, lediglich das Vorhandensein der Mutation konnte durch die Struktur bestätigt werden. Wie in der schon bekannten Struktur des Wildtyps in der geschlossenen Konformation ist das aktive Zentrum nicht zugänglich und der Erfolg eines "soaking" Experiments, das erfolgreich bei der CaL B angewendet werden konnte, schließt sich daher aus.

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist der erfolgreiche Einsatz dieses Enzyms in der Biokatalyse. Die Fragestellung lautete daher, ob es möglich ist, dieses Enzym auf ein gegebenes Substrat über eine gerichtete Mutagenese maßzuschneidern.

In der Literatur existieren bisher nur wenig Beispiele, in denen eine Verbesserung der katalytischen Eigenschaften durch gerichtete Mutagenese erzielt wurde. In jüngerer Zeit wurde dagegen oft die Methode der ungerichteten Evolution zur Optimierung von Proteinen angewandt.



Zum jetzigen Zeitpunkt fehlen allerdings noch die exakten strukturellen und thermodynamischen Daten zum vollständigen Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen.

Da ein Expressionssystem und kinetische Methoden aus einer Kooperation mit der Abteilung Biokatalyse der BASF AG (Dr. Bernhard Hauer, ZHF) verfügbar sind, wurde bevor die experimentellen Ergebnisse der Strukturanalyse bereitstehen, bereits computergestützte Methoden zur Vorhersage von Mutationen eingesetzt.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse über die Enantioselektivität von Lipase-katalysierten Reaktionen und den vorliegenden Strukturinformationen aus homologen Lipasen wurde daher ein Homologiemodell der BpL in der offenen Konformation erstellt. Über die Modellierung des vermutlich selektivitätsbestimmenden tetraedrischen Intermediats mit dem Programm MOLOC konnte dann ein Modell für die Substraterkennung generiert werden.

## 8.4. Strukturbasierte Vorhersage von Mutanten

Das erstellte Homologiemodell in der offenen Konformation im Komplex mit dem modellierten tetraedrischen Intermediat wurde erfolgreich zur Vorhersage der katalytischen Eigenschaften von Mutanten eingesetzt.

Zur Erstellung des Homologiemodells wurden alle verfügbaren Informationen herangezogen, insbesondere die in dieser Arbeit gelösten Strukturen der CaL B im Komplex mit den tetraedrischen Phosphonamid-Inhibitoren und weiteren bekannten Komplexstrukturen aus der PDB. Zur Modellierung wurde das Kraftfeld MAB eingesetzt, da bereits am Beispiel der CaL B gute Erfahrung mit der Reproduktion der Geometrie des Inhibitors in der Kristallstruktur gesammelt wurden.

Die graphische Auswertung der minimierten Geometrien in der Bindetasche erlaubt Plausibilitätsbetrachtungen zur Identifizierung von denkbaren Mutationen, die eine Verbesserung der katalytischen Eigenschaften gegenüber einem gegebenem nichtnatürlichen Substrat erreichen sollten.

Es wurde versucht, alle zum heutigen Zeitpunkt verfügbaren Informationen über konservierte Aminosäuren in der Bindetasche und detaillierte Studien über den Mechanismus von Serinproteasen in die wissensbasierte Auswahl einfließen zu lassen.

Es wurden zwei Modellsubstrate ausgewählt, für die bei der BASF bereits ein Assay zum

experimentellen Nachweis der erzielten Aktivität und Selektivität der vorgeschlagenen Mutationen vorhanden war.

Ein Ziel war es, die *Burkholderia plantarii* Lipase zur Spaltung von Phenylelessigsäure-Ethylester maßzuscheidern. Dieses Substrat mit einem aromatischen Acylrest und einem kleinen Alkohol ist ein typisches Esterase-substrat, für das Lipasen keine Aktivität zeigen.

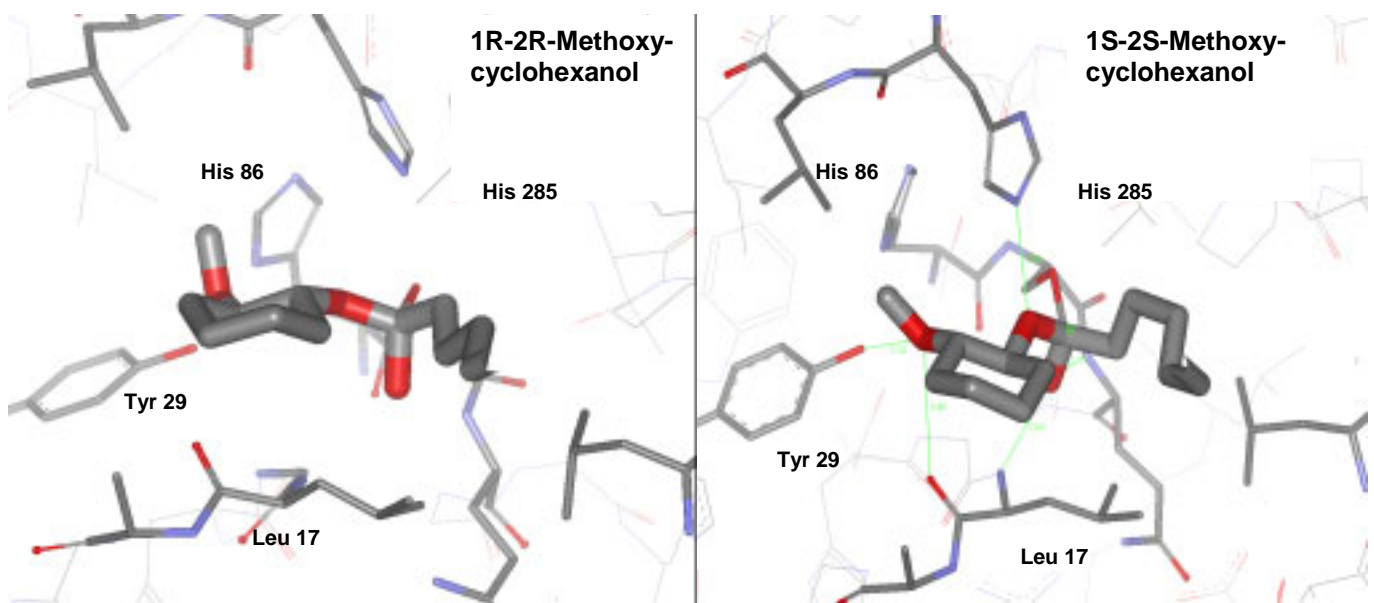
Diese Topologie ist exakt konträr zum sterischen Anspruch typischer Lipase-Substrate. Natürliche Substrate von Lipasen zeichnen sich durch langkettige, unverzweigte Säurereste und sterisch anspruchsvolle Alkoholreste aus, wie z. B. im Triacylglycerolester.

Die Anpassung auf dieses "falsche" Substrat mit inversem Raumbedarf gelang durch den gezielten Austausch von den im Modell direkt

zur relevanten Acylbindetasche weisenden Aminosäuren Leu167 und Leu17 durch Alanin. Damit konnte erstmals die Aktivität einer Lipase für dieses Substrat erreicht werden.

Die Bedeutung der Aminosäure an der Position 17 in BpL für die Katalyse ist bereits seit langem bekannt, da sie zusammen mit Gln 88 die Oxyanion-Höhle ausbildet. Untersuchungen über die Konservierung dieser Aminosäureposition (Pleiss, Scheib & Schmid, 2000) und bisherige Mutagenesestudien (Beer *et al.*, 1996) haben gezeigt, dass ein Austausch dieser Aminosäure unvorteilhaft für die katalytische Aktivität zu sein scheint.

Das Ziel dieser Studien war es bisher jedoch immer, für den Mechanismus relevante Aminosäuren durch den Aktivitätsverlust gegenüber dem natürlichen Substrat zu identifizieren. Daher sollte gerade dieser Austausch von Vorteil für ein nichtnatürliches Substrat sein, was



**Abb.8.3:** Vergleich der mit MOLOC/MAB minimierten Geometrien des tetraedrischen Methoxycyclohexanol - Intermediats in der Bindetasche der BpL. Die Geometrie der 1S-2S-Diastereomers erscheint für die Katalyse günstiger, da die katalytische Wasserstoffbrücke vom Estersauerstoff zum His 187 eine ideale Geometrie zeigt. Im 1R-2R-Diastereomer (links) ist der Estersauerstoff hingegen vom His285 abgewandt und es liegt ein unproduktiver Bindungsmodus vor.

durch die experimentelle Überprüfung bestätigt werden konnte. Die Vorhersagekraft des in dieser Arbeit generierten Modells konnte auch für ein zweites Substrat gezeigt werden.

Die Lipase sollte für die enantioselektive Katalyse der kinetischen Racematspaltung von Methoxycyclohexanol optimiert werden. Das Wildtypenzym zeigt bereits eine hohe Selektivität, aber eine geringe Aktivität gegenüber diesem sekundären Alkohol.

Eine weitere Besonderheit dieses Alkohols ist die Verletzung der empirischen Kazlauskas-Regel für die kinetische Racematspaltung von sekundären Alkoholen (siehe auch Abschnitt 3.1.5.2). Das Enzym zeigt eine Selektivität zugunsten des 1S-2S-Methoxycyclohexanol obwohl das 1R-2R-Enantiomer nach den empirischen Regeln als schnelles Enantiomer vorhergesagt wurde, da der Methoxy-Rest in die Stereospezifitätstasche zum His 86 weist, wenn keine zusätzlichen Wechselwirkungen angenommen werden.

Die Modellierung des tetraedrischen Intermediats mit dem Programm MOLOC erlaubt erste Rückschlüsse auf eine mögliche rationale Erklärung dieses überraschenden kinetischen Verhaltens.

In der Abbildung 8.3 ist die mit MOLOC /MAB minimierte Geometrie der beiden enantiomeren Formen des diastereomeren tetraedrischen Intermediats von Methoxycyclohexanol-*laureat* gezeigt. Besonders auffällig ist die vorgeschlagene Geometrie der zu spaltenden Esterbindung. Nur für das 1S-2S-Enantiomer

wird eine Ausrichtung zum katalytischen His 285 vorgeschlagen. Zusätzlich kann eine Wasserstoffbrücke vom Methoxyrest zum Tyr 29 ausgebildet werden.

Diese Umkehr der Kazlauskas-Regel durch die Anwesenheit von zusätzlichen Sauerstoffatomen im sekundären Alkohol wurde bereits in der Literatur (Tuomi & Kazlauskas, 1999) postuliert.

## 8.5 Ausblick

Zum Abschluß der Arbeiten zur strukturbasierten Vorhersage von Mutanten fehlt immer noch die eigentliche Voraussetzung für diesen hohen Anspruch, die Raumstruktur der *Burkholderia plantarii* Lipase im Komplex mit den zu diesem Zweck synthetisierten Methoxycyclohexanol-Phosphonat-Inhibitoren.

Es ist in zwei Beispielen gelungen, Mutanten mit maßgeschneiderten katalytischen Eigenschaften vorherzusagen und auch den experimentellen Nachweis für die Korrektheit dieser Vorhersagen zu erbringen. Aber ob die Schlüsse aus dem erstellten Homologiemodell tatsächlich den strukturellen Gegebenheiten entsprechen, kann nur eine zukünftige Kristallstrukturanalyse der Komplexe klären.

Es stellt sich damit auch die Frage, ob es überhaupt möglich sein wird, alle relevanten Parameter für die Selektivität einer komplexen enzymkatalysierten Reaktion mit Hilfe einer statischen Struktur erfassen zu können.

Auch der vermeintlich gut untersuchte und verstandene Katalysemechanismus von Serin-Hydrolasen bietet Raum für weitere Detailstudien und zukünftige kinetische, thermodynamische und strukturelle Untersuchungen von Mutanten. Es wäre zudem interessant, z.B. die Relevanz der Wasserstoffbrücke zum Tyr 29 durch Mutagenesestudien und thermodynamische Messungen auszuleuchten, da diese Informationen zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung stehen.

Insbesondere die Struktur und Dynamik des "Lids" und seine Rolle in der Katalyse sind weitgehend unverstanden. Einen vielversprechenden Ansatz dazu bieten die in dieser Arbeit begonnenen Fluoreszenzuntersuchungen von Tryptophanmutanten zusammen mit kinetischen Methoden wie die Stopped-Flow-Spektrofluorometrie, um die Geschwindigkeit und die Funktion einzelner Schritte innerhalb eines katalytischen Mechanismus isoliert betrachten zu können.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell zur Vorhersage von Mutationen beruht auf der impliziten Annahme, dass die mit den verwendeten Kraftfeldmethoden zugängliche Geometrie des tetraedrischen Intermediats dem tatsächlich geschwindigkeitsbestimmenden Schritt weitestgehend entspricht (Kazlauskas, 2000). Der eigentliche nukleophile Angriff des Serin für den Bindungsaufbau bzw. die anschließende Bindungsspaltung und die dazu erforderlichen stereoelektronischen Anforderungen (Ema *et al.*, 1998) müssen bei diesem Ansatz zwangsläufig unberücksichtigt bleiben,

ebenso wie das komplexe Zusammenspiel von (organischem) Solvens und protonierbaren Gruppen im Enzym (Hacking *et al.*, 2000). Die zunehmende technische Anwendung von Enzymen unter nichtnatürlichen Bedingungen fordert das bisher erworbene Wissen über die Mechanismen der enzymatischen Katalyse und die Leistungsfähigkeit von biologischen Katalysatoren in einer heute noch nicht abzusehende Weise heraus. Erste Erfolge der evolutiven Proteinoptimierung mit Hilfe der ungerichteten Mutagenese konnten zeigen, dass es prinzipiell möglich ist Enzyme unter nichtnatürlichen Bedingungen auf eine gewünschte Eigenschaft hin zu optimieren (Arnold *et al.*, 2001). Dieser Ansatz ersetzt das fehlende Wissen über die zugrundeliegenden Mechanismen durch einen enormen technischen und zeitlichen Aufwand bei der Durchmusterung aller möglichen Mutanten hinsichtlich der gewünschten Eigenschaften. Die Zahl der möglichen Mutanten eines Proteins mit  $n$  Aminosäuren beträgt  $20^n$ . Es ist praktisch nicht möglich, alle Varianten zu screenen. Daher wäre es von Vorteil, die Methode der evolutiven Optimierung auf die zur Substraterkennung relevanten Aminosäuren zu beschränken oder sogar einen rein rationalen Ansatz anzuwenden.

Es bleibt abzuwarten, inwieweit die umfassende Betrachtung der kinetischen, thermodynamischen und strukturellen Parameter enzymatischer Prozesse wie die Substraterkennung und die Stabilisierung von Übergangszuständen zu differenzierteren und hoffentlich auch vermehrt rationalen Ansätzen des "Enzym-Design" führen kann (Cedrone *et al.*, 2000).

## 9 Zusammenfassung

Lipasen aus Bakterien und Hefen werden in der präparativen organischen Chemie als Biokatalysator zur kinetischen Racematspaltung eingesetzt. Erste strukturelle Untersuchungen von Cygler et al. aus dem Jahr 1994 bestätigen die empirische Katzlauskas Regel, nach der die Enantiopräferenz aus sterischen Betrachtungen abgeleitet werden kann. Die energetischen, kinetischen und strukturellen Grundlagen der enantioselektiven Substraterkennung von Lipasen für sekundäre Alkohole und Amine sind nicht im Detail bekannt.

Nach dem heutigen Stand der Technik ist die initiale Suche nach einer geeigneten Lipase als Biokatalysator für eine gegebene Reaktion und die Optimierung der Reaktionsbedingungen der zeitaufwendigste Schritt in der Entwicklung lipasekatalysierter Reaktionen. Ein alternativer Ansatz ist die Anpassung einer bereits bekannten Lipase durch die Methode der ungerichteten Mutagenese in einem evolutiven Ansatz. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich eine Lipase, für die bereits optimale Reaktionsbedingungen bekannt sind, an ein bestimmtes Substrat anzupassen. Dabei ist es nicht erforderlich den Mechanismus des Enzyms zu kennen (Reetz, 2000), da die Aminosäuren zufällig ausgetauscht werden und die Mutanten nach ihren katalytischen Eigenschaften ausgewählt werden. Diese Methode erfordert ebenfalls einen enormen technischen und zeitlichen Aufwand bei der Erzeugung und Durchmusterung der Lipasevarianten.

Es erscheint aus diesem Grund wünschenswert, die Methode der strukturbasierten, gerichteten Mutagenese anzuwenden, um massgeschneiderte Biokatalysatoren durch ein rationales Proteindesign zu erreichen. Die grundlegende Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung eines solchen computerunterstützten Proteindesigns ist die detaillierte Kenntnis des Enzymmechanismus und ein hinreichend genaues räumliches Modell des Enzyms.

In der vorliegenden Arbeit wurden im ersten Teil die kinetischen und strukturellen Determinanten für die Enantioselektivität von Lipasen am Beispiel der kinetischen Racematspaltung von 1-Phenylethylamin mit *Candida antarctica* Lipase B untersucht.

Zu diesem Zweck wurden von Hans-Dieter Gerber (AG Klebe) enantiomerenreine Übergangszustandsanaloge Phosphonamid-Inhibitoren synthetisiert. Die Stereochemie der Inhibitoren wurde durch Kristallstrukturen aller Diastereomere bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass die Lipase in abhängig von der Stereochemie des Inhibitors unterschiedlich schnell gehemmt wird. Die kovalente Bindung der Phenylethylamid-Inhibitoren konnte durch MALDI-TOF massenspektrometrische Untersuchungen eindeutig gezeigt werden.

Die kinetische Relevanz des tetraedrischen Übergangszustandes für die Reaktion wurde durch die Bestimmung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes mit Stopped-Flow spektroskopischen Methoden bestätigt.

Die thermodynamischen Parameter der kineti-

schen Racematspaltung von rac-Phenylethylamin wurden mit Hilfe von van't Hoff Daten aus der Temperaturabhängigkeit der Reaktion bestimmt. Die Analyse der entropischen und enthalpischen Beiträge zur freien Differenzaktivierungsenthalpie  $\Delta_{R,S}\Delta G^\ddagger$  der kinetischen Racematspaltung ergaben eine enthalpische Favorisierung des schneller reagierenden R-Phenylethylamins. Interessanterweise ist der entropische Beitrag gegenläufig, durch den entropischen Beitrag wird das langsamere Enantiomer bevorzugt und die resultierende Enantioselektivität sinkt mit steigender Temperatur. Das langsamer reagierende S-Phenylethylamin scheint daher im geschwindigkeitsbestimmenden Übergangszustand eine höhere Restmobilität zu besitzen.

Zur Klärung der strukturellen Beiträge zur Enantiopräferenz der CaL B gegenüber Phenylethylamin wurde die Kristallstruktur der Lipase in der offenen Konformation in einer neuen hexagonalen Raumgruppe durch die Methode des molekularen Ersatzes gelöst. Die Komplexstruktur mit dem R-Phenylethylamid-Inhibitor zeigt, dass der Inhibitor in der schmalen Bindetasche perfekt eingeschlossen werden kann (Abb. 5.19). Diese optimale Passform, die für eine enthalpischen Begünstigung des R-Substrates spricht, führt zu einem hohen entropischen Verlust durch die starke Fixierung dieses Substrats im tetraedrischen Intermediat. Die Komplexstruktur der CaL B mit dem S-Phenylethylamid-Inhibitor zeigt dagegen keine Elektronendichte für die Phenyl-Gruppe des Phenylethylamid-Inhibitors, was auf eine Unordnung dieses Molekülteils hindeutet. Diese

Interpretation des reduzierten Streubeitrages ist in Übereinstimmung mit den thermodynamischen Daten, die ebenfalls auf eine höhere Restmobilität des langsameren S-Enantiomers hindeuten.

Unter diesem Gesichtspunkt wurden computergestützte Methoden zur Untersuchung des zugänglichen Konformationsraumes der beiden Enantiomere im tetraedrischen Übergangszustand angewendet. Die durchgeführten Konformationssuchen in der Bindetasche und die MD-Simulationen weisen ebenfalls auf die schlechtere Stabilisierung sowie den Verlust der katalytischen Wasserstoffbrücke zum His 224 für das S-Phenylethylamid hin.

Aus diesen experimentellen Daten und den Hinweisen der computergestützten Methoden konnte ein konsistentes Modell der enantioselektiven Substraterkennung von Lipasen im tetraedrischen Übergangszustand abgeleitet werden, welches sowohl sterisch-enthalpische als auch entropische Beiträge berücksichtigt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Lipase aus *Burkholderia plantarii* betrachtet. Es konnte erfolgreich ein Reinigungssystem für diese bakterielle Lipase der Klasse I.2 etabliert werden. Es wurde festgestellt, dass nur die Lipase aus dem Wildtyp bis zur Homogenität gereinigt werden konnte, während die aus dem Produktionsstamm gewonnenen Lipase Inhomogenitäten in der isoelektrischen Fokussierung zeigt. Die Kristallisation dieser Lipase gelang nur aus der sojaölfrei, rekombinant im Wildtypstamm exprimierter Lipasepräparation.

Die erfolgreich gelöste Kristallstruktur der BpL konnte leider keinen Aufschluß über die Bindetasche der Lipase geben, da das Enzym in einer geschlossenen Konformation vorliegt. Der für bakterielle Lipasen der Klasse I.2 typische "Lid" bedeckt das aktive Zentrum (Abb. 7.8). Im Zeitrahmen dieser Arbeit gelang es nicht, die Struktur der BpL im Komplex mit den von Hans Dieter Gerber (AG Klebe) synthetisierten 2-Methoxycyclohexanol-Phosphonsäure-Inhibitoren zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde ein Homologiemodell der *Burkholderia plantarii* Lipase auf der Basis von homologen Strukturen aus der PDB in einer offenen Konformation erstellt.

Ziel dieser Arbeiten war es, die rekombinante BpL durch eine strukturbasierte gerichtete Mutagenese für zwei gegebene Modellsubstrate masszuschneiden. Auf der Grundlage der im ersten Teil dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über den Mechanismus der enantio-selektiven Substraterkennung im tetraedrischen Übergangszustand wurden die beiden Modellsubstrate im tetraedrischen Übergangszustand analog zur Röntgenstruktur der CaL B modelliert.

Mit Hilfe dieses computergestützten Modells wurden dann durch graphische Auswertung Aminosäuren priorisiert, welche an der Stabilisierung des tetraedrischen Intermediates beteiligt sind. Diese Aminosäurepositionen wurden aufgrund der physikochemischen Eigenschaften als potentiell Ziel von ortsgerichteten Mutationen zur Verbesserung der katalytischen Eigenschaften ausgewählt.

Es konnte in ersten Experimenten von Dr. M. Matuschek (BASF AG) gezeigt werden, dass mit Hilfe dieses struktur- und mechanismusbasierten Ansatzes die spezifische Aktivität der BpL für trans-2-Methoxycyclohexanol tatsächlich gesteigert werden konnte. Der Austausch der Aminosäure Leu17, die an der Stabilisierung des tetraedrischen Intermediates in der Oxyanionen-Höhle beteiligt ist, durch Ala bewirkte eine Steigerung der spezifischen Aktivität um 700%. Auch für das zweite gewählte Modellsubstrat Phenyllessigsäure-ethylester, ein typisches Esterasesubstrat für das Lipasen keine katalytische Aktivität besitzen, konnte in einem ersten Vorversuch erstmals eine katalytische Aktivität der BpL-Mutanten Leu17Ala sowie Leu167Ala gezeigt werden. Diese Aminosäuren befinden sich in direkter Nachbarschaft zum Phenylring der Phenyllessigsäure und zur Oxyanionen-Höhle im tetraedrischen Übergangszustand (Abb. 7.16).

In der vorliegenden Arbeit wurde darüberhinaus ein Ansatz zur Kombination der klassischen gerichteten Mutagenese mit der zufälligen, ungerichteten Mutagenese vorgeschlagen. Dieser rationale Ansatz der fokussierten Mutagenese reduziert die nahezu unendliche Zahl der möglichen Mutationen durch die strukturbasierte Auswahl relevanter Aminosäuren auf eine kleinere Zahl von Enzymvarianten.

Die vollständige Durchmusterung dieses Sequenzraumes mit den Methoden der ungerichteten Mutagenese kann dann wertvolle Aufschlüsse für eine weitere rationale Auswahl von Mutationen liefern.

## ANHANG A LITERATURVERZEICHNIS

- Akrim, M., Bally, M., Ball, G., Tommassen, J., Teerink, H., Filloux, A. & Lazdunski, A. (1993). Xcp-mediated protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of two additional genes and evidence for regulation of xcp gene expression. *Mol Microbiol* **10**, 431-43.
- Alden, R. A., Wright, C. S. & Kraut, J. (1970). A hydrogen-bond network at the active site of subtilisin BPN'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **257**, 119-24.
- Arnold, F. H., Wintrode, P. L., Miyazaki, K. & Gershenson, A. (2001). How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem Sci* **26**, 100-6.
- Aung, H. P., Bocola, M., Schleper, S. & Rohm, K. H. (2000). Dynamics of a mobile loop at the active site of *Escherichia coli* asparaginase. *Biochim Biophys Acta* **1481**, 349-59.
- Balkenhohl, F., Ditrich, K., Hauer, B. & Ladner, W. (1997). Optisch aktive Amine durch Lipase-katalysierte Methoxyacetylierung. *J Prakt Chem* **339**, 381-384.
- Beer, H. D., Wohlfahrt, G., McCarthy, J. E., Schomburg, D. & Schmid, R. D. (1996). Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants. *Protein Eng* **9**, 507-17.
- Berg, O. G., Cajal, Y., Butterfoss, G. L., Grey, R. L., Alsina, M. A., Yu, B. Z. & Jain, M. K. (1998). Interfacial activation of triglyceride lipase from *Thermomyces (Humicola) lanuginosa*: kinetic parameters and a basis for control of the lid. *Biochemistry* **37**, 6615-27.
- Blow, D. (1990). Enzymology. More of the catalytic triad. *Nature* **343**, 694-5.
- Bommarius, A. S., Schwarm, M. & Drauz, K. D. A. (1998). Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals—examples and perspectives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **5**, 1-11.
- Boston, M., Requadt, C., Danko, S., Jarnagin, A., Ashizawa, E., Wu, S., Poulouse, A. J. & Bott, R. (1997). Structure and function engineered *Pseudomonas mendocina* lipase. *Methods Enzymol* **284**, 298-317.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christensen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L. & et al. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**, 767-70.
- Brown, E. D., Yada, R. Y. & Marangoni, A. G. (1993). The dependence of the lipolytic activity of *Rhizopus arrhizus* lipase on surfactant concentration in Aerosol-OT/isooctane reverse micelles and its relationship to enzyme structure. *Biochim Biophys Acta* **1161**, 66-72.
- Bruice, T. C. & Kahn, K. (2000). Computational enzymology. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 540-4.
- Brunger, A. T. (1992). X-PLOR, version 3.1. A system for X-ray crystallography and NMR. *Yale University Press, New Haven, CT*.
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* **54**, 905-921.
- Brzozowski, A. M., Savage, H., Verma, C. S., Turkenburg, J. P., Lawson, D. M., Svendsen, A. & Patkar, S. (2000). Structural origins of the interfacial activation in *thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. *Biochemistry* **39**, 15071-82.



- Cajal, Y., Svendsen, A., De Bolos, J., Patkar, S. A. & Alsina, M. A. (2000). Effect of the lipid interface on the catalytic activity and spectroscopic properties of a fungal lipase. *Biochimie* **82**, 1053-61.
- Cardenas, F., de Castro, M. S., Sanchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V., Valmaseda, M., Elson, S. W. & Alvarez, E. (2001). Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme Microb Technol* **28**, 145-154.
- Carrea, G. & Riva, S. (2000). Enzyme in organischen Lösungsmitteln: Eigenschaften und Einsatz in der Synthese. *Angew. Chemie*, 2312-2341.
- Carvalho, C. M., Aires-Barros, M. R. & Cabral, J. M. (1999). Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol Bioeng* **66**, 17-34.
- Cedrone, F., Menez, A. & Quemeneur, E. (2000). Tailoring new enzyme functions by rational redesign. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 405-10.
- Cereghino, J. L. & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 45-66.
- Chang, R. C., Chen, J. C. & Shaw, J. F. (1996). Studying the active site pocket of *Staphylococcus hyicus* lipase by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **229**, 6-10.
- Chapus, C., Semeriva, M., Charles, M. & Desnuelle, P. (1978). Adsorption and activation of pancreatic lipase at interfaces. *Adv Exp Med Biol* **101**, 57-68.
- Chen, J. C. & Tsai, S. W. (2000). Enantioselective synthesis of (S)-ibuprofen ester prodrug in cyclohexane by *Candida rugosa* lipase immobilized on Accurel MP1000. *Biotechnol Prog* **16**, 986-92.
- Cygler, M., Grochulski, P., Kazlauskas, R. J., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Rubin, B., Serreqi, A. N. & Gupta, A. K. (1994). Molecular Basis for the Enantioselectivity of Lipases toward Secondary Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3180-3186.
- De Santis, L. & Carloni, P. (1999). Serine proteases: an ab initio molecular dynamics study. *Proteins* **37**, 611-8.
- Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Yamaguchi, S., Joerger, R., Haas, M. J. & Derewenda, Z. S. (1994). Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Eng* **7**, 551-7.
- Dewar, M. J. S. & Storch, D. M. (1985). Alternative view of enzyme reactions. *Proc. Natn. Acad. Sci.* **82**, 2225-2229.
- Dodson, G. & Wlodawer, A. (1998). Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem Sci* **23**, 347-52.
- Dodson, G. G., Lawson, D. M. & Winkler, F. K. (1992). Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation. *Faraday Discuss* **93**, 95-105.
- Egloff, M. P., Marguet, F., Buono, G., Verger, R., Cambillau, C. & van Tilbeurgh, H. (1995). The 2.46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate. *Biochemistry* **34**, 2751-62.
- Ema, T., Kobayashi, J., Maeno, S., Sakai, T. & Utaka, M. (1998). Origin of the Enantioselectivity of Lipases Explained by a Stereo-Sensing Mechanism Operative at the Transition State. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2**, 443-453.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate Bond and Angle Parameters for X-ray Protein-Structure Refinement. *Acta Cryst. A* **47**, 392-400.
- Eyring, H. & Polanyi, M. (1931). Über einfache Gasreaktionen. *Z. Phys. Chem B* **1**, 279.

- Faber, K. (1997). Biotransformations of Non-Natural Compounds: State of the Art and Future Developments. *Pure Appl. Chem.* **69**, 1613-1632.
- Ferrato, F., Carriere, F., Sarda, L. & Verger, R. (1997). A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods Enzymol* **286**, 327-47.
- Fischer, E. (1894). Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dtsch. Chem Ges.* **2**, 2985-2993.
- Fiser, A., Do, R. K. & Sali, A. (2000). Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci* **9**, 1753-73.
- Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. & Petersen, S. B. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* **82**, 1033-41.
- Frenken, L. G., Bos, J. W., Visser, C., Muller, W., Tommassen, J. & Verrips, C. T. (1993a). An accessory gene, lipB, required for the production of active *Pseudomonas glumae* lipase. *Mol Microbiol* **9**, 579-89.
- Frenken, L. G., de Groot, A., Tommassen, J. & Verrips, C. T. (1993b). Role of the lipB gene product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*. *Mol Microbiol* **9**, 591-9.
- Frenken, L. G., Egmond, M. R., Batenburg, A. M., Bos, J. W., Visser, C. & Verrips, C. T. (1992). Cloning of the *Pseudomonas glumae* lipase gene and determination of the active site residues. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3787-91.
- Garcia-Alles, L. F. & Gotor, V. (1998). Lipase-catalyzed transesterification in organic media: solvent effects on equilibrium and individual rate constants. *Biotechnol Bioeng* **59**, 684-94.
- Gaskin, D. J., Bovagnet, A. H., Turner, N. A. & Vulfson, E. N. (1997). Directed evolution of an industrially important enzyme. *Biochem Soc Trans* **25**, 15S.
- Gogonea, V., Suarez, D., van der Vaart, A. & Merz, K. M., Jr. (2001). New developments in applying quantum mechanics to proteins. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 217-23.
- Gohlke, H., Hendlich, M. & Klebe, G. (2000). Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J Mol Biol* **295**, 337-56.
- Gotor, V. (1999). Non-conventional hydrolase chemistry: amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases. *Bioorg Med Chem* **7**, 2189-97.
- Grochulski, P., Bouthillier, F., Kazlauskas, R. J., Serreqi, A. N., Schrag, J. D., Ziomek, E. & Cygler, M. (1994a). Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochemistry* **33**, 3494-500.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B. & Cygler, M. (1993). Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem* **268**, 12843-7.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D. & Cygler, M. (1994b). Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci* **3**, 82-91.
- Gutfreund, H. (1996). Kinetics for the Life Sciences : Receptors, Transmitters and Catalysts. *Cambridge Univ Pr (Pap Txt)*; ISBN: 052148586X .
- Gutfreund, H. & Sturtevant, J. M. (1956). The Mechanism of Chymotrypsin catalysed reactions. *PNAS* , 719-28.
- Hacking, M. A., Akkus, H., van Rantwijk, F. & Sheldon, R. A. (2000). Lipase and esterase-catalyzed acylation of hetero-substituted nitrogen nucleophiles in water and organic solvents. *Biotechnol Bioeng* **68**, 84-91.
- Haeffner, F., Norin, T. & Hult, K. (1998). Molecular modeling of the enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterification reactions. *Biophys J* **74**, 1251-62.

- Hedrich, H. C., Isobe, K., Stahl, B., Nokihara, K., Kordel, M., Schmid, R. D., Karas, M., Hillenkamp, F. & Spener, F. (1993). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry applied to multiple forms of lipases. *Anal Biochem* **211**, 288-92.
- Hermoso, J., Pignol, D., Penel, S., Roth, M., Chapus, C. & Fontecilla-Camps, J. C. (1997). Neutron crystallographic evidence of lipase-colipase complex activation by a micelle. *Embo J* **16**, 5531-6.
- J.Navaza. (1994). Amore automated molecular replacement. *Acta Cryst.* **A50**, 157-163.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M. & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 29-63.
- Jaeger, K. E. & Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* **16**, 396-403.
- Jaeger, K. E. & Reetz, M. T. (2000). Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 68-73.
- Joerger, R. D. & Haas, M. J. (1994). Alteration of chain length selectivity of a *Rhizopus delemar* lipase through site-directed mutagenesis. *Lipids* **29**, 377-84.
- Jutila, A., Zhu, K., Patkar, S. A., Vind, J., Svendsen, A. & Kinnunen, P. K. (2000). Detergent-induced conformational changes of *Humicola lanuginosa* lipase studied by fluorescence spectroscopy. *Biophys J* **78**, 1634-42.
- Kazlauskas, R. J. (1993). Biocatalysis--becoming more predictable and selective. *Trends Biotechnol* **11**, 439-40.
- Kazlauskas, R. J. (1994). Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends Biotechnol* **12**, 464-72.
- Kazlauskas, R. J. (2000). Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations, and opportunities. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 81-8.
- Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y. & Suh, S. W. (1997). The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* **5**, 173-85.
- Klebe, G. & Mietzner, T. (1994). A fast and efficient method to generate biologically relevant conformations. *J Comput Aided Mol Des* **8**, 583-606.
- Klein, R. R., King, G., Moreau, R. A. & Haas, M. J. (1997). Altered acyl chain length specificity of *Rhizopus delemar* lipase through mutagenesis and molecular modeling. *Lipids* **32**, 123-30.
- Kleywegt, G. J. (2000). Validation of protein crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 249-65.
- Kleywegt, G. J. & Brunger, A. T. (1996). Checking your imagination: applications of the free R value. *Structure* **4**, 897-904.
- Kollman, P. A., Kuhn, B., Donini, O., Perakyla, M., Stanton, R. & Bakowies, D. (2001). Elucidating the nature of enzyme catalysis utilizing a new twist on an old methodology: quantum mechanical-free energy calculations on chemical reactions in enzymes and in aqueous solution. *Acc Chem Res* **34**, 72-9.
- Koshland, D. E. (1994). Das Schlüssel-Schloß-Prinzip und die Induced-fit-Theorie. *Angew. Chem* **10**, 2468-2472.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Desjardins, E., Robinson, J., Culp, J. S., Hellmig, B. D., Sweet, R. W., Sodroski, J. & Hendrickson, W. A. (1999). Probability analysis of variational crystallization and its application to gp120, the exterior envelope glycoprotein of type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1). *J Biol Chem* **274**, 4115-23.

- Labes, M., Puhler, A. & Simon, R. (1990). A new family of RSF1010-derived expression and lac-fusion broad-host-range vectors for gram-negative bacteria. *Gene* **89**, 37-46.
- Lakshmi, B. S., Kanguane, P., Guo, Y., Chen, Y. Z. & Gautam, P. (2000). Molecular Basis for the stereospecificity of *Candida Rugosa* Lipase (CRL) towards Ibuprofen. *Biocatalysis and Biotransformation* **17**, 475-86.
- Lang, D. A., Mannesse, M. L., de Haas, G. H., Verheij, H. M. & Dijkstra, B. W. (1998). Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur J Biochem* **254**, 333-40.
- Lawson, D. M., Brzozowski, A. M., Rety, S., Verma, C. & Dodson, G. G. (1994). Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling. *Protein Eng* **7**, 543-50.
- Lazdunski, A., Guzzo, J., Filloux, A., Bally, M. & Murgier, M. (1990). Secretion of extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* **72**, 147-56.
- Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. & Jaeger, K. (2000). Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem Biol* **7**, 709-18.
- Liese, A. & Filho, M. V. (1999). Production of fine chemicals using biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 595-603.
- Luic, M., Tomic, S., Lescic, I., Ljubovic, E., Sepac, D., Sunjic, V., Vitale, L., Saenger, W. & Kojic-Prodic, B. (2001). Complex of *Burkholderia cepacia* lipase with transition state analogue of 1-phenoxy-2-acetoxybutane: biocatalytic, structural and modelling study. *Eur J Biochem* **268**, 3964-73.
- Manetti, F., Mileto, D., Corelli, F., Soro, S., Palocci, C., Cernia, E., D'Acquarica, I., Lotti, M., Alberghina, L. & Botta, M. (2000). Design and realization of a tailor-made enzyme to modify the molecular recognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* lipase. *Biochim Biophys Acta* **1543**, 146-58.
- Mannesse, M. L., Boots, J. W., Dijkman, R., Slotboom, A. J., van der Hijden, H. T., Egmond, M. R., Verheij, H. M. & de Haas, G. H. (1995a). Phosphonate analogues of triacylglycerols are potent inhibitors of lipase. *Biochim Biophys Acta* **1259**, 56-64.
- Mannesse, M. L., Cox, R. C., Koops, B. C., Verheij, H. M., de Haas, G. H., Egmond, M. R., van der Hijden, H. T. & de Vlieg, J. (1995b). Cutinase from *Fusarium solani* pisi hydrolyzing triglyceride analogues. Effect of acyl chain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity. *Biochemistry* **34**, 6400-7.
- Martinelle, M., Holmquist, M., Clausen, I. G., Patkar, S., Svendsen, A. & Hult, K. (1996). The role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase. *Protein Eng* **9**, 519-24.
- Martinelle, M., Holmquist, M. & Hult, K. (1995). On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochim Biophys Acta* **1258**, 272-6.
- Martinelle, M. & Hult, K. (1995). Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalysed by *Candida antarctica* lipase B. *Biochim Biophys Acta* **1251**, 191-7.
- Martinez, A., Ostrovsky, P. & Nunn, D. N. (1999). LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components. *Mol Microbiol* **34**, 317-26.
- Martinez, C., Nicolas, A., van Tilbeurgh, H., Egloff, M. P., Cudrey, C., Verger, R. & Cambillau, C. (1994). Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochemistry* **33**, 83-9.
- Mochizuki, N., Yamada, H., Sugai, T. & Ohta, H. (1993). A synthesis of (R)-recifeiolide by the aid of biochemical reaction as the key-step. *Bioorg Med Chem* **1**, 71-5.

- Moore, J. C. & Arnold, F. H. (1996). Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nat Biotechnol* **14**, 458-67.
- Moris-Varas, F., Shah, A., Aikens, J., Nadkarni, N. P., Rozzell, J. D. & Demirjian, D. C. (1999). Visualization of enzyme-catalyzed reactions using pH indicators: rapid screening of hydrolase libraries and estimation of the enantioselectivity. *Bioorg Med Chem* **7**, 2183-8.
- Mustranta, A. (1992). Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**, 61-6.
- Nardini, M., Lang, D. A., Liebeton, K., Jaeger, K. E. & Dijkstra, B. W. (2000). Crystal structure of pseudomonas aeruginosa lipase in the open conformation. The Pprototype For Family I.1 of Bacterial Lipases. *J Biol Chem* **275**, 31219-25.
- Neves Petersen, M. T., Fojan, P. & Petersen, S. B. (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *J Biotechnol* **85**, 115-147.
- Noble, M. E., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R. & Frenken, L. G. (1993). The crystal structure of triacylglycerol lipase from Pseudomonas glumae reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett* **331**, 123-8.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J. & et al. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **5**, 197-211.
- Orrenius, C., Haeffner, F., Rotticci, R., Norin, T. & Hult, K. (1998a). Chiral recognition of alcohol enantiomers in acyl transfer reaction catalysed by Candida Antarctica lipase B. *Biocatalysis and Biotransformation* **16**, 1-15.
- Orrenius, C., van Heusden, C., van Ruiten, J., Overbeeke, P. L., Kierkels, H., Duine, J. A. & Jongejan, J. A. (1998b). Simple conformation space search protocols for the evaluation of enantioselectivity of lipases. *Protein Eng* **11**, 1147-53.
- Ottosson, J. & Hult, K. (2001). Influence of acyl chain length on the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B and its thermodynamic components in kinetic resolution of *sec*-alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , 1025-1028.
- Ottosson, J., Rotticci-Moulder, J. C., Roticci, D. & Hult, K. (2001). Rational Design of enantioselective enzymes requires consideration of entropy. *Protein science* , 1769-74.
- Otwinowski, Z. & W. Minor, W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods in Enzymology, Macromolecular Crystallography, part A ; Academic Press (New York)*. **Volume 276**, 307-326.
- Patkar, S., Vind, J., Kelstrup, E., Christensen, M. W., Svendsen, A., Borch, K. & Kirk, O. (1998). Effect of mutations in Candida antarctica B lipase. *Chem Phys Lipids* **93**, 95-101.
- Patkar, S. A., Björkeling, F., Zundel, M., Schülein, M., Svendsen, A., Heldt-Hansen, H. P. & Gormsen, E. (1993). CaLB purification. *Ind. J. Chem.* **32 B**, 76-80.
- Pleiss, J., Scheib, H. & Schmid, R. D. (2000). The his gap motif in microbial lipases: A determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogs. *Biochimie* **82**, 1043-52.
- Prompers, J. J., Groenewegen, A., Hilbers, C. W. & Pepermans, H. A. (1999). Backbone dynamics of Fusarium solani pisi cutinase probed by nuclear magnetic resonance: the lack of interfacial activation revisited. *Biochemistry* **38**, 5315-27.
- Ransac, S., Ivanova, M., Panaiotov, I. & Verger, R. (1999). Monolayer techniques for studying lipase kinetics. *Methods Mol Biol* **109**, 279-302.
- Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T. & Klebe, G. (1996). A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol* **261**, 470-89.

- Raza, S., Fransson, L. & Hult, K. (2001). Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study. *Protein Sci* **10**, 329-38.
- Reetz, M. T. (2000). Evolution in the test tube as a means to create enantioselective enzymes for use in organic synthesis. *Sci Prog* **83**, 157-72.
- Reetz, M. T. & Dreisbach, C. (1994). Highly efficient lipase catalysed kinetic resolution of chiral amines. *Chimia* **48**, 570.
- Riedel, K., Ohnesorg, T., Krogfelt, K. A., Hansen, T. S., Omori, K., Givskov, M. & Eberl, L. (2001). N-Acyl-L-Homoserine Lactone-Mediated Regulation of the Lip Secretion System in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **183**, 1805-1809.
- Rosenau, F. & Jaeger, K. (2000). Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie* **82**, 1023-32.
- Rotticci, D., Rotticci-Mulder, J. C., Denman, S., Norin, T. & Hult, K. (2001). Improved Enantioselectivity of a Lipase by Rational Protein Engineering. .
- Rubingh, D. N. (1997). Protein engineering from a bioindustrial point of view. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 417-22.
- Sanchez, R. & Sali, A. (1997). Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3. *Proteins Suppl*, 50-8.
- Sanchez, R. & Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with modeller. *Methods Mol Biol* **143**, 97-129.
- Schafferhans, A. & Klebe, G. (2001). Docking ligands onto binding site representations derived from proteins built by homology modelling. *J Mol Biol* **307**, 407-27.
- Scheib, H., Pleiss, J., Kovac, A., Paltauf, F. & Schmid, R. D. (1999). Stereoselectivity of Mucorales lipases toward triacylglycerols--a simple solution to a complex problem. *Protein Sci* **8**, 215-21.
- Scheib, H., Pleiss, J., Stadler, P., Kovac, A., Potthoff, A. P., Haalck, L., Spener, F., Paltauf, F. & Schmid, R. D. (1998). Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward triacylglycerols. *Protein Eng* **11**, 675-82.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. & Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**, 258-68.
- Schmid, H. & Verger, R. (1998). Lipasen, Grenzflächen-Enzyme mit attraktiven Anwendungen. *Angew. Chem.* , 1694-1720.
- Schrag, J. D. & Cygler, M. (1993). 1.8 Å refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. *J Mol Biol* **230**, 575-91.
- Schrag, J. D. & Cygler, M. (1997). Lipases and alpha/beta hydrolase fold. *Methods Enzymol* **284**, 85-107.
- Schrag, J. D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H. J., Schmid, R., Schomburg, D., Rydel, T. J., Oliver, J. D., Strickland, L. C., Dunaway, C. M., Larson, S. B., Day, J. & McPherson, A. (1997). The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* **5**, 187-202.
- Schulz, T., Pleiss, J. & Schmid, R. D. (2000). Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: a quantitative model. *Protein Sci* **9**, 1053-62.
- Schulz, T., Schmid, R. D. & Pleiss, J. (2001). Structural basis of stereoselectivity in *Candida rugosa* lipase-catalyzed hydrolysis of secondary alcohols. *J. Mol. Model.* **7**, 265-70.

- Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H. & Tominaga, Y. (1999). Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc* **76**, 789-793.
- Simons, J. W., Adams, H., Cox, R. C., Dekker, N., Gotz, F., Slotboom, A. J. & Verheij, H. M. (1996). The lipase from *Staphylococcus aureus*. Expression in *Escherichia coli*, large-scale purification and comparison of substrate specificity to *Staphylococcus hyicus* lipase. *Eur J Biochem* **242**, 760-9.
- Simons, J. W., Cox, R. C., Egmond, M. R. & Verheij, H. M. (1999). Rational design of alpha-keto triglyceride analogues as inhibitors for *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry* **38**, 6346-51.
- Stadler, P., Zandonella, G., Haalck, L., Spener, F., Hermetter, A. & Paltauf, F. (1996). Inhibition of microbial lipases with stereoisomeric triradylglycerol analog phosphonates. *Biochim Biophys Acta* **1304**, 229-44.
- Sugihara, A., Tani, T. & Tominaga, Y. (1991). Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *J Biochem (Tokyo)* **109**, 211-6.
- Sussman, J. L., Lin, D., Jiang, J., Manning, N. O., Prilusky, J., Ritter, O. & Abola, E. E. (1998). Protein Data Bank (PDB): database of three-dimensional structural information of biological macromolecules. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**, 1078-84.
- Svendsen, A. (2000). Lipase protein engineering. *Biochim Biophys Acta* **1543**, 223-238.
- Tafi, A., van Almsick, A., Corelli, F., Crusco, M., Laumen, K. E., Schneider, M. P. & Botta, M. (2000). Computer simulations of enantioselective ester hydrolyses catalyzed by *Pseudomonas cepacia* lipase. *J Org Chem* **65**, 3659-65.
- Tanaka, T., Katoh, T. & Fujita, Y. (1994). Isolation of *Pseudomonas plantarii*, pathogen of bacterial seedling blight of rice, from the weeds around the paddy field. *Annals of the phytopathological society of Japan* **60**, 640.
- Tang, S. J., Sun, K. H., Sun, G. H., Chang, T. Y. & Lee, G. C. (2000). Recombinant expression of the *Candida rugosa* lip4 lipase in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **20**, 308-13.
- Theil, F. (1997). *Enzyme in der organischen Synthese*. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg.
- Tuomi, W. V. & 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**, 2638-2647.
- Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S. & Jones, T. A. (1994a). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **2**, 293-308.
- Uppenberg, J., Ohrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T. & Jones, T. A. (1995). Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry* **34**, 16838-51.
- Uppenberg, J., Patkar, S., Bergfors, T. & Jones, T. A. (1994b). Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J Mol Biol* **235**, 790-2.
- Vasel, B., Hecht, H. J., Schmid, R. D. & 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**, 99-115.
- Verger, R. (1976). Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. *Annu Rev Biophys Bioeng* **5**, 77-117.
- Wang, W., Donini, O., Reyes, C. M. & Kollman, P. A. (2001). Biomolecular simulations: recent developments in force fields, simulations of enzyme catalysis, protein-ligand, protein-protein, and protein-nucleic acid noncovalent interactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**, 211-43.

- Winkler, H. U.-P. D. D. H. (1995). PHARMAINFORMATION. *Pharainformation, Allgemeine Ärztekammer Jahrgang 10, Nummer 1, Innsbruck, März 1995*.
- Wright, C. S., Alden, R. A. & Kraut, J. (1969). Structure of subtilisin BPN' at 2.5 angstrom resolution. *Nature* **221**, 235-42.
- Xie, Y. C., Liu, H. Z. & Chen, J. Y. (1998). Effect of water content on enzyme activity and enantioselectivity of lipase-catalyzed esterification of racemic ibuprofen in organic solvents. *Ann N Y Acad Sci* **864**, 570-5.
- Yamaguchi, S., Takeuchi, K., Mase, T., Oikawa, K., McMullen, T., Derewenda, U., McElhaney, R. N., Kay, C. M. & Derewenda, Z. S. (1996). The consequences of engineering an extra disulfide bond in the Penicillium camembertii mono- and diglyceride specific lipase. *Protein Eng* **9**, 789-95.
- Zhu, K., Jutila, A. & Kinnunen, P. K. (2000). Steady state and time resolved effects of guanidine hydrochloride on the structure of Humicola lanuginosa lipase revealed by fluorescence spectroscopy. *Protein Sci* **9**, 598-609.
- Zhu, K., Jutila, A., Tuominen, E. K. & Kinnunen, P. K. (2001a). Effects of i-propanol on the structural dynamics of Thermomyces lanuginosa lipase revealed by tryptophan fluorescence. *Protein Sci* **10**, 339-51.
- Zhu, K., Jutila, A., Tuominen, E. K. J. & Kinnunen, P. K. J. (2001b). Effects of i-propanol on the structural Dynamics of Thermomyces lanuginosa lipase revealed by tryptophan fluorescence. *Protein science* , 339-351.



## ANHANG B ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3D	dreidimensional
Å	Angstroem ( $1 \cdot 10^{-10}$ Meter)
A(x)	Absorption bei einer Wellenlänge von x nm
Abb.	Abbildung
aqua demin.	deionisiertes Wasser
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Cm	Chloramphenicol
d	Tag(e)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Maßeinheit der Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-(Hydroxyethyl)piperazin)-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-thio-b-galaktosid
kat.	katalytisch
kb	Kilobasen
$K_{cat}$	maximale Katalysegeschwindigkeit bei Substratsättigung
$K_M$	Michaelis Konstante (Substratkonzentration bei halbmaximaler Katalysegeschwindigkeit)
Km	Kanamycin
LB	Luria-Bertani (Komplexmedium)
min	Minute(n)
nm	Nanometer
OD <sub>(600)</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
RMS	engl. root mean square
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

## Anhang B Abkürzungsverzeichnis

U	Unit
u/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

### *Lipasen*

<i>AcL</i>	<i>Acinobacter calcoacidum Lipase</i>
<i>BcL (PcL)</i>	<i>Burkholderia cepacia Lipase</i> (vorher <i>Ps. cepacia Lipase</i> )
<i>BpL (BgL, PgL)</i>	<i>Burkholderia plantarii Lipase</i> (vorher <i>Burkholderia glumae</i> oder <i>Pseudomonas glumae Lipase</i> )
<i>CaL B</i>	<i>Candida antarctica Lipase B</i>
<i>CrL</i>	<i>Candida rugosa Lipase</i>
<i>CvL</i>	<i>Chromobacterium viscosum Lipase</i>
<i>FsC</i>	<i>Fusarium solani Cutinase</i>
<i>GcL</i>	<i>Geotrichium candidum Lipase</i>
<i>HIL</i>	<i>Humincola lanuginosa Lipase</i>
<i>HuPL</i>	<i>Human pancreatic Lipase</i>
<i>PaL</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa Lipase</i>
<i>PfL</i>	<i>Ps. fluorescens Lipase</i>
<i>PfrL</i>	<i>Ps. fragi Lipase</i>
<i>PIL</i>	<i>Ps. luteola Lipase</i>
<i>PvL</i>	<i>Ps. vulgaris Lipase</i>
<i>PwL</i>	<i>Ps. wisconsin Lipase</i>
<i>RdL</i>	<i>Rhizopus delmar Lipase</i>
<i>RmL</i>	<i>Rhizomucor mihei Lipase</i>
<i>VcL</i>	<i>Vibrio cholerae Lipase</i>

*Aminosäuren*

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

## VERÖFFENTLICHUNGEN :

Aus der vorliegenden Arbeit sind bisher folgende Posterbeiträge, Publikationen und Patente hervorgegangen:

**M. Bocola, H. D. Gerber, K. Ditrich, T. Friedrich, C. Sotriffer, M.T. Stubbs, B. Hauer, G. Klebe**

Substrate flexibility as a putative stereoselectivity criterion  
X-ray structures, thermodynamics and molecular modeling  
of *Candida antarctica* Lipase B

Poster BIOTRANS 2001, Darmstadt

**Hauer, B. Klebe, G. Bocola, M. Matuschek, Stürmer, R.**

Enzymvarianten von Lipasen

Durch rationales Protein Design wurden Lipasevarianten erhalten, die eine erhöhte spezifische Aktivität bei der Umsetzung von racemischen trans-2-Methoxycyclohexanol mit Vinylaurat aufweisen.

Deutsche Patentanmeldung, in Zusammenarbeit mit der BASF AG

M. Bocola, H.-D. Gerber, B. Hauer, T. Friedrich, K. Ditrich, G. Klebe

Titrimetric determination of enantiopreference of lipases using enantiopure phospho-analog transition state inhibitors

ChemBioChem (to be submitted)

M. Bocola, M.T.S. Stubbs, C. Sotriffer, B. Hauer, T. Friedrich, K. Ditrich, G. Klebe

Residual mobility of the transition state determines enantiopreference of *Candida antarctica* Lipase B towards phenylethylamine substrates: Evidence from X-ray crystallography, kinetic data and molecular dynamics.

ChemBioChem (to be submitted)