

***Molecular-Modelling*-Untersuchungen  
enzymkatalysierter  
Ringöffnungspolymerisationen der  
*Candida antarctica* Lipase B**

Von der Fakultät für Naturwissenschaften

Department Chemie

der Universität Paderborn

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

**Iris Schönen**

geb. Baum

Paderborn, Oktober 2011

Eingereicht am: 24.10.2011

Mündliche Prüfung am: 18.11.2011

Referent: Prof. Dr. Gregor Fels

Korreferent: Prof. Dr. Katja Loos

## Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2008 bis Oktober 2011 an der Universität Paderborn im Fachbereich Organische Chemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. Gregor Fels angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Gregor Fels danke ich für die interessante Themenstellung, die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und sein stets offenes Ohr.

Frau Prof. Dr. Katja Loos danke ich sowohl für die langjährige fruchtbare Zusammenarbeit als auch für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Leendert Schwab und Frau Erythrina Stavila vom Zernike Institute for Advanced Materials der Universität Groningen danke ich für die vielen Diskussionen, die durch die Synergie ihrer präparativen Arbeiten und meiner Modellierungen viele neue Lösungsansätze geliefert haben. Den Mitarbeitern des PC<sup>2</sup> (*Paderborn Center for Parallel Computing*) danke ich für den schnellen und zuverlässigen Support. Herrn Prof. Dr. Jordis (Universität Wien) danke ich für die Berechnung der pK<sub>a</sub>-Werte der  $\beta$ -Alaninoligomere im wässrigen Medium.

Den Mitarbeitern meines Arbeitskreises, Herrn Dr. Markus Tusch, Frau Dr. Brigitta Elsässer, Herrn Lars Haller, Herrn Dr. Jens Krüger und Frau Dr. Silvia Dohmeier-Fischer danke ich für den fachlichen Austausch und das angenehme Arbeitsklima. Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei den Freunden und Kollegen, die mich während meiner Zeit in Paderborn begleitet haben und diese unvergesslich machen.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann und Wegbegleiter Stephan für seine Unterstützung in den letzten Jahren und seine Fürsorge in den letzten Wochen, sowie auch meiner restlichen Familie dafür, dass sie für mich da sind.





*meiner Familie*



## Kurzfassung

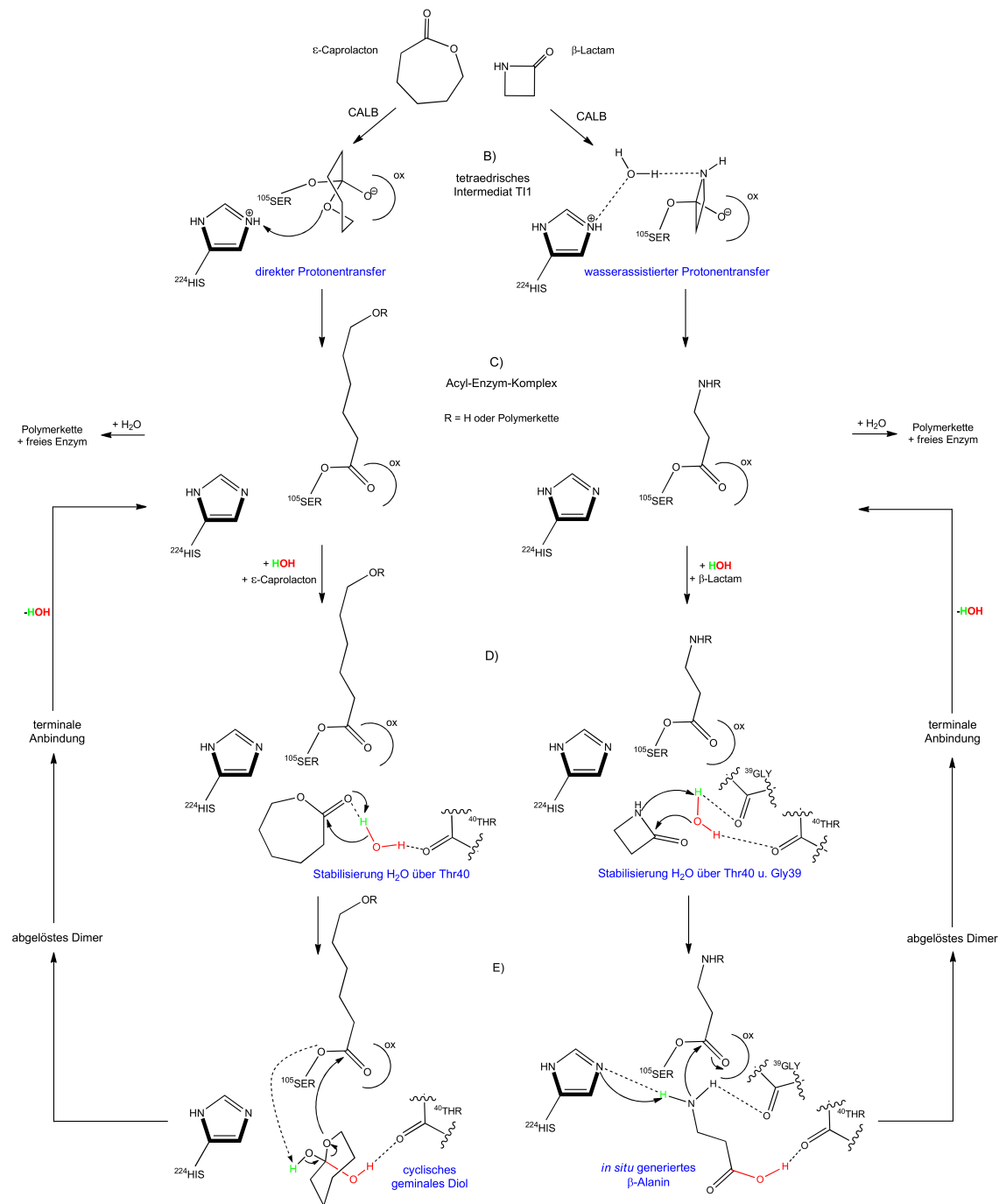
In der vorliegenden Arbeit erfolgte die mechanistische Aufklärung der durch *Candida antarctica* Lipase B (CALB) katalysierten Ringöffnungspolymerisationen von  $\beta$ -Lactam und  $\epsilon$ -Caprolacton mittels *Molecular-Modelling*-Techniken. Im Gegensatz zu Polyestern sind Polyamide bisher nicht durch lipasekatalysierte Polymerisationsreaktionen zugänglich. Eine Ausnahme bildet hier die Polymerisation von  $\beta$ -Lactam mit CALB als erstes Beispiel einer enzymkatalysierten Polyamidbildung, wobei das resultierende unverzweigte Nylon 3 (Poly( $\beta$ -Alanin)) allerdings nur eine maximale Kettenlänge von 18 und eine durchschnittliche Länge von acht Monomereinheiten aufweist. Gründe für diese, trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit zwischen Lactonen und Lactamen, sehr unterschiedlich ausgeprägte Polymerisierbarkeit waren in der Vergangenheit nicht ersichtlich, zumal die molekularen Abläufe dieser Polymerisationen gänzlich unerforscht waren. Ziel dieser Arbeit war daher die vergleichende Untersuchung der Polymerisationsmechanismen von Lactamen und Lactonen am Beispiel der  $\beta$ -Lactam-Polymerisation als einzig bekannter Polyamidbildung und der  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation als Paradebeispiel einer in Polymeren mit hohen Molekulargewichten resultierenden Lactonpolymerisation.

Durch Anwendung von molekularen Simulationsverfahren wie Docking, Molekulardynamik und QM/MM-Berechnungen konnten die grundlegenden Schritte der CALB-katalysierten Polymerisationen von  $\beta$ -Lactam und  $\epsilon$ -Caprolacton auf molekularer Ebene geklärt werden. Zunächst tritt ein Monomer in die Bindungstasche der CALB ein und wird durch nucleophilen Angriff des Serins der katalytischen Triade (Ser105) an das Enzym gebunden. Die im nächsten Schritt erforderliche Ringöffnung des resultierenden ersten tetraedrischen Intermediates TI1 (s. Schema 0.1B) erfordert einen Protonentransfer vom katalytischen Histidin (His224), das nun das Serinproton trägt, zum Ringheteroatom des gebundenen Liganden. Im TI1 der Lactonpolymerisation liegt der Ringsauerstoff des ehemaligen  $\epsilon$ -Caprolactons auf der sogenannten Alkoholseite des Enzyms und übernimmt das Histidinproton in einem direkten Protonentransfer. Im Gegensatz dazu

bildet  $\beta$ -Lactam mit CALB einen inversen TI1, dessen Ringstickstoff auf der Acylseite angeordnet ist, und der Protonentransfer kann einzig unter Verwendung eines Wassermoleküls als Protonenshuttle stattfinden, was ein Hemmnis der Polymerisation darstellt. Die in beiden Polymerisationen gebildeten Acyl-Enzym-Komplexe (s. Schema 0.1C) sind dagegen komplett analog zueinander. Eine Hydrolyse des Acyl-Enzym-Komplexes, die eine ständige Konkurrenz zur Kettenverlängerung darstellt, bewirkt die Freisetzung der entsprechenden Säuren  $\beta$ -Alanin ( $pK_a$  3,6) bzw. 6-Hydroxyhexansäure ( $pK_a$  4,75). Während 6-Hydroxyhexansäure jedoch keinen Einfluss auf das Enzym hat, ist  $\beta$ -Alanin bedingt durch seine höhere Azidität in der Lage das Histidin der katalytischen Triade irreversibel zu protonieren. Das betreffende Enzym wird auf diesem Wege inaktiviert und nimmt nicht weiter an der Polymerisationsreaktion teil. Dies führt zu den bei der  $\beta$ -Lactam-Polymerisation beobachteten kurzen Kettenlängen.

Die Kettenverlängerung des Acyl-Enzym-Komplexes verläuft über ein aktiviertes Monomer (s. Schema 0.1E), das durch Addition eines katalytisch genutzten kristallographischen Wassermoleküls an das Monomer (s. Schema 0.1D) gebildet wird. Auch hier unterscheiden sich die gefundenen Mechanismen der Lactam- und Lactonpolymerisation deutlich. Bei der Polymerisation von  $\beta$ -Lactam erfolgt die Kettenverlängerung durch ein *in situ* generiertes  $\beta$ -Alanin, das bei Hydrolyse von  $\beta$ -Lactam gebildet wird. Einzig aufgrund der guten Stabilisierung dieses  $\beta$ -Alanins in der Bindungstasche der CALB und nur wenn diese gegeben ist, ist die Nutzung eines solchen aziden Monomers und somit die gesamte Polymerisation überhaupt erst möglich. Der kettenverlängernde Schritt der  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation verläuft hingegen problemlos über ein neutrales cyclisches geminales Diol.

Das durch sofortige Ablösung der verlängerten Kette resultierende freie Dimer bzw. Oligomer wird im darauffolgenden Schritt durch nucleophilen Angriff des Ser105 an der terminalen Carboxylgruppe neu angebunden und ergibt nach Abspaltung des katalytischen Wassermoleküls einen verlängerten Acyl-Enzym-Komplex.



**Schema 0.1:** Wichtige Zwischenstufen im Katalysezyklus der *Candida antarctica* Lipase B katalysierten Ringöffnungspolymerisationen von  $\beta$ -Lactam und  $\epsilon$ -Caprolacton im Vergleich (ox: oxyanion hole). Die entscheidenden Unterschiede beider Polymerisationen liegen in der zueinander inversen Anbindung des tetraedrischen Intermediates TI1 und den mechanistischen Details bei der Kettenverlängerung der Acyl-Enzym-Komplexe.



## Abstract

The present thesis describes the mechanism of the *Candida antarctica* lipase B (CALB) catalyzed ring-opening polymerization of  $\beta$ -lactam and  $\epsilon$ -caprolactone which has been elucidated by molecular modelling techniques. In contrast to polyesters, polyamides are not yet accessible via lipase catalyzed polymerization. As the only exception  $\beta$ -lactam can enzymatically be polymerized by CALB resulting in unbranched nylon 3 (poly( $\beta$ -alanine)), with, however, a maximum chain length of only 18 and an average length of 8 monomer units. Reasons for this different polymerizability of lactones and lactams were unapparent in the past despite of their great structural similarity, especially as the molecular basis of these polymerizations was completely uninvestigated. With this background, the aim of this thesis was a comparative study of mechanistic details of the CALB-catalyzed polymerization of lactams and lactones particularly using  $\beta$ -lactam as the monomer of the only known polyamide formation and  $\epsilon$ -caprolactone as the most prominent example of a lactone polymerization yielding a polymer of high molecular weights.

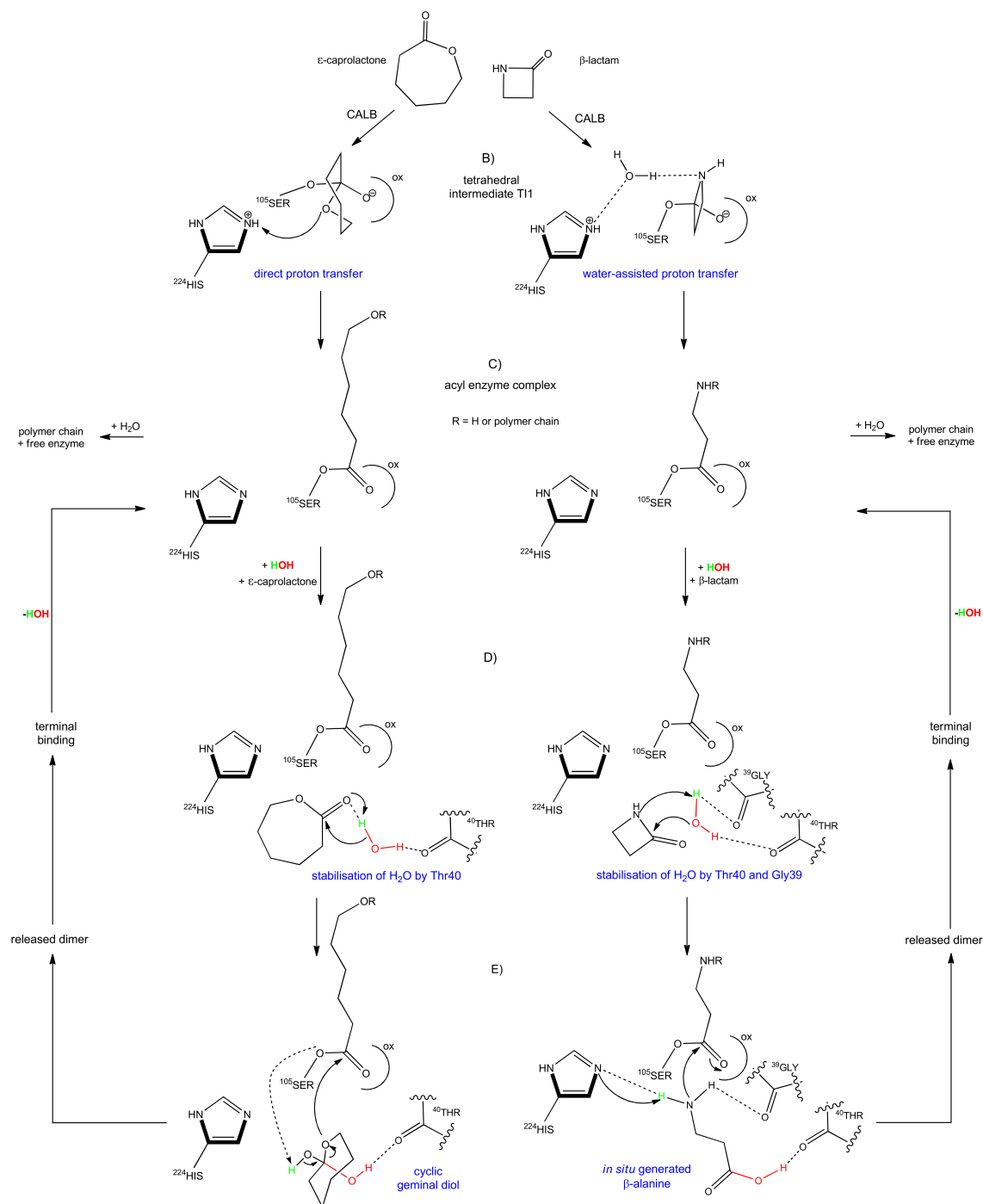
The basic steps of the CALB-catalyzed polymerization of  $\beta$ -lactam and  $\epsilon$ -caprolactone were investigated with atomistic details based on experimental data by applying molecular modelling techniques like docking, molecular dynamics and QM/MM-procedures. The reaction sequence starts with a monomer entering the CALB active site, where it is covalently bound by nucleophilic attack of serine Ser105 which is part of the enzyme's catalytic triade. The subsequent step requires a ring-opening of the resulting tetrahedral intermediate TI1 (see scheme 0.2B) involving a proton transfer from the catalytic histidine (His224), which transfers the serine-proton to the ring heteroatom of the bound ligand. In the TI1 of the lactone reaction sequence the ring-oxygen of the former  $\epsilon$ -caprolactone is oriented towards the so called alcohol side of the binding pocket and takes up the histidine-proton by a direct proton transfer. In contrast,  $\beta$ -lactam forms an inverse TI1, whose ring-nitrogen is oriented on the acyl side and in which the proton transfer can only occur by help of a crystallographic water molecule of the enzyme as proton shuttle.

The resulting acyl enzyme complexes from  $\beta$ -lactam and  $\epsilon$ -caprolactone are completely analogous (see scheme 0.2C). Release of the acyl chain from the enzyme by hydrolytic cleavage, which permanently competes with chain elongation, and which causes liberation of the corresponding acids  $\beta$ -alanine ( $\text{pK}_a$  3.6) and 6-hydroxyhexanoic acid ( $\text{pK}_a$  4.75), respectively. However, while 6-hydroxyhexanoic acid does not affect the enzyme's activity,  $\beta$ -alanine featuring a higher acidity is able to protonate the histidine residue of the catalytic triade irreversibly. This leads to an inactivation of the enzyme and terminates for this particular enzyme molecule the polymerization process. As a result only short polymer chains are accessible as it is observed in the CALB-catalyzed  $\beta$ -lactam polymerization.

Chain elongation of the acyl enzyme complex proceeds via an activated monomer (see scheme 0.2E), which is formed by addition of a catalytic water molecule to the monomer (see scheme 0.2D). Again, the proposed mechanisms of the lactam- and lactone-polymerization differ significantly in this step. Chain elongation of  $\beta$ -lactam polymerization proceeds via an *in situ* generated  $\beta$ -alanine, which is formed by hydrolysis of a  $\beta$ -lactam molecule inside the binding site. The good stabilization of this  $\beta$ -alanine inside the CALB active site is the important feature that enables utilization of this molecule despite of its comparatively strong acidity and prevents inhibition of the enzyme. In contrast, the chain elongating step of the  $\epsilon$ -caprolactone polymerization takes place via a neutral cyclic geminal diol.

After chain elongation the dimer or oligomer, respectively, is released from the enzyme and is rebound with its terminal carboxyl group by nucleophilic attack of Ser105 which yields an elongated acyl enzyme complex while the catalytic water molecule is liberated and can be used for the next elongation step.





**Schema 0.2:** Comparison of important intermediates of the catalytic cycle of the *Candida antarctica* lipase B catalyzed ring-opening polymerization of  $\beta$ -lactam and  $\epsilon$ -caprolactone, respectively (ox: oxyanion hole). The crucial differences of the two reaction sequences are the inverse binding of the tetrahedral intermediates TI1 and the mechanistic details concerning the chain elongation of the acyl enzyme complexes.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung</b>	<b>I</b>
<b>Abstract</b>	<b>V</b>
<b>Publikationen</b>	<b>XI</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Biokatalyse . . . . .	2
1.2 Enzyme . . . . .	6
1.3 Lipasen . . . . .	13
1.4 <i>Candida antarctica</i> Lipase B . . . . .	18
1.4.1 Struktur und Mechanismus . . . . .	18
1.4.2 Selektivität der <i>Candida antarctica</i> Lipase B . . . . .	22
1.4.3 Lösungsmiteleinfluss auf <i>Candida antarctica</i> Lipase B . . . . .	27
1.4.4 pH-Abhängigkeit der <i>Candida antarctica</i> Lipase B . . . . .	29
1.5 Lipase-katalysierte Polymerisationen . . . . .	31
<b>2 Aufgabenstellung</b>	<b>39</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1 CALB-katalysierte $\beta$ -Lactam-Polymerisation . . . . .	41
3.1.1 Katalyseschritte der CALB-katalysierten Polyamidbildung . . . . .	46
3.2 CALB-katalysierte $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation . . . . .	65
3.2.1 Katalyseschritte der CALB-katalysierten Polyesterbildung . . . . .	65

---

<b>4</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>79</b>
4.1	Vergleich der $\beta$ -Lactam- und $\varepsilon$ -Caprolacton-Polymerisation . . . . .	79
4.2	Ausblick . . . . .	88
<b>5</b>	<b>Strukturen und Methoden</b>	<b>91</b>
5.1	Workflow . . . . .	91
5.2	Verwendete Strukturen . . . . .	91
5.3	pK <sub>a</sub> -Berechnungen . . . . .	92
5.4	Docking-Studien mit QXP . . . . .	92
5.4.1	Quick eXPlore . . . . .	92
5.4.2	Definition des Dockingvolumens . . . . .	94
5.4.3	Rescoring der Dockingergebnisse . . . . .	96
5.4.4	Aufbereitung der Dockingstrukturen und Berechnung der Proto- nierungszustände . . . . .	98
5.5	Energieminimierungen . . . . .	99
5.5.1	Grundlagen . . . . .	99
5.5.2	Durchführung . . . . .	101
5.6	Molekulardynamische Untersuchungen . . . . .	102
5.6.1	Grundlagen . . . . .	102
5.6.2	Durchführung . . . . .	103
5.7	QM/MM-Geometrieoptimierungen . . . . .	103
5.7.1	Grundlagen . . . . .	103
5.7.2	Durchführung . . . . .	105
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>XV</b>

## Publikationen

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Veröffentlichungen erschienen:

Baum I., Elsässer B., Schwab L.W., Loos K., Fels G., Atomistic model for the polyamide formation from  $\beta$ -lactam by *Candida antarctica* Lipase B., *ACS Catalysis* **2011**, *1*:323-336

Fels G., Baum I., Molecular Modeling Approach to Enzymatic Polymerization. in “Biocatalysis in Polymer Chemistry”, Loos K. (Herausgeber), Wiley-VCH (978-3-527-32618-1), **2010**, Kapitel 14, 349-368

Schwab L.W., Baum I., Fels G., Loos K., Mechanistic Insight in the Enzymatic Ring-Opening Polymerization of  $\beta$ -Propiolactam. in “Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials”, Cheng H. N., Gross R. A. (Herausgeber), *ACS Symposium Series*, American Chemical Society, **2010**, Kapitel 19, 265-278



## Verwendete Abkürzungen

### Aminosäuren

Aminosäure	Code
Alanin	Ala
Arginin	Arg
Asparagin	Asn
Asparaginsäure	Asp
Cystein	Cys
Glutaminsäure	Glu
Glutamin	Gln
Glycin	Gly
Histidin	His
Isoleucin	Ile
Leucin	Leu
Lysin	Lys
Methionin	Met
Phenylalanin	Phe
Prolin	Pro
Serin	Ser
Threonin	Thr
Tryptophan	Trp
Tyrosin	Tyr
Valin	Val

**Abkürzungen****Abkürzung    Bedeutung**

ATP	Adenosintriphosphat
CALB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CL	Caprolacton
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DNA	Desoxyribonucleinsäure
LMCS	<i>local Monte Carlo search algorithm</i>
MC	Monte Carlo
MD	Molekulardynamik
MM	Molekularmechanik
MOE	Molecular Operating Environment
N435	Novozyme435
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
PCA	Hauptkomponentenanalyse ( <i>Principal Component Analysis</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDB	Protein Data Base
PDL	15-Pentadecanolid
QM	Quantenmechanik
QXP	Quick eXPlore
VL	Valerolacton



# 1 Einleitung

Polymere sind in unserer heutigen Technologiegesellschaft in nahezu allen Lebensbereichen vertreten und aus dem Alltag nicht mehr wegzudenken. Seit Begründung der Polymerchemie durch den Chemiker Hermann Staudinger, der seine Theorien zum strukturellen Aufbau von Polymerketten im Jahr 1920 veröffentlichte<sup>[1]</sup> und für seine Arbeiten auf diesem Gebiet im Jahr 1953 den Nobelpreis für Chemie erhielt,<sup>[2]</sup> entstand ein eigenständiger Industriezweig mit rasantem Aufschwung.

Unter dem Handelsnamen Nylon kam kurz vor dem zweiten Weltkrieg die erste vollsynthetische Faser auf den Markt: Polyamid 6.6, ein Polykondensat aus Hexamethyldiamin und Adipinsäure. Diese Erfindung des US-amerikanischen Chemikers Wallace H. Carothers, 1938 von DuPont patentiert,<sup>[3],[4]</sup> wurde zunächst für zivile Zwecke, wie Zahnbürsten und Damenstrumpfhosen, eingesetzt, entwickelte sich allerdings zusammen mit dem deutschen Konkurrenzprodukt Perlon (Polyamid 6 aus  $\epsilon$ -Caprolactam)<sup>[5],[6]</sup> zum kriegswichtigen Rohstoff zur Herstellung von Fallschirmen. Seit 1950 ist ein kontinuierliches Wachstum der Weltproduktion von Kunststoffen von 1,5 Mio. t (1950), über bereits 50 Mio. t im Jahr 1976 bis hin zu 230 Mio. t (2009) zu verzeichnen, was einem durchschnittlichen Wachstum von 9,0 % entspricht.<sup>[7]</sup> Die großtechnische Herstellung von Polyamid 6.6 erfolgt in der Schmelze durch Bulkpolymerisation eines Salzes aus Adipinsäure und Hexamethyldiamin (AH-Salz) bei ca. 290 °C und 2,7 MPa im kontinuierlichen Röhrenreaktor.<sup>[5]</sup> Polyamid 6 wird hauptsächlich über die hydrolytische Polymerisation einer 80-90 %igen wässrigen Lösung von  $\epsilon$ -Caprolactam unter Zusatz kleiner Mengen Essigsäure gewonnen, wobei die Polymerisation chargenweise bei 260 °C abläuft.<sup>[5]</sup>

Die meisten klassischen Polymerisationsverfahren sind energie- und somit auch kostenintensiv, sowie aus ökologischen Gesichtspunkten problematisch. In den letzten Jahren geht der Trend hin zur Entwicklung ökologisch und ökonomisch sinnvollerer Verfahren, wie dem Einsatz enzymkatalysierter Synthesen. Enzymkatalysierte Polymerisationen

können unter milderen Bedingungen und somit kostensparend durchgeführt werden, tragen durch die Wiederverwendung des Katalysators zu einer besseren ökologischen Bilanz bei, bieten durch ihrer hohe Regio- und Stereoselektivität neue Synthesemöglichkeiten und sind auch in organischen Lösungsmitteln möglich. Des Weiteren können hochreine Produkte, die frei von Rückständen der sonst üblichen organometallischen Polymerisationsinitiatoren sind, hergestellt werden. Durch ihre gesundheitliche Unbedenklichkeit sind diese auch für biomedizinische Anwendungen geeignet.<sup>[8]</sup> Der Mechanismus enzymkatalysierter Polymerisationen ist auf molekularer Ebene kaum erforscht, was eine Optimierung der Prozesse schwierig macht. Mit Methoden des *Molecular Modelling* ist das Studium dieser molekularen Abläufe möglich, wodurch auf langfristige Sicht eine Optimierung der Prozesse durch gezielte Mutation des Enzymkatalysators erreicht werden kann.

## 1.1 Biokatalyse

Biokatalytische Verfahren werden bereits seit Jahrtausenden zur Herstellung von Lebensmitteln wie Käse, Sojasauce, Wein oder Bier eingesetzt. Bei diesen zunächst zufällig entdeckten und später technisierten Verfahren handelt es sich um Fermentationen, in denen mehrstufige Synthesen unter Verwendung von biokatalytisch aktiven lebenden Zellen ablaufen. Im letzten Jahrhundert kamen zahlreiche neue biotechnologische Synthesen hinzu, beispielsweise fermentative Verfahren zur Herstellung von Antibiotika wie Penicillin, Vitaminen und Aminosäuren, sowie großtechnische Prozesse zur Gewinnung von Glycerin und Herstellung von Lösungsmitteln über die Aceton-Butanol-Gärung.<sup>[9]–[11]</sup>

Neben der Fermentation ist als zweite bedeutsame Gruppe biokatalytischer Verfahren die Biotransformation zu nennen, bei der keine lebenden Organismen, sondern isolierte Enzyme eingesetzt werden, die dem Reaktionsgemisch entweder in löslicher Form oder auf einem Träger immobilisiert zugesetzt werden.<sup>[9]</sup> Die Verwendung freier Enzyme in Lösung erweist sich aufgrund ihrer eingeschränkten Aktivität und Stabilität als problema-

tisch. Ferner ist eine Zurückgewinnung des Katalysators nicht möglich, was den entscheidenden Vorteil eines immobilisierten Enzyms gegenüber dem freien Enzym darstellt.<sup>[12]</sup> Erste Versuche zur Immobilisierung von Enzymen erfolgten zwar bereits Anfang des letzten Jahrhunderts, der Erfolg dieses Vorhabens ließ allerdings weitere 40 Jahre auf sich warten bis in den 50er- und 60er-Jahren eine hinreichende Stabilität des immobilisierten Enzyms auf seinem Träger gewährleistet werden konnte.<sup>[12],[13]</sup> Die Wahl des Trägermaterials und des Verfahrens zur Immobilisierung ist entscheidend um eine hohe Aktivität und Stabilität des Enzympräparates zu erreichen. Die gebräuchlichste Methode zur Immobilisierung bildet die physikalische Adsorption, bei der das Enzym nur über Van-der-Waals-Kräfte, ionische und hydrophobe Wechselwirkungen gebunden ist. Vorteil dieser Methode ist die kostengünstige Durchführbarkeit und der geringe Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Diese Anbindung von Enzymen durch relativ schwache physikalische Wechselwirkungen hat jedoch im Vergleich zur zweithäufigsten Immobilisierungsmethode, der kovalenten Anbindung, den Nachteil, dass mit der Zeit eine Desorption des Proteins erfolgt. Durch kovalente Anbindung kann dieser ständige Katalysatorverlust behoben werden, wobei allerdings eine Verringerung der Enzymaktivität auftritt, da die erhöhte Bindungsstärke eine sich meist nachteilig auswirkende Konformationsänderung des Proteins hervorruft. Als Trägermaterialien für die physikalische Adsorption von Enzymen werden häufig Polymere, aber auch Kohlenstoffnanofasern, Silica und Celite verwendet, während die kovalente Anbindung auf Trägermaterialien erfolgt, deren reaktive Gruppen, wie zum Beispiel Epoxidringe, mit den Aminogruppen des Proteins reagieren.<sup>[12]</sup>

Obwohl in der Vergangenheit vor allem fermentative Prozesse industriell genutzt wurden, gewinnen auch Biotransformationen immer mehr an Bedeutung. Diese lassen sich, im Vergleich zur Verwendung ganzer Zellen bei Fermentationen, wesentlich komfortabler in kontinuierlichen Prozessen umsetzen. Das immobilisierte Enzym ist dabei wie ein klassischer heterogener Katalysator verwendbar.<sup>[14]</sup> Tabelle 1.1 zeigt beispielhaft einige großtechnisch angewandte Biotransformationen unter Verwendung immobilisierter Enzyme.<sup>[11],[15]–[18]</sup> Hier fällt als besonders umsatzstarker Bereich die Lebensmittelindus-

trie ins Auge, während die Bereiche Pharma und Feinchemikalien eher eine Nebenrolle spielen. Als weiteres bedeutendes Einsatzgebiet von Enzymen sind Wasch- und Reinigungsmittel zu nennen, gefolgt von wesentlich geringeren Anteilen in der Textil- und Lederindustrie.<sup>[14]</sup>

In den letzten Jahren wurde das enorme Potential der Biokatalyse bezüglich der Herstellung enantiomerenreiner Produkte jedoch auch von der chemischen Industrie und der Pharmaindustrie erkannt, weshalb auch in diesem Sektor immer häufiger enzymkatalysierte Synthesen zur Anwendung kommen.<sup>[18],[19]</sup> Letztlich entscheidet jedoch der Kostendruck, ob eine Synthese auf klassischem chemischen oder biokatalytischem Weg erfolgt. Somit ist die kostengünstige Verfügbarkeit von Enzymen besonders wichtig für die industrielle Anwendbarkeit der Biokatalyse. Dies kann durch Herstellung rekombinanter Proteine mittels Klonierung gewährleistet werden.<sup>[19]</sup> Dabei wird zunächst die DNA eines Organismus, der ein katalytisch interessantes Enzym herstellt, isoliert und aufgereinigt, woraufhin das für diese Enzymsynthese verantwortliche Gen identifiziert und mittels der PCR-Methode (*polymerase chain reaction*) kloniert wird. Über einen sogenannten Vektor, ein Plasmid bestehend aus einem DNA-Doppelstrang, kann das klonierte Gen in einen Wirt (z.B. das Bakterium *Escherichia coli*) eingebaut werden. Nach Vermehrung des Wirtsorganismus tragen die Tochterzellen das auf diesem Wege eingeschleuste Gen und können durch induzierte Überexpression das gewünschte Enzym in hinreichend großer Menge produzieren.<sup>[11],[20]</sup>

Weitere Kriterien für den industriellen Einsatz eines Biokatalysators sind ausreichend hohe Aktivität und Stabilität sowie Substratspezifität des Enzyms.<sup>[19]</sup> Während Aktivität und Stabilität des Enzyms sich, wie bereits beprochen, maßgeblich durch die Art der Immobilisierung beeinflussen lassen, müssen zur Erhöhung der Substratspezifität gezielte Veränderungen am Enzym selbst vorgenommen oder andere geeignetere Biokatalysatoren gefunden werden. Die Suche nach neuen Biokatalysatoren erfolgt heutzutage meist über das Screening (*high-throughput screening*) kommerziell erhältlicher Enzymdatenbanken, wobei mittels eines entsprechenden Assays Enzyme gefunden werden können,

**Tabelle 1.1:** Industriell angewandte Biotransformationen

Produkt	Edukt	Reaktion	Enzym	Enzymklasse	Produktions- maßstab (pro Jahr) <sup>[11]</sup>
Maissirup <sup>[15]</sup> ( <i>High-fructose corn syrup</i> )	D-Glucose	Isomerisierung	Glucoseisomerase	Isomerase (EC5)	> 1 Mio. t
Lactose-freie Milch <sup>[16]</sup> (D-Glucose und D-Galactose)	D-Lactose	Hydrolyse	Lactase	Hydrolase (EC3)	> 100.000 t
Kakaobutter <sup>[17]</sup> <sup>a</sup>	1,3-Dipalmitoyl- 2-monoolein (POP)	Umesterung	<i>Candida rugosa</i> Lipase	Hydrolase (EC3)	> 10.000 t
6-Aminopenicillansäure <sup>[11]</sup>	Penicillin G	Hydrolyse	Penicillinamidase	Hydrolase (EC3)	> 1.000 t
L-Asparaginsäure <sup>[11]</sup>	Fumarsäure	Addition von Ammoniak	Aspartase	Lyase (EC4)	> 1.000 t
Ampicillin <sup>[11]</sup>	6-Aminopenicillansäure und D-Phenylglycinamid	Acylierung	Penicillinamidase	Hydrolase (EC3)	> 100 t
L-Maleinsäure <sup>[18]</sup>	Fumarsäure	Addition von Wasser	Fumarase	Lyase (EC4)	> 100 t
L-Alanin <sup>[18]</sup>	L-Asparaginsäure	Decarboxylierung	L-Aspartat- $\beta$ -Decarboxylase	Lyase (EC4)	> 100 t

<sup>a</sup>bestehend aus 1(3)-Palmitoyl-3(1)-Stearoyl-2-monoolein (POSt) und 1,3-Distearoyl-2-monoolein (StOSt)

die eine hohe Aktivität für bestimmte Reaktionen aufweisen.<sup>[21]</sup> Allerdings rückt auch das aufwändigere *Protein Engineering*, das gezielte Design von Biokatalysatoren, immer mehr in den Fokus der Forschung.<sup>[22]</sup> Man unterscheidet dabei einerseits zwischen der zielgerichteten Mutagenese (*site-directed mutagenesis*), bei der Aminosäuren des Enzyms gezielt ausgetauscht werden, was zwangsläufig eine tiefgehende Kenntnis des Enzyms erfordert und trotzdem nicht immer zum Erfolg führt,<sup>[22]</sup> und andererseits der gerichteten Evolution (*directed evolution*), die sich in den meisten Fällen als die Methode der Wahl erwiesen hat. Die gerichtete Evolution nutzt eine iterative Herangehensweise, bei der zunächst eine zufällige oder zielgerichtete Mutagenese durchgeführt wird, die Mutanten im Hinblick auf die gewünschten katalytischen Eigenschaften untersucht und die erfolgsversprechendsten Mutanten weiter optimiert werden.<sup>[23]</sup> Ein prominentes Beispiel für den Einsatz genetisch veränderter Organismen ist die Produktion von Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) durch Hefen und Bakterien. So konnte die gegen zu hohe Eisenkonzentrationen empfindliche Riboflavin-Produktion der Hefe *Candida famata* durch Auswahl von entsprechenden eisenresistenten Mutanten wesentlich verbessert werden.<sup>[24]</sup>

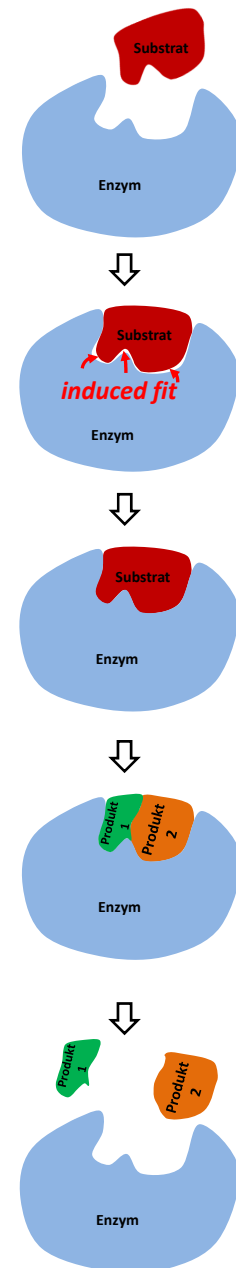
## 1.2 Enzyme

Enzyme sind hochmolekulare katalytisch aktive Proteine, in der Regel bestehend aus linearen Ketten proteinogener Aminosäuren, die durch Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Die katalytische Aktivität von Enzymen beruht auf der besonderen räumlichen Anordnung der Peptidketten, die nicht in langgestreckter Form, sondern als gefaltete Kette, in der sogenannten Sekundärstruktur, vorliegen. Je nach Anordnung unterscheidet man dabei zwischen  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt. Der Wechsel zwischen verschiedenen Strukturabschnitten eines Enzyms erfolgt über sogenannte  $\beta$ -Schleifen. Besonders bei globulären Proteinen, zu denen die meisten Enzyme gehören, können nicht alle Kettenabschnitte eine Sekundärstruktur aufweisen, da sonst die für diese Proteine typische sphärische Form nicht realisierbar wäre. Aus der räumlichen Anordnung der einzelnen

Strukturabschnitte des Proteins ergibt sich die Tertiärstruktur, deren Stabilisierung über Wasserstoffbrückenbindungen, Disulfid-Brücken, ionische und hydrophobe Wechselwirkungen erfolgt.<sup>[25],[26]</sup> Der Erhalt dieser Tertiärstruktur ist von elementarer Bedeutung für die katalytische Aktivität eines Enzyms.

Durch Visualisierung der Oberfläche eines Proteins wird deutlich, dass diese nicht glatt ist, sondern viele Unregelmäßigkeiten und Vertiefungen aufweist. Eine spezielle Vertiefung ist die Bindungstasche (auch: *active site*), in der die Umsetzung des Substrats stattfindet. Bei Ablauf einer Enzymkatalyse tritt zunächst das Substrat in einem diffusionskontrollierten Schritt in die Bindungstasche des Enzyms ein (s. Abb. 1.1). Enzymkatalysierte Reaktionen sind substratspezifisch, d.h. von einem Enzym werden nur bestimmte Substrate bzw. Substratgruppen umgesetzt, die den sterischen und elektronischen Gegebenheiten des Enzyms entsprechen. Vereinfacht kann hier von einem Schlüssel-Schloss-Prinzip,<sup>[26]</sup> bei dem das Substrat (Schlüssel) genau zum Schloss (Enzym) passen muss, sprechen. Enzyme verfügen jedoch über eine gewisse Flexibilität, die durch das sogenannte *Induced-fit-Modell*<sup>[27]</sup> wesentlich besser beschrieben wird.

Demnach ist das Enzym in der Lage bei Bindung eines Substrats strukturelle Änderungen zu vollziehen und sich so dem Liganden anzupassen, es bildet sich ein Enzym-Substrat-Komplex, der in einer enzymkatalysierten Reaktion zu einem Enzym-Produkt-Komplex weiterreagiert. In einem letzten Schritt verlassen ein oder mehrere Produkte die *active site*. Auch dieser letzte Schritt unterliegt der Diffusi-

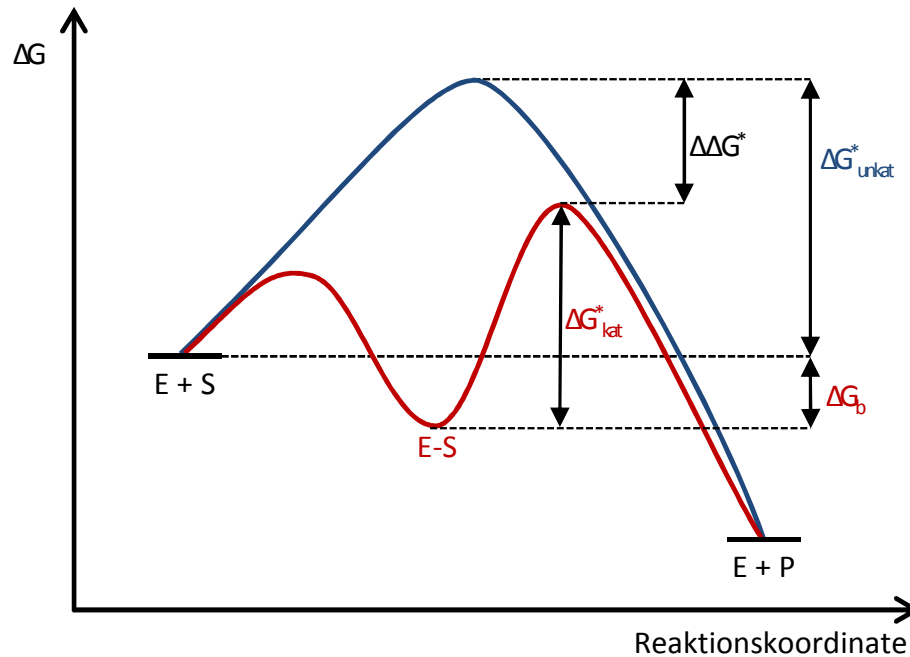


**Abbildung 1.1:** Bindung eines Substrats an ein Enzym nach dem *Induced-fit-Modell*

onskontrolle (s. Abb. 1.1). Das Enzym bleibt als Katalysator im gleichen Zustand wie vor der Reaktion zurück. Das Prinzip der Enzymkatalyse ist für alle Lebewesen von enormer Bedeutung, eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen, die unkatalysiert nicht möglich wären, läuft dank der Enzymkatalyse bei niedrigen Temperaturen ab. Dies ist möglich, da Enzyme die Aktivierungsenergie von Reaktionen durch Veränderung des Reaktionsweges herabsenken. Abbildung 1.2 zeigt den Verlauf der Gibbs'schen freien Enthalpie einer unkatalysierten und einer katalysierten Reaktion in Abhängigkeit von der Reaktionskoordinate.<sup>[11]</sup> Zunächst liegen Enzym und Substrat im Grundzustand (E + S) vor ohne miteinander in Wechselwirkung zu treten. Überwindung einer relativ kleinen Energiebarriere führt zur reversiblen Bindung des Substrats an das Enzym und Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes (E-S), wobei die Gibbs'sche freie Bindungsenthalpie ( $\Delta G_b$ ) gewonnen wird. Durch Zufuhr weiterer Aktivierungsenergie ( $\Delta G_{kat}^*$ ) wird der Enzym-Substrat-Komplex über einen wesentlich höher gelegenen Übergangszustand direkt zu einem Produkt (P) und dem freien Enzym (E) umgesetzt. Der Enzym-Produkt-Komplex (EP) wird dabei unter der Annahme, dass die Ablösung sehr schnell erfolgt, vernachlässigt. Bei einer direkten Umsetzung des Substrats zum Produkt ohne die Hilfe eines Katalysators muss die Aktivierungsenergie ( $\Delta G_{unkat}^*$ ) in einem Schritt zugefügt werden. Je höher die Energiebarriere einer Reaktion desto mehr Energie muss sich im System befinden und desto höhere Reaktionstemperaturen sind notwendig. Die erste Energiebarriere der katalysierten Reaktion (s. Abb. 1.2) kann somit als unkritisch angenommen werden, interessanter ist der Vergleich der maximalen Energiebarrieren der katalysierten und unkatalysierten Reaktion. Nach Gleichung 1.1 ergibt sich die Ersparnis der aufzuwendenden Aktivierungsenergie bei Einsatz eines Enzymkatalysators aus der Gibbs'sche freie Bindungsenthalpie bei Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes und den Aktivierungsenergien von katalysierter und unkatalysierter Reaktion.

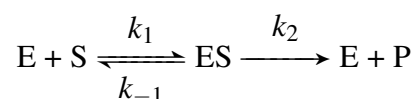
$$\Delta\Delta G^* = \Delta G_{unkat}^* + \Delta G_b - \Delta G_{kat}^* \quad (1.1)$$





**Abbildung 1.2:** Energiediagramm einer enzymkatalysierten (rot) und der analogen unkatalysierten (blau) Reaktion (in Anlehnung an Bommarius *et al.*<sup>[11]</sup>).  $\Delta G_b$ : Gibbs'sche freie Bindungsenthalpie,  $\Delta G_{unkat}^*$ : Gibbs'sche freie Enthalpie der Aktivierung (unkatalysierte Reaktion),  $\Delta G_{kat}^*$ : Gibbs'sche freie Enthalpie der Aktivierung (enzymkatalysierte Reaktion),  $\Delta\Delta G^*$ : Differenz der Aktivierungsenergien von katalysierter und unkatalysierter Reaktion

Die Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen lässt sich durch die von Michaelis und Menten im Jahr 1913 postulierten Geschwindigkeitsgesetze beschreiben.<sup>[11]</sup> Auch Michaelis und Menten vernachlässigten dabei die Bildung des Enzym-Produkt-Komplexes (EP), da die Ablösung des Produktes sehr schnell erfolgt. Die Reaktion des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) zum Produkt und freien Enzym wird als irreversibel angenommen, was für die Betrachtung am Reaktionsbeginn auch zutreffend ist, da zu diesem Zeitpunkt hohe Substratkonzentrationen herrschen und die Produktkonzentration sehr klein ist. Nach Michaelis und Menten lautet die zu beschreibende Reaktionsgleichung folglich:



Die nach ihnen benannte Michaelis-Menten-Gleichung (s. Gl. 1.2-1.4) beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  einer enzymatischen Reaktion als zeitliche Zunahme der Produktkonzentration  $[P]$  in Abhängigkeit von der Substratkonzentration  $[S]$ , der möglichen Maximalgeschwindigkeit  $v_{max}$  und der Michaelis-Konstanten  $K_M$ , bestehend aus

den Geschwindigkeitskonstanten der Einzelreaktionen. Die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) wird nach dem Bodenstein'schen Quasistationaritätsprinzip als zeitlich konstant angenommen ( $d[ES]/dt \approx 0$ ) und die Gesamtkonzentration des Enzyms setzt sich aus den Konzentrationen des freien Enzyms und des Enzym-Substrat-Komplexes zusammen ( $[E]_{ges} = [E] + [ES]$ ).<sup>[11]</sup>

$$v = \frac{d[P]}{dt} = v_{max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (1.2)$$

mit

$$v_{max} = k_2 \cdot [E]_{ges} \quad (1.3)$$

und

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (1.4)$$

Ist die Substratkonzentration klein ( $[S] \ll K_M$ ), so verhält sich die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional zu dieser, während bei hohen Substratkonzentrationen ( $[S] \gg K_M$ ), also einer Sättigung des Enzyms mit Substrat, die Umsetzung mit Maximalgeschwindigkeit abläuft. Die Michaelis-Konstante ist ein Maß der Bindungsaffinität des Enzyms, je kleiner  $K_M$  desto höher die Affinität des Enzyms für ein bestimmtes Substrat.<sup>[11]</sup> Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt neben Faktoren wie Substrat- und Enzymkonzentration auch von äußeren Einflüssen wie pH-Wert, Temperatur und Zusatz anderer Substanzen, die aktivierend oder inhibierend wirken können, ab. Sogenannte Aktivatoren, die die enzymkatalysierte Reaktion beschleunigen, sind häufig Ionen, beispielsweise bei Aktivierung des Enzyms Amylase durch Chlorid-Ionen.<sup>[28]</sup> Inhibitoren senken hingegen die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymkatalyse. Dabei ist zwischen verschiedenen Mechanismen der Inhibierung zu unterscheiden. Kompetitive Inhibitoren, die die am häufigsten auftretende Gruppe der Inhibitoren darstellen, binden in der gleichen *active site* wie das Substrat und stehen somit zu diesem in Konkurrenz. Experimentell ist bei kompetitiver Inhibierung eine Erhöhung der Michaelis-Konstanten  $K_M$  feststellbar. Zusatz weiterer Mengen Substrat führt allerdings zur Verschiebung des Gleichgewichts und es kann die

gleiche Maximalgeschwindigkeit  $v_{max}$  erreicht werden wie bei der ungehemmten Reaktion. Eine nicht-kompetitive (allosterische) Hemmung bewirkt durch Wechselwirkung des Inhibitors mit einer anderen Bindungsstelle des Enzyms eine konformelle Änderung der Bindungstasche des Substrats, die eine Bindung des Substrats erschwert oder verhindert. Dabei bleibt die Michaelis-Konstante  $K_M$  unbeeinflusst, während die Maximalgeschwindigkeit  $V_{max}$  absinkt. Eine Erhöhung der Substratkonzentration hat keinerlei Effekt auf die nicht-kompetitive Hemmung. Bei beiden vorgestellten Inhibierungsmechanismen handelt es sich um reversible Inhibierungen. Des Weiteren ist auch eine irreversible Inhibierung durch kovalente Anbindung des Inhibitors an das Enzym möglich.

Der Mechanismus der Inhibierung ist von enormer Bedeutung zur Regulierung enzymatischer Prozesse in Organismen, die ebenfalls über körpereigene Inhibitoren erfolgt. Auch viele Medikamente oder toxische Substanzen entfalten ihre Wirkung durch die Inhibierung von Enzymen, so hemmt zum Beispiel das Antibiotikum Penicillin ein für die Zellwandsynthese in Bakterien verantwortliches Enzym.<sup>[26]</sup> Ein mehr oder minder unspezifischer, da auf alle Enzyme wirkender, Inhibitor sind Protonen.

Die Aktivität von Enzymen hängt sehr stark vom pH-Wert der Umgebung ab, da die sauren und basischen Aminosäuren des Proteins je nach pH-Wert in einem anderen Protonierungszustand vorliegen und die Umsetzung nicht möglich ist, wenn dieser nicht dem zur Katalyse benötigten Protonierungszustand entspricht. Die meisten Enzyme besitzen ein pH-Optimum im neutralen Bereich, es sind jedoch auch solche bekannt, die unter extremen Bedingungen arbeiten, wie zum Beispiel das Enzym Pepsin im Magensaft mit einem Optimum von pH 2.<sup>[26],[28]</sup>

Enzyme haben nicht nur spezifische Anforderungen an ihre Umgebung und Reaktionsbedingungen, sondern auch an die umzusetzenden Substrate. Diese Substratspezifität macht man sich auch bei der Einteilung von Enzymen in ihre verschiedenen Gruppen zunutze, die nach der vom Enzym katalysierten Reaktion bzw. dem umgesetzten Substrat erfolgt. Tabelle 1.2 zeigt die sechs bekannten Enzymklassen, einige ihrer Untergruppen und Beispiele der von ihnen katalysierten Reaktionen.<sup>[26],[28]</sup> Von besonderem industriell-

len Interesse sind die Enzymklassen der Hydrolasen (44% der biokatalytischen Anwendungen) und Oxidoreduktasen (33%).<sup>[29]</sup> Zu den Hydrolasen gehört unter anderem die Untergruppe der Lipasen, deren natürliche Substrate Triglyceride sind, die jedoch auch eine Vielzahl anderer Substrate akzeptieren und dadurch bedingt häufig in der organischen Synthesechemie eingesetzt werden.<sup>[30]</sup>

Einige Enzyme benötigen zur Umsetzung von Substraten weitere nichtproteinogene Bestandteile, sogenannte Cofaktoren. Ein in biologischen Systemen bedeutsamer Cofaktor ist Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD), das in den Dehydrogenasen der Mitochondrien als Wasserstoffüberträger fungiert, indem es ein Hydrid aufnimmt ( $NAD^+ + H_2 \rightarrow NADH + H^+$ ). Andere häufig vorkommende Cofaktoren sind Metallionen wie  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  oder  $Mg^{2+}$ .<sup>[26], [28]</sup>

**Tabelle 1.2:** Klassifizierung von Enzymen<sup>[26], [28], [31]</sup>

Enzymklasse	Untergruppen	Aufgaben (Bsp.)
Oxidoreduktasen (EC1)	Dehydrogenasen Oxidasen	Oxidation von Substraten unter $NADH^a$ -Verbrauch Elektronentransfer bei Photosynthese
Transferasen (EC2)	Kinasen Polymerasen	Transfer von Phosphatgruppen von $ATP^b$ auf Substrate Polymerisation von Nukleotiden
Hydrolasen (EC3)	Lipasen Esterasen	Spaltung von Lipiden in Glycerin und Fettsäuren im menschlichen Verdauungstrakt hydrolytische Spaltung von Estern
Lyasen (EC4)	Decarboxylasen Synthasen	Decarboxylierung von Substraten Kondensationsreaktionen ohne ATP als Energiequelle
Isomerasen (EC5)	Racemasen	Racemisierung von chiralen Aminosäuren
Ligasen (EC6)	Synthetasen	Kondensationsreaktionen unter Nutzung von ATP als Energiequelle

<sup>a</sup>Cofaktor Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) fungiert als Wasserstoffüberträger

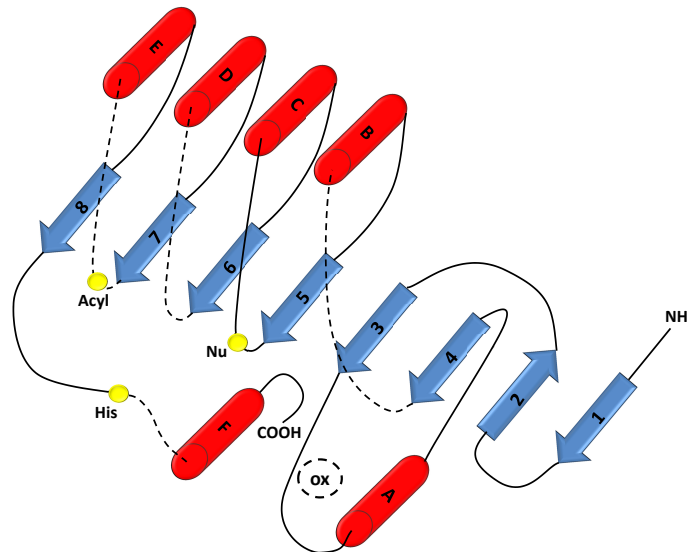
<sup>b</sup>Adenosintriphosphat (ATP) wird dabei unter Energiefreisetzung zu Adenosindiphosphat umgesetzt

## 1.3 Lipasen

Lipasen, die zur Gruppe der Serin-Hydrolasen gehören, sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die z.B. bei Säugetieren für die Spaltung von Nahrungsfetten im Dünndarm verantwortlich sind und in den Samen höherer Pflanzen die Mobilisierung von Speicherlipiden während des Keimvorgangs bewerkstelligen.<sup>[25],[32]</sup> Durch ihre stark hydrophobe Tasche sind Lipasen besonders zur Hydrolyse von Triglyceriden geeignet und setzen bevorzugt wasserunlösliche Substrate um, während sie in rein wässrigen Lösungen eine sehr niedrige Aktivität zeigen. Dieses Phänomen tritt durch die, für eine katalytische Aktivität benötigte, Grenzflächenaktivierung der Lipasen zutage. In Anwesenheit einer hydrophoben Grenzschicht, wie zum Beispiel in zweiphasigen Wasser/Fett-Gemischen, steigt die Hydrolyseaktivität mit Überschreiten der Löslichkeit des Fetts sprunghaft an. Verantwortlich dafür ist die *lid*-Struktur der Lipasen, in der der Eingang zur Bindungstasche in wässrigen Lösungen von einem aus  $\alpha$ -Helices bestehenden Deckel (*lid*) verschlossen wird. In Anwesenheit einer hydrophoben Substratschicht vollzieht die Lipase jedoch eine Konformationsänderung, wobei der *lid* zur Seite schwenkt und den Eingang zur *active site* freigibt.<sup>[32],[33]</sup> Erst diese Konformationsänderung führt zur Bildung des bei Stabilisierung des Übergangszustands katalytisch wichtigen *oxyanion holes* und erhöht gleichzeitig durch Exposition hydrophober Reste den hydrophoben Charakter der Bindungstasche in der offenen Form. Die restliche Oberfläche von Lipasen ist, wie typisch für wasserlösliche Enzyme, hydrophil. Auch der *lid* der geschlossenen Form besitzt eine hydrophile Oberfläche, während seine hydrophobe nach Innen gewandte Oberfläche erst bei Kontakt mit einer ebenfalls hydrophoben Phasengrenzfläche nach außen gekehrt wird.<sup>[34]</sup> Die meisten Lipasen weisen diese Grenzflächenaktivierung auf, eine seltene Ausnahme ist hier *Candida antarctica* Lipase B.

Auch im Aufbau ihrer zentralen katalytischen Domäne besitzen Lipasen große Ähnlichkeit, sie alle weisen das für Serin-Hydrolasen typische Strukturelement der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung (s. Abb. 1.3) auf.<sup>[35]</sup> Hierbei handelt es sich um ein  $\alpha/\beta$ -Sheet aus acht

$\beta$ -Faltblättern, die über  $\alpha$ -Helices miteinander verbunden sind. Für die katalytische Aktivität der Serin-Hydrolasen unerlässlich sind die sogenannte katalytische Triade, die direkt an der Anbindung des Substrats beteiligt ist, und das *oxyanion hole* zur Stabilisierung der tetraedrischen Zwischenstufen. Die katalytische Triade<sup>[36]</sup> besteht aus einem Nucleophil (z.B. Serin, Cystein), das das Substrat nucleophil angreift und einem Histidin, das ein Proton des Nucleophils übernimmt und an das Carboxylat des Acylrestes (Asparaginsäure oder Glutaminsäure) weitergibt. Dabei entsteht ein negativ geladenes Intermediat, das vom *oxyanion hole* stabilisiert wird, indem dessen Aminosäurereste Wasserstoffbrückenbindungen zum Substratsauerstoff, der die negative Ladung trägt, ausbilden.<sup>[14],[32]</sup>

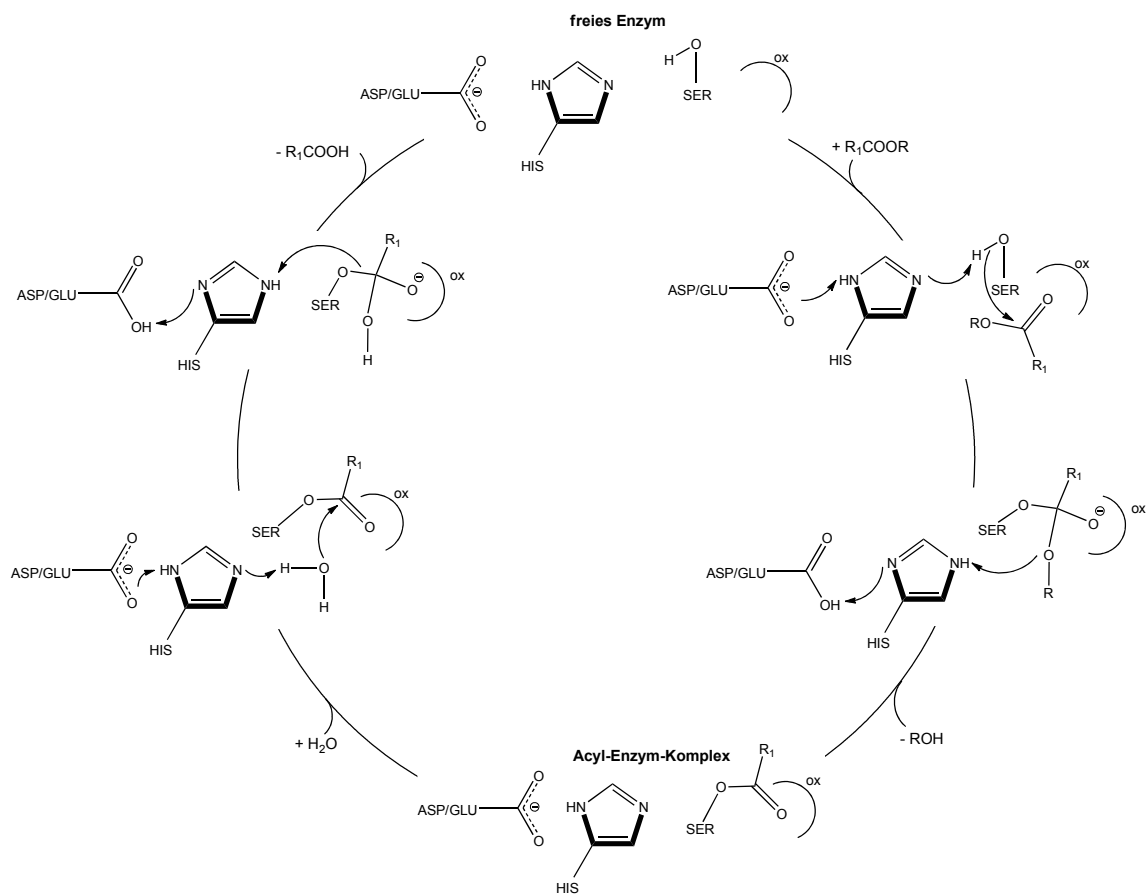


**Abbildung 1.3:**  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung von Serin-Hydrolasen (in Anlehnung an Ollis *et al.*<sup>[35]</sup> und Baumann<sup>[14]</sup>).  $\beta$ -Faltblätter (1-8) und  $\alpha$ -Helices (A-F) sind als Pfeile bzw. Zylinder dargestellt. Der Acylrest (Acyl), das Nucleophil (Nu) und das Histidin (His) der katalytischen Triade sowie das *oxyanion hole* (ox) sind auf den entsprechenden Abschnitten eingezeichnet. Die zentrale Topologie ist bei allen Serin-Hydrolasen gleich, obwohl in einigen Abschnitten eine gewisse Variabilität vorliegt, hier angedeutet durch gestrichelte Linien.

Ein für Serin-Hydrolasen allgemein gültiger Mechanismus zur Spaltung von Peptid- und Esterbindungen wurde bereits 1988 von Carter *et al.*<sup>[37]</sup> anhand von Untersuchungen an Serin-Proteasen aufgeklärt. Bei einer hydrolasekatalysierten Esterspaltung tritt zunächst der Ester ( $R_1COOR$ ) in die Bindungstasche des freien Enzym ein und wird dort vom Nucleophil der katalytischen Triade (Serin) nucleophil angegriffen (s. Abb. 1.4). Während der Serinsauerstoff eine Bindung zum Carbonylkohlenstoff des Esters eingeht

wird das Proton des Serins vom Histidinstickstoff abstrahiert, während ein Histidinproton auf das Carboxylat des Acylrestes (Asparaginsäure oder Glutaminsäure) übertragen wird. Die Reversibilität dieses Protonenübertrags innerhalb der katalytischen Triade ist von elementarer Bedeutung für die Funktionsfähigkeit des Enzyms. Es bildet sich ein tetraedrisches Intermediat, dessen negativ geladener Sauerstoff im *oxyanion hole* stabilisiert ist, und das durch Abspaltung eines Alkoholrestes (*ROH*) unter Rückbildung der Carbonylgruppe in einen Acyl-Enzym-Komplex übergeht. Das Proton des gebildeten Alkohols stammt dabei vom Histidin, das selbst wiederum ein Proton des Acylrestes abstrahiert. Der über Wechselwirkungen zum *oxyanion hole* stabilisierte Acyl-Enzym-Komplex kann im darauffolgenden Schritt von einem Wassermolekül gespalten werden, das sich im Wasserstoffbrückenbindungsabstand zum Histidin aufhält und im Zuge eines nucleophilen Angriffs auf den Carbonylkohlenstoff des Acyl-Enzym-Komplexes ein Proton an den Histidinstickstoff abgibt. Es bildet sich ein durch Wechselwirkungen zum *oxyanion hole* stabilisiertes zweites tetraedrisches Intermediat, das durch Protonenübertrag vom Histidin zum Serinsauerstoff abgelöst wird, wobei eine Carbonsäure als Produkt entsteht. Nach Durchlaufen eines Katalysezyklus liegt das Enzym wieder in seiner nativen Form vor und kann die nächste Umsetzung im darauffolgenden Zyklus katalysieren.

Vertreter aus der Enzymgruppe der Lipasen (EC3.1.1.3) werden aufgrund ihrer guten Eigenschaften häufig als Biokatalysatoren eingesetzt. Im Allgemeinen verfügen Lipasen über eine hohe Temperatur- und Lagerstabilität, hohe Regio- und Enantioselektivität, tolerieren auch organische Lösungsmittel und sind meist cofaktorunabhängig. Ein direkter Vergleich der verschiedenen Lipasen ist aufgrund der großen strukturellen Vielfalt schwierig. Schon relativ geringe Änderungen, wie die Mutation einer einzelnen Aminosäure, können weitreichende Auswirkungen auf die Aktivität und Selektivität eines Enzyms haben, eine konkrete Voraussage dieser Eigenschaften anhand der Enzymstruktur ist somit schwierig bis unmöglich. Allein in Bezug auf die Größe der *active sites* fällt die enorme Bandbreite der Taschenvolumina verschiedener Lipasen ins Auge. Tabelle 1.3 zeigt die mittels Q-SiteFinder<sup>[38]</sup> berechneten Volumina der Bindungstaschen einiger Li-



**Abbildung 1.4:** Katalysezyklus der Esterhydrolyse von Serin-Hydrolasen (ox: oxyanion hole).



pasen und (sofern vorhanden) Umsatz und Molekulargewicht bei Polymerisation diverser Lactone. Ein direkter Zusammenhang zwischen Taschenvolumen und Polymerisierbarkeit großer Lactone besteht nicht. Sowohl *Burkholderia cepacia* mit einem Volumen von  $364 \text{ \AA}^3$  als auch *Pseudomonas fluorescens* mit einer halb so großen Tasche ( $162 \text{ \AA}^3$ ) polymerisieren das 16-gliedrige Lacton PDL mit ähnlichen Umsätzen und Molekulargewichten, während die wesentlich größere *Porcine pancreas* Lipase ( $429 \text{ \AA}^3$ ) eine klare Bevorzugung des kleineren  $\epsilon$ -Caprolactons zeigt. *Candida antarctica* Lipase B hat sich mit der Zeit als effektiver Katalysator für eine Vielzahl von Polymerisationsreaktionen erwiesen und zeigte in vergleichenden Studien von Sivalingam *et al.*<sup>[39]</sup> die höchste Aktivität der untersuchten Lipasen bei Polymerisation von  $\epsilon$ -Caprolacton.

**Tabelle 1.3:** Bindungstaschenvolumina ausgewählter Lipasen

Enzym	PDB-Code	Volumen in $\text{\AA}^3$	Monomer <sup>a</sup>	Umsatz in %	$\bar{M}_n$ in $10^3 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$
<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>b</sup>	2NW6	364	PDL <sup>[40]</sup>	90	2,4
<i>Candida antarctica</i> Lipase A	3GUU	599	k.A.	k.A.	k.A.
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	1LBS	301	$\epsilon$ -CL <sup>[41]</sup>	99	25
<i>Candida cylindracea</i>	1LLF	270	$\epsilon$ -CL <sup>[40]</sup> PDL <sup>[40]</sup>	75 54	3,3 5,8
<i>Candida rugosa</i>	3RAR	403	PDL <sup>[40]</sup>	21	2,5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3IA2	162	$\delta$ -VL <sup>[40]</sup> $\epsilon$ -CL <sup>[40]</sup> PDL <sup>[40]</sup>	95 85 97	1,9 7 2,8
<i>Porcine pancreas</i> Lipase	1ETH	429	$\epsilon$ -CL <sup>[40]</sup> PDL <sup>[40]</sup>	69 27	2,5 1,8

<sup>a</sup>  $\delta$ -VL:  $\delta$ -Valerolacton,  $\epsilon$ -CL:  $\epsilon$ -Caprolacton, PDL: 15-Pentadecanolid

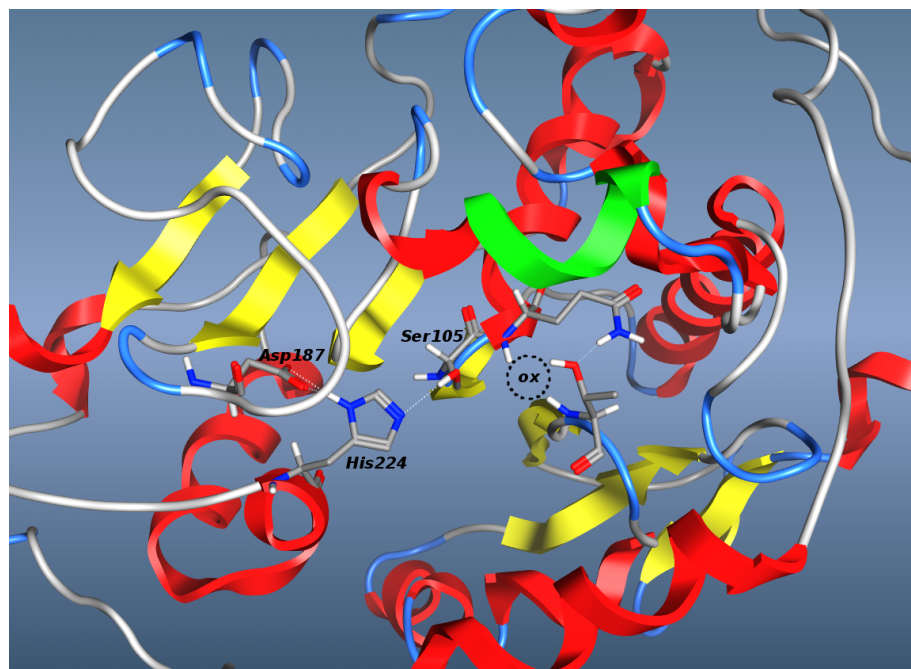
<sup>b</sup> früher: *Pseudomonas cepacia*

## 1.4 *Candida antarctica* Lipase B

### 1.4.1 Struktur und Mechanismus

Aus der Hefe *Candida antarctica*, benannt nach ihrem Fundort in der Antarktis,<sup>[42]</sup> konnten die beiden Lipasen *Candida antarctica* Lipase A und B isoliert werden. Durch Expression in *Aspergillus oryzae* sind diese in großtechnischem Maßstab für industrielle Anwendungen verfügbar.<sup>[32]</sup> Lipase A weist bei sehr hoher Thermostabilität ein nur geringes Substratspektrum auf, weshalb bevorzugt Lipase B eingesetzt wird, die zwar eine etwas geringere Thermostabilität aufweist, aber ein breites Spektrum von Substraten akzeptiert und cofaktorunabhängig ist.<sup>[42]</sup> Die lang gehegte Vermutung, dass Lipase A von  $Ca^{2+}$  als Cofaktor abhängig ist konnte durch Strukturaufklärung von Ericsson *et al.*<sup>[43]</sup> widerlegt werden. *Candida antarctica* Lipase A ist vor allem zur Umsetzung sterisch stark gehinderter Substrate geeignet, beispielsweise Spaltung der mittleren Estergruppe von Triglyceriden, für die *Candida antarctica* Lipase B (CALB) keinerlei Aktivität aufweist.<sup>[42]</sup> Diese hohe Spezifität für sterisch stark gehinderte Substrate ist durch die ungefähr doppelt so große Bindungstasche der Lipase A im Vergleich zu Lipase B gegeben (s. Tab. 1.3). CALB ist immobilisiert auf einer makroporösen Polymermatrix aus Polymethylmethacrylat unter dem Namen Novozym 435 (N435) kommerziell erhältlich.<sup>[44]</sup> Die Strukturaufklärung von Lipase B erfolgte durch Uppenberg *et al.*, sowohl für das native Enzym (PDB ID: 1TCA, 1TCB)<sup>[45]</sup> als auch komplexiert mit einem kovalent gebundenen Phosphonat-Inhibitor (PDB ID: 1LBS)<sup>[46]</sup> bzw. mit dem Detergenz Tween 80 (PDB ID: 1LBT).<sup>[46]</sup> Im Gegensatz zur Mehrzahl der Lipasen zeigt CALB nicht die für diese Enzymgruppe typische Grenzflächenaktivierung, da sie über keine *lid*-Struktur, sondern nur einen großen hydrophoben Bereich am Tascheneingang verfügt.<sup>[42], [45]</sup> Aus diesem Grund kann sie auch als Zwischenstufe zur Gruppe der Esterasen gesehen werden.<sup>[14]</sup> In neueren Untersuchungen konnten Skjöt *et al.*<sup>[47]</sup> zwei Enzymregionen sehr hoher Mobilität identifizieren: die  $\alpha 5$ -Helix (Aminosäuren 142-146), die schon Uppenberg als möglichen *lid* erkannte, und die  $\alpha 10$ -Helix (Aminosäuren 268-287). Es handelt sich bei der  $\alpha 5$ -Helix

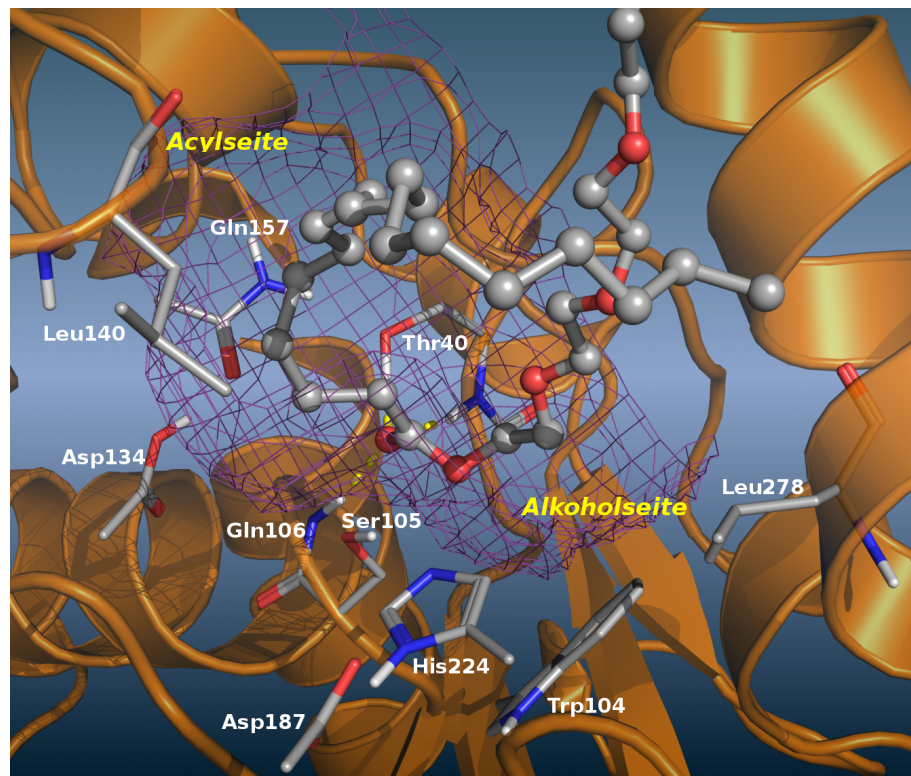
jedoch eher um einen verkümmerten *lid*, eine geschlossene Form der CALB ist nicht bekannt. *Candida antarctica* Lipase B gehört zu den globulären Proteinen und weist die für Serin-Hydrolasen typische  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung auf, wobei die zentrale  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aus sieben Strängen besteht, von denen sechs parallel verlaufen und einer antiparallel. Fünf der benachbarten  $\beta$ -Faltblätter werden miteinander durch vier der zehn vorhandenen  $\alpha$ -Helices verbunden. Die Bindungstasche von CALB besteht größtenteils aus den Helices  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  und  $\alpha 10$  mit der  $\alpha 5$ -Helix als nicht funktionsfähigem *lid* (s. Abb. 1.5).



**Abbildung 1.5:** Tertiärstruktur von *Candida antarctica* Lipase B. Die zentrale  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aus sechs parallelen und einem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt (gelb) ist von mehreren  $\alpha$ -Helices (rot) umgeben, die fünf der  $\beta$ -Faltblätter miteinander verknüpfen. Die  $\alpha 5$ -Helix (grün) bildet den *lid* der Lipase, wobei allerdings keine geschlossene Form vorhanden ist. Die Lage der katalytischen Triade (Ser105, His224, Asp187) und des oxyanion holes (ox) ist angedeutet.

Die hydrophobe *active site* ist relativ eng, ca. 12 Å tief und wird auf der einen Seite von Leu140 und Leu144 und auf der anderen Seite von Leu278 begrenzt. Die untere Begrenzung der Tasche bildet Trp104, das sich in direkter Nähe zum aktiven Zentrum am Boden der Bindungstasche befindet. Die katalytische Triade, bestehend aus Ser105, His224 und Asp187, war nach Aufklärung der Enzymstruktur leicht identifizierbar, da sie das einzig vorhandene Histidin der Struktur enthält.<sup>[45]</sup> Zur kovalenten Anbindung eines

Substrats greift der Sauerstoff der Serinhydroxygruppe den Carbonylkohlenstoff des Substrats nucleophil an, während gleichzeitig ein Proton vom Serin auf den basischen Histidinstickstoff übergeht, was wiederum einen Protonenübertrag von His224 auf Asp187 zur Folge hat. Der daraus resultierende negativ geladene Substratsauerstoff wird im *oxyanion hole* durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Gln106-NH (*backbone*), Thr40-NH (*backbone*) und Thr40-OH (Seitenkette) stabilisiert. Die direkte Umgebung des katalytischen Serins (Ser105) ist äußerst polar. Neben His224 sind Thr40, Asp134 und Gln157 als weitere polare Reste vorhanden, die über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpft sind.<sup>[45]</sup> Die protonierte Carboxylgruppe des Asp134 weist eine Wechselwirkung zur Seitenketten-Amidgruppe des Gln157 auf, dessen Aminogruppenproton die Position der Thr40-Hydroxygruppe des *oxyanion holes* stabilisiert. Die in der Mitte der Tasche befindlichen hydrophoben Seitenketten der Reste Ile189 und Ile285 unterteilen diese in die sogenannte Alkohol- und Acylseite. Die Acylseite der Tasche ist größer und weniger spezifisch als die Alkoholseite und hat somit keinen Einfluss auf die Stereoselektivität des Enzyms. Nach Uppenberg *et al.*<sup>[46]</sup> muss ein an Ser105 gebundener Ester bei seiner Hydrolyse so in der Tasche liegen, dass der Alkoholsauerstoff ein Proton des His224 aufnehmen kann (s. Abb. 1.6). Diese Seite (Leu278) wurde als Alkoholseite benannt. Die bei der Esterspaltung entstehende Säure kommt in der Acylseite der Tasche (Leu140, Leu144) zu liegen. Bei anderer Anordnung kann der zur Spaltung benötigte Protonenübertrag vom Histidin zum Substratsauerstoff nicht auf direktem Wege stattfinden. Im Falle einer genau inversen Positionierung des Substrats konnte allerdings in verschiedensten Untersuchungen ein durch Alkohole oder Wasser vermittelter Protonenübertrag von His224 zum Substrat gezeigt werden. Park *et al.*<sup>[48]</sup> schließen aus *Molecular-Modelling*-Studien phosphoranaloger  $\beta$ -Lactame auf eine substrat-assistierte Ringöffnung bei Umesterung von  $\beta$ -Lactamen. Der zur Umesterung eingesetzte Alkohol nimmt dabei das Histidinproton auf und überträgt dieses auf den in der Alkoholseite befindlichen Ringstickstoff des phosphoranalogen  $\beta$ -Lactams. In einer aus dem Jahr 2005 stammenden Studie von Lavandera *et al.*,<sup>[49]</sup> einer Zusammenarbeit der Gruppen um Gotor und Kazlauskas, wird anhand



**Abbildung 1.6:** Kristallstruktur von *Candida antarctica* Lipase B mit dem Ester Tween 80 (PDB ID: 1LBT<sup>[46]</sup>). Der Ester (ball and stick) liegt so in der Bindungstasche (violett), dass sich seine Acylkette in die Acylseite (Leu140) der active site erstreckt, während der Alkoholsauerstoff des Esters auf der Alkoholseite (Leu278) vor His224 angeordnet ist. Der Carbonylsauerstoff des Esters ist durch Wasserstoffbrückenbindungen (gelb) zum oxyanion hole (Thr40, Gln106) stabilisiert. Das Serin der katalytischen Triade liegt an der Grenze der Seiten zueinander, während sich die beiden anderen Reste der Triade (His224 u. Asp178) auf der Alkoholseite befinden. Asp134 und Gln157 bilden auf der Acylseite ein Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk zur Stabilisierung der am oxyanion hole beteiligten Thr40-Hydroxygruppe.

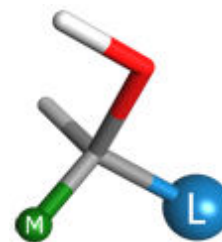
von Untersuchungen zur regioselektiven Acylierung von 3',5'-Diaminonucleosiden ein inverser Mechanismus für die CALB-katalysierte Aminolyse postuliert, der jedoch, wie von Lavandera ausdrücklich erwähnt, nicht bewiesen ist. Bei Aminolyse nach dem inversen Mechanismus liegt die Acylkette des Acyl-Enzym-Komplexes auf der Alkoholseite der Tasche, während das Amin in die Acylseite eintritt und den Carbonylkohlenstoff des Acyl-Enzym-Komplexes nucleophil angreift. Der anschließende Protonenübertrag vom Aminstickstoff zum Histidinstickstoff erfolgt über ein Wassermolekül als Protonenshuttle. Ein solcher inverser Mechanismus kann die höhere Regioselektivität der Aminolyse von Nucleosiden im Vergleich zur Umesterung erklären, jedoch ist eine einzelne Studie unter Verwendung sehr großer Nucleophile nicht unbedingt repräsentativ für alle Aminolysen. So wurde aus der Gruppe um Gotor ein Jahr später eine Studie von González-Sabín *et al.* nach klassischem Mechanismus veröffentlicht. González-Sabín *et al.*<sup>[50]</sup> positioniert in Studien der lipasekatalysierten Aminolyse von Estern den Stickstoff der modellierten phosphonamid-analogen CALB-Komplexe wieder in der Alkoholseite der *active site* und verwendet ebenfalls ein Wassermolekül als Protonenüberträger vom Aminstickstoff auf His224. Unabhängig vom genauen Mechanismus gibt es somit verschiedenste Beispiele für einen assistierten Protonenübertrag.

#### 1.4.2 Selektivität der *Candida antarctica* Lipase B

*Candida antarctica* Lipase B akzeptiert nicht nur eine Vielzahl von Substraten, sondern zeigt oft auch hohe Enantioselektivität bei der Umsetzung chiraler Substrate, eine Eigenschaft, die besonders in der organischen Chemie zur selektiven Umsetzung einzelner Enantiomere eines racemischen Gemisches gefragt ist. Die genauen Mechanismen nach denen die selektive Umsetzung erfolgt, sind von Substrat zu Substrat verschieden, jedoch treten im Allgemeinen nur zwei entscheidende Einflüsse auf, die zur Bevorzugung eines Enantiomers führen: zum einen sterische Hinderung und zum anderen der Verlust von Wasserstoffbrückenbindungen. Die ersten Studien zur Vorhersage von Enzymselektivitäten stammen von Prelog,<sup>[51]</sup> der bereits 1964 empirische Regeln für die

Addition von Wasserstoff an Ketone durch die Hefe *Culvaria lunata* aufstellte. 1991 folgte die ebenfalls auf empirischen Untersuchungen basierende Regel von Kazlauskas<sup>[52]</sup> zur Vorhersage der Enantioselektivität von Cholesterolesterase, *Pseudomonas cepacia* Lipase und *Candida rugosa* Lipase bezüglich der Hydrolyse von Acetaten sekundärer Alkohole.

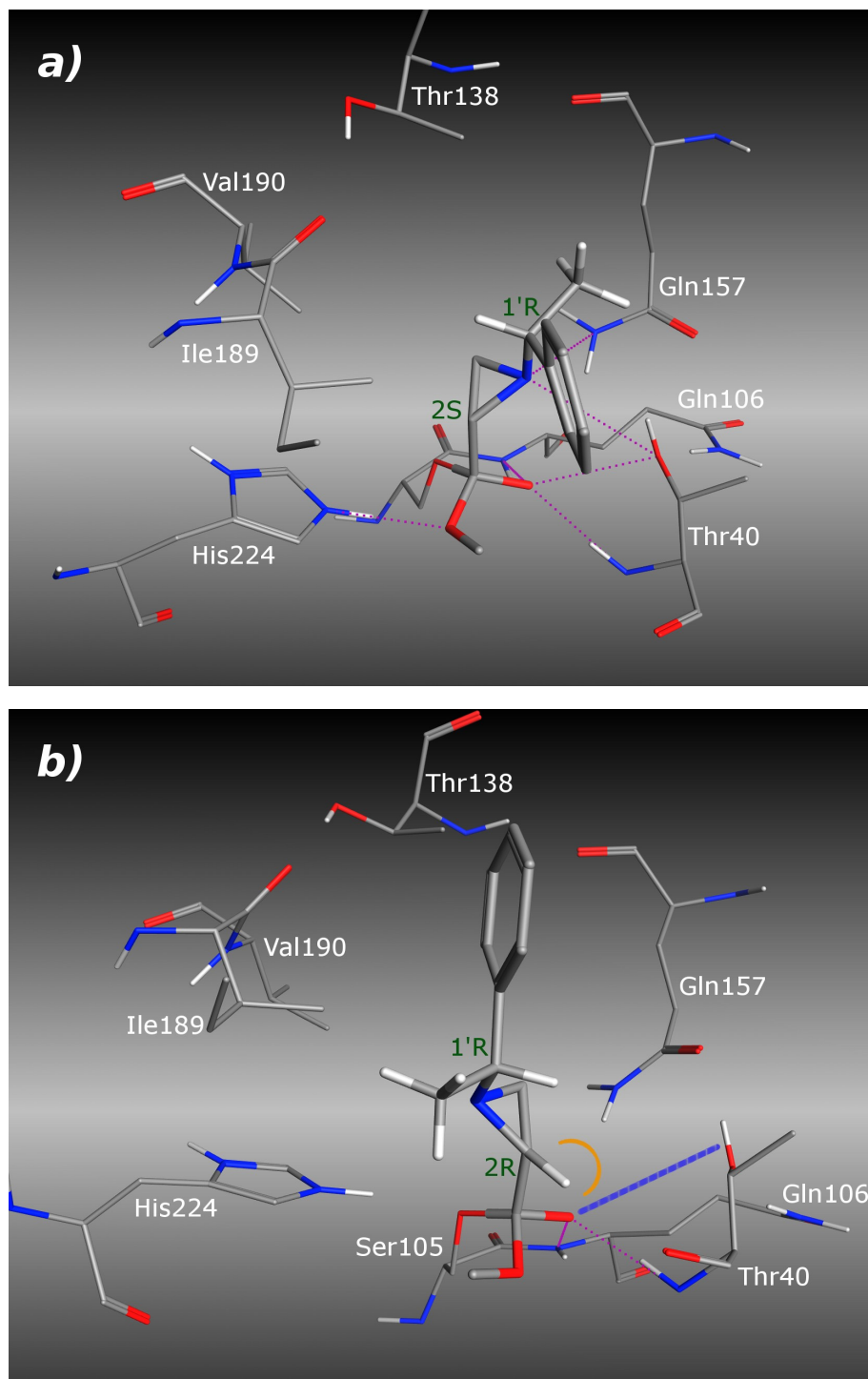
Nach Kazlauskas Regel, die für eine Vielzahl von Enzymen, unter anderem auch CALB, anwendbar ist erfolgt die Spaltung von Estern, deren Alkohole ein bestimmtes Substitutionsmuster am Stereozentrum (s. Abb. 1.7) aufweisen, schneller als die des anderen Enantiomers. Dem-



nach führen zwei unterschiedlich große Alkylreste am chiralen Zentrum des Alkohols zu einer Erhöhung der Enantioselektivität, wobei ein großer und ein mittelgroßer

**Abbildung 1.7:** Substitutionsmuster des chiralen Alkohols nach Kazlauskas.<sup>[53]</sup> M: mittelgroßer Rest, L: großer Rest

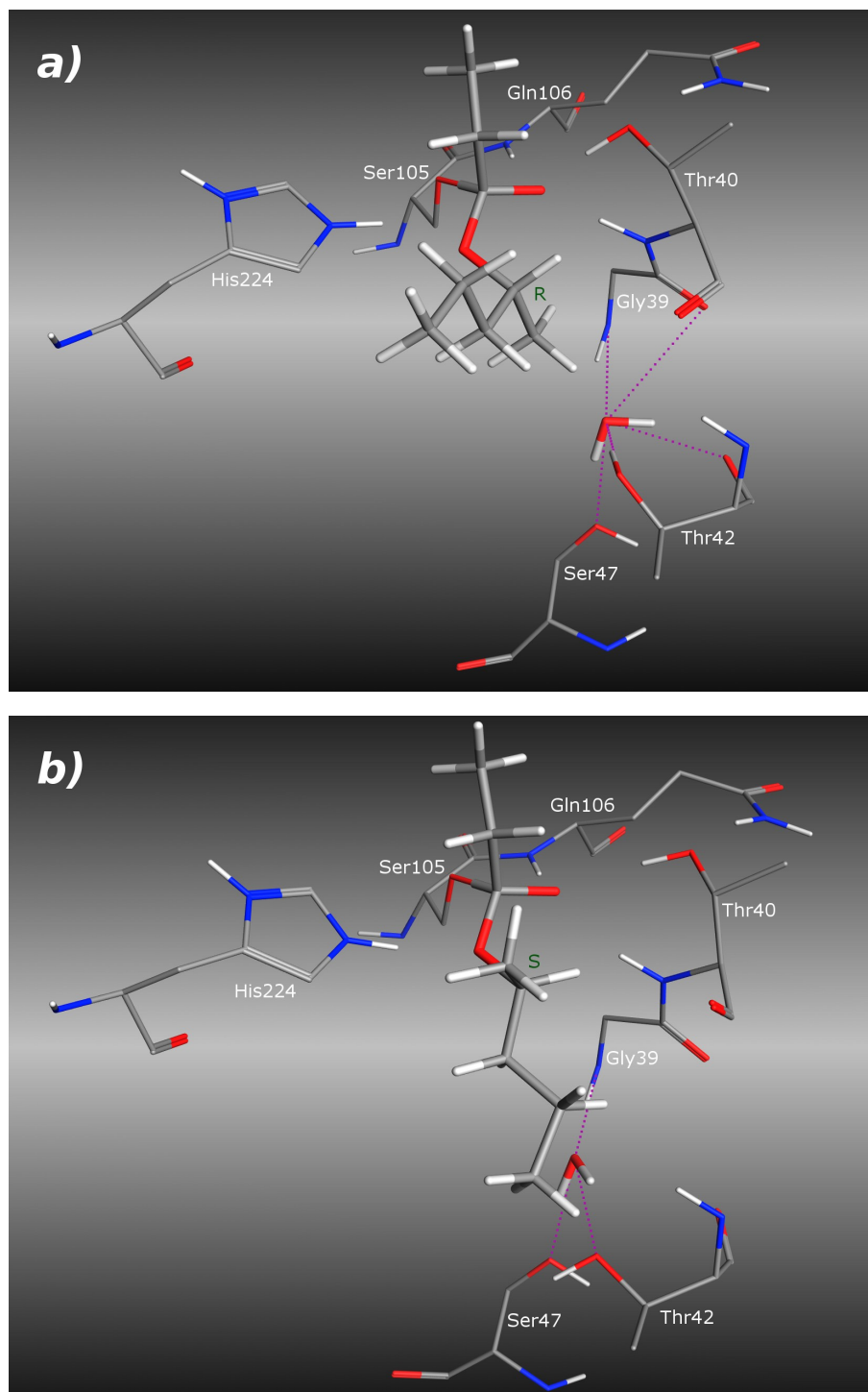
Substituent vertreten sein sollten. Bei Austausch einer Methylgruppe am Stereozentrum des sekundären Alkohols durch eine *tert*-Butylgruppe findet die Hydrolyse des entsprechenden Esters somit mit wesentlich höherer Enantioselektivität statt. Die Gründe für diese Bevorzugung eines Enantiomers der Ester sekundärer Alkohole können über empirische Untersuchungen allerdings nicht geklärt werden. Einen Ansatz zur mechanistischen Klärung der Enantioselektivität von Enzymen bieten *Molecular-Modelling*-Techniken, wie auch anhand der in den letzten Jahren steigenden Zahl der Veröffentlichungen auf diesem Gebiet erkennbar. Ein Beispiel dafür ist die Erweiterung der Kazlauskas-Regel für die selektive Spaltung von Aziridin-2-Carboxylaten in CALB.<sup>[54]</sup> Ein Vergleich der tetraedrischen Zwischenstufen der serin-gebundenen Liganden (s. Abb. 1.8) mittels computerbasierter Methoden liefert hier die Erklärung für die Bevorzugung eines Diastereomers. Das langsam umgesetzte Diastereomer (*2R,1'R*) weist eine ungünstige sterische Hinderung zu Thr40 auf, wodurch dessen Wasserstoffbrückenbindung zum negativ geladenen Substratsauerstoff im *oxyanion hole* verloren geht, während das bevorzugte (*2S,1'R*)-Diastereomer sterisch wesentlich passender ist und besser in der *active site* stabilisiert wird.



**Abbildung 1.8:** Tetraedrische Zwischenstufen der Aziridin-2-Carboxylate in CALB.<sup>[53]</sup> Das bevorzugt umgesetzte (2S, 1'R)-Diastereomer (a) passt sterisch gut in die active site und wird durch einige Wasserstoffbrückenbindungen (lila) stabilisiert. Das langsam umgesetzte (2R, 1'R)-Diastereomer (b) muss zur Bildung des tetraedrischen Intermediats in Bezug auf die Konfiguration des (2S, 1'R)-Diastereomers eine schirmartige Inversion der Substituenten durchlaufen. Dadurch kommt es zu einer ungünstigen Wechselwirkung des Wasserstoffs am 2R-Stereozentrum mit der Hydroxygruppe von Thr40 (orange), wobei eine Wasserstoffbrückenbindung zum oxyanion hole verloren geht, wie hier als blaue Linie angedeutet.



Der Verlust von Wasserstoffbrückenbindungen als Ursache der Selektivität muss nicht unbedingt zwischen Ligand und Enzym erfolgen, sondern kann auch intramolekular im Enzym oder zu konservierten Wassermolekülen stattfinden. So konnten Léonard *et al.*<sup>[55]</sup> die Enantioselektivität von CALB gegenüber Pentan-2-ol durch Destabilisierung eines Wassermoleküls in der stereoselektiven Seitentasche des Enzyms erklären. Die Aminosäuren Gly39, Thr42, und Ser47 bilden diese stereoselektive Seitentasche, in der ein Wassermolekül durch fünf Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird und wie ein nicht-kompetitiver Inhibitor wirkt. Im vorliegenden Fall hängt somit die Enantioselektivität der Reaktion vom Wassergehalt des Systems ab. Ist die stereoselektive Tasche mit einem Wassermolekül besetzt, so tritt eine hohe Enantioselektivität auf, wohingegen bei kleinen Wasseranteilen die Tasche eher unbesetzt und die Selektivität gering ist. Léonard *et al.* untersuchten die Umesterung von Propansäuremethylester mit einem racemischen Gemisch von 2-Pentanol im Gasphasenreaktor und stellten fest, dass (*R*)-Pentan-2-ol bevorzugt umgesetzt wird. In einem ersten Reaktionsschritt bindet der Propansäuremethylester an Ser105, Methanol wird abgespalten und 2-Pentanol greift den gebildeten Acyl-Enzym-Komplex nucleophil an, woraus ein tetraedrischer Übergangszustand resultiert, der in *Molecular-Modelling*-Studien näher untersucht wurde. Abbildung 1.9 zeigt die enzymgebundenen tetraedrischen Intermediate von (*R*)-2-Pentylpropanolat und (*S*)-2-Pentylpropanolat in Anwesenheit eines Wassermoleküls in der stereoselektiven Tasche. Die beiden Zwischenstufen unterscheiden sich vor allem dadurch, dass im (*S*)-Enantiomer ein Propylrest und im (*R*)-Enantiomer ein Methylrest auf die stereoselektive Tasche gerichtet ist. Damit die Umsetzung des (*S*)-Enantiomers überhaupt möglich ist durchläuft das Enzym eine Konformationsänderung um Raum für den sterisch anspruchsvolleren Propylrest zu schaffen, wobei jedoch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thr40 und Thr42 verloren geht und die Zahl der Wasserstoffbrückenbindungen des Wassermoleküls in der stereoselektiven Tasche von fünf auf drei sinkt. Da eine derartige konformelle Änderung bei Umsetzung des (*R*)-Enantiomers nicht notwendig ist, wird dieses thermodynamisch bevorzugt. In neueren Arbeiten von Marton *et al.*,<sup>[56]</sup> ebenfalls aus der



**Abbildung 1.9:** *Molecular-Modelling-Untersuchungen der tetreadrischen Intermediate von (R)-2-Pentylpropanolat (a) und (S)-2-Pentylpropanolat (b) in Anwesenheit eines Wassermoleküls in der stereoselektiven Tasche.<sup>[53]</sup> Bei Anbindung des (R)-Enantiomers bildet das Wassermolekül fünf Wasserstoffbrückenbindungen (lila) aus, wovon zwei im Fall des (S)-Enantiomers verloren gehen, was zu einer thermodynamischen Bevorzugung des (R)-Enantiomers führt.*

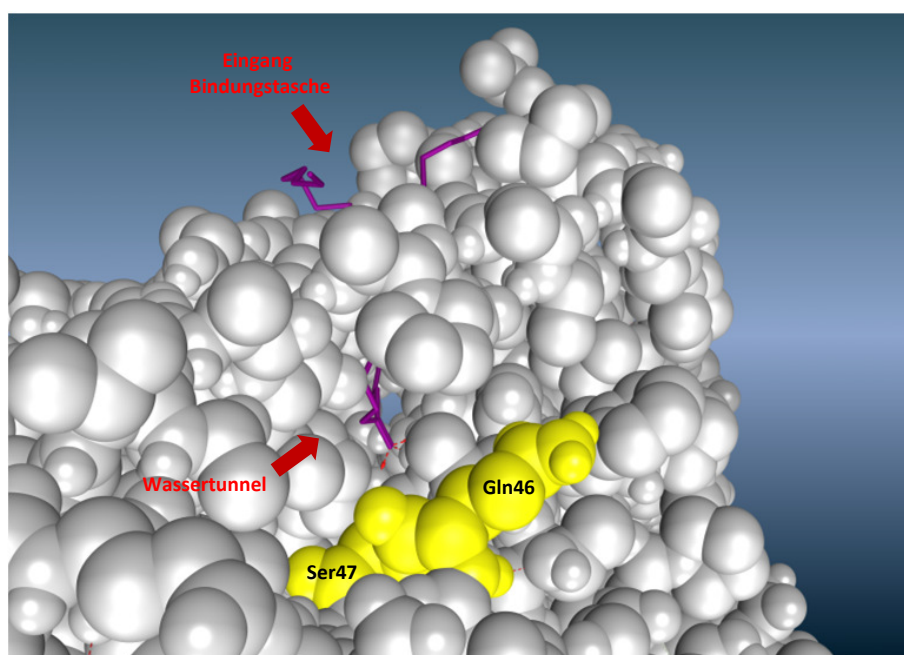
Gruppe um Hult, konnte die Enantioselektivität von CALB gegenüber sekundären Alkoholen durch gerichtete Mutation der stereoselektiven Seitentasche (Ser47Ala, Thr42Val und Ser47Ala–Thr42Val) weiter verbessert werden.

Ein Beispiel für klassische sterische Limitationen der Enzymtasche als Ursache der Selektivität bietet die Arbeit von Magnusson *et al.*,<sup>[57]</sup> der durch Austausch von Trp104, das den Boden der Alkoholseite von CALB bildet, gegen kleinere Aminosäuren wie Histidin, Glutamin oder Alanin die Akzeptanz des Enzyms gegenüber sekundären Alkoholen mit zwei großen Resten am Stereozentrum wesentlich erhöhen konnte. Des Weiteren spielen nicht nur die sterischen Gegebenheiten des Enzyms selbst eine Rolle, sondern auch der Einfluss des Acyldonors auf ein angreifendes Nucleophil, wie von Rotticci<sup>[58]</sup> berichtet. Da die Acyl- und die Alkoholseite von CALB räumlich nahe beieinander liegen, können große Acylreste auch die Enantioselektivität bei Umesterung mit racemischen Alkoholgemischen beeinflussen. Diese steigt mit zunehmender Größe oder Länge des Acylrestes, während gleichzeitig allerdings die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt.

#### 1.4.3 Lösungsmiteleinfluss auf *Candida antarctica* Lipase B

Enzyme zeigen bezüglich Aktivität und Enantioselektivität eine Abhängigkeit von ihrem Wasserhaushalt und vom verwendeten Lösungsmittel. Wasser ist von elementarer Bedeutung für Proteine, da bei zu geringen Wasseranteilen eine Destabilisierung der Struktur eintritt. In hohen Konzentrationen reagiert Wasser jedoch vermehrt als Nucleophil, das den Acyl-Enzym-Komplex angreifen kann und somit zu seiner Ablösung führt. Dieser Prozess findet in biologischen Systemen statt, in denen Enzyme oft die Aufgabe haben Bindungen durch Hydrolyse zu spalten. Für die Synthese von Verbindungen ist eine solche Hydrolyse natürlich unerwünscht, weshalb diese in organischen wasserfreien Lösungsmitteln unter Verwendung getrockneter Enzympräparationen erfolgt. Für CALB (N435) wurde eine optimale Trocknungszeit von 24 Stunden bei 46 °C im Vakuum über Phosphorpentoxid ermittelt.<sup>[59]</sup> Die Unterdrückung der Hydrolyse kann neben der Verwendung wasserfreier Reagenzien auch durch Modifikationen des Enzymkatalysators selbst erfol-

gen. Larsen *et al.*<sup>[60]</sup> entdeckte einen möglichen Wassertunnel in CALB (s. Abb. 1.10) durch den die *active site* auch dann mit Wasser zur Hydrolyse von Substraten versorgt werden kann wenn der Tascheneingang durch eine hydrophobe Substratphase blockiert ist. Durch Austausch der hydrophilen Aminosäurereste entlang des Tunnels gegen hydrophobe Reste lässt sich der Wassertunnel blockieren. So zeigt der Mutant Ser47Leu eine wesentlich geringere Hydrolyseaktivität, während die Mutation Gln46Ala in einer weiteren Öffnung des Tunnels und einer höheren Hydrolyseaktivität resultiert.



**Abbildung 1.10:** Seitenansicht von CALB komplexiert mit dem Ester Tween 80 (PDB ID: 1LBT). Der Ligand (violett) ragt nach oben aus der Bindungstasche heraus. Der Wassertunnel führt seitlich an Ser46 und Gln47 (gelb) vorbei bis in die *active site* des Enzyms. Durch den Wassertunnel ist die Carbonylgruppe des Liganden mit Wasserstoffbrückenbindungen (rot) zum *oxyanion hole* zu erkennen.

Bei der Wahl eines Lösungsmittels für die enzymkatalysierte Katalyse ist zu beachten, dass das Lösungsmittel selbst kein Substrat für das Enzym sein darf, sondern sich möglichst inert verhält und die Löslichkeit des Substrats im verwendeten Lösungsmittel hoch genug ist. Ferner sind hydrophobe Lösungsmittel besser geeignet, da sie das Kristallwasser des Enzyms nicht aufnehmen und dieses in der Enzymstruktur konserviert bleibt. Auch in Lösungsmitteln, die diese Voraussetzungen erfüllen treten jedoch unterschiedliche Enzymaktivitäten auf. Nicht nur Wasser kann als nicht-kompetitiver Inhibitor auf

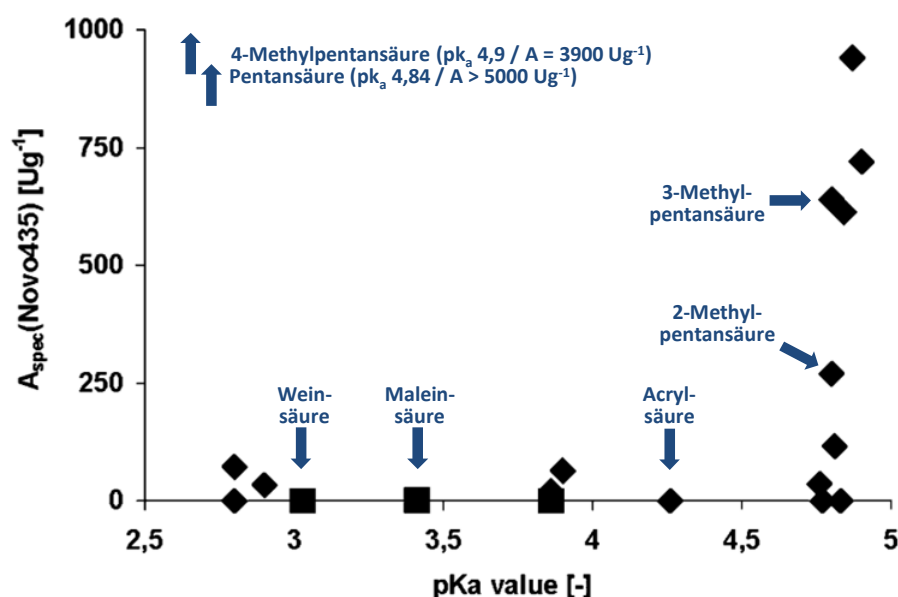
CALB (s. Abschnitt 1.4.2) wirken, sondern auch durch organische Lösungsmittel ist eine kompetitive Inhibierung der Lipase B bekannt. Besonders Ketone üben diesen Effekt aus, während tertiäre Alkohole und Kohlenwasserstoffe die Enzymaktivität nicht beeinflussen.

Eine völlig andere Gruppe der Lösungsmittel, die ebenfalls gut für biokatalytische Anwendungen geeignet ist, stellen ionische Flüssigkeiten dar, bestehend aus Salzen mit Schmelzpunkten von unter 100 °C bis hin zu Raumtemperatur.<sup>[61]</sup> Diese niedrigen Schmelzpunkte werden durch Auswahl großer organischer Kationen mit delokalisierter Ladung (z. B. Methylimidazolium oder Pyridinium) und schwach koordinierender Anionen (z. B. Tetrafluoroborat oder Hexafluorophosphat) erreicht, da bei diesen Kombinationen kein stabiles Kristallgitter gebildet wird und eine geringe Energiezufuhr ausreicht um die Gitterenergie zu überwinden. Ionische Flüssigkeiten bieten diverse Eigenschaften, die in der Biokatalyse von Vorteil sind: sie besitzen eine mittelmäßige Polarität (vergleichbar mit Ethanol), sind hochgradig inert, meist hydrophob und weisen durch die Delokalisierung ihrer Ladungen kaum Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein auf, wodurch eine Denaturierung des Proteins quasi ausgeschlossen ist. Besonders durch die höhere Polarität ist oft eine bessere Löslichkeit des Substrats im Vergleich zu den für die Biokatalyse geeigneten organischen Lösungsmitteln feststellbar. Ionische Flüssigkeiten der neuesten Generation bestehen beispielsweise aus einem Trimethylethanolammonium-Kation und Anionen wie Zuckern, Aminosäuren oder Alkylphosphaten und zeigen die bereits genannten Vorteile der Verbindungsgruppe bei geringerer Toxizität der Anionen.<sup>[61]</sup> Für die CALB-katalysierte Synthese von Polyestern aus  $\epsilon$ -Caprolacton wurden ionische Flüssigkeiten erstmals 2002 in der Gruppe um Kobayashi eingesetzt,<sup>[62]</sup> weitere Verwendung in lipasekatalysierten Synthesen anderer Gruppen folgten.<sup>[63]–[66]</sup>

#### 1.4.4 pH-Abhängigkeit der *Candida antarctica* Lipase B

Enzyme zeigen nur in einem beschränkten pH-Bereich katalytische Aktivität, da der pH-Wert der Umgebung direkten Einfluss auf den Protonierungszustand der Aminosäuren hat. Wie die meisten Enzyme weist auch *Candida antarctica* Lipase B ein pH-Optimum

von 7 auf, ist aber über den gesamten Bereich von pH 3,5 bis 9,5 stabil.<sup>[42]</sup> Neben dem pH-Wert der Umgebung ist jedoch auch der  $pK_a$ -Wert des Substrats zu beachten. Untersuchungen von Hollmann *et al.*<sup>[67]</sup> haben gezeigt, dass CALB in Gegenwart starker Säuren irreversibel inhibiert wird, weshalb eine lipasekatalysierte Veresterung vieler essbarer organischer Säuren wie Weinsäure und Maleinsäure nicht möglich ist. Abbildung 1.11 zeigt die von Hollmann *et al.* bestimmten Aktivitäten in Anwesenheit verschiedener Säuren, wobei die entsprechende Säure mit der jeweils äquimolaren Menge 1-Oktanol bei 65 °C mit 5 Massenprozent N435 inkubiert wurde.



**Abbildung 1.11:** Aktivität der CALB in Anwesenheit verschiedener Säuren (Diagramm modifiziert aus Untersuchungen von Hollmann *et al.*<sup>[67]</sup>). Einige Säuren sind exemplarisch aufgeführt, wobei 4-Methylpentansäure und Pentansäure eine Aktivität außerhalb der Diagrammskala aufweisen. Äquimolare Mengen Säure und 1-Oktanol wurden mit 5% (w/w) Novozyme 435 bei 65 °C inkubiert. Einzig Weinsäure und Maleinsäure wurden statt dessen als 0,1 molare Lösung in 1-Oktanol eingesetzt. Die Analyse erfolgte mittels GPC.

Alle untersuchten Säuren mit einem  $pK_a$ -Wert unter 4,26 führen ausnahmslos zu einer rapiden Abnahme der Aktivität und in fast allen Fällen zu einem völligen Erliegen der Reaktion. Im  $pK_a$ -Bereich zwischen 4,3 und 4,7 liegen aus dieser Studie keine Daten vor, wohingegen oberhalb dieses Bereiches eine Vielzahl von Verbindungen untersucht wurden. Bei  $pK_a \sim 4,8$  sind Säuren mit starkem, schwachem und keinem Inhibierungseffekt vertreten. Hier ist eine Strukturabhängigkeit der Inhibierung erkennbar, wobei Verzwei-

gungen der Säure in  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Position ein Absinken der Aktivität verursachen. Dies wird darauf zurückgeführt, dass sterisch anspruchsvolle Substituenten in Nähe der Carboxylgruppe eine Anbindung des Substrats verhindern. Hollmann *et al.* schließt aus diesem für die Inaktivierung kritischen Schwellenwert von  $pK_a \sim 4,8$  auf die Protonierung eines katalytisch oder strukturell wichtigen Aminosäurerestes und nennt unter anderem als möglichen Kandidaten die Asparaginsäure der katalytischen Triade (Asp187). Eine Protonierung des Asp187 könnte indirekt über Protonierung von His224 erfolgen, das daraufhin ein Proton zu Asp187 transferiert. Dadurch kommt es zu einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms, da bei nucleophilem Angriff des katalytischen Serins (Ser105) am Carboxylkohlenstoff des Substrats das Serinproton von His224 aufgenommen werden muss. Ist bereits im Vorfeld eine derartige Protonierung des Histidins erfolgt, kann es diese Aufgabe nicht mehr erfüllen, und eine Anbindung des Substrats am Enzym ist unmöglich. Des Weiteren liegt nach Deprotonierung der Säure ein Carboxylat in der Bindungstasche vor, das nicht mehr nucleophil angegriffen werden kann.

Außerdem ist anzumerken, dass in einigen Arbeiten von einer Erhöhung der Enantioselektivität und Reaktionsgeschwindigkeit bei Umsetzung sekundärer Alkohole durch Zusatz organischer Basen wie Triethylamin berichtet wird.<sup>[64], [68]</sup> Wodurch dieser Effekt auftritt und ob es sich dabei um eine Säure-Base-Reaktion oder einen eher unspezifischen Einfluss, z. B. auf die Polarität des Systems, handelt ist nicht bekannt. Ferner wird Triethylamin in Arbeiten von Husson *et al.*<sup>[69]</sup> auch bei CALB-katalysierter Umsetzung von Aminosäureoligomeren in ionischen Flüssigkeiten mit dem Ziel der Deprotonierung der Aminogruppen zugesetzt.

## 1.5 Lipase-katalysierte Polymerisationen

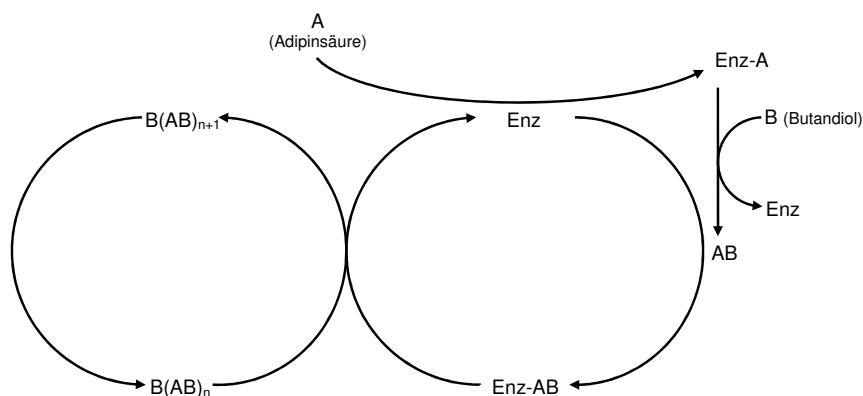
Enzymkatalysierte Polymerisationen spielen in vielen Organismen eine wichtige Rolle beim Aufbau von Makromolekülen wie Polysacchariden, Proteinen und Polyestern. Die Synthese erfolgt dabei über enzymkatalysierte Kettenwachstumsreaktionen.<sup>[70]</sup> Bereits in

den 80er- und 90er-Jahren des letzten Jahrhunderts wurde festgestellt, dass Enzyme nicht nur natürliche Substrate katalysieren, sondern auch für synthetische Zwecke zu nutzen sind. Eine Vielzahl von Enzymen ist in der Lage Polymerisationen zu katalysieren, darunter Vertreter aus vier der sechs bekannten Enzymklassen: Oxidoreduktasen (EC1), Transferasen (EC2), Hydrolasen (EC3) und Ligasen (EC6) wurden bereits verwendet. Als Produkte sind Polyester, Polyphenole, Polycarbonate, Polyaniline, Vinylpolymere, aber auch Polysaccharide und Polyaminosäuren bekannt.<sup>[40], [42], [70]–[75]</sup> Einen guten Überblick gibt das Buch “Biocatalysis in Polymer Chemistry”.<sup>[76]</sup>

Lipasen haben sich als besonders geeignet für die enzymkatalysierte Synthese erwiesen, da sie auch in organischen Lösungsmitteln stabil sind und eine Vielzahl von Substraten akzeptieren. Während in wässrigen Lösungen die Hydrolyse des Polymers überwiegt, bieten wasserfreie Reaktionsmedien die Möglichkeit des lipasekatalysierten Aufbaus der Polymerkette. Wege zur enzymkatalysierten Polyestersynthese unter Verwendung von Lipasen sind bereits seit Jahren bekannt,<sup>[75], [77], [78]</sup> wohingegen die enzymkatalysierte Polyamidsynthese noch weitgehend erfolglos blieb. Die Polyestersynthese kann dabei über Polykondensation von Disäuren und Diolen<sup>[77], [78]</sup> oder auch durch Ringöffnungspolymerisation von Lactonen<sup>[44], [75], [79]–[81]</sup> erfolgen. Der Mechanismus der CALB-katalysierten Polykondensation von Adipinsäure und Butan-1,4-diol ist bereits von Binns *et al.*<sup>[78]</sup> eingehend behandelt worden. Laut seiner Hypothese bindet zunächst die Säure (A) unter Bildung einer acylierten Zwischenstufe an das Enzym (vgl. Abb. 1.12). Diese wird durch nucleophilen Angriff des Alkohols (B) zu einem Dimer (AB) verlängert, das sich vom Enzym ablöst, neu anbindet und durch Addition einer weiteren Alkoholeinheit eine BAB-Spezies ergibt. Da keine terminale Anbindung dieses Trimer über seine Hydroxyendgruppen (B) möglich ist, muss die wachsende Kette im oder außerhalb des Enzyms auf die Acylierung des katalytischen Serins durch ein Dimer (AB) warten um den gebildeten Acyl-Enzym-Komplex durch nucleophilen Angriff am Carbonylkohlenstoff zu verlängern. Die kettenverlängernde Spezies ist nach Binns *et al.* somit immer ein AB-Dimer, das das Enzym acyliert und von einem wartenden hydroxy-terminierten Oligomer



$(B(AB)_n)$  angegriffen wird. Binns stützt seine Schlussfolgerungen bezüglich des Mechanismus der Reaktion vor allem auf die Tatsache, dass größtenteils hydroxy-terminierte Oligomere auftreten. Der von Binns *et al.* postulierte Mechanismus erfordert allerdings, dass zu Beginn der Reaktion entweder große Mengen AB auf Vorrat gebildet werden, oder die wachsende Kette die *active site* während der Reaktion verlässt, damit das zur Kettenverlängerung benötigte Dimer AB gebildet werden kann. Beide Wege erscheinen relativ umständlich und das Auftreten von vorwiegend hydroxy-terminierten Oligomeren ist vielleicht auch auf anderem Wege erklärbar: so ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein carboxyl-terminiertes Oligomer die Tasche verlässt ohne wieder angebunden zu werden wesentlich kleiner als die Wahrscheinlichkeit, dass zu einem wartenden hydroxy-terminierten Oligomer ein Dimer hinzudiffundiert, das Enzym acyliert und verlängert wird. Nach dieser Überlegung wäre ebenfalls die Quote der hydroxy-terminierten Oligomere, die die Tasche verlassen größer als die der carboxyl-terminierten.

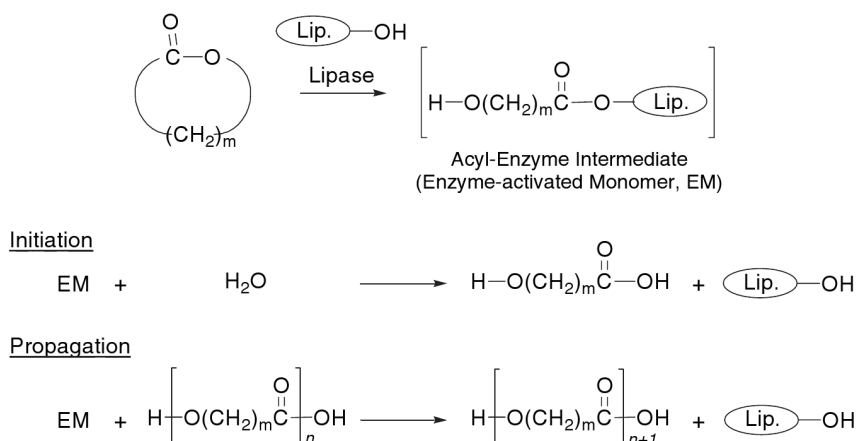


**Abbildung 1.12:** Mechanismus der Polyestersynthese aus Adipinsäure und Butandiol (nach Binns *et al.*<sup>[78]</sup>)

Obwohl mechanistisch bisher wenig erforscht, gibt es bereits vielfältige Anwendungen der Ringöffnungspolymerisation von Lactonen. Neben der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Lipase B aus *Candida antarctica* werden beispielsweise auch Lipase P aus *Pseudomonas fluorescens* (Polymerisation von  $\epsilon$ -Caprolacton<sup>[82]</sup>), *Porcine pancreas* Lipase (Polymerisation von  $\epsilon$ -Caprolacton<sup>[83]</sup>) und *Candida cylindracea* Lipase B (Polymerisation von 11-Undecanolid<sup>[84]</sup>) verwendet. Unter den enzymkatalysierten Ringöffnungspolymerisationen ist die Polymerisation von  $\epsilon$ -Caprolacton wohl eine der bestun-

tersuchten Reaktionen. Einen guten Überblick über die dabei verwendeten Lipasen, ihre Aktivität und die resultierenden Polymereigenschaften gibt Sivalingam *et al.*,<sup>[39]</sup> in dessen Untersuchungen Lipase B aus *Candida antarctica* die höchste Aktivität zeigte. Die Kinetik von Lactonpolymerisationen entspricht einer Michaelis-Menten-Kinetik,<sup>[73]</sup> wobei die erreichten Ausbeuten sowohl von der Ringgröße als auch von der Wahl der verwendeten Lipase abhängen (s. auch Tab. 1.3).<sup>[73],[75]</sup> Kleine Ringsysteme weisen eine höhere Ringspannung auf, was sie zwar chemisch reaktiver macht, jedoch ist für sogenannte Macrolide (10- bis 17-gliedrige Lactonringe) eine noch höhere Reaktivität in lipasekatalysierten Polymerisationen festzustellen als für kleine Ringe.<sup>[73],[75],[84]</sup> In Untersuchungen von Veld *et al.*<sup>[85]</sup> konnte dies auf die unterschiedliche Ringkonformation zurückgeführt werden. Kleine Lactone wie  $\delta$ -Valerolacton und  $\epsilon$ -Caprolacton weisen eine *cisoide* Konformation der Esterbindung auf, während bei Macroliden (z.B. Heptanolacton) eine *transoide* Konformation vorliegt. In Docking- und Molekulardynamik-Studien von Lactonen verschiedener Größe in CALB zeigen *cisoide* Lactone (VL u. CL) katalytisch unproduktive Bindungsmodi als bevorzugte Konformation, wohingegen *transoide* Lactone (HL) vorwiegend im produktiven Bindungsmodus vorliegen. Bei Ablauf einer enzymkatalysierten Reaktion müssen somit *cisoide* Lactone zunächst durch Einbringen einer Aktivierungsenergie vom unproduktiven in einen produktiven Bindungsmodus überführt werden.<sup>[85]</sup>

Der Mechanismus der enzymkatalysierten Ringöffnungspolymerisation wurde, wie in Schema 1.1 gezeigt, von Uyama *et al.*<sup>[84]</sup> postuliert. In einem Startschritt erfolgt zunächst die Ringöffnung eines ersten Lactonmonomers unter Bildung des Acyl-Enzym-Intermediates, von Uyama als enzymaktiviertes Monomer (EM) bezeichnet. Dieses kann in einem Initiationsschritt mit Wasser gespalten werden, wobei die entsprechende Hydroxycarbonsäure und das native Enzym freigesetzt werden. Der Initiationsschritt der Polymerisation stellt die Verfügbarkeit von Hydroxycarbonsäuren als kettenverlängerndes Monomer sicher, während das Kettenwachstum in einen Propagationsschritt durch Addition freier Hydroxycarbonsäureeinheiten oder Oligomere an das Acyl-Enzym-Intermediat erfolgt. Dieser Mechanismus wird auch als monomer-aktivierter Mechanismus bezeichnet.<sup>[73],[84]</sup>



**Schema 1.1:** Mechanismus der lipasekatalysierten Ringöffnungspolymerisation von Lactonen nach dem monomer-aktivierten Mechanismus von Uyama *et al.*,<sup>[84]</sup> aus einem Beitrag von Kobayashi in *Macromolecular Symposia* (2006).<sup>[73]</sup> Das Lacton bindet unter Ringöffnung an den Enzymkatalysator und es entsteht ein enzymaktiviertes Monomer (*enzyme activated monomer EM*), das durch Wasser abgelöst wird und eine Hydroxycarbonsäure als kettenverlängernde Spezies ergibt. Das Kettenwachstum erfolgt durch nucleophilen Angriff der Hydroxyendgruppe eines Monomers oder Oligomers am Acyl-Enzym-Komplex (enzymaktiviertes Monomer).

Auch hier wird das kettenverlängernde Monomer zunächst in einem Startschritt erzeugt und im Lösungsmittel oder Enzym gespeichert um während des Kettenwachstums in ausreichenden Mengen zur Verfügung zu stehen. Ist dies nicht der Fall, so erfolgt nach jeder Kettenverlängerung eine Ablösung, wobei die wachsende Kette die *active site* zumindest so weit verlassen muss, dass ein neues Lactonmonomer aktiviert werden kann. Insgesamt beinhaltet ein derartiger Mechanismus einen enormen zeitlichen Aufwand für die Diffusion der Monomere und Oligomere. Bei Speicherung des aktivierten Monomers im Lösungsmittel tritt jedes Monomer zwei Mal in die Tasche ein, zur Aktivierung und zur Kettenverlängerung. Sollte die Erzeugung des kettenverlängernden Monomers erst bei Bedarf erfolgen, so muss sogar die wachsende Kette vom Enzym abgelöst werden und ganz oder teilweise die Tasche verlassen. Das freie Oligomer liegt je nach Lösungsmittel nicht in einer gestreckten Konformation vor, sondern entweder als Polymerknäuel oder in Wechselwirkung mit der Enzymoberfläche. Diese intra- oder intermolekularen Wechselwirkungen müssen vor Diffusion des Oligomers zurück in die Bindungstasche gebrochen werden. Der von Uyama *et al.* postulierte Mechanismus beinhaltet zwar die typischen Schritte enzymkatalysierter Reaktionen, wie die Bildung und Verlängerung eines Acyl-

Enzym-Komplexes, ist aber in Bezug auf die Aktivierung des Monomers eher unwahrscheinlich.

In bisherigen Arbeiten ist nicht nur die Umsetzung unsubstituierter Lactone gelungen, sondern auch die enantioselektive Umsetzung racemischer Gemische substituierter Lactone. Sowohl Caprolacton als auch Propiolacton werden auch in substituierter Form als Substrat anerkannt. In der Regel werden beide Enantiomere umgesetzt, wobei sich allerdings die Reaktionsgeschwindigkeiten so stark unterscheiden, dass man ein stark angereichertes Polymer eines Enantiomers erhält. Die Ursachen der Enantioselektivität der lipase-katalysierten Ringöffnungspolymerisation sind bis jetzt noch nicht geklärt.<sup>[75], [86]</sup>

Wie bereits erwähnt gibt es recht wenige Beispiele für die enzymkatalysierte Synthese von Polyamiden. Gu *et al.*<sup>[87]</sup> beschreibt die Polykondensation von Disäuren wie Adipinsäure, Malonsäure und Fumarsäure mit Diaminen wie Diethylentriamin oder Triethylentetramin, wobei allerdings einfache Diamine wie 1,6-Hexamethyldiamin nicht eingesetzt wurden, obwohl das analoge Diol 1,6-Dihydroxyhexan mit Adipinsäuredimethylester lipasekatalysiert polymerisierbar ist.<sup>[40]</sup> Die erste bekannte enzymkatalysierte Polymerisation eines Lactams ist die von Schwab *et al.*<sup>[88]</sup> untersuchte Polymerisation von  $\beta$ -Lactam (2-Azetidinon) zu unverzweigtem Poly( $\beta$ -Alanin) unter Verwendung von *Candida antarctica* Lipase B, wobei allerdings nur Oligomere mit einer maximalen Kettenlänge von 18 Einheiten gebildet werden. Andere enzymkatalysierte Ringöffnungsreaktionen substituierter  $\beta$ -Lactame sind zwar vielfach bekannt, jedoch handelt es sich dabei nicht um Polymerisationsreaktionen.<sup>[48], [89]–[91]</sup>

Der Mechanismus enzymkatalysierter Ringöffnungspolymerisationen ist bisher kaum verstanden und auch die Auswahl des richtigen Enzymkatalysators für ein bestimmtes Substrat erfolgt eher durch empirische Studien. Keine der enzymatischen Polymerisationen wurde bisher mit Methoden der Computerchemie untersucht, obwohl auf diesem Wege die molekularen Vorgänge im Enzym weit besser verstanden werden können und sich so ganz neue Ansätze zur Optimierung des Systems ergeben könnten. Der direkte Beweis eines postulierten Mechanismus kann mittels computerbasierter Untersuchungen

zwar nicht erbracht werden, jedoch können mögliche Reaktionspfade und Zwischenstufen vorgeschlagen und sterische Hindernisse der *active site* erkannt werden. Diese Ergebnisse sollten nachfolgend in experimentellen Studien überprüft werden. Ein solche synergetische Herangehensweise gestaltet sich wesentlich langwieriger als das Screening nach geeigneten Enzymen oder deren Mutanten, ermöglicht aber langfristig ein besseres Verständnis und somit auch die gezielte Optimierung der Reaktionen.



## 2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist die vergleichende Untersuchung der *Candida antarctica* Lipase B (CALB) katalysierten Ringöffnungspolymerisation von  $\beta$ -Lactam und  $\epsilon$ -Caprolacton auf molekularer Ebene mittels *Molecular-Modelling*-Techniken auf QM-Niveau. Aus den Arbeiten von Schwab *et al.*<sup>[88]</sup> ist bekannt, dass  $\beta$ -Lactam mit kurzen Kettenlängen von durchschnittlich acht und maximal 18 Einheiten polymerisiert. Dabei handelt es sich um die erste erfolgreiche CALB-katalysierte Polyamidsynthese. Im Gegensatz dazu sind diverse Studien zur Polymerisation von Lactonen in der Literatur bekannt,<sup>[39],[44],[75],[79]–[81]</sup> wobei besonders  $\epsilon$ -Caprolacton, das mit hohen Ausbeuten und Molekulargewichten CALB-katalysiert polymerisierbar ist, eingehend experimentell untersucht wurde.<sup>[39],[80],[81]</sup>

Durch *Molecular-Modelling*-Studien der  $\beta$ -Lactam-Polymerisation, als bislang einzig erfolgreiches Beispiel einer Lactampolymerisation, und der  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation, als bestuntersuchte und optimierte Lactonpolymerisation, sollen diese bisher nicht erklärbaren gravierenden Unterschiede der Polymerisierbarkeit von Lactamen und Lactonen auf molekularer Ebene geklärt werden um so neue Optimierungsvorschläge für die Polymerisation von  $\beta$ -Lactam, sowie langfristig auch anderen Lactamen wie  $\epsilon$ -Caprolactam zu erlangen.

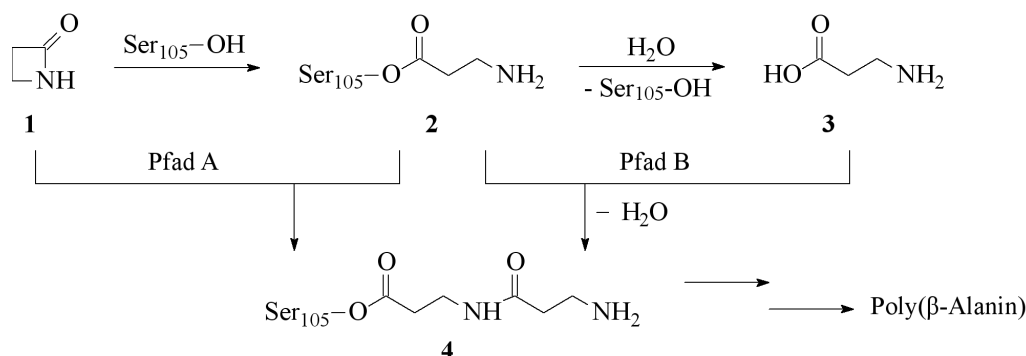




### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Molecular Modelling der *Candida antarctica* Lipase B katalysierten Polyamidbildung aus $\beta$ -Lactam

Der Mechanismus der *Candida antarctica* Lipase B katalysierten Ringöffnungspolymerisation von  $\beta$ -Lactam konnte mittels kraftfeldbasierter Dockingmethoden und QM/MM-Studien aufgeklärt werden, wobei der QM-Bereich mit DFT/B3LYP und das umgebende Protein und Lösungsmittel mit dem Kraftfeld Amber<sup>[92]</sup> beschrieben wurde. Der gefundene Mechanismus entspricht dabei im Wesentlichen dem der klassischen lipasekatalysierten Veresterung, wobei der initiale Schritt die Acylierung von Ser105 durch ein geeignetes Nucleophil ist, während in einem zweiten Schritt die Kettenverlängerung durch Angriff eines Alkohols am Carbonylkohlenstoff des Acyl-Enzym-Komplexes erfolgt. Beide Schritte verlaufen dabei über Intermediate mit tetraedrischer Geometrie am seringebundenen Kohlenstoff. Übertragen auf die  $\beta$ -Lactam-Polymerisation bedeutet dies, dass zunächst ein Angriff des Ser105-Sauerstoffs auf  $\beta$ -Lactam (1) stattfindet und ein Acyl-Enzym-Komplex (2) gebildet wird, der in Anwesenheit von Wasser unter Bildung von  $\beta$ -Alanin (3) gespalten werden kann (s. Schema 3.1).



**Schema 3.1:** Mögliche Reaktionspfade der lipasekatalysierten  $\beta$ -Lactam-Polymerisation.<sup>[93]</sup>

Ein entscheidender Unterschied der lipasekatalysierten Veresterung ausgehend von zwei Edukten im Vergleich zur Amidbildung aus einem Edukt ist die kettenverlängernde Spe-

zies. Als diese fungiert bei der klassischen Adipinsäure/Oktandiol-Polymerisation<sup>[94]</sup> immer der Alkohol, während bei der Ringöffnungspolymerisation nur  $\beta$ -Lactam verfügbar ist, das sowohl selbst (Pfad A, Schema 3.1) als auch in offenkettiger Form nach Hydrolyse zu  $\beta$ -Alanin (Pfad B, Schema 3.1) als Monomer in Frage kommt. Im letzteren Fall muss zunächst genügend  $\beta$ -Alanin durch enzymkatalysierte Hydrolyse des Lactams erzeugt und anschließend in der *active site* oder im Lösungsmittel gespeichert werden. Dabei würde pro ringgeöffnetem Monomer ein Molekül Wasser aus dem Wasserreservoir des getrockneten Enzyms benötigt, das im weiteren Verlauf der Reaktion wieder freigesetzt wird. Eine Speicherung von  $\beta$ -Alanin im umgebenden organischen Medium würde sich als limitierender Faktor auf die Reaktionsgeschwindigkeit auswirken, da jedes Monomer zwei Mal, zur Hydrolyse und zur Kettenverlängerung, in richtiger Orientierung in die Bindungstasche diffundieren muss. Ein solches Szenario lässt sich allerdings aufgrund der geringen Löslichkeit des  $\beta$ -Alanins in Toluol (wie in Experimenten von Schwab *et al.*<sup>[88]</sup> verwendet) ausschließen, während eine Speicherung in der *active site* prinzipiell denkbar ist. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass  $\beta$ -Alanin mit einem  $pK_a$ -Wert von 3,6<sup>[95]</sup> weit unterhalb der von Hollmann *et al.*<sup>[67]</sup> gefundenen Inaktivierungsschwelle ( $pK_a < 4,8$ ) liegt und somit in einer geeigneten Position, mit ausreichendem Abstand der Säuregruppe zum Histidin der katalytischen Triade, in der Tasche vorliegen muss, damit es nicht zu einer Blockade des Enzyms durch Protonierung des Histidins kommt. Die Protonierung von His224 verhindert die Übernahme des Ser105-Protons, die bei Anbindung eines Liganden erforderlich ist, und würde so zur Inaktivierung des Enzyms führen. Eine Speicherung größerer Mengen  $\beta$ -Alanin in der *active site* der Lipase ist demnach undenkbar. Des Weiteren wurde von Schwab *et al.*<sup>[88]</sup> bewiesen, dass  $\beta$ -Alanin selbst kein Substrat für die CALB-katalysierte Polyamidbildung ist. Eine Lösungsmittelabhängigkeit dieses Resultats konnte durch umfangreiche Experimente in verschiedenen Lösungsmitteln ausgeschlossen werden.<sup>[59]</sup> Ein Mechanismus der lipasekatalysierten  $\beta$ -Lactam-Polymerisation muss somit über  $\beta$ -Lactam als kettenverlängerndes Monomer verlaufen (Pfad A, Schema 3.1) und gleichzeitig auch die geringere Nucleophilie des Amidstickstoffs im Lactam

gegenüber einem Amin wie dem  $\beta$ -Alanin berücksichtigen. In jedem durchlaufenen Katalysezyklus entsteht ein Acyl-Enzym-Komplex (4, Schema 3.1), der entweder durch ein weiteres Monomer verlängert oder durch Wasser gespalten werden kann, wobei die Acylkette als  $\beta$ -Alaninoligomer freigesetzt wird. Jede Kettenablösung verbraucht dabei ein Wassermolekül, das aus dem Wasserreservoir des immobilisierten Enzyms bereitgestellt werden muss. Dies ist jedoch kein limitierender Faktor der Reaktion. Selbst die allgemein gebräuchlichen getrockneten Enzymzubereitungen verfügen über einen genügend hohen Wassergehalt für die Kettenablösung, wie anhand der lipasekatalysierten Lactonpolymerisationen erkennbar.<sup>[73],[80],[96],[97]</sup>

Neben dem Wasserhaushalt des Systems sind auch die Säure-Base-Eigenschaften der Liganden und der umgebenden Aminosäuren von entscheidender Bedeutung für den Ablauf der Polymerisation. Dabei ist nicht nur der  $pK_a$ -Wert des  $\beta$ -Alanins sondern auch die Azidität der abgelösten Oligomere in Betracht zu ziehen. Da hierzu keine experimentellen Werte vorliegen erfolgte die Berechnung der  $pK_a$ -Werte<sup>1</sup> der  $\beta$ -Alaninoligomere mithilfe der ACDLab<sup>[98]</sup> Software. Um den Vergleich mit der von Hollmann *et al.*<sup>[67]</sup> gefundenen Inaktivierungsschwelle zu ermöglichen erfolgte die Berechnung im wässrigen Medium (Tabelle 3.1). Dabei konnte der experimentelle  $pK_a$ -Wert von  $\beta$ -Alanin (3,6)<sup>[95]</sup> hinreichend genau reproduziert werden. Dimerisierung und Trimerisierung des  $\beta$ -Alanins bewirken einen leichten Abfall der Säure- bzw. Basenstärke des Liganden. Eine weitere Kettenverlängerung hat keinen Einfluss auf den  $pK_a$ -Wert der endständigen Gruppen.

**Tabelle 3.1:** Berechnete  $pK_a$ -Werte der  $\beta$ -Alaninoligomere

$\beta$ -Alanineinheiten	1	2	>3
$pK_a(\text{Säure})$	$3,7 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,4$
$pK_a(\text{Base})$	$10,3 \pm 0,4$	$9,4 \pm 0,4$	$9,3 \pm 0,4$

Beim Vergleich der berechneten  $pK_a$ -Werte der Oligomere mit der Inaktivierungsschwelle der CALB ist zu beachten, dass Hollmann *et al.*<sup>[67]</sup> keine Liganden im  $pK_a$ -Bereich von 4,3 bis 4,7 untersucht und selbst beim Schwellenwert von 4,8 eine Abhängigkeit der En-

<sup>1</sup>Berechnung von Prof. Dr. Ulrich Jordis (Technische Universität Wien)

zymaktivität von der Ligandenstruktur festzustellen ist. Des Weiteren ist Adipinsäure, mit einem  $pK_a$ -Wert von 4,42,<sup>[99]</sup> mit Oktandiol in hohen Ausbeuten lipasekatalysiert polymerisierbar.<sup>[94]</sup> Es lässt sich also annehmen, dass auch im  $pK_a$ -Bereich von 4,3 bis 4,7 eine Strukturabhängigkeit der Enzymaktivität besteht. Im Hinblick auf die Ungenauigkeit der berechneten  $pK_a$ -Werte (s. Tabelle 3.1) kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden ob  $\beta$ -Alaninoligomere eine Inaktivierung der Lipase bewirken, jedoch wird die Wahrscheinlichkeit einer Inaktivierung mit steigender Kettenlänge vom  $\beta$ -Alanin zum Trimer hin geringer.

Die bisher im wässrigen Medium berechneten  $pK_a$ -Werte erlauben zwar einen Vergleich mit experimentellen Daten, lassen allerdings keine Rückschlüsse auf die Verhältnisse in der Tasche zu. Die Proteinumgebung kann die Azidität eines Liganden stark beeinflussen abhängig davon ob dieser in unmittelbarer Nähe eines Protonenakzeptors liegt und somit leichter deprotonierbar ist. Das von Jensen *et al.*<sup>[100],[101]</sup> entwickelte PROPKA Web Interface ermöglicht die Berechnung von Liganden- $pK_a$ -Werten in der *active site* eines Enzyms. Dies erlaubt einen Vergleich der Polyamidbildung aus  $\beta$ -Lactam mit der Polyesterbildung aus Adipinsäure und Oktandiol im Hinblick auf eine mögliche Inaktivierung. Eine Säure, die als Monomer der lipasekatalysierten Polymerisation fungieren soll, muss in die *active site* des Enzyms mit der Carboxylgruppe nach unten eintreten um dort Ser105 zu acylieren, während das Serinproton auf das Histidin der katalytischen Triade (His224) übertragen wird. Durch die räumliche Nähe von Ser105 zu His224 ist eine Protonierung des Histidinstickstoffs anstelle einer Acylierung des Serins durch die Säure denkbar. Dies führt zu einer Inaktivierung des Enzyms, da kein anderer Akzeptor für das Serinproton verfügbar ist und das entstehende Carboxylatanion nicht nucleophil angegriffen werden kann.

Zur Berechnung der  $pK_a$ -Werte der beiden Säuren  $\beta$ -Alanin und Adipinsäure wurden diese manuell in der Bindungstasche positioniert, wobei die Position der Carboxylgruppen exakt identisch zueinander ist und das Säureproton im Wasserstoffbrückenbindungsabstand zum Histidinstickstoff liegt. Nach sukzessiver Energieminimierung dieser Start-

strukturen ergaben sich lokale Energieminima der Liganden, in denen eine Protonierung von His224 möglich wäre.

Eine Inaktivierung muss nicht zwangsläufig im nativen Enzym erfolgen, sondern ist auch nach Bildung des Acyl-Enzym-Komplexes möglich, wenn eine Säure anstelle des für den Propagationsschritt nötigen Nucleophils in die Tasche eintritt. Zum Vergleich der  $\beta$ -Lactam- mit der Adipinsäure-Oktandiol-Polymerisation wurden die Säuren in eine serin-acylierte CALB eingebracht und die Strukturen, wie für das freie Enzym beschrieben, verfeinert. Die Acylierung erfolgte dabei durch die entsprechende Säure.

Die ermittelten Ligandpositionen stellen zwar keine globalen Minima dar, aber angesichts der freien Beweglichkeit der Liganden in der Tasche können diese auftreten und beinhalten dabei ein gewisses Risiko für eine Protonierung des His224. Aus der Berechnung der Ligand- und Histidin- $pK_a$ -Werte dieser Konformationen (s. Tabelle 3.2) lässt sich die Wahrscheinlichkeit für einen Protonenübergang ableiten. Im nativen Enzym ist die  $pK_a$ -Differenz, und somit auch die Triebkraft eines Protonenübergangs, zwischen  $\beta$ -Alanin und Histidin (7,35  $pK_a$ -Einheiten) wesentlich größer als zwischen Adipinsäure und Histidin (5,58  $pK_a$ -Einheiten), während in der serin-acylierten CALB kaum ein Unterschied besteht. Ein direkter Vergleich dieser Ergebnisse mit experimentellen Werten ist nicht möglich, allerdings wird deutlich, dass die polymerisierbare Adipinsäure in der Bindungstasche bedeutend weniger sauer reagiert als  $\beta$ -Alanin.

**Tabelle 3.2:** Berechnete  $pK_a$ -Werte von  $\beta$ -Alanin und Adipinsäure in CALB

Säure	native CALB		serin-acylierte CALB	
	$pK_a$ (Säure)	$pK_a$ (His224)	$pK_a$ (Säure)	$pK_a$ (His224)
$\beta$ -Alanin	2,68	10,03	4,37	8,55
Adipinsäure	3,10	8,68	5,50	9,60

### 3.1.1 Katalyseschritte der CALB-katalysierten Polyamidbildung

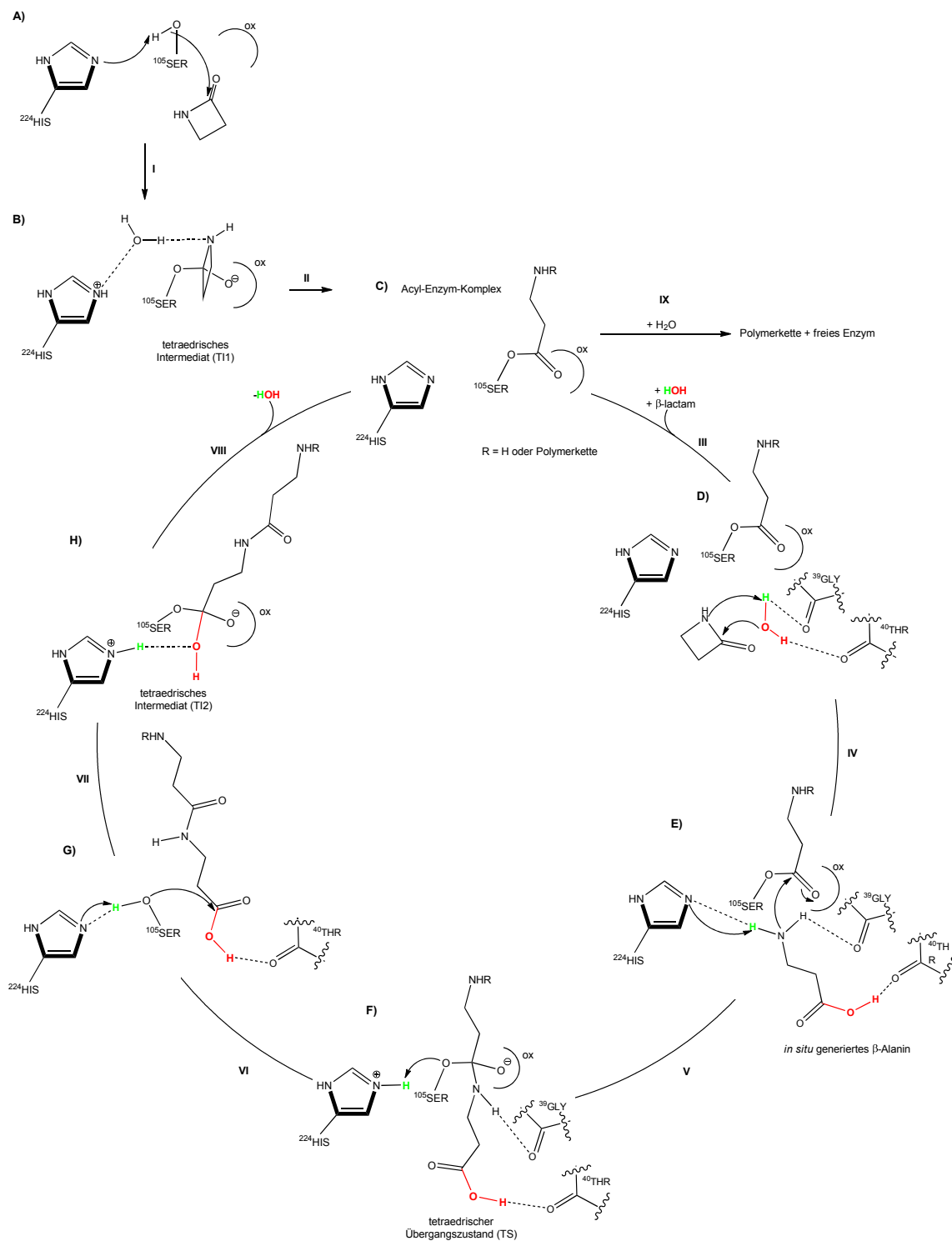
Die Ergebnisse der *Molecular-Modelling*-Studien der CALB-katalysierten  $\beta$ -Lactam-Polymerisation lassen sich in einem Katalysezyklus (s. Schema 3.2) bestehend aus zwei Startschritten (I und II), die den Acyl-Enzym-Komplex ergeben, sechs Propagationsschritten zur Kettenverlängerung durch ein *in situ* generiertes  $\beta$ -Alanin (III-VIII) und einem Terminierungsschritt zur Ablösung der Polymerkette zusammenfassen.

Während die QM/MM-Berechnungen in einer Wasserbox erfolgten, ist in den experimentellen Arbeiten<sup>[88]</sup> Toluol als Lösungsmittel verwendet worden. In vergleichenden Berechnungen von Elsässer<sup>2</sup> wurden jedoch die ersten drei Schritte des Katalysezyklus in einer COSMO-Berechnung mit Toluol als implizitem Lösungsmittel wiederholt. Dabei ergab sich für beide Lösungsmittelmodelle, explizites Wasser und implizites Toluol, exakt der gleiche Reaktionspfad, wobei in Toluol ein geringer Energiegewinn von 2 kcal/mol auftritt.

#### Schritt I

Docking-Studien von  $\beta$ -Lactam in die Bindungstasche von CALB zeigen, dass das erste Monomer in die Alkoholseite der Tasche eintritt und dort über vier Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird (s. Abb. 3.1A). Diese Position ist durch Wechselwirkungen zu Ser105 und Thr40 (OH- und NH-Gruppe) sowie His224 (jeweils 2,52 Å, 3,02 Å, 2,72 Å und 2,71 Å) energetisch stark begünstigt. Dabei ist zu beachten, dass ein im Docking überwiegender und energetisch bevorzugter Bindungsmodus nicht zwangsläufig eine katalytisch produktive Konformation darstellt, sondern, dass möglicherweise eine weitere Energiebarriere überwunden werden muss um diese zu erreichen. Eine derartige Energiebarriere wurde auch in Studien der Bindungsmodi *cisoider* und *transoider* Lactone von Veld *et al.*<sup>[85]</sup> beobachtet. Molekulardynamische Untersuchungen belegen, dass  $\beta$ -Lactam sich dauerhaft nahe Ser105 aufhält und somit ein nucleophiler Angriff des Serinsauerstoffs auf den Carbonylkohlenstoff des  $\beta$ -Lactams wahrscheinlich ist, wobei zeitgleich

<sup>2</sup>Berechnung von Dr. Brigitta Elsässer, Universität Paderborn



**Schema 3.2:** Katalysezyklus der *Candida antarctica* Lipase B katalysierten Ringöffnungspolymerisation von  $\beta$ -Lactam (ox: oxyanion hole).<sup>[93]</sup>

ein Protonenübertrag vom angreifenden Serinsauerstoff zum Histidinstickstoff (His224) stattfindet. Es resultiert das tetraedrische Intermediat TI1, das je nach Position des angegriffenen  $\beta$ -Lactams eine (*S*)- oder (*R*)-Konfiguration am ehemaligen Carbonylkohlenstoff tragen kann. In MD-Studien konnten Monomer-Konformationen gefunden werden, die zur Bildung beider Enantiomere führen. Tabelle 3.3 fasst die geometrischen Daten zweier repräsentativer Konformationen eines 1 ns MD-Laufes von  $\beta$ -Lactam in CALB zusammen. Sowohl ein Angriff des Serinsauerstoffs am  $\beta$ -Lactam-Carbonylkohlenstoff als auch ein Protonenübergang vom Ser105-O zum Histidinstickstoff ist in beiden Konformationen möglich. In der zu einer (*R*)-Konfiguration führenden Konformation ist die Geometrie allerdings geringfügig günstiger.

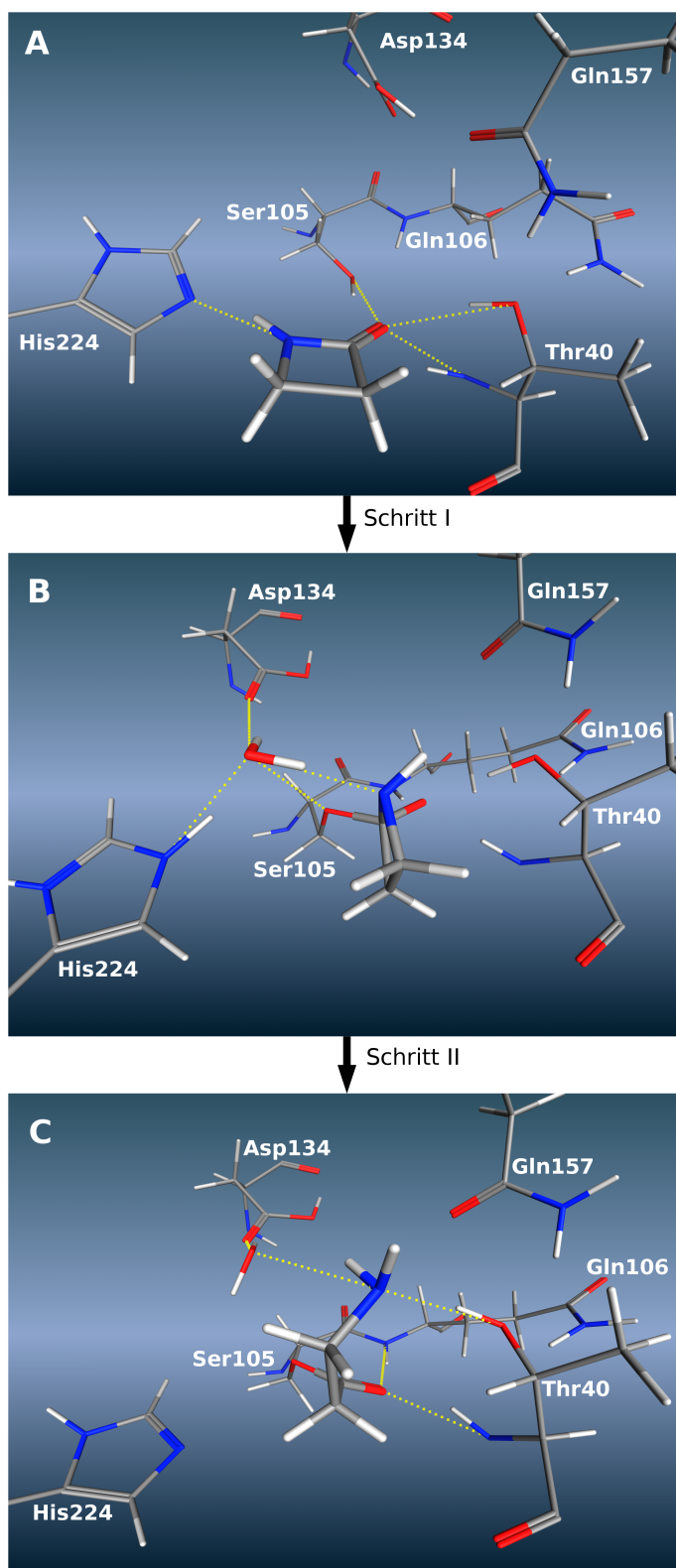
**Tabelle 3.3:** Repräsentative Konformationen eines MD-Laufes (1 ns) von  $\beta$ -Lactam in CALB und daraus resultierendes TI1-Enantiomer

Konformationen MD-Lauf	O(Ser105)- N(His224)		O(Ser105)- C=O( $\beta$ -Lactam)		Konfigura- tion TI1
	Abstand (Å)	Winkel (°)	Abstand (Å)	Winkel (°)	
1	2,85	166,4	3,70	78,7	( <i>S</i> )
2	3,07	129,3	3,39	71,9	( <i>R</i> )

## Schritt II

Ein nucleophiler Angriff des Serinsauerstoffs am  $\beta$ -Lactamcarbonyl ergibt ein erstes tetraedrisches Intermediat TI1, das eine (*R*)- oder (*S*)-Konfiguration am ehemaligen Carbonylkohlenstoff des  $\beta$ -Lactams und eine *cis*- oder *trans*-Konfiguration des NH-Protons bezüglich des negativ geladenen Sauerstoffs aufweist. Eine Ringöffnung dieses tetraedrischen Intermediats erfordert den Transfer eines Protons von His224-N zum Ringstickstoff des ehemaligen  $\beta$ -Lactams. Dazu muss das NH-Proton im ehemaligen Lactamring in der *cis*-Konfiguration vorliegen und es müssen die geometrischen Voraussetzungen bezüglich Abstand und Winkel zwischen besagtem Ringstickstoff und His224-N gegeben sein. Geometrieoptimierungen ergaben sowohl im (*R*)- als auch im (*S*)-Enantiomer von TI1 eine *cis*-Ständigkeit des NH-Protons zum negativ geladenen Sauerstoff, wobei bei Raumtem-

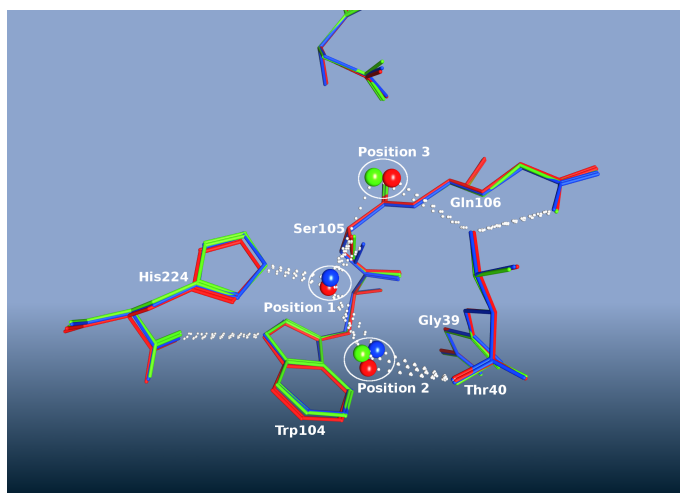




**Abbildung 3.1:** Stabilisierung von  $\beta$ -Lactam in der Alkoholseite von CALB: (A). Anbindung des  $\beta$ -Lactams durch Angriff des Serinsauerstoffs am  $\beta$ -Lactamcarbonyl ergibt ein erstes tetraedrisches Intermediat TI1 (Schritt I). Kovalentes Docking und QM/MM-Optimierung von TI1 in Gegenwart eines Wassermoleküls als Protonenshuttle (B). Ringöffnung von TI1 (Schritt II) resultiert in einer seringebundenen  $\beta$ -Amino-Acylseitenkette (Acyl-Enzym-Komplex), die nach QM/MM-Geometrieoptimierung auf der Acylseite der Tasche liegt (C).<sup>[93]</sup>

peratur beide Konfigurationen im Gleichgewicht vorliegen sollten, da der Ring eine Inversionsschwingung aufweist. Docking- und QM/MM-Studien des (*S*)-Enantiomers von TI1 haben jedoch gezeigt, dass sich His224 in Richtung von Ser105-O orientiert, wodurch kein direkter Protonenübertrag stattfinden kann und stattdessen eine Ablösung des Monomers bevorzugt wird (Daten nicht gezeigt). Aber auch bei analogen Studien des (*R*)-Enantiomers ergab sich eine Struktur, in der der Abstand zwischen His224-N und der NH-Gruppe des ehemaligen Lactams für eine Protonierung des Ringstickstoffs zu groß und eine Ringöffnung somit nicht möglich ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass unter Einbeziehung der Kristallwasser des nativen Enzyms ein wasservermittelter Protonentransfer stattfinden kann, wie bereits für andere CALB-katalysierte Reaktionen beschrieben, in denen ein Molekül Alkohol oder Wasser als Protonenshuttle fungiert.<sup>[48]–[50]</sup> In der Kristallstruktur der nativen CALB (PDB ID: 1TCA und 1TCB)<sup>[45]</sup> befinden sich mehrere kristallographisch konservierte Wassermoleküle, woraus sich bestimmte Positionen, die bevorzugt von Wasser besetzt sind, ableiten lassen. Eine dieser Wasserpositionen liegt auf der Alkoholseite der Tasche im Wasserstoffbrückenbindungsabstand zu His224-N (Position 1, Abb. 3.2), eine Weitere vor Thr40 mit Wechselwirkung zum *backbone*-Carbonyl (Position 2, Abb. 3.2) und eine Dritte oberhalb des *oxanion holes* mit Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxygruppe des Thr40 (Position 3, Abb. 3.2). Diese kristallographischen Wassermoleküle wurden in Dockingstudien der Strukturen B und D (s. Schema 3.2) und in allen nachfolgenden QM/MM-Berechnungen des Katalysezyklus berücksichtigt.

Das vor His224 gefundene kristallographische Wassermolekül wurde in beiden Enantiomeren der tetraedrischen Zwischenstufe TI1 manuell vor His224-N eingefügt und energieminiert. Im Falle einer (*R*)-Konfiguration am ehemaligen Carbonylkohlenstoff des tetraedrischen Intermediates verblieb dieses Wassermolekül im Verlauf von kovalenten Dockingstudien des TI1, nachfolgender Energieminimierung und QM/MM-Optimierung an seiner Position nahe His224-N. Aufgrund der sehr guten Stabilisierung dieses Wassermoleküls durch Wasserstoffbrückenbindungen zu His224-N, Asp134-O und zum Ring-



**Abbildung 3.2:** Kristallwasser in der Bindungstasche der nativen CALB (rot: 1TCA.A, grün: 1TCB.A, blau: 1TCB.B)<sup>[93]</sup>

stickstoff des ehemaligen Lactams ist diese Position stark begünstigt. Der negativ geladene Sauerstoff des tetraedrischen Intermediats erfährt weiterhin eine Stabilisierung durch Wechselwirkungen zum *oxyanion hole* (s. Abb. 3.1B). Tabelle 3.4 fasst die Wasserstoffbrückenbindungen des tetraedrischen Intermediats der (*R*)-Konfiguration zum umgebenden Protein und die das Wassermolekül stabilisierenden Wechselwirkungen zusammen. Die geometrischen Voraussetzungen für eine Verwendung dieses Wassermoleküls als Protonenshuttle sind ideal, da eine starke Wasserstoffbrückenbindung sowohl zu His224-NH als auch zum Ringstickstoff des ehemaligen Lactams besteht und die zu transferierenden Protonen fast perfekt ausgerichtet sind.

**Tabelle 3.4:** Wasserstoffbrückenbindungen zwischen a) tetraedrischem Intermediat TI1 und *oxyanion hole* und b) katalytischem Wassermolekül und umgebendem Protein nach QM/MM-Optimierung

a) TI1 - <i>oxyanion hole</i>			
	O(TI1)-NH(Gln106)	O(TI1)-OH(Thr40)	O(TI1)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	2,84	2,71	2,71
Winkel (°)	164,9	176,7	176,0
b) H <sub>2</sub> O			
	O(H <sub>2</sub> O)-NH(TI1)	O(H <sub>2</sub> O)-NH(His224)	O(H <sub>2</sub> O)-O(Asp134)
Abstand (Å)	2,67	2,55	3,12
Winkel (°)	168,2	162,5	161,4

Analoge Studies des (*S*)-Enantiomers von TI1 ergaben, dass hier eine derartige Stabilisierung des Wassermoleküls nahe Histidin (His224) vollkommen fehlt. Anstelle dessen war während der Energieminimierung eine Migration des Wassers in Richtung der Acylseite der Tasche zu beobachten. Folglich kann die Ringöffnung des ersten tetraedrischen Intermediates nur in der (*R*)-Konfiguration erfolgen, während das katalytisch unproduktive (*S*)-Enantiomer zwar gebildet werden könnte, aber mangels Alternativen durch Rückreaktion wieder abgelöst wird.

Die Ringöffnung des (*R*)-Enantiomers von TI1 verläuft unter Zuhilfenahme des erwähnten Wassermoleküls als Protonenshuttle. Das Programm NWChem<sup>[102],[103]</sup> ermöglicht die Simulation dieses Prozesses in einer QM/MM-Berechnung, wobei zunächst das zu übertragende Proton des Wassers mit einer bestimmten Kraftkonstante zum Ringstickstoff des TI1 gezogen wurde (*spring method*), gefolgt von einer QM/MM-Geometrieoptimierung des Systems. Dabei ergab sich eine Struktur, in der ein Proton des katalytischen Wassermoleküls zum Ringstickstoff des ehemaligen Lactams übergeben wird, während das Wassermolekül das Histidinproton aufnimmt. Das entstandene Zwitterion ist nicht stabil und reagiert unter sofortiger Ringöffnung des Lactamrings zum Acyl-Enzym-Komplex, wobei die Acylkette auf die Acylseite der Tasche verlagert und die Alkoholseite für den Eintritt eines neuen Monomers frei wird (s. Abb. 3.1C). Kovalente Docking-Studien des Acyl-Enzym-Komplexes in CALB ergaben eine fast identische Position der Acylkette (s. Abb. 3.3C). Die Wechselwirkungen des Acyl-Enzym-Komplexes in QM/MM- und Dockingstudien sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. In QM/MM-Berechnungen zeigte sich eine zusätzliche Stabilisierung des Acyl-Enzym-Komplexes durch Wasserstoffbrückenbindungen zum katalytischen Wassermolekül, das in Schritt II als Protonenshuttle eingesetzt wurde und nun zwischen der Aminogruppe der  $\beta$ -Amino-Acylseitenkette und Asp134 liegt (s. Abb. 3.1C). Der Carbonylsauerstoff des Acyl-Enzym-Komplexes verliert eine Wasserstoffbrückenbindung zum *oxyanion hole* (Thr40-NH) zugunsten einer Wechselwirkung zur Aminogruppe des kovalent gebundenen Liganden (s. Tab. 3.5). In den nachfolgenden Schritten des Katalysezyklus wird erneut ein Wassermolekül in der Alko-

holseite der Tasche benötigt. Somit muss das katalytische Wassermolekül wieder von der Acyl- zurück auf die Alkoholseite wandern oder aus dem Wasserreservoir des Enzyms ersetzt werden.

**Tabelle 3.5:** Wechselwirkungen des Acyl-Enzym-Komplexes (aec) zum oxyanion hole und zum katalytischen Wassermolekül nach a) Docking bzw. b) QM/MM-Optimierung

a) Acyl-Enzym-Komplex - oxyanion hole (Docking)			
	O(aec)-NH(Gln106)	O(aec)-OH(Thr40)	O(aec)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	3,17	2,86	2,62
Winkel (°)	133,0	163,5	161,7
b) Acyl-Enzym-Komplex - oxyanion hole bzw. H <sub>2</sub> O (QM/MM)			
	O(aec)-NH(Gln106)	O(aec)-OH(Thr40)	O(aec)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	2,77	3,37	2,70
Winkel (°)	165,0	94,5	155,2
	NH <sub>2</sub> (aec)-OH(Thr40)	NH <sub>2</sub> (aec)-H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O-O(Asp134)
Abstand (Å)	2,74	2,91	2,76
Winkel (°)	163,3	136,6	166,9

### Schritt III

Wie bereits ausführlich diskutiert kann die Kettenverlängerung des Acyl-Enzym-Komplexes nur durch  $\beta$ -Lactam als kettenverlängerndes Monomer erfolgen. Die Elektronendichte am Ringstickstoff des  $\beta$ -Lactams ist jedoch, bedingt durch den partiellen Doppelbindungscharakter der Amidbindung, zu klein für einen direkten Angriff der Ser105-gebundenen Carbonylgruppe. Anstelle dessen muss das  $\beta$ -Lactammonomer zunächst unter Aufhebung dieses Doppelbindungscharakters aktiviert werden. Dies kann durch nucleophilen Angriff eines katalytischen Wassermoleküls am  $\beta$ -Lactamcarbonyl erreicht werden. Diese Reaktion ist neutral bezüglich des Wasserreservoirs des Enzyms, da das katalytische Wassermolekül an einer anderen Stelle des Zyklus wieder freigesetzt wird und somit der Prozess der Kettenverlängerung kein Wasser konsumiert. Die Alkoholseite der CALB weist mehrere kristallographische Wassermoleküle auf, wobei das Wassermolekül vor His224-N bereits in Schritt II als Protonenshuttle eingesetzt wurde. Die beiden Po-

sitionen vor His224 und Thr40 sind recht nah zueinander, so dass ein schneller Wechsel zwischen beiden Zuständen möglich ist. Bei dem zur Aktivierung verwendeten Wasser könnte es sich daher um dasselbe Molekül handeln, das schon in Schritt II als Protonen-shuttle eingesetzt wurde.

Docking-Studien von  $\beta$ -Lactam in die acylierte Lipase in Anwesenheit eines Wassermoleküls vor Thr40 (Position 2, Abb. 3.2) und nachfolgende QM/MM-Optimierungen ergaben die in Abb. 3.3D gezeigte Struktur. Das zweite  $\beta$ -Lactammonomer wird durch eine starke Wasserstoffbrückenbindung zu einem weiteren Lösungsmittelmolekül (2,77 Å, 163,6°) und eine schwache Wechselwirkung zu His224-N (3,36 Å, 144,9°) stabilisiert, während das katalytische Wassermolekül zwei starke H-Brücken zu den Carbonylgruppen von Gly39 (2,62 Å, 155,8°) und Thr40 (2,60 Å, 161,0°) aufweist. Der Acyl-Enzym-Komplex wird von zwei der ursprünglich drei Wasserstoffbrückenbindungen des *oxyanion holes* stabilisiert (s. Tab. 3.6). Die H-Brücke zu Thr40-NH geht zugunsten der Reorientierung der Peptidbindung verloren, wodurch eine zusätzliche Stabilisierung des katalytischen Wassermoleküls durch die Gly39-Carbonylgruppe ermöglicht wird. In der resultierenden Struktur (s. Abb. 3.3D) sind Abstand und Winkel zwischen dem Sauerstoff des Wassers und dem Carbonylkohlenstoff des Lactams ideal für eine *in situ* Ringöffnung des  $\beta$ -Lactamrings (2,90 Å, 109,4°), die in einer QM/MM-Berechnung mittels der *spring method* simuliert wird.

**Tabelle 3.6:** Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Acyl-Enzym-Komplex und *oxyanion hole* nach Dockingstudien des zweiten  $\beta$ -Lactammonomers und anschließender QM/MM-Optimierung (s. Abb. 3.3D)

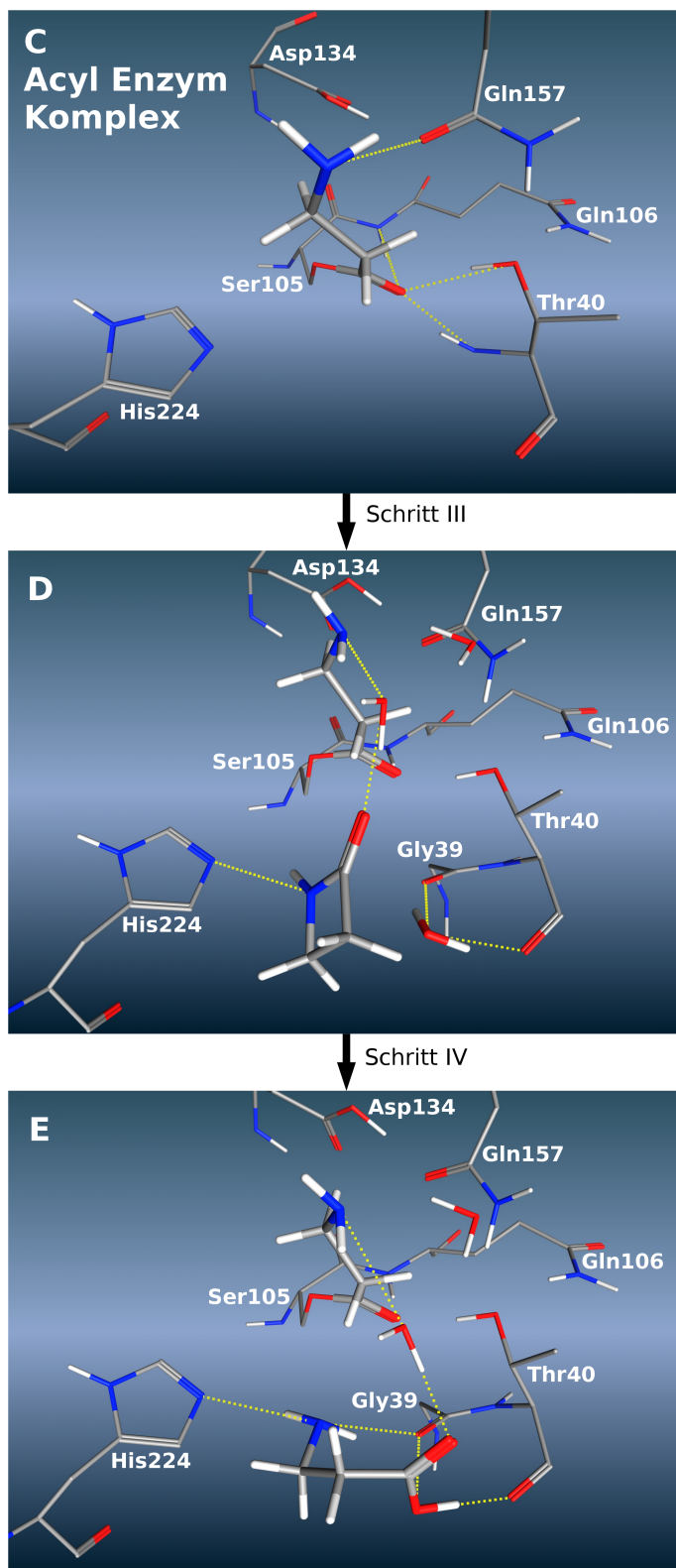
	Acyl-Enzym-Komplex (aec) - <i>oxyanion hole</i>		
	O(aec)-NH(Gln106)	O(aec)-OH(Thr40)	O(aec)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	2,77	2,60	3,74
Winkel (°)	158,2	166,4	49,1

Das durch Angriff des katalytischen Wassermoleküls am  $\beta$ -Lactam entstandene, *in situ* generierte  $\beta$ -Alanin weist im Vergleich zu  $\beta$ -Lactam eine wesentlich höhere Elektrodichte am Stickstoff auf und ist somit für eine Kettenverlängerung des Acyl-Enzym-

Komplexes geeignet. Das katalytische Wassermolekül wird bei dieser Aktivierung des  $\beta$ -Lactammonomers nicht verbraucht, sondern in Schritt VIII wieder freigesetzt und steht für die nächste Ringöffnung im nachfolgenden Zyklus zur Verfügung. In Konkurrenz zur Kettenverlängerung des Acyl-Enzym-Komplexes ist alternativ eine Ablösung der Oligo( $\beta$ -Alanin)-Kette (Schritt IX) möglich. Da ein Wassermolekül nahe His224 oder Thr40 sich gleichzeitig auch in der Nähe von Ser105 befindet, kann der Acyl-Enzym-Komplex durch nucleophilen Angriff des Wassers am Carbonylkohlenstoff leicht gespalten werden. Diese ständige Konkurrenz von Kettenverlängerung und Kettenablösung hat in Verbindung mit der kritischen Azidität des  $\beta$ -Alanins eine vermehrte Bildung kurzer Ketten zur Folge und erklärt die in Experimenten von Schwab *et al.*<sup>[59]</sup> gefundenen kleinen Molmassen des Polymers.

#### Schritt IV

Schritt IV der CALB-katalysierten Polyamidbildung beschreibt die zur Kettenverlängerung der serinegebundenen  $\beta$ -Amino-Acylseitenkette notwendige Aktivierung eines  $\beta$ -Lactammonomers. Ausgehend von einem  $\beta$ -Lactam nahe des katalytischen Wassermoleküls vor Thr40 (s. Abb. 3.3D) erfolgt die Aktivierung durch Angriff des katalytischen Wassermoleküls am  $\beta$ -Lactamcarbonylkohlenstoff. Dieser Prozess konnte in einer mehrstufigen QM/MM-Simulation nachvollzogen werden. Dabei wurde zuerst eine *spring* zwischen dem Sauerstoff des Wassers und dem Lactamcarbonylkohlenstoff und, nach Optimierung dieser Struktur, eine *spring* zwischen dem Wasserproton und dem Lactamstickstoff angewandt, gefolgt von einer abschließenden Optimierung. Das *in situ* generierte  $\beta$ -Alanin wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Thr40-CO (2,55 Å, 176,3°), Gly39-CO (3,00 Å, 161,2°), einem kristallographischen Wassermolekül (2,88 Å, 169,6°) und einer schwachen Wechselwirkung zu His224-N (3,27 Å, 156,2°) stabilisiert (s. Abb. 3.3E). Das azide Proton des  $\beta$ -Alanins, das vorher der Hydroxygruppe des katalytischen Wassers entsprach, befindet sich während des gesamten Aktivierungsprozesses im Wasserstoffbrückenbindungsabstand zur *backbone*-Carbonylgruppe des Thr40, was eine Pro-



**Abbildung 3.3:** Die serinegebundene  $\beta$ -Amino-Acylseitenkette liegt nach kovalentem Docking auf der Acylseite der Tasche (C), ähnlich der in QM/MM-Studien gefundenen Struktur (Abb. 3.1C). Docking des zweiten  $\beta$ -Lactammonomers in das acylierte Enzym in Gegenwart eines kristallographischen Wassermoleküls und nachfolgende QM/MM-Studien der Struktur (Schritt III, Struktur D) zeigen eine Aktivierung von  $\beta$ -Lactam durch Angriff des Wassermoleküls auf den Carbonylkohlenstoff und Bildung eines *in situ* generierten  $\beta$ -Alanins (Schritt IV, Struktur E).<sup>[93]</sup>



tonierung des Histidins (His224) und eine Inaktivierung des Enzyms unmöglich macht. Berechnung der  $pK_a$ -Werte in dieser Konformation ergab, unter Verwendung des PROPKA Web Interfaces, einen Wert von 8,54 für die Säuregruppe des  $\beta$ -Alanins, während der  $pK_a$ -Wert des Histidins bei 5,08 liegt. Durch Wasserstoffbrückenbindung des His224 zur Aminogruppe des  $\beta$ -Alanins und dadurch bedingten Anteil am Ligandenproton wird die Basizität des Histidins herabgesetzt. Im Falle des  $\beta$ -Alanins führt der gleiche Effekt zu einer Erhöhung des  $pK_a$ -Wertes, da das Säureproton eine starke Wechselwirkung zur Proteinumgebung zeigt, die die Azidität des  $\beta$ -Alanins herabsetzt. Der Acyl-Enzym-Komplex bleibt auch weiterhin durch zwei von drei H-Brücken des *oxyanion holes* stabilisiert (s. Tab. 3.7), wobei die Wasserstoffbrückenbindung zu Thr40-NH zugunsten der Stabilisierung des  $\beta$ -Alaninmonomers durch Gly39-CO verloren geht. Das *in situ* gebildete  $\beta$ -Alanin ist ein geeignetes Monomer zur Kettenverlängerung, da die Elektronendichte der Aminogruppe im Vergleich zu  $\beta$ -Lactam signifikant erhöht ist und die passende Ausrichtung des  $\beta$ -Alanins für einen Angriff am Carbonylkohlenstoff des Acyl-Enzym-Komplexes vorliegt (3,28 Å, 95,0°). Ausgehend von einer *in situ* Bildung eines  $\beta$ -Alanins vor Thr40 kann eine sofortige Kettenverlängerung ohne Reorientierung des Monomers, die zur Protonierung von His224 führen könnte, erfolgen.

**Tabelle 3.7:** Wechselwirkungen des Acyl-Enzym-Komplex zum *oxyanion hole* nach QM/MM-Studien des *in situ* generierten  $\beta$ -Alanins (s. Abb. 3.3E)

	Acyl-Enzym-Komplex (aec) - <i>oxyanion hole</i>		
	O(aec)-NH(Gln106)	O(aec)-OH(Thr40)	O(aec)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	2,77	2,63	3,52
Winkel (°)	158,9	169,8	55,8

## Schritt V

Die hinreichende Elektronendichte des Aminstickstoffs und die geeignete Lage des *in situ* generierten  $\beta$ -Alanins zum Acyl-Enzym-Komplex (3,28 Å, 95,0°) führen zu einem nucleophilen Angriff des  $\beta$ -Alanin an der seringebundenen Carbonylgruppe. Dieser Re-

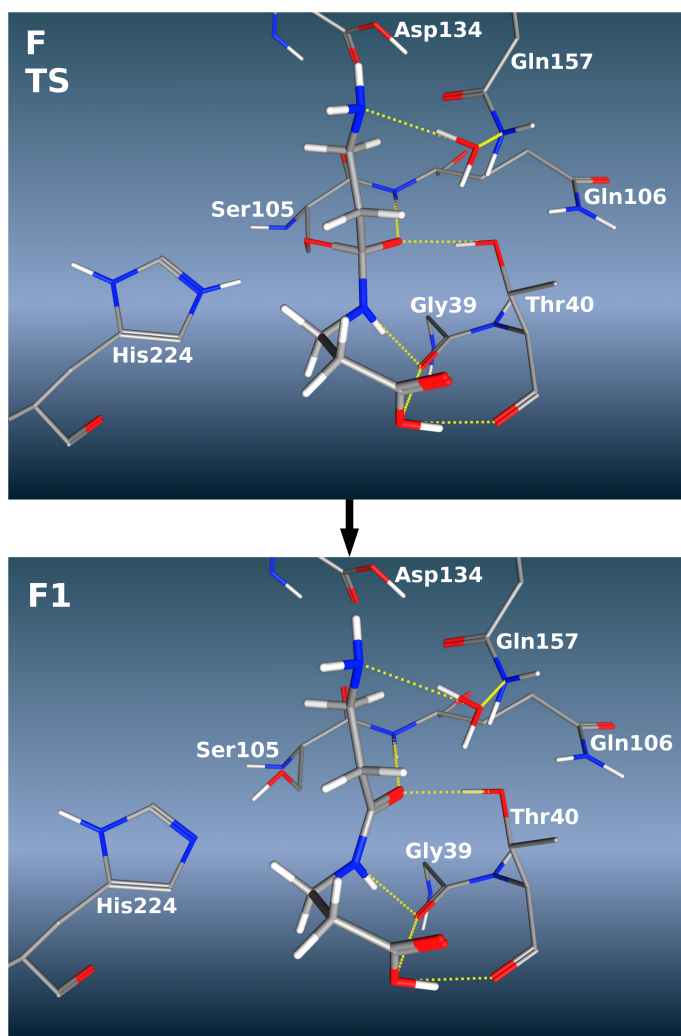
aktionsschritt wurde mithilfe einer *spring* zwischen dem Alaninstickstoff und dem Carbonylkohlenstoff des Acyl-Enzym-Komplex simuliert, wobei sich ein protonierter tetraedrischer Übergangszustand TS ergibt, der durch Anlegen einer zweiten *spring* zwischen dem positiv geladenen ehemaligen Alaninstickstoff und His224-N in den instabilen tetraedrischen Übergangszustand TS übergeht (s. Abb. 3.4F). Tabelle 3.8 fasst die geometrischen Daten des Übergangszustands TS nach QM/MM-Optimierung zusammen. Die Säuregruppe des TS zeigt noch immer starke Wechselwirkung zu Thr40, während die NH-Gruppe in Richtung der Gly39-Carbonylgruppe orientiert ist. Des Weiteren wird der negativ geladene Sauerstoff des TS im *oxyanion hole* von zwei Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, wobei der Ladungsausgleich durch die positive Ladung am protonierten Histidinstickstoff erfolgt. Der dimere Übergangszustand TS verhält sich instabil und spaltet nach Entfernung der *constraints* in einer anschließenden QM/MM-Optimierung das neu gebildete  $\beta$ -Alanindimer ab (s. Abb. 3.4F1).

**Tabelle 3.8:** Wechselwirkungen des dimeren tetraedrischen Übergangszustands TS zum *oxyanion hole* und zum umgebenden Protein nach QM/MM-Optimierung

	O(TS)-NH(Gln106)	O(TS)-OH(Thr40)	O(TS)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	2,70	2,58	3,44
Winkel (°)	173,2	171,9	66,1
	OH(TS)-O(Thr40)	NH(TS)-O(Gly39)	
Abstand (Å)	2,55	2,78	
Winkel (°)	168,0	169,2	

## Schritt VI

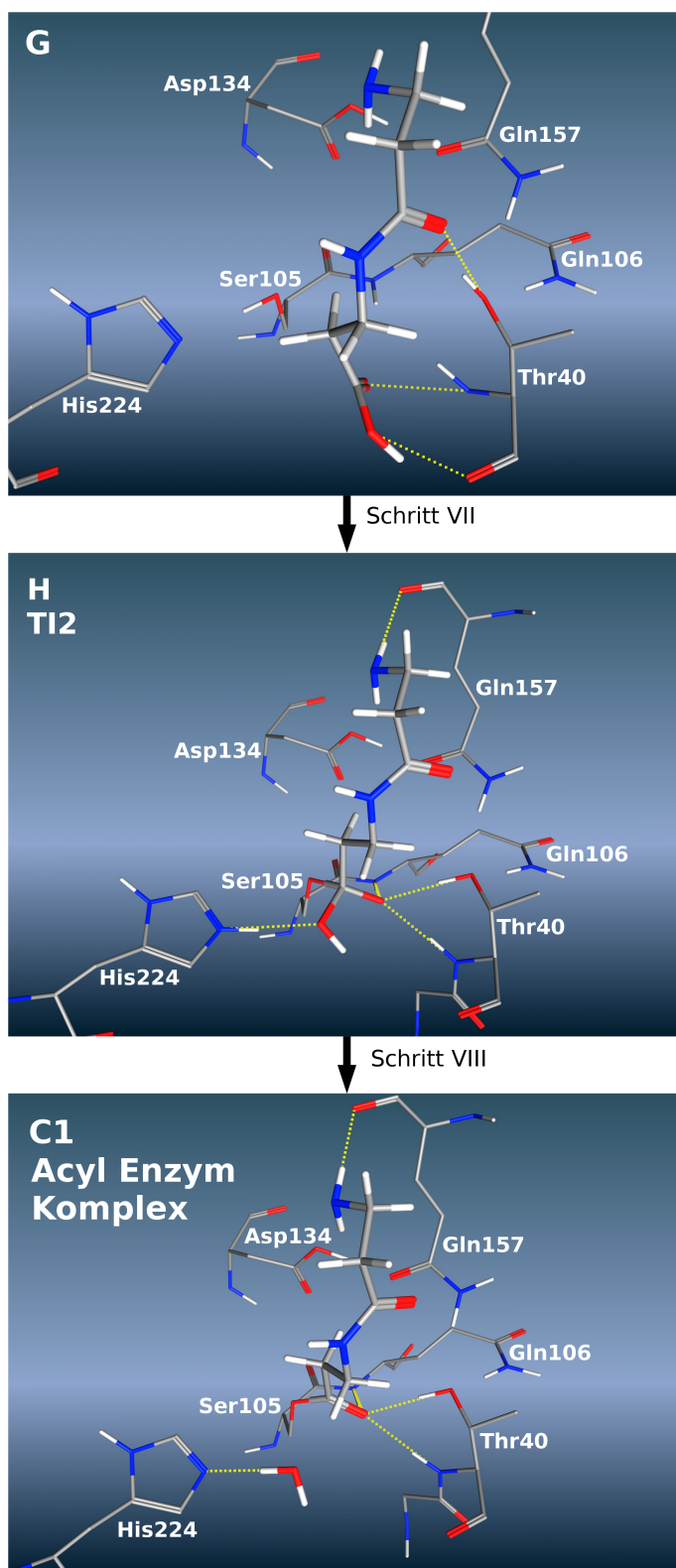
Optimierung des dimeren tetraedrischen Übergangszustands TS führt zur Ablösung des Dimers, wobei das Histidinproton zurück zum Ser105-Sauerstoff übertragen wird. Das abgelöste Dimer (Abb. 3.4F1) bleibt während einer weiteren QM/MM-Optimierung in der Nähe seiner vorherigen angebundenen Position, wobei sich die Wechselwirkungen zum Protein nur marginal verändern (s. Tab. 3.9). Eine Neuanbindung des Dimers an seiner terminalen Carboxylgruppe war in dieser Konformation nicht möglich, sondern



**Abbildung 3.4:** Angriff des *in situ* generierten  $\beta$ -Alanins am serinegebundenen Carbonylkohlenstoff führt zur Bildung eines instabilen dimeren Übergangszustands (F), aus dem augenblicklich ein Dimer (F1) freigesetzt wird.<sup>[93]</sup>

erfordert eine Wanderung der Oligomerkette in Richtung der Acylseite der Tasche. Ein besonderes Merkmal des gefundenen Mechanismus ist, dass das Dimer die Tasche zur terminalen Anbindung nicht verlassen muss und ein einfaches Rearrangement der Kette zur Neuanknüpfung ausreicht. Nach Verlassen der Bindungstasche ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Polymerkette in genau der richtigen Orientierung in die Tasche zurückkehrt verschwindend gering. Sollte ein Oligomer mit der Säuregruppe nach unten eintreten und anstelle von Thr40 eine Wechselwirkung zu His224 eingehen, erfolgt möglicherweise eine Protonierung von His224 und somit eine Inaktivierung des Enzyms.

Docking-Studien des abgelösten Dimers in CALB ergaben eine leicht veränderte Konformation des Dimers, in der ein weiteres Kettenwachstum durch terminale Anbindung des Liganden möglich ist. Obwohl die gedockte Dimerkonformation ein globales Minimum darstellt, also gegenüber dem Dimer nach Ablösung energetisch begünstigt ist, konnte die Umlagerung des Dimers aufgrund der starken Wechselwirkungen des Dimers und der begrenzten Zeitskala in einem 1 ns MD-Lauf leider nicht simuliert werden. Abbildung 3.5G zeigt die im Docking gefundene Struktur nach QM/MM-Optimierung. Das Proton der Säuregruppe weist noch immer eine starke Wasserstoffbrückenbindung zu Thr40-O auf (2,6 Å, 150,2°), was drauf hindeutet, dass diese Wasserstoffbrückenbindung auch während der Migration des Dimers bestehen bleibt und dadurch eine Inaktivierung des Enzyms, ausgelöst durch Protonierung des His224, verhindert wird.  $pK_a$ -Berechnungen dieser Dimer-Konformation ergaben einen  $pK_a$  von 6,35 für die Säuregruppe, während His224 in dieser Struktur einen Wert von 6,43 zeigt, wodurch ein Protonenübertrag in dieser Struktur vollkommen ausgeschlossen ist. Der ausgesprochen niedrige  $pK_a$ -Wert des His224 wird dabei durch eine starke Wasserstoffbrückenbindung zu Ser105 verursacht (s. Abb. 3.5G). Zusätzliche Stabilisierung erfährt das gedockte Dimer durch Wechselwirkungen des terminalen Carboxylsauerstoffs zu Thr40-NH (2,87 Å, 124,9°) und des Peptidsauerstoffs zu Thr40-OH (2,82 Å, 166,7°).



**Abbildung 3.5:** Nach der ersten Kettenverlängerung wird das gebildete Dimer von Ser105 abgelöst und durchwandert die Tasche Richtung Acylseite, wobei die H-Brückenbindung zu Thr40 erhalten bleibt, und eine leicht veränderte Konformation (G) eingenommen wird, die für die Neu-anbindung am Carboxylterminus des Dimers, unter Bildung des tetraedrischen Intermediats TI2 (H), geeignet ist. Protonenübertrag des Histidinprotons zur terminalen Hydroxygruppe des TI2 ergibt den um eine Monomereinheit verlängerten Acyl-Enzym-Komplex C1.<sup>[93]</sup>

**Tabelle 3.9:** Wechselwirkungen des abgelösten Dimers F1 zum *oxyanion hole* und zum umgebenden Protein nach QM/MM-Optimierung

	O(Dimer)-NH(Gln106)	O(Dimer)-OH(Thr40)	O(Dimer)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	2,96	2,57	3,40
Winkel (°)	169,8	163,7	61,6
	OH(Dimer)-O(Thr40)	NH(Dimer)-O(Gly39)	
Abstand (Å)	2,55	2,71	
Winkel (°)	166,3	163,3	

## Schritt VII

Das abgelöste Dimer durchquert die Alkoholseite der Tasche in Richtung Acylseite, bleibt dabei aber mit der Carboxylgruppe am Thr40-O verankert (s. Abb. 3.4F1 und 3.5G). Der terminale Carboxylsauerstoff zeigt bereits eine erste Wechselwirkung zum *oxyanion hole* (Thr40-NH) und wird durch nucleophilen Angriff des Serinsauerstoffs am Carboxylkohlenstoff vollständig ins *oxyanion hole* gezogen. Die Orientierung des Carboxylkohlenstoffs bezüglich Ser105 ist nicht ideal für einen Angriff des Serinssauerstoffs (3,60 Å, 64,4°); dieser konnte allerdings mittels der *spring method* von NWChem simuliert werden. Durch Anbringen einer *spring* zwischen Ser105-O und dem Carboxylkohlenstoff des Dimers erfolgte die terminale Neuansbindung unter Bildung des tetraedrischen Intermediates TI2 (s. Abb. 3.5H). Alternativ konnte das Dimer zunächst mit einem *constrain* an Ser105 angenähert werden und verblieb auch nach Lösen des *constrain* in einem Abstand von 2,86 Å zu Ser105 um von dieser Position ausgehend mithilfe einer *spring* angebunden zu werden. Beide Verfahrensweisen liefern exakt das gleiche Ergebnis. Beim nucleophilen Angriff des Serins erfolgt gleichzeitig ein Transfer des Serinprotons zum Histidinstickstoff (2,80 Å, 169,0°), der dadurch eine positive Ladung erhält. Der negativ geladene Sauerstoff des tetraedrischen Intermediates TI2 wird durch Wechselwirkungen zum *oxyanion hole* stabilisiert, während die terminale Aminogruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zum *backbone*-Carbonyl von Gln157 eingeht und die Hydroxygruppe des TI2 eine starke Wechselwirkung zu His224-NH aufweist (s. Tabelle 3.10).

**Tabelle 3.10:** Stabilisierung des terminal gebunden tetraedrischen Intermediates TI2 nach QM/MM-Geometrieoptimierung

	O(TI2)-NH(Gln106)	O(TI2)-OH(Thr40)	O(TI2)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	2,89	2,92	2,90
Winkel (°)	171,9	173,8	174,1
	NH <sub>2</sub> (TI2)-CO(Gln157)	OH(TI2)-NH(His224)	
Abstand (Å)	2,96	2,89	
Winkel (°)	171,1	168,3	

**Schritt VIII**

Das Dimer reagiert durch terminale Anbindung an Ser105 zum tetraedrischen Intermediat TI2, dessen Hydroxygruppe eine starke Wasserstoffbrückenbindung (2,89 Å, 168,3°) zu His224-NH zeigt, die in Schritt VIII in einem via QM/MM-Berechnung mit *spring* simulierten Protonenübertrag resultiert. Protonierung der terminalen OH-Gruppe führt unter Rückbildung der seringebundenen Carbonyl-Doppelbindung zur Abspaltung von Wasser und es entsteht ein um eine Monomereinheit verlängerter Acyl-Enzym-Komplex (s. Abb. 3.5C1, vgl. Abb. 3.1C). Bei dem freigesetzten Wassermolekül handelt es sich um das in Schritt IV zur Aktivierung des  $\beta$ -Lactams verwendete katalytische Wassermolekül, das nun wieder im nächsten Zyklus für eine weitere Aktivierung zur Verfügung steht. Die Kettenverlängerung ist demnach bezüglich des Wasserreservoirs des Enzyms neutral.

**Schritt IX**

Mit der Bildung eines elongierten Acyl-Enzym-Komplexes ist der Katalysezyklus vollständig und es kann entweder eine weitere Kettenverlängerung über Schritt III erfolgen oder eine Kettenablösung über Schritt IX. Beide Prozesse stehen in ständiger Konkurrenz zueinander. Im Fall einer Kettenablösung greift das in Schritt VIII abgespaltene katalytische Wassermolekül den Carbonylkohlenstoff des Acyl-Enzym-Komplexes nucleophil an. Ein Proton des Wassermoleküls wird dabei an His224-N abgegeben und es entsteht erneut das tetraedrische Intermediat TI2, aus dem durch Übertragung des Histidinprotons

auf Ser105 ein Oligomer abgespalten wird. Dieses kann, wenn es nicht sofort wieder angebunden wird, möglicherweise den Histidinstickstoff protonieren und so zur Inaktivierung des Enzyms führen oder die Tasche verlassen und ins Lösungsmittel diffundieren, von wo aus es für eine Kettenverlängerung in der richtigen Orientierung zurück in die Tasche finden müsste.



## 3.2 Molecular Modelling der *Candida antarctica* Lipase B katalysierten Polyesterbildung aus $\epsilon$ -Caprolacton

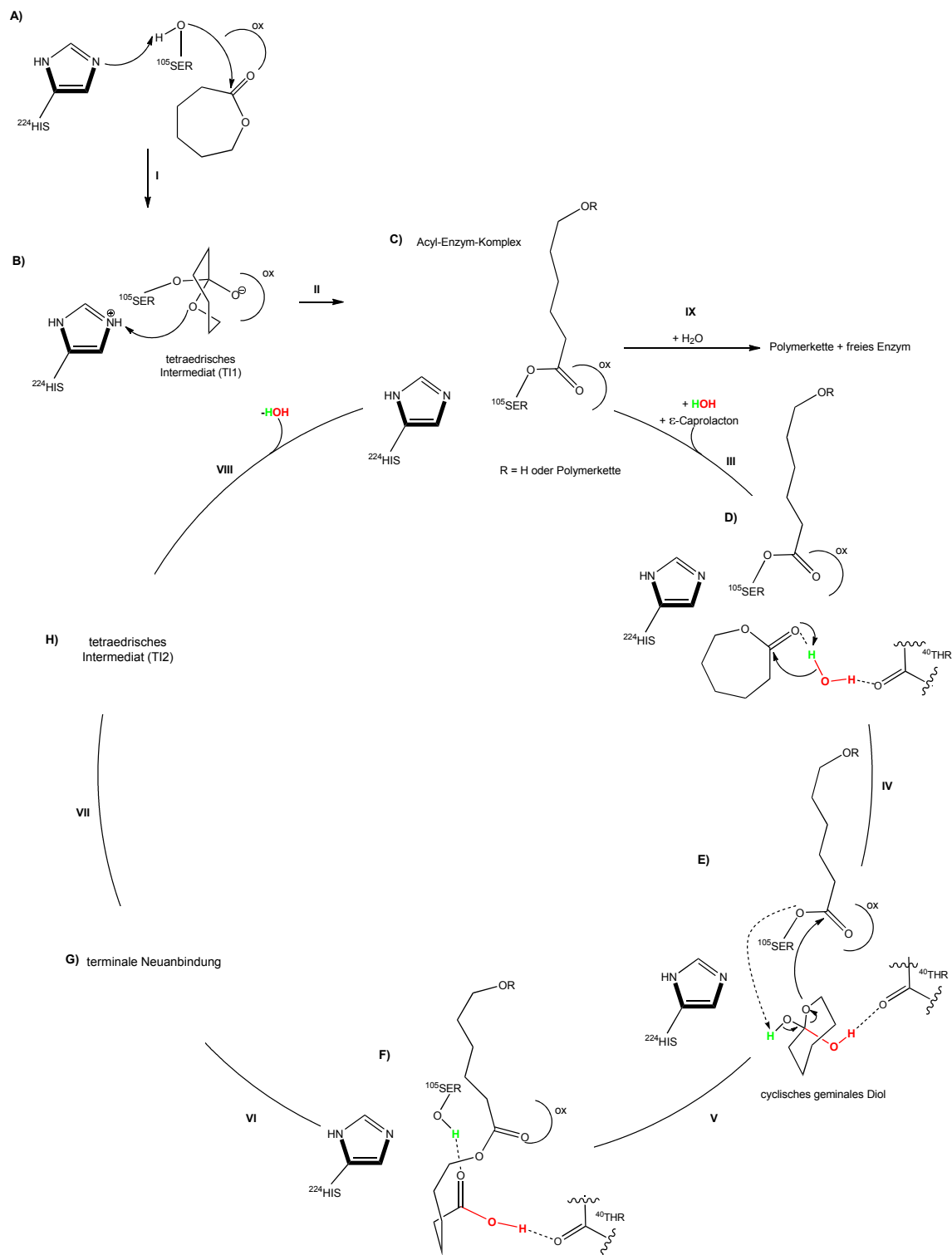
Der Mechanismus der *Candida antarctica* Lipase B katalysierten Ringöffnungspolymerisation von  $\epsilon$ -Caprolacton verläuft ähnlich der  $\beta$ -Lactam-Polymerisation über einen nucleophilen Angriff des Ser105 am Ringcarbonyl, die Bildung eines Acyl-Enzym-Komplexes unter Ringöffnung, die Verlängerung durch ein aktiviertes Monomer und die anschließende terminale Anbindung und Bildung eines verlängerten Acyl-Enzym-Komplexes. Trotz dieser mechanistischen Gemeinsamkeiten zeigen  $\beta$ -Lactam und  $\epsilon$ -Caprolacton ein grundlegend unterschiedliches Polymerisationsverhalten. Während  $\epsilon$ -Caprolacton mit hohen Molekulargewichten lipasekatalysiert polymerisierbar ist, bilden sich bei Verwendung von  $\beta$ -Lactam als Monomer nur Oligomere. Die Untersuchung des Mechanismus der lipasekatalysierten  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation mittels kraftfeldbasierter Dockingmethoden und QM/MM-Studien liefert jedoch einige Anhaltspunkte für dieses unterschiedliche Polymerisationsverhalten. Im Nachfolgenden werden die Schritte der CALB-katalysierten  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation im Einzelnen beschrieben.

### 3.2.1 Katalyseschritte der CALB-katalysierten Polyesterbildung

Schema 3.3 zeigt den Katalysezyklus der CALB-katalysierten  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation als Ergebnis von *Molecular-Modelling*-Studien. Dieser besteht aus einer initialen Acylierung des Enzyms in zwei Startschritten (I und II), sechs Propagationsschritten zur Kettenverlängerung (III-VIII) unter Verwendung eines aktivierten Monomers und einem Terminierungsschritt zur Ablösung des Polymers durch Wasser (IX).

#### Schritt I

Ein erstes  $\epsilon$ -Caprolacton-Monomer wurde mittels Docking- und QM/MM-Methoden auf der Alkoholseite der *active site* von CALB positioniert, wo das Monomer über Wasserstoffbrückenbindungen des Carbonylsauerstoffs zu Thr40-OH (2,81 Å, 151,0°) und



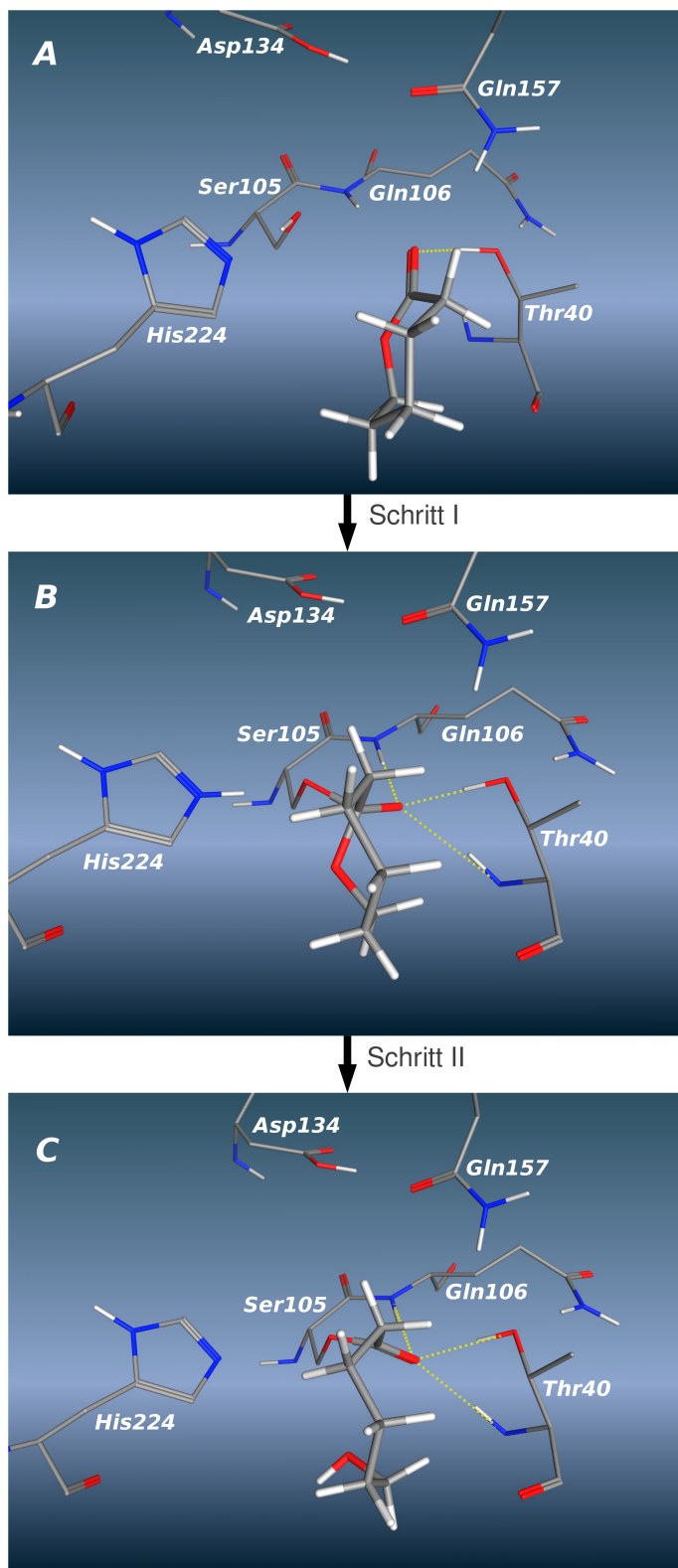
**Schema 3.3:** Katalysezyklus der *Candida antarctica* Lipase B katalysierten Ringöffnungspolymerisation von  $\epsilon$ -Caprolacton (ox: oxyanion hole).

Gln157-NH<sub>2</sub> (2,97 Å, 174,2°) stabilisiert wird. Das Proton der Serinhydroxygruppe weist in Richtung des basischen Stickstoffs des Histidins (2,74 Å, 156,3°), wodurch zwar eine geeignete Geometrie für einen Protonenübertrag zwischen diesen beiden Aminosäuren der katalytischen Triade gegeben ist, jedoch ist der Carbonylkohlenstoff des Lactons für einen nucleophilen Angriff des Serins zu weit entfernt (3,74 Å, 62,5°). In einer nachfolgenden QM/MM-Optimierung konnte dieser Abstand unter Anwendung von *constraints* auf 3,37 Å (bei 57,9°) nach erneuter Relaxation verringert werden, wobei die Wasserstoffbrückenbindung zu Gln157 verloren geht (s. Abb. 3.6A). Das Monomer wird immer noch durch Wechselwirkung zur Hydroxygruppe des Thr40 stabilisiert (2,68 Å, 149,9°) und es liegt weiterhin eine passende Geometrie für den Protonenübertrag zwischen Ser105 und His224 vor (2,65 Å, 157,1°). Da  $\epsilon$ -Caprolacton somit über mehrere lokale Minima in der Nähe des katalytischen Serins verfügt, kann angenommen werden, dass ein nucleophiler Angriff des Serinsauerstoffs am Carbonylkohlenstoff des Lactons erfolgen kann, wobei das Serinproton zu His224 übertragen wird. Dieser Angriff konnte mittels der *spring method* von NWChem simuliert werden, indem eine *spring* zwischen dem Serinsauerstoff und dem Carbonylkohlenstoff des Lactons zur Erzwingung einer Bindung eingebracht wurde. Gleichzeitig erfolgte der Transfer des Serinprotons zum His224.

In der daraus resultierenden tetraedrischen Zwischenstufe TI1 (s. Abb. 3.6B) liegt der Ringsauerstoff des Lactons auf der Alkoholseite der Tasche vor His224 und der ehemalige Carbonylkohlenstoff des gebundenen Monomers besitzt eine (*R*)-Konfiguration. Der negativ geladene Sauerstoff des TI1 ist durch drei Wasserstoffbrückenbindungen im *oxyanion hole* stabilisiert, wie in Tabelle 3.11 gezeigt. Der Ladungsausgleich findet dabei durch den positiv geladenen Histidinstickstoff statt, der nun das Serinproton trägt.

**Tabelle 3.11:** Wasserstoffbrückenbindungen zwischen tetraedrischem Intermediat TI1 und *oxyanion hole* nach QM/MM-Optimierung

	TI1 - <i>oxyanion hole</i>		
	O(TI1)-NH(Gln106)	O(TI1)-OH(Thr40)	O(TI1)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	2,73	2,66	3,11
Winkel (°)	176,4	176,0	162,9



**Abbildung 3.6:**  $\epsilon$ -Caprolacton in der Alkoholseite von CALB (A) nach Docking und QM/MM-Optimierung mit *constraint* und anschließender Relaxierung. Anbindung des  $\epsilon$ -Caprolactons durch Angriff des Serinsauerstoffs am Lactoncarbonyl (Schritt I) resultiert in einem ersten tetraedrischen Intermediat TI1 (B). Ringöffnung von TI1 (Schritt II) durch Protonenübertragung des Histidinprotons zum Ringsauerstoff des ehemaligen Lactonrings ergibt eine seringebundene  $\epsilon$ -Hydroxy-Acylseitenkette (Acyl-Enzym-Komplex), deren Hydroxygruppe nach QM/MM-Geometrieoptimierung noch auf der Alkoholseite der Tasche liegt (C).

Für die Bildung des entsprechenden (*S*)-Enantiomers, in dem der Ringsauerstoff auf der Acylseite liegt, muss das ungebundene  $\epsilon$ -Caprolacton eine andere Konformation einnehmen. Veld *et al.*<sup>[85]</sup> unterscheidet in seinen Untersuchungen zur Reaktivität verschiedener Lactone zwischen einem produktiven und einem unproduktiven Bindungsmodus. Der produktive Bindungsmodus nach Veld *et al.* führt im vorliegenden Fall zu einem (*R*)-Enantiomer, während aus dem unproduktiven Bindungsmodus ein (*S*)-Enantiomer resultiert. Docking-Experimente von  $\epsilon$ -Caprolacton in der Bindungstasche von CALB ergaben im ersten Dockinglauf (*mcdock*) beide Bindungsmodi zu fast gleichen Anteilen, wobei der unproduktive Bindungsmodus leicht überwiegt. Das Rescoring-Verfahren nach Alisaraie *et al.*<sup>[104]</sup> und Haller<sup>[105]</sup> (s. auch Abschnitt 5.4.3) verweist jedoch auf drei Strukturen mit produktivem Bindungsmodus, die in weiteren verfeinernden Dockingläufen (*mcdock*) eingesetzt wurden. Auch in diesen befinden sich unproduktive Bindungsmodi unter den ausgegebenen Strukturen. Die im Rescoring ermittelten Docking-Ergebnisse liegen jedoch erneut im produktiven Bindungsmodus vor. Aus diesem Grund wurden die unproduktiven Ligand-Enzym-Komplexe nicht weiter untersucht, sondern nur die als Treffer des Rescorings erhaltenen produktiven Bindungsmodi in Energieminimierungen und QM/MM-Optimierungen weiter verfeinert. Die Bildung eines (*S*)-Enantiomers durch Anbindung eines im unproduktiven Bindungsmodus vorliegenden  $\epsilon$ -Caprolacton-Monomers ist allerdings nicht auszuschließen.

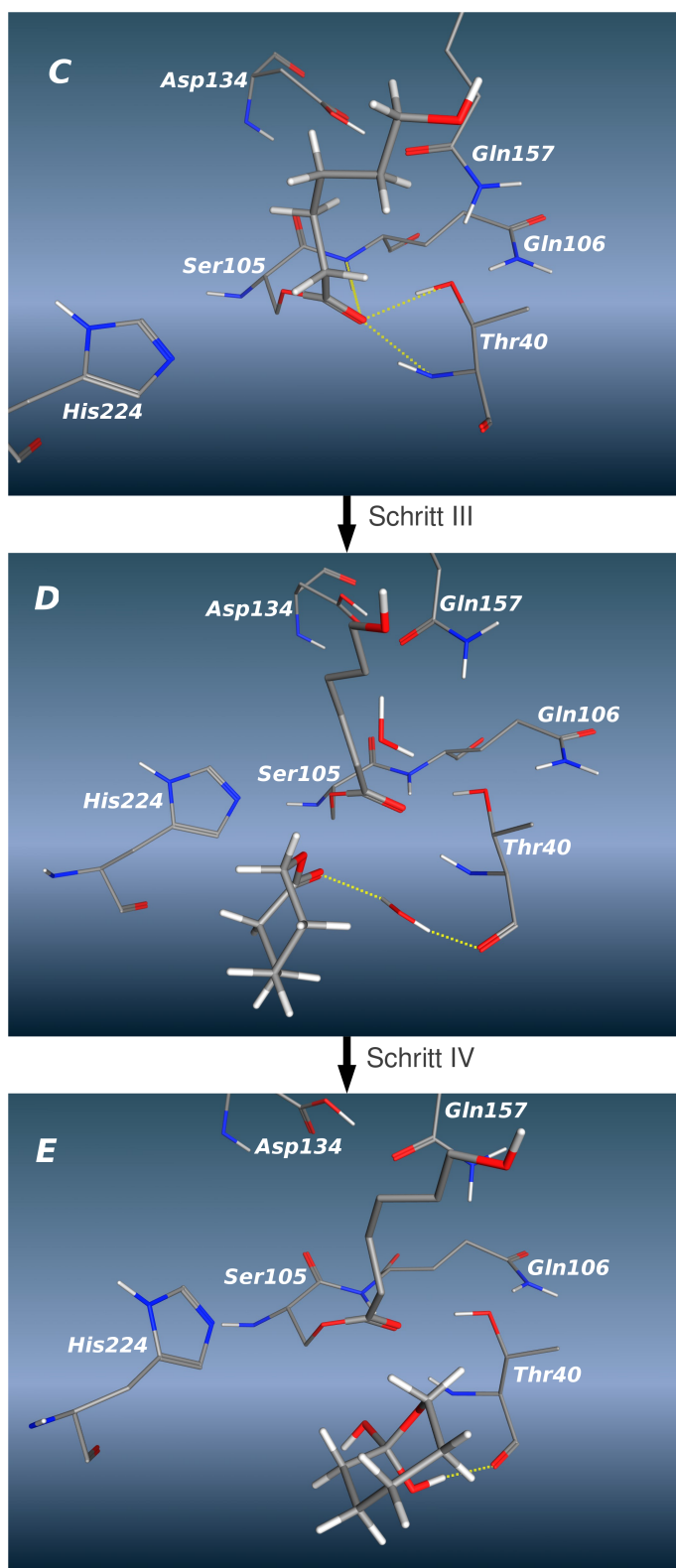
## Schritt II

Ein nucleophiler Angriff des Serinsauerstoffs am Lactoncarbonyl resultiert in einer tetraedrischen Zwischenstufe TI1, die entweder eine (*R*)- oder (*S*)-Konfiguration am ehemaligen Carbonylkohlenstoff aufweist. Im nächsten Katalyseschritt erfolgt eine Ringöffnung des Lactonrings durch Transfer des Histidinprotons zum Ringsauerstoff. Im (*S*)-Enantiomer des TI1, dessen Ringsauerstoff auf der Acylseite der Tasche liegt, ist ein solcher Protonenübertrag höchstwahrscheinlich nicht auf direktem Wege möglich, ein wasserassistierter Protonenübertrag analog zur Ringöffnung des  $\beta$ -Lactams (s. Abschnitt

3.1.1 Schritt II) aber durchaus denkbar. Dieser Reaktionsweg wurde nicht weiter verfolgt, da Docking-Studien auf eine Konformation des ungebundenen Monomers verweisen, die bei Anbindung das (*R*)-Enantiomer des ersten tetraedrischen Intermediats TI1 (s. Abb. 3.6B) ergibt, dessen Ringsauerstoff auf der Alkoholseite angeordnet ist. In dieser Struktur ist der Abstand zwischen His224-NH und dem Ringsauerstoff des Lactons für den zur Ringöffnung notwendigen Protonenübertrag noch zu groß (3,50 Å), da das Histidin in Richtung Ser105 orientiert ist. Die hohe Beweglichkeit des His224 ermöglicht jedoch ein Umschwenken der Histidin-Seitenkette zur Alkoholseite und somit den erforderlichen Transfer eines Protons vom Histidinstickstoff zum Ringsauerstoff des Lactons. Die Simulation dieses Protonentransfers erfolgte durch Anbringen einer *spring* zwischen Histidinproton und Ringsauerstoff, wodurch das Proton übertragen und der ehemalige Lactonring unter Rückbildung der Carbonylgruppe geöffnet wird. Nach QM/MM-Optimierung verblieb die Alkoholfunktion des gebildeten Acyl-Enzym-Komplexes zunächst in einem lokalen Energieminimum auf der Alkoholseite der Tasche, wie in Abbildung 3.6C gezeigt. Kovalentes Docking der enzymgebundenen Acylkette platzierte diese vollständig auf der Acylseite der Tasche (s. Abb 3.7C). Diese Konformation, in der die Acylkette auf der Acylseite angeordnet ist, stellt ein globales Minimum dar. Zur Entfaltung der Kette und Übergang vom lokalen ins globale Minimum muss eine Energiebarriere überwunden werden, wofür sich Docking-Studien ausgesprochen gut eignen.

In beiden Strukturen erfolgt eine Stabilisierung der serin-gebundenen Carbonylgruppe des Acyl-Enzym-Komplexes durch das *oxyanion hole*, wobei in der gedockten Struktur zwei starke Wasserstoffbrückenbindungen zu Thr40 aufzufinden sind, während die Wechselwirkung zu Gln106 fast verloren geht (s. Tabelle 3.12).

Die Generierung eines ersten Acyl-Enzym-Komplexes (C) bildet den Einstieg in den Katalysezyklus (vgl. Schema 3.3). Von Struktur C ausgehend kann nun entweder die Verlängerung der Kette über Schritt III ablaufen oder eine Ablösung durch Wasser in Schritt IX stattfinden.



**Abbildung 3.7:** Die seringebundene  $\epsilon$ -Hydroxy-Acylseitenkette liegt nach kovalentem Docking auf der Acylseite der Tasche (C), während sie in QM/MM-Studien zunächst auf der Alkoholseite verbleibt (Abb. 3.6C). Docking des zweiten Monomers in das acylierte Enzym und nachfolgende QM/MM-Studien zeigen eine Positionierung des Monomers im Wasserstoffbrückenbindungsabstand zum katalytischen Wassermolekül vor Thr40 (Schritt III, Struktur D). Ein Angriff des Wassersauerstoffs am Lactoncarbonyl resultiert in einem geminalen cyclischen Diol (Schritt IV, Struktur E), das als aktiviertes Monomer in der Lage ist den Acyl-Enzym-Komplex zu verlängern.

**Tabelle 3.12:** Wechselwirkungen des Acyl-Enzym-Komplexes (aec) zum *oxyanion hole* nach a) Docking bzw. b) QM/MM-Optimierung

a) Acyl-Enzym-Komplex - <i>oxyanion hole</i> (Docking)			
	O(aec)-NH(Gln106)	O(aec)-OH(Thr40)	O(aec)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	3,38	2,66	2,57
Winkel (°)	138,1	166,0	153,8
b) Acyl-Enzym-Komplex - <i>oxyanion hole</i> (QM/MM)			
	O(aec)-NH(Gln106)	O(aec)-OH(Thr40)	O(aec)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	2,81	2,68	3,04
Winkel (°)	168,8	164,5	167,1

### Schritt III

Nach Anbindung des ersten Monomers und Bildung eines Acyl-Enzym-Komplexes muss zur Kettenverlängerung ein neues Monomer in die Tasche eintreten. Dieser Vorgang wurde mittels Dockingstudien von  $\epsilon$ -Caprolacton in die Bindungstasche des acylierten Enzyms, dessen Acylkette in der Acylseite der *active site* liegt, simuliert. Die Docking-Experimente wurden sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Kristallwasser (vgl. Abb. 3.2 in Abschnitt 3.1.1 Schritt II) durchgeführt. Im Gegensatz zu Lactamen, die durch den Doppelbindungscharakter der Peptidbindung bedingt nur über eine niedrige Elektronendichte am Ringstickstoff verfügen, weisen Lactone eine wesentlich höhere Elektronendichte am Ringsauerstoff auf. Somit ist hier auch die Möglichkeit einer direkten Verlängerung ohne vorherige Aktivierung des Monomers zu überprüfen, wobei sich in QM/MM-Studien jedoch zeigte, dass auch die  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation eines Wassermoleküls zur Aktivierung bedarf. Eine direkte Verlängerung ist ausgehend von den verschiedensten Ligandpositionen weder mit noch ohne Kristallwasser möglich. Docking-Studien und nachfolgende QM/MM-Optimierungen in Anwesenheit von Kristallwasser ergaben eine fast senkrechte Positionierung des zweiten  $\epsilon$ -Caprolactonmonomers in der Alkoholseite der *active site*, wo es eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem vor Thr40 befindlichen Wassermolekül aufweist. Die freien Elektronenpaare des Wassersauerstoffs zeigen dabei in Richtung des Trp104, das den Boden der Tasche bildet. Durch Anwenden eines *cons-*



*straints* und nachfolgende QM/MM-Optimierung konnte eine Drehung des Wassermoleküls erreicht werden, wobei die Position des Lactons fast identisch bleibt und auch die Wasserstoffbrückenbindungen des Wassermoleküls Bestand haben. Abbildung 3.7D zeigt die auf diese Weise erlangte Platzierung des Monomers in der *active site* des acylierten Enzyms. Das konservierte Wassermolekül vor Thr40 befindet sich im Wasserstoffbrückenbindungsabstand zum *backbone*-Carbonylsauerstoff dieser Aminosäure (2,63 Å, 168,6°) und bildet gleichzeitig eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonylsauerstoff des Lactons (2,94 Å, 144,6°). Abstand und Winkel des Wassersauerstoffs zum Lactoncarbonyl (3,01 Å, 74,9°) sind dabei gut für eine Aktivierung des Monomers durch das katalytisch genutzte Wasser geeignet. Der Acyl-Enzym-Komplex, dessen Wechselwirkungen in Tabelle 3.13 zusammengefasst sind, bleibt weiterhin im *oxyanion hole* stabilisiert, während seine Hydroxygruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Solvensmolekül ausbildet.

**Tabelle 3.13:** Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Acyl-Enzym-Komplex und *oxyanion hole* bzw. Solvensmolekül nach Dockingstudien des zweiten  $\epsilon$ -Caprolactonmonomers und anschließender QM/MM-Optimierung (s. Abb. 3.7D)

Acyl-Enzym-Komplex (aec) - <i>oxyanion hole</i>			
	O(aec)-NH(Gln106)	O(aec)-OH(Thr40)	O(aec)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	2,84	2,75	2,84
Winkel (°)	155,6	170,8	160,0
Acyl-Enzym-Komplex (aec) - H <sub>2</sub> O			
	OH(aec)-OH(H <sub>2</sub> O)		
Abstand (Å)	2,78		
Winkel (°)	168,9		

#### Schritt IV

Die Aktivierung des  $\epsilon$ -Caprolactons erfolgt durch einen nucleophilen Angriff des Sauerstoffs des katalytischen Wassermoleküls am Carbonylkohlenstoff des  $\epsilon$ -Caprolactons, der mittels einer QM-spring simuliert wurde. Dabei ist eine Übertragung des Wasserprotons, das vorher eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonylsauerstoff des Lactons

ausbildete, auf eben diesen Carbonylsauerstoff zu beobachten. Es resultiert ein cyclisches geminales Diol, das auch in der nachfolgenden QM/MM-Optimierung stabil blieb. Dieses ist durch Wasserstoffbrückenbindung der Hydroxygruppe des Diols zu Thr40 (2,71 Å, 172,9°) stabilisiert (s. Abb. 3.7E), wobei es sich um dieselbe OH-Gruppe handelt, die auch vorher im katalytischen Wassermolekül auf Thr40 gerichtet ist. Das kristallographische Wassermolekül vor Thr40 wird in diesem Schritt nicht verbraucht, sondern nur als Katalysator verwendet, der in Schritt VIII wieder freigesetzt wird. Der Acyl-Enzym-Komplex ist weiterhin durch das *oxyanion hole* und ein Wassermolekül stabilisiert, wie in Tabelle 3.14 gezeigt. Der Ringsauerstoff dieses aktivierten Monomers befindet sich in einem Abstand von 3,34 Å zum Carbonylkohlenstoff des Acyl-Enzym-Komplexes und ist senkrecht zu diesem ausgerichtet (90,4°), wodurch ein sofortiger nucleophiler Angriff des Diols am Acyl-Enzym-Komplex möglich wird. Alternativ wäre auch ein vorheriger Zerfall des Diols in die entsprechende Hydroxycarbonsäure denkbar, der allerdings in entsprechenden QM/MM-Rechnungen unter Anwendung der *spring method* nicht zu beobachten war und deshalb nicht weiter berücksichtigt wurde.

**Tabelle 3.14:** Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Acyl-Enzym-Komplex und *oxyanion hole* bzw. Solvensmolekül nach QM/MM-Optimierung des aktivierten Monomers (s. Abb. 3.7E)

Acyl-Enzym-Komplex (aec) - <i>oxyanion hole</i>			
	O(aec)-NH(Gln106)	O(aec)-OH(Thr40)	O(aec)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	2,76	2,75	2,89
Winkel (°)	155,2	170,3	154,7
Acyl-Enzym-Komplex (aec) - H <sub>2</sub> O			
	OH(aec)-OH(H <sub>2</sub> O)		
Abstand (Å)	2,77		
Winkel (°)	168,6		

## Schritt V

Das in Schritt IV gebildete aktivierte Monomer kann zur Kettenverlängerung eingesetzt werden, wobei der senkrecht zum Carbonylkohlenstoff des Acyl-Enzym-Komplexes po-

sitionierte Ringsauerstoff des cyclischen Diols (3,34 Å, 90,4°) diesen nucleophil angreift. Dieser Vorgang wurde durch eine QM-*spring* simuliert, wobei nach Verlängerung eine sofortige Ablösung des Dimers erfolgt. Ein stabiles zweites tetraedrisches Intermediat wurde nicht gefunden. Der nucleophile Angriff des Ringsauerstoffs an der seringebundenen Carbonylgruppe der  $\epsilon$ -Hydroxy-Acylseitenkette bewirkt eine Ringöffnung des aktivierten Monomers, wodurch ein Proton des geminalen Diols unter Bildung einer terminalen Carboxylgruppe abgespalten wird. Ob dieses Proton zunächst unter Bildung eines tetraedrischen instabilen Übergangszustands an His224 übertragen wird, um von dort zu Ser105 transferiert zu werden, oder ob aufgrund der räumlichen Nähe während des nucleophilen Angriffs der Protonentransfer direkt vom Diol zum Serinsauerstoff erfolgt, ist nicht klar. Die Ablösung des Dimers fand bereits während der ersten QM/MM-Optimierung unter Anwendung der *spring* statt und nicht erst bei der anschließenden Relaxation, so dass keine Rückschlüsse zu ziehen sind über welchen Übergangszustand die Reaktion verläuft. Die Estercarbonylgruppe des abgelösten Dimers (s. Abb. 3.8F) zeigt noch immer zwei Wechselwirkungen zu den am *oxyanion hole* beteiligten Gruppen des Thr40, während das Proton der terminalen Carboxylgruppe eine starke Wasserstoffbrückenbindung zum *backbone*-Carbonyl des Thr40 aufweist und die Hydroxygruppe des Serins auf den Carbonylsauerstoff der Säuregruppe gerichtet ist (s. Tab. 3.15).

**Tabelle 3.15:** Wasserstoffbrückenbindungen der Estercarbonylgruppe und Carboxylgruppe des abgelösten Dimers zum *oxyanion hole* und umgebenden Protein nach QM/MM-Optimierung (s. Abb. 3.8F)

	Estergruppe (Dimer) - <i>oxyanion hole</i>	
	CO(Ester)-OH(Thr40)	CO(Ester)-NH(Thr40)
Abstand (Å)	2,70	3,20
Winkel (°)	162,0	149,9
	Carboxylgruppe (Dimer) - Enzym	
	H(COOH)-CO(Thr40)	CO(COOH)-OH(Ser105)
Abstand (Å)	2,58	2,83
Winkel (°)	169,1	150,4



erstoff im *oxyanion hole* stabilisiert ist. Die Hydroxygruppe des TI2 wird daraufhin in Verbindung mit dem Histidinproton als Wassermolekül abgespalten, wobei sich unter Rückbildung der seringebundenen Carbonylgruppe ein elongierter Acyl-Enzym-Komplex ergibt (Schritt VIII).

### Schritt IX

Nach Durchlaufen jedes Katalysezyklus ergibt sich ein um eine Monomereinheit verlängerter Acyl-Enzym-Komplex, der entweder über Schritt III weiter elongiert oder in Schritt IX durch nucleophilen Angriff eines Wassermoleküls am Carbonylkohlenstoff abgelöst werden kann, wobei zunächst ein Proton des Wassermoleküls an His224 übergeht und das tetraedrische Intermediat TI2 resultiert. Dieses spaltet durch Protonentransfer vom katalytischen Histidin zu Ser105 ein Oligomer mit terminaler Carboxylgruppe ab. Die beiden Reaktionswege der Kettenverlängerung und -terminierung stehen in ständiger Konkurrenz zueinander. Die abgelöste Polymerkette kann entweder die Tasche verlassen und ins Lösungsmittel diffundieren, was ein weiteres Kettenwachstum unwahrscheinlich macht, da dazu ein erneuter Eintritt in die Bindungstasche in geeigneter Orientierung erfolgen muss, oder sofort neu angebunden werden. Das in diesem Schritt verwendete Wassermolekül wird verbraucht, sofern keine Neuanbindung der Kette erfolgt. Somit muss das Wasserreservoir des Enzyms pro abgelöster Polymerkette ein Wassermolekül zur Verfügung stellen. Die Gefahr einer Inaktivierung des Enzyms durch Protonierung des Histidins der katalytischen Triade besteht bei der  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation nicht, da das hydrolysierte Monomer (6-Hydroxyhexansäure) einen hinreichend hohen  $pK_a$ -Wert von  $4,75 \pm 0,1$ <sup>[98]</sup> aufweist und dieser bei Oligomerisierung noch weiter ansteigt.



## 4 Diskussion und Ausblick

### 4.1 Vergleich der CALB-katalysierten Polymerisationen von $\beta$ -Lactam und $\epsilon$ -Caprolacton

Obwohl die *Candida antarctica* Lipase B katalysierte Polymerisation von Lactonen Polyester mit hohen Molekulargewichten liefert,<sup>[75]</sup> konnte die analoge Polyamidsynthese bisher einzig mit  $\beta$ -Lactam als Monomer durchgeführt werden, wobei nur eine Oligomerisierung mit der maximalen Kettenlänge von 18 und einer durchschnittlichen Länge von 8 Monomereinheiten gelingt.<sup>[59],[88]</sup> Die zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen werden in der Literatur bislang als identisch angesehen, wobei sie nur spekulativ und bisher nicht experimentell oder theoretisch untersucht worden sind. An diesem Punkt setzt die vorliegende Arbeit an, mit dem Ziel, die experimentellen Befunde mechanistisch zu erklären.

Die CALB-katalysierte Polymerisation von  $\beta$ -Lactam verläuft über die Anbindung des ersten Monomers durch nucleophilen Angriff des Ser105-Sauerstoffs am  $\beta$ -Lactam-Carbonyl und Ringöffnung des so gebildeten tetraedrischen Intermediats TI1 unter Zuhilfenahme eines katalytischen Wassermoleküls als Protonenshuttle zur Protonenübertragung von His224-NH zum auf der Acylseite liegenden Ringstickstoff des TI1. Der daraus resultierende Acyl-Enzym-Komplex wird entweder in einem sechsschrittigen Katalysezyklus um eine Monomereinheit verlängert oder durch nucleophilen Angriff des katalytischen Wassermoleküls abgespalten.

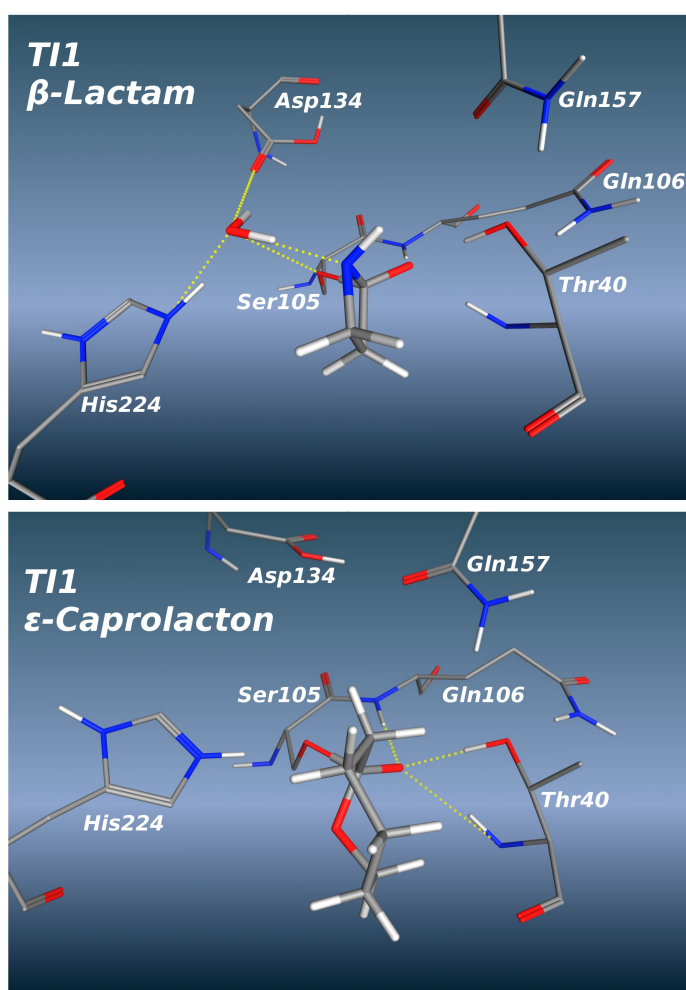
Die Verlängerung erfolgt dabei durch ein *in situ* gebildetes  $\beta$ -Alanin, das durch nucleophilen Angriff eines kristallographischen Wassermoleküls auf den  $\beta$ -Lactam-Carbonylkohlenstoff entsteht. Dieses katalytisch genutzte Wassermolekül befindet sich an einer in der Kristallstruktur von CALB konservierten Wasserposition vor Thr40 und weist bei Aktivierung Wasserstoffbrückenbindungen zu den *backbone*-Carbonylgruppen von Gly39

und Thr40 auf, zu deren Gunsten eine Wasserstoffbrückenbindung des *oxyanion holes* verloren geht. Das *in situ* gebildete  $\beta$ -Alanin stellt das kettenverlängernde Monomer der  $\beta$ -Lactam-Polymerisation dar und greift den Carbonylkohlenstoff der seringebundenen  $\beta$ -Amino-Acylkette nucleophil an. Das resultierende Dimer wird sofort abgelöst und muss nach Konformationsänderung und Durchwanderung der Tasche in einem darauffolgenden Schritt durch nucleophilen Angriff des Serinsauerstoffs an seiner terminalen Carboxylgruppe neu angebunden werden. In einem letzten Schritt entsteht unter Freisetzung des katalytischen Wassermoleküls ein verlängerter Acyl-Enzym-Komplex, der entweder in einen neuen Zyklus eintreten oder durch nucleophilen Angriff eines Wassermoleküls abgelöst werden kann.

Die CALB-katalysierte  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation erfolgt ähnlich der  $\beta$ -Lactam-Polymerisation über die Bildung eines tetraedrischen Intermediats TI1, das nach Ringöffnung zum Acyl-Enzym-Komplex durch ein aktiviertes Monomer verlängert wird. Die Ringöffnung des ersten tetraedrischen Intermediats TI1 verläuft dabei allerdings durch einen direkten Protonentransfer vom basischen Histidinstickstoff des His224 zum in der Alkoholseite befindlichen Ringsauerstoff des ehemaligen Caprolactons ohne Verwendung eines Wassermoleküls als Protonenshuttle. Abbildung 4.1 zeigt die ersten tetraedrischen Intermediate der  $\beta$ -Lactam- und  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation im direkten Vergleich. Die Bildung des Acyl-Enzym-Komplexes der  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation zeigt demnach keine Wasserabhängigkeit.

Nach Acylierung des Enzyms besteht sowohl bei der Polyester- als auch bei der Polyamidsynthese eine ständige Konkurrenz zwischen Kettenverlängerung und Ablösung. Beide Reaktionen benötigen ein Wassermolekül vor Thr40 zur Erzeugung eines aktivierten Monomers, das aufgrund der räumlichen Nähe alternativ auch den Acyl-Enzym-Komplex ablösen könnte. Dieses zur Kettenterminierung verwendete Wasser wird verbraucht und muss aus dem Wasserhaushalt des Enzyms ersetzt werden, was allerdings kein limitierender Faktor der  $\beta$ -Lactam-Polymerisation ist, da dieses Wassermolekül auch in Lactonpolymerisationen vom Enzym aufgebracht wird.<sup>[75]</sup> Als problematisch erwie-





**Abbildung 4.1:** Erstes tetraedrisches Intermediat TI1 der  $\beta$ -Lactam- (oben) und  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation (unten). Durch die inverse Anordnung des Ringstickstoffs im ehemaligen  $\beta$ -Lactam-Ring im Vergleich zum Ringsauerstoff des  $\epsilon$ -Caprolactons kann kein direkter sondern nur ein wasserassistierte Protonenübertrag zum Ringstickstoff erfolgen.

sen hat sich jedoch die Säurestärke der dabei freigesetzten Säuren. Während  $\beta$ -Alanin im wässrigen Medium einen  $pK_a$ -Wert von 3,6<sup>[95]</sup> aufweist, der deutlich unter der von Hollmann *et al.*<sup>[67]</sup> postulierten Inaktivierungsschwelle der CALB ( $pK_a \sim 4,8$ ) liegt, zeigt 6-Hydroxyhexansäure einen  $pK_a$  von 4,75<sup>[98]</sup> und verursacht keine Inhibierung. Protonierung des katalytischen Histidins durch eine Säure wie  $\beta$ -Alanin führt zu einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms, da der zur kovalenten Anbindung eines Substrats notwendige Protonentransfer von Ser105 zu His224 nicht mehr möglich ist.  $\beta$ -Alaninoligomere weisen ab einer Kettenlänge von drei Einheiten einen im Vergleich zum Monomer erhöhten  $pK_a$  von 4,2 auf, weshalb angenommen werden kann, dass die Wahrscheinlichkeit einer Inaktivierung des Enzyms von  $\beta$ -Alanin zum  $\beta$ -Alanintrimer hin leicht abnimmt. Da in den Studien von Hollmann *et al.*<sup>[67]</sup> keine Säuren mit  $pK_a$ -Werten zwischen 4,3 und 4,7 eingesetzt wurden und nur eine Säure bei  $pK_a$  4,26 untersucht wurde, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden in welchem Maße die Inaktivierung durch  $\beta$ -Alanintrimere und höhere Oligomere stattfindet. Es wird jedoch in den vielen Polymerisationszyklen, die das Enzym durchlaufen sollte, aufgrund der Konkurrenz von Kettenablösung und Wachstum gelegentlich auch zu einer frühzeitigen Ablösung kommen. Im Falle des  $\epsilon$ -Caprolactons geht von der entstehenden Hydroxycarbonsäure dabei keine Gefahr aus und die Carbonylgruppe kann durch nucleophilen Angriff des katalytischen Serins wieder angebunden werden, während die Hydrolyse von  $\beta$ -Lactam ein  $\beta$ -Alanin freisetzt, das zwar auch wieder angebunden werden könnte, dazu allerdings mit der Carboxylgruppe in der Nähe des Serins und somit auch des Histidins vorliegen muss und dort aufgrund seines niedrigen  $pK_a$ -Wertes das Histidin der katalytischen Triade protonieren kann.

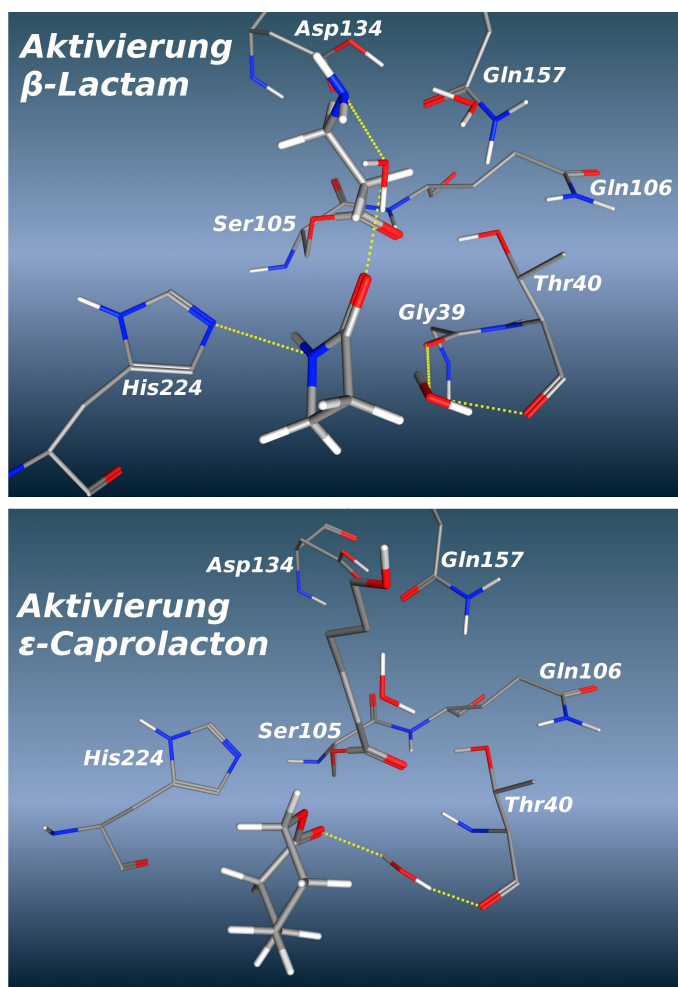
Die Kettenverlängerung beider Ringöffnungspolymerisationen verläuft über die Aktivierung des cyclischen Monomers unter Zuhilfenahme eines kristallographischen Wassermoleküls, wobei  $\beta$ -Lactam zu einem *in situ* generierten  $\beta$ -Alanin ringgeöffnet wird, wohingegen  $\epsilon$ -Caprolacton mit Wasser ein cyclisches geminales Diol bildet. In beiden Fällen greift die Hydroxygruppe des Wassers am Carbonylkohlenstoff des Monomers an. Die Übertragung des Wasserprotons erfolgt im  $\beta$ -Lactam jedoch auf den Ringstick-

stoff, während beim  $\epsilon$ -Caprolacton eine Protonierung des ehemaligen Carbonylsauerstoffs erfolgt. Wie in Berechnungen auf QM/MM-Niveau überprüft wurde, kann die Kettenverlängerung der  $\beta$ -Lactam-Polymerisation nicht analog zur  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation über ein cyclisches geminales Diol erfolgen. Ebenso wurde der Zerfall des bei der  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation auftretenden cyclischen geminalen Diols in die entsprechende Hydroxycarbonsäure in QM/MM-Rechnungen nicht beobachtet.

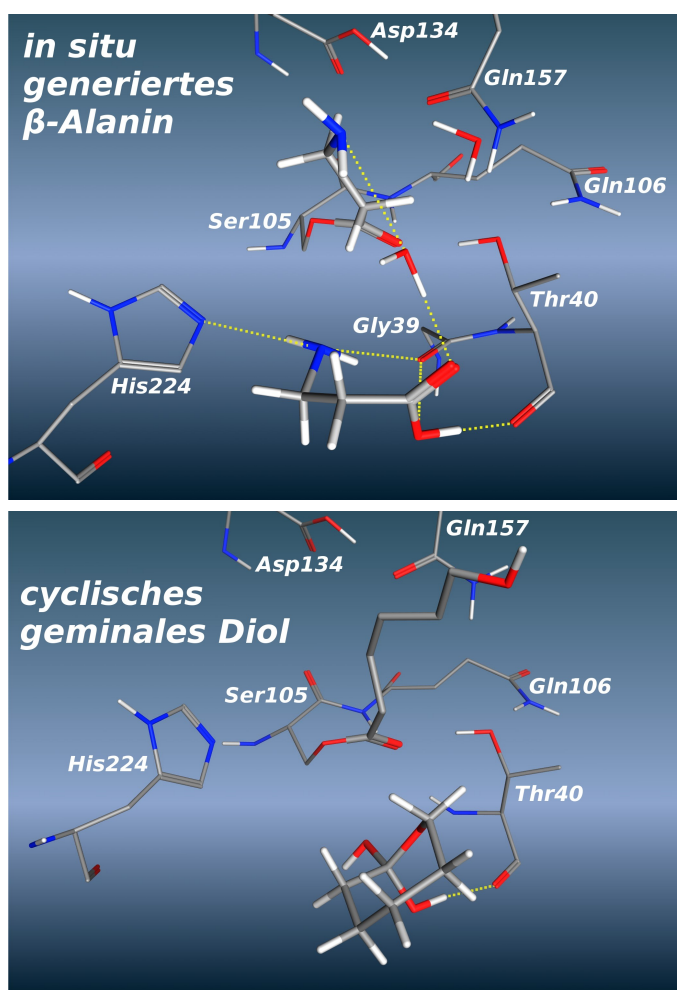
Die verschiedenen Mechanismen der Monomeraktivierung benötigen auch leicht unterschiedliche Positionierung des katalytischen Wassermoleküls, wie in Abbildung 4.2 gezeigt. Im Fall des  $\beta$ -Lactams ist das katalytische Wassermolekül nicht nur am Thr40- sondern auch am Gly39-Carbonylsauerstoff verankert, wozu eine Rotation der Thr40/Gly39-Peptidbindung erforderlich ist, die zum Verlust der Wasserstoffbrückenbindung des Thr40-NH zum Acyl-Enzym-Komplex führt. Der Verlust dieser Wechselwirkung des *oxyanion holes* und die Rotation der Bindung bedarf der Überwindung einer Energiebarriere bei *in situ* Generierung des  $\beta$ -Alanins, die zur Aktivierung des  $\epsilon$ -Caprolactons nicht notwendig ist. Abbildung 4.3 zeigt das *in situ* generierte  $\beta$ -Alanin und das zum cyclischen geminalen Diol umgesetzte  $\epsilon$ -Caprolacton im Vergleich. Die Carboxylgruppe des  $\beta$ -Alanins ist in Richtung der Thr40-*backbone*-Carbonylgruppe orientiert, während seine Aminogruppe zwischen His224 und Gly39 stabilisiert und optimal für die Verlängerung des Acyl-Enzym-Komplexes ausgerichtet ist. Der im nächsten Katalyseschritt folgende nucleophile Angriff der Aminogruppe an der seringebundenen Carbonylgruppe muss schneller ablaufen als eine Konformationsänderung des kettenverlängernden Monomers, was durch die Fixierung des  $\beta$ -Alanins mittels Wasserstoffbrückenbindungen gewährleistet ist. Auf diese Weise wird eine Protonierung des Histidins vorerst verhindert und die Kettenverlängerung durch ein eigentlich inhibierend wirkendes Monomer wie  $\beta$ -Alanin überhaupt erst möglich.

Im Vergleich dazu erfolgt bei der  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation eine wesentlich schwächere Stabilisierung des aktivierten Monomers. Dieses ist zwar ebenfalls über eine Hydroxygruppe am Thr40-Carbonylsauerstoff verankert, verfügt aber über keine weiteren

Wasserstoffbrückenbindungen, so dass das *oxyanion hole* bei der  $\epsilon$ -Caprolacton- im Gegensatz zur  $\beta$ -Lactam-Polymerisation intakt bleibt. Nach Kettenverlängerung durch das jeweilige Monomer erfolgt nach beiden Polymerisationsmechanismen die Ablösung eines Dimers, das durch Angriff des Serins an der terminalen Carboxylgruppe neu angebunden werden muss.



**Abbildung 4.2:** Positionierung des zweiten Monomers der  $\beta$ -Lactam- (oben) und  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation (unten) in der jeweils durch das entsprechende Monomer acylierten CALB.



**Abbildung 4.3:** Kettenverlängernde aktivierte Monomere der  $\beta$ -Lactam- (oben) und  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation (unten) in der jeweils durch das entsprechende Monomer acylierten CALB.

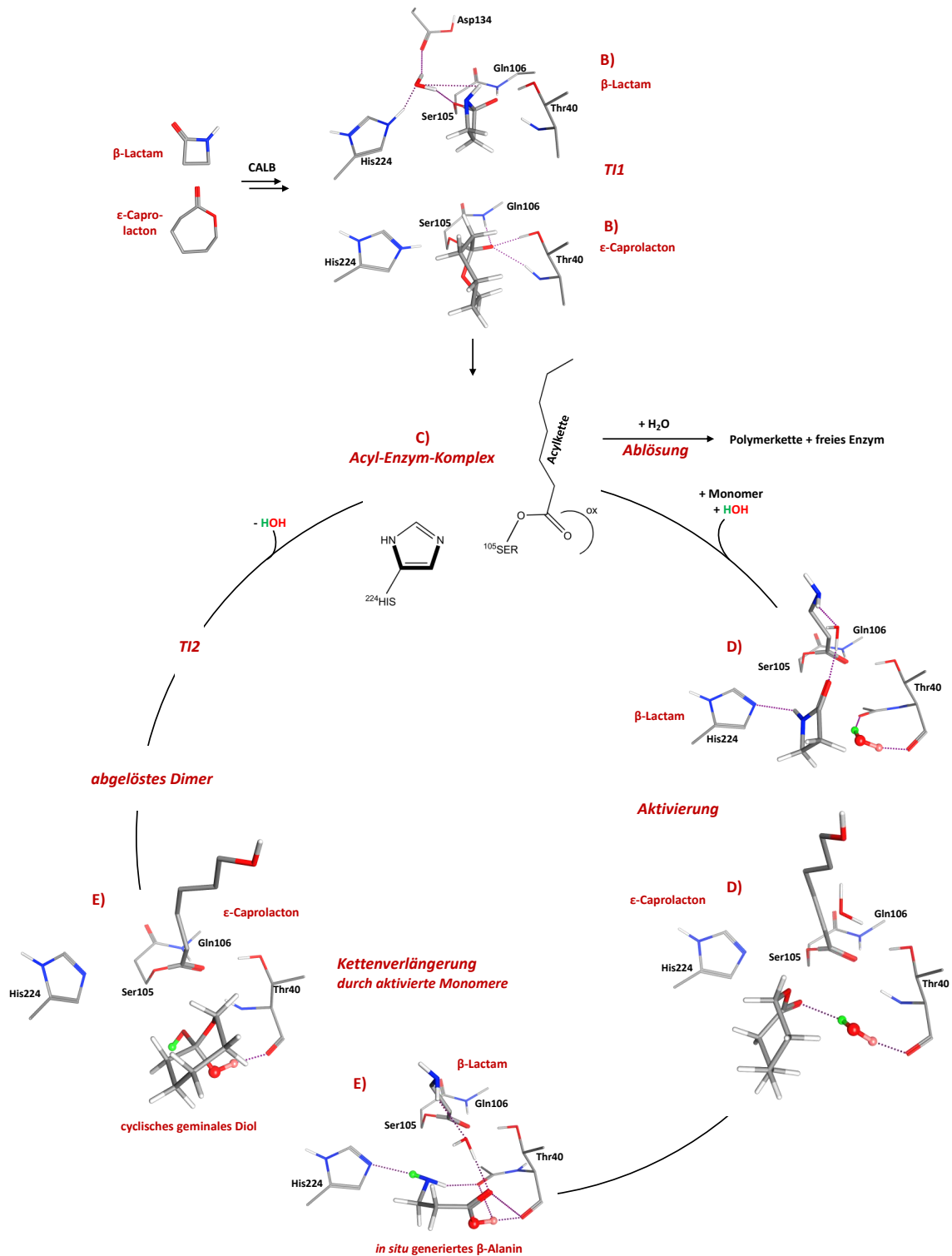
Zusammenfassend konnten drei grundlegende mechanistische Unterschiede der CALB-katalysierten Ringöffnungspolymerisation von  $\beta$ -Lactam und  $\epsilon$ -Caprolacton identifiziert werden:

	$\beta$ -Lactam	$\epsilon$ -Caprolacton
<b>Ringöffnung TI1</b> s. Abb. 4.4B	Wasser als Protonenshuttle	direkter Protonenübertrag
<b>Aktivierung</b> s. Abb. 4.4D	Stabilisierung des katalytischen Wassers über Thr40 und Gly39 $\Rightarrow$ Destabilisierung <i>oxyanion hole</i>	Stabilisierung des katalyti- schen Wassers über Thr40
<b>Kettenverlängerung</b> s. Abb. 4.4E	<i>in situ</i> generiertes $\beta$ -Alanin	cyclisches geminales Diol

Die Ringöffnung des ersten tetraedrischen Intermediates ist elementar, ohne sie kann keinerlei enzymkatalysierte Umsetzung stattfinden, weder Polymerisation noch Hydrolyse. Ein wasserassistierter Protonenübertrag, wie bei der  $\beta$ -Lactam-Polymerisation zu beobachten, verlangsamt möglicherweise die Polymerisationsgeschwindigkeit im Vergleich zur  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation, da die  $\beta$ -Lactam-Polymerisation so lange ruht bis ein Wassermolekül an geeigneter Stelle vorliegt, während der direkte Protonentransfer in der Lactonpolymerisation unabhängig davon vonstattengeht (s. Abb. 4.4B).

Der Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung und die daraus hervorgehende Destabilisierung des *oxyanion holes* zugunsten einer für die Aktivierung des  $\beta$ -Lactams geeigneten Positionierung des katalytischen Wassermoleküls zwischen Thr40 und Gly39 (s. Abb. 4.4D) ist höchstwahrscheinlich nicht der die  $\beta$ -Lactam-Polymerisation limitierende Faktor.

Für eine genauere Einschätzung dieser beiden ersten Effekte bedarf es der Berechnung der Aktivierungsenergien der entsprechenden Katalyseschritte beider Polymerisationen im Vergleich.



**Abbildung 4.4:** Wichtige Zwischenstufen im Katalysezyklus der *Candida antarctica* Lipase B katalysierten Ringöffnungspolymerisationen von  $\beta$ -Lactam und  $\epsilon$ -Caprolacton im Vergleich

Als der die Kettenlänge limitierende Faktor der  $\beta$ -Lactam-Polymerisation ist vor allem die Azidität des  $\beta$ -Alanins zu sehen. Dieses wird sowohl als *in situ* generiertes kettenverlängerndes Monomer (s. Abb. 4.4E) verwendet als auch bei enzymkatalysierter Hydrolyse freigesetzt. Im Gegensatz dazu liegt der  $pK_a$ -Wert von 6-Hydroxyhexansäure, die durch Hydrolyse von  $\epsilon$ -Caprolacton entsteht, in einem unkritischen Bereich.

## 4.2 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten die wesentlichen mechanistischen Unterschiede der CALB-katalysierten Ringöffnungspolymerisationen von  $\beta$ -Lactam und  $\epsilon$ -Caprolacton und die Gründe für die nur eingeschränkte Polymerisierbarkeit des  $\beta$ -Lactams aufgezeigt werden.

Die Optimierungsmöglichkeiten der  $\beta$ -Lactam-Polymerisation erwiesen sich allerdings als eher beschränkt, da die enzymkatalysierte Hydrolyse des  $\beta$ -Lactams die Säure  $\beta$ -Alanin freisetzt, deren Azidität ausreicht um das Histidin der katalytischen Triade zu protonieren, was zu einer Inaktivierung des Enzyms führt. Eine Mutation dieses für Serin-Hydrolasen typischen Histidinrestes gegen eine weniger basische Aminosäure ist nicht möglich, weil dadurch die katalytische Triade ihre Funktion einbüßen würde. Eine Verringerung des Wassergehalts des Enzyms und somit auch der Hydrolyseaktivität ist ebenfalls problematisch, da die Stabilität des Enzyms durch Entfernung des Kristallwassers in Mitleidenschaft gezogen wird und auch die Polymerisation selbst ein katalytisches Wassermolekül benötigt. Ein Optimierungsansatz der  $\beta$ -Lactam-Polymerisation bestünde aber in der Verwendung von möglichst wasserfreien CALB-Mutanten mit blockiertem Wassertunnel<sup>[60]</sup> in Verbindung mit einem geeigneten Alkohol, der sowohl als Protonenshuttle als auch als aktivierendes Reagenz verwendet würde. Einerseits würde eine Blockierung des Wassertunnels den Transport von Wassermolekülen aus dem Reservoir des Enzyms in die Bindungstasche hemmen. Andererseits ist z.B. ein Alkohol wie Methanol geeignet



sowohl als Protonenshuttle zu fungieren als auch die Bildung eines *in situ* generierten  $\beta$ -Alaninmethylester zu ermöglichen.

Ein gänzlich anderer Ansatz zur CALB-katalysierten Synthese von Nylon 3 wäre auf der Basis der Untersuchungen von Müller<sup>[106]</sup> denkbar, der Aminosäuren durch Bildung von Kontaktionenpaaren mit nicht-nucleophilen Basen in unpolaren Lösungsmitteln lipasekatalysiert umsetzt. Unter Umständen wäre die Erzeugung eines  $\beta$ -Alanin/Base-Kontaktionenpaars eine Möglichkeit  $\beta$ -Alanin selbst direkt als Monomer einzusetzen.

Orientierende *Modelling*-Studien zur Übertragung des hier postulierten Mechanismus der  $\epsilon$ -Caprolacton-Polymerisation auf die experimentell nicht mögliche Polymerisation von  $\epsilon$ -Caprolactam ergaben erste Anhaltspunkte, dass auch  $\epsilon$ -Caprolactam analog zu  $\beta$ -Lactam einen inversen TI1 ausbildet, dessen Ringstickstoff in der Acylseite liegt. Aufgrund der unterschiedlichen Ringgröße und -konformation des Siebenrings im Vergleich zum Vierring des  $\beta$ -Lactams unterscheidet sich auch die Lage des Ringstickstoffs beider Intermediate, wobei das NH-Proton des ehemaligen Caprolactams eine starke Wechselwirkung zu Gln157 bildet und ein TI1 resultiert, das aufgrund der ungünstigen Geometrie auch über einen wasserassistierten Protonentransfer nicht ringgeöffnet werden kann. Hier wäre vermutlich eine Verhinderung dieser Wechselwirkung über Mutation des Gln157 durch Aminosäuren mit kürzeren Seitenketten ein potenzieller Weg, um auch die CALB-katalysierte  $\epsilon$ -Caprolactam-Polymerisation zu ermöglichen. Diese und weitere Denkansätze zur Durchführbarkeit der Polymerisation von  $\epsilon$ -Caprolactam werden zukünftig in *Molecular-Modelling*-Studien von Elsässer<sup>1</sup> basierend auf den hier beschriebenen Erkenntnissen zur  $\beta$ -Lactam- und  $\epsilon$ -Caprolactam-Polymerisation untersucht.

---

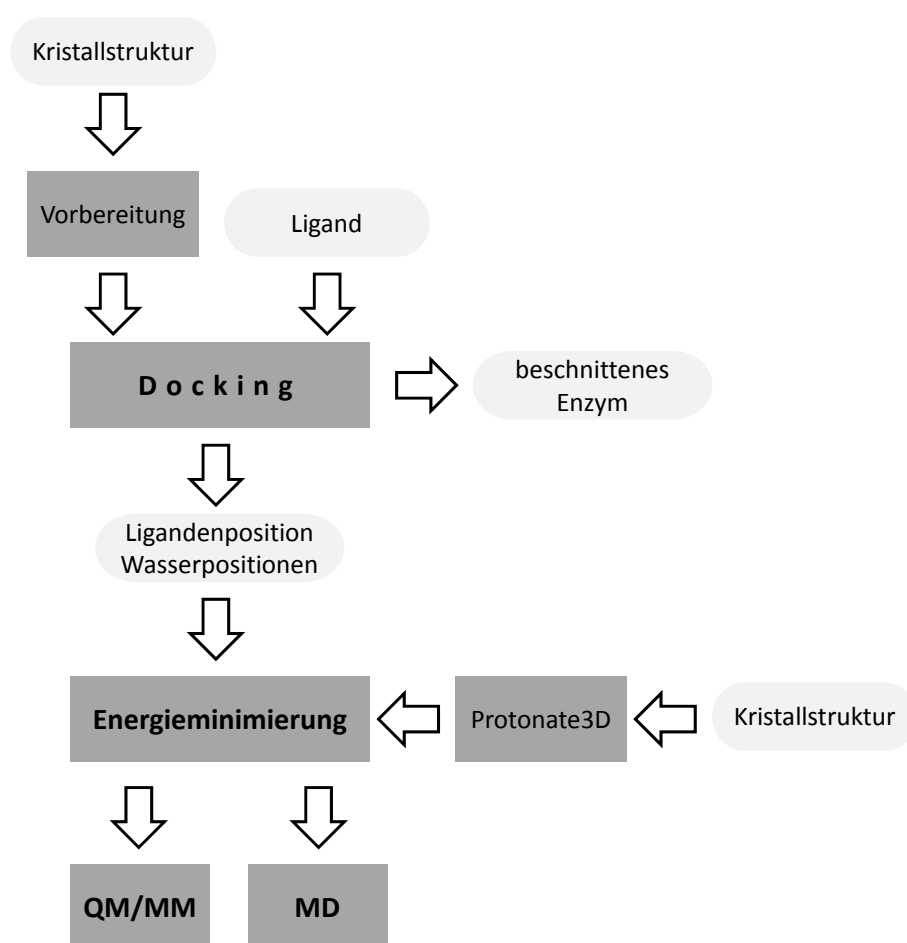
<sup>1</sup>Dr. Brigitta Elsässer, Universität Paderborn



## 5 Strukturen und Methoden

### 5.1 Workflow

Abbildung 5.1 zeigt den zur Modellierung lipasekatalysierter Reaktionen verwendeten Workflow.



**Abbildung 5.1:** Workflow für die Modellierung lipasekatalysierter Polymerisationen

### 5.2 Verwendete Strukturen

Alle Rechnungen basieren auf der Kristallstruktur von *Candia antarctica* Lipase B komplexiert mit einem kovalent gebundenen Phosphonat-Inhibitor (PDB ID: 1LBS),<sup>[46]</sup> die

aus der Brookhaven Protein Data Bank<sup>[107],[108]</sup> entnommen wurde. Zur Vorbereitung der Strukturen wurde das Programm MOE (Molecular Operating Environment)<sup>[109]</sup> eingesetzt. Bei Verwendung von kristallographischen Wassermolekülen wurden deren Positionen aus den Kristallstrukturen der nativen *Candida antarctica* Lipase B (PDB ID: 1TCA, 1TCB)<sup>[45]</sup> entnommen und auf 1LBS übertragen, gefolgt von einer Energieminimierung (Kraftfeld MMFF94x). Alle anderen Wassermoleküle, Liganden und nicht-proteinogene Reste wurden entfernt.

### 5.3 pK<sub>a</sub>-Berechnungen

pK<sub>a</sub>-Berechnungen der Liganden in der *active site* von *Candida antarctica* Lipase B wurden mithilfe des PROPKA Web Interface (Version 2.0)<sup>[101]</sup> durchgeführt. Da PROPKA einen pK<sub>a</sub>-Wert von 4,50 für alle Säuren in Wasser annimmt, wurden die Berechnungen ein zweites Mal unter Verwendung der experimentellen pK<sub>a</sub>-Werte, bzw. im Fall des  $\beta$ -Alanindimers des berechneten pK<sub>a</sub>-Werts in Wasser, wiederholt.

## 5.4 Docking-Studien mit QXP

### 5.4.1 Quick eXPlore

Die initiale Positionierung der Liganden in der Bindungstasche erfolgte mittels Quick eXPlore (QXP),<sup>[110]</sup> einem auf Monte-Carlo-Verfahren basierenden Dockingtool, das eine modifizierte Variante des Kraftfelds AMBER<sup>[92]</sup> verwendet. Ziel des Docking-Verfahrens ist es, die Konformation und Positionierung des Liganden im Enzym am globalen Minimum der Energiehyperfläche vorauszusagen. Als Modellsystem wurde ein die Bindungstasche umgebender Ausschnitt im Radius von 15 Å verwendet, wobei das Dockingvolumen (s.a. Abschnitt 5.4.2) manuell durch Colorierung sogenannter *guided atoms* zu definieren ist. Aus der Röntgenstruktur des Proteins sind nur die Positionen der Schweratome bekannt, die Absättigung durch Wasserstoffatome erfolgt in QXP automatisiert, wobei gleichzeitig auch die Protonierungszustände der Aminosäuren berechnet werden. Letz-

tere sollten, besonders in der *active site*, noch einmal visuell überprüft werden. Asp134 wird von QXP als protoniert angenommen, wie von Uppenberg *et al.*<sup>[45]</sup> vorausgesagt und auch in Arbeiten von García-Urdiales *et al.*<sup>[111]</sup> verwendet.

Im Gegensatz zu einer Energieminimierung, die als Ergebnis die Konformation am nächstliegenden lokalen Minimum der Energiehyperfläche liefert, können bei der Konformationsgenerierung mittels Monte-Carlo-Verfahren auch globale Minima erreicht werden, die von der Startkonformation ausgehend hinter einer Energiebarriere liegen. Die Generierung von Konformationen verläuft dabei nach einem Zufallsprinzip und im Gegensatz zu molekulardynamischen Verfahren nur abhängig von der letzten unmittelbar vorher auftretenden Konformation. Jede neu generierte Struktur wird nachfolgendend einer energetischen Bewertung unterzogen. Ist die Energie der neu erzeugten geringer als die der vorangegangenen Konformation, so wird die neue Konformation akzeptiert. Andernfalls erfolgt der Vergleich des Boltzmannfaktors der Energiedifferenz von alter und neuer Konformation ( $\exp\{\frac{-(E_{neu}-E_{alt})}{k_B \cdot T}\}$ ) mit einer Zufallszahl zwischen null und eins, wobei die energiereichere Konformation akzeptiert wird wenn die Zufallszahl kleiner als der Boltzmannfaktor ist. Ist diese Bedingung nicht erfüllt, so wird im nächsten Iterationsschritt die alte Konformation als Ausgangsstruktur verwendet. Dieses Prozedere ermöglicht die Generierung und Akzeptanz energetisch ungünstigerer Konformationen und damit das Überwinden von Energiemaxima auf dem Weg zum globalen Minimum. Jedoch sinkt die Wahrscheinlichkeit für energetisch ungünstige Konformationen mit steigender Energiedifferenz ( $E_{neu} - E_{alt}$ ) zwischen alter und neuer Konformation. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten handelt es sich bei den verwendeten Zufallszahlen um sogenannte *pseudo random numbers*, d.h. unter gleichen Ausgangsbedingungen werden auch die gleichen Zufallszahlen erzeugt, die allerdings die gleichen statistischen Eigenschaften wie echte Zufallszahlen haben.<sup>[112]</sup>

Ein Docking-Lauf mit QXP besteht aus drei aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten:

1. **sdock**

- initiale Platzierung des außerhalb der Tasche befindlichen Liganden

- keine Konformationssuche
- erster Treffer wird für *full Monte Carlo Search* eingesetzt

## 2. *full Monte Carlo Search* (mcdock)

- erster Dockinglauf mit uneingeschränkter Konformationssuche (360°-Drehbarkeit aller Ligandbindungen)
- Auswahl von 1-4 Strukturen für *local Monte Carlo Search* im *Rescoring*-Verfahren

## 3. *local Monte-Carlo-Search* (mcldock)

- zweiter Dockinglauf mit eingeschränkten Freiheitsgraden (20-30°-Drehbarkeit der Ligandbindungen)
- Auswahl der Zielstruktur(en) im *Rescoring*-Verfahren

### 5.4.2 Definition des Dockingvolumens

Die Definition des Dockingvolumens erfolgte über manuelle Colorierung sogenannter *guided atoms* und anschließende visuelle Kontrolle des Dockingvolumens. Als *guided atoms* wurden alle erwartungsgemäß an der Stabilisierung des Liganden beteiligten Heteroatome samt angebundener Protonen und die Seitenketten-C-Atome der Aminosäuren Ile189 und Ile285 verwendet. Eventuell vorhandene kristallografische Wassermoleküle sowie funktionelle Gruppen einer seringebundenen Acylkette wurden ebenfalls coloriert. Tabelle 5.1 zeigt eine Übersicht der Colorierung im nativen und acylierten Enzym. Je nach Colorierung können Atome das Dockingvolumen definieren (*pink*, *lightblue*), starr gehalten werden (*pink*), sich eingeschränkt (*purple*) oder uneingeschränkt (*lightblue*, *blue*) bewegen. Bei eingeschränkter Beweglichkeit ist eine Positionsänderung im Umkreis von 2 Å erlaubt, wobei derartige Bewegungen in die Verformungsenergie der Tasche eingehen und sich somit nachteilig auf die Gesamtenergie des System und die Platzierung der Struktur in der Trefferliste auswirken. Kristallographische Wassermoleküle wurden, sofern nicht

explizit benötigt, vor dem Docking entfernt, da die Sauerstoffatome des Wassers nur einer eingeschränkten Beweglichkeit (*purple*) unterliegen und folglich nicht beliebig ausweichen können um eine andere Position des Liganden zu ermöglichen und ihre Bewegung außerdem in die Verformungsenergie der Tasche eingeht. Beim Einsatz kristallographischer Wassermoleküle in Docking-Studien sollte deshalb geprüft werden inwiefern die Wassermoleküle die Positionierung des Liganden verändern.

**Tabelle 5.1:** Colorierung der *guided atoms* von CALB (PDB: 1LBS) in Docking-Studien mit Quick eXPlore. Die Definition der Tasche erfolgt nur über die entsprechend gekennzeichneten ("X") *guided atoms*.

Rest	Atom(Gruppe)	Farbe	Beweglichkeit	Definition der Tasche
Thr40	N(NH, <i>backbone</i> )	<i>purple</i>	eingeschränkt	
	H(NH, <i>backbone</i> )	<i>lightblue</i>	uneingeschränkt	X
	O(Hydroxygruppe)	<i>purple</i>	eingeschränkt	
	H(Hydroxygruppe)	<i>lightblue</i>	uneingeschränkt	X
Ser105	O(Hydroxygruppe)	<i>purple</i>	eingeschränkt	
	H(Hydroxygruppe)	<i>lightblue</i>	uneingeschränkt	X
Gln106	N(NH, <i>backbone</i> )	<i>purple</i>	eingeschränkt	
	H(NH, <i>backbone</i> )	<i>lightblue</i>	uneingeschränkt	X
His224	N(Imidazol)	<i>purple</i>	eingeschränkt	
His224 (prot.)	N(Imidazol)	<i>purple</i>	eingeschränkt	
	H(NH, protoniert)	<i>lightblue</i>	uneingeschränkt	X
Ile189	C(CH <sub>2</sub> , Seitenkette)	<i>pink</i>	keine	X
Ile285	C(CO, <i>backbone</i> )	<i>pink</i>	keine	X
eventuell vorhandene Reste:				
H <sub>2</sub> O	O	<i>purple</i>	eingeschränkt	
	H	<i>blue</i>	uneingeschränkt	
Acylkette	O(Carbonylgruppe)	<i>purple</i>	eingeschränkt	
	O(Ester)	<i>purple</i>	eingeschränkt	
	N(Aminogruppe)	<i>purple</i>	eingeschränkt	
	H(Aminogruppe)	<i>blue</i>	uneingeschränkt	
	N(Peptid)	<i>purple</i>	eingeschränkt	
	H(Peptid)	<i>blue</i>	uneingeschränkt	
	O(Säure)	<i>purple</i>	eingeschränkt	
	H(Säure)	<i>blue</i>	uneingeschränkt	

### 5.4.3 Rescoring der Dockingergebnisse

Das Rescoring der Docking-Ergebnisse erfolgte nach einer Kombination zweier verschiedener Verfahren:

- Punkte-Vergabe nach Alisaraie *et al.*<sup>[104]</sup>
- Hauptkomponentenanalyse (PCA, *principal component analysis*)<sup>[105]</sup>

Im Rescoring stehen 25 von QXP ausgegebene Strukturen, sortiert nach ihrer Gesamtbindungsenergie  $E_{ass}$ , zur Verfügung, jede von ihnen mit einem entsprechenden Datensatz der in Tabelle 5.2 gegebenen Energiewerte.

**Tabelle 5.2:** Energiewerte eines QXP-Docking-Laufes. Die Verwendung der Werte im Rescoring<sup>[113]</sup> ist entsprechend markiert (“X”).

Energie	Beschreibung	Rescoring
$E_{ass}$	Gesamtbindungsenergie	
$E_{lig}$	Ligandenenergie im Komplex abzüglich Ligandenenergie außerhalb der Bindungstasche im globalen Minimum	
$E_{she}$	Energie der Bindungstasche im Komplex abzüglich Energie der Bindungstasche nach lokaler Energieminimierung	
$E_{slb}$	Energie, die aus den bei Formierung neuer Bindungen im Komplex auftretenden Spannungen resultiert	
$E_{nbd}$	Gesamtenergie der nichtbindenden Wechselwirkungen im Komplex	X
$E_{vdw}$	van-der-Waals-Energie der Komplexbildung	X
$E_{est}$	elektrostatische Energie der Komplexbildung	X
$E_{cnt}$	abstandsabhängige Kontaktenergie summiert über alle Bindungstasche/Ligand-Atompaare	X
$E_{vw+}$	Summe aller van-der-Waals-Energien für Bindungstasche/Ligand-Atompaare mit positiven (abstoßenden) Energien	X
$N_{hph}$	Anzahl der hydrophoben Ligandatome, die in Kontakt zu hydrophoben Teilen der Bindungstasche stehen	X
$N_{hbd}$	Anzahl Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ligand und Bindungstasche	



Die Gesamtbindungsenergie des Enzym-Ligand-Komplexes ergibt sich aus der Summe der Ligandenenergie, Verformungsenergie und Energie der nichtbindenden Wechselwirkungen (s. Gl. 5.1 und 5.2).

$$E_{ass} = E_{lig} + E_{she} + E_{slb} + E_{nbd} \quad (5.1)$$

$$E_{nbd} = E_{vdw} + E_{est} + E_{cnt} \quad (5.2)$$

Im Scoring nach Punkte-Vergabe-Verfahren wird für jede der zu bewertenden Größen (s. Tab. 5.2) der beste Wert (Minimum bei Energien bzw. Maximum bei Kontakten) gesucht und daraufhin für alle Treffer mit einer Abweichung von  $\leq \pm 2$  ein Punkt vergeben. Insgesamt ergeben sich so zwischen null und sechs Punkte pro Trefferstruktur. Als Rescoring-Ergebnis nach dem Punkte-Vergabe-Verfahren ergibt sich die Struktur mit den meisten Punkten und, sofern mehrere Treffer dieses Kriterium erfüllen, der niedrigsten Gesamtbindungsenergie.<sup>[104]</sup> Im Rescoring mittels Hauptkomponentenanalyse wird das vorliegende sechsdimensionale Problem (sechs zu bewertende Größen pro Treffer) auf ein zweidimensionales Problem reduziert. Eine derartige Reduktion der Dimensionalität ist immer dann möglich, wenn zwischen den Ausgangsvariablen eine Korrelation besteht, die im vorliegenden Fall durch Abhängigkeit der Energiewerte voneinander gegeben ist. Diese Korrelation lässt sich mittels PCA eliminieren. Dabei ergibt sich pro Variable eine Hauptkomponente, die aus einer Linearkombination von Variablen besteht, und einer Raumachse entspricht. D. h. für ein System mit sechs Variablen ergibt sich ein sechsdimensionaler Raum. Die erste Hauptkomponente maximiert die Varianz, wodurch die größte Streuung des Datensatzes entlang der ersten Hauptkomponente (PCA1) auftritt. Nachfolgende Hauptkomponenten berücksichtigen nur noch die Varianz, die nicht bereits in die vorherigen einbezogen wurde. Um die Gesamtvarianz zu erhalten werden zwar genau so viele Hauptkomponenten wie Variablen benötigt, jedoch ist der Anteil der höheren Hauptkomponenten so gering, dass diese zu vernachlässigen sind.<sup>[112],[114]</sup> Im

vorliegenden Fall bedeutet dies, dass nur die erste (PCA1) und zweite Hauptkomponente (PCA2) berücksichtigt wurden. Die zweite Hauptkomponente PCA2 wurde in Abhängigkeit von der ersten Hauptkomponente PCA1 in einem Diagramm aufgetragen, wobei sich die Trefferstrukturen nach Hauptkomponentenanalyse im oberen linken Quadranten als die Strukturen mit kleinster PCA1 und größter PCA2 ergeben.<sup>[105]</sup> Wenn beide Rescoring-Methoden in einem *lmcs*-Dockinglauf auf die gleiche Struktur verwiesen, so wurde diese als Endergebnis des Dockings angesehen.

#### 5.4.4 Aufbereitung der Dockingstrukturen und Berechnung der Protonierungszustände

Da für die mit QXP durchgeführten Dockingstudien nur ein Ausschnitt um die Bindungstasche mit einem Radius von 15 Å verwendet wird, muss die Proteinstruktur für nachfolgende Rechnungen wieder komplettiert werden. Dazu erfolgte zunächst die Berechnung der Protonierungszustände der eingangs verwendeten Kristallstruktur nach Entfernung des Liganden mithilfe der *Protonate3D*-Routine des Programms MOE, wobei die energetisch optimale Protonierung der Aminosäuren resultieren sollte. Hier ist jedoch zu beachten, dass die Option *flip*, die eine Drehung von Aminosäureseitenketten erlaubt, deaktiviert wird. Andernfalls kommt es zu einer Drehung der Gln157-Seitenkette, Protonierung von Asp134 und Zerstörung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes dieser beiden Aminosäuren mit der Thr40-Hydroxygruppe des *oxyanion holes*. Die berechneten Protonierungszustände sind visuell zu kontrollieren und die Reste der katalytischen Triade müssen sich in einem katalytisch aktiven Protonierungszustand befinden (Asp187 deprotoniert, His224 unprotoniert). In diese vorbereitete Enzymstruktur wurde die inkomplette Dockingstruktur geladen, woraufhin man die Ligandenposition und - falls vorhanden - die im Docking verwendeten Wassermoleküle in die Originalstruktur überführte und das beschchnittene Protein verwarf. Im Docking aufgetretene strukturelle Änderungen gehen auf diese Weise zwar verloren, sind aber im Allgemeinen so gering, dass sie zu vernachlässigen sind, sofern die Struktur nachfolgend durch Energieminimierungen verfeinert wird.

## 5.5 Energieminimierungen

### 5.5.1 Grundlagen

In kraftfeldbasierten Berechnungen, wie Energieminimierungen, erfolgt die Behandlung eines Moleküles nach einem rein mechanischen Modell als Ansammlung einzelner Massenpunkte definierter Ausdehnung, die durch harmonische Kräfte miteinander wechselwirken, wobei die Gesamtenergie des Systems nur von den Positionen der Atome, die es beinhaltet, abhängt.<sup>[115]</sup> Ziel ist es das nächstgelegene lokale oder globale Minimum der Energiehyperfläche zu erreichen. Ausgehend von der Schrödinger-Gleichung, die keine exakte Lösung für Moleküle besitzt, müssen zur Aufstellung einfacherer Modelle verschiedene Näherungen gelten, als wichtigste von ihnen die Born-Oppenheimer-Näherung. Nach der Born-Oppenheimer-Näherung kann die Wellenfunktion des Gesamtsystems in einen Elektronen- und einen Atomkernanteil aufgespalten werden (s. Gl. 5.3).

$$\psi_{ges}(Kerne, Elektronen) = \psi(Elektronen)\psi(Kerne) \quad (5.3)$$

Die Atomkerne verhalten sich nach dieser Näherung adiabatisch und so können die Elektronen sich dank ihrer wesentlich kleineren Masse und Trägheit jeglicher Positionsänderung der Kerne sofort angleichen. Somit hängt die Wellenfunktion der Elektronen nur von der Position der Kerne ab und nicht von ihrem Impuls. Unter Anwendung der Born-Oppenheimer-Näherung ist die Schrödinger-Gleichung auch für Moleküle lösbar. Die Gesamtenergie  $E_{ges}$  des Systems ergibt sich als Summe der durch elektrostatische Abstoßung der Kerne bedingten Kernenergie  $E_{Kerne}$  und der Energie der Elektronen  $E_{Elektronen}$ , die sich aus ihrer kinetischen und der potentiellen Energie im elektrostatischen Feld der Kerne zusammensetzt (s. Gl. 5.4).<sup>[112]</sup>

$$E_{ges} = E_{Kerne} + E_{Elektronen} \quad (5.4)$$

Unter der Annahme, dass die Atomkerne fixiert sind, ergibt sich die Gesamtenergie des Systems nach Gleichung 5.5.

$$E_{ges} = E_{str} + E_{bend} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{elec} \quad (5.5)$$

Die Gesamtenergie setzt sich demnach aus den kovalenten Energietermen für Bindungsstreckung ( $E_{str}$ ), Winkelkrümmung ( $E_{bend}$ ) und Torsionsenergie ( $E_{tors}$ ), sowie den nicht-kovalenten Energietermen für van-der-Waals- ( $E_{vdw}$ ) und elektrostatische Wechselwirkungen ( $E_{elec}$ ) zusammen.<sup>[115]</sup> Nach Einsetzen dieser Terme in Gleichung 5.5 erhält man Gleichung 5.6, die die potentielle Energie des Gesamtsystems in biomolekularen Kraftfeldern beschreibt.<sup>[116]</sup>

$$\begin{aligned} E_{ges} = & \sum_{\text{Bindungen}} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\text{Winkel}} \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{Torsion}} \frac{1}{2} k_\varphi (1 + \cos(m\varphi - \varphi_0)) \\ & + \sum_{vdW} \epsilon_{ik} \left[ \left( \frac{R_{min,ik}}{r_{ik}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{min,ik}}{r_{ik}} \right)^6 \right] + \sum_{\text{Coulomb}} \frac{q_i q_k}{\epsilon_D r_{ik}} \end{aligned} \quad (5.6)$$

Die Energieterme für bindende Wechselwirkungen werden, mit Ausnahme der Torsionsenergie, durch harmonische Potentiale beschrieben, wobei man die Abweichung der Bindungslängen  $r$  und Bindungswinkel  $\theta$  von den entsprechenden Werten im Gleichgewicht ( $r_0$ ,  $\theta_0$ ) betrachtet. Die Torsionsenergie ergibt sich aus einer Cosinusfunktion mit Torsionswinkel  $\varphi$ , Nullphasenwinkel  $\varphi_0$  und Periodizität  $m$ . Die jeweiligen Kraftkonstanten werden mit  $k_r$ ,  $k_\theta$  und  $k_\varphi$  bezeichnet. Elektrostatische Wechselwirkungen werden durch das Coulomb-Potential und van-der-Waals-Wechselwirkungen durch das Lennard-Jones-Potential ausgedrückt. Das Coulomb-Potential beschreibt die Wechselwirkung zweier am Kern befindlicher Punktladungen ( $q_i$  und  $q_k$ ), die im Abstand  $r_{ik}$  zueinander liegen, wobei  $\epsilon_D$  die Dielektrizitätskonstante ist. Das Lennard-Jones-Potential setzt sich aus

dem Potentialminimum  $\varepsilon_{ik}$ , dem Kollisionsradius  $R_{min,ik}$  und dem Atomabstand  $r_{ik}$  zusammen.<sup>[116]</sup>

Die Kraftfeldparameter (Kraftkonstanten und Gleichgewichtswerte) unterscheiden sich von Kraftfeld zu Kraftfeld. Die Ermittlung dieser Werte kann beispielsweise auf empirischem Wege erfolgen, wobei die im Kraftfeld auftretenden Torsionsprofile iterativ so lange mit den aus quantenmechanischen Rechnungen resultierenden Profilen verglichen werden bis eine gute Übereinstimmung erreicht ist.<sup>[116]</sup> Da nicht für alle Klassen von Molekülen die gleichen Energiefunktionen und Parameter angewendet werden können, gibt es verschiedene Kraftfelder.

In der vorliegenden Arbeit werden die Kraftfelder MMFF94x, ein für alle Atomsorten parametrisiertes Kraftfeld, das vor allem für kleine organische Moleküle geeignet ist, und AMBER99,<sup>[92]</sup> das ebenfalls für alle Atomsorten parametrisiert ist, aber für Proteine und Nucleinsäuren erstellt wurde und nur bedingt auf Liganden anwendbar ist, verwendet.<sup>[117]</sup>

### 5.5.2 Durchführung

Die aufbereiteten Dockingstrukturen wurden in einer Kaskade von Energieminimierungen schrittweise verfeinert. Ein erster Minimierungslauf beinhaltet dabei verschiedene Randbedingungen (*constraints*), die bewirken, dass der Ligand auf seiner Position verbleibt und das Enzym sich in einer Art *induced fit* anpasst. So wurden im Fall des acylierten Enzyms drei *constraints* (Länge 2,6-3,2 Å) vom Substratsauerstoff zu den an der Bildung des *oxyanion holes* beteiligten Schweratomen gesetzt, während bei einem ungebundenen Ligand der im Docking resultierende Abstand zum Serinsauerstoff (oder Carbonylkohlenstoff des Acyl-Enzym-Komplexes) als maximal erlaubter Abstand eingesetzt wurde. In einem zweiten Minimierungslauf wurden alle *constraints* entfernt. Jeder Lauf besteht aus einer Abfolge von vier Energieminimierungen, die im Programm MOE durchgeführt werden:

#### 1. Minimierung der Wasserstoffatome des Proteins

- Kraftfeld: Amber99

- Ligand und kristallografische Wassermoleküle fixiert

## 2. Minimierung der Proteinseitenketten

- Kraftfeld: Amber99
- Ligand und kristallografische Wassermoleküle fixiert

## 3. Minimierung des Proteins

- Kraftfeld: Amber99
- Ligand und kristallografische Wassermoleküle fixiert

## 4. Minimierung des Liganden und seiner Umgebung

- Kraftfeld: MMFF94x
- Ligand und kristallografische Wassermoleküle beweglich
- Protein im Umkreis von 7 Å um den Liganden beweglich
- restliches Protein fixiert

Die energieminierten Dockingstrukturen wurden nachfolgend in molekulardynamischen und quantenmechanischen Untersuchungen eingesetzt.

## 5.6 Molekulardynamische Untersuchungen

### 5.6.1 Grundlagen

In molekulardynamischen Untersuchungen erfolgt die Berechnung der zeitabhängigen Dynamik eines Systems durch numerisches Lösen der Newtonschen Bewegungsgleichungen für die Atomkoordinaten. Die Wechselwirkungsenergien der Partikel untereinander werden dabei weiterhin durch Kraftfelder beschrieben. Der Zustand des Systems an jedem beliebigen Zeitpunkt in der Zukunft kann aus dem gegenwärtigen Zustand vorhergesagt werden, wobei jedoch die berechenbare Zeitspanne durch die heutige Rechnerleistung sehr begrenzt ist (je nach Systemgröße im Bereich von Nanosekunden).<sup>[115],[117]</sup>

Molekulardynamische Simulationen ermöglichen die Überwindung von Energiebarrieren, da dabei auch die thermische Bewegung berücksichtigt wird, wodurch die Moleküle genügend Energie besitzen um auch Energiebarrieren zu überwinden und andere lokale Minima bzw. das globale Minimum zu erreichen. Dadurch sind molekulardynamische Methoden besonders zur Konformationssuche großer Moleküle (wie Proteine) geeignet. Bei kleinen Molekülen können zum Beispiel Monte-Carlo-basierte Verfahren sinnvoller sein.<sup>[115],[117]</sup>

### 5.6.2 Durchführung

Molekulardynamische Untersuchungen wurden mit MOE unter Verwendung der Nosé-Poincaré-Anderson (NPA) Gleichungen und eines NPT-Ensembles durchgeführt. Die Simulation erfolgte bei einer Temperatur von 300 K und einem Druck von 101 kPa für eine Zeitspanne von 1 ns.

## 5.7 QM/MM-Geometrieoptimierungen

### 5.7.1 Grundlagen

Kombinierte quantenmechanische und molekularmechanische Methoden (QM/MM-Methoden) verbinden den Vorteil der großen Systemgrößen in molekularmechanischen Berechnungen mit der Genauigkeit bei quantenmechanischer Beschreibung kleiner Systeme.<sup>[118]</sup> Bei diesen kombinierten Verfahren wird das Gesamtsystem in eine innere Region (z.B. die *active site* eines Enzyms), die quantenmechanisch behandelt wird, und eine äußere Region, die mittels kraftfeldbasierter Methoden beschrieben wird, geteilt. Aufgrund der Wechselwirkung von QM- und MM-Region ergibt sich die Gesamtenergie des Systems nicht als Summe der Energien dieser Subsysteme, sondern es müssen weitere Kopplungsterme berücksichtigt werden. Die Grenze zwischen QM- und MM-Region durchtrennt zahlreiche kovalente Bindungen, deren Atome (sogenannte Grenzatom) mit Linkatomen abgesättigt werden um eine vollständige QM-Region zu erhalten. Bei diesen nicht im real

vorliegenden System vorhandenen Linkatomen handelt es sich meist um Wasserstoffatome. Die Grenze sollte so gewählt werden, dass die zu durchtrennende Bindung möglichst unpolar ist, so eignen sich besonders aliphatische C-C-Bindungen.<sup>[118]</sup>

Die Beschreibung der QM-Region kann anhand verschiedenster Methoden erfolgen, die in diesem Zusammenhang meistverwendete ist die Dichtefunktionaltheorie (DFT). Die Dichtefunktionaltheorie beschreibt die Energie des Grundzustand nach dem Hohenberg-Kohn-Theorem als alleinig abhängig von der Elektronendichte des Grundzustands.<sup>[119],[120]</sup> Somit muss keine Lösung der Schrödingergleichung für ein Vielelektronensystem gefunden werden, sondern alle Eigenschaften stehen nur in Abhängigkeit von der Elektronendichte des Grundzustands. Die Schrödingergleichung ergibt für ein N-Elektronensystem  $3N$  Koordinaten, je drei pro Elektron. Da die Elektronendichte durch das Quadrat der Wellenfunktion integriert über alle Elektronenkoordinaten beschrieben wird, ist diese von der Anzahl der Elektronen unabhängig und hängt nur von drei Koordinaten ab. Mittels DFT sind so auch komplexe Vielelektronensysteme wie Moleküle zu berechnen.<sup>[119],[120]</sup> Die Energie des Systems ergibt sich aus drei verschiedenen Energietermen: der kinetischen Energie, der Anziehungsenergie zwischen Kernen und Elektronen und der Abstoßungsenergie zwischen den Elektronen, wobei sich die Energie der Elektronenabstoßung aus dem Anteil der Coulomb-Wechselwirkung und einem Austauschkorrelationsterm zusammensetzt. Es existieren verschiedene Methoden für die Berechnung des Austauschkorrelationsterms, zum einen die lokale Dichtenäherung (LDA), bei der ein uniformes Elektronengas mit räumlich konstanter Dichte als Modell verwendet wird, und zum anderen die generalisierte Gradientennäherung (GGA), die eine ortsabhängige Betrachtung erlaubt. Daneben stehen diverse Hybridmethoden, die sich aus Linearkombinationen der LDA und GAA zusammensetzen, zur Verfügung. Die in der Computerchemie gebräuchlichste Hybridmethode ist B3LYP.<sup>[112],[120]</sup>



### 5.7.2 Durchführung

Alle QM/MM-Geometrieoptimierungen wurden unter Anwendung des Programms NWChem (Version 6.0, Pacific Northwest National Laboratory, USA)<sup>[102],[103]</sup> durchgeführt. Die in direkte Wechselwirkung zum Liganden tretenden Aminosäuren der *active site* (Thr40, Ser105, Gln106, His224) und die an der Stabilisierung des *oxyanion holes* beteiligten Reste (Asp134, Gln157) waren Teil der QM-Region, während das restliche Protein und Wasser molekularmechanisch beschrieben wurde. Der Ligand, eine eventuell gebundene Acylkette und die kristallographischen Wassermoleküle befinden sich, sofern vorhanden, ebenfalls in der QM-Region. Der Übergang zwischen QM- und MM-Region sollte stets zwischen zwei Kohlenstoffatomen erfolgen, diese Grenzatom wurden mit Wasserstoffatomen abgesättigt und nach dem Pseudobindungsansatz<sup>[121],[122]</sup> behandelt. Der QM-Bereich wurde mittels DFT unter Verwendung des B3LYP-Hybridfunktionals mit dem Basissatz Ahlrichs-pVDZ berechnet, während für die Beschreibung der MM-Region das Kraftfeld Amber99 verwendet wurde. Die Simulation von Reaktionen innerhalb der QM-Region erfolgte in NWChem mittels der sogenannten *spring method*, bei der eine harmonische Feder zwischen zwei Atomen deren Bindungsabstand im Produkt definiert. Eine *spring* zwischen den Atomen  $i$  und  $j$  mit einer Federkonstante  $k$  und einem Gleichgewichtsabstand  $r_0$  bewirkt ein Ansteigen der Energie des Systems durch Beitrag eines neuen Energieterms zur Gesamtenergie  $E_{ges}$  (s. Gl. 5.7).<sup>[123]</sup>

$$E_{ges+spring} = E_{ges} + \frac{1}{2}k(r_{ij} - r_0)^2 \quad (5.7)$$

Dieser zusätzliche Energieterm erzwingt einen Abstand von ungefähr  $r_0$  zwischen den beiden Atomen, wobei nie der exakte Wert erreicht wird.<sup>[123]</sup> Die Kraftkonstante  $k$  betrug im Falle eines Protonenübertrags 0,5 au bei einem Abstand von  $r_0 = 1,8 \text{ au}$ , wohingegen für eine Schweratombindung im Allgemeinen eine Kraftkonstante von 1,0 bis maximal 2,0 au und ein Bindungsabstand von 2,5 bis 3,0 au gewählt wurde. Die Startkonfiguration wird mittels der *spring method* möglichst nahe an den Produktzustand angenähert,

während die MM-Region sich den geometrischen Veränderungen anpasst. In einer nachfolgenden Optimierung, für die die *spring* entfernt wurde, relaxiert das System und man erhält die Struktur im nächstgelegenen Energieminimum.

## Literaturverzeichnis

- [1] Staudinger H., Über Polymerisation, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1920**, 53:1073–1085.
- [2] Nobelprize.org, Hermann Staudinger - Biography, [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1953/staudinger-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1953/staudinger-bio.html), zuletzt besucht: 18.08.11.
- [3] Carothers W.H., Linear polyamides and their production, Patent 2130523, *United States Patent Office* **1938**.
- [4] Carothers W.H., Diamine-dicarboxylic acid salts and process of preparing same, Patent 2130947, *United States Patent Office* **1938**.
- [5] Elias H.G., *Makromoleküle Band 3, Industrielle Polymere und Synthesen*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 6. Auflage, **2001**.
- [6] Elias H.G., *An Introduction to Plastics*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 1. Auflage, **1993**.
- [7] PlasticsEurope Association of Plastics Manufactures, Plastics – the Facts 2010, <http://www.plasticseurope.org> **2010**.
- [8] Varma I., Albertsson A.C., Rajkhowa R., Srivastava R., Enzyme catalyzed synthesis of polyesters, *Progress in Polymer Science* **2005**, 30(10):949–981.
- [9] Breuer M., Stürmer R., Chemie und Biologie Hand in Hand. Enzyme als Katalysatoren, *Chemie in unserer Zeit* **2006**, 40(2):104–111.
- [10] Ulber R., Soye K., 5000 Jahre Biotechnologie: Vom Wein zum Penicillin, *Chemie in unserer Zeit* **2004**, 38(3):172–180.

- 
- [11] Bommarius A.S., Riebel B., *Biocatalysis, Fundamentals and Applications*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 1. Auflage, **2004**.
- [12] Miletić N., *Improved Biocatalysts based on Candida antarctica lipase B immobilization*, Dissertation, University of Groningen, **2009**.
- [13] Silman I.H., Katchalski E., Water-insoluble derivatives of enzymes, antigens, and antibodies., *Annual review of biochemistry* **1966**, 35:873–908.
- [14] Baumann M., *Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen für den industriellen Einsatz*, Dissertation, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, **2002**.
- [15] Bhosale S.H., Rao M.B., Deshpande V.V., Molecular and industrial aspects of glucose isomerase., *Microbiological reviews* **1996**, 60(2):280–300.
- [16] Mateo C., Monti R., Pessela B.C.C., Fuentes M., Torres R., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R., Immobilization of lactase from Kluyveromyces lactis greatly reduces the inhibition promoted by glucose. Full hydrolysis of lactose in milk., *Biotechnology progress* **2004**, 20(4):1259–62.
- [17] Baldwin A.R. (Herausgeber), *Proceedings of the World Conference on Emerging Technologies in the Fats and Oils Industry*, American Oil Chemists' Society, **1986**.
- [18] Breuer M., Ditrich K., Habicher T., Hauer B., Kessler M., Stürmer R., Zelinski T., Industrial methods for the production of optically active intermediates., *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2004**, 43(7):788–824.
- [19] Buthe A., *Charakterisierung und rationale Immobilisierung von Lipasen in biphasischen Reaktionssystemen*, Dissertation, Rheinisch-Westfälisch Technische Hochschule Aachen, **2006**.
- [20] Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 5. Auflage, **2003**.

- 
- [21] Saha B.C., Demirjian D.C., Advances in Enzyme Development and Applied Industrial Biocatalysis, in *Applied Biocatalysis in Specialty Chemicals and Pharmaceuticals*, Band 6, ACS Symposium Series, American Chemical Society, 669–670.
- [22] Schoemaker H.E., Mink D., Wubbolts M.G., Dispelling the myths–biocatalysis in industrial synthesis., *Science (New York, N.Y.)* **2003**, 299(5613):1694–1697.
- [23] Otten L.G., Quax W.J., Directed evolution: selecting today’s biocatalysts., *Biomolecular engineering* **2005**, 22(1-3):1–9.
- [24] Stahmann K.P., Revuelta J.L., Seulberger H., Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2000**, 53(5):509–516.
- [25] Karlson P., Doenecke D., Koolmann J., *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 14. Auflage, **1994**.
- [26] Stryer L., *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 4. Auflage, **1996**.
- [27] Koshland D.E., Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1958**, 44:98–104.
- [28] Christen P., Jaussi R., *Biochemie*, Springer-Lehrbuch, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1. Auflage, **2005**.
- [29] Straathof A.J.J., Panke S., Schmid A., The production of fine chemicals by biotransformations., *Current opinion in biotechnology* **2002**, 13(6):548–56.
- [30] Haeffner F., Norin T., Molecular Modelling of Lipase Catalysed Reactions. Prediction of Enantioselectivities, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1999**, 47(5):591–600.
- [31] Baum I., Lipasekatalysierte Polymerisation von Lactamen, Masterarbeit, Universität Paderborn, **2008**.

- [32] Rusnak M., *Untersuchungen zur enzymatischen Enantiomerentrennung von Glykolethern und Etablierung neuer Methoden des synthetischen Shufflings*, Dissertation, Universität Stuttgart, **2004**.
- [33] Riddihough G., Picture an enzyme at work, *Nature* **1993**, 362:793.
- [34] Trodler P., *Untersuchung von Lipasen - Elektrostatik, Selektivität und Einfluss von Lösungsmitteln auf Struktur und Dynamik*, Dissertation, Universität Stuttgart, **2008**.
- [35] Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S.M., Harel M., Remington S.J., Silman I., Schrag J., Sussman J.L., Verschueren K.H., Goldman A., The  $\alpha / \beta$  hydrolase fold, *Protein Engineering* **1992**, 5(3):197–211.
- [36] Dodson G., Wlodawer a., Catalytic triads and their relatives., *Trends in biochemical sciences* **1998**, 23(9):347–52.
- [37] Carter P., Wells J.A., Dissecting the catalytic triad of a serine protease, *Nature* **1988**, 332:564–568.
- [38] Laurie A.T.R., Jackson R.M., Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites., *Bioinformatics* **2005**, 21(9):1908–1916.
- [39] Sivalingam G., Madras G., Modeling of lipase catalyzed ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone., *Biomacromolecules* **2004**, 5(2):603–609.
- [40] Kobayashi S., Recent Developments in Lipase-Catalyzed Synthesis of Polyesters, *Macromolecular Rapid Communications* **2009**, 30(4-5):237–266.
- [41] Matsumura S., Ebata H., Toshima K., A new strategy for sustainable polymer recycling using an enzyme: poly( $\epsilon$ -caprolactone), *Macromolecular rapid communications* **2000**, 21:860–863.

- [42] Anderson E.M., Larsson K.M., Kirk O., One Biocatalyst–Many Applications: The Use of *Candida Antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis, *Biocatalysis and Biotransformation* **1998**, 16(3):181–204.
- [43] Ericsson D.J., Kasrayan A., Johansson P., Bergfors T., Sandström A.G., Bäckvall J.E., Mowbray S.L., X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation., *Journal of molecular biology* **2008**, 376(1):109–119.
- [44] Mei Y., Miller L., Gao W., Gross R.A., Imaging the distribution and secondary structure of immobilized enzymes using infrared microspectroscopy., *Biomacromolecules* **2003**, 4(1):70–74.
- [45] Uppenberg J., Hansen M.T., Patkar S., Jones T.A., The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*., *Structure* **1994**, 2(4):293–308.
- [46] Uppenberg J., Ohrner N., Norin M., Hult K., Kleywegt G.J., Patkar S., Waagen V., Anthonsen T., Jones T.a., Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols., *Biochemistry* **1995**, 34(51):16838–51.
- [47] Skjø t M., De Maria L., Chatterjee R., Svendsen A., Patkar S., Ostergaard P.R., Brask J., Understanding the plasticity of the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold: lid swapping on the *Candida antarctica* lipase B results in chimeras with interesting biocatalytic properties., *Chembiochem* **2009**, 10(3):520–527.
- [48] Park S., Forró E., Grewal H., Fülöp F., Kazlauskas R.J., Molecular Basis for the Enantioselective Ring Opening of  $\beta$ -Lactams Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2003**, 345(8):986–995.
- [49] Lavandera I., Fernández S., Magdalena J., Ferrero M., Kazlauskas R.J., Gotor V., An inverse substrate orientation for the regioselective acylation of 3',5'-

- diaminonucleosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B?, *Chembiochem* **2005**, 6(8):1381–90.
- [50] González-Sabín J., Lavandera I., Rebolledo F., Gotor V., Redesigning the mechanism of the lipase-catalysed aminolysis of esters, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17(8):1264–1274.
- [51] Prelog V., Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections, *Pure Appl. Chem.* **1964**, 9:119 –130.
- [52] Kazlauskas R.J., Weissfloch A.N.E., Rappaport A.T., Cuccia L.a., A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*, *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56(8):2656–2665.
- [53] Fels G., Baum I., Molecular Modeling Approach to Enzymatic Polymerization, in K. Loos (Herausgeber), *Biocatalysis in Polymer Chemistry*, Kapitel 14, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2010**, 349–368.
- [54] Park J.H., Ha H.J., Lee W.K., Génereux-Vincent T., Kazlauskas R.J., Molecular basis for the stereoselective ammoniolysis of N-alkyl aziridine-2-carboxylates catalyzed by *Candida antarctica* lipase B., *Chembiochem* **2009**, 10(13):2213–2222.
- [55] Léonard V., Fransson L., Lamare S., Hult K., Graber M., A water molecule in the stereospecificity pocket of *Candida antarctica* lipase B enhances enantioselectivity towards pentan-2-ol., *Chembiochem* **2007**, 8(6):662–7.
- [56] Marton Z., Léonard-Nevers V., Syrén P.O., Bauer C., Lamare S., Hult K., Tranc V., Graber M., Mutations in the stereospecificity pocket and at the entrance of the active site of *Candida antarctica* lipase B enhancing enzyme enantioselectivity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, 65:11–17.



- [57] Magnusson A.O., Rotticci-Mulder J.C., Santagostino A., Hult K., Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida antarctica* lipase B., *Chembiochem* **2005**, 6(6):1051–1056.
- [58] Rotticci D., *Understanding and Engineering the Enantioselectivity of Candida antarctica Lipase B toward sec-Alcohols*, Dissertation, University of Stockholm, **2000**.
- [59] Schwab L.W., Baum I., Fels G., Loos K., Mechanistic Insight in the Enzymatic Ring-Opening Polymerization of  $\beta$ -Propiolactam, in H.N. Cheng, R.A. Gross (Herausgeber), *Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials*, ACS Symposium Series, Kapitel 19, American Chemical Society, **2010**, 265–278.
- [60] Larsen M.W., Zielinska D.F., Martinelle M., Hidalgo A., Jensen L.J., Bornscheuer U.T., Hult K., Suppression of water as a nucleophile in *Candida antarctica* lipase B catalysis., *Chembiochem* **2010**, 11(6):796–801.
- [61] Gorke J.T., Sreenc F., Kazlauskas R., Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2010**, 15(1):40–53.
- [62] Uyama H., Takamoto T., Kobayashi S., Enzymatic Synthesis of Polyesters in Ionic Liquids., *Polymer Journal* **2002**, 34(2):94–96.
- [63] Gorke J.T., Okrasa K., Louwagie A., Kazlauskas R.J., Sreenc F., Enzymatic synthesis of poly(hydroxyalkanoates) in ionic liquids., *Journal of biotechnology* **2007**, 132(3):306–13.
- [64] Wu X.M., Xin J.Y., Sun W., Xia C.G., Environmentally friendly, efficient resolution of racemic secondary alcohols by lipase-catalyzed enantioselective transesterification in ionic liquids in the presence of organic bases., *Chemistry & biodiversity* **2007**, 4(2):183–188.

- [65] Ou G., Yang J., He B., Yuan Y., Buffer-mediated activation of *Candida antarctica* lipase B dissolved in hydroxyl-functionalized ionic liquids, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, 68(1):66–70.
- [66] Habulin M., Knez v., Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, 58(1-4):24–28.
- [67] Hollmann F., Grzebyk P., Heinrichs V., Doderer K., Thum O., On the inactivity of *Candida antartica* lipase B towards strong acids, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, 57(1-4):257–261.
- [68] Wu X.M., Sun W., Xin J.Y., Xia C.G., Lipase-catalysed kinetic resolution of secondary alcohols with improved enantioselectivity in propylene carbonate, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2008**, 24(11):2421–2424.
- [69] Husson E., Humeau C., Paris C., Vanderesse R., Framboisier X., Marc I., Chevalot I., Enzymatic acylation of polar dipeptides: Influence of reaction media and molecular environment of functional groups, *Process Biochemistry* **2009**, 44(4):428–434.
- [70] Gross R.A., Kumar A., Kalra B., Polymer synthesis by in vitro enzyme catalysis., *Chemical reviews* **2001**, 101(7):2097–124.
- [71] Gotor-Fernández V., Busto E., Gotor V., *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2006**, 348(7-8):797–812.
- [72] Gross R., Kalra B., Kumar A., Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, 55(6):655–660.
- [73] Kobayashi S., Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Lactones by Lipase Catalyst: Mechanistic Aspects, *Macromolecular Symposia* **2006**, 240(1):178–185.

- [74] Kobayashi S., Ritter H., Kaplan D. (Herausgeber), *Enzyme Catalyzed Synthesis of Polymers (Advances in Polymer Science)*, Springer-Verlag, Berlin, **2006**.
- [75] Matsumura S., Enzymatic Synthesis of Polyesters via Ring-Opening Polymerization, *Advanced Polymer Science* **2006**, 194:95–132.
- [76] Loos K. (Herausgeber), *Biocatalysis in Polymer Chemistry*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2010**.
- [77] Uyama H., Kobayashi S., Enzymatic Synthesis of Polyesters via Polycondensation, *Advanced Polymer Science* **2006**, 194:133–158.
- [78] Binns F., Harffey P., Roberts S.M., Taylor A., Studies of lipase-catalyzed polyesterification of an unactivated diacid/diol system, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1998**, 36(12):2069–2080.
- [79] Dong H., Cao S.G., Li Z.Q., Han S.P., You D.L., Shen J.C., Study on the enzymatic polymerization mechanism of lactone and the strategy for improving the degree of polymerization, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1999**, 37(9):1265–1275.
- [80] Kumar A., Gross R.A., Candida antarctica Lipase B Catalyzed Polycaprolactone Synthesis: Effects of Organic Media and Temperature, *Biomacromolecules* **2000**, 1(1):133–138.
- [81] Thurecht K.J., Heise A., DeGeus M., Villarroja S., Zhou J., Wyatt M.F., Howdle S.M., Kinetics of Enzymatic Ring-Opening Polymerization of  $\epsilon$ -Caprolactone in Supercritical Carbon Dioxide, *Macromolecules* **2006**, 39(23):7967–7972.
- [82] Uyama H., Kobayashi S., Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Lactones Catalyzed by Lipase, *Chemistry Letters* **1993**, 22(7):1149–1150.
- [83] Henderson L.A., Svirkin Y.Y., Gross R.A., Kaplan D.L., Swift G., Enzyme-Catalyzed Polymerizations of  $\epsilon$ -Caprolactone: Effects of Initiator on Product Struc-

- ture, Propagation Kinetics, and Mechanism, *Macromolecules* **1996**, 29(24):7759–7766.
- [84] Uyama H., Takeya K., Kobayashi S., Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Lactones to Polyesters by Lipase Catalyst: Unusually High Reactivity of Macroli-  
des., *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1995**, 68:56–61.
- [85] Veld M.A.J., Fransson L., Palmans A.R.A., Meijer E.W., Hult K., Lactone size  
dependent reactivity in *Candida antarctica* lipase B: a molecular dynamics and  
docking study., *Chembiochem* **2009**, 10(8):1330–1334.
- [86] Al-Azemi T.F., Kondaveti L., Bisht K.S., Solventless Enantioselective Ring-  
Opening Polymerization of Substituted  $\epsilon$ -Caprolactones by Enzymatic Catalysis,  
*Macromolecules* **2002**, 35:3380–3386.
- [87] Gu Q.M., Maslanka W., Cheng H., Enzyme-Catalyzed Polyamides and Their Deri-  
vatives, in *Polymer Biocatalysis and Biomaterials II, ACS Symposium Series*, Ka-  
pitel 21, American Chemical Society, **2008**, 309 –319.
- [88] Schwab L.W., Kroon R., Schouten A.J., Loos K., Enzyme-Catalyzed Ring-Opening  
Polymerization of Unsubstituted  $\beta$ -Lactam, *Macromolecular Rapid Communicati-  
ons* **2008**, 29(10):794–797.
- [89] Forró E., Fülöp F., Lipase-catalyzed enantioselective ring opening of unactivated  
alicyclic-fused  $\beta$ -lactams in an organic solvent., *Organic letters* **2003**, 5(8):1209–  
1212.
- [90] Li X.G., Lähitie M., Kanerva L.T., Burkholderia cepacia lipase and activated  $\beta$ -  
lactams in  $\beta$ -dipeptide and  $\beta$ -amino amide synthesis, *Tetrahedron: Asymmetry*  
**2008**, 19(15):1857–1861.

- [91] Tasnádi G., Forró E., Fülöp F., Candida antarctica lipase B-catalyzed ring opening of 4-arylalkyl-substituted  $\beta$ -lactams, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18(23):2841–2844.
- [92] Cieplak P., Caldwell J., Kollman P., Molecular and mechanical models for organic and biological systems going beyond the atom centered two body additive approximation: aqueous solution free energies of methanol and N-methyl acetamide, nucleic acid base, and amide hydrogen bonding and chlorof, *Journal of Computational Chemistry* **2001**, 22(10):1048–1057.
- [93] Baum I., Schwab L.W., Loos K., Fels G., Atomistic Model for the Polyamide Formation from  $\beta$ -Lactam Catalyzed by Candida antarctica Lipase B, *ACS Catalysis* **2011**, 1:323–336.
- [94] Mahapatro A., Kumar A., Kalra B., Gross R.A., Solvent-Free Adipic Acid/1,8-Octanediol Condensation Polymerizations Catalyzed by Candida antartica Lipase B, *Macromolecules* **2004**, 37(1):35–40.
- [95] Tarabek P., Bonifacić M., Beckert D., Time-resolved FT EPR and optical spectroscopy study on photooxidation of aliphatic alpha-amino acids in aqueous solutions; electron transfer from amino vs carboxylate functional group., *The journal of physical chemistry. A* **2006**, 110(22):7293–7302.
- [96] van der Mee L., Helmich F., de Bruijn R., Vekemans J.a.J.M., Palmans A.R.a., Meijer E.W., Investigation of Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerizations of Lactones with Various Ring Sizes: Kinetic Evaluation, *Macromolecules* **2006**, 39(15):5021–5027.
- [97] Panova A.A., Kaplan D.L., Mechanistic limitations in the synthesis of polyesters by lipase-catalyzed ring-opening polymerization., *Biotechnology and bioengineering* **2003**, 84(1):103–113.
- [98] ACD/Labs PhysChem Suite, [www.acdlabs.com/physchembatch/](http://www.acdlabs.com/physchembatch/).

- [99] Dash U.N., Nayak K., Thermodynamics of ionization of trans-crotonic and adipic acids in water; the silver-silver adipate electrode, *Canadian Journal of Chemistry* **1980**, 58:323–327.
- [100] Li H., Robertson A.D., Jensen J.H., Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values., *Proteins* **2005**, 61(4):704–721.
- [101] Bas D.C., Rogers D.M., Jensen J.H., Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes., *Proteins* **2008**, 73(3):765–783.
- [102] Kendall R.A., Aprà E., Bernholdt D.E., Bylaska E.J., Dupuis M., Fann G.I., Harrison R.J., Ju J., Nichols J.A., Nieplocha J., Straatsma T., Windus T.L., Wong A.T., High performance computational chemistry: An overview of NWChem a distributed parallel application, *Computer Physics Communications* **2000**, 128(1-2):260–283.
- [103] Valiev M., Yang J., Adams J.a., Taylor S.S., Weare J.H., Phosphorylation reaction in cAPK protein kinase-free energy quantum mechanical/molecular mechanics simulations., *The journal of physical chemistry. B* **2007**, 111(47):13455–13464.
- [104] Alisaraie L., Haller L.A., Fels G., A QXP-based multistep docking procedure for accurate prediction of protein-ligand complexes., *Journal of chemical information and modeling* **2006**, 46(3):1174–1187.
- [105] Haller L.A., unveröffentlichte Ergebnisse, Universität Paderborn, **2008**.
- [106] Müller S., *Lipase-katalysierte Acylierungen von Aminosäuren und Aminosäurederivaten, Enzymunterstützte Synthese von (R)- $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren*, Dissertation, Bergische Universität-GH-Wuppertal, **2000**.
- [107] RCSB Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>, zuletzt besucht: 10.10.11.

- [108] Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E., The Protein Data Bank., *Nucleic acids research* **2000**, 28(1):235–242.
- [109] Molecular Operating Environment (MOE), 2010.10, Chemical Computing Group, <http://www.chemcomp.com/>.
- [110] McMartin C., Bohacek R.S., QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design., *Journal of computer-aided molecular design* **1997**, 11(4):333–344.
- [111] García-Urdiales E., Ríos-Lombardía N., Mangas-Sánchez J., Gotor-Fernández V., Gotor V., Influence of the nucleophile on the *Candida antarctica* lipase B-catalysed resolution of a chiral acyl donor., *Chembiochem* **2009**, 10(11):1830–1838.
- [112] Leach A.R., *Molecular Modelling - Principles and Applications*, Pearson Education Limited, Harlow, 2. Auflage, **2001**.
- [113] McMartin C., Quick eXPlore Screen Manual, **1999**.
- [114] Smith L.I., A tutorial on Principal Components Analysis, [www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student\\_tutorials/principal\\_components.pdf](http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf), **2002**.
- [115] Höltje H.D., Folkers G., *Molecular Modeling - Basic Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **1997**.
- [116] Otte N., Bocola M., Thiel W., Force-Field Parameters for the Simulation of Tetrahedral Intermediates of Serine Hydrolases, *Journal of Computational Chemistry* **2008**, 30(1):154–162.
- [117] Gasteiger J., Engel T. (Herausgeber), *Chemoinformatics*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2003**.
- [118] Senn H., Thiel W., QM/MM-Methoden für biomolekulare Systeme, *Angewandte Chemie* **2009**, 121(7):1220–1254.

- [119] Wennmohs F., *Theoretische Untersuchungen schwacher Wasserstoffbrückenbindungen zu Schwefel*, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, **2003**.
- [120] Cournia Z., *Structure and Dynamics of Biomenbranes containing Cholesterol and other Biologically-Important Sterols. A computational perspective.*, Dissertation, Ruperto-Carola Universität Heidelberg, **2006**.
- [121] Valiev M., Garrett B.C., Tsai M.K., Kowalski K., Kathmann S.M., Schenter G.K., Dupuis M., Hybrid approach for free energy calculations with high-level methods: application to the SN2 reaction of CHCl<sub>3</sub> and OH<sup>-</sup> in water., *The Journal of chemical physics* **2007**, 127(5):051102–1 – 051102–4.
- [122] Zhang Y., Lee T.S., Yang W., A pseudobond approach to combining quantum mechanical and molecular mechanical methods, *The Journal of Chemical Physics* **1999**, 110(1):46–54.
- [123] NWChem Documentation, [http://www.nwchem-sw.org/index.php/NWChem\\_Documentation](http://www.nwchem-sw.org/index.php/NWChem_Documentation), zuletzt besucht: 29.09.11.