

## Die Nachahmung von Enzymen

**Anthony J. Kirby\***

Genau zu verstehen, wie Enzyme arbeiten, ist eine der großen intellektuellen Herausforderungen, die die Natur der Wissenschaft gestellt hat. Bis zu einem gewissen Grad können wir die Funktion von Enzymen „erklären“: Ein Enzym stabilisiert durch selektive Bindung den Übergangszustand einer bestimmten Reaktion<sup>[1]</sup>. Aber unser gegenwärtiges Verständnis reicht nicht aus, um den strengerem praktischen Test zu bestehen: den Entwurf und die Herstellung künstlicher Enzymsysteme mit einer katalytischen Leistungsfähigkeit, die der natürlicher Enzyme nahekommt.

Die Nachahmung von Enzymen ist schon lange eines der ehrgeizigen Ziele der Bioorganiker. Die augenblickliche Lage bietet ein vertrautes Bild: Es gibt stetigen Fortschritt und gelegentlich aufflackernde Geistesblitze, und man wird sich mehr und mehr bewußt, wie komplex dieses Problem eigentlich ist. In zwei kürzlich erschienenen Arbeiten<sup>[2, 3]</sup>, die die Fragestellung aus völlig verschiedenen Richtungen angehen, wird jedoch über katalytische Leistungen berichtet, die vom bisherigen Kenntnisstand aus betrachtet außergewöhnlich sind. Doch sei zunächst der Hintergrund erläutert.

Der allgemeine Kenntnisstand basiert einerseits auf mechanistischen Untersuchungen an Enzymen und andererseits auf (meist nicht von den gleichen Autoren durchgeführten) Arbeiten zur Bindung und zur katalytischen Funktion bei einfacheren künstlichen Systemen. Enzyme sind natürlich mehr als nur hochentwickelte Katalysatoren: Sie sind Teil des Steuerungsapparates der Zelle und erkennen als solcher auch andere Moleküle als ihr spezifisches Substrat und Produkt und reagieren darauf. Aber die Entwicklung von Enzymimitaten befindet sich erst in einem Stadium, in dem die wirkungsvolle Kombination von Bindung und Katalyse das Hauptziel ist. Ausgangspunkt könnte einerseits ein System sein, das eine effektive Substratbindung zeigt oder auch den Mechanismus der fraglichen Reaktion, denn der geschwindigkeitsbestimmende Übergangszustand ist das wichtigste Ziel des Bindungsvorgangs. Die beiden Ansätze müssen am Ende ineinander übergehen, wenn die Nachahmung der Enzymfunktion wirklich gelingen soll. Diese Arbeitsweise könnte künstliche Katalysatoren, die robuster sind als Proteine, für interessante nichtnatürliche Reaktionen hervorbringen. Andererseits ist der nächstliegende Ausgangspunkt für die Nachahmung eines Enzyms natürlich das echte Enzym. Alle diese Ansätze liefern zur Zeit interessante Ergebnisse.

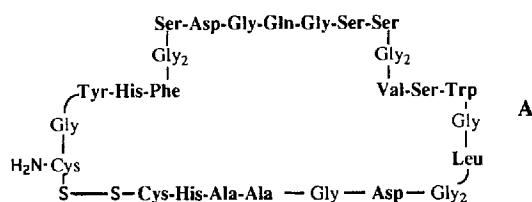
### Imitate auf Enzymbasis

Man kann ein natürliches Enzym chemisch oder, häufiger, durch die Methoden des „Protein-Engineering“ so verändern, daß sich seine Spezifität ändert, und zwar sogar so weit, daß das veränderte System eine völlig andere Reaktion katalysiert. Solche Systeme sind eher modifizierte als nachgeahmte Enzyme, als die wir hier nur solche betrachten wollen, die künstlich hergestellt wurden.

[\*] Dr. A. J. Kirby  
University Chemical Laboratory  
GB-Cambridge, CB2 1EW (Großbritannien)  
Telefax: Int. + 223/336-362

Als man in der Lage war, die funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum eines Enzyms zu identifizieren, untersuchte man natürlich kleine Peptide mit der Aminosäuresequenz eines aktiven Zentrums als mögliche Katalysatoren. Die Ergebnisse dieses Vorgehens waren ausnahmslos negativ. Wir wissen heute, daß die funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum eines funktionsfähigen Enzyms eine spezifische, dreidimensionale Anordnung aufweisen, in der sie signifikant mit dem Rest des Proteins wechselwirken; dies läßt sich in zwei Dimensionen nicht simulieren.

Bei einer wirklichen Imitation auf Enzymbasis sollte man versuchen, die dreidimensionale Anordnung der funktionellen Gruppen des aktiven Zentrums in einem synthetischen Gerüst nachzubauen. Das sagt sich leicht; von der Idee zu wirklichen Molekülen zu kommen ist schon schwieriger. Ein wichtiger Erfolg dieser Vorgehensweise scheint jedoch die Arbeit von Atassi und Manshoury<sup>[2]</sup> über die Synthese von zwei „Pepzymen“ zu sein, die durch „Oberflächensimulation“ der aktiven Zentren von Trypsin und Chymotrypsin entstanden. Dabei wurde zunächst eine Reihe relativ kleiner (aus 29 Aminosäuren aufgebauter) Peptide, die die wesentlichen bindenden und katalytischen Aminosäuresequenzen der Enzyme enthielten, entworfen und synthetisiert. Diese wurden dann über Glycin-Spacer so miteinander verbunden, daß die aus Röntgenstrukturanalysen der Enzyme und ihrer Komplexe mit Substratanaloga bekannte räumliche Anordnung modelliert wurde. Eine frühe Version, die eine gewisse trypsinartige Bindungsaktivität zeigte, wurde systematisch so weit optimiert, bis mit dem Peptid A (Aminosäuren des natürlichen aktiven Zentrums sind fett gedruckt) eines mit außergewöhnlicher katalytischer Aktivität, besonders in der dargestellten cyclischen (Disulfid-)Form, erhalten war.



Dieses Molekül hydrolysiert nicht nur das einfache Trypsin-„substrat“ *N*-Tosyl-L-argininmethylester mit Werten für  $k_{\text{cat}}$  und  $K_{\text{m}}$ , die denen des natürlichen Enzyms ähnlich sind, es spaltet auch Testproteine zu ähnlichen Peptidmustern wie Trypsin. Ein zu **A** analoges Peptid, das auf dem aktiven Zentrum von Chymotrypsin basiert, zeigte ähnliche Aktivität wie **A** und die erwartete abweichende Spezifität.

Diese hohe katalytische Aktivität – das muß man sagen – ist überraschend, besonders bei Amidbindungen, und zur Zeit werden intensive Anstrengungen unternommen, um die Ergebnisse zu wiederholen. Wenn sie sich bestätigen lassen, wird man diese Arbeit als wichtigen Fortschritt betrachten. Die Synthesplanung ist durchaus komplex, aber mit modernen präparativen

Methoden sind Peptide dieser Größe noch mit vernünftigem Aufwand zugänglich. In der Praxis findet dieser Ansatz, zumindest im derzeitigen Entwicklungsstadium, seine Grenze – wie alle Nachahmungsversuche auf Enzymbasis – in der Tatsache, daß ein voller Erfolg gerade darin besteht, eine Reaktion genauso gut zu katalysieren wie ein natürlicher zur Verfügung stehender Katalysator.

#### Enzymimitate auf der Grundlage des Reaktionsmechanismus

Im anderen Extremfall kann man eine enorme Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit mit recht einfachen Systemen erreichen, indem man den Bindungsvorgang übergeht und die Reaktionen intramolekular verlaufen läßt, d. h. indem man die beteiligten funktionellen Gruppen in dasselbe Molekül einbaut<sup>[4]</sup>. Typischerweise macht man die interessierende Reaktion zum Teilschritt einer thermodynamisch günstigen Cyclisierung und kann so Systeme erhalten, bei denen die äußerst stabilen, in biologischen Systemen strukturbildenden Gruppen (Amid-, Glycosid- und Phosphateereinheiten haben unter physiologischen Bedingungen bei etwa pH 7 Halbwertszeiten von vielen Jahren) im Bruchteil einer Sekunde gespalten werden. Man kann dann für bestimmte Reaktionen, die man unter den gleichen Bedingungen untersucht und die mit einer ähnlichen Geschwindigkeit ablaufen wie die entsprechenden Reaktionen der beiden (oder mehreren) funktionellen Gruppen am aktiven Zentrum eines Enzyms, den genauen Mechanismus der Katalyse aufklären. Für die katalytische Aktivität gibt es zwei wichtige Maßzahlen: die effektive Molarität (EM), d. h. die effektive Konzentration der katalytischen Gruppe, die nötig ist, um eine intermolekulare Reaktion genauso schnell ablaufen zu lassen wie die intramolekulare<sup>[4]</sup>, und natürlich die absolute Reaktionsgeschwindigkeit. Denn Umsetzungen im aktiven Zentrum eines Enzyms verlaufen äußerst schnell, so schnell, daß viele Enzyme ein perfektes evolutionäres Stadium erreicht haben, das von Alberty und Knowles<sup>[5]</sup> als die katalytische Aktivität definiert wurde, bei der der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion die Diffusion der Produkte weg vom Enzym ist.

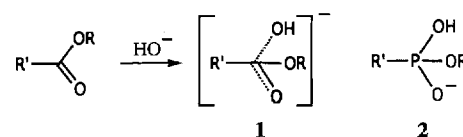
EM-Werte von  $10^{13}$ – $10^{14}$  M – d. h. Halbwertszeiten in der Größenordnung von einer Sekunde – können in Systemen erreicht werden, in denen eine gewöhnliche aliphatische Amideinheit ganz in die Nähe einer COOH-Gruppe gebracht wird<sup>[5, 6]</sup> oder eine Phosphorsäurediestereinheit in die Nähe einer OH-Gruppe<sup>[7]</sup>, und man kann für solche Modellreaktionen den Mechanismus genau erklären. Diese Modellreaktionen sind eine wesentliche Grundlage für die Diskussion des Mechanismus der entsprechenden Reaktion am aktiven Zentrum eines Enzyms oder für das Entwerfen von Enzymimitaten. Denn es ist nicht möglich – zumindest bis jetzt – auch nur annähernd so große Steigerungen der Reaktionsgeschwindigkeit zu erzielen, wenn die reagierenden Gruppen durch nichtkovalente Bindungen zusammengebracht werden.

#### Enzymimitate auf der Grundlage des Bindungsschritts

Eine Mindestanforderung an ein echtes Enzymimitat ist eine bindende Wechselwirkung zwischen zwei Molekülen vor der katalytischen Reaktion; diese wird durch die Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben. Bei intramolekularen Systemen kann man sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeiten erreichen, weil man durch entsprechende Synthese eine große Annäherung zwischen funktionellen Gruppen erzwingen kann. Ein Enzym dagegen

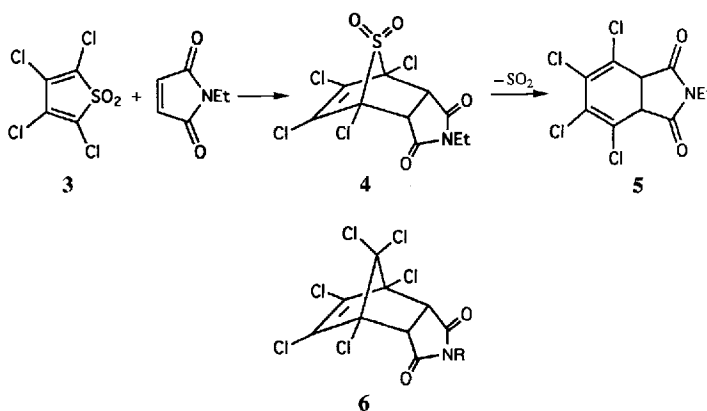
muß in einem dynamischen Gleichgewicht sein Substrat erkennen und nichtkovalent binden. Die Chemie der molekularen Erkennungsvorgänge, die hierbei eine Rolle spielen, gehört zu den derzeit am intensivsten bearbeiteten Forschungsgebieten und ist ein beliebtes Thema für Tagungen<sup>[8, 9]</sup>, Highlights<sup>[10]</sup> und Übersichtsartikel<sup>[11]</sup>. Wie bei der chemischen Katalyse stammen viele unserer Erkenntnisse über nichtkovalente Wechselwirkungen aus Untersuchungen an einfachen Systemen, die so angelegt wurden, daß man bestimmte Fragen zum grundlegenden Vorgang beantworten konnte. Mehr Bedeutung für die Entwicklung von Enzymimitaten haben Systeme, die so konzipiert wurden, daß die katalytische Funktion durch eine Bindung erreicht wird, d. h. ohne eingebaute spezifische, katalytisch wirksame Gruppen. Es gibt zwei wichtige Gruppen solcher Systeme: synthetische Wirtmoleküle, die so konzipiert wurden, daß sie die beiden Reaktanten in eine günstige Anordnung zueinander bringen, und die meisten katalytischen Antikörper.

Die meisten bisher bekannten katalytischen Antikörper<sup>[12, 13]</sup> wurden zur Hydrolyse von Carbonsäurederivaten hergestellt und gegen Phosphonate **2** als Haptene gezüchtet, die ein Modell für den beteiligten tetraedrischen Übergangszustand **1** sind. Mit



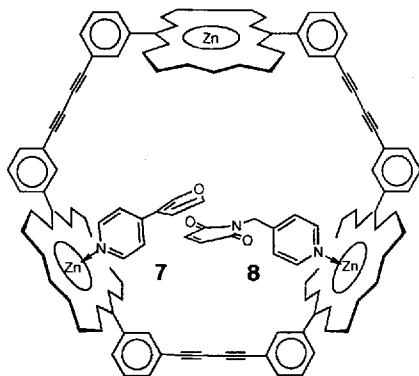
geeigneten Haptenen (und Substraten) erreicht man in recht verlässlicher Weise die Katalyse der Esterhydrolyse, wobei das Nucleophil aus dem Lösungsmittel kommt. Zu anspruchsvollen Systemen mit eingebauten katalytisch aktiven Gruppen kann man im Prinzip durch sorgfältige Wahl des Haptens (und mit einer großen Portion Glück) kommen; eine andere Möglichkeit besteht darin, einen bekannten katalytischen Antikörper durch Protein-Engineering zu modifizieren. Auf diesem Gebiet gibt es gute Erfolgsaussichten, und es wird derzeit intensiv bearbeitet.

Eine sorgfältige Wahl des Haptens ermöglichte auch die Herstellung eines Antikörpers, der die Diels-Alder-Reaktion zwischen Tetrachlorthiophendioxid **3** und *N*-Ethylmaleinsäureimid katalysiert<sup>[14]</sup>. Wiederum ist die Katalyse einfach Folge einer günstigen Bindung (für EM kann man einen Wert  $> 110$  M ab-



schätzen): Der Umsatz hängt von der Instabilität des anfangs gebildeten Addukts **4** ab, das sehr schnell  $\text{SO}_2$  abspaltet und so das Produkt **5** bildet. Dadurch wird Produkthemmung, ein häufiges Problem bei solchen Systemen mit potentieller katalytischer Aktivität, vermieden: Das Hapten **6**,  $\text{R} = (\text{CH}_2)_5\text{CO}_2\text{H}$ , ist ein vernünftiges Analogon des Übergangszustandes, unterscheidet sich aber in seiner Struktur stark vom Endprodukt.

Eine Katalyse der Diels-Alder-Reaktion kann man auch mit einfachen künstlichen Systemen erreichen. Ein Beispiel aus jüngerer Zeit ist die reversible Reaktion zwischen **7** und **8**, die durch (stöchiometrische Mengen) eines trimeren, cyclischen Zinkporphyrin-Wirtmoleküls, das die beiden Pyridinderivate im Innern seines Hohlraums bindet, beschleunigt wird<sup>[16]</sup>. Als Produkt



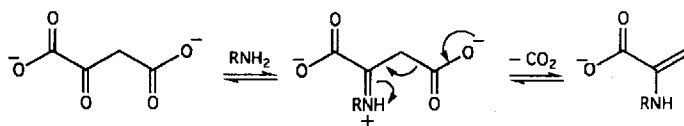
entsteht das *exo*-Addukt, das bis zu tausendmal schneller gebildet wird als das entsprechende *endo*-Isomer (das in Abwesenheit des Makrocyclus als kinetisch kontrolliertes Produkt erhalten wird). Dies entspricht einem EM-Wert von etwa 20 M. Aufgrund von Produkthemmung ist das System nicht katalytisch (ebenso wie ein früheres Beispiel, bei dem Cyclodextrin als Wirtmolekül eingesetzt wurde<sup>[17]</sup>).

#### Enzymimitate mit Substratbindung und katalytischer Wirkung

Viele der erfolgreichsten Enzymimitate wurden aus funktionalisierten Cyclodextrinen hergestellt; die Arbeiten von Breslow et al. insbesondere sind jedem ein Begriff, der die Entwicklung auf diesem Gebiet verfolgt hat<sup>[18]</sup>. Diese Wirtmoleküle binden aromatische Ringe in einem hydrophoben Hohlraum. Ein weiterer grundlegender Beitrag stammt von Lehn et al.<sup>[19]</sup>, die Polyammoniummakrocyclen zur Katalyse der Phosphatübertragung durch ATP nutzten und zeigten, daß auch mehrfache Wasserstoffbrückenbindungen zur wirksamen Bindung zwischen flexiblen Systemen in wäßriger Lösung führen können.

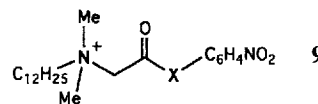
Ein ganz anderer Ansatz stammt von Benner und seiner Gruppe<sup>[20]</sup>: Sie gingen bei der Planung einer synthetischen Decarboxylase von den bekannten Eigenschaften von Proteinen und dem Mechanismus der aminkatalysierten Decarboxylierung von  $\beta$ -Ketosäuren aus. Bei ihren Enzymimitaten handelt es sich um Peptide aus 14 Aminosäuren (Oxaldie 1 und 2), die aus Leucin und Lysin in einer Sequenz bestehen, die bekanntermaßen die Bildung einer  $\alpha$ -Helix begünstigt. Daher sollten diese Peptide eine proteinartige Konformation mit einem hydrophoben Kern und einem hydrophilen Äußeren einnehmen. Sie katalysieren die Decarboxylierung von Oxalylacetat über den erwarteten Mechanismus (siehe Schema 1), wobei die kationischen

Lysinseitenketten vermutlich an der Bindung der beiden Carboxylatfunktionen sowohl bei den Edukten als auch im Übergangszustand beteiligt sind (Acetylacetat, das nur eine einzige Carboxylatgruppe enthält, ist kein Substrat). Man findet eine Michaelis-Menten-Kinetik, und die Bildung des Imins verläuft um den Faktor  $10^3$ – $10^4$  schneller als mit einfachen Aminkatalysatoren. Die katalytische Aktivität hängt dabei anscheinend tatsächlich vom Grad der  $\alpha$ -Helixbildung ab.



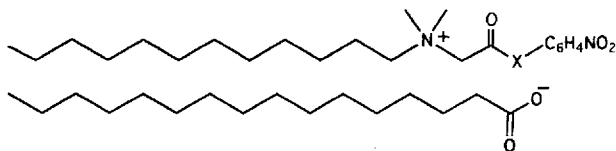
Schema 1. Decarboxylierung von Oxalylacetat, katalysiert durch ein Enzymimitat. R = Lysinseitenkette.

Die bemerkenswertesten und einfachsten neuartigen Enzymimitate resultierten aus einer Art „Querdenken“ von Menger und Fei<sup>[3]</sup>. Hier gibt es keinerlei Synthese. Die Autoren mischten einfach langkettige Carbonsäuren, Amine, Alkohole und Alkylimidazole der Typen, die in wäßriger Lösung Aggregate und Micellen bilden. Dann untersuchten sie eine große Zahl solcher Mischungen auf katalytische Aktivität. Die Testreaktion war die Hydrolyse des reaktiven Esters **9** ( $\text{X} = \text{O}$ ), die sich oberhalb von pH 7 leicht durch die Freisetzung des *p*-Nitrophenolat-Chromophors verfolgen läßt.



Einige der eingesetzten Mischungen beschleunigten die Hydrolyse von **9** ( $\text{X} = \text{O}$ ) so stark, daß die Geschwindigkeitskonstanten manuell nicht mehr gemessen werden konnten. Bemerkenswerterweise galt dies auch in Gegenwart einer einzelnen Komponente, nämlich des Hexadecanoat-Ions; dieses System beschleunigt auch die Hydrolyse von *p*-Nitroanilid (**9**,  $\text{X} = \text{NH}$ ). Dabei handelt es sich um ein aktiviertes Amid, das jedoch in Gegenwart von Acetat (0.2 M) bei pH 7 und 25 °C nicht merklich hydrolysiert wird. Unter den gleichen Bedingungen, jedoch in Gegenwart von Hexadecanoat in einer Konzentration von lediglich  $2 \times 10^{-5}$  M, beträgt seine Halbwertszeit nur noch drei Minuten.

Nucleophile Katalyse ist die einzige Erklärung für solch einen starken Einfluß<sup>[4]</sup>. Ein EM-Wert kann hier nicht berechnet werden, da keine Daten zur Verfügung stehen, die man zum Vergleich heranziehen könnte, aber Hexadecanoat ist mindestens um den Faktor  $10^8$  wirksamer als Acetat. Interessanterweise verläuft die Reaktion stöchiometrisch: Vermutlich liegt ein gemischtes Anhydrid als Intermediat vor, dessen Hydrolyse der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der gesamten Hydrolyse des Anilids ist. Die Autoren vermuten, daß die Reaktion in submicellaren Aggregaten, sogenannten „Klumpen“, abläuft, in denen sich die Carbonylgruppe des Anilids und die Carboxylgruppe des Hexadecanoats durch hydrophobe Assoziation der langen Alkylketten ideal für eine bemerkenswert schnelle Umsetzung nahe kommen (siehe Schema 2). Verlängert man das Substrat einfach um drei Methylengruppen [**9**,  $\text{X} = (\text{CH}_2)_3\text{NH}$ ], so findet die Reaktion nicht mehr statt.



Schema 2. Hydrophobe Assoziation zwischen 9 und Hexadecanoat.

Zwei Punkte sind hier hervorzuheben: die hohe Reaktivität, die viel größer ist als bei früher untersuchten, offensichtlich schwach assoziierten Systemen, und das Prinzip, viele einfache Systeme zu untersuchen, statt eine Synthese von komplexen, sorgfältig konzipierten Systemen durchzuführen. Dieser neue Ansatz ist eine Ergänzung des bisherigen gedanklichen Vorgehens und wird vielleicht zu Anwendungen in der Praxis führen.

- [1] A. R. Fersht, *Enzyme Structure and Mechanism*, 2. Aufl., W. H. Freeman, New York, 1985.  
 [2] M. Z. Atassi, T. Manshour, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 8282–8286.  
 [3] F. Menger, Z. X. Fei, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 329; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 346.

- [4] A. J. Kirby, *Effective molarities for intramolecular reactions* (*Adv. Phys. Org. Chem.* **1980**, 17, 183–278).  
 [5] W. J. Albery, J. R. Knowles, *Biochemistry* **1976**, 15, 5631.  
 [6] F. M. Menger, M. Ladika, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6794.  
 [7] K. N. Dalby, A. J. Kirby, F. Hollfelder, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 1269.  
 [8] *Host-Guest Interactions: from Chemistry to Biology* (Hrsg.: D. J. Chadwick, K. Widdows) (*Ciba Found. Symp.* **1991**, 158).  
 [9] *The Chemistry of Biological Molecular Recognition* (Hrsg.: A. J. Kirby, D. H. Williams) (*Philos. Trans. Soc. London A* **1993**, 345, 1–164).  
 [10] H.-J. Schneider, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 890; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 848.  
 [11] R. J. Pieters, J. Rebek, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1993**, 112, 330; I. Chao, F. Diederich, *ibid.* **1993**, 112, 335.  
 [12] P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 1336; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 1283.  
 [13] U. K. Pandit, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1993**, 112, 431.  
 [14] D. Hilvert, K. W. Hill, K. D. Narel, M.-T. M. Auditor, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 9261; siehe auch [15].  
 [15] A. C. Braisted, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 112, 7431.  
 [16] C. J. Walter, H. L. Anderson, J. K. M. Sanders, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 458.  
 [17] D. Rideout, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 7816.  
 [18] Für aktuelle Zitate und einen Überblick siehe: R. Breslow, P. J. Duggan, J. P. Light, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3982; R. Breslow in [8], S. 115.  
 [19] M. W. Hosseini, J.-M. Lehn, K. C. Jones, K. E. Plute, K. B. Mertes, M. P. Mertes, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6330–6335; M. P. Mertes, K. B. Mertes, *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 413–418.  
 [20] K. Johnsson, R. K. Allemann, H. Widmer, S. Benner, *Nature (London)* **1993**, 365, 530–532.

## Nur Kopieren ist teurer...

... und zudem mühsamer! Diplomanden und Doktoranden können als studentische Mitglieder der GDCh die "Angewandte" für ca. Fünfmarkachtzig (DM 5.80!!) pro Heft druckfrisch frei Haus erhalten. Das sind weniger als sechs Pfennige pro Seite!

### Interessiert?

Dann rufen Sie doch einfach bei Beate Geiß an (Tel. 06201/606-199) oder schicken Sie ihr ein Fax (06201/606-184). Aber natürlich können Sie ihr auch schreiben:

**VCH-Leserservice, Postfach 10 11 61, 69451 Weinheim**

