

Die Herstellung enantioselektiver Membranen mit Enzymen, die durch ortsspezifische Mutagenese inaktiviert sind**

Alexander Skolaut und János Rétey*

Viele biologisch aktive Verbindungen, darunter Medikamente, haben chirale Strukturen, von denen nur ein einziges Stereoisomer die gewünschte Wirkung zeigt. Die chemische Synthese solcher Verbindungen führt oft zu Racematen, deren Trennung eine langwierige und teure Prozedur sein kann. Enantioselektive Membranen können den gezielten Transport eines Enantiomers aus einem Racemat erleichtern, was eine einfache und schnelle Trennungsmethode darstellt. Lakshmi und Martin bauten Enzyme in poröse polymere Membranen ein und verhinderten die unerwünschte katalytische Umsetzung der Substrate durch Entzug der entsprechenden Cofaktoren.^[1] Da viele Enzyme keine Cofaktoren benötigen, könnte die ortsspezifische Mutagenese eine allgemeine Methode sein, um die katalytische Aktivität der Enzyme zu verhindern, gleichzeitig bleibt aber ihre Fähigkeit, die Substrate enantioselektiv zu binden, erhalten. In anderen Worten würde dies die Umwandlung der Enzyme in Rezeptoren bedeuten.

Für ein solches Unterfangen erschienen uns die Histidin- und Phenylalanin-Ammoniak-Lyasen, HAL und PAL, besonders geeignet. Beide Enzyme haben eine für die Katalyse essentielle elektrophile Gruppe, von der man 30 Jahre geglaubt hat, dass sie ein Dehydroalanin-Rest sei. Die kürzlich ermittelte Röntgenstrukturanalyse von HAL zeigte, dass die elektrophile prosthetische Gruppe nicht Dehydroalanin, sondern Methylidenimidazolone (MIO) ist.^[2] Von PAL gibt es bis jetzt keine Röntgenstruktur, die MIO-Gruppe wurde aber durch UV-Differenzspektroskopie identifiziert.^[3] Wir haben eine Anzahl von HAL- und PAL-Mutanten erzeugt, die keine MIO-Gruppe oder andere katalytisch essentiellen Aminosäurereste enthielten.^[3–6]

Die meisten von ihnen behielten ihre Affinität für ihre Substrate, verloren aber weitgehend ihre katalytische Aktivität. Für den Einbau in die künstliche Membran sind die zwei Mutanten PAL Y109F und HAL E414A ausgewählt worden.

Um den Transport durch die Membran zu beschleunigen, muss sich das Trägermolekül im ganzen porösen Volumen frei bewegen können. Dies könnte durch einen physischen Einschluss zwischen polymeren Filmen, die als semipermeable Barriere dienen, erreicht werden. Kleine Moleküle wie Solvens oder Substrat können durch das Polymer diffundie-

ren, nicht aber große Moleküle wie der Transporter. Der polymere Film kann zum Beispiel durch Redox-Polymerisation von Pyrrol oder dessen Derivaten, oder aber durch Polykondensation von Dialkyldichlorsilanen an der Oberfläche einer mesoporösen Membran präpariert werden.

Die Qualität des synthetisierten polymeren Films kann am besten durch Elektronenmikroskopie kontrolliert werden.^[7] Mit dieser Methode fanden wir, dass nur die Poly(dimethylsiloxan)-Polymerfilme, welche an der Oberfläche einer Aluminiumoxid-Membran (Anodisc-Membran, Abbildung 1a) synthetisiert worden waren, in reproduzierbar guter Qualität erhalten werden konnten (Abbildung 1b). Alle anderen Polymere oder Polymer/Membran Kombinationen gaben keine Polymerfilme, sondern nur kleinere Polymer-Plättchen (Abbildung 1c).

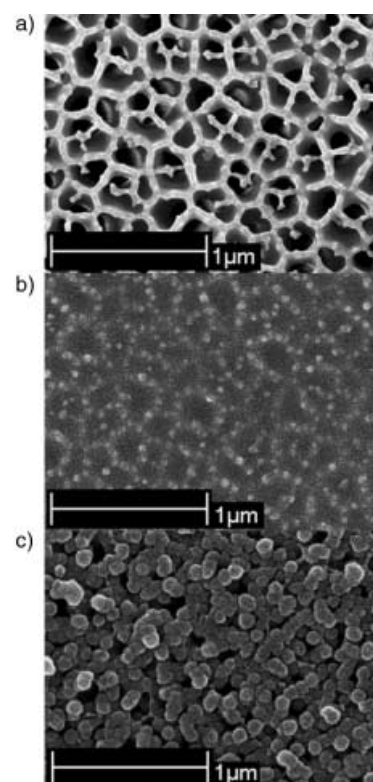


Abbildung 1. Elektronenmikroskopische Bilder: a) einer unbeschichteten Oberfläche einer Aluminiumoxid-Membran (Whatman Anodisc), b) eines an der Membranoberfläche synthetisierten Poly(dimethylsiloxan)-Polymerfilmes, c) von Polypyrrol-Plättchen an der Oberfläche einer Aluminiumoxid-Membran.

Die Immobilisierung der Enzyme wurde folgendermaßen bewerkstelligt: Ein kleines Volumen (< 100 mL) der konzentrierten Enzymlösung (50 mg mL^{-1}) wurde auf die unbeschichtete Seite der Membran aufgetragen. Nachdem die Enzymlösung in die Poren der Membran eingedrungen war, wurde sie physisch mit einer weiteren einfach beschichteten Membran immobilisiert, sodass ein Membran-Sandwich entstand (Abbildung 2a). Durch diese Prozedur können wechselnde Mengen des Proteins (bis zu 10 mg) unter milden Bedingungen immobilisiert werden, d. h. ohne Denaturierung und dadurch ohne die Zerstörung der Bindungsfähigkeit.

[*] Prof. Dr. J. Rétey, Dr. A. Skolaut
Institut für Organische Chemie
Universität Karlsruhe
Richard-Willstätter-Allee 2, 76128 Karlsruhe (Deutschland)
Fax: (+49) 721-608-4823
E-mail: biochem@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung. A.S. dankt dem Land Baden-Württemberg für ein Stipendium nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz. Für die Überlassung des rekombinanten Plasmids, welches nach dem „codon usage“ von *Escherichia coli* geändert wurde, danken wir Prof. Dr. G. E. Schulz und M. Bädeker.

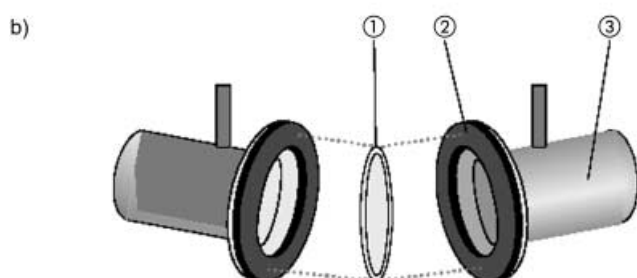
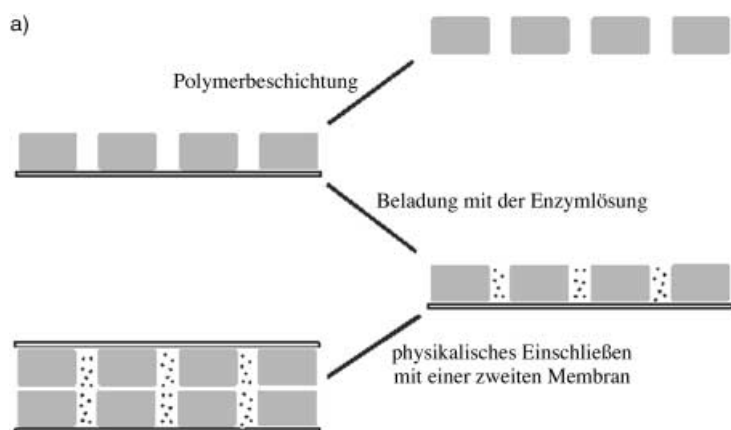


Abbildung 2. a) Das Prinzip des Membranbeschichtungs- und Immobilisierungsprozesses an einer Aluminiumoxid-Membran mit Poly(dimethylsiloxan). b) Aufbau der Testzelle (1 = Membran, 2 = Versiegelung, 3 = Kammer).

Die Versuche zum Transport wurden bei optimierten pH-Werten und Temperaturen durchgeführt, siehe Tabelle 1. Für die Versuche wurden die Membran-Sandwiches zwischen die beiden Hälften der Testzellen eingesetzt (Abbildung 2b). Die

Tabelle 1. Charakteristische Daten der Wildtyp-Enzyme und ihrer inaktiven Mutanten.

Enzym	K_m	V_{max}	pH-Optimum	Temp. Optimum
wt-PAL	0.12 mM	2.6 U mg ⁻¹	8.8	30 °C
PAL-Y109F ^[a]	n.d. ^[b]	0.00035 U mg ⁻¹	8.8	30 °C
wt-HAL	3.9 mM	24.3 U mg ⁻¹	9.3	25 °C
HAL-E414A	6.1 mM	0.00024 U mg ⁻¹	9.3	25 °C

[a] Y109F bedeutet, dass in Position 109 Tyrosin (Y Ein-Buchstabencode) durch Phenylalanin (F) ersetzt wurde. [b] nicht detektierbar.

eine Seite der Membran war mit der Lösung des racemischen Substrats in Kontakt (feed-side), die andere mit der Substratfreien Pufferlösung (strip-side). In beiden Kammern wurden die Lösungen mit einem Magnetrührer bei 250 rpm gerührt. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben entnommen und durch Umkehrphasen-HPLC sowie HPLC an chiralen Phasen analysiert. Das Verhältnis der transportierten L- und D-Enantiomere wurde als Selektivitätskoeffizient (SF) bezeichnet.

Die ersten Transportexperimente wurden mit der immobilisierten PAL-Mutante Y109F, welche etwa 75 000-mal weniger Aktivität als der Wild-Typ aufweist, durchgeführt.^[6] Abbildung 3a zeigt sowohl die Konzentrations- als auch die

Zeitabhängigkeit der Selektivität. Bei niedrigen Konzentrationen (0.1 mM) wird L-Phenylalanin schneller transportiert und die Selektivität erreicht ein Maximum (2.5) nach 30 min. Dann sinkt die Selektivität ab, was durch die Annahme erklärt werden kann, dass der erleichterte Transport in beide Richtungen stattfindet. Es ist bekannt, dass PAL auch D-Phenylalanin als Substrat akzeptiert, allerdings mit niedrigerer Affinität und Wechselzahl. Gleichzeitig und unabhängig vom Transportmolekül findet auch ein langsamerer unselektiver Diffusions-Transport statt. Erstaunlicherweise wird D-Phenylalanin bei viel höherer Substratkonzentration (2.5 mM) in der Feed-Seite schneller transportiert. Dieses unerwartete Resultat kann dadurch erklärt werden, dass bei dieser Konzentration das D-Enantiomer erfolgreich um die Bindungsstellen von

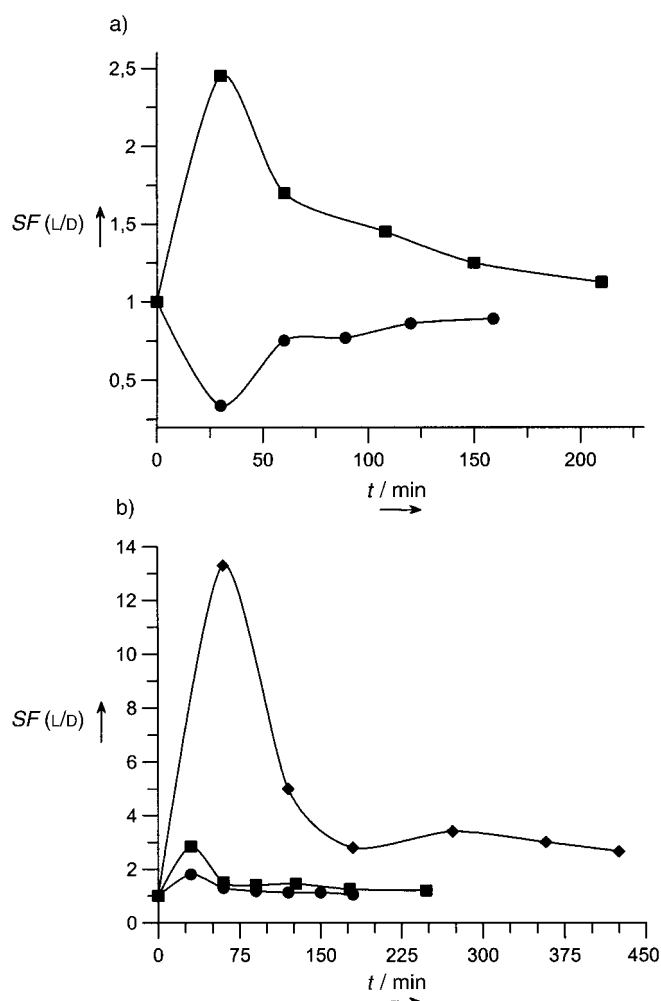


Abbildung 3. Zeitabhängigkeit des Selektivitätskoeffizienten in den Transportexperimenten: a) Anodisc-Membran, 20 nm Porendurchmesser, Silanbeschichtung; PAL-Mutante Y109F bei verschiedenen Feed-Konzentrationen von D,L-Phenylalanin und Protein-Beladungen (2.5 mM D,L-Phenylalanin, 2.2 mg Protein [●]; 0.1 mM D,L-Phenylalanin, 3.5 mg Protein [■]). b) Anodisc-Membran, 20 nm Porendurchmesser, Silanbeschichtung; HAL-Mutante E414A bei verschiedenen Feed-Konzentrationen von D,L-Histidin, 5 mg Protein-Beladung (2.5 mM D,L-Histidin [●], 1.0 mM D,L-Histidin [■], 0.1 mM D,L-Histidin [◆]). Alle Substrat-Konzentrationen sind für den Start der Experimente angegeben. Während der ersten Stunde wurden 3% der Aminosäuren zur Strip-Seite transportiert, am Ende der Versuche 15%.

PAL konkurriert und sie länger besetzt, sodass nur sehr wenig freies Enzym für den Transport des L-Enantiomers zur Verfügung steht. Der Selektivitätskoeffizient nimmt nach 30 min auch hier ab und nähert sich asymptotisch dem Gleichgewicht.

Anders verhielt sich die immobilisierte HAL-Mutante E414A. Es ist bekannt, dass HAL eine strikte Enantioselektivität für L-Histidin aufweist.^[8] Dementsprechend erleichterte die HAL-Mutante den Transport des L-Enantiomers bei allen drei angewendeten Konzentrationen (Abbildung 3b). Aber auch hier war der Selektivitätskoeffizient (13.3) bei der niedrigsten Konzentration (0.1 mM) am höchsten. Nach 70 min nahm die Selektivität ab, offenbar aus demselben Grund, der beim PAL-Experiment diskutiert wurde. Bei höheren Konzentrationen auf der Feed-Seite lag das Maximum viel tiefer (2–3) und wurde schneller überschritten (30 min). Als Kontrolle wurde das selbe Membransystem ohne eingeschlossenes Enzym untersucht, um zu sehen, ob es Phenylalanin enantioselektiv transportieren kann. Die Analyse auf einer chiralen Säule (siehe Experimentelles) zeigte, dass beide Enantiomere mit derselben Geschwindigkeit durch die Membran diffundierten.

Unsere Resultate zeigen, dass Enzyme durch ortsspezifische Mutagenese in enantioselektive Rezeptoren umgewandelt und in immobilisierter Form für die Erleichterung des enantioselektiven Transports durch eine Membran genutzt werden können. Die hier beschriebene Methode unterscheidet sich von früher veröffentlichten Ergebnissen mit enantioselektiven Membranen, die unselektive Proteine wie Serumalbumin oder andere chirale Materialien enthielten.^[9–11] Sowohl solche Membranen als auch chirale Chromatographie-Säulen arbeiten durch Bindung und Verlangsamung des Transportes des einen Enantiomers, während das andere Enantiomer passiv diffundieren oder ohne Zurückhaltung eluiert werden kann. Bei unserer Methode wird der Transport des einen Enantiomers beschleunigt, während das andere – viel langsamer – durch die Membran diffundiert. Kontinuierliche Entfernung des angereicherten Enantiomers von der Permeat(strip)-Seite könnte zu einer Trennung im präparativem Maßstab führen. Ob diese Methode mit anderen etablierten Methoden der Enantiomertrennung konkurrieren kann oder nicht, muss die zukünftige Forschung entscheiden.

Es ist das erste Mal, dass nicht nur über den Einfluss der Konzentration, sondern auch über die Zeitabhängigkeit der Enantioselektivität des Transportes durch eine Enzym-dotierte Membran berichtet wird. Ein weiterer Aspekt unserer Ergebnisse ist, dass dank der breiten Substratspezifität von PAL, die vorgestellten Membranen das Potenzial haben, eine größere Anzahl von racemischen Arylalaninen zu trennen.^[12]

Experimentelles

Beschichtung der Membranen: In diesem Prozess wurde die Membran zuerst für 5 min mit den Dämpfen von Dichlordimethylsilan äquilibriert und dann eine Seite der Membran für weitere 5 min mit Wasser benetzt. Die so beschichteten Membranen wurden 1 min mit Wasser gewaschen und dann bei Raumtemperatur getrocknet.

Analytische Methoden: Für die Trennungen durch HPLC wurde ein Hewlett-Packard-Series-1050-Liquid-Chromatography-System mit den folgenden Säulen und Bedingungen verwendet: D,L-Phenylalanin: Grom

Symbasic 125 × 4.6 mm, versehen mit einer 10 × 2.5 mm Vorsäule, 5 µm, isokratische Elution durch bidestilliertes H₂O mit 0.1 % TFA; D,L-Histidin: Grom Sil ODS-O AB, 250 × 4.0 mm, 5 µm, isokratische Elution durch 20 % CH₃CN und 80 % 10 mM K-phosphat-Puffer (pH 8.0); Astec Chirobiotic T, 250 × 2.5 mm, mit einer 10 × 2.5 mm Vorsäule für chirale Analysen.

Bedingungen nach dem Chirobiotic Handbook (Advanced Separation Technologies Inc.).

Alle Chromatogramme wurden bei 210 nm detektiert.

Eingegangen am 27. November 2001 [Z18284]

- [1] B. B. Lakshmi, C. R. Martin, *Nature* **1997**, 388, 758–760.
- [2] T. F. Schwede, J. Rétey, G. E. Schulz, *Biochemistry* **1999**, 38, 5355–5361.
- [3] D. Röther, D. Merkel, J. Rétey, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2592–2594; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2462–2464.
- [4] D. Röther, L. Poppe, S. Vieregutz, B. Langer, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 6011–6019.
- [5] B. Langer, D. Röther, J. Rétey, *Biochemistry* **1997**, 36, 10867–10871.
- [6] D. Röther, L. Poppe, G. Morlock, S. Vieregutz, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 3065–3075.
- [7] Alle elektronenmikroskopischen Bilder wurden am Lehrstuhl für Elektronenmikroskopie (LEM) an der Universität Karlsruhe aufgenommen.
- [8] P. C. Wu, T. A. Kroening, P. J. White, K. E. Kendrick, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 1647–1655.
- [9] M. Nakamura, S. Kiyohara, K. Saito, K. Sugita, T. Sugo, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 1323–1325.
- [10] P. C. Wang, J. Gao, C. S. Lee, *J. Chromatography A* **2002**, 942, 115–122.
- [11] J. T. F. Keurentjes, F. J. M. Voermans, in *Chirality in Industry II* (Hrsg.: A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby), Wiley, New York, **1997**, S. 157–180.
- [12] A. Gloge, J. Zsó, A. Kövári, L. Poppe, J. Rétey, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 3386–3390.

Parallele, photoakustische Echtzeit-Detektion von Reaktionsprodukten aus Katalysatorbibliotheken**

Thorsten Johann, Armin Brenner, Manfred Schwickardi, Oliver Busch, Frank Marlow, Stephan Schunk und Ferdi Schüth*

In den letzten Jahren fand das Hochdurchsatz-Screening zunehmende Akzeptanz als geeignete Methode, um die Entdeckung von neuen Feststoffkatalysatoren zu beschleunigen. Obwohl bereits von interessanten Entwicklungen bei solchen Produktanalysen berichtet wurde,^[1–4] besteht ein dringender Bedarf an schnellen und parallelen Analysetechniken. Des weiteren stellt die Integration von verschiedenen,

[*] Prof. Dr. F. Schüth, T. Johann, M. Schwickardi, O. Busch, Dr. F. Marlow
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim (Deutschland)
Fax: (+49) 208-306-2995
E-mail: schueth@mpi-muelheim.mpg.de
Dr. A. Brenner, Dr. S. Schunk
hte-AG
Kurfürsterring 104, 69123 Heidelberg (Deutschland)

[**] Wir danken C. Kiener und C. Klanner für die Unterstützung bei der Durchführung einiger Experimente.