

Enzymmodelle

Molekular geprägte Polymere mit starker Carboxypeptidase-A-Aktivität: Kombination einer Amidiniumfunktion mit einer Zink-Bindungsstelle in einem durch einen Übergangszustand geprägten Hohlraum**

*Jun-qiu Liu und Günter Wulff**

Die Herstellung von enzymähnlichen Systemen mit katalytisch aktiven Anordnungen in geeigneten Rezeptoren ist eine besondere Herausforderung. Bemerkenswerte Fortschritte bei derartigen Modellsystemen konnten mit synthetischen makrocyclischen Verbindungen, Molekülaggregaten, katalytischen Antikörpern und molekular geprägten Polymeren

[*] Prof. Dr. G. Wulff

Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf (Deutschland)
Fax: (+49) 211-811-5840
E-mail: wulffg@uni-duesseldorf.de

Prof. Dr. J.-q. Liu

Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials
Jilin University, Changchun, 130023 (China)

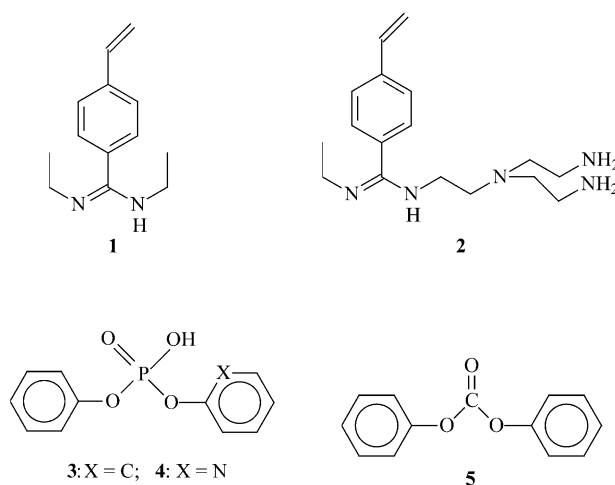
[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie gefördert. J.-q. L. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für die Vergabe eines Stipendiums. Prof. Dr. W. Kläui vom Anorganisch-Chemischen Institut unserer Universität sei für wertvolle Diskussionen gedankt.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

gemacht werden.^[1] Molekulares Prägen (molecular imprinting) hat sich als vielversprechende Methode zum Aufbau von aktiven Zentren für Enzymmodelle herausgestellt^[2] und sollte nutzbar sein, um komplexere Baumuster mit hoher Ähnlichkeit zu natürlichen Systemen aufzubauen. Um enzymähnliches Verhalten, speziell Esteraseaktivität, durch Prägen mit Übergangszustandsanaloga (TSAs) zu erhalten, wurden zahlreiche Versuche unternommen.^[3,4] Frühere Arbeiten führten zu Enzymmodellen mit nur begrenzter Wirksamkeit, in den letzten Jahren wurden jedoch bemerkenswerte katalytische Aktivitäten erzielt. Dabei sind starke Bevorzugung der Bindung des Übergangszustandes und korrekt eingeführte funktionelle Gruppen notwendige Voraussetzungen zum Aufbau effektiver Enzymmodelle.^[1–4] Bei unseren früheren Versuchen zum Aufbau katalytisch aktiver Polymere durch molekulares Prägen ordneten wir funktionalisierte Monomere mit Amidiniumgruppen in geprägten Hohlräumen an. Die Gruppen dienten als Bindungsstellen für den tetraedrischen Übergangszustand der basischen Ester- oder Carbonathydrolyse, ähnlich der Rolle von Guanidiniumfunktionen in katalytischen Antikörpern^[1c] und in der Carboxypeptidase A.^[5] An der katalytischen Funktion von Carboxypeptidase A sind zwei Guanidiniumfunktionen und ein Zn^{2+} -Ion beteiligt. Die Guanidiniumfunktion des Arg 127 bindet das Oxyanion, das im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt als tetraedrischer Übergangszustand gebildet wird.^[6] Das Zn^{2+} -Ion koordiniert an die Reste His 69, Glu 72 und His 196 und ist entscheidend an der Katalyse beteiligt. Die Substratspezifität resultiert aus einer hydrophoben Tasche und dem Guanidiniumrest des Arg 145.^[5]

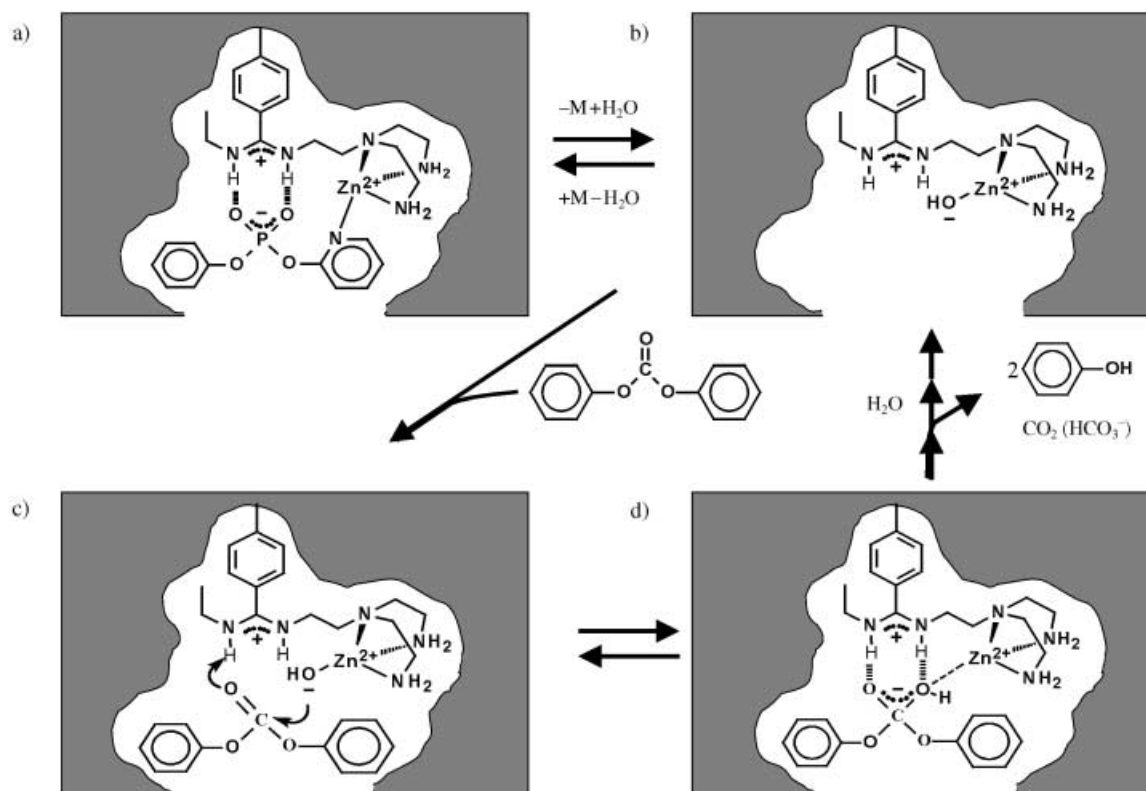
In dieser Arbeit berichten wir über ein Polymer, in dem eine Amidiniumfunktion und ein Zn^{2+} -Ion in einem Übergangszustandsgeprägten Hohlraum ähnlich angeordnet sind wie im aktiven Zentrum der Carboxypeptidase A. Derartige geprägte Polymere beschleunigen die Carbonathydrolyse stark. Wir konnten bereits früher zeigen,^[4] dass die Amidinogruppe im Monomer *N,N'*-Diethyl-4-vinylbenzamidin (**1**) spezifische Bindungseigenschaften hat und eine gute Katalysegruppe ist. Sie kann durch Komplexierung mit Carboxygruppen oder Übergangszustandsanaloga wie Phosphat oder Phosphonat durch stöchiometrisch nichtkovalente Wechselwirkungen^[7] im geprägten Hohlraum positioniert werden. Eine ähnliche Amidiniumfunktion ist im Monomer **2** enthalten. Es enthält zusätzlich eine Triamineinheit in definiertem Abstand zur Amidinogruppe. Das Triamin erlaubt eine Dreifachkoordination eines Zn^{2+} -Ions, während die vierte Koordinationsstelle des Zn^{2+} -Ions für andere Monoliganden frei bleibt.^[8] Eine Koordination des Zn^{2+} durch die Amidinogruppe ist viel schwächer.^[9] Ähnlich den früher zur Carbonathydrolyse verwendeten Matrices (z. B. **3**)^[1c,4b] sollte das neue Templat **4** als stabiles Analogon für den tetraedrischen Übergangszustand der basischen Carbonathydrolyse fungieren. Ein Phenylrest in **3** wurde in **4** durch einen Pyridylrest ersetzt, was dazu führt, dass die vierte Koordinationsstelle des Zn^{2+} -Ions durch das Pyridin-Stickstoffatom besetzt wird (Schema 1a). Die zusätzliche Koordination führt zur Bildung stabilerer Komplexe zwischen dem Monomer und dem Templat.^[10] Weiterhin werden hierdurch die Amidinogruppe und das Zn^{2+} -Ion während der vernetzenden Polymerisation



beim Prägeprozess in eine definierte Orientierung zueinander und zum Templatmolekül gebracht.

Geprägte Polymere wurden durch radikalische Initiierung bei 60 °C aus Polymerisationsmischungen hergestellt. Diese bestanden aus dem Vernetzer Ethylendimethacrylat (EDMA), Methylmethacrylat (MMA), dem funktionellen Monomer **2** und Diphenylphosphat (**3**) oder Phenylpyridylphosphat (**4**) als Templatmolekül jeweils in Gegenwart von ZnCl_2 sowie dem Lösungsmittel Acetonitril. Die Herstellung ist analog der von geprägten Polymeren aus **1** und **3**,^[4b] bei der jedoch kein Zn^{2+} zugesetzt wurde. Die Matrices wurden anschließend aus dem zerkleinerten makroporösen Polymer (Partikel von 45–125 μm) mit 0.1M Natronlauge extrahiert. Die Aktivität der geprägten Polymere und der Kontrollen wurde durch Hydrolyse von Diphenylcarbonat (**5**) in einer 1:1-Mischung des Puffers 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin]ethansulfonsäure (HEPES, pH 7.3) mit Acetonitril bestimmt. Um die Reaktionskinetik zu verfolgen, wurden in regelmäßigen Abständen Aliquote entnommen und mit HPLC untersucht, und das Reaktionsprodukt Phenol wurde quantifiziert. Die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung wurden aus der Reaktionsgeschwindigkeit bei niedrigen Umsätzen berechnet.

Die Ergebnisse der Hydrolyseexperimente mit den unterschiedlichen molekular geprägten Katalysatoren sind in Tabelle 1 wiedergegeben; Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Kontrollen. Dabei wurde die Hydrolyse in der gleichen Lösung ohne Katalysator, mit Kontrollpolymeren oder mit **2** und ZnCl_2 durchgeführt. Wie zuvor^[4] wurde die katalytische Wirksamkeit als Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit mit Katalysator zu der in reiner HEPES-Acetonitril-Lösung ($k_{\text{impr}}/k_{\text{soln}}$) definiert. Der durch das Prägen hervorgerufene Effekt (Imprinting-Effekt) ergibt sich aus dem Verhältnis $k_{\text{impr}}/k_{\text{contr}}$. In früheren Untersuchungen ergab sich durch ein Polymer, das mit dem Templatmolekül **3** und dem Monomer **1** hergestellt wurde (**P1,3**), eine 455fache Reaktionsbeschleunigung und einen Präge-Effekt von 10.7.^[4b] Das Polymer mit dem gleichen Templatmolekül **3**, das jedoch mit dem Monomer **2** und Zn^{2+} -Ionen hergestellt wurde (**PZn2,3**), beschleunigt die Reaktion um das 1800fache und hat einen Präge-Effekt von 34. Bei der Herstellung eines Polymers mit



Schema 1. Schematische Darstellung a) des molekular geprägten Polymers mit Templat **4** und Monomer **2** in Gegenwart eines Zn^{2+} -Ions, b) nach Entfernen des Templats **M** und c), d) bei der Katalyse.

Tabelle 1: Kinetische Parameter für die Hydrolyse von Diphenylcarbonat (**5**) in Gegenwart von geprägten Polymeren in Puffer (pH 7.3)/Acetonitril (1:1).^[a]

Geprägtes Polymer ^[b]	Monomer	Templat	$k_{\text{impr}} [\text{min}^{-1}]$	$k_{\text{impr}}/k_{\text{soln}}$	$k_{\text{impr}}/k_{\text{contr}}$
P1,3 ^[c]	–	1	2.80×10^{-4}	455	10.7
PZn2,3	Zn^{2+}	2	1.30×10^{-3}	1806	34.0
PZn2,4	Zn^{2+}	2	2.35×10^{-3}	3264	61.5

[a] Hydrolyse von Diphenylcarbonat (**5**) in einer Lösung von 50 mM HEPES-Puffer (pH 7.3)/Acetonitril (1:1) bei 20 °C. Es sind 2 mM aktive Zentren im Polymer im Verhältnis zu 1 mM Substrat vorhanden. Alle k -Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei Messungen mit einer Standardabweichung von weniger als 5%. k_{impr} ist die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung für die Reaktion in Gegenwart des geprägten Polymers für dieses Katalysator-Substrat-Verhältnis; k_{contr} ist die Geschwindigkeitskonstante in Gegenwart des Kontrollpolymers; k_{soln} ist die Geschwindigkeitskonstante für die Hydrolyse in HEPES-Puffer (pH 7.3)/Acetonitril (1:1). [b] Die Polymerisationsmischung zur Herstellung der geprägten Polymere bestand aus 83.3 Gew.-% EDMA, 10.4 Gew.-% MMA, 6.3 Gew.-% Monomer-Templat-1:1-Komplex und 1 Gew.-% Azobis(isobutyronitril), die mit gleichen Gewichtsanteilen des Porogens Acetonitril verdünnt waren. Das Kontrollpolymer wurde entsprechend hergestellt, allerdings ohne das Templat. Für Einzelheiten siehe Hintergrundinformationen. [c] Dieser Wert wurde aus Lit. [4b] entnommen. Er ist bei 15 °C gemessen.

Templat **4**, Monomer **2** und Zn^{2+} -Ionen (**PZn2,4**) ist im Hohlraum eine wesentlich bessere Fixierung des Templats während des Prägens möglich (Schema 1 a). Der katalytische Koeffizient dieses Polymers liegt bei über 3200, der Präge-

Tabelle 2: Kinetische Kontrollexperimente für die Hydrolyse von **5** zum einen in reinem Puffer (pH 7.3)/Acetonitril (1:1), zum anderen mit Zusatz von Kontrollsubstanzen.

Kontrolle	$k [\text{min}^{-1}]$	k/k_{soln}
kein Zusatz	7.20×10^{-7}	$\equiv 1.00$
Monomer 2 und Zn^{2+} ^[a]	1.29×10^{-5}	17.9
Kontrollpolymer und Zn^{2+}	3.82×10^{-5}	53.1

[a] Die Konzentrationen von **2** und Zn^{2+} entsprachen denen der zugänglichen Bindungsstellen im geprägten Polymer.

Effekt bei 61.5 (Tabelle 1). Die starke Beschleunigung der Reaktion stützt die postulierte Kooperativität der Amidiniumgruppe mit dem Zn^{2+} -Ion. Der Einfluss der funktionellen Gruppen des Polymers auf die Katalyse ergab sich aus der katalytischen Aktivität des löslichen Monomers **2** mit Zn^{2+} -Ionen in HEPES-Acetonitril-Lösung. Dessen katalytischer Koeffizient liegt mit 18 sehr niedrig (Tabelle 2).

Ähnlich den natürlichen Enzymen zeigt **PZn2,4** eine typische Michaelis-Menten-Kinetik. Die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration ergibt eine zunächst steigende Funktion, die in ein Plateau übergeht. Bei höheren Substratkonzentrationen, wenn alle aktiven Zentren besetzt sind, bleibt die Geschwindigkeit somit konstant; sie ist nullter Ordnung in Bezug auf die Carbonatkonzentration (Sättigungskinetik). Aus diesen Daten lässt sich die Michaelis-Konstante mit $K_m = 2.01 \text{ mM}$ und die Wechselzahl mit $k_{\text{cat}} = 0.035 \text{ min}^{-1}$ berechnen (Tabelle 3). k_{cat} ist deutlich höher als k_{impr} , das nur für ein

Tabelle 3: Daten der Michaelis-Menten-Kinetik der Hydrolyse von **5** in Gegenwart von **PZn2,4**.

K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	k_{cat}/k_{soln}
2.01 mM	0.035 min ⁻¹	17.0 min ⁻¹ M ⁻¹	6900

einziges Katalysator/Substrat-Verhältnis berechnet wurde. Mit dem Verhältnis k_{cat}/k_{uncat} wird die katalytische Aktivität von Antikörpern und natürlichen Enzymen beschrieben. Wird in unserem Fall k_{soln} für k_{uncat} eingesetzt, ergibt sich für **PZn2,4** das Verhältnis $k_{cat}/k_{soln} = 6900$. Dies ist das beste Ergebnis, das bislang für derartige Polymere erhalten wurde. **PZn2,4** übertrifft sogar deutlich katalytische Antikörper, für die im Fall der Carbonhydrolyse $k_{cat}/k_{uncat} = 810$ erhalten wurde.^[12]

In Hinblick auf den Mechanismus ist anzunehmen, dass das Zn²⁺-Ion durch drei Aminogruppen und ein Wassermolekül tetraedrisch koordiniert ist.^[13] Das zinkgebundene Wassermolekül wird durch die Amidiniumgruppe basenkatalytisch ionisiert. Es ist bekannt, dass zinkgebundene Wassermoleküle eine höhere Acidität als unkoordinierte aufweisen (Schema 1 b).^[13] In Abbildung 1 ist die Reaktions-

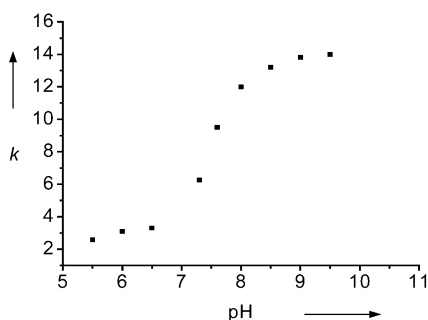


Abbildung 1. pH-Profil der Hydrolysegeschwindigkeit von **5** in Gegenwart von 1 mM aktiven Zentren von **PZn2,4** in Puffer/Acetonitril (1:1). Verwendete Puffer waren MES (pH 5.5–6.5), HEPES (pH 7.3–8.1), CHES (pH 8.4–9.5). Die Einheit von k ist 10⁻⁴ min⁻¹. MES = 2-Morpholinoethansulfonsäure, CHES = Cyclohexylaminoethansulfonsäure.

geschwindigkeit der Carbonhydrolyse in Gegenwart von **PZn2,4** gegen den pH-Wert aufgetragen. Die Kurve hat einen Inversionspunkt bei pH 7.5 und zeigt deutlich die pH-Abhängigkeit der Reaktion. Der Inversionspunkt korreliert recht gut mit den Daten über zinkgebundenes Wasser^[14] und dem durch potentiometrische Titration von **PZn2,4** erhaltenen pK_s-Wert von 7.4.

Die Katalyse verläuft über die Bindung des Substrats und eine Polarisierung der Carbonylgruppe durch die Amidiniumgruppe (Schema 1 c). Der nucleophile Angriff des zinkgebundenen OH⁻-Ions führt über einen Übergangszustand zu einem tetraedrischen Zwischenprodukt (Schema 1 d). Die Reaktion wird durch die Stabilisierung des Übergangszustandes im aktiven Zentrum beschleunigt, und die Aktivierungsenergie der Reaktion wird herabgesetzt. Nach diesem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden zwei Moleküle Phenol und ein Molekül CO₂ (als HCO₃⁻) in einer Reihe von schnellen Schritten gebildet, und der Katalysator wird regeneriert (Schema 1 b).

Dies ist der erste Bericht über einen molekular geprägten Katalysator, der eine deutlich höhere Aktivität als entsprechende katalytische Antikörper aufweist. In früheren Arbeiten^[4b] konnte die katalytische Aktivität von Antikörpern im Falle der Carbamathydrolyse^[15] erreicht werden. Für die neuen geprägten Katalysatoren ist eine vielversprechende, breite Anwendung vorhersehbar, da sie mechanisch und thermisch stabiler sind als katalytische Antikörper, leichter hergestellt werden können und in ihrer Struktur leicht variierbar sind.^[16]

Eingegangen am 2. September 2003 [Z52770]

Stichwörter: Enzymmodelle · Heterogene Katalyse · Imprinting · Polymere · Reaktionskinetik

- [1] Übersichten siehe: a) A. Kirby, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 770–790; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 707–724; b) R. Breslow, S. D. Dong, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1997–2011; c) R. A. Lerner, S. J. Benkovic, P. G. Schultz, *Science* **1991**, *252*, 659–667; d) G. Wulff, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1958–1979; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1812–1832; e) K. Mosbach, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 9–14; f) K. J. Shea, *Trends Polym. Sci.* **1994**, *5*, 166–173.
- [2] Übersichtsartikel: a) G. Wulff, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1–27; b) O. Ramstrom, K. Mosbach, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 759–764.
- [3] Für Beispiele siehe: a) D. K. Robinson, K. Mosbach, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 969–970; b) B. Sellergren, R. N. Karmalkar, K. J. Shea, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4009–4027; c) K. Ohkubo, Y. Urata, Y. Honda, Y. Nakashima, K. Yoshinaga, *Polymer* **1994**, *35*, 5372–5374.
- [4] a) G. Wulff, T. Gross, R. Schoenfeld, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2049–2052; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1961–1964; b) A. G. Strikovsky, D. Kasper, M. Gruen, B. S. Green, J. Hradil, G. Wulff, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6295–6296; c) M. Emgenbroich, G. Wulff, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4106–4117.
- [5] D. W. Christianson, W. N. Lipscomb, *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 62–69.
- [6] M. A. Phillips, R. Fletterick, W. J. Rutter, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 20692–20698.
- [7] G. Wulff, K. Knorr, *Bioseparation* **2002**, *10*, 257–276.
- [8] Zur Kooperativität von Guanidinium und Metallionen in neuen Enzymmodellen aus niedermolekularen Verbindungen: H. Haddou, J. Sumaoka, S. L. Wiskur, J. F. Anderson, E. V. Anslyn, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4186–4188; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4014–4016. Für ein Beispiel aus hochmolekularen Verbindungen siehe: B.-B. Jang, K.-P. Lee, D.-H. Min, J. Suh, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12008–12016.
- [9] Im Falle einer Guanidiniumverbindung siehe: S. Aoki, K. Iwaida, N. Hanamoto, M. Shiro, E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5256–5257.
- [10] Die Assoziationskonstante für einen 1:1-Komplex aus Monomer **2** und Templat **3** wurde in CDCl₃ durch ¹H-NMR-Titration zu 5.6 × 10³ M⁻¹ bestimmt. Für Zn²⁺-Komplexe mit dem Triaminteil von Monomer **2** wurde durch potentiometrische Titration in wässriger Lösung eine Bindungskonstante lg K von 9.3 bestimmt. Zwar konnten wir die Komplexierungskonstante von **2** mit **4** in Gegenwart von Zn²⁺ nicht direkt messen, doch ist anzunehmen, dass die Komplexierung von **2** mit **4** stärker als die von **1** mit **3** ist ($K = 4.6 \times 10^3$ in Acetonitril bei 25°C),^[7] was aus der zweifachen Bindung sowohl vom Amidiniumion zum Phosphation als auch vom Zn²⁺-Ion zum Pyridinring in Templat **4** resultiert.
- [11] Der Zinkgehalt in den geprägten Polymeren wurde durch Elementaranalyse bestimmt. Bei der Abspaltung des Templats

aus den geprägten Polymeren wurde nur ein geringer Zinkverlust beobachtet, so lag der Zinkgehalt in **PZn2,4** bei 0.84 Gew.-% vor und bei 0.82 Gew.-% nach Herauslösen des Templats.

- [12] J. W. Jacobs, P. G. Schultz, R. Sugawara, M. Powell, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2174–2176.
- [13] R. P. Sheridan, L. C. Allen, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1544–1550.
- [14] E. Kimura, T. Shiota, T. Koike, M. Shiro, M. Kodama, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5805–5811.
- [15] P. Wentworth, A. Datta, S. Smith, A. Marshall, L. J. Partridge, G. M. Blackburn, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2315–2316.
- [16] In Antikörpern können Funktionalitäten nicht einfach variiert werden; es ist beispielsweise schwierig, ein Zinkzentrum in einer definierten Orientierung durch ortsgerichtete Mutagenese in das aktive Zentrum einzuführen.