



Chemie ist ohne Katalysatoren undenkbar. Katalysatoren ermöglichen viele chemische Reaktionen erst oder beschleunigen sie zumindest kräftig. Dabei werden die chemischen Tausendsassas nicht verbraucht – sie liegen nach der Reaktion unverändert vor, was ihre zweite charakteristische Eigenschaft ist. Chemiker haben inzwischen eine Vielzahl synthetischer Katalysatoren entwickelt. Leider funktionieren diese oft nicht so effizient und umweltfreundlich, wie man es sich wünschen würde. Wie es eleganter geht, macht

zeitlicher Wirkstoffe, ein riesiger Markt mit mehr als hundert Milliarden Dollar Jahresumsatz weltweit. Wenn Chemiker das natürliche Enzym, den **Wildtyp**, auch künstlich als Katalysator einsetzen wollen, müssen sie es gezielt zweckentfremden. Das allerdings gelang ihnen bisher nur in relativ wenigen Fällen. Noch steckt die vielversprechende „Weiße Biotechnologie“ in den Kinderschuhen. Die Enzyme aus der Natur konfrontieren die Forscher nämlich mit einem massiven Problem: In der künstlichen Umgebung des Rea-

Evolution im Reagenzglas – wie Forscher an Enzymen feilen

uns die Natur vor: Enzyme halten als **Biokatalysatoren** praktisch alle Stoffwechselvorgänge im Organismus in Gang. „Sie sind die Katalysatoren des Lebens“, sagt Manfred Reetz, Direktor am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim.

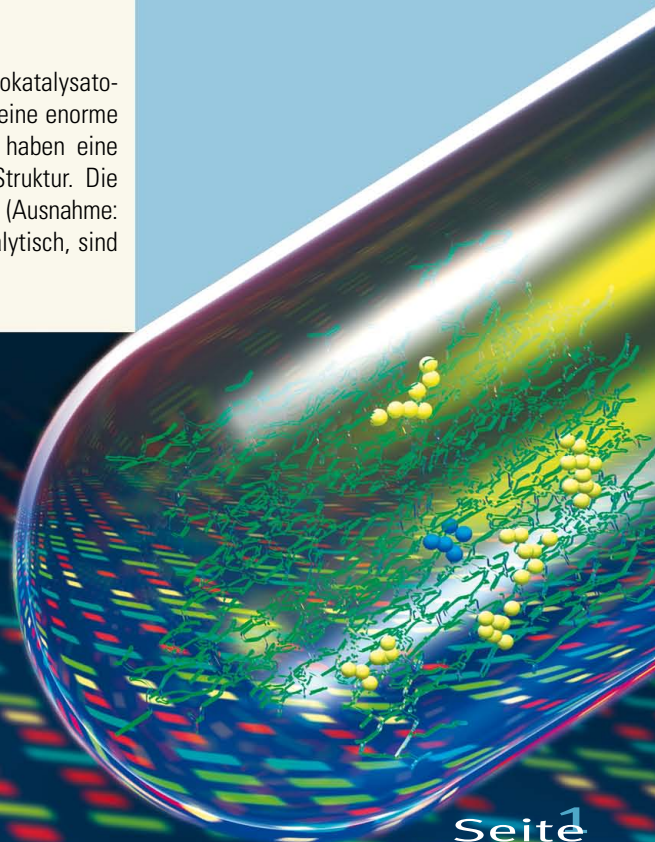
Enzyme funktionieren in Wasser, brauchen also keine giftigen Lösungsmittel, und anders als viele künstliche Katalysatoren sind sie bei Umgebungstemperatur aktiv und nicht bei einigen Hundert Grad, was viel Energie spart. Schon deshalb sind sie für die synthetische organische Chemie äußerst attraktiv. Der Griff ins reichhaltige Katalysatorsortiment der Natur liegt besonders dann nahe, wenn die Substanzen biochemisch wirksam sein sollen. Das gilt natürlich für die Herstellung pharma-

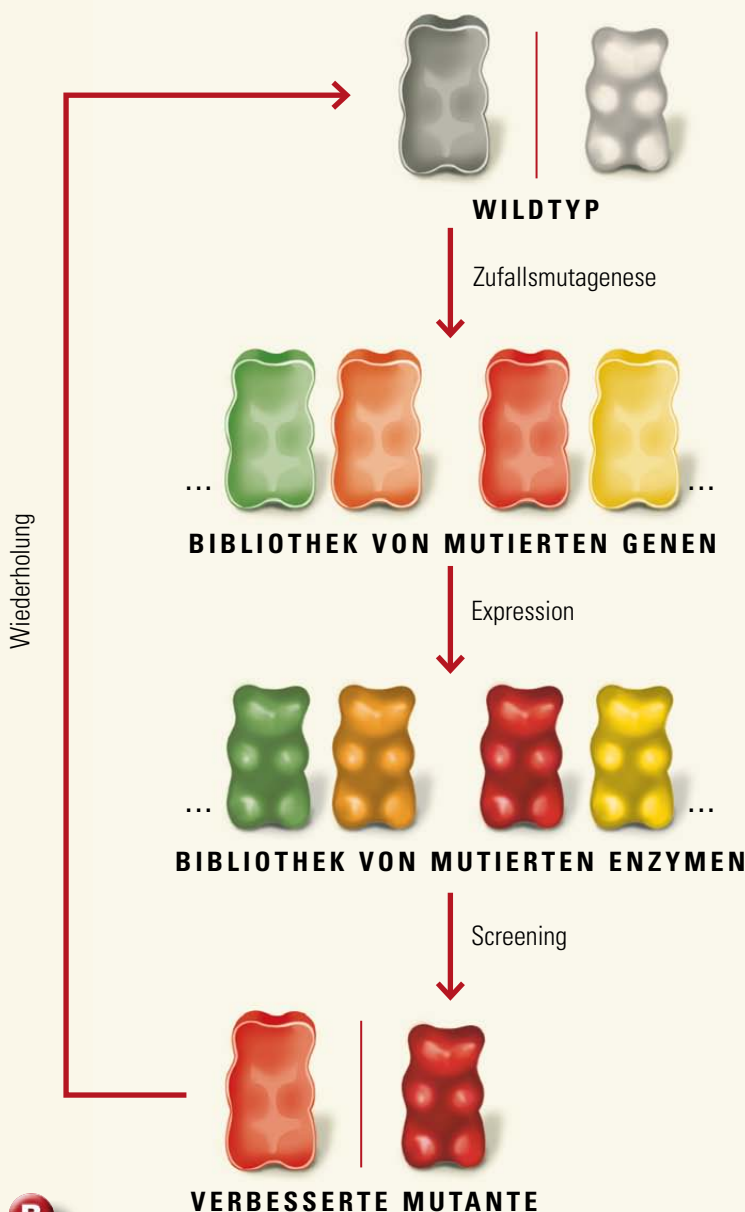
genzglases verlieren sie meist ihre katalytische Fähigkeit. Erschwerend kommt hinzu, dass die Chemiker oft nicht die biochemische Reaktion im Organismus kopieren wollen, was schwierig genug wäre. Stattdessen soll das Enzym synthetische chemische Substanzen, die von den natürlichen etwas abweichen, katalysieren können. Bei solchen synthetischen Substraten versagen aber die Wildtyp-Enzyme in der Regel.

Also müssen die Forscher ihre Biokatalysatoren chemisch umbauen. Das ist eine enorme Herausforderung, denn Enzyme haben eine äußerst komplexe molekulare Struktur. Die meisten gehören zu den Proteinen (Ausnahme: RNA-Moleküle wirken auch katalytisch, sind aber eben keine Proteine). →

A

► Ein Molekül der Wildtyp-Lipase des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*. Im Bereich mit den blau eingezeichneten Atomen befindet sich das katalytisch aktive Zentrum (die Bindungstasche), die gelb gezeichneten Atome markieren die Stellen, an denen der Austausch von Aminosäuren zu einer Mutante mit der besten Enantioselektivität geführt hat.





B

▲ Im ersten Schritt wird durch Zufallsmutagenese eine „Bibliothek“ verschiedener Gen-Mutanten vom Wildtyp-Gen erzeugt. Diese exprimieren unterschiedliche Enzym-Mutanten, die in aufwändigen Reihenuntersuchungen (Screening) auf ihre Enantioselektivität getestet werden. Die „beste“ Mutante wird dann zum Ausgangspunkt eines neuerlichen Durchlaufs – diesen Prozess bezeichnen die Forscher als gerichtete Evolution.

→ Sie bestehen aus langen molekularen Ketten, in denen sich Aminosäuren wie Perlen aneinander reihen. Zwanzig verschiedene Aminosäuren finden dabei Verwendung. Sie werden in unterschiedlicher Zahl und Reihenfolge verknüpft, und diese Kette faltet sich dann in der biologisch aktiven Form zu einem komplizierten Knäuel mit einer Vertiefung. Diese „Bindungstasche“ beherbergt das katalytisch aktive Zentrum des Enzyms. Die chemische Reaktion läuft nur ab, wenn das Substrat in diese Bindungstasche, wie ein Schlüssel in ein Schloss, hinein passt. „Dieses **Schlüssel-Schloss-Prinzip** hat Hermann Emil Fischer, der Nobelpreisträger und Gründungsvater des

Mülheimer Instituts, schon vor etwa einem Jahrhundert entdeckt“, erklärt Reetz.

Dieses „Schloss“ müssen die Chemiker so „umfeilen“, dass ihr synthetischer „Substrat-Schlüssel“ passt. Um die Bindungstasche zu verformen, tauschen sie im Molekül Aminosäurebausteine aus. Allerdings ist es nicht leicht, die Folgen dieser Eingriffe richtig abzuschätzen. Enzyme sind riesige Moleküle mit vernetzten Ketten aus Tausenden von Atomen und Elektronen, die für ihre chemischen Eigenschaften sorgen (Abb. A). Deshalb ist es extrem schwierig, die richtigen Stellen für solche Manipulationen zu identifi-

zieren. Im Idealfall sagen die theoretischen Molekülmodelle den Forschern, wo sie ansetzen müssen. „Dieses rationale Design ist etwas Wunderbares, funktioniert aber leider nur sehr selten“, sagt Reetz. Der Forscher wurde selbst oft genug davon überrascht, dass ein Umbau im Molekül, der fernab des aktiven Zentrums lag, schließlich den gewünschten Effekt brachte. In solchen Fällen pflanzt sich die Änderung wie eine Reihe fallender Dominosteine durch das Netz des Moleküls fort, bis sie die Bindungstasche erwischt.

EINE BIBLIOTHEK OHNE BÜCHER

Da die Theorie bislang nur begrenzt hilft, nehmen Chemiker wie Reetz sich die Natur zum Vorbild. In ihr dirigiert die **Evolution** die zufällige Produktion von Abweichungen in einzelnen Biomolekülen oder ganzen Organismen. Dabei entstehen **Mutanten**, die an die herrschenden Umweltbedingungen besser angepasst sind. Diese erfolgreiche Darwinistische Strategie wollen die Mülheimer Forscher im Labor nachahmen. Seit über zehn Jahren arbeiten sie an der Entwicklung von Verfahren, mit denen sie gezielt optimierte Mutanten von interessanten Enzymen erzeugen können. Dazu gehen sie in mehreren Schritten vor (Abb. B): Zuerst spannen sie den Zufall für ihre Zwecke ein, um eine „Bibliothek“ verschiedener Mutanten des Wildtyp-Enzyms herzustellen. In aufwändigen Reihenuntersuchungen (Screening) testen sie dann, wie gut diese die gewünschte Reaktion katalysieren. Aus den „guten“ Mutanten erzeugen sie wieder durch Zufallsmutationen eine verbesserte Bibliothek, die sie erneut durchtesten. Wenn es gut läuft, dann bekommen sie nach einigen solcher Generationen schließlich ein Enzym, das für die synthetische Reaktion optimiert ist.

Für ihr evolutionäres Verfahren mussten die Mülheimer Forscher sich die Methoden der Biotechnologie aneignen, also sozusagen das Reagenzglas mit der Bakterienkultur tauschen. Die Bakterien produzieren als kleine Biofabriken die veränderten Enzyme. Das ist heute eigentlich Routine, angesichts der ungeheuren Vielfalt der möglichen Mutationen bleibt die künstliche Evolution jedoch eine Herausforderung. Das zeigt das Beispiel der Lipase des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*, das auch in unserem Darmtrakt vorkommt. Dieses Enzym katalysiert die chemische Zersetzung von Fett, hilft also bei der Verdauung. Es besteht aus 285 Aminosäuren. Wollen die Forscher an allen 285 Stellen jeweils einen Aminosäurebaustein austauschen, dann müs-

sen sie – rein rechnerisch – 5415 verschiedene Mutanten durchtesten. Bei zwei auszutauschenden Aminosäuren umfasst dieser „Protein-Sequenzraum“ theoretisch schon 14 Millionen Mutanten, bei dreien explodiert er auf 26 Milliarden! Mit solchen Riesenzahlen hat die Natur kein Problem, denn für sie zählen weder Jahrmillionen noch Abermilliarden von Molekülen. Doch Menschen können im Labor höchstens mit ein paar tausend Mutanten hantieren und müssen in wenigen Jahren zum Ziel kommen. Der Mutanten-Heuhaufen ist also viel zu gigantisch, um darin völlig blind nach der richtigen Enzym-Stecknadel zu suchen. „Wir mussten effizientere Methoden entwickeln, um den Protein-Sequenzraum ganz gezielt zu durchsuchen“, erzählt Reetz, „inzwischen ist uns der Durchbruch gelungen.“

UNERWÜNSCHTE SPIEGELBILDER

Bei ihrer Forschung konzentrierten sich die Mülheimer zunächst auf eine chemische Eigenschaft, die in Natur und Industrie eine prominente Rolle spielt: die **Enantioselektivität** der Katalysatoren. **Enantiomere** sind die zwei ungleichen Geschwister eines Moleküls, von denen eines die spiegelbildliche chemische Struktur des anderen hat. „Man kann sie sich wie die linke und die rechte Hand vorstellen“, erklärt Reetz. Deshalb sprechen Wissenschaftler auch von Chiralität, das leitet sich vom altgriechischen Wort $\chi\epsilon\iota\rho$ (*cheir*) für Hand ab. Diese Händigkeit ist in der Natur wichtig. In der Regel bevorzugen die Biochemie in Organismen die „rechtsdrehende“ Konfiguration. Sogar unsere Nase kann mit ihren Chemosensoren manche Enantiomere am Duft unterscheiden (**siehe Kastent**). Im Supermarkt begegnet uns das Thema zum Beispiel in Form der „linksdrehenden“ (D-) und „rechtsdrehenden“ (L-) Milchsäure im Joghurt. Chemiker wie Reetz bevorzugen dafür allerdings die Bezeichnungen *R*- und *S*-Enantiomer. Auch 19 der 20 Aminosäuren, die die Enzyme aufbauen, sind chiral. Deshalb katalysieren viele Enzyme selektiv nur ein Enantiomer des Substrats und lassen das



C

▲ Im Labor überträgt ein Roboter die Bakterienkolonien auf Mikrotiterplatten.

andere unverändert. Das Enzym funktioniert quasi wie eine Gewindeschneidemaschine, die nur entweder rechtsdrehende oder linksdrehende Schrauben herstellt.

Diese Enantioselektivität hat für die Pharmaindustrie eine große Bedeutung. Ursache ist die Tragödie um das Schmerz- und Beruhigungsmittel **Contergan** in den 1960er-Jahren. Nahmen Frauen es in einem bestimmten Stadium der Schwangerschaft ein, so kamen die Kinder mit schweren Missbildungen auf die Welt. Wie sich später herausstellte, war dafür die chirale *S*-Form des Wirkstoffs Thalidomid verantwortlich. Das *R*-Enantiomer wirkte dagegen wie gewünscht, doch beide Enantiomere waren im Medikament enthalten. Heute schreibt der Gesetzgeber vor, dass immer beide Enantiomere eines neuen chiralen Wirkstoffs getrennt geprüft werden müssen. Leider produzieren synthetische Reaktionen meist ein „Racemat“, das beide Chiralitäten zu gleichen Anteilen enthält. Diese hinterher zu trennen, ist sehr schwierig. Beide Enantiomere haben nämlich fast identische chemische und physikalische Eigenschaften. Könnte die Industrie dagegen mit enantioselektiven Enzymen arbeiten, dann würde sie von vornherein nur Moleküle in der erwünschten Chiralität produzieren. Eine nachträgliche Trennung wäre gar nicht nötig.

Deshalb sind Enzyme für die Weiße Biotechnologie so attraktiv.

SPIEL MIT DEM ZUFALL

Manfred Reetz und seine Mitarbeiter haben in jahrelangen Versuchsreihen eine evolutionäre Laborstrategie entwickelt, die Enzym-Mutanten mit hoher Enantioselektivität hervorbringen kann. Der Max-Planck-Wissenschaftler erläutert das Verfahren am Beispiel der Lipase von *P. aeruginosa*. Chemisch basiert die Fettverdauung auf der Spaltung von Triglyceriden, die – sofern es sich um natürliche Fette handelt – aus einem Molekül Glycerol (früher Glycerin) und drei Fettsäuremolekülen bestehen. Die Spaltung erfolgt durch Reaktion mit Wasser, weswegen dieser Reaktionstyp Hydrolyse heißt. Um Lipase-Mutanten herzustellen, die das in der künstlichen Laborumwelt schaffen und darüber hinaus auch noch enantioselektiv wirken, arbeiten die Mülheimer Forscher, wie schon erwähnt, mit Bakterienkulturen. Über einen mehrstufigen Prozess (iterative Sättigungsmutagenese) können sie die genetische Bauanleitung für die Lipase perfekt manipulieren. Der entsprechende DNA-Abschnitt, also das veränderte Gen, wird in die Bakterien eingeschleust und dient dort als Bauanleitung für ein Enzym, bei dem nun genau an der gewünschten Stelle Aminosäure-Bausteine ausgetauscht sind.

EINE NASE FÜR RECHTS- UND LINKSDREHEND

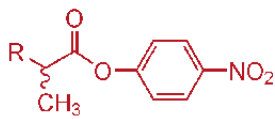
Bei manchen Molekülen kann unsere Nase „rechtsdrehend“ von „linksdrehend“ unterscheiden. Ein schönes Beispiel ist Limonen, ein Naturstoff aus der Gruppe der Terpene. Das *R*-Limonen ist optisch vom *S*-Limonen nicht zu unterscheiden, beides sind farblose Flüssigkeiten. *R*-Limonen riecht aber nach Orange, *S*-Limonen nach Zitrone. Ein anderes Beispiel sind die Enantiomere des nahe verwandten Carvon, das natürlicherweise in Kümmel und

Dill vorkommt. Tatsächlich riecht das *S*-Carvon nach Kümmel, während das *R*-Carvon einen Minzgeruch entwickelt.

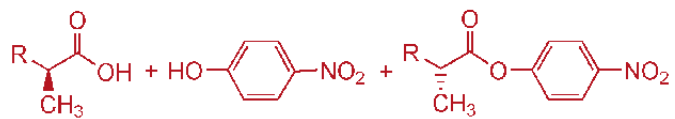
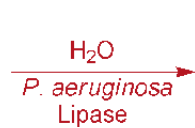
Bei einem Schulversuch empfehlen sich möglichst niedrige Konzentrationen, um die Nase nicht zu betäuben. Am besten testet man das vorher aus. Achtung: Carvon und Limonen sind Reizstoffe, detaillierte Informationen geben die Sicherheitsdatenblätter der Hersteller (zum Beispiel auf chemdat.merck.de).

Wüssten die Forscher von vornherein, welche Aminosäure sie wo austauschen müssen, wären sie schon am Ziel. Da das nicht der Fall ist, spannen sie den Zufall ein – aber eben nicht blind. Als erfahrene Chemiker können sie anhand der Molekülstruktur zumindest vermuten, wo die „heißen Stellen“ für die Eingriffe sitzen, und dafür sorgen, dass sich eben genau dort bei der Vervielfachung der DNA-Abschnitte Kopierfehler





Ester (R = $n\text{-C}_8\text{H}_{17}$)



Säure mit S-Struktur

Rest

R-Enantiomer

▲ Beide Enantiomere des chiralen Esters (links) liegen als Gemisch vor (die Bindung der CH_3 -Gruppe wird deshalb durch eine geschlängelte Linie dargestellt). Die Lipase von *P. aeruginosa* katalysiert die Hydrolyse des S-Enantiomers in die Säure mit S-Struktur (die CH_3 -Gruppe zeigt nach oben ▲) und einen Rest, das R-Enantiomer (die CH_3 -Gruppe zeigt nach unten ▾) bleibt im Idealfall unverändert (rechts).

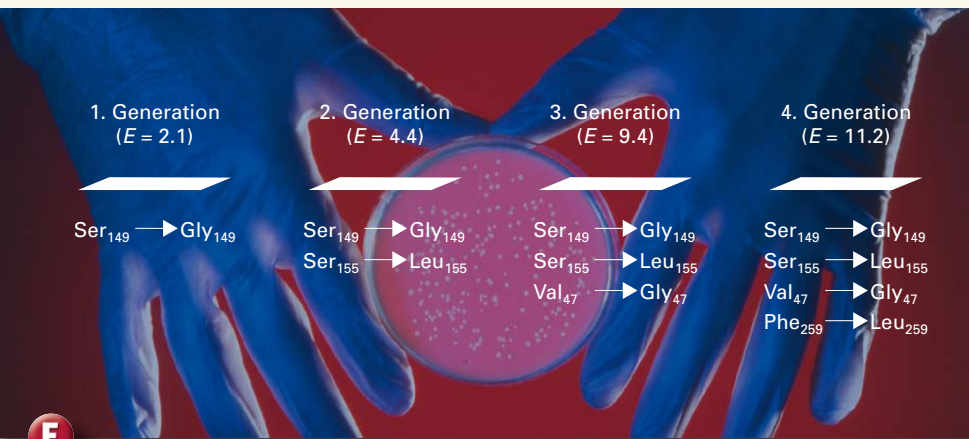
D

→ einschleichen. Das Resultat ist eine relativ überschaubare Bibliothek, die allerdings immer noch einige Tausend Mutanten umfassen kann. Haben die Forscher tatsächlich die „Hot Spots“ gefunden, dann können sie in mehreren Testreihen mutierte Enzyme erzeugen, die schon sehr effizient enantioselektiv katalysieren. „Wir kombinieren Grips mit Evolution“, sagt Reetz, „und bekommen so eine gerichtete Evolution.“

det. Aus ihnen gewinnen die Forscher nun eine Bibliothek mit mutierten Lipasen und testen diese durch. Das Ziel der Chemiker: Die Lipase soll möglichst nur das S-Enantiomer des chiralen Esters in die Säure mit S-Struktur und einen Rest zerlegen, das R-Enantiomer soll möglichst lange unverändert bleiben (Abb. D). Tatsächlich wird auch das R-Enantiomer im Reagenzglas gespalten, aber seine chemische Umsetzung läuft viel

spalten ist. An ihr können die Forscher sehen, wie gut die betrachtete Enzym-Mutante arbeitet. Die UV-Durchleuchtung lässt sich elegant automatisieren, um viele Proben gleichzeitig zu prüfen – **Hochdurchsatz-Screening** nennen die Forscher das. Und das ist wichtig, denn die gerichtete Evolution bringt nur dann einen Vorteil, wenn sich die vielen Mutationen auch schnell durchtesten lassen.

Manfred Reetz und seine Gruppe haben an einigen Beispielen zeigen können, dass die gerichtete Evolution im Reagenzglas funktioniert. Bei der Lipase von *P. aeruginosa* konnten sie in nur vier Generationen die Enantioselektivität auf einen Selektivitätsfaktor von 11,2 steigern (Abb. E), bei weiteren Experimenten mit insgesamt 80.000 Bakterienkulturen sogar über den kritischen Wert von 50. Bei anderen Enzymen haben die Mülheimer schon in fünf bis sechs Schritten Selektivitätsfaktoren über 100 erreicht. „Damit steht der Weißen Biotechnologie ein neues Werkzeug zur Verfügung“, bilanziert der Max-Planck-Forscher. Und dafür könnten sich in Zukunft noch ganz andere Leute interessieren.



E

▲ Der Austausch der Aminosäure-Bausteine an vier Stellen erhöht innerhalb von vier Generationen die Enantioselektivität der Lipase. Die tief gestellte Zahl bezeichnet die Position der Aminosäure.

Der Chemotechniker Marcus Hermes führt im Labor vor, wie es nach Einschleusen der DNA weiter geht: Die Bakterien werden auf so genannten Agarplatten ausgestrichen und wachsen dort in Kolonien heran. Nun spielt die Natur den Forschern in die Hände: Jeder Fleck auf dem Nährboden entspricht einer reinrassigen Kolonie einer einzigen Mutante von *P. aeruginosa*. Diese Kolonien werden aufgepickt und auf Mikrotiterplatten übertragen – anfangs haben Hermes und seine Mitarbeiter das mit Zahnstochern von Hand gemacht, heute übernimmt das ein Laborroboter (Abb. C). Die Mikrotiterplatten haben über 9000 winzige Näpfchen mit Nährlösung, in denen sich jeweils eine Mutante von *P. aeruginosa* befin-

langsamer als beim S-Enantiomer – für praktische Anwendungen sollte das S-Enantiomer fünfzigmal schneller zerlegt werden als das R-Enantiomer. Dieses Verhältnis der Geschwindigkeit der R- und der S-Reaktion beschreiben Chemiker mit dem Selektivitätsfaktor *E*. Wie können die Forscher herausfinden, was in der Testreaktion passiert ist? Immerhin müssen sie Tausende von Mutanten auf den Mikrotiterplatten analysieren. Im Fall der Lipase von *P. aeruginosa* hilft ihnen, dass der Rest, der bei der Hydrolyse des S-Enantiomers gebildet wird, im UV-Licht gelb erscheint. Die Gelbfärbung ist ein Maß dafür, welche Menge an Ester in dem untersuchten Tröpfchen der Mikrotiterplatte bereits ge-

Schlagwörter: Biokatalysator, Enzym, Wildtyp/Mutante, Schlüssel-Schloss-Prinzip, Evolution, Enantioselektivität, Enantiomere, Contergan, Hochdurchsatz-Screening
Lesetipp: BIOMAX Ausgabe 13, Sommer 2003, Anstandsdamen in der Zelle – wie Chaperone Proteine in Form bringen
Internet: <http://dc2.uni-bielefeld.de/dc2/katalyse/>
<http://www.transgen.de/gentechnik/enzyme/133.doku.html>
http://www.europabio.org/white_biotech.htm
http://www.mckinsey.com/client-service/chemicals/pdf/BioVision_Booklet_final.pdf

WWW.MAXWISSEN.DE

– der Link zur Forschung für Schüler und Lehrer

Hier finden Sie Hintergrundinformationen und didaktisches Material zu den jeweils zweimal im Jahr erscheinenden Ausgaben von BIOMAX, GEOMAX und TECHMAX. Weitere Exemplare können Sie kostenlos bestellen unter: www.maxwissen.de/heftbestellung