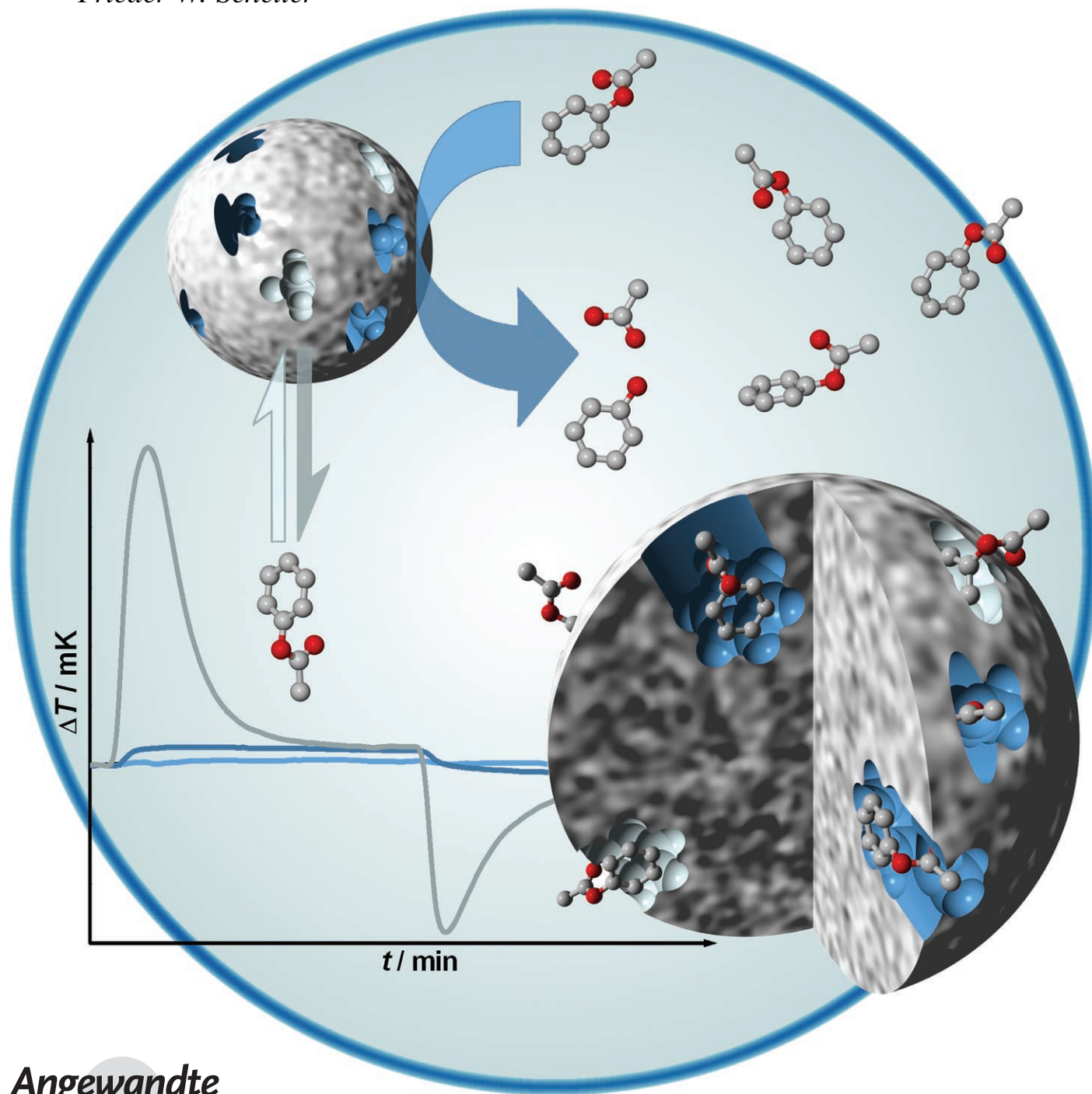


Ein bifunktionelles molekular geprägtes Polymer (MIP): Analyse von Bindung und Katalyse mit einem Thermistor**

Kristian Lettau, Axel Warsinke, Martin Katterle, Bengt Danielsson und Frieder W. Scheller*



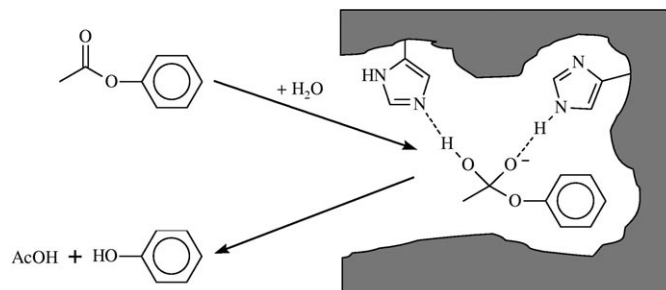
In der belebten Natur basieren Erkennungselemente auf Proteinen und Nucleinsäuren, die sowohl eine hohe chemische Selektivität als auch katalytische Aktivität aufweisen. Als Alternative zur evolutiven Erzeugung von optimalen Bindern und Katalysatoren auf der Basis von Aminosäuren und Nucleotiden wurden von den Arbeitsgruppen von Wulff, Shea und Mosbach synthetische molekular geprägte Polymere (molecularly imprinted polymers, MIPs) entworfen.^[1–3]

Wegen ihrer hohen chemischen und thermischen Stabilität und ihrer geringen Kosten haben „bio-inspirierte“ molekular geprägte Polymere das Potenzial, biologische Erkennungselemente in der Affinitätschromatographie sowie in Biosensoren und Biochips zu ersetzen. Einige Sensorkonfigurationen wurden zwar bereits veröffentlicht, der große Durchbruch steht aber noch aus.^[4,5] Ein Hindernis für Routineanwendungen ist die Signalgenerierung bei Bindung des Analyten an das Polymer. Zwar können sämtliche Markertypen von Immunassays auch bei MIP-Analyt-Wechselwirkungen angewendet werden, besonders vielversprechend sind aber direkte (markerfreie) Transduktoren.^[6–10] Vor diesem Hintergrund wurden mit geprägten Polymeren beschichtete Quarzkristall-Mikrowaagen sowie Oberflächenplasmonenresonanz-Sensoren bereits erfolgreich für die Erkennung von niedermolekularen Substanzen, aber auch von Proteinen, Viren und lebenden Zellen eingesetzt.^[11–13]

Eine weitere Möglichkeit für die markerfreie Detektion ist die Verwendung von Kalorimetern. In der Enzymtechnologie kommt der Enzym-Thermistor für diesen Zweck zum Einsatz, da enzymatische Reaktionen eine Enthalpieänderung in einer Größenordnung von ca. 5–100 kJ mol^{–1} aufweisen.^[14–16] Es wurden bereits erste Untersuchungen von MIPs mittels isothermaler Titrationskalorimetrie zur chiralen Erkennung von Phenyl- α -D/L-mannopyranosid beschrieben, und Haupt et al. haben die Nutzung von Thermistoren zur Messung von Adsorptions- und Desorptionsprozessen an molekular geprägten Polymeren vorgeschlagen.^[17–19]

Hier demonstrieren wir erstmals die Kombination eines kalorimetrischen Transduktors – des Thermistors – mit der Analyterkennung durch ein katalytisch aktives MIP. Beide Effekte, die Bindung/Desorption sowie die katalytische Umwandlung des Substrats, werden durch konzentrationsabhängige Wärmesignale widerspiegelt.

Das katalytisch aktive Polymer wurde, wie bereits beschrieben, mittels eines Phosphorsäuremonoamids (Matrize) als Übergangszustandsanalogon der Esterhydrolyse und 4-Vinylimidazol hergestellt.^[20,21] Die Polymerpartikel hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von ungefähr 40 μ m und katalysierten die Solvolyse von nicht aktivierten Phenolestern (Schema 1). Die spezifische Aktivität dieses Poly-



Schema 1. Vorgeschlagener Mechanismus der MIP-katalysierten Solvolyse des Substrats zu Phenol und Essigsäure

mers in Bezug auf 4-Nitrophenylacetat (NPA) beträgt 90 mU mg^{–1} Polymer und die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante (K_M) war 2.2 mM. Die Geschwindigkeitskonstanten (Tabelle 1) der Nitrophenylacetat-Solvolyse liegen in der

Tabelle 1: Kinetische Parameter für die MIP-katalysierte Solvolyse von Phenylacetat (PA) und Nitrophenylacetat (NPA).^[a]

		$k_{\text{obs.}}$ [min ^{–1}]	$k_{\text{unkat.}}$ [min ^{–1}]	$k_{\text{obs.}}/k_{\text{unkat.}}$	$(k_{\text{obs.}} - k_{\text{unkat.}})/k_{\text{unkat.}}$
PA ^[b]	MIP	15.83×10^{-6}	5.92×10^{-6}	2.67	1.67
	NIP	7.01×10^{-6}		1.18	0.18
NPA ^[c]	MIP	3.83×10^{-3}	0.13×10^{-3}	28.69	27.69
	NIP	1.89×10^{-3}		14.2	13.12

[a] 100 μ g mL^{–1} Polymer; [b] 500 μ M Phenylacetat; [c] 5 mM Nitrophenylacetat.

gleichen Größenordnung, wie bereits für andere esterolytische MIPs berichtet.^[22–26] Das entsprechende nicht geprägte Polymer (NIP) wurde aus derselben Monomermischung, aber ohne Templat hergestellt.

Generell sind die Geschwindigkeitskonstanten für Phenylacetat niedriger als die für NPA veröffentlichten Werte.^[23] Dies kann seine Ursache darin haben, dass das Polymer ursprünglich für die Solvolyse von NPA konzipiert wurde und NPA außerdem leichter hydrolysierbar als PA ist.^[23] Als Substrat für die Messungen im Thermistor wurde Phenylacetat verwendet. Dieses Substrat hat eine geringere Eigenhydrolyse als der entsprechende Nitrophenylester, es ist in Puffer mit 10 % Methanol in millimolaren Konzentrationen löslich und zeigt keine Produktinhibition im Bereich der erwarteten Produktkonzentration, wie sie für andere Substrate beschrieben wurde.^[27]

Für den Vergleich des esterolytischen Polymers mit einem Enzym untersuchten wir die katalytische Spaltung von Phenylacetat durch Esterase, die zuvor an aminopropylfunktionalisiertem porösem Glas immobilisiert worden war.^[28] Die Messungen im Thermistor erfolgten in einem Durchflussre-

[*] Dipl.-Biochem. K. Lettau, Dr. habil. A. Warsinke, Dr. M. Katterle, Prof. Dr. F. W. Scheller
Institut für Biochemie und Biologie
Universität Potsdam
Karl-Liebknecht Straße 24–25, 14476 Golm (Deutschland)
Fax: (+49) 331-977-5050
E-Mail: fschell@uni-potsdam.de

Dr. B. Danielsson
Department of Pure and Applied Biochemistry
Lund University
P.O. Box 124, 22100 Lund (Schweden)

[**] Die Autoren danken Dr. E. Yilmaz für seine Ideen hinsichtlich der Thermistormessungen und der IMPRS für biomimetische Systeme sowie dem BMBF (BioHyTec InnoRegio 03i1314) für die finanzielle Unterstützung.

aktor, der das immobilisierte Enzym enthält. Die Signal/Zeit-Kurve hat den typischen Verlauf, der schon früher für Enzymreaktionen beschrieben wurde (Abbildung 1), d.h. eine stationäre Wärmeentwicklung bei der katalytischen

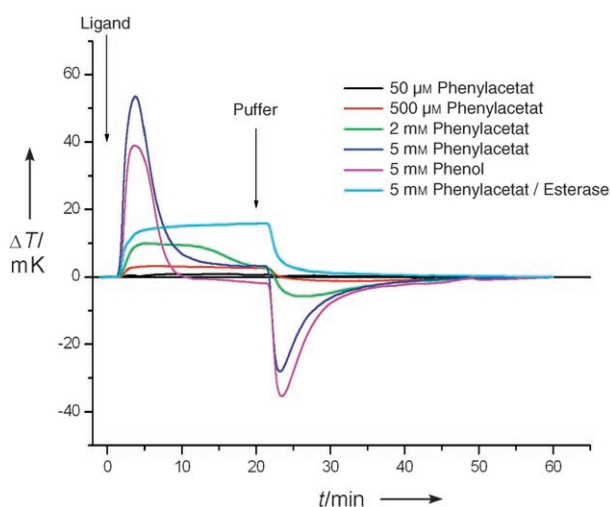


Abbildung 1. Thermistor-Signal für die MIP-katalysierte Reaktion bei verschiedenen Phenylacetatkonzentrationen sowie bei 5 mM Phenol und für immobilisierte Esterase mit 5 mM Phenylacetat. Substratfluss bei 0 min, Start des Waschens bei 20 min. 20 mM Natriumphosphat-puffer (pH 7.5)/10% Methanol.

Reaktion.^[14] Peaks traten weder nach Substrat- noch nach Pufferinjektion auf, was darauf hindeutet, dass keine messbare Wärme durch Adsorptions- und Desorptionsprozesse entsteht. Dies ist begründet durch die hydrophile Oberfläche der Partikel nach der Funktionalisierung mit der Esterase. Im Bereich von 0.5 bis 5.0 mM Phenylacetat wurde eine lineare Abhängigkeit des Signals für den stationären Zustand beobachtet. Die Bestimmung der Phenolkonzentration mithilfe einer Tyrosinaselektrode ergab einen Umsatz von nahezu 100%.

Zum Testen der Polymere wurden je 150 mg MIP oder NIP in einen 500-μL-Reaktor gefüllt. Analog zur Esterase zeigt das geprägte Polymer (Abbildung 1) für niedrige Phenylacetatkonzentrationen ein konzentrationsabhängiges Plateau, das über mehr als 20 min konstant bleibt. Eine Sättigung dieses „stationären Zustandes“ der katalytischen Reaktion erfolgt bei ca. 500 μM. Der Umsatz bei dieser Substratkonzentration liegt bei ungefähr 20%. Nach dem Umstellen auf Puffer verringert sich die Signalstärke auf die Höhe der Basislinie. Bei Konzentrationen von bis zu 5 mM Phenylacetat beobachtet man einen Peak in den ersten 10 min mit einem anschließenden Abfall des Signals auf einen Sättigungswert. Der folgende Pufferstrom generiert einen negativen Peak, der sich langsam der Basislinie annähert. Das Signal wurde auch über eine längere Zeit bei einer Konzentration von 5.0 mM Phenylacetat (Abbildung 2) aufgezeichnet. Nach dem initialen Peak bleibt das Signal bis zur Pufferinjektion über den gesamten Zeitraum auf dem Niveau des stationären Zustandes. Die Injektion resultiert wiederum in einem negativen Peak.

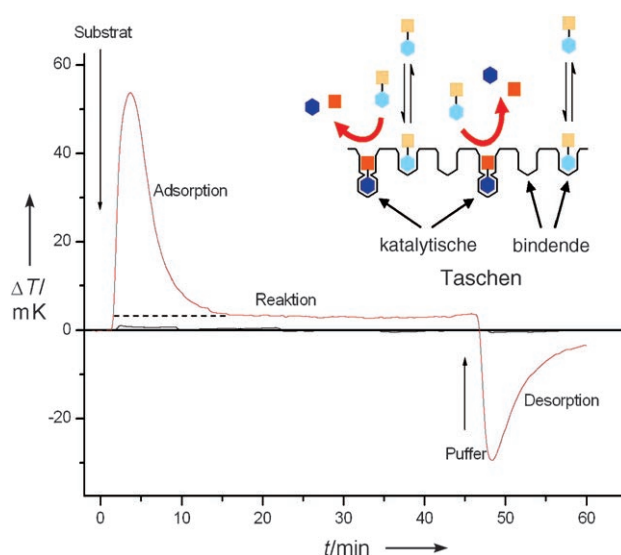


Abbildung 2. Wärmesignale der Reaktion des bifunktionellen MIP und des NIP mit 5 mM Phenylacetat. Start des Substratflusses bei 0 min und Start des Waschens mit Puffer bei 45 min. Die rote Kurve repräsentiert das MIP und die schwarze Kurve das NIP. Der Einschub zeigt die zwei verschiedenen Wechselwirkungen zwischen Polymer und Substrat im MIP bei Zeiten zwischen 25 und 45 min.

Um die Ursache des initialen Peaks bei höheren Konzentrationen zu ermitteln, wurden Messungen mit den Reaktionsprodukten – Phenol und Essigsäure – durchgeführt. Für 5.0 mM Phenol wird ein viel schärferer Injektionspeak als für 5.0 mM Phenylacetat beobachtet, der aber sehr schnell auf die Basislinie hin abfällt (Abbildung 1). Da berichtet wurde, dass Solvolyseprodukte die Substratumsetzung beeinträchtigen, wurde der Einfluss von Phenol auf die PA-Solvolyse untersucht.^[27] Experimente mit einem Laufpuffer, der 5.0 mM Phenol enthält, und Injektionen von verschiedenen Phenylacetatkonzentrationen resultierten in einer um 50% verminderten, aber noch feststellbaren Katalyse. Auch der initiale Peak war noch sichtbar, wenn auch niedriger und verbreitert. Diese Verkleinerung kann mit einer Vorbesetzung der Bindungsstellen bei einem großen Produktüberschuss erklärt werden. Da aber nur eine sehr niedrige Konzentration des Produkts erzeugt wird, das außerdem durch das verwendete Fließsystem ständig ausgewaschen wird, kann der Inhibitionseffekt vernachlässigt werden. Die Injektion von 5.0 mM Essigsäure ergab ein scharfes Signal, das sehr schnell wieder auf die Basislinie abfiel. Das konzentrationsabhängige Wärmesignal des NIP betrug hingegen für Phenylacetat und auch für Phenol weniger als 5% des entsprechenden Signals des MIP (Abbildung 2).

Da beide Polymere – MIP und NIP – aus derselben Monomermischung hergestellt wurden, können wir aus diesem Verhalten schließen, dass es sich bei den Signalen des MIP eindeutig um einen Prägeeffekt handelt. Aus der Konzentrationsabhängigkeit können wir schlussfolgern, dass es zwei Gruppen von Bindungsstellen im MIP gibt. Die Einstellung eines stationären Zustandes bei niedrigen Substratkonzentrationen ist das Resultat einer Gruppe von Bindungsstellen mit hoher Affinität, die Phenylacetat zu Phenol und Essig-

säure hydrolysieren können (Abbildung 2, Einschub). Diese Katalyse erzeugt das konzentrationsabhängige Wärmesignal über die gesamte Zeit, während der das Substrat durch den Reaktor gepumpt wird. Der Peak, der bei hohen Konzentrationen entsteht, wird durch eine zweite Gruppe von Bindungsstellen mit schwächerer Affinität verursacht, die in der Lage sind, reversibel Phenylacetat oder Phenol zu binden (Abbildung 2, Einschub). Die Signale für diese Bindungsstellen resultieren aus der Adsorption und Desorption dieser Arylreste. Nach einer bestimmten Zeit der Substratzufuhr ist ein Bindungsgleichgewicht erreicht, und das Signal fällt auf den Wert der durch die Katalyse bestimmten Wärme, bis die Waschphase beginnt. Hier wird dann ein negatives Signal beobachtet, das der endothermen Desorption des Substrates zugeordnet werden kann.

Phenylacetat wird nur von der „katalytisch aktiven Tasche“ mit einer Sättigung über 500 μM umgewandelt. Bei höheren Konzentrationen tritt eine Überlagerung durch ein Signal auf, das aus der Adsorption an nicht katalytische Bindungsstellen resultiert. Dies ist in Einklang mit der Desorption während des Waschens, die auch bei Konzentrationen $> 500 \mu\text{M}$ sichtbar ist. Kirchner et al. berichteten bereits über einen ähnlichen Effekt, bei dem die perfektesten Kavitäten bevorzugt bei niedrigen Analytkonzentrationen und die weniger perfekten Kavitäten bei höheren Konzentrationen besetzt wurden, was in zwei unterschiedlichen Bindungsenthalpien resultierte.^[19]

Mit diesem Wissen können wir nun die scheinbaren kinetischen Daten für beide Bindungsstellen bestimmen. Für die katalytische Tasche wurde das Signal bei 20 min direkt vor dem Waschen und für die bindende Tasche das Signal bei 4 min gegen die jeweils verwendete Substratkonzentration aufgetragen (Abbildung 3). Die scheinbaren kinetischen Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Mit dieser Methode konnten zum ersten Mal enzymähnliche Katalyse und antikörperähnliche Bindung an einem bifunktionellen MIP simultan beobachtet werden. Die Bifunktionalität basiert auf zwei unterschiedlichen Typen von Erkennungsstellen im MIP und kann durch die Enthalpiedifferenzen unter Verwendung eines Durchflussthermistors unterschieden werden. So ermöglichen die MIP-Thermistor-Messungen die Erfassung von zwei unterschiedlichen Ereignissen: Substratumwandlung in den katalytischen Taschen und Adsorption in den bindenden Taschen. Diese Methode ermöglicht es, markerfreie Multianalyt-Detektoren zu entwickeln sowie einen tieferen Einblick in die Wechselwirkungen zwischen polymerem Katalysator und Substrat zu erhalten, was hilfreich bei der Optimierung der Polymersynthese von Katalysatoren sein wird.

Experimentelles

Die Polymere wurden nach Lettau et al. hergestellt.^[20] Proben wurden in 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.5)/10% Methanol direkt vor der Verwendung gelöst. Fließgeschwindigkeit und physikalische Bedingungen für die Thermistormessungen: 1.0 mL min⁻¹ 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.5)/10% Methanol und eine konstante Temperatur T von 303.15 K. Die Geschwindigkeitskon-

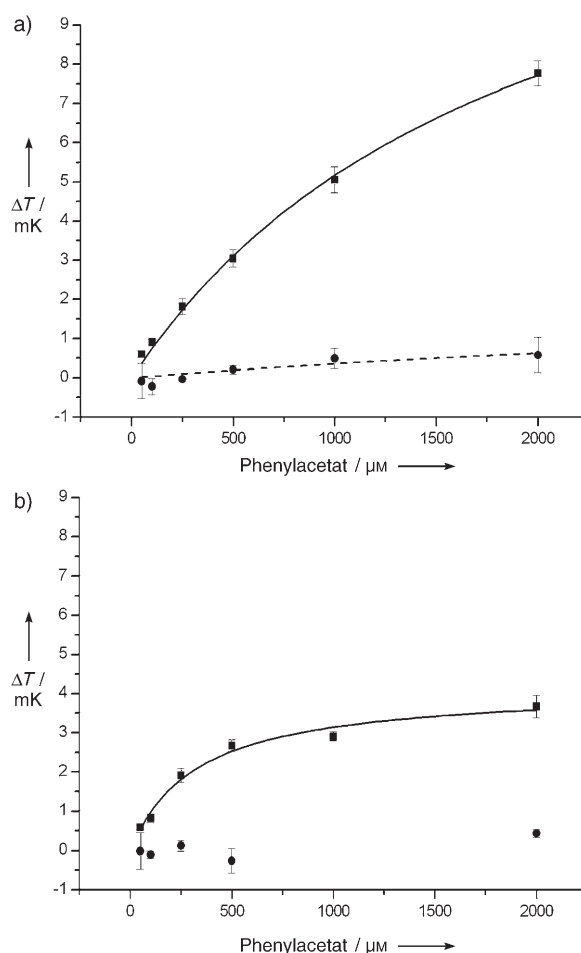


Abbildung 3. Michaelis-Menten-Auftragungen der Signale bei a) 4 min und b) 20 min. Rechtecke repräsentieren das MIP und Kreise das NIP. Fehlerbalken: Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei Messwerten.

Tabelle 2: Scheinbare kinetische Daten, gemessen im Fluss.

		ΔT_{max}	$K^{\text{[a]}}$
Signal (stat. Zustand)	MIP	$4.16 \pm 0.25 \text{ mK}$	$322.17 \pm 57.88 \mu\text{M}$
	NIP	n.b. ^[b]	n.b. ^[b]
Signal (Peak)	MIP	$15.72 \pm 0.94 \text{ mK}$	$1836.28 \pm 187.76 \mu\text{M}$
	NIP	n.b. ^[b]	n.b. ^[b]

[a] K_M für Signal (stationärer Zustand), K_D für Signal (Peak). [b] Nicht bestimmbar.

stanten wurden in 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.5)/10% Methanol bestimmt.

Eingegangen am 8. Mai 2006,
veränderte Fassung am 15. Juni 2006

Stichwörter: Biosensoren · Enzymmodelle · Kalorimetrie · Molekulare Erkennung · Solvolyse

- [1] G. Wulff, W. Vesper, R. Grobe-Einsler, A. Sarhan, *Macromol. Chem. Phys.* **1977**, 178, 2799–2816.
- [2] K. J. Shea, E. A. Thompson, S. D. Pandey, P. S. Beauchamp, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 3149–3155.

- [3] R. Arshady, K. Mosbach, *Macromol. Chem. Phys.* **1981**, 182, 687–692.
- [4] S. A. Piletsky, A. P. F. Turner, *Electroanalysis* **2002**, 14, 317–323.
- [5] F. L. Dickert, O. Hayden, P. Lieberzeit, C. Haderspoeck, R. Bindeus, C. Palfinger, B. Wirl, *Synth. Met.* **2003**, 138, 65–69.
- [6] I. Surugiu, L. Ye, E. Yilmaz, A. Dzgoev, B. Danielsson, K. Mosbach, K. Haupt, *Analyst* **2000**, 125, 13–16.
- [7] B. Sellergren, L. I. Andersson, *Methods* **2000**, 22, 92–106.
- [8] K. Haupt, A. G. Mayes, K. Mosbach, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3936–3939.
- [9] R. J. Ansell, K. Mosbach, *Analyst* **1998**, 123, 1611–1616.
- [10] E. P. C. Lai, A. Fafara, V. A. VanderNoot, M. Kono, B. Polsky, *Can. J. Chem.* **1998**, 76, 265–273.
- [11] T. Kobayashi, Y. Murawaki, P. S. Reddy, M. Abe, N. Fujii, *Anal. Chim. Acta* **2001**, 435, 141–149.
- [12] F. L. Dickert, P. Lieberzeit, O. Hayden, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 377, 540–549.
- [13] A. Kugimiya, T. Takeuchi, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, 1059–1062.
- [14] K. Mosbach, B. Danielsson, *Anal. Chem.* **1981**, 53, A83.
- [15] B. Danielsson, L. Buelow, C. R. Lowe, I. Satoh, K. Mosbach, *Anal. Biochem.* **1981**, 117, 84–93.
- [16] I. Satoh in *Chemical Sensor Technology*, Vol. 2 (Hrsg.: T. Seyama), Elsevier, Amsterdam, **1989**.
- [17] K. Haupt in *Ultrathin Electrochemical Chemo- and Biosensors*, Vol. 2 (Hrsg.: V. M. Mirsky), Springer, Berlin, **2004**, S. 23–37.
- [18] A. Weber, M. Dettling, H. Brunner, G. E. M. Tovar, *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, 23, 824–828.
- [19] R. Kirchner, J. Seidel, G. Wolf, G. Wulff, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2002**, 43, 279–283.
- [20] K. Lettau, A. Warsinke, A. Laschewsky, K. Mosbach, E. Yilmaz, F. W. Scheller, *Chem. Mater.* **2004**, 16, 2745–2749.
- [21] E. Yilmaz, K. Haupt, K. Mosbach, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2178–2181; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2115–2118.
- [22] C. G. Overberger, J. C. Salamone, *Acc. Chem. Res.* **1969**, 2, 217–224.
- [23] K. Ohkubo, Y. Urata, S. Hirota, Y. Honda, Y. Fujishita, T. Sagawa, *J. Mol. Catal.* **1994**, 93, 189–193.
- [24] K. Ohkubo, Y. Urata, S. Hirota, Y. Honda, T. Sagawa, *J. Mol. Catal.* **1994**, 87, L21–L24.
- [25] J. M. Kim, K. D. Ahn, G. Wulff, *Macromol. Chem. Phys.* **2001**, 202, 1105–1108.
- [26] J. Q. Liu, G. Wulff, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 1307–1311; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1287–1290.
- [27] G. Wulff, T. Gross, R. Schönfeld, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2050–2052; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1962–1964.
- [28] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**.