

Abschlussbericht

Reaktionstechnische Evaluierung reversibel immobilisierter Enzyme (1. Förderjahr)

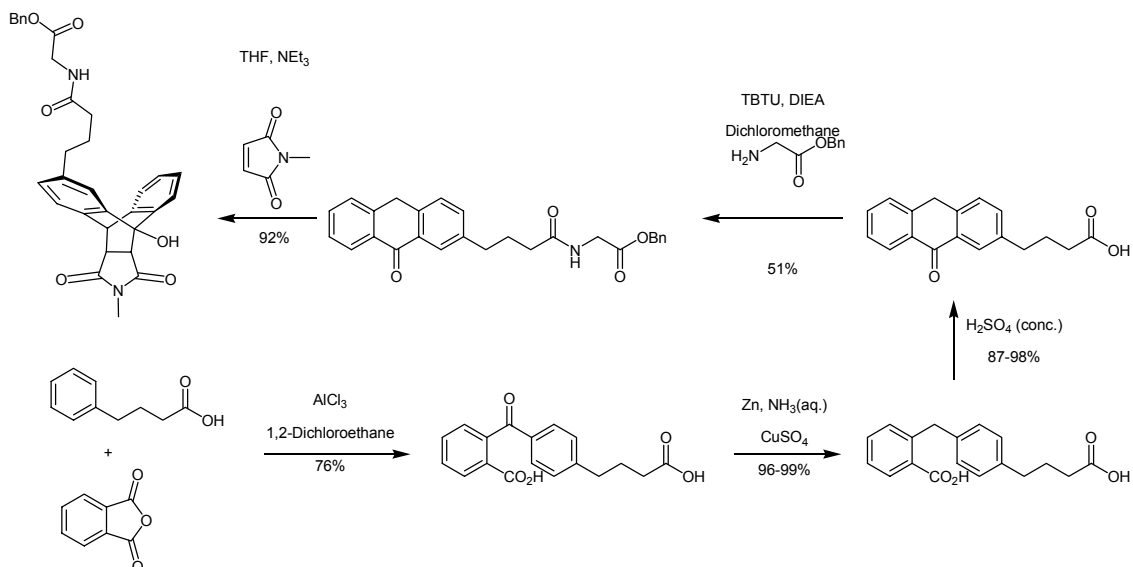
Aufgabenstellung

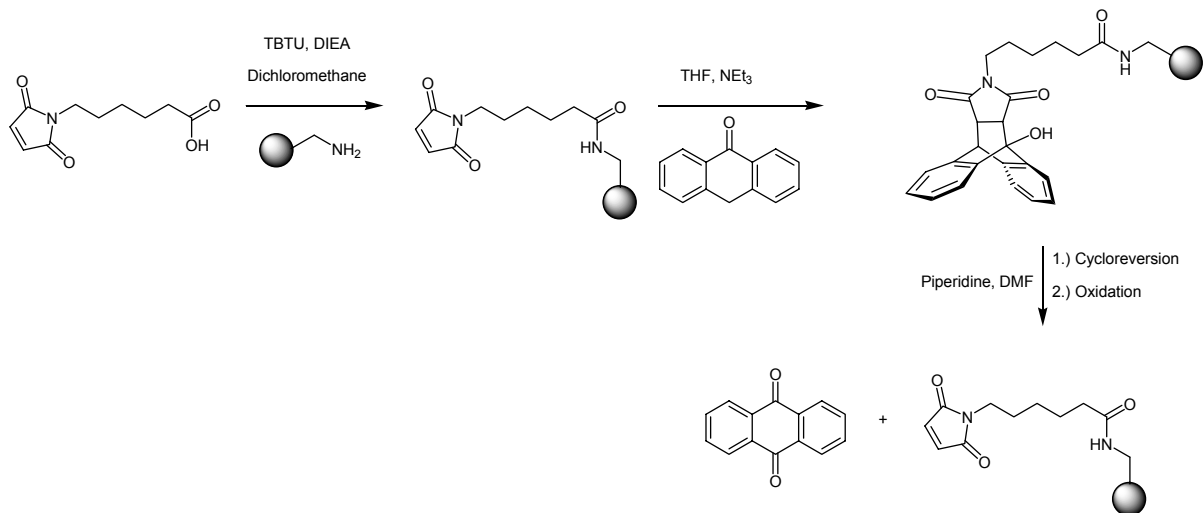
Ziel des Forschungsvorhabens ist die kovalente, reversible Immobilisierung von Enzymen an unlöslichen Trägern. Das hierzu verwendete Linkersystem soll die Reversibilität der [4+2] Cycloaddition (DIELS-ALDER Reaktion) ausnutzen.

Nach eingehender reaktionstechnischer Charakterisierung der Immobilisate hinsichtlich Aktivität, Stabilität und Diffusionslimitierung, einschließlich Kinetik, wird ihre Einsatzfähigkeit in verschiedenen Reaktortypen bei variablen Betriebsparametern untersucht werden.

Ausgangssituation

Ansätze, die Reversibilität der Diels-Alder Reaktion von Anthracenol-Derivaten für die Proteinimmobilisierung zu nutzen, wurden bereits von BANNWARTH et al. Formuliert [1]. Das Prinzip beruht auf der gut untersuchten Reaktion von Anthron mit Maleinimid und greift Arbeiten von NICOLAOU [2] und RICKBORN [3-5] auf. Allerdings wird das Prinzip der Reversibilität anhand von Modellreaktionen beschrieben und nicht die tatsächliche Immobilisierung von Proteinen.





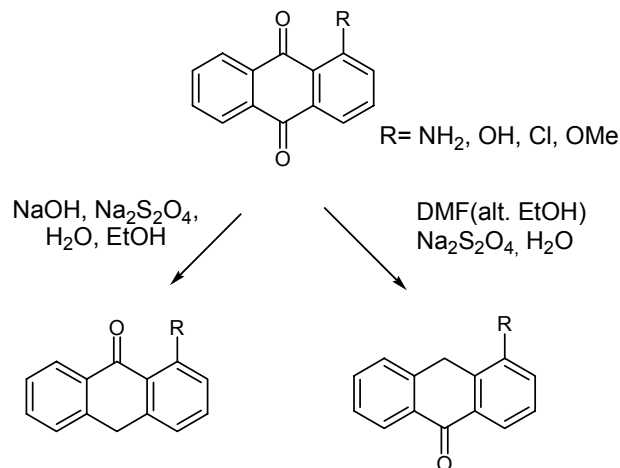
Eigenen Arbeiten

Einleitende Überlegungen

Der Ansatz von BANNWARTH bildet die Ausgangsposition, die Anthronsynthese jedoch erscheint lang und es wäre praktischer, die Enzyme mit bereits bestehenden Reaktionen aus der Proteinimmobilisierung und der Festphasenchemie anzubinden. Möglich wären die etablierten Techniken der EDC/DCC-Methode und der nucleophilen Epoxidöffnung.

Dabei gilt es die Linkersynthese zu vereinfachen und Reversibilität im echten Sinne zu gewährleisten:

Beide Vorgaben werden von in 1-Position mit Amino- oder Hydroxygruppen substituierten Anthrachinonen erfüllt. Diese lassen sich mit Natriumdithionit zu den entsprechenden Anthronen reduzieren. Abhängig von den Bedingungen reagiert die flankierte oder die isolierte Carbonylfunktion. [6, 7]



Ein potentieller Nutzen ist eher vom Produkt mit der isolierten Carbonylgruppe zu erwarten, da es aus der Literatur bekannt ist, dass eine H-Brücke zwischen Carbonylgruppe und *peri*-Substituent unter Cycloreversionsbedingungen die Umlagerung zum Michael-Addukt begünstigt.[3]

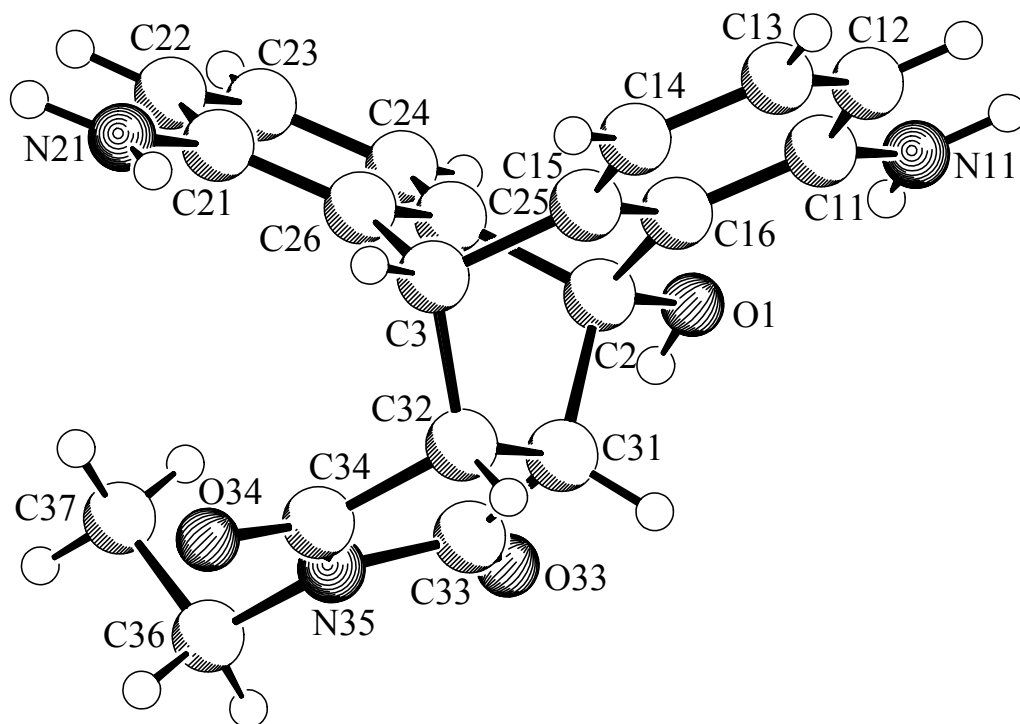
Außerdem stabilisiert eine Aminogruppe in β -Position durch Wasserstoffbrückenbindungen die Keto-Form des Anthrons. Dieser Umstand sollte einerseits die Reaktivität insgesamt herabsetzen, andererseits aber auch die Lagerungsstabilität des Reagenzes erhöhen.

In der Anfangsphase wurden einleitende Experimente mit 1,5-Diaminoanthron gemacht, da es aus der Literatur bekannt ist [6] und leicht in hoher Ausbeute hergestellt werden kann. Tatsächlich konnte 1,5-Diaminoanthron über Monate an der Luft gelagert und dabei nur sehr langsame Oxidation zum Anthrachinon beobachtet werden.

Die Reaktion verlief glatt und lieferte auch ohne Aufarbeitungsschritt ein Produkt akzeptabler Sauberkeit (CHN +/- 0.5%). In einem nächsten Schritt wurde die Diels-Alder Reaktion unter den von BANNWARTH beschriebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Dabei sind für das Diels-Alder Addukt zwei syn/anti-Diastereomere möglich, und das einfache, bzw. doppelte Michael-Addukt.

Welche genau dieser Produkte in welchem Verhältnis dabei entstehen, bleibt ungeklärt, da im DC eine Vielzahl von Reaktionsprodukten angezeigt wurde, die sehr ähnliche R_f-Werte aufwiesen. Nach einer chromatografischen Vortrennung war es

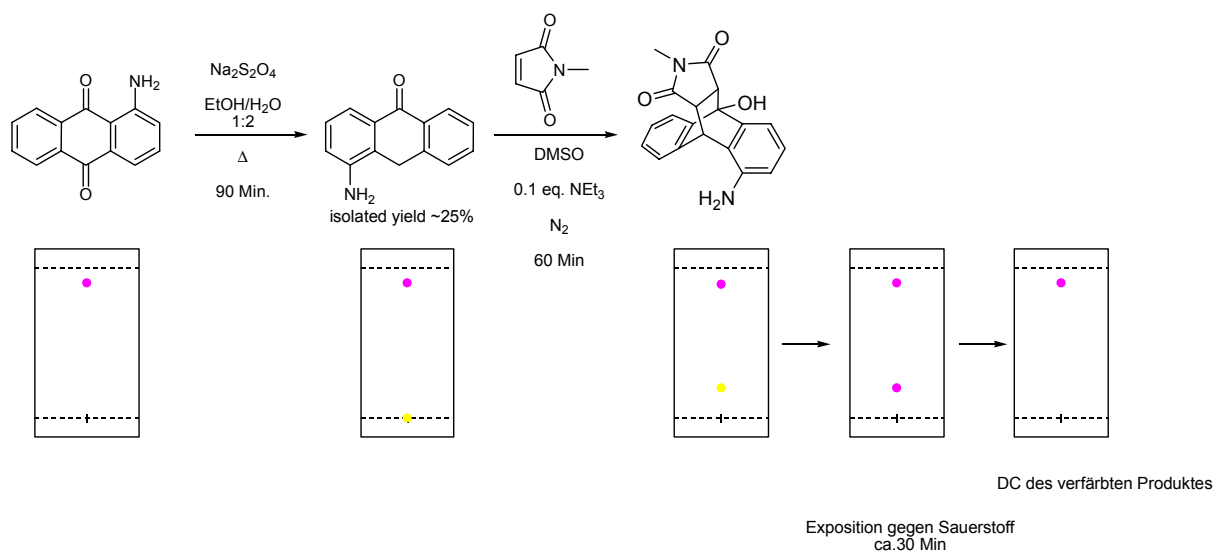
möglich, das Produkt zu kristallisieren und eine Kristallstruktur zu erhalten. Unseres Wissens ist die Struktur bislang unbekannt gewesen.



Das Produkt lässt sich **nicht** reversibel spalten.

Als Modellverbindung wird 1-Aminoanthron aus 1-Aminoanthrachinon nach der Methode von Prinz und Wiegrebe hergestellt. [7] Dabei wird die Reduktion unter neutralen Bedingungen in einem Wasser/DMF 1:1 Gemisch durchgeführt. Allerdings ist die Produktabtrennung, bzw. die Aufreinigung ein aufwendiges Unterfangen. Zudem ist es eine nicht wirtschaftliche Prozedur, da das Ausgangsmaterial pro 100g etwa 25 € kostet, die Aufarbeitung aber Lösungsmittel in mindestens demselben Wert verbraucht. Daher wurde das Verfahren dahingehend verändert, dass Ethanol als Cosolvens eingesetzt wurde, das Produkt konnte nach der Reaktion durch Filtration gewonnen werden (DC nur ein Spot). Dieser Schritt wurde durch die positiven Erfahrungen bei der Reaktionsführung im Falle des 1,5-Diaminoanthrachinon begründet. [6] Die isolierte Ausbeute lag zwar niedriger (~25%) als in der Literatur [7] (50%), jedoch rechtfertigt der deutlich geringere Aufwand, und die Einsparung von Lösungsmittel diesen Schritt. Die Reinheit wurde per DC überprüft.

Um die Umlagerung zum Michael-Addukt zu unterbinden, wurden DMSO und DMF als Lösungsmittel für die Diels-Alder Reaktion benutzt. Dabei zeigt sich, dass die Reaktion sehr schnell verläuft und die Edukte nach 5 Minuten im DC nicht mehr nachweisbar sind.



Nach wässriger Aufarbeitung und Umkristallisieren unter Argon aus *tert.*-Butylmethylether im DC erscheint wieder der Spot für das Edukt-Anthron; anhand der thermischen Reversibilität der Reaktion kann auf das Diels-Alder Addukt geschlossen werden.

Dass schon bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen die Rückreaktion vollständig ist, weist auf eine relative Instabilität der Reaktionsprodukte hin. Der Produktspot im DC verfärbt sich binnen einer Stunde von Gelb nach Rot. Dieser Farbumschlag bleibt auch bestehen, wenn man das Produkt in Puffer bei verschiedenen pH-Werten (pH-3-7.5) suspendiert.

Der Farbumschlag vollzieht sich anscheinend langsamer, ist aber dennoch nach 48 Stunden (Wochenende) vollständig. Eine wesentlich erhöhte Stabilität der Produkte im sauren Medium konnte nicht festgestellt werden. Versuche, die Stabilität des Produktes durch weniger reaktive Dienophile als N-Methylmaleinimid heraufzusetzen (Ethylacrylat und Allylethylether), sind fehlgeschlagen.

Zusammenfassung und Bewertung

Nach der ersten Evaluationsphase konnte die prinzipielle Richtigkeit der angestellten Überlegungen bestätigt werden. Aminosubstituierte Anthrone besitzen in basenkatalysierten Diels-Alder Reaktionen eine hohe Reaktivität ($T < 5$ Min.); die Reaktivität des Dienophils spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle.

Aufgrund der Instabilität der Diels-Alder Addukte, sind aminosubstituierte Anthrone für ein reversibel arbeitendes Linkersystem ungeeignet. Die Anbindungsstabilität ist zu gering, um von praktischem Nutzen zu sein.

Zudem traten im Zuge der Arbeiten eine Vielzahl von weiteren Schwierigkeiten auf; insbesondere bei der Übertragung der Reduktionsreaktion auf die feste Phase stellte die Beschaffenheit des Trägermaterials ein Problem dar. Aminomodifiziertes Glas schied aus, da es eine zu geringe Hydrolysebeständigkeit aufwies. Melamin-basierte Polymere wären eine mögliche Lösung gewesen, von der Anschaffung dieser Materialien wurde jedoch aufgrund der hohen Kosten und der Ergebnisse der Vorversuche in Lösung abgesehen.

Die Verwendung von gut verfügbaren Chemikalien als Vorstufe für einen reversibel arbeitenden Linker, und die auf dem Papier einfache Umsetzung, stellten hinreichende Motivation für das Projekt dar; jedoch erscheinen weitere Bemühungen in dieser Richtung mit Blick auf die gewonnenen Erkenntnisse wenig Erfolg versprechend.

Erschwerend kam hinzu, dass diese Arbeiten während des Umzuges der Arbeitsgruppe von Prof. Liese von der Universität Münster an die Technische Universität Hamburg-Harburg und anschließender Renovierung des Laborbereiches durchgeführt wurden und ein Großteil der Standardanalytik (GC / HPLC und NMR) während dieser Zeit nicht zur Verfügung stand.

Literatur

1. Gerspacher, C., *Entwicklung eines Linkersystems zur reversiblen Immobilisierung von Molekülen auf Oberflächen*, in *Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften*. 2004, Albert-Ludwigs-Universität: Freiburg.
2. Bunnage, M.E. and K.C. Nicolaou, *Ene-diyne generation by a retro-Diels-Alder reaction*. *Angewandte Chemie, International Edition in English*, 1996. **35**(10): p. 1110-1112.
3. Koerner, M. and B. Rickborn, *Base-catalyzed reactions of anthrones with dienophiles*. *Journal of Organic Chemistry*, 1990. **55**(9): p. 2662-72.
4. Koerner, M., *Base-catalyzed anion-accelerated Diels-Alder reactions of anthrones and reduced anthraquinones*. 1990. p. 151 pp.
5. Koerner, M. and B. Rickborn, *Anthrones as reactive dienes in Diels-Alder reactions*. *Journal of Organic Chemistry*, 1989. **54**(1): p. 6-9.
6. Bradley, W. and R.F. Maisey, *Reduction of Anthraquinone Derivatives with Alkaline Dithionite*. *Journal of the Chemical Society, Abstracts*, 1954: p. 274-278.
7. Prinz, H., W. Wiegrebe, and K. Müller, *Syntheses of Anthracenones. 1. Sodium Dithionite Reduction of peri-Substituted Anthracenediones*. *Journal of Organic Chemistry*, 1996. **61**: p. 2853-2856.