

Polymer Biotechnologie

Neue Strategien zur Entwicklung von bioresponsiven Polymeren und funktionellen Materialien

Polymer Biotechnology

Novel Approaches towards Bioresponsive Polymers and Functional Materials

Georg Gübitz

Am Institut für Umweltbiotechnologie wird an biotechnologischen Prozessen zur Entwicklung von Materialien mit interessanten Eigenschaften gearbeitet. Dabei werden Enzyme eingesetzt, um hochspezifisch und unter schonenden Bedingungen funktionelle Gruppen auf Polymeroberflächen anzubringen. Auf diese Weise entstehen intelligente Materialien, die mit biologischen Systemen in Wechselwirkung treten. Bioresponsive Polymere können einerseits kontrolliert Wirkstoffe freisetzen oder Infektionen von Wunden diagnostizieren. Andererseits werden mittels Enzymen Materialien auf Basis nachwachsender Rohstoffe wie Lignozellulose antimikrobiell oder wasserweisend funktionalisiert. In diesem jungen Forschungsgebiet sind insbesondere auch die mechanistischen Grundlagen der Wechselwirkung von Enzymen mit Polymeren Gegenstand laufender Projekte am Institut.

Bioresponsive Polymere antworten auf Änderungen in biologischen Systemen und können daher zur kontrollierten Freisetzung von Wirkstoffen oder als hochspezifische Sensoren eingesetzt werden. Letztere können die Anwesenheit von pathogenen Mikroorganismen detektieren, was im FFG-K-Projekt MacroFun untersucht wird. Immerhin kommt es bei mehr als 25 % aller chronischen Wunden zu Infektionen. Daher gibt es einen großen Bedarf an einem Diagnosesystem, das eine rasche Detektion der Wunden ermöglicht – und zwar noch vor dem Auftreten klinischer Symptome. Basierend auf dem Nachweis von Enzymen des Immunsystems haben wir im EU-Projekt Lidwine ein solches System entwickelt und patentiert. Eva Wehrschütz-Sigl und ihr Team konnten tatsächlich deutlich erhöhte Aktivitäten der von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sekretierten Enzyme wie Lysozym, Elastase oder Myeloperoxidase in infizierten Wunden nachweisen.

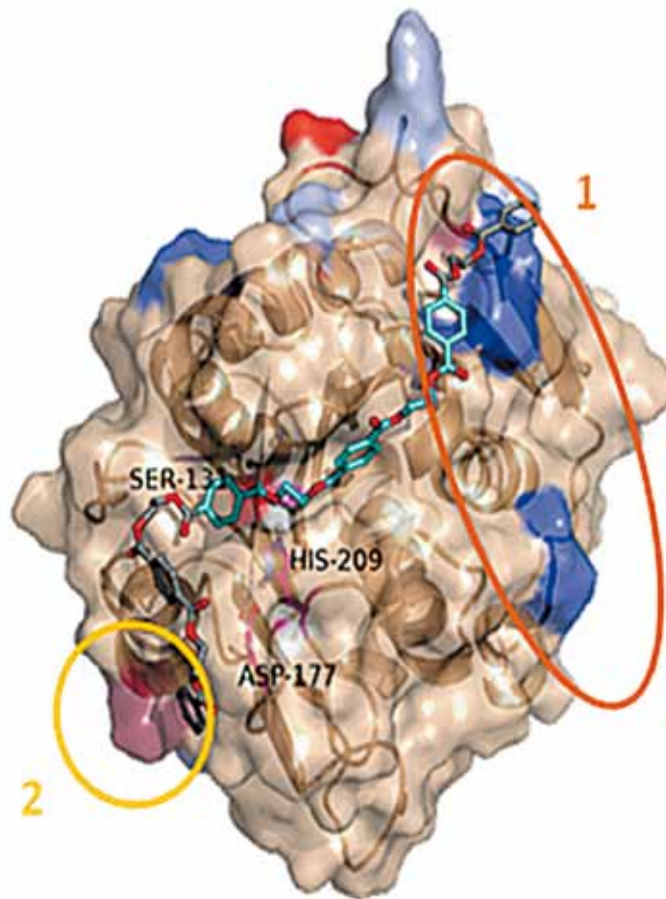
At the Institute of Environmental Biotechnology the potential of biotechnology for the construction of smart materials is being assessed. Enzymes are being used as highly specific catalysts for the selective introduction of functional groups to polymer surfaces without compromising polymer bulk properties. The resulting intelligent materials can interact with biological systems. For example, bioresponsive polymers can indicate infection in wound fluids or initiate controlled release of drugs. On the other hand, enzymes are used for permanent antimicrobial or hydrophobic functionalisation of materials based on renewable resources like lignocellulose. In this emerging research area several projects at the institute are focusing on the mechanistic investigation of enzyme – polymer interaction.

Bioresponsive polymers respond to biological systems to serve as controlled release devices or as highly specific sensors. The latter could detect the presence of pathogenic or contaminating microorganisms in wounds or in food products, respectively; something which is being investigated in the K-project MacroFun. Interestingly, infections occur in more than 25% of chronic wounds. Thus, there is a strong need for a fast prognostic aid to predict infection of a wound prior to clinical symptoms. In the human body, neutrophilic polymorphonuclear leukocytes and macrophages play a crucial role in the host defence against infections, liberating a variety of enzymes such as elastase, myeloperoxidase and lysozyme. Eva Wehrschütz-Sigl & team demonstrated together with medical doctors in the Lidwine EU project that the activity of these enzymes is considerably elevated in infected wound fluids. Consequently, bioresponsive devices were developed and patented to predict clinical infection.



Georg Gübitz beschäftigt sich am Institut für Umweltbiotechnologie mit enzymatischen Prozessen zur Funktionalisierung von nachwachsenden und synthetischen Materialien. In diesem Forschungsgebiet leitet er das FFG-K-Projekt MacroFun sowie zwei EU-Projekte.

Georg Gübitz investigates enzymatic processes for the functionalisation of renewable and synthetic materials. In this research area he currently coordinates the FFG-K project MacroFun and two European projects at the Institute of Environmental Biotechnology.



© G. Steinkellner, K. Gruber

Abb. 1: Vergleich zweier PET-hydrolysierender Cutinasen Thc_Cut2 und Thc_Cut1 aus *Thermobifida cellulolytica* mit PET als Substrat. Diese Enzyme unterscheiden sich um nur 18 Aminosäuren außerhalb des aktiven Zentrums. Die markierten Bereiche 1 und 2 weisen auf Unterschiede hinsichtlich Hydrophobizität und elektrostatischem Potenzial an der Oberfläche hin. Interessanterweise ist Thc_Cut2 bezüglich PET-Hydrolyse weitaus effizienter, was die Bedeutung der Oberflächeneigenschaften des Enzyms bei der Wechselwirkung mit dem polymeren Substrat bestätigt.

Fig. 1: Surface comparison of two isomers of the PET-hydrolysing cutinases Thc_Cut2 and Thc_Cut1 from *Thermobifida cellulolytica* with a modeled PET substrate. The enzymes are highly homologous with only 18 different amino acids outside the active site. The marked areas 1 and 2 indicate changes in surface hydrophobicity and electrostatic potential. Interestingly, only Thc_Cut2 efficiently hydrolyses PET, indicating the importance of enzyme surface properties in interaction with the polymeric substrate.

Basierend auf dieser Erkenntnis wurden nun Strategien zur kovalenten (= permanenten) Bindung von Enzymsubstraten an Polyethylenterephthalat (PET) oder Siloxane entwickelt, um eine Integration des Systems in Wundauflagen zu ermöglichen. Nach diesem Prinzip kann nun erstmals in wenigen Minuten über eine Farbänderung eine Infektion diagnostiziert werden.

Millionen von Menschen sind weltweit von Entzündungen betroffen. In der Behandlung ist der Transport von Wirkstoffen zu aktivierten Makrophagen, d. h. zum Ort der Entzündung, essenziell. Im Rahmen des EU-Projekts Nanofol realisieren wir das mit „drug delivery devices“, welche an der Oberfläche zur Erkennung durch Folsäurerezeptoren der Makrophagen mit Folsäure funktionalisiert sind. Enzyme werden als hochspezifische Werkzeuge zur Quervernetzung dieser Proteinkapseln sowie auch von Kollagen eingesetzt. Kollagen hat in der Medizintechnik ein breites Anwendungsfeld für Implantate, als Hämostyptikum, als chirurgisches Nahtmaterial oder als Matrix für die Züchtung von Gewebe. Bei der Verarbeitung von Kollagen kommt es jedoch zu einer dramatischen Verschlechterung der thermischen und mechanischen Stabilität. Bislang wurden giftige Chemikalien wie Aldehyde zu Quervernetzung von Kollagen verwendet, um diese Eigenschaften wiederherzustellen. Im Rahmen des EU-Comet-Projekts konnten wir zeigen, dass Kollagen mittels Enzymen aus der Klasse der Oxidoreduktasen

Essentially, specific substrates for these enzymes were covalently (permanently) immobilised on polymers such as polyethyleneterephthalate or siloxanes to allow integration into wound dressings. These bioresponsive polymers can indicate infection in wound fluids with simple colour reactions within minutes while future applications could involve controlled release of antibiotics. Inflammatory diseases affect millions of people worldwide. Selective targeting of activated macrophages occurring in inflammatory diseases is a major issue. In the Nanofol EU project we develop polymer based drug delivery devices which are surface functionalised with folic acid to be recognised by folate receptors of the macrophages. Enzymes are used as specific tools for cross-linking and functionalisation of these protein based devices as well as of collagen based materials. Collagen has a variety of uses in medical applications, such as suture material, non-woven hemostyptic, implant material, matrix material for drug delivery systems and in tissue engineering. However, processing of collagen leads to a dramatic loss in mechanical and thermal stability. Conventionally, toxic chemicals like aldehydes are used to recover these properties. Within the EU-Comet project we demonstrated that oxidoreductases can be used both for covalent cross-linking and functionalisation of collagens resulting in increased mechanical, proteolytic and thermal stability.

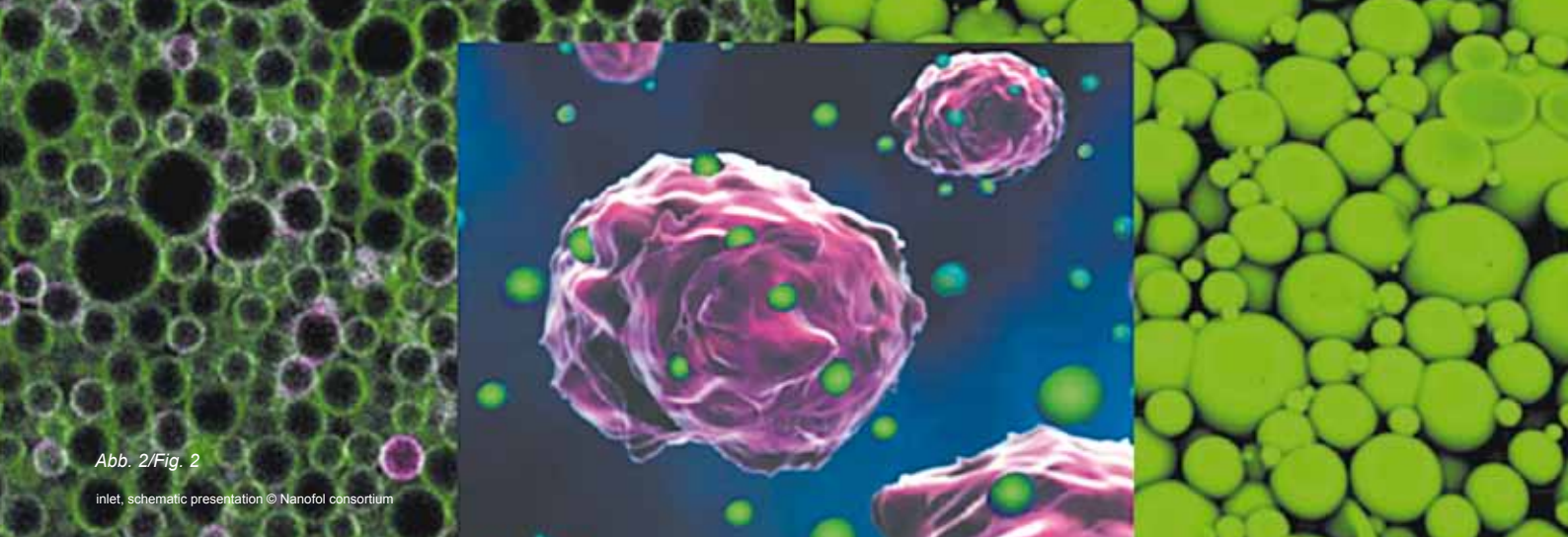


Abb. 2/ Fig. 2

inlet, schematic presentation © Nanofol consortium

sowohl quervernetzt wie auch hochspezifisch mit Peptiden funktionalisiert werden kann und somit Eigenschaften wie Temperatur- oder mechanische Stabilität verbessert werden.

Funktionalisierung von Polymeren

Eine „Biorefinery“ involviert die möglichst vollständige Umwandlung von Lignozellulose in hochwertige Produkte durch den Einsatz biotechnologischer Prozesse. In diesem Sinne gelang kürzlich die enzymatische Polymerisation von Lignosulfonaten für den Einsatz als Dispergiermittel. Dabei wurde mit analytischen Methoden wie NMR¹, PyrGC², LC-MS³ etc. die Bildung neuer C-C-Bindungen bewiesen. Enzyme ermöglichen auch die permanente (kovalente) Bindung von funktionellen Molekülen an die Oberfläche von Lignozellulose wie Gibson Stephen Nyanhongo und sein Team zeigten. Laccasen können Tannine als natürliche Biozide oder wasserabweisende Alkylamine permanent an die Oberfläche von Lignozellulose binden. Mittels NMR und LC-MS wurde bewiesen, dass diese Moleküle dabei an die Ligninbausteine Syringyl- und Guaiacylglycerol β -guaiacylether nach dem 4-O-5- bzw. 5-5-Mechanismus binden. In ähnlicher Weise werden im K2-Zentrum ACIB neue Strategien zur Oberflächenmodifikation von synthetischen Polymeren wie Polyamid, Polyethylenterephthalat (PET) oder Polyacrylonitril mittels Enzymen entwickelt, mit Anwendungen vom Elektronik- bis zum Textilsektor. Zur mechanistischen Untersuchung der neuen Enzym-katalysierten Reaktionen verwenden die Forscherinnen und Forscher um Doris Ribitsch und Enrique Herrero-Acero oligomere Modellssubstrate in Verbindung mit modernen analytischen Verfahren. Die erfolgreiche Aufklärung von Enzym – Struktur / Funktionsbeziehungen ermöglicht letztendlich über genetische Methoden eine Verbesserung bzw. „Adaption“ der Enzyme an diese nicht natürlichen Substrate.

Surface functionalisation of polymers

The “biorefinery” involves a complete transformation of lignocellulose into high-value products by using biotechnical approaches. Following this concept, enzymatic polymerization of lignosulfonates to obtain dispersants was achieved. By means of this, using analytical tools like NMR¹, PyrGC², LC-MS³ etc. the formation of novel C–C bonds was demonstrated. Gibson Stephen Nyanhongo & team has also employed enzymes to specifically bind functional molecules such as tannins as biocides or alkylamines as hydrophobic water repellent molecules onto the surface of lignocellulose materials. Covalent binding (4-O-5 / 5-5) of these molecules to the lignin structural elements syringyl- and guaiacylglycerol β -guaiacylether was demonstrated.

Similarly, novel strategies for surface functionalisation of synthetic polymers such as polyamides, polyalkyleneterphthalates or polyacrylonitriles with applications ranging from electronics to textiles are developed in Eva Ribitsch’s & Enrique Herrero-Acero’s project within the K2 Centre on Industrial Biotechnology (ACIB). All enzyme based modifications are permanent in contrast to many conventional methods due to the establishment of covalent bonds. Mechanistic investigations to elucidate novel enzyme catalyzed reactions use oligomeric model molecules combined with sophisticated analysis tools while enzyme structure / function relationships are studied to ultimately allow genetic enzyme “adaption” to these non natural substrates.

Abb. 2: 3-D (rechts) und 2-D (links) CLSM (confocal laser scanning microscopy)-Bild von Mikrosphären, hergestellt aus fluoreszenzmarkiertem (FITC) humanem Serumalbumin (HSA). Mit Fluorescent Red markierte Folsäure (lila, linkes Bild) wurde an die Mikrosphären gebunden, um eine Erkennung durch Makrophagen zu ermöglichen.

Fig. 2: 3-D (right) and 2-D (left) confocal laser scanning microscopy (CLSM)-image of microspheres produced from human serum albumin (HSA) labelled with fluorescein isothiocyanate. Folic acid labelled with fluorescent red was bound to the microspheres (pink circles, left) to allow recognition by activated macrophages.

¹ NMR: nuclear magnetic resonance Spektroskopie

² PyrGC: pyrolysis chromatography

³ LC-MS: Flüssigchromatografie mit Massenspektrometrie-Koppelung