



**Neue Einsatzmöglichkeiten von Polyphenoloxidasen
und Peroxidasen zur Synthese von Hybrid-
molekülen und Wirkstoffen und Entwicklung des
Gebiets der Kombinatorischen Biochemie**

Prof. Dr. F. Schauer, Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald





Enzyme mit Fähigkeiten zur Kopplung von Substanzen und zur Herstellung von Hybridmolekülen

- Polyphenoloxidasen
- Laccase
- Tyrosinase
- Peroxidasen
- Ligninperoxidase
- Manganperoxidase
- Meerrettichperoxidase



Laccase



ein bekanntes pilzliches Enzym
mit neuen biotechnologischen Anwendungen

Prof. Dr. F. Schauer, Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald



Vorkommen und natürliche Bedeutung der Laccase



- Zählt zum extrazellulären, ligninolytischen Enzymsystem von Weissfäulepilzen
- Erstmals im Saft des japanischen Lac-Baumes *Toxicodendron verniciflua* 1883 entdeckt
- Nachweis in Pflanzen, Insekten, Bakterien und Pilzen



Vorkommen und natürliche Bedeutung der Laccase



- Meist extrazelluläres Glycoprotein
- Ligninabbau
- Konidienfärbung bei der Morphogenese in Pilzen
- Zellwandbiosynthese in Pflanzen
- Pigmentbildung und Cuticula-Härtung bei Insekten



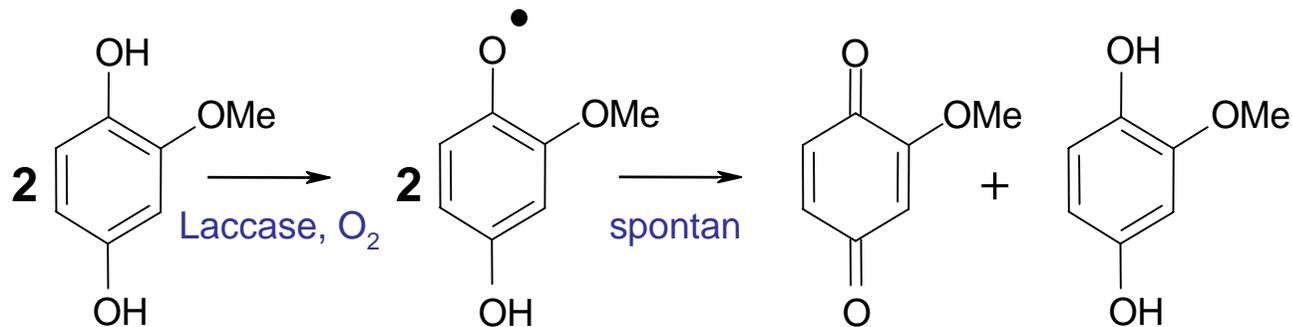
Merkmale der Laccase



- Laccase = Polyphenoloxidase (EC 1.10.3.2)
- Zur Gruppe der blauen Kupfer-Oxidasen gehörend
- Oxidation zahlreicher phenolischer Verbindungen
- Substratoxidation verbunden mit gleichzeitiger Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser
- Breites Substratspektrum
- Unterschiedliche pH- sowie Temperatur-Optima



Die Laccasereaktion - Bildung von Chinonen



Beispiel: Oxidation von Methoxyhydrochinon

1. Schritt: Bildung eines Phenoxy-Radikals
2. Schritt: nicht-enzymatische Disproportionierung unter Bildung von Methoxy- p- Benzochinon.



Anwendungsmöglichkeiten der Laccase



- Schadstoffeliminierung
- Einsatz in der Lebensmittelindustrie
- Herstellung von Verbundwerkstoffen
- Biosensor- und Diagnostik-Anwendungen
- **Biokombinatorische Reaktionen**



Am Institut für Mikrobiologie verfügbare Laccasen



Pycnoporus cinnabarinus



Trametes villosa
Trametes spec.

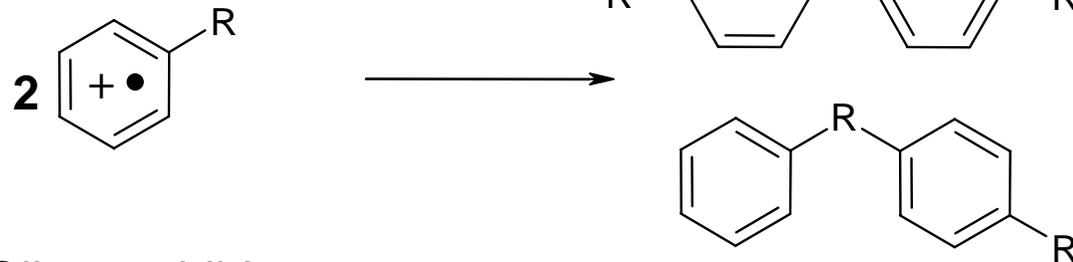
Myceliophthora thermophila



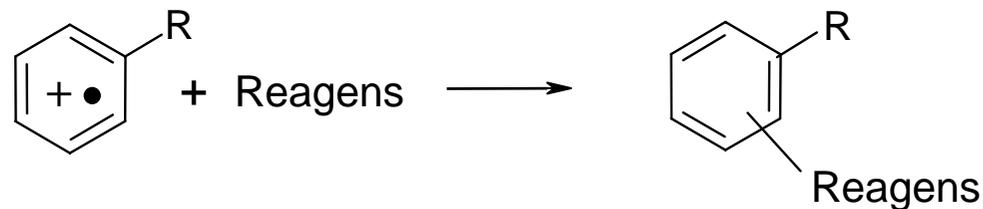
Nutzung der Laccasereaktion für eine gerichtete Produktbildung Patent PCP/EP 01/07152, 2001



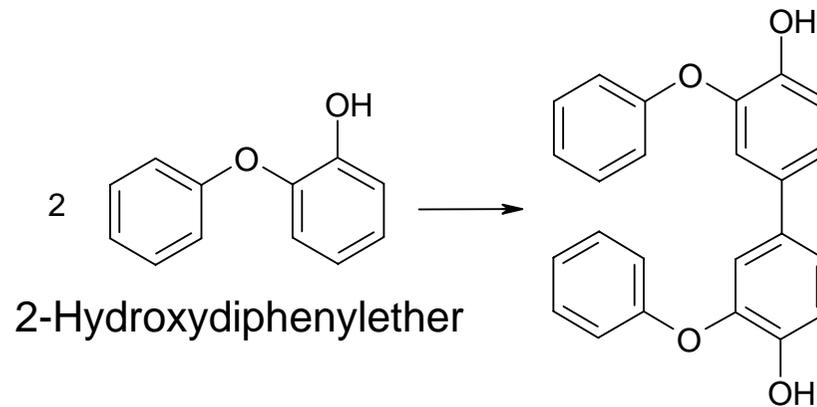
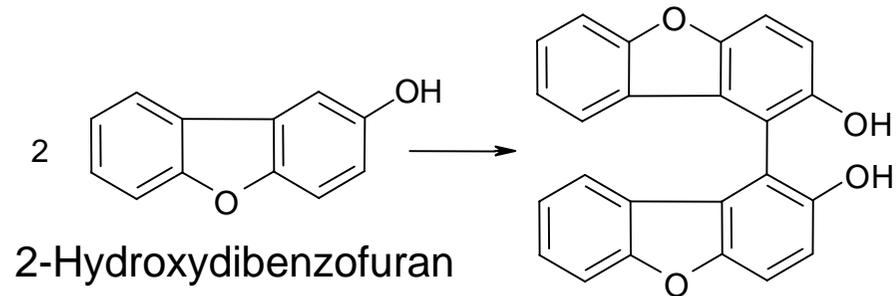
- Homologe Oligomerbildung



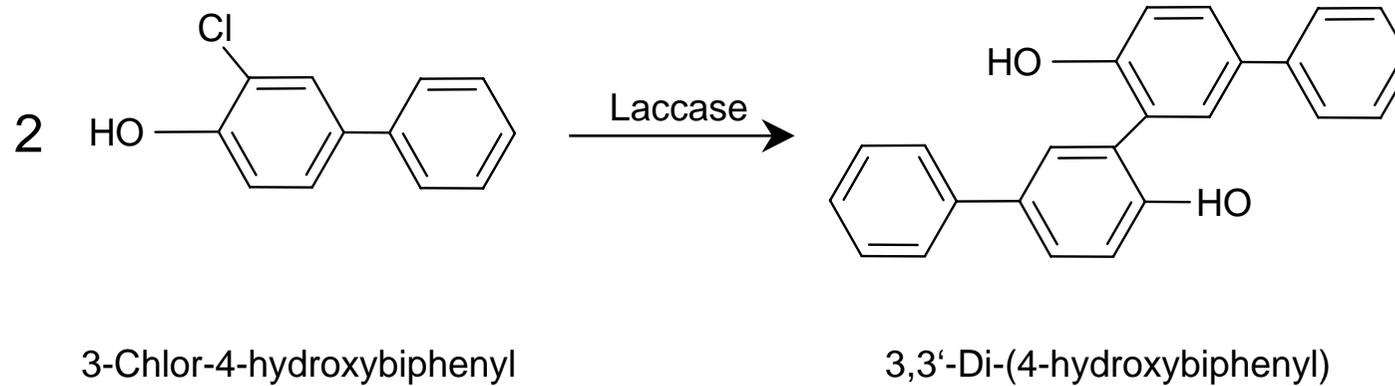
- Heterologe Oligomerbildung



Transformation von Umweltschadstoffen durch Laccase



Dechlorierung von 3-Chlor-4-hydroxybiphenyl durch Laccase

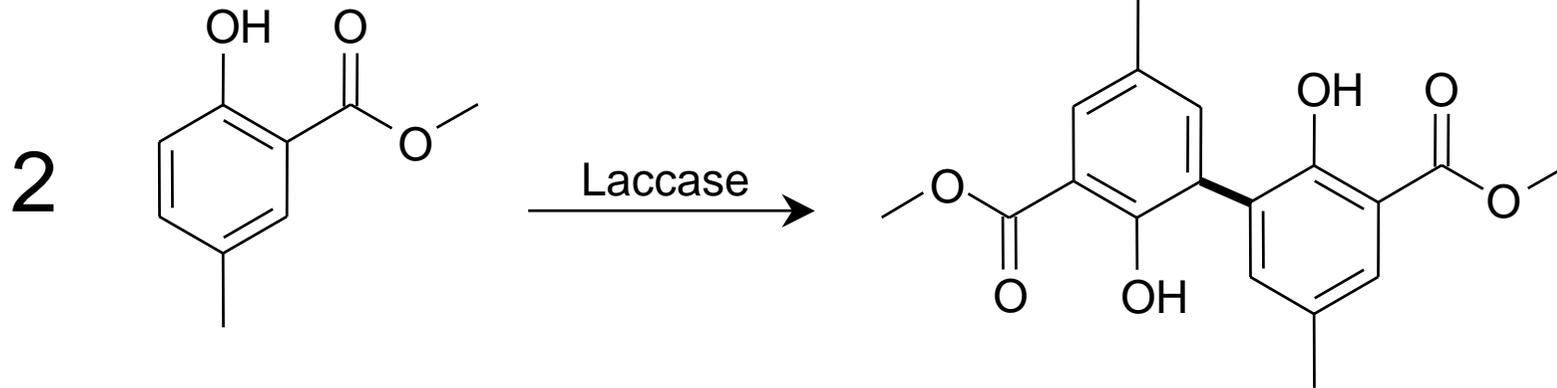


Schultz, A.; Jonas, U.; Hammer, E., ;Schauer, F. Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccase
Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001) 4377-81

Prof. Dr. F. Schauer, Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald



Beispiel einer homomolekularen Kopplung



Salicylsäure-Derivate

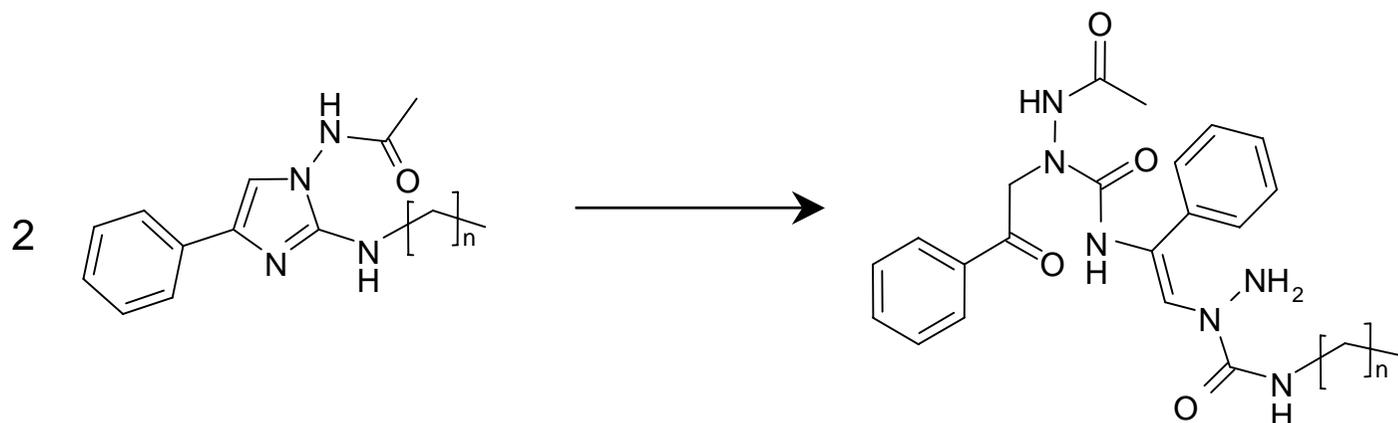
C-C-gekoppeltes
Dimerisationsprodukt

Ciecholewski, S.; Hammer, E.; Manda, K.; Bose, G.; Nguyen, V. T. H.; Langer, P.; Schauer, F. Laccase-catalyzed carbon-carbon bond formation: oxidative dimerization of salicylic esters by air in aqueous solution. *Tetrahedron* 61 (2005) 4615-4619

Prof. Dr. F. Schauer, Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald



Einsatz von Laccase in der organischen Synthese

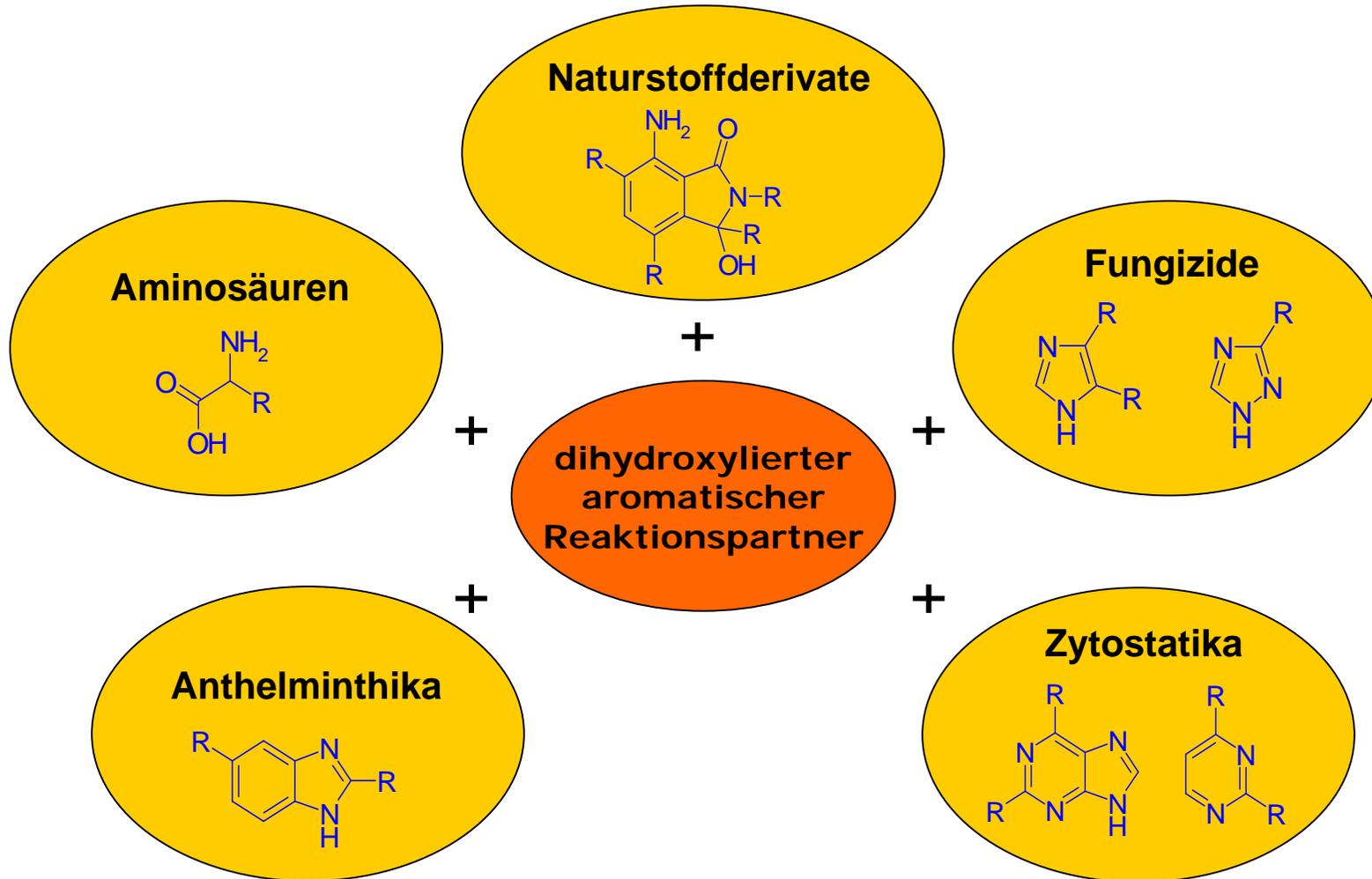


N-(2-Alkylamino-4-phenyl-imidazol-1-yl)-acetamid

Mikolasch, A.; Schauer, F.; (2003): Characterization of N-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamides in kinetic studies by using cells and laccase from *Trametes versicolor*. *J. Basic Microbiol.* 43, 508-521



Laccasevermittelte Biotransformationen



Nutzung der Laccasereaktion für eine gerichtete Produktbildung



Laccasesubstrate

- Aromaten mit 2 *ortho*-ständigen Hydroxygruppen
- Aromaten mit 2 *para*-ständigen Hydroxygruppen
- Ligninbausteine oder Biarylverbindungen mit 1 Hydroxygruppe

Reaktionspartner

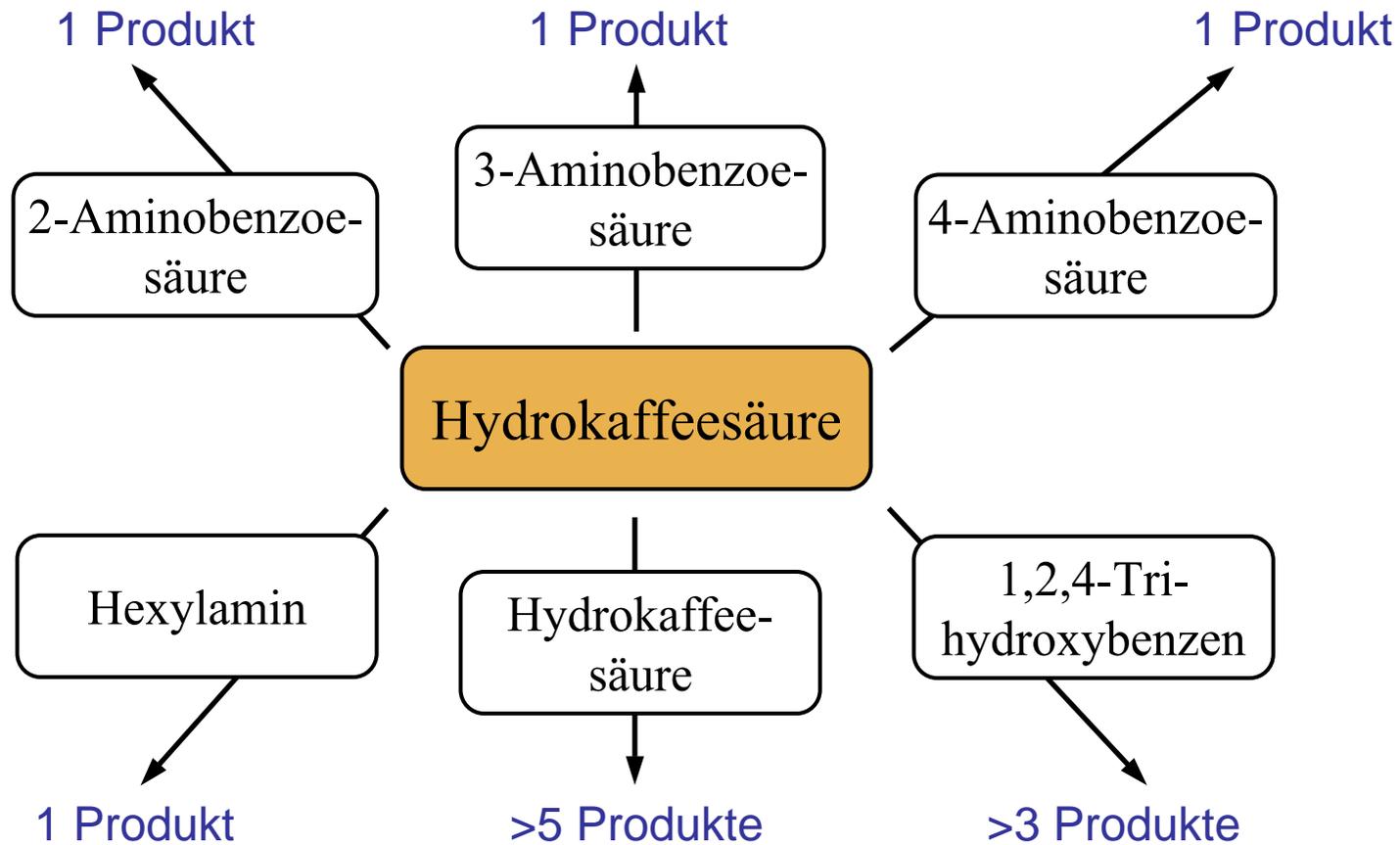
- Aromaten mit 2 *ortho*-ständigen oder 2 *para*-ständigen OH-Gruppen
- Hydroxygruppen tragende Verbindungen
- Aminogruppen tragende Verbindungen
- Thiogruppen tragende Verbindungen



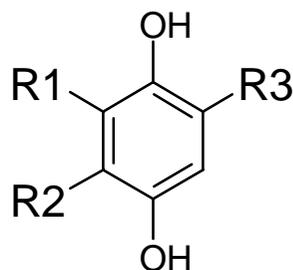
Tausende von Reaktionsmöglichkeiten über C-C, C-O, C-N und C-S- Kopplung



Beispieltransformation eines Wirkstoffes



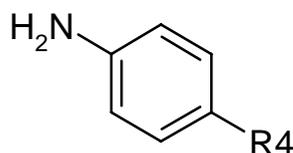
Laccase als Katalysator für eine Derivatisierung von aromatischen Aminen



2,5-Dihydroxybenzoesäurederivate

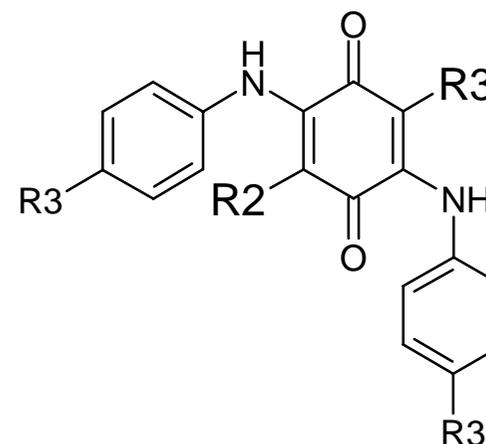
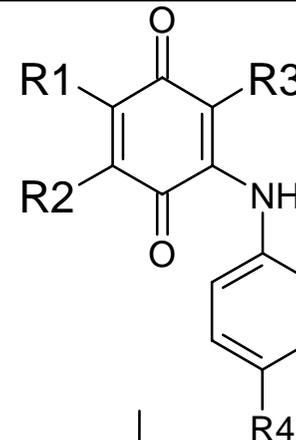
alkylierte *para*-Hydrochinone

+

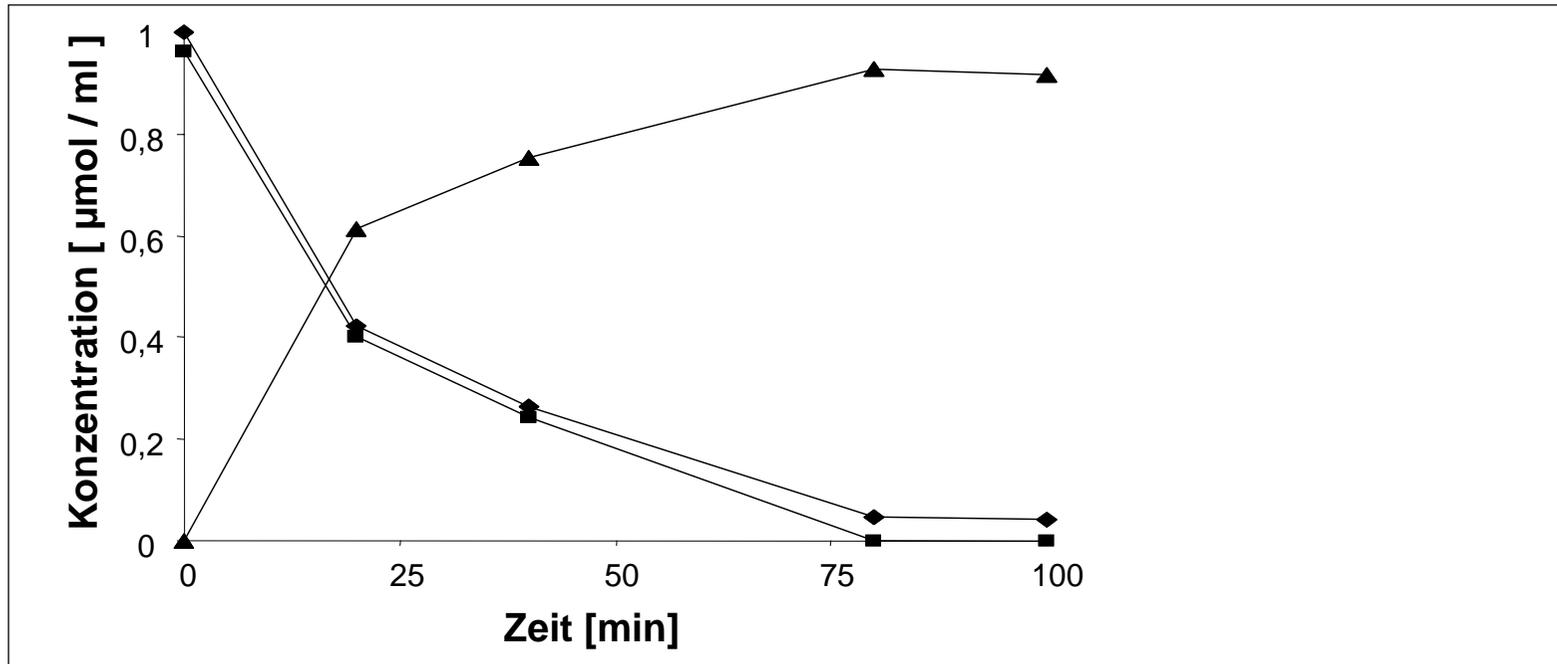


4-Aminobenzoesäurederivate,
para-substituierte Aniline

4-Aminobenzoesäurederivate,
para-substituierte Aniline



Kinetik des Laccase-vermittelten Substratverbrauchs



Substrate: 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid (■), 4-Aminobenzoesäure (◆)
Produkt: 2-(4'-Carboxy-anilino)-N-(2''-hydroxyethyl)-3,6-dioxo-1,4-cyclohexadien-1-carboxamid (▲)



Durchführung von Laccase-Umsetzungen



- Ausgangsstoffe und Laccase in entsprechenden Puffersystemen pH 5,0 oder pH 7,0, mit Substraten in Gegenwart von Sauerstoff inkubieren
- Erfassung der Produktbildung mittels HPLC (oftmais mit Farbveränderung verbunden)
- Aufarbeitung über Festphasenextraktion
- Strukturaufklärung gebildeter Produkte mittels GC, GC-MS, LC-MS-NMR-Kopplung
- Versuchsoptimierung und Maßstabsvergrößerung



Bedarf an neuen bioaktiven Substanzen



- Wirkstoff-Forschung
Medizin
Veterinärmedizin
Pflanzenschutz
- Materialwissenschaften
- Katalyse
- Kosmetik

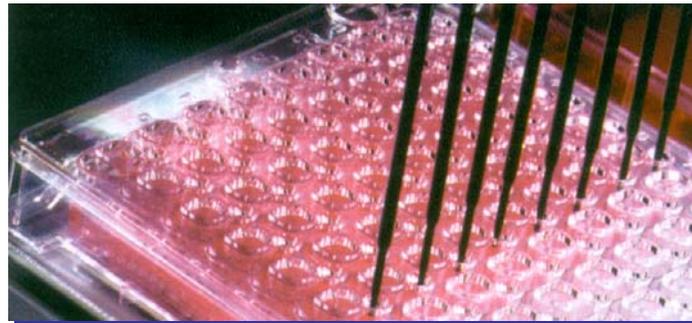


Quellen neuer Wirkstoffe

Effizienz



- Naturstoffscreening 1
 - chemische Synthese 4
 - kombinatorische Chemie 3300
 - Biotransformation 1-10
- Biokombinatorik* ca. 1000





- Biologisches Derivatisierungsverfahren für Wirkstoffe unter Einsatz des Biokatalysators Laccase
- Gewinnung des Enzyms mit breitem Substratspektrum aus Weißfäulepilzen



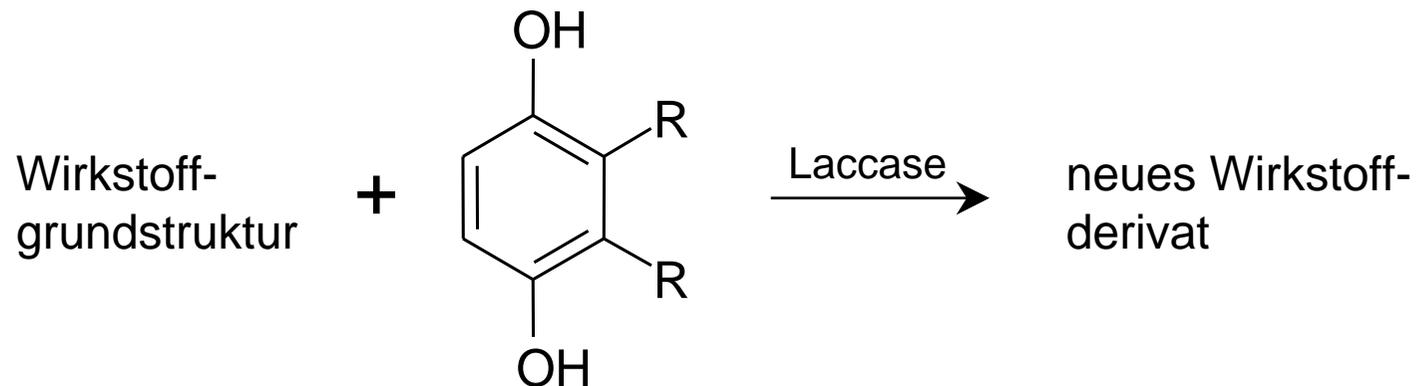
Pycnoporus cinnabarinus,
Zinnoberroter Zunderschwamm



Derivatisierung von Wirkstoffen mittels Laccase



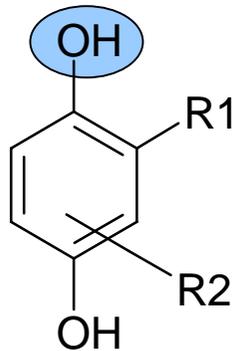
- Dihydroxylierte oder monohydroxylierte aromatische Verbindungen als Laccasesubstrat
- Radikalisierung des Substrates durch Laccasezusatz
- Reaktion des radikalisierten Laccasesubstrates mit Wirkstoffgrundstrukturen (z.B. Aminogruppen tragend)
- Entstehung eines neuen potentiellen Wirkstoffes



Laccase als Katalysator für eine Derivatisierung von Antibiotika



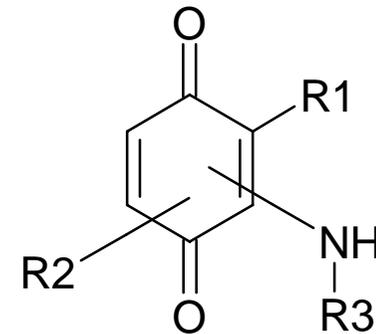
Wirkstoff A / Substrat A + Wirkstoff B \longrightarrow Wirkstoff AB



2,5-Dihydroxybenzoesäure-Derivate, alkylierte *para*-Hydrochinone



β-Lactame, Aminoglycoside



Testung der Wirkstoffeigenschaften



- Antimikrobielle Testung in vitro

gramnegative Keime: *Escherichia coli*

grampositive Keime: *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*,
Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*

- Zytotoxizität

- Antimikrobielle Wirksamkeit in vivo

Infektionsmodell „mit *Staphylococcus aureus* infizierte Maus“



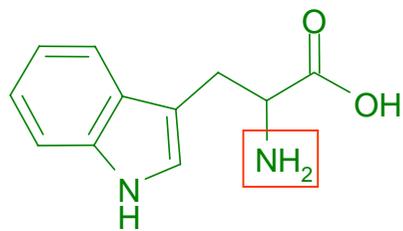
Vorteile der biokombinatorischen Derivatisierung



- Herstellung einer Vielzahl von Verbindungen innerhalb kurzer Zeit
- Breites Substratspektrum der Enzyme
- Hohe Umsatzgeschwindigkeit und Substratumsätze
- Umsatz von empfindlichen Naturstoffen möglich (RT, Normaldruck, etc.)
- Verknüpfung von Wirksubstanzen möglich
- Reaktion ohne chemische Katalysatoren, Lösungsmittel, etc.
- Leichte Enzymgewinnung, hohe Enzymstabilität

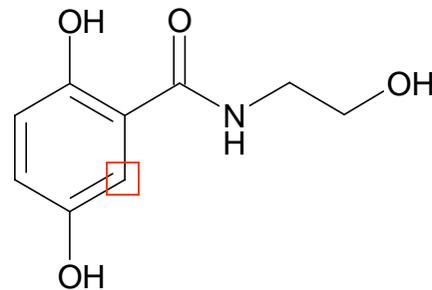


Derivatisierung von Aminosäuren mittels Laccasen

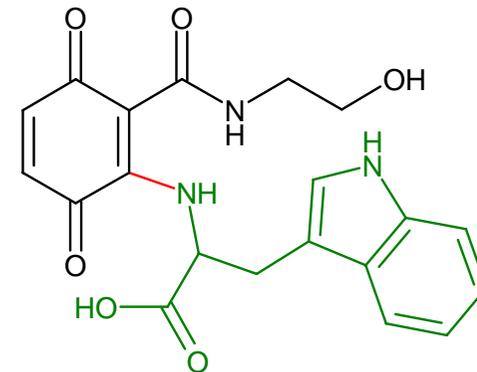


L-Tryptophan

+



2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid



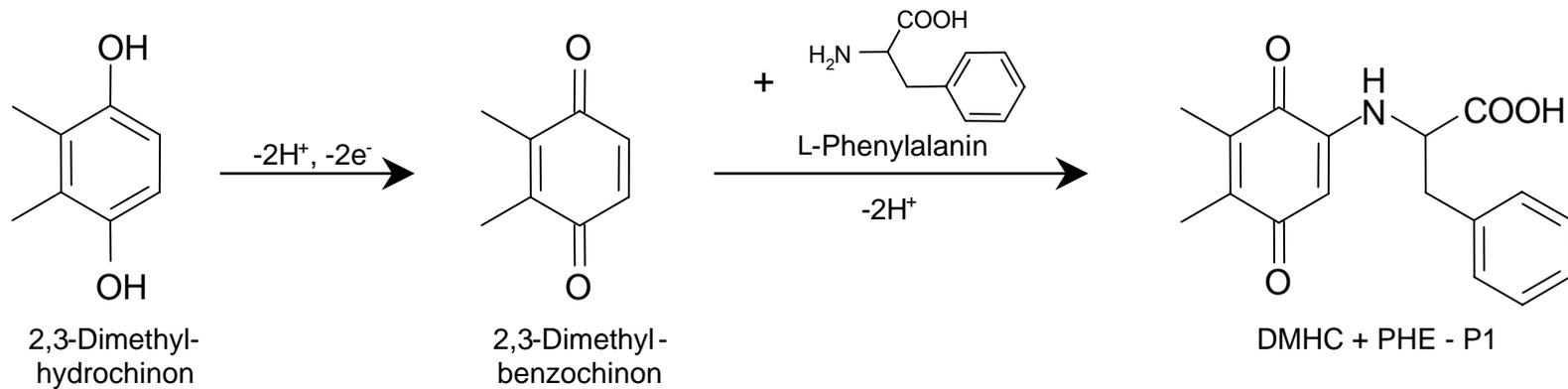
Kopplungsprodukt



Derivatisierung von Phenylalanin mittels Laccase



Transformation von 2,3-Dimethylhydrochinon und L-Phenylalanin mittels Laccase



Kopplungsversuche zur Entwicklung neuer Klebstoffe auf Strukturbasis von MAP`s



- MAP`s = mussel adhesive proteins
- Enzymatische Vernetzung von Peptidsequenzen
- Beispiel



Beispiele für Anwendungen der Kombinatorischen Biokatalyse mittels Laccasen



Derivatisierung von 4-Hydroxyprolin Derivatisierung von aromatischen Aminen und aliphatischen Aminen	Riemser Arzneimittel AG Stiftung Industrieforschung (SIF) Verbesserung der Anwendungseigenschaften von Wirkstoffen durch Biotransformation
Derivatisierung von Purinen und Pyrimidinen (Zytostatika) Derivatisierung von Imidazolen und Triazolen (Antimykotika)	Technologieberatungsinstitut (TBI) Untersuchungen zur Erweiterung des Anwendungsspektrums Laccase-vermittelter biokombinatorischer Reaktionen
Derivatisierung von Aminosäuren Derivatisierung von N-analogen Corollosporinen	Landesforschungsschwerpunkt (LFS) Anwendungsoptimierung neuer Wirkstoffe und Biomaterialien durch Derivatisierung und Strukturveränderung mittels Laccasen
Derivatisierung von Antibiotika	Herstellung von Funktionsmustern entsprechend dem Patent "Biologisch aktive Verbindungen aus <i>G. pfeifferi</i> " Ganomycin Gesellschaft für biomedizinische Forschung mbH Greifswald

Prof. Dr. F. Schauer, Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald



Zusammenfassung einiger Vorteile des Einsatzes von Laccasen



- Breites Substratspektrum (ca. 200 Substrate)
- Reaktion mit Tausenden von Nicht-Laccase-Substraten
- hohe Enzymstabilität
- außer O₂ keine Cofaktoren erforderlich
- Enzymproduktion im technischen Maßstab bereits möglich
- Enzymreaktoren in der Entwicklungsphase
- breite mögliche Anwendungsgebiete: Organische Synthese, C-C-Kopplungen, Protein-Modifizierung, Oligomerisierungen, Polymer-Chemie,
- Umsatz und Derivatisierung von hochempfindlichen Natur- und Wirkstoffen möglich.

Forschungsbedarf: Für welche Reaktionen kann die kombinatorische Biochemie als umweltfreundliches Syntheseverfahren konkret nutzbar gemacht und ökonomisch sinnvoll eingesetzt werden?

