



**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



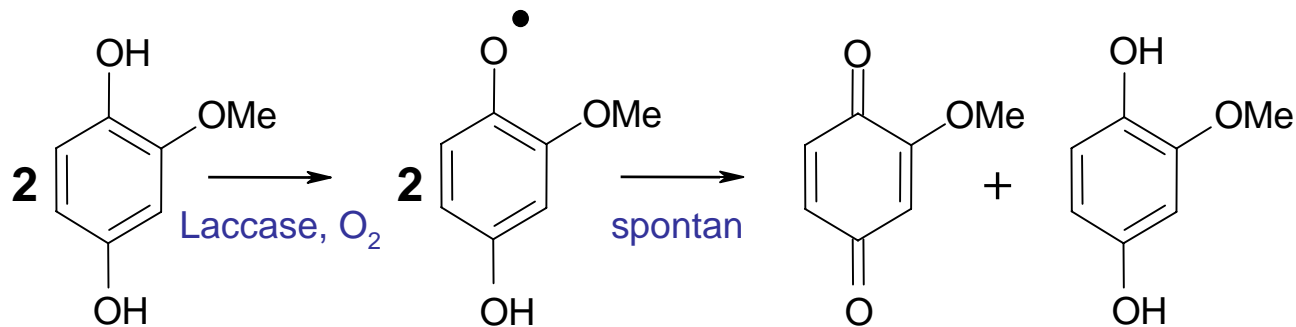
## Merkmale der Laccase



- 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.*

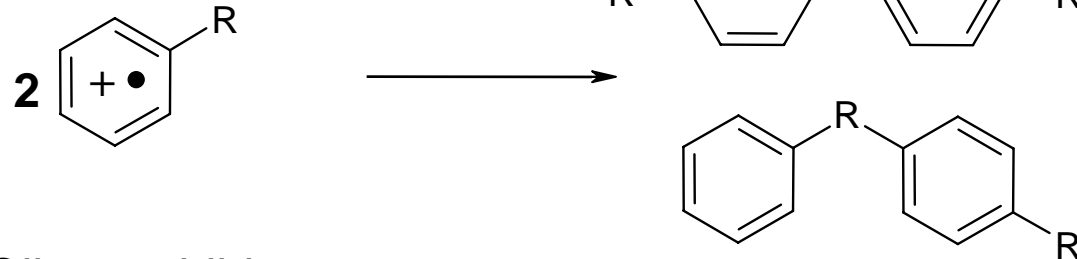
*Myceliophthora thermophila*



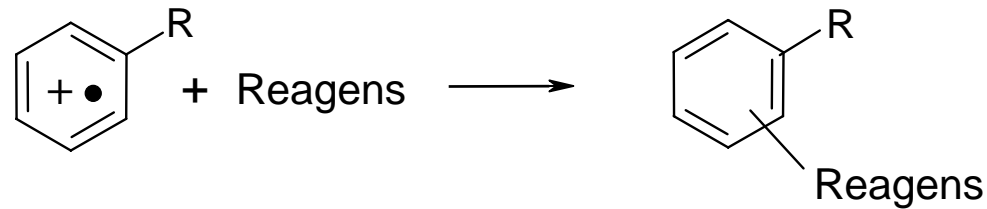
# Nutzung der Laccasereaktion für eine gerichtete Produktbildung Patent PCP/EP 01/07152, 2001



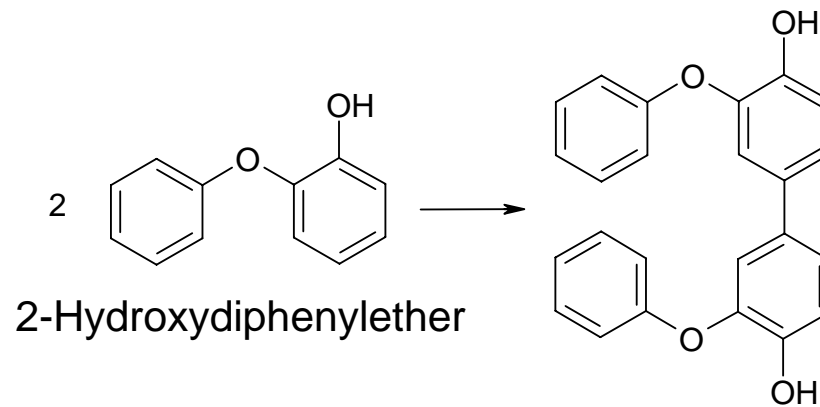
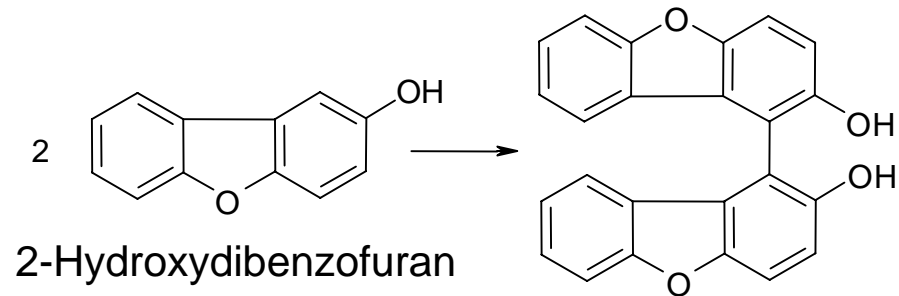
- Homologe Oligomerbildung



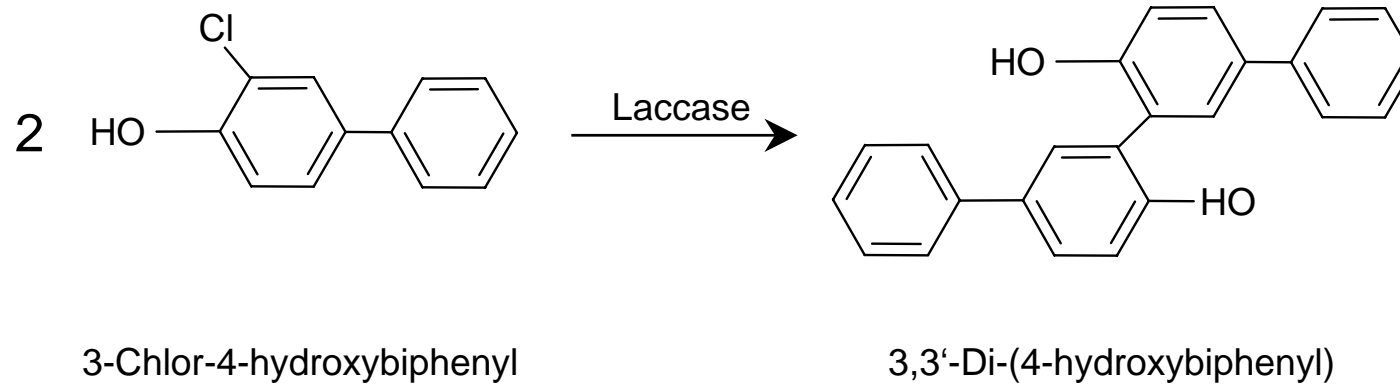
- Heterologe Oligomerbildung



# Transformation von Umweltschadstoffen durch Laccase



# Dechlorierung von 3-Chlor-4-hydroxybiphenyl durch Laccase

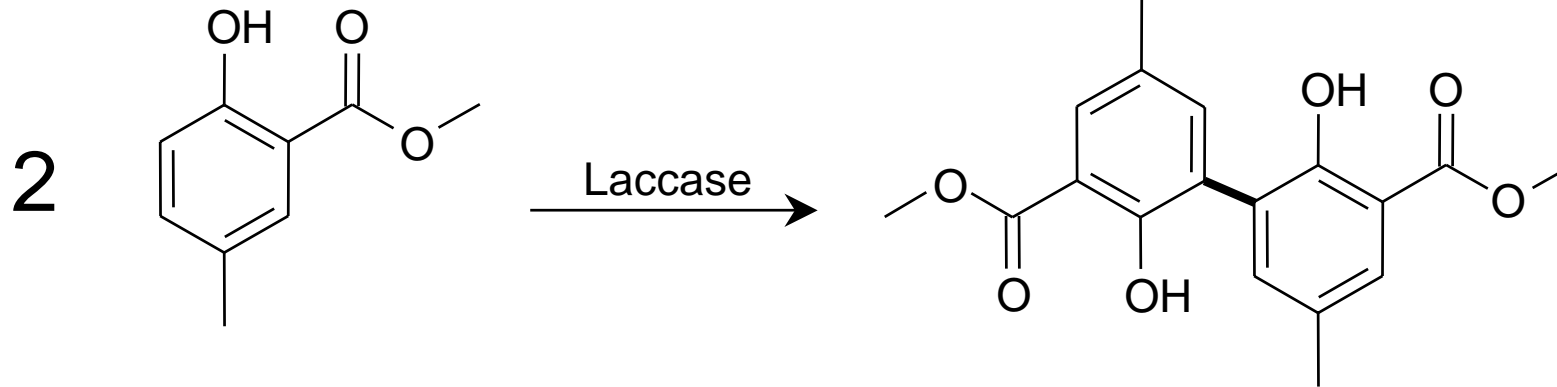


Schultz, A.; Jonas, U.; Hammer, E., ;Schauer, F. Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccase  
Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001) 4377-81

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



## Beispiel einer homomolekularen Kopplung



Salicylsäure-Derivate

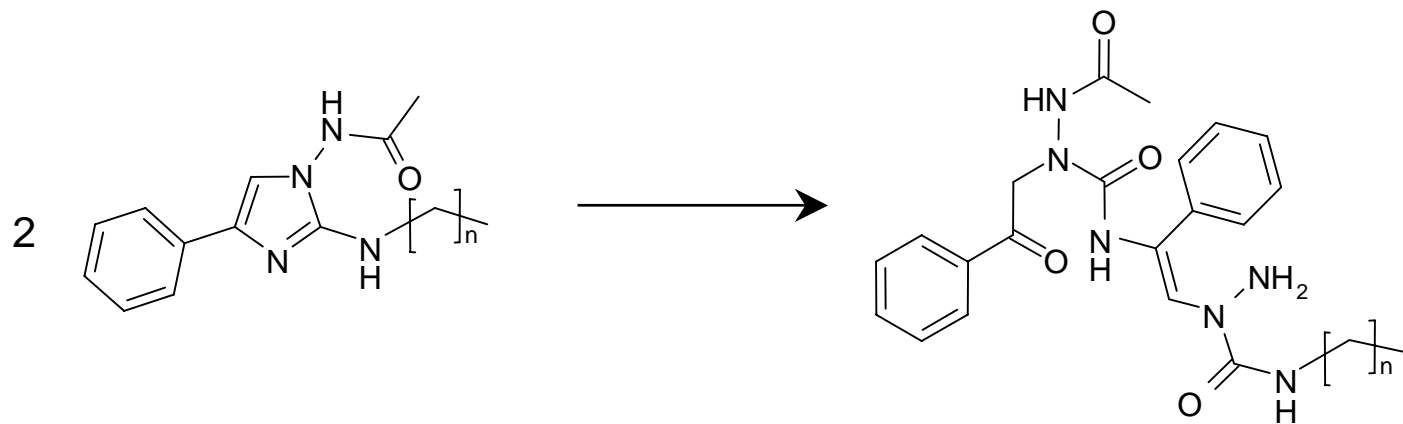
C-C-gekoppeltes  
Dimerisationsprodukt

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

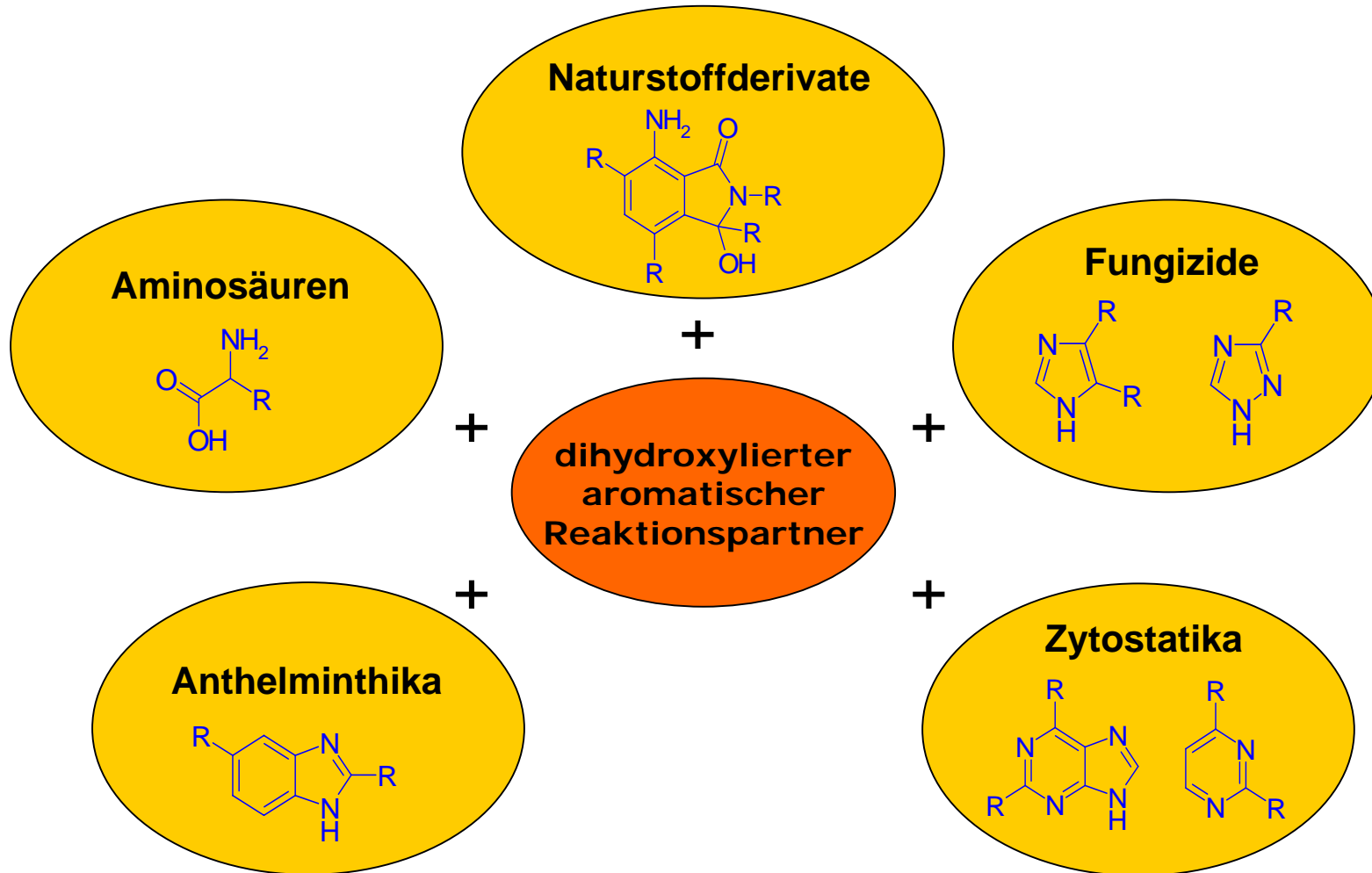


N-(2-Alkylamino-4-phenyl-imidazol-1-yl)-acetamid

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

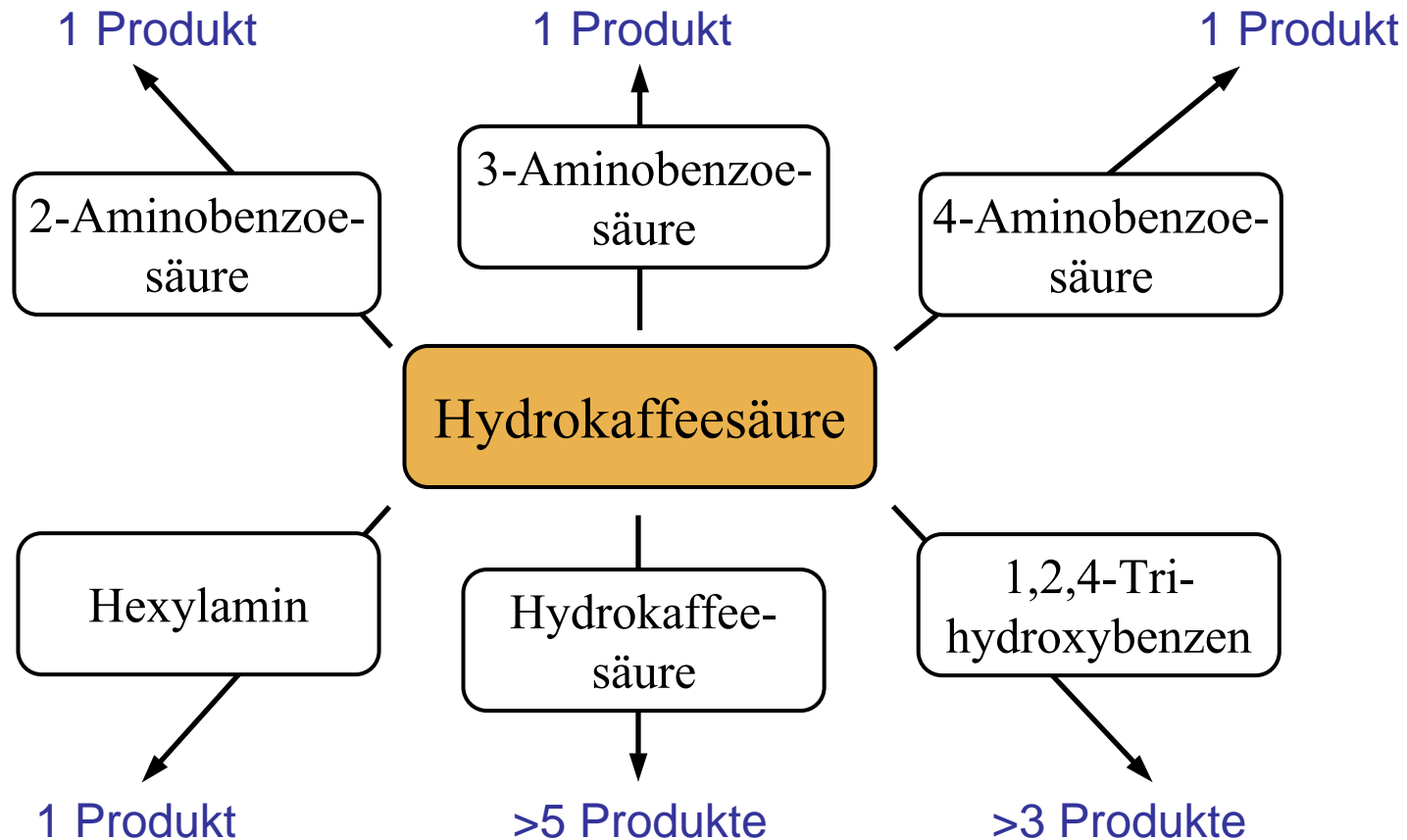


Tausende von Reaktionsmöglichkeiten über C-C, C-O, C-N und C-S- Kopplung

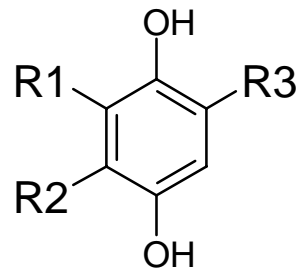




# Beispieltransformation eines Wirkstoffes



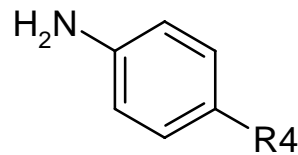
# Laccase als Katalysator für eine Derivatisierung von aromatischen Aminen



2,5-Dihydroxybenzoesäurederivate

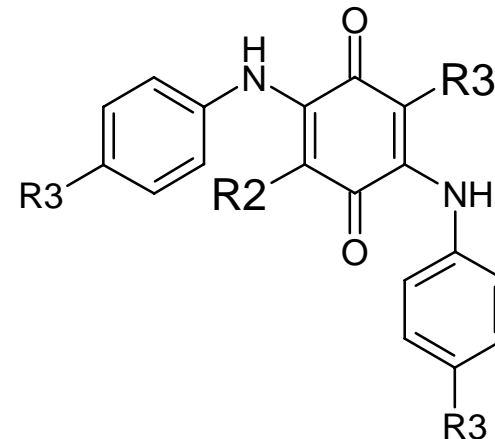
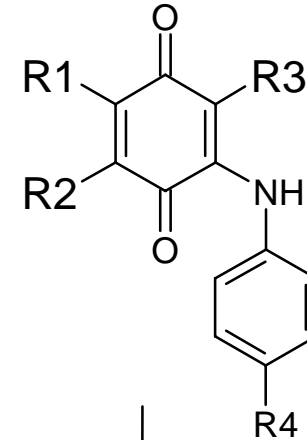
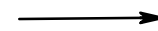
alkylierte *para*-Hydrochinone

+

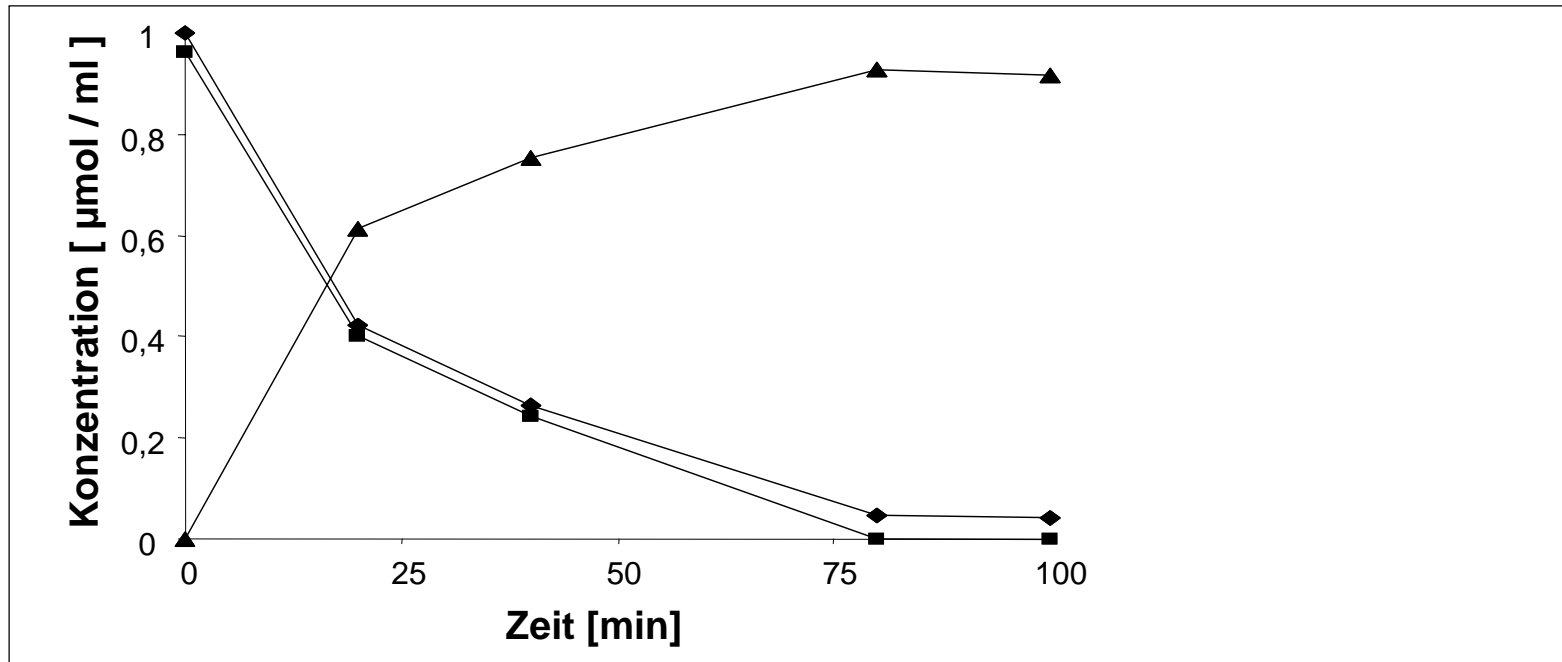


4-Aminobenzoesäurederivate,  
*para*-substituierte Aniline

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 ( oftmals 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

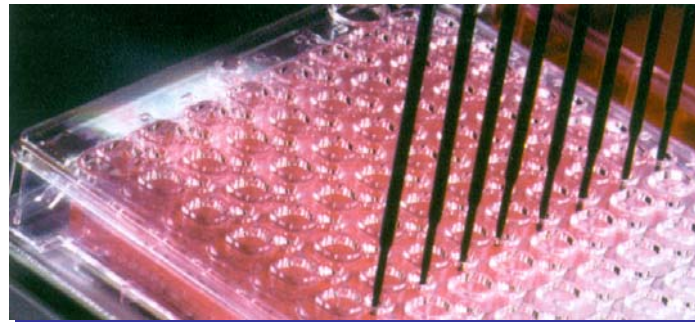


## Quellen neuer Wirkstoffe

## 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



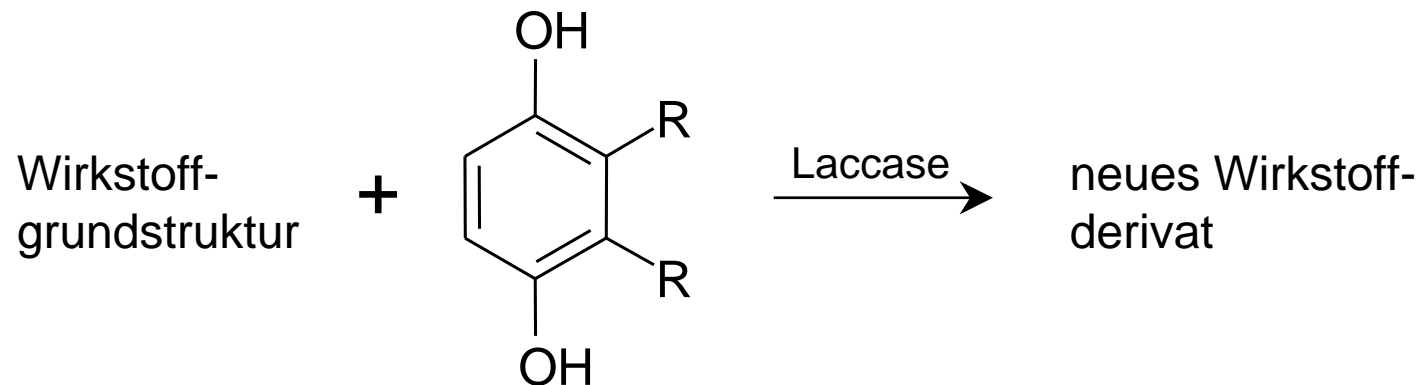
*Pycnoporus cinnabarinus*,  
Zinnoberroter Zunderschwamm



# 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

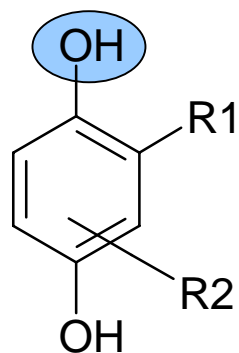




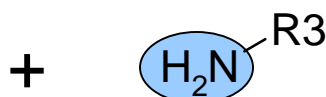
# Laccase als Katalysator für eine Derivatisierung von Antibiotika



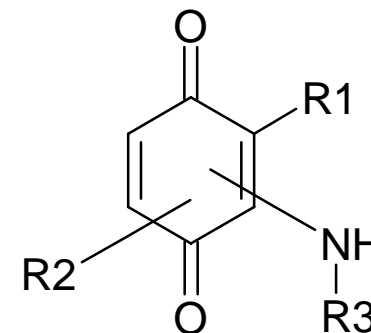
Wirkstoff A / Substrat A + Wirkstoff B  $\longrightarrow$  Wirkstoff AB



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



β-Lactame, Amino-glycoside



# 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“



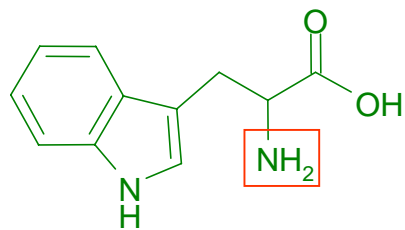
# Vorteile der biokombinatorischen Derivatisierung



- 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

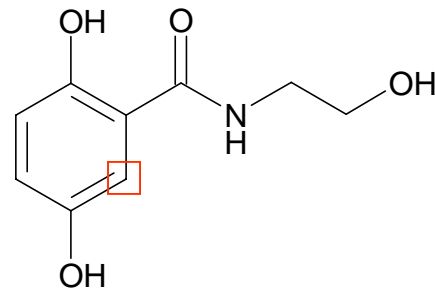


# Derivatisierung von Aminosäuren mittels Laccasen

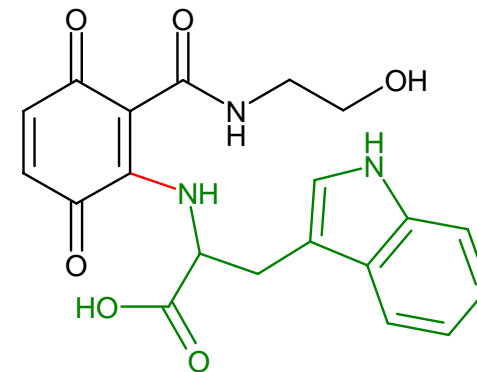
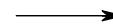


L-Tryptophan

+



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



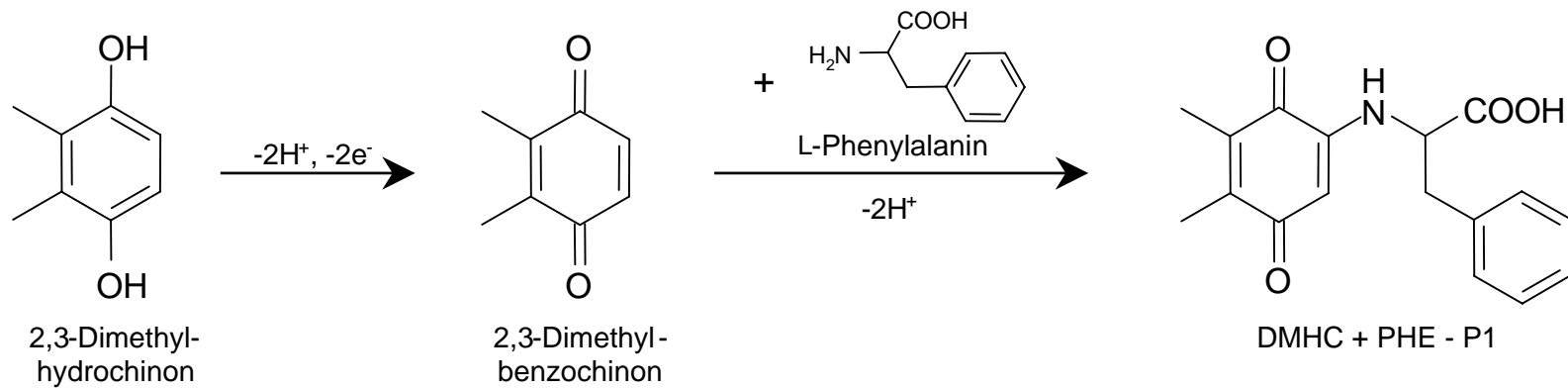
Kopplungsprodukt



# 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 O<sub>2</sub> 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?

