Einsatz von Laccasen aus Pilzen zur Herstellung von Hybridmolekülen unter besonderer Berücksichtigung der Synthese von antifungalen Substanzen und Aminosäurederivaten

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von
Veronika Hahn
geboren am 19.12.1980
in Eberswalde

Greifswald, 09. Oktober 2009

Dekan:	Prof. Dr. K. Fesser
1. Gutachter:	Prof. Dr. F. Schauer
2. Gutachter:	Prof. Dr. U. Kragl
Tag der Promotion:	18.12.2009

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

2 Laccase 3
2.1 Reaktionsmechanismus der Laccase im Hinblick auf die Synthese organischer Moleküle 12

3 Reaktionen zur Derivatisierung bzw. Synthese von Wirkstoffen und funktionellen Biomaterialien 15

3.1 Homomolekulare Reaktionen 15
3.1.1 Derivatisierung von östrogenen Substanzen 15
3.1.2 Derivatisierung von antioxidativen Substanzen 17
3.1.3 Derivatisierung von antibakteriellen Substanzen 20

3.2 Heteromolekulare Reaktionen 23
3.2.1 Derivatisierung von antimikrobiellen Substanzen 23
3.2.1.1 Derivatisierung von Mithramycin 23
3.2.1.2 Derivatisierung von *β*-Lactam-Antibiotika 24
3.2.1.3 Derivatisierung von Corollosporin-Derivaten 27
3.2.1.4 Antimikrobielle Substanzen zur Herstellung funktionalisierter Oberflächen 28
3.2.2 Derivatisierung von antioxidativen Substanzen 28
3.2.3 Derivatisierung von primären Aminen zur Synthese von zytotoxisch und antineoplastisch wirkenden Substanzen 29
3.2.4 Derivatisierung aromatischer und aliphatischer Aminosäuren als potenzielle Wirkstoffe 31
3.2.4.1 Derivatisierung der 4-Aminobenzoesäure 31
3.2.4.2 Derivatisierung verschiedener Aminosäuren 33

3.3 Polymerisationsreaktionen 34
3.3.1 Synthese von physiologisch bedeutsamen Polymeren 35
3.3.2 Derivatisierung von antioxidativen Substanzen 36
3.3.3 Synthese von funktionellen Biomaterialien (Klebstoffe und Lacke) 37

4 Ziele und Ergebnisse der Dissertation 41
4.1 Synthesis of model morpholine derivatives with biological activities by laccase-catalyzed reactions 45
4.2 A novel enzymatic process for the synthesis of new antifungals 59
4.3 Application of a fungal virulence factor for the synthesis of new antifungal compounds 62
4.4 Laccase-catalyzed carbon–nitrogen bond formation: coupling and derivatization of unprotected L-phenylalanine with different *para*-hydroquinones 64
4.5 Derivatization of amino acids by fungal laccases: Comparison of enzymatic and chemical methods 72

4.6 Laccase-catalyzed cross-linking of amino acids and peptides with dihydroxylated aromatic compounds 79
4.7 Mikrobielle Laccasen zur Synthese organischer Substanzen 97
4.8 Enzymatic cyclizations using laccases: Multiple bond formation between dihydroxybenzoic acid derivates and aromatic amines 101
4.9 Derivatization of the azole 1-aminobenzotriazole using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila:* influence of methanol on the r eaction and biological evaluation of the derivatives 113
4.10 New enzymatic principle for the synthesis of novel antimicrobials 123

5 Unveröffentlichte Ergebnisse 126
5.1 Strukturelle Charakterisierung der mittels Laccase synthetisierten ..... Produkte 126
5.2 Bestimmung der biologischen Aktivität der mittels Laccase synthetisierten Produkte 140

6 Zusammenfassung 147

7 Literaturverzeichnis 151

A Zusammenfassende Darstellung der laccasekatalysierten Reaktionen zur Derivatisierung bzw. Synthese von Wirkstoffen und funktionellen Biomaterialien 176

B Supporting Information - Enzymatic cyclizations using laccases: Multiple bond formation between dihydroxybenzoic acid derivates and aromatic amines 181

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABT	1-Aminobenzotriazol
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
AEM	4-(2-Aminoethyl)-morpholin
CHC	Chlor-1,4-hydrochinon
Da	Dalton
DHBA	2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid
DHBEE	2,5-Dihydroxybenzoesäureethylester
DHBME	2,5-Dihydroxybenzoesäuremethylester
DHBS	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMHC	2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
et al.	et alii (und andere)
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
F	5-Flucytosin (5-Fluorcytosin)
GC/MS	Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektroskopie
HC	1,4-Hydrochinon
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IC	Inhibitorische Konzentration
LC/MS	Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektroskopie
M	Morpholin
MA	4-Morpholinoanilin
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minuten
MS	Massenspektroskopie
MW	Molekulargewicht
NMR	Kernresonanz
P	Produkt
RP	Reaktionsprodukt
SBUG-M	Stammsammlung für Myzelpilze der Fachrichtung Biologie der Universität Greifswald am Institut für Mikrobiologie
Tab.	Tabelle
TOF	Time-of-flight
t_R	Retentionszeit

UV/Vis	Ultraviolett/Visible
vgl.	vergleiche

1 Einleitung

Pilze besitzen eine große Vielfalt an biotechnologisch potentiell einsetzbaren Enzymen, von denen bereits diverse industrielle Anwendungen ausgehen und die neue Einsatzgebiete ermöglichen können.

Enzyme sind wichtige Biokatalysatoren, die in allen Organismen vorkommen und den Ablauf von Reaktionen beschleunigen können. Die Anwendungsmöglichkeiten von Enzymen sind sehr vielfältig und umfassen unterschiedliche Industriezweige. In der Backindustrie werden beispielsweise Amylasen und Proteasen sowie Hemicellulasen eingesetzt (Weegels et al. 1992, Blaszczak et al. 2004, Keskin et al. 2004), während zum Bierbrauen neben Amylasen Carboxypeptidasen und Glucanasen genutzt werden (Bhat et al. 2000, Evans et al. 2008). Neben der Brau- und Backindustrie werden Enzyme v.a. Proteasen auch für die Herstellung von Käse eingesetzt (Ohmiya et al. 1979, Garg und Johri 1993). Die Klärung von Fruchtsäften durch Pektinasen ist eine weitere Einsatzmöglichkeit von Enzymen in der Lebensmittelindustrie (Sreenath und Santhanam 1992). Aber auch in anderen Industriezweigen, wie bei der Herstellung von Leder werden Enzyme eingesetzt (Thanikaivelan et al. 2004). Daneben werden Enzyme z.B. Proteasen oder Cellulasen auch in der Waschmittelindustrie angewandt, um die Reinigungsleistung, die Farbintensität und die Weichheit zu erhöhen (Galante et al. 2003, Maurer 2004, Saeki et al. 2007, Verenich et al. 2008). Bei der Zellstoff- und Papierherstellung werden Enzyme, v.a. Xylanasen eingesetzt um die farbigen Komponenten des Roh-Zellstoffes, der aus Holz gewonnen wurde, zu entfernen (Bleichung) um den Verbrauch von umweltgefährlichen Chlorverbindungen zu minimieren (Viikari et al. 1994, Buchert et al. 1992). Weitere Einsatzmöglichkeiten von Enzymen bestehen in der Medizin z.B. die Anwendung in Biosensoren zur Bestimmung von Glucose oder Cholesterin (Wang et al. 2008). Darüber hinaus können Restriktions-endonukleasen in der Molekularbiologie zum Spalten von DNA in definierte Abschnitte genutzt werden. Nach der Bestimmung der Größe oder der Sequenzierung der entstandenen Abschnitte erhält man Restriktionskarten, die zur Klonierung und Expression fremder DNA-Abschnitte dienen können (Yoshikawa und Isono 1991, Weld et al. 2006).

Auf dem Gebiet der Biotechnologie, beispielsweise zur Synthese neuer Wirkstoffe und Feinchemikalien, gewinnen Enzyme immer mehr an Bedeutung. Jeder neu entwickelte Prozess führt gleichzeitig zu einer Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten auch in der chemischen Industrie (Panke und Wubbolts 2005, Schmid et al. 2001).

Dabei bieten Enzyme entscheidende Vorteile gegenüber chemischen Katalysatoren. Enzyme besitzen u.a. höhere Reaktionsgeschwindigkeiten und eine höhere Reaktionsspezifität (einschließlich Regio- und Stereoselektivität) als chemische Katalysatoren. Darüber hinaus laufen enzymatische Reaktionen meist unter milden Reaktionsbedingungen ab, was auch die Einführung und Abspaltung von Schutzgruppen überflüssig macht. Des Weiteren sind enzymatische Prozesse katalytisch, nicht stöchiometrisch und ermöglichen so einen bequemeren Prozessablauf und den Einsatz geringerer Mengen des Katalysators (Call und Mücke 1997, Woodley 2008).
Es wird geschätzt, dass ca. 150 biokatalytische Prozesse bereits industriell genutzt werden, wobei der Hauptschwerpunkt im pharmazeutischen Bereich liegt (Panke und Wubbolts 2005, Woodley 2008).

In der vorliegenden Dissertation steht das v.a. von Weißfäulepilzen gebildete ligninolytische Enzym Laccase im Mittelpunkt. Die Laccase kann eine Vielzahl von phenolischen Verbindungen oxidieren. Diese Fähigkeit des Enzyms ist die Grundlage verschiedener Reaktionsmöglichkeiten, zu denen Depolymerisations- und Polymerisationsreaktionen, aber auch die Verknüpfung von Verbindungen unterschiedlicher Substanzklassen gehören. Die laccasevermittelte Kopplung von verschiedenen Substanzen zu neuen organischen und bioaktiven Molekülen war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Dabei standen neuartige Möglichkeiten der Wirkstoffsynthese und -derivatisierung im Zentrum des Interesses. Das Ziel bestand in der Herstellung von Substanzen, deren Aktivitäten (z.B. gegen Pilze oder Bakterien) und Anwendungseigenschaften besser waren als die der Ausgangsstoffe aus denen sie gebildet wurden. Als Ausgangsstoffe dienten sowohl vorhandene Wirkstoffe als auch Verbindungen ohne eine bekannte Wirkung. Eine weitere völlig neue Anwendungsmöglichkeit der Laccase, die sich mit der Polymerisation und Zyklisierung von Substanzen beschäftigt, wurde ebenfalls untersucht, wobei die gebildeten Zyklisierungsprodukte erstmalig beschrieben wurden.
Im ersten Teil der vorliegenden kumulativen Dissertation erfolgt eine umfassende Einführung in die Thematik und eine Zusammenfassung der in der Literatur beschriebenen Zitate, die sich mit der laccasekatalysierten Synthese von Substanzen mit biologischer Wirkung bzw. der Derivatisierung von Wirkstoffen oder Wirkstoffgrundstrukturen befassen. Im Anschluß daran werden im Haupteil dieser Dissertation eigene Publikationen der Forschungsergebnisse vorgestellt. Dabei wird auf die laccasekatalysierte Derivatisierung von Grundstrukturen antifungaler Verbindungen wie Azolen und Morpholinen als auch von Aminosäuren mit *para*-dihydroxylierten aromatischen Verbindungen eingegangen. Im letzten Teil der Arbeit werden unveröffentlichte Ergebnisse vorgestellt, wobei der Schwerpunkt auf der strukturellen Charakterisierung der mittels Laccase synthetisierten Produkte liegt.

2 Laccase

Laccasen sind Enzyme, die aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften in hervorragender Weise für den Einsatz als Katalysator in der organischen Chemie zur Synthese einer Vielzahl von biologisch aktiven Verbindungen geeignet sind. Sowohl die proteinchemischen Merkmale der Laccase als auch die durch sie katalysierten Reaktionen bieten zahlreiche Vorteile für einen biotechnologischen Einsatz:

1. Laccasen sind in einem großen pH-Bereich von 2-8 stabil und aktiv (Baldrian 2006), wobei es Hinweise dafür gibt, dass das pH-Optimum der Laccase von der Struktur und dem Redoxpotential des Laccasesubstrates abhängig ist (Mai et al. 2001, Baldrian 2006).
2. Laccasen sind als meist extrazelluläre Enzyme sehr temperaturstabil und weisen Temperaturmaxima zwischen 50 bis 70 °C auf (Morozova et al. 2007a).
3. Laccasen besitzen aufgrund ihrer geringen Spezifität ein breites Substratspektrum. Zusätzlich kann das Substratspektrum mit Hilfe von Mediatoren erweitert werden (Morozova et al. 2007b).
4. Neben Laccasesubstraten können auch Nicht-Laccasesubstrate mittlels Laccase derivatisiert werden. So ist beispielsweise die Derivatisierung von Verbindungen wie Aminosäuren ohne die Einführung von Schutzgruppen möglich (Manda et al. 2006, Hahn et al. 2009b,c).
5. Laccasevermittelte Synthesen laufen meist unter Verwendung wenig toxischer Ausgangsverbindungen und milden Reaktionsbedingungen z.B. bei Luftdruck und Raumtemperatur ab, sodass auch empfindliche Naturstoffe eingesetzt werden können (Call und Mücke 1997).
6. Die Laccasekatalyse erfordert außer O_2 keine Cosubstrate und Cofaktoren, sowie i.d.R. nur wenige Reaktionsschritte, sodass sogenannte "one pot" Synthesen möglich sind.
7. Aufgrund der Vielzahl an isolierten Laccasen, des breiten Substratspektrums und der Einbeziehung von Nicht-Laccasesubstraten ist eine Vielzahl an Variationen der durch sie katalysierten Reaktionswege und damit der Produktspektren möglich.
8. Es können sehr hohe Produktausbeuten erreicht werden, welche im Mittel zwischen 20 und 80 % (Hahn et al. 2009d) liegen und bei optimierten Reaktionen auch 96 % (Niedermeyer et al. 2005) erreichen können.

Aufgrund der genannten Eigenschaften und vor allem wegen der Vielzahl an katalytischen Reaktionen stellt die laccasevermittelte Katalyse eine wertvolle Ergänzung zu den in der Chemie verwendeten Synthesewegen dar. Zudem bietet die Gentechnik zukünftig durch gerichtete Evolution die Möglichkeit die Eigenschaften der Laccase entsprechend dem Anwendungsgebiet und den Reaktionsbedingungen anzupassen. Bulter et al. (2003) gelang beispielweise die funktionelle Mutation einer thermophilen Laccase aus *Myceliophthora thermophila* in *Saccharomyces cerevisiae*. Aufgrund der gerichteten Evolution wurde die Expression des Enzyms um das achtfache gesteigert was zu einer Erhöhung der Enzymaktivität um das 170-fache führte. Sowohl die gesteigerte Enzymaktivität als auch die Temperaturstabilität bietet v.a. bei Prozessen wie der Bleichung in der Holzindustrie erhebliche Vorteile (Monteiro und de Carvalho 1998).
Durch Verfahren der rekombinanten DNA-Technologie und des “protein engineering“ können in Kombination mit einer Reaktorproduktion (Pilz et al. 2003, Couto und Toca-Herrera 2007) effektive Laccasen für industrielle Anwendungen bereitgestellt werden.

Erstmals wurde die Laccase [E.C. 1.10.3.2, Benzendiol : O_2 Oxidoreduktase] in Exsudaten des japanischen Lackbaumes *Toxicodendron verniciflua* (frühere Benennung als *Rhus vernicifera*) von Yoshida im Jahre 1883 entdeckt (Yoshida 1883). Erst zwölf Jahre später bekam das Enzym den Namen Laccase (Bertrand 1894, 1895, 1931). Seitdem wurden mehr als 100 pilzliche Laccasen in Ascomyceten (z.B. *Aspergillus*-Arten), Deuteromyceten (z.B. *Botrytis*-Arten) und vor allem in ligninolytischen Basidiomyceten gefunden. Besonders die zur letztgenannten Gruppe gehörenden Weißfäulepilze, zu denen u.a. die Gattungen *Trametes*, *Pycnoporus* und *Phanerochaete* zählen, stellten sich als herausragende Laccaseproduzenten heraus (Hermann et al. 1983, Slomczynski et al. 1995, Srinivasan et al. 1995, Eggert et al. 1996, Yaver et al. 1996). Dort gehört die Laccase zusammen mit der Lignin- und Manganperoxidase sowie der manganunabhängigen Peroxidase zum ligninolytischen Enzymsystem. Im Gegensatz zu den Peroxidasen benötigt die Laccase kein Wasserstoffperoxid als Cofaktor (Heinzkill und Messner 1997). Bei niederen Pilzen wie Zygomyceten und Chytridiomyceten wurde hingegen noch keine Laccase nachgewiesen (Baldrian 2006). Neben Pflanzen und Pilzen bilden aber auch Tiere wie Insekten z.B. *Manduca sexta* (Thomas et al.1989, Dittmer et al. 2004), *Anopheles gambiae* (Dittmer et al. 2004) und *Bombyx mori* (Yamazaki 1972, Yatsu und Asano 2009) Laccasen. Zudem wurden in Bakterien Laccasen bzw. laccaseähnliche Enzyme nachgewiesen, z.B. in *Azospirillum lipoferum* (Givaudan et al. 1993, Diamantidis et al. 2000), *Marinomonas mediterranea* (Sanchez-Amat und Solano 1997, Sanchez-Amat et al. 2001, Sharma et al. 2007) oder *Bacillus subtilis* (Hullo et al. 2001, Martins et al. 2002, Enguita et al. 2003).

Genauso divers wie die Quellen der einzelnen Laccasen sind, können auch die physiologischen Funktionen sehr unterschiedlich sein. Einerseits katalysieren Laccasen katabole Reaktionen, z.B. im Rahmen des Abbaus von Lignin durch Weißfäulepilze (Leonowicz et al. 2001), andererseits ist die Laccase in Pflanzen, Insekten, Bakterien und Pilzen an verschiedenen Polymerisationsreaktionen und damit u.a. an der Morphogenese beteiligt. In Pflanzen wird die Laccase zur Synthese von Lignin genutzt (Whetten et al. 1998) und in Insekten dient die Laccase neben der Tyrosinase zur Sklerotisierung der Kutikula (Kramer et al. 2001, Arakane et al. 2005, Suderman et al. 2006). Der Pilz *Aspergillus nidulans* besitzt zwei Laccasen. Die eine ist an der Synthese von dunkelgrünem konidialem Pigment beteiligt, und die andere spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Entwicklung der Cleistothecien (Hermann et al. 1983). Die Laccase von *Lentinula edodes* ist an der Oxidation von phenolischen Verbindungen zu Chinonen beteiligt. Die gebildeten Chinone polymerisieren nicht-enzymatisch, um das Pigment Melanin zu bilden (Nagai et al. 2003). Die Laccase von *Bacillus subtilis* besitzt eine ähnliche Funktion. Als Bestandteil der Endospore spielt sie vermutlich bei der Bildung einer Melanin-ähnlichen Verbindung eine Rolle, die zum Schutz der Spore gegen UV-Licht und H_2O_2 beiträgt (Hullo et al. 2001, Martins et al. 2002). Durch die laccasevermittelte Synthese von Melanin, das dann den Mikroorganismus vor exogenen Einflüssen schützt, wie beispielsweise bei dem humanpathogenen hefeähnlichen Pilz *Cryptococcus neoformans*, kann die Laccase auch als Virulenzfaktor fungieren (Nosanchuk und Casadevall 2003). Die Laccase des phytopathogenen Pilzes *Botrytis cinerea* ist ebenfalls an der Virulenz des Pilzes beteiligt. *Botrytis cinerea* verursacht Fäulnis bei verschiedenen Kulturpflanzen, wie Karotten, Gurken und Weintrauben. Die extrazelluläre Laccase spielt eine Rolle bei der Pathogenese und wird vom Pilz genutzt um antimikrobielle Verbindungen der Pflanze (Phytoalexine) zu detoxifizieren (Bar-Nun et al. 1988, Pezet et al. 1991, Viterbo et al. 1993, Thurston 1994, Sbaghi et al. 1996).

Pilzliche Laccasen besitzen i.d.R. ein Molekulargewicht von 50-100 kDa (Thakker et al. 1992, Srinivasan et al. 1995, Claus 2004). Die meisten pilzlichen Laccasen sind monomere Proteine. Es wurden aber auch mehrere homodimere Laccasen, bestehend aus zwei identischen Untereinheiten z.B. bei *Trametes villosa* (Yaver et al. 1996) oder *Rhizoctonia solani* (Wahleithner et al. 1996) nachgewiesen. Viele Laccasen kommen als Isoenzyme vor, die zu multimeren Komplexen oligomerisieren können (Claus 2003). In den meisten Fällen liegen konstitutive und induzierbare Isoformen gleichzeitig vor (Leonowicz et al. 1972, Soden und Dobson 2001, Mayer und Staples 2002, Cho et al. 2006, Kunamneni et al. 2008). Eine Laccase, die konstitutiv gebildet wird, ist z.B. das Enzym aus *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert et al. 1996). Die Induktion der Expression kann durch aromatische Aniline darunter v.a. 2,5-Xylidin (2,5-Dimethylanilin) (Bollag und Leonowicz 1984, Collins und Dobson 1997,

Soden und Dobson 2001) erfolgen. Kollmann et al. (2005) wiesen eine Steigerung der Laccaseaktivität auch durch die mittels Laccase aus 2,5-Xylidin gebildeten C-N- und C=N-Oligomere nach. Darüber hinaus führen auch Methoxyphenole wie Veratrylalkohol (3,4-Dimethoxybenzylalkohol) (Kantelinen et al. 1989, Rogalski et al. 1991, Domínguez et al. 2007) oder Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure) (Leonowicz et al. 1972, Sigoillot et al. 1999, Cho et al. 2006), sowie Ethanol (Lee et al. 1999, Meza et al. 2007) zu einer Erhöhung der Laccaseproduktion.
Ein Großteil der pilzlichen extrazellulären Laccasen ist - wie auch andere extrazelluläre Enzyme von Pilzen - glykosyliert. Der Glykosylierungsgrad der Laccase ist relativ hoch. Der Zuckeranteil kann 10-45 % des gesamten Moleküls betragen (Claus 2004). Die Glykosylierung dient wahrscheinlich der thermischen und proteolytischen Stabilisierung des entstehenden Peptides bei der Faltung (Schauer und Borriss 2004).

Die Lokalisation der meisten pilzlichen Laccasen ist extrazellulär, während bakterielle Laccasen v.a. intrazellulär vorkommen (Baldrian 2006, Sharma et al. 2007). In anderen Fällen kann die Laccase auch in der Zellwand oder der Sporenumhüllung lokalisiert sein. So ist die Laccaseaktivität der Hefe *Cryptococcus neoformans* (Zhu et al. 2001) und des Basidiomyceten *Irpex lacteus* (Svobodová et al. 2008) fast ausschließlich auf die Zellwand bezogen, während die Laccase bei *Trichoderma* spec. in den Sporen nachgewiesen wurde (Hölker et al. 2002). Bei *Phanerochaete chrysosporium* wurden extra- und intrazelluläre Laccasen nachgewiesen (Dittmer et al. 1997).

Das Enzym oxidiert unter anderem Di- und Polyphenole, Aminophenole, methoxysubstituierte Phenole, hydroxylierte Biarylverbindungen, Diamine und Arylamine (Keilin und Mann 1939, Bollag et al. 1988, Messerschmidt 1993, Thurston 1994, Yaropolov 1994, Ciecholewski et al. 2005, Mikolasch und Schauer 2009). Das große Substratspektrum der Laccase umfasst u.a. Verbindungen wie Salicylsäureester (Ciecholewski et al. 2005), Vanillin- und Syringasäure (Tatsumi et al. 1994a), Hydroxybiphenyl (Jonas et al. 2000) 2,5-Xylidin (Bertrand et al. 2002) sowie *ortho*- (Hosny und Rosazza 2002, Mikolasch et al. 2008c) und *para*-dihydroxylierte (Anyanwutaku et al. 1994, Manda et al. 2005) Aromaten.
Ein teilweise ähnliches Substratspektrum weist die Tyrosinase auf, die neben der Laccase zu den kupferenthaltenden Oxidasen gehört (Keilin und Mann 1939, Lerner et al. 1950 Garcia-Borron und Solano 2002, Piontek et al. 2002, Claus 2004). Im Gegensatz zur Laccase, die keine *ortho*-Hydroxylierungen des Substrates katalysieren kann, wird beispielsweise Tyrosin von der Tyrosinase in *ortho*-Position hydroxyliert. Das im Fall von Tyrosin als Substrat gebildete 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa), stellt dann wieder ein Substrat beider Enzyme dar und kann nachfolgend einer erneuten Oxidation unterliegen. Ein weiterer Unterschied

zwischen Tyrosinase und Laccase besteht darin, dass die Tyrosinase keine *para*-dihydroxylierten Aromaten oxidieren kann (Brown 1967).

Neben der Tyrosinase ist die Laccase mit weiteren kupferhaltigen Enzymen verwandt. So gehört die Laccase zusammen mit der Ascorbatoxidase (aus Pflanzen) und dem Ceruloplasmin (aus Wirbeltieren) zur Gruppe der blauen Multikupferoxidasen (Claus 2003, 2004).

Die Oxidation der Substrate durch die Laccase ist eine Ein-Elektronen-Reaktion, die zur Bildung eines freien Radikals führt (Nakamura 1960, Bollag et al. 1977, Xu 1999, Solomon et al. 2001, 2008). Von vier Substratmolekülen wird jeweils ein Elektron auf das Enzym übertragen. Als Elektronenakzeptor dient Sauerstoff. Dabei werden vier Elektronen auf Sauerstoff übertragen, wobei zwei Moleküle Wasser gebildet werden. Die Katalyse erfolgt über vier Kupferatome, die entsprechend ihrer elektronischen Eigenschaften in verschiedene Typen eingeteilt werden und anhand ihrer spektroskopischen Merkmale unterschieden werden können. Dabei ist sowohl das Kupferatom, das in einer sogenannten Typ 1-Bindungsstelle (T1) liegt, als auch das Kupferatom in der Typ 2 (T2) und die zwei Kupferatome in der Typ 3-Bindungsstelle (T3) am katalytischen Prozess beteiligt. T2 und T3 liegen räumlich nahe beieinander und bilden das sogenannte trinukleäre Kupferzentrum. Die Oxidation der Substratmoleküle erfolgt am T1 durch einen stufenweisen Transfer von vier Elektronen (Abb. 1).

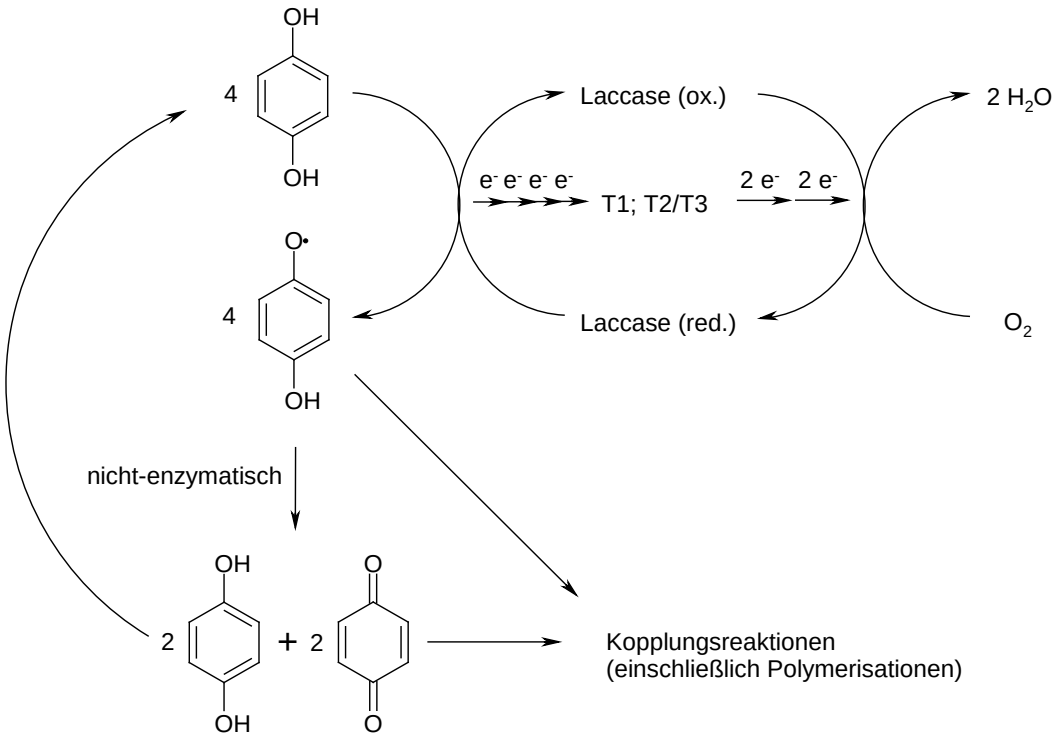


Abb. 1 Katalytischer Zyklus der laccasevermittelten Oxidation von Substraten und sich daran anschließende Reaktionen (abgewandelt nach Thurston 1994, Claus 2003, Baldrian 2006, Solomon et al. 2001, 2008)

Die Elektronen werden dann auf T2/T3 übertragen. Die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser erfolgt am T3 durch zweistufige Übertragung von insgesamt vier Elektronen, wobei die Laccase reoxidiert wird. Das durch die laccasevermittelte Reaktion entstehende Radikal, aber auch die im Folgenden nicht-enzymatisch gebildeten Produkte können Kopplungsreaktionen unterliegen, die schließlich zur Bildung von Polymeren führen können (Bertrand et al. 2002, Piontek et al. 2002, Claus 2003, 2004, Baldrian 2006). Die entstehende hydrochinoide Verbindung stellt ein Laccasesubstrat dar und unterliegt erneut der Oxidation, wobei auch eine Beteiligung an den ablaufenden Kopplungsreaktionen nicht ausgeschlossen werden kann.

Neben der Katalysereaktion sind die vier Kupferatome des katalytischen Zentrums auch für andere Eigenschaften z.B. die Farbe und Inhibitionsmöglichkeiten der Laccase verantwortlich. So ist das Typ 1 Kupferatom aufgrund einer starken Absorption bei 610 nm für die blaue Farbe der Laccase verantwortlich (Claus 2004). Laccase-ähnliche Enzyme bei denen das T1 und damit die charakteristische Absorption fehlt wurden bereits beschrieben. So besitzt *Pleurotus* eine sogenannte “weiße Laccase“ die nur ein Kupferatom, zusammen mit zwei Zinkatomen und einem Eisenatom pro Molekül enthält (Palmieri et al. 1997). Daneben wurden auch “gelbe Laccasen“ beschrieben. Im Fall der gelben Laccasen scheint es sich um eine Modifikation blauer Laccasen durch Ligninabbauprodukte zu handeln (Leontievsky et al. 1997a,b).

Die Laccase kann unter anderem durch Fluorid-, Chlorid-, Cyanid-, Azid- und Hydroxylanionen gehemmt werden. Diese binden an T2/T3 und verhindern so den Elektronentransfer. Daneben wurden auch Metallionen (z.B. Hg^{2+}), Sulfhydrylverbindungen (z.B. Thioglykolsäure), Fettsäuren, Hydroxyglycin und kationische quarternäre Ammoniumlösungsmittel als Laccaseinhibitoren beschrieben (Keilin und Mann 1939, Xu 1996, 1997, 1999, Xu et al. 1998, Gianfreda et al. 1999, Johannes und Majcherczyk 2000, Baldrian 2006).

In strukturellen Unterschieden von Laccasen können auch die verschiedenen Redoxpotentiale der einzelnen Laccasen begründet sein (Piontek et al. 2002). So werden Laccasen in *low potential* (+0,5 V, bestimmt gegen eine normale Wasserstoffelektrode; z.B. *Myceliophthora thermophila*) und *high potential* (+0,7 bis +0,8 V; z.B. *Pycnoporus cinnabarinus*) entsprechend ihrem Redoxpotential eingeteilt (Xu 1996, Xu et al. 1998, Li et al. 1999). Xu (1996) beschrieb, dass die Redoxpotentialdifferenz zwischen Enzym und Substrat einen Einfluß auf die enzymatische Oxidation hat. Laccasen können nur Substrate oxidieren deren Redoxpotentiale unterhalb ihres eigenen liegen (Xu et al. 2000). Das erklärt wieso beispielsweise *ortho*- und *para*-dihydroxylierte Aromaten besonders gute Laccasesubstrate darstellen. Diese Verbindungen besitzen ein niedriges Redoxpotential (+0,5 bis +0,6 V), während *meta*-Diphenole ein Redoxpotential zwischen +0,8 und +1,1 V besitzen und somit

von Laccasen nicht oder nur schwer oxidiert werden können (Mai et al. 2001). Für die Oxidationsfähigkeit einer Verbindung spielen neben dem Redoxpotential auch sterische Behinderungen eine Rolle. So konnten Tadesse et al. (2008) zeigen, dass 2,4,6-Tritertiärbutylphenol und 2,6-Diisopropylphenol trotz gleichem Redoxpotential in unterschiedlichen Mengen oxidiert wurden, was auf sterische Behinderungen der Substituenten bei der Bindung der Substrate in der enzymatischen Tasche zurückgeführt wurde.

Zur Überbrückung von hohen Redoxpotentialen oder sterischen Problemen können Mediatoren eingesetzt werden (Tadesse et al. 2008). Mediatoren sind Verbindungen mit einem geringen Molekulargewicht, mit deren Hilfe Substanzen indirekt durch die Laccase oxidiert werden können. Dabei wird durch die Laccase zunächst der Mediator oxidiert, der dann von der enzymatischen Tasche wegdiffundiert und seinerseits das Substrat oxidiert (d'Acunzo et al. 2002, Claus 2003). Bourbonnais und Paice (1990) zeigten, dass bei Anwesenheit von 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) auch nicht-phenolische Ligninmodellbestandteile, wie beispielsweise Veratrylalkohol, als Laccasesubstrate dienen können. ABTS gehört wie auch 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yloxy (TEMPO) und 1-Hydroxybenzotriazol zu den synthetischen Mediatoren. Natürliche Mediatoren sind u.a. Malonat oder Oxalat. Diese organischen Säuren, aber auch Verbindungen wie Veratrylalkohol oder 3-Hydroxyanthranilsäure werden vom Pilz selbst gebildet und ausgeschieden. Zusätzlich können Mediatoren wie beispielsweise Syringaldehyd, Vanillin und *p*-Cumarsäure beim Zersetzungsprozess von hochpolymeren Substanzen (z.B. Lignin) entstehen (Wesenberg et al. 2003, Wells et al. 2006, Kunamneni et al. 2008). Die Laccase kann also bei der Ligninoxidation mit Polyphenolen und anderen aromatischen Zersetzungsprodukten reagieren, welche dann sowohl polymerisiert, als auch depolymerisiert werden oder als Mediatoren fungieren können (Bourbonnais et al. 1995). Ein Beispiel für ein potentiell großtechnisch einsetzbares Laccase-Mediator-System ist der Lignozym®-Prozess, bei dem eine Laccase und 1-Hydroxybenzotriazol zur Delignifikation in der Holzindustrie eingesetzt werden (Call und Mücke 1997). Weitere Enzym-Mediator Komplexe werden von der Firma Novozymes vertrieben, wie DeniLite® für den Abbau von Indigo bei der Jeansherstellung, Suberash® für die Korkmodifikation und Novozymes® 51003 für die Delignifikation bei der Papierherstellung (Morozova et al. 2007b).

Die Anwendungsmöglichkeiten von Laccasen im Rahmen der weißen Biotechnologie sind sehr vielfältig. Laccasen können allein bzw. zusammen mit Mediatoren u.a. die Bleichung von Holz (Balakshin et al. 2001, Widsten und Kandelbauer 2008, Valls und Roncero 2009), die formaldehydfreie Herstellung von Phenolharzen (Ikeda et al. 2000) sowie die Entfernung von Farbstoffen aus Abwässern beispielsweise in der Textilindustrie (Campos et al. 2001,

Wesenberg et al. 2003, Zille et al. 2005) katalysieren. Gerade in diesen Bereichen ist das Interesse an der Laccase als “grünem“, also umweltverträglichem Katalysator, der nur Sauerstoff benötigt und bei dessen Reaktion lediglich Wasser als Nebenprodukt entsteht, sehr groß (Riva 2006).

Des Weiteren kann die Laccase an der Bindung, und damit an der Immobilisierung und Detoxifikation von Xenobiotika maßgeblich beteiligt sein. Phenolische Verbindungen und deren Abbauprodukte können durch oxidative Kopplung in Humusmaterial inkorporiert werden. Durch diesen Prozess kann die Interaktion von Xenobiotika wie halogenierten Phenolen und Anilinen mit der biotischen Umwelt und somit deren Toxizität gesenkt werden (Hoff et al. 1985, Bollag et al. 1988, Bollag 1992a,b, Tatsumi et al. 1992, 1994a,b, Leonowicz et al. 2001, Gianfreda et al. 2006, Rubilar et al. 2008). Als eines von vielen Beispielen der Anwendung dieser Fähigkeit der Laccase ist die Sanierung von Böden, die mit polychlorierten Biphenylen kontaminiert sind, zu nennen (Bollag 1992a,b, Ahn et al. 2002). Die Transformation von chlorierten Phenolen (Bollag et al. 2003), 2-Hydroxydibenzofuran (Jonas et al. 1997), 2-Hydroxydiphenylether und 2-Hydroxybiphenyl (Jonas et al. 2000) mittels Laccase wurde ebenfalls beschrieben. Die Dehalogenierung und die dadurch bewirkte Detoxifikation von chlorierten Hydroxybiphenylen mit Laccase aus *Pycnoporus cinnabarinus* wurde von Schultz et al. (2001) untersucht. Neben der Dechlorierung von phenolischen Verbindungen (Minard et al. 1981, Roy-Arcand und Archibald 1991, Iimura et al. 1996, Leontievsky et al. 2001, Schultz et al. 2001) katalysiert die Laccase auch Decarboxylierungen (Agematu et al. 1992, 1993c, Tatsumi et al. 1994a, Leonowicz et al. 1984). Darüber hinaus können auch Methoxygruppen z.B. durch Demethylierungen (Leonowicz et al. 1979, 1984) angegriffen werden. Die Abspaltung von Substituenten resultiert wahrscheinlich aus dem Prozess der oxidativen Kopplung und weniger aus der direkten Enzymwirkung. So können die mittels Laccase gebildeten Radikale entweder miteinander koppeln, ohne dass ein Verlust von Substituenten auftritt, oder die Kopplung erfolgt unter Abspaltung von Substituenten (Dec et al. 2003).

Neben der Anwendung der Laccase im Umweltschutz ergeben sich auch Einsatzmöglichkeiten in der Lebensmittelindustrie. Hier wird die Laccase zur Entfernung von Phenolen aus Most eingesetzt, die zu einer unerwünschten Veränderung der Farbe und des Geschmacks des daraus gewonnenen Weines führen könnten (Piacquadio et al. 2002, Minussi et al. 2002, 2007). Da Laccasen als Lebensmittelzusatzstoffe noch nicht eingesetzt werden dürfen, spielen gerade in diesem Anwendungsbereich immobilisierte Laccasen eine große Rolle (Minussi et al. 2002). Diese Immobilisierung kann beispielsweise an Kieselgelträgern (Lante et al. 1992) oder aktivierten Agarosematrizes (Brenna und Bianchi 1994) erfolgen. Allgemein kann man zwischen chemischen und physikalischen Immobilisationsverfahren unterscheiden. Die chemische Immobilisation beruht darauf dass

das Enzym z.B. durch kovalente Bindungen an eine Matrix gebunden wird während bei der physikalischen Immobilisation das Enzym beispielsweise in porösen Hohlfasern oder einer unlöslichen Gelmatrix z.B. einem Polyacrylamidgel eingeschlossen wird (Durán et al. 2002). Zu den Vorteilen der Immobilisierung zählt neben der mehrfachen Nutzung der Laccase die i.d.R. gesteigerte Stabilität im Hinblick auf Veränderungen des pH-Wertes und der Temperatur (Mikolasch und Schauer 2009).

Zusätzlich zu den bereits aufgeführten Anwendungsgebieten wird die Laccase in Enzym-basierten Biosensoren beispielsweise zur Detektion von Morphin, Immunoglobulinen und diversen Catecholen (z.B. Dopamin, Adrenalin, 4-Methylcatechol) eingesetzt (Bauer et al. 1999, Kuznetsov et al. 2001, Ferry und Lech 2005, Huang et al. 2008, Kochana et al. 2008). Es bestehen auch Bestrebungen die Laccase in Brennstoffzellen zu nutzen (Chen et al. 2001, Coman et al. 2008, Deng et al. 2008, Glykys und Banta 2009, Amir et al. 2009). Daneben kann der Einsatz von Laccase auch eine Reihe von zunächst unerwarteten technischen Möglichkeiten eröffnen. So ergab Kakao, der in eine Lösung mit Laccase getaucht, getrocknet und geröstet wurde, eine besser schmeckende Schokolade als die Kontrolle (Minussi et al. 2002). Selinheimo et al. (2006) konnten bei Versuchen mit der Laccase von *Trametes hirsuta* die Stabilität und das Volumen von Brotteig steigern, was eine mögliche Anwendung in der Backindustrie erlaubt. Zudem kann die Laccase sogar in der Kosmetikindustrie Einsatz finden. Eine Verringerung von Hautirritationen und eine einfachere Handhabung von Laccase-basierten Haarfärbemitteln resultierten aus dem Ersatz von H_2O_2 durch Laccase als Oxidationsmittel (Lang und Cotteret 1999, Couto und Toca-Herrera 2006).

Die einzelnen biotechnologischen Anwendungsmöglichkeiten der Laccase umfassen somit zahlreiche Bereiche und sind in verschiedenen Industriezweigen, im Umweltschutz oder für analytische Zwecke (Biosensoren) von Bedeutung (Abb. 2).

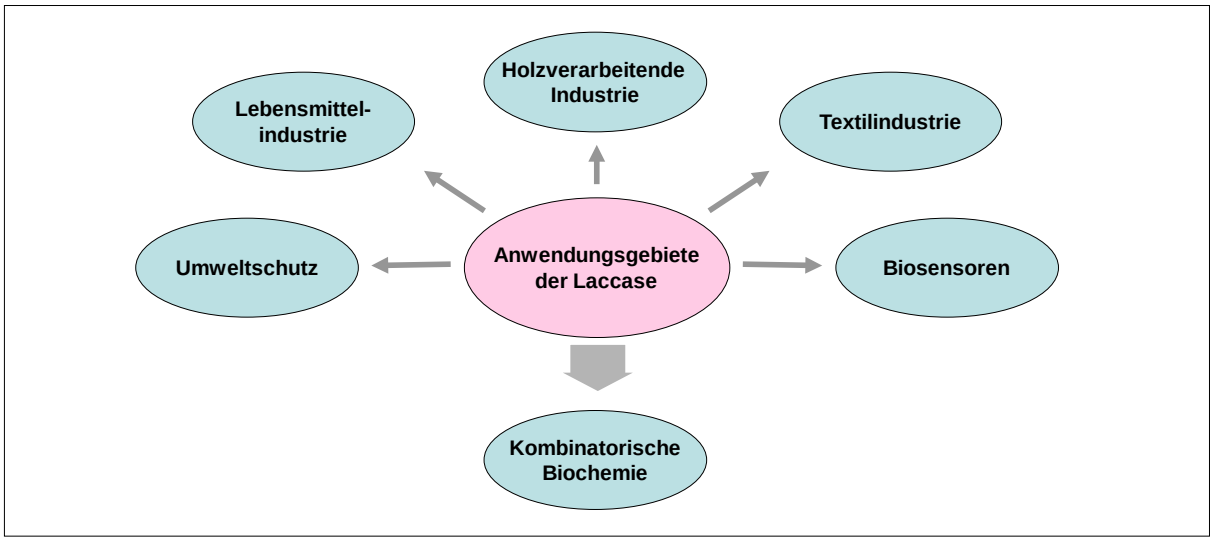


Abb. 2 Anwendungsmöglichkeiten der Laccase in der Biotechnologie

Darüber hinaus wird die Laccase zunehmend für die „Weiße Biotechnologie“ im Rahmen der kombinatorischen Biochemie genutzt, wobei Verbindungen unterschiedlicher Substanzklassen mit Hilfe der Laccase verknüpft werden. Dieser Anwendungsaspekt soll im Folgenden ausführlicher dargestellt werden.

2.1 Reaktionsmechanismus der Laccase im Hinblick auf die Synthese organischer Moleküle

Die Oxidation von Laccasesubstraten (aromatische Verbindung mit einer oder mehreren Hydroxylgruppen) führt zur Bildung freier Radikale (Xu 1999, Claus 2003). Auf diese Weise können zahlreiche aromatische Laccasesubstrate „aktiviert“ werden. Sie sind dann in der Lage, mit Molekülen der gleichen Art, anderen Laccasesubstraten oder auch mit Hunderten von Nicht-Laccasesubstraten zu reagieren und Kopplungsreaktionen mit verschiedenen Molekülen zu vollziehen. Die durch die Oxidation von unterschiedlichen Laccasesubstraten entstehenden Radikale unterliegen je nach den gewählten Bedingungen verschiedenen Reaktionen. Dabei können homo- und heteromolekulare Reaktionen unterschieden werden. Bei der homomolekularen Reaktion werden zwei Moleküle der gleichen Substanz verknüpft; bei der heteromolekularen Kopplung erfolgt eine Reaktion zwischen unterschiedlichen Verbindungen. Dabei zählen zu den möglichen Reaktionspartnern sowohl Verbindungen, die von der Laccase oxidiert werden können, als auch Substanzen, welche nicht oxidiert werden können. Auf diese Weise ist die Bildung von homo- oder heteromolekularen Hybridmolekülen möglich. Der/die Reaktionspartner können in Abhängigkeit von der Anzahl und Art der Substituenten sowie der Reaktionszeit ein- oder mehrmals verknüpft werden, was zur Bildung von Di-, Tri- oder Polymeren führt. Die Verknüpfung der Moleküle und somit der Bindungstyp ist abhängig von den Reaktionspartnern. Die homomolekulare Reaktion führt zu C-C- (Abb. 3A; Bollag et al. 1977, Jonas et al. 2000, Schultz et al. 2001, Ciecholewski et al. 2005), C=C- (Benfield et al. 1964, Simmons et al. 1989) und auch C-O-Bindungen (Leonowicz et al. 1984, Jonas et al. 1997). Die heteromolekularen Hybridmoleküle können bei phenolischen Reaktionspartnern über C-C- (Bollag et al. 1979, Anyanwutaku et al. 1994), C=C- (Simmons et al. 1989) und C-O-Bindungen (Bollag und Liu 1985) oder bei der Reaktion von aromatischen Aminen über C-N (Tatsumi et al. 1992, Manda et al. 2005, Niedermeyer et al. 2005) bzw. C=N (Abb. 3B; Simmons et al. 1989, Tatsumi et al. 1992, 1994a, Mikolasch et al. 2002, Niedermeyer et al. 2005) verknüpft sein.

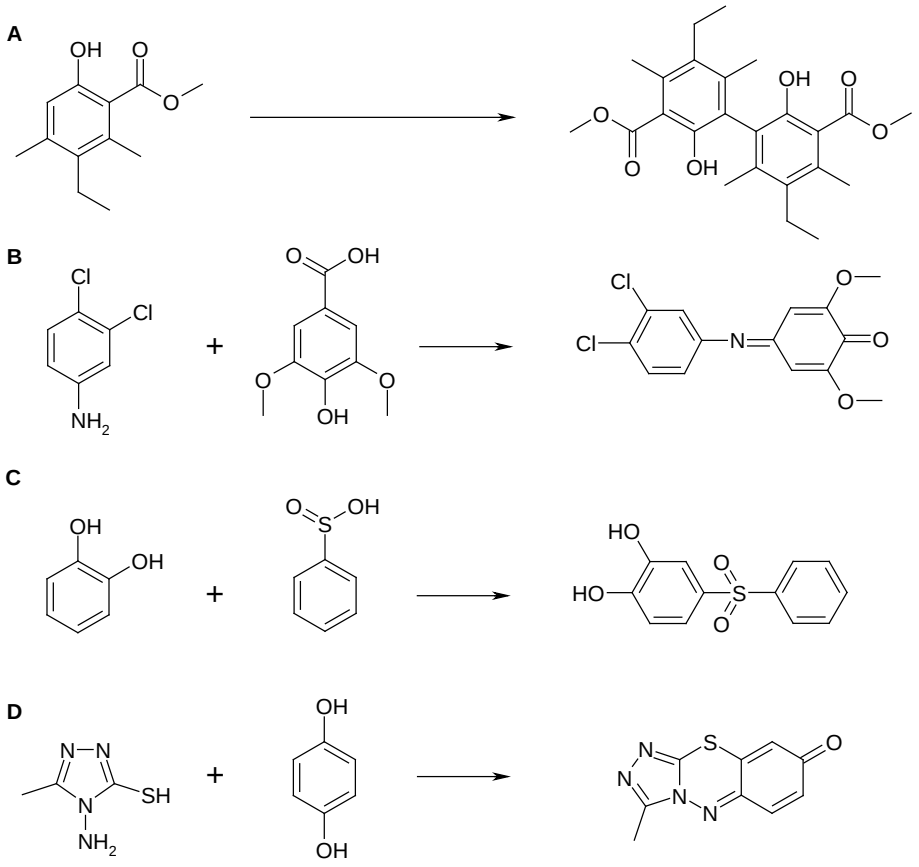


Abb. 3 Beispiele für die laccasekatalysierte Synthese von (A) homo- und (B-D) heteromolekularen Kopplungsprodukten (nach (A) Ciecholewski et al. 2005, (B) Tatsumi et al. 1994a, (C) Benfield et al. 1964 und (D) Bhalerao et al. 1994)

Gerade bei der Bildung von C-N-Bindungen - die auch bei den eigenen Arbeiten eine zentrale Rolle spielte - wird davon ausgegangen, dass es im Zuge der laccasekatalysierten Reaktion zur Entstehung von Kationenradikalen kommt, welche nachfolgend mit der Aminogruppe des Reaktionspartners über eine nukleophile Addition (Michael-Addition) reagieren (Niedermeyer et al. 2005). Neben den vorgestellten Bindungstypen sind auch C-S-Bindungen möglich (Abb. 3C; Benfield et al. 1964). Im Falle von Ringbildungen werden mehrere Bindungen geknüpft (Abb. 3D; Bhalerao et al. 1994). Eine Zusammenfassung über laccasekatalysierte homo- und heteromolekulare Reaktionen einschließlich der dabei gebildeten Produkte wurde von Mikolasch und Schauer (2009) erstellt.

Der Vorteil dieses als kombinatorische Biochemie bezeichneten Prozesses gegenüber chemischen Syntheseverfahren liegt vor allem in der Nutzung von milden, umweltschonenden Reaktionsbedingungen, wie die Verwendung von Raumtemperatur und Atmosphärendruck, sowie die Vermeidung von organischen Lösungsmitteln (Xu 1999). Darüber hinaus sind die Herstellung einer Vielzahl von Substanzen in kurzer Zeit und die Umsetzung auch von empfindlichen Natur- und Wirkstoffen möglich. Zudem können Verbindungen synthetisiert werden, die in der Natur nur selten vorkommen oder die erst aufwendig aus natürlichen Quellen isoliert werden müssen. Indem natürliche Ressourcen bewahrt werden, bietet die enzymatische Synthese auch eine Möglichkeit, zur Nachhaltigkeit beizutragen.

Die Synthese und Derivatisierung von biologisch aktiven Wirkstoffen bzw. Substanzen mit Wirkstoffgrundstrukturen stellt somit eine neue Einsatzmöglichkeit der Laccase dar. Aus diesem Grund wird in den folgenden Beispielen auf die laccaseinduzierte Herstellung von potentiell pharmakologisch und biotechnologisch nutzbaren Substanzen eingegangen. Diese Arbeiten bildeten eine wesentliche Basis für die vorliegende Dissertation, in der die Grundlagen für den Einsatz der Laccase zur Herstellung von neuen organischen Molekülen, als Wirkstoffe und Biomaterialien untersucht wurden.

3 Reaktionen zur Derivatisierung bzw. Synthese von Wirkstoffen und funktionellen Biomaterialien

Die Erforschung der Laccase als Katalysator hinsichtlich der Derivatisierung bzw. Synthese von Wirkstoffen begann in den 1960er Jahren. Seither wurden diverse Wirkstoffgruppen und Wirkstoffgrundstrukturen mit Hilfe der Laccase verändert und die verschiedenen Wirkungen erforscht. Einen Schwerpunkt bildete vor allem die Synthese von potentiell antimikrobiellen und antioxidativen aber auch östrogenen Verbindungen. Daneben wurde auch die Synthese von Klebstoffen und Lacken mittels Laccase untersucht. Für die Herstellung von neuen Wirkstoffen und Biomaterialien waren sowohl homo- und heteromolekulare Reaktionen als auch Polymerisationsreaktionen Gegenstand der Betrachtungen verschiedener Arbeitsgruppen.

3.1 Homomolekulare Reaktionen

3.1.1 Derivatisierung von östrogenen Substanzen

Die laccasekatalysierte Derivatisierung von östrogenen Wirkstoffen wurde u.a. von Lugaro et al. (1973) beschrieben. Dabei wurde die laccasevermittelte Transformation von verschiedenen hydroxylierten Steroiden in einem Zwei-Phasensystem, bestehend aus organischem Lösungsmittel und Puffer, durchgeführt. Die strukturelle Charakterisierung von zwei der insgesamt sechs homomolekularen Produkte aus der Reaktion mit Östradiol ergab eine direkte C-C-Bindung zweier Monomere zwischen den A-Ringen in der Position 1-2'- für das erste Produkt und in 1-4'-Position für das zweite Produkt (Abb. 4). Die Produkte der laccasekatalysierten Reaktion zeigten keine östrogene Aktivität.

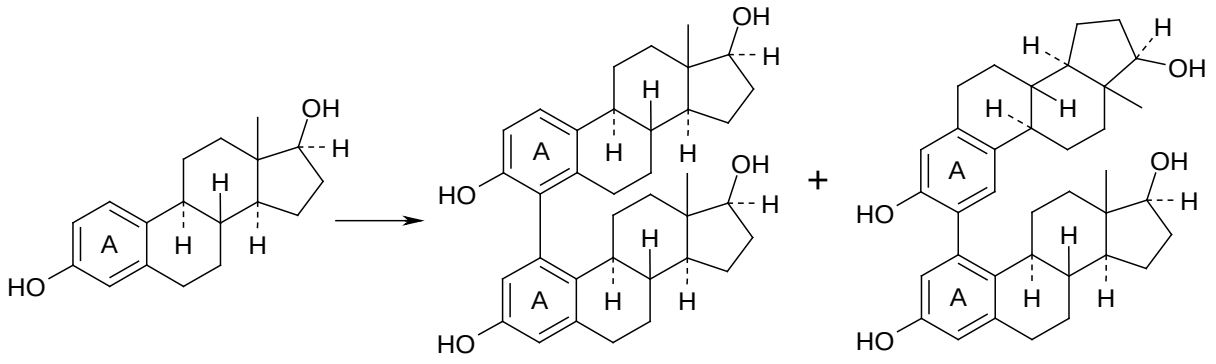


Abb. 4 Dimerbildung bei der laccasekatalysierten Reaktion von Östradiol (nach Lugaro et al. 1973)

Nach 30 Jahren wurde die Reaktion von Östradiol erneut untersucht (Nicotra et al. 2004b). Es wurden ebenfalls Dimere mit C-C-Bindungen gefunden (Abb. 5), allerdings andere als die von Lugaro et al. (1973) beschriebenen Produkte. Zudem wurden bei der wiederholten Untersuchung auch C-O verknüpfte Dimere nachgewiesen. Die Wirkung der Produkte wurde nicht untersucht.

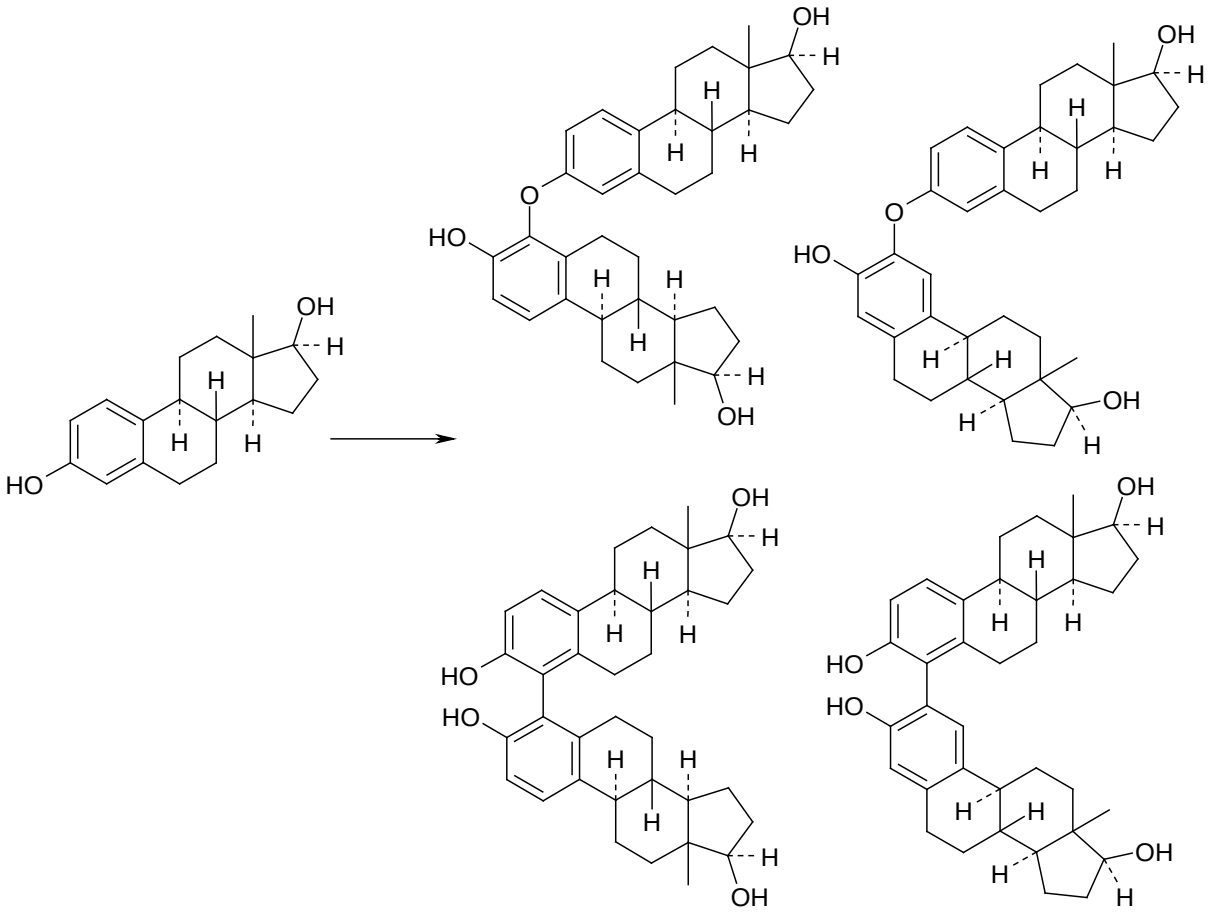


Abb. 5 Dimerbildung bei der laccasekatalysierten Reaktion von Östradiol (nach Nicotra et al. 2004b)

Neben Östradiol ist auch Bisphenol A eine östrogen wirkende Substanz, die mittels Laccase verändert werden kann. Bisphenol A, fällt bei der Polycarbonatherstellung an. Es kann in Gewässer gelangen und dort ein Umweltproblem darstellen (Krishnan et al. 1993). Im Rahmen dieser zusammenfassenden Darstellung ist Bisphenol A jedoch weniger als Schadstoff, sondern vielmehr als östrogen wirkende Substanz von Bedeutung, deren Wirkung mit Hilfe der laccasekatalysierten Reaktion verändert werden kann. Untersuchungen von Uchida et al. (2001) und Fukuda et al. (2001, 2004) zeigten, dass die Metabolisierung von Bisphenol A mit der Laccase von *Trametes villosa* in zwei Arten von Produkten resultierte. Auf der einen Seite wurden Verbindungen mit hohem Molekulargewicht durch oxidative Kondensation gebildet, wie z.B. C-C-verknüpfte Dimere (Abb. 6) oder Oligomere

mit möglichen C-O- oder C-C-Bindungen (unlösliche Fraktion) und auf der anderen Seite wurden diese Verbindungen zu phenolischen Substanzen mit einem geringen Molekulargewicht abgebaut, wie z.B. 4-Isopropenylphenol (lösliche Fraktion). Die Verbindungen sowohl der unlöslichen als auch der löslichen Fraktion hatten keine östrogene Wirkung.

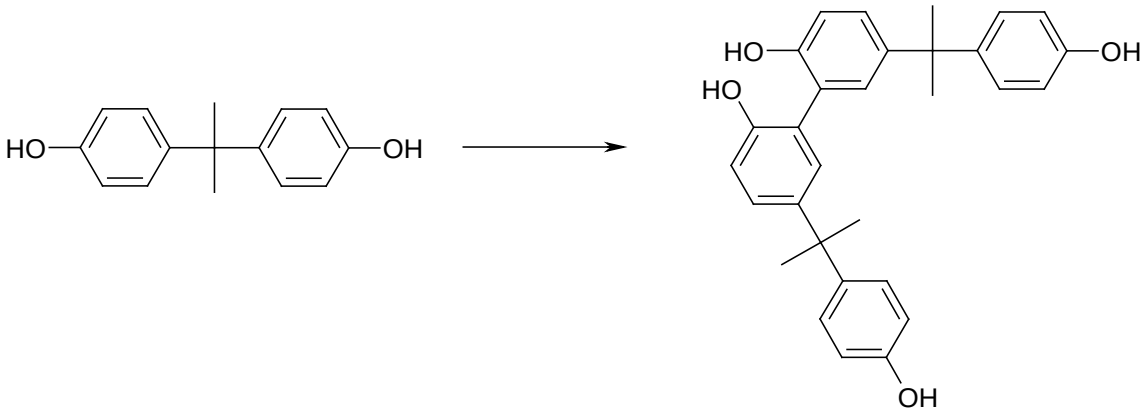


Abb. 6 Dimerbildung (5,5'-Bis-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-bisphenyl-2,2'-diol) bei der laccasekatalysierten Reaktion von Bisphenol A (nach Uchida et al. 2001)

Eine großtechnische Anwendung der Laccase von *Trametes versicolor* in Bioreaktoren wurde von Ricupito et al. (2009) an Abwasser gezeigt, das mit Bisphenol A verschmutzt war. Die Proliferationsrate und Vitalität von humanen Brustkrebszellen (MCF-7) sank mit der Dauer der Laccasebehandlung, also der zunehmenden Inaktivierung des Bisphenols A.

3.1.2 Derivatisierung von antioxidativen Substanzen

Im Gegensatz zur laccasevermittelten Derivatisierung von östrogenen Wirkstoffen, bei der die synthetisierten Produkte eine geringere Aktivität aufwiesen, als die der Ausgangswirkstoffe, wurden bei der Derivatisierung von antioxidativ wirkenden Verbindungen, Produkte gebildet, die - im Vergleich zur jeweiligen Ausgangsverbindung - zumindest eine gleich starke bzw. eine andere z.B. eine antibakterielle Wirkung hatten.

Bei der laccasevermittelten Reaktion des Phytoalexins Resveratrol wurde ein Dehydrodimer, mit einer C-C- und C-O-Bindung in einem Produktmolekül nachgewiesen (Abb. 7), das eine ähnlich hohe antioxidative Wirkung hatte wie das Resveratrol selbst (Nicotra et al. 2004a). Ponzoni et al. (2007) zeigten an Reaktionen mit Hydroxystilbenen (Analoge des Resveratrols), dass das gebildete Produkt durch eine Radikal-Radikal-Kopplung entstand.

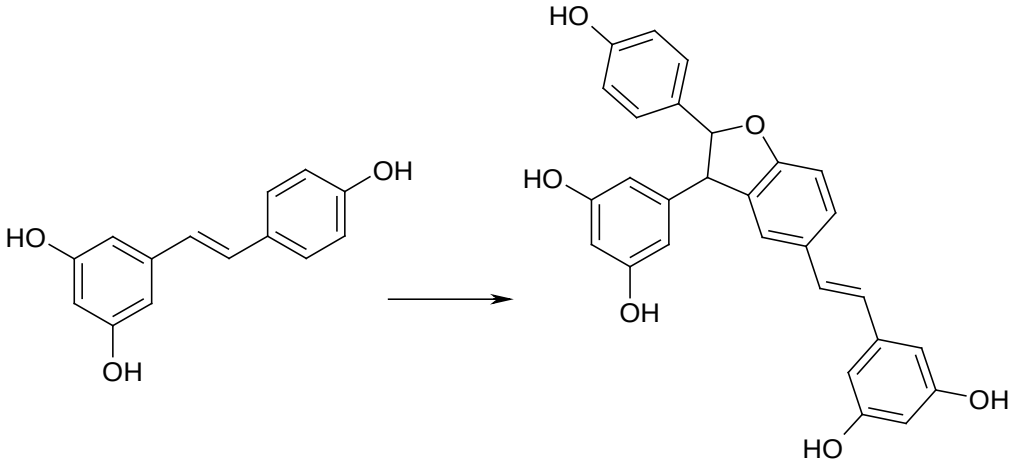


Abb. 7 Dehydrodimerbildung bei der laccasekatalysierten Reaktion von Resveratrol (nach Nicotra et al. 2004a)

Die laccasevermittelte Reaktion mit Resveratrol erfolgte, wie auch die Synthese von Phenoxazinon-Chromophoren über eine Ringbildung. Die Phenoxazinone resultierten dabei aus der Knüpfung von C=N- und C-O-Bindungen zwischen zwei Substratmolekülen (Eggert et al. 1995, Osiadacz et al. 1999, Bruyneel et al. 2008). Mitglieder der Gattung *Pycnoporus* produzieren orangerote Pigmente, die ihren Fruchtkörpern eine charakteristische Farbe geben. Die Pigmente vom Phenoxazinon-Typ sind z.B. Cinnabarin, Tramesanguin und die Cinnabarinsäure (Gripenberg 1951, Sullivan und Henry 1971). Aufgrund dessen wird *Pycnoporus cinnabarinus* auch “Zinnoberroter Zunderschwamm“ genannt. Eggert et al. (1995) nutzten *Pycnoporus cinnabarinus* Laccase und 3-Hydroxyanthranilsäure, die in der Natur vom Pilz selbst gebildet wird zur Synthese von Cinnabarinsäure (Abb. 8A).

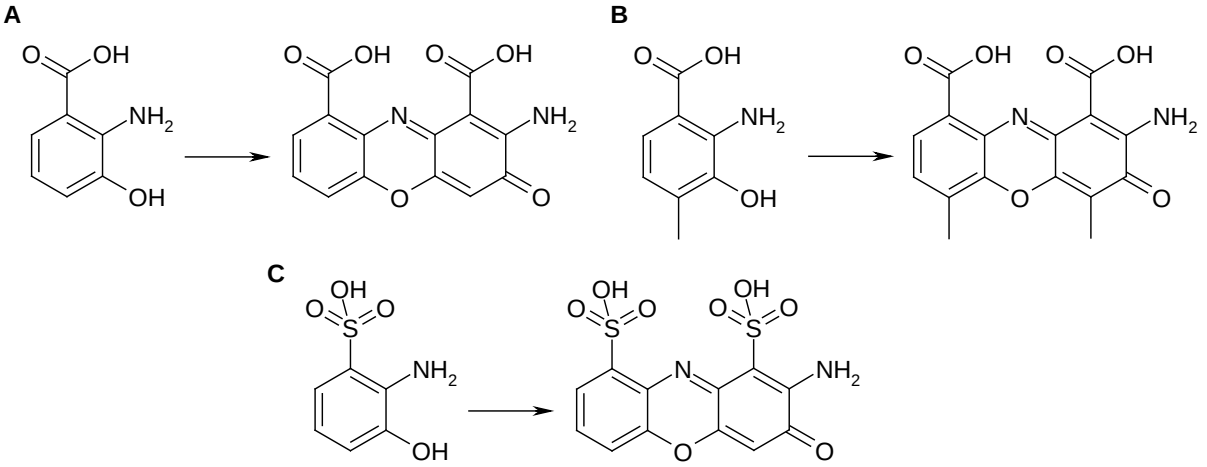


Abb. 8 (A) Synthese von Cinnabarinsäure (nach Eggert et al. 1995);
(B) Synthese von Actinocin (nach Osiadacz et al. 1999);
(C) Synthese von 2-Amino-3-oxo-3H-phenoxazin-1,9-disulfonsäure (nach Bruyneel et al. 2008)

Die Autoren nehmen an, dass 3-Hydroxyanthranilsäure zu Phenoxyradikalen reagiert, die dann zu einem Molekül 3-Hydroxyanthranilsäure und einem Molekül Chinonimin disproportionieren; im Anschluß daran wird ein Dimer gebildet. Die Besonderheiten dieses Dimers im Vergleich zu vielen anderen, mittels Laccase synthetisierten Produkten sind die zwei unterschiedlichen Bindungstypen C=N und C-O, welche bei einem Reaktionsschritt gebildet wurden. Cinnabarinsäure wird vermutlich als Produkt antioxidativer Reaktionen im Zuge der Eigenschaft der 3-Hydroxyanthranilsäure als Radikalfänger gebildet. Die Cinnabarinsäure wurde aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Actinomycin, einem Antibiotikum, hinsichtlich ihrer antibakteriellen Wirkung von Eggert (1997) getestet. Im Vergleich zur 3-Hydroxyanthranilsäure, wies die Cinnabarinsäure eine andere, also eine antibakterielle Wirkung auf. Dieses Beispiel belegt, dass mit Hilfe der laccasekatalysierten Reaktion, Produkte gebildet werden können, die andere Wirkungen besitzen als die für die Synthese genutzten Ausgangsstoffe. Der vom Mycel des Pilzes getrennte und konzentrierte Kulturüberstand enthielt große Mengen an Cinnabarinsäure und wies im Vergleich zur *in vitro* mittels Laccase hergestellten Cinnabarinsäure eine ähnlich hohe antibakterielle Aktivität auf. Allgemein war die hemmende Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien v.a. *Streptococcus*-Arten größer als bei gramnegativen Bakterien. Im Gegensatz dazu konnte bei einer Laccase-Defektmutante von *Pycnoporus cinnabarinus* zwar 3-Hydroxyanthranilsäure aber keine Cinnabarinsäure und keine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden. Die Autoren kamen zu dem Schluß, dass für eine antibakterielle Wirkung von *Pycnoporus cinnabarinus* die laccaseinduzierte Bildung der Cinnabarinsäure verantwortlich ist, die neben den strukturellen Übereinstimmungen auch Ähnlichkeiten mit der Synthese von Actinomycin D durch das blaue Kupferenzym Phenoxazinon-Synthase in *Streptomyces antibioticus* aufweist. Der antibakterielle Effekt der Cinnabarinsäure ist wahrscheinlich Teil eines Schutzmechanismus des Sporokarps im Verlauf der Reproduktion. Die zytotoxische Wirkung der Cinnabarinsäure stellten auch Hiramatsu et al. (2008) fest. Bei ihren Untersuchungen zeigte die Cinnabarinsäure eine 10fach höhere induzierende Aktivität der Apoptose gegenüber Thymozyten als 3-Hydroxyanthranilsäure. Actinomycin besitzt neben einer antibakteriellen zudem eine zytotoxische Wirkung, weshalb es als Antitumor-Antibiotikum eingestuft wird. Die zytotoxische Wirkung des Actinomycins wird auf die Hemmung der RNA-Synthese zurückgeführt. Das Actinomycin bindet an die DNA und verhindert so die RNA-Synthese (Goldberg et al. 1962, Reich et al. 1962, Morioka et al. 1985).

Neben der bisher vorgestellten Synthese der Cinnabarinsäure aus 3-Hydroxyanthranilsäure wurde eine Synthese von Phenoxazinon-Derivaten auch von Osiadacz et al. (1999) und Bruyneel et al. (2008) demonstriert, allerdings mit anderen Ausgangsstoffen.

So beschrieben Osiadacz et al. (1999) eine laccasekatalysierte Bildung von Actinocin aus 4-Methyl-3-hydroxyanthranilsäure (Abb. 8B). 4-Methyl-3-hydroxyanthranilsäure-Pentapeptid-lactone sind Precusoren zur Synthese von Actinomycin bei Streptomyceten (Keller 1984, Barry et al. 1989). Bruyneel et al. (2008) verwiesen darüber hinaus auf eine Möglichkeit zur Synthese von Phenoxazinonderivaten, die sich durch eine höhere Polarität auszeichneten und sich folglich besser für biologische Anwendungen eignen würden. Nach der chemischen Sulfonierung der 3-Hydroxyanthranilsäure erfolgte mit der Laccase von *Trametes versicolor* die Bildung eines Dimers (Abb. 8C). Für die hergestellten Phenoxazinon-Derivate würde sich eine Weiterentwicklung zu Antitumor-Antibiotika anbieten.

3.1.3 Derivatisierung von antibakteriellen Substanzen

Neben den bisher vorgestellten homomolekularen Reaktionen mit östrogenen und antioxidativen Ausgangsstoffen nutzten Ncanana et al. (2007) eine antibakterielle Verbindung und zwar (+)-Totarol für die laccasekatalysierte Synthese von C-C und C-O verknüpften Dimeren (Abb. 9).

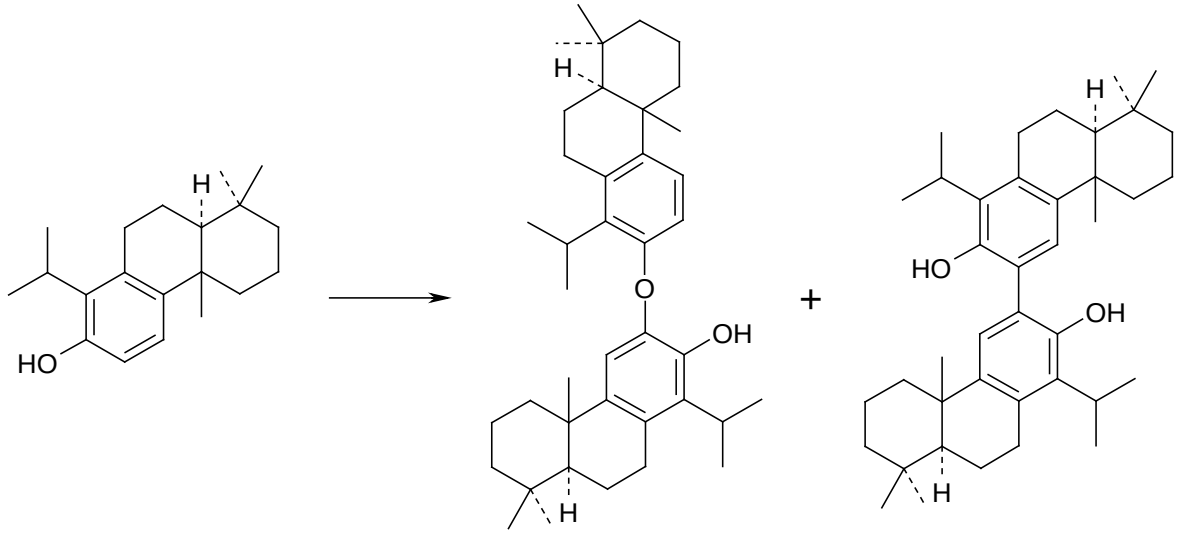


Abb. 9 Dimerbildung bei der laccasekatalysierten Reaktion von (+)-Totarol (nach Ncanana et al. 2007)

Das C-C verknüpfte Produkt wurde bereits 1963 von Bocks und Cambie beschrieben. Die Synthese erfolgte mit Hilfe eines pflanzlichen Enzyms, das aufgrund seiner physiologischen Eigenschaften als Laccase angesehen werden kann. Totarol selbst besitzt eine antibakterielle Wirkung, was wahrscheinlich der Grund dafür ist, dass die Bäume (z.B. *Podocarpus totara*), aus denen es gewonnen wird, sehr resistent gegenüber einem mikrobiellen Angriff sind. Daneben wurde auch eine hemmende Aktivität gegenüber

Plasmodien (Malariaerreger) nachgewiesen (Kubo et al. 1992, Clarkson et al. 2003, Smith et al. 2007).

Zur Optimierung der laccasevermittelten Reaktion von Totarol wurden verschiedene Lösungsmittel geprüft, welche mit Acetatpuffer kombiniert wurden (Ncanana et al. 2007). Die genutzten Lösungsmittel hatten eine Auswirkung auf den Reaktionsverlauf der enzymatischen Oxidation sowohl in Bezug auf den Substratumsatz als auch auf die Produktzusammensetzung. Beispielsweise waren die Geschwindigkeit der Reaktion und der Substratumsatz schneller in wassermischbaren Lösungsmitteln (Methanol, Acetonitril, Aceton) als in nicht-wassermischbaren Lösungsmitteln (Ethylacetat, Chloroform, *tert*-Butylmethylester, *tert*-Amylalkohol, Toluen). Auch Lugaro et al. (1973) wiesen nach, dass unpolarere Lösungsmittel weniger effizient waren und nahmen an, dass der Grund dafür in einer geringeren Löslichkeit des Ausgangsstoffes und einer stärkeren Inaktivierung der Laccase liegen würde. Ncanana et al. (2007) hingegen führten geringe Oxidationsraten auf einen unzureichenden Massetransfer der Reaktanten zum und im Falle des Produkts vom Enzym zwischen den unterschiedlichen Phasen zurück.

Die Variation des Reaktionsmediums ermöglicht den Einsatz der Laccase auch bei Reaktionen mit schlecht wasserlöslichen Wirkstoffen und zeigt, dass die Laccase in der Lage ist auch hohe Konzentrationen an organischen Lösungsmitteln zu tolerieren. Zudem können auch die Enzymselektivität und damit die Umsatzraten, sowie das daraus resultierende Produktmuster mit Hilfe unterschiedlicher Reaktionsmilieus der angestrebten Synthese angepasst und optimiert werden. Unter Anwendung dieses als “medium engineering“ bezeichneten Prinzips ist die Laccase noch interessanter für die kombinatorische Biochemie (Ottolina et al. 1994, Wescott und Klibanov 1994, Carrea und Riva, 2000) und kann generell auch auf andere Substanzklassen übertragen werden. In eigenen Untersuchungen wurde der Einfluß des Lösungsmittels Methanol auf die laccasekatalysierte Reaktion ermittelt.

Neben Totarol beschrieben Agematu et al. (1993a) ein weiteres Beispiel für die laccasevermittelte Derivatisierung antibakterieller Verbindungen mit der Synthese von dimeren Produkten aus verschiedenen Estern des Penicillin X. Die Nutzung von Estern ergab sich aus der höheren Stabilität und einfacheren Isolation der Dimere, verglichen mit den Reaktionsprodukten des Penicillin X Natriumsalzes. Die Dimere des Penicillin X Methylesters zeigten kaum antibakterielle Aktivität. Demgegenüber stellte das aus dem Penicillin X Pivaloyloxymethylester gebildete *ortho-ortho* Kopplungsprodukt (Abb. 10) eine Vorstufe (Prodrug) des Penicillin X Dimers dar.

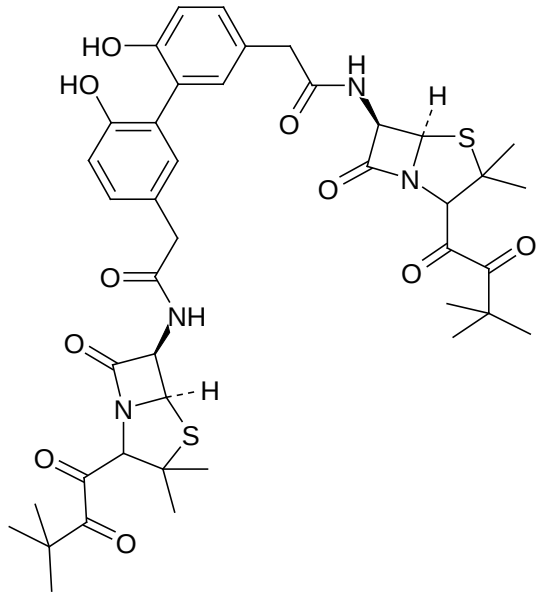


Abb. 10 Penicillin X Pivaloyloxymethylester Dimer (nach Agematu et al. 1993a)

Bei der Anwesenheit einer Esterase konnte die Pivaloyloxymethylestergruppe leicht hydrolysiert werden, sodass der aktive Teil des Moleküls die getesteten Bakterienstämme hemmen konnte. Die minimale Hemmkonzentration war allerdings geringer als die des Penicillin X Natriumsalzes.

Die von Agematu et al. (1993b) untersuchte laccasekatalysierte Reaktion eines Cephalosporinsäure-Derivates resultierte in der Bildung eines Spiro-Epoxides (Abb. 11). Das synthetisierte Epoxid bestand aus zwei Diastereomeren, welche sich in ihrer Konfiguration am C-2' und ihrer antibakteriellen Wirkung unterschieden. Trotzdem zeigten beide Verbindungen eine geringere Aktivität als die Ausgangsverbindung.

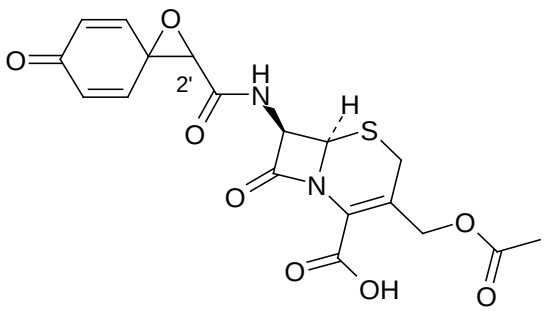


Abb. 11 Diastereomeres Produkt 7-[1-Oxaspiro(2.5)octa-6-oxo-4,7-dien-2-carboxamido]-cephalosporinsäure (nach Agematu et al. 1993b)

3.2 Heteromolekulare Reaktionen

Für die Synthese von Hybridmolekülen werden zwei verschiedene Substanzen zusammen mit der Laccase inkubiert, wobei i.d.R. nur eine Substanz das eigentliche Laccasesubstrat darstellt (vgl. Kap. 3.1). Insbesondere diese Verknüpfung von unterschiedlichen Substanzklassen mit Hilfe der Laccase ermöglicht die Synthese einer Vielzahl von organischen Molekülen, was auch für die vorliegende Dissertation genutzt wurde. Als Resultat dieser Reaktion können nicht nur heteromolekulare Dimere sondern auch Oligomere entstehen. Die Kopplung oder Derivatisierung von Wirkstoffen bzw. Wirkstoffgrundstrukturen erlaubt die Entwicklung neuer Wirkstoffe und Arzneimittel, sowie die Verbesserung der Wirksamkeit oder auch Verträglichkeit eines bereits angewendeten Arzneimittels. Indem zwei unterschiedliche Wirkstoffe mit Hilfe der Laccase zu einer neuen Verbindung verknüpft werden können und somit eine synergistische Wirkung erreicht werden kann, stellen heteromolekulare Reaktionen eine Weiterentwicklung zu den im vorigen Abschnitt vorgestellten homomolekularen Reaktionen dar. Aber auch die Kopplung von Verbindungen, die keine eigene beschriebene Wirksamkeit aufweisen oder die Grundstrukturen von Wirkstoffen darstellen, kann mittels Laccase zu biologisch aktiven Verbindungen führen.

3.2.1 Derivatisierung von antimikrobiellen Substanzen

Gerade im Hinblick auf zunehmende Multiresistenzen bei Mikroorganismen wächst der Bedarf an antimikrobiellen Verbindungen, die ein breiteres Wirkungsspektrum und geringere Nebenwirkungen besitzen als die zurzeit verfügbaren Medikamente.

3.2.1.1 Derivatisierung von Mithramycin

Anyanwutaku et al. (1994) beschrieben die laccasekatalysierte Reaktion von Mithramycin, einem Antitumor-Antibiotikum und 1,4-Hydrochinon. Die Bildung eines heteromolekularen Dimers (Abb. 12) erfolgte mit der Laccase von *Polyporus anceps*.

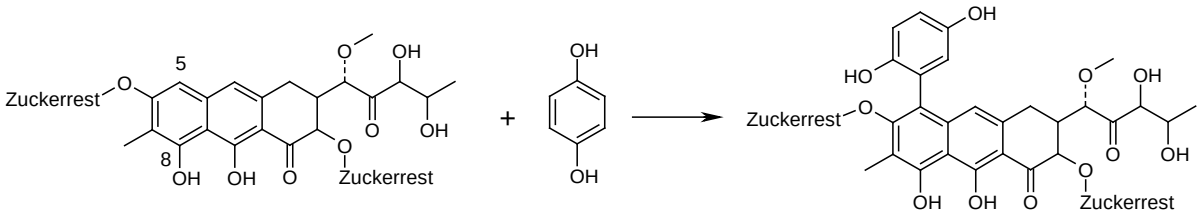


Abb. 12 Bildung eines heteromolekularen Dimers bei der laccasekatalysierten Reaktion von Mithramycin und 1,4-Hydrochinon (nach Anyanwutaku et al. 1994)

Das Produkt entstand auch bei der nicht-enzymatisch-katalysierten Reaktion mit 1,4-Benzochinon. Die Strukturanalysen der Produkte ergaben eine C-C-Bindung des Hydrochinons an das Aglycon des Mithramycins. Die Autoren gehen davon aus, dass nicht nur das 1,4-Hydrochinon sondern auch das Mithramycin, also beide Ausgangsstoffe durch die Laccase oxidiert werden. Das dabei entstehende Phenoxy-Radikal in Position C-8 des Mithramycins würde zu einem C-5-Kohlenstoffradikal isomerisieren und dann mit dem aus Hydrochinon gebildeten Semichinon-Radikal koppeln.

Das gebildete heteromolekulare Dimer zeigte keine Wirkung gegenüber einer Leukämie-Zelllinie. Es wurde vermutet, dass aufgrund der Blockierung der C-5-Position die Bildung reaktiver Radikale oder die Bindung an die DNA verhindert wird.

3.2.1.2 Derivatisierung von *β*-Lactam-Antibiotika

Die laccasekatalysierte Synthese von heteromolekularen Dimeren resultierend aus der Reaktion von Antibiotika mit dihydroxylierten Verbindungen wurde auch von Mikolasch et al. (2006, 2007, 2008a,c) untersucht. In einer Reihe von Untersuchungen zur Derivatisierung von *β*-Lactam-Antibiotika bzw. Antibiotika-Grundstrukturen wurden verschiedene Produkte isoliert und strukturell charakterisiert. Die Bindung zwischen den jeweiligen Kopplungspartnern erfolgte über eine C-N-Brücke, wobei die Aminogruppe des Antibiotikums mit dem entsprechenden Chinon aus *ortho*- oder *para*-dihydroxylierten Aromaten reagierte. Die dabei entstandenen Penicillin- und Cephalosporin-Derivate wurden hinsichtlich ihrer Wirkung detailliert charakterisiert. So isolierten Mikolasch et al. (2006) acht neue Penicilline aus den Reaktionen von Ampicillin bzw. Amoxicillin mit verschiedenen 2,5-Dihydroxybenzoesäurederivaten als Laccasesubstrate (Abb. 13A). Ampicillin und Amoxicillin sind *β*-Lactamantibiotika mit einer freien Aminogruppe, welche sie für die laccasekatalysierte Derivatisierung prädistiniert. Neben der Synthese von neuen Penicillinen wurden auch die Cephalosporine Cefadroxil, Cefalexin, Cefaclor und Loracarbef von Mikolasch et al. (2007) mit den *para*-dihydroxylierten aromatischen Verbindungen der vorangegangenen Studie derivatisiert (Abb. 13B). Im Vergleich zu den Penicillinen zeichnen sich Cephalosporine durch eine höhere *β*-Lactamasestabilität aus und besitzen ebenfalls eine freie Aminogruppe, die potentiell derivatisiert werden kann.

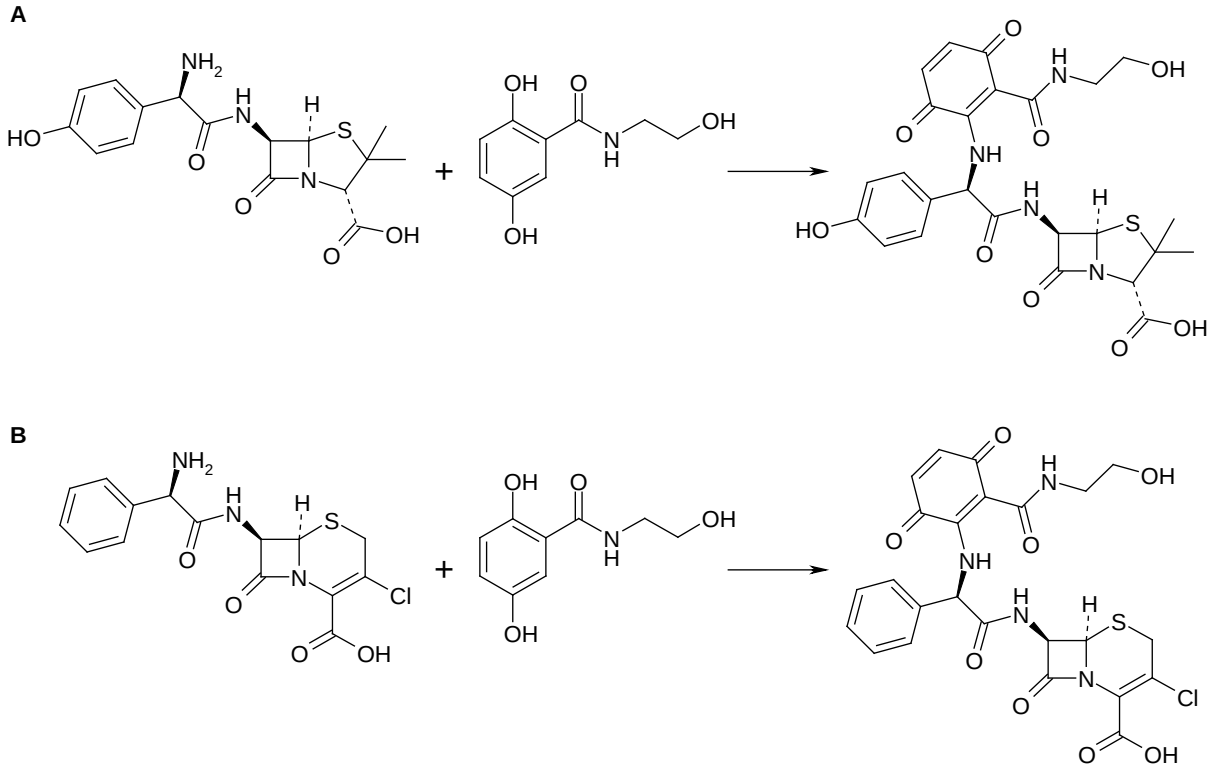


Abb. 13 Bildung eines heteromolekularen Dimers bei der laccasekatalysierten Reaktion von
(A) Amoxicillin und 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid (nach Mikolasch et al. 2006) sowie
(B) Cefaclor und 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid (nach Mikolasch et al. 2007)

Die neuen Produkte zeigten im Agardiffusionstest eine moderate bis starke wachstumshemmende Wirkung gegenüber den meisten eingesetzten Bakterienstämmen, einschließlich multiresistenten *Staphylococcus*- und *Enterococcus*- Stämmen. Darüber hinaus wurde die *in vivo* Aktivität der neuen Verbindungen getestet. Dabei wurden Mäuse mit *Staphyllococcus aureus* infiziert und nach Applikation des mittels Laccase synthetisierten Antibiotikum-Derivates das Überleben der Mäuse registriert. Alle Mäuse überlebten im Gegensatz zu den unbehandelten Mäusen. Zudem zeigten die Mäuse keine Intoxikationserscheinungen. Die Testung eines Penicillin-Derivates (Abb. 13A) ergab eine erhöhte *β*-Lactamasestabilität. Der log D Wert aller Produkte mit einer Penicillin-Komponente war ebenfalls deutlich höher verglichen mit den eingesetzten Penicillinen Ampicillin und Amoxicillin (Mikolasch et al. 2006). Daraus resultiert eine gute Absorption der Verbindungen durch den Gastrointestinaltrakt und ermöglicht eine perorale Anwendung. Die einzelnen Testergebnisse belegen, dass mit Hilfe der laccasekatalysierten Derivatisierung von Antibiotika neue Substanzen hergestellt werden können, die in ihrer Wirkung der der Ausgangsverbindungen ebenbürtig und sogar überlegen sein können.

Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Untersuchungen nutzten Mikolasch et al. 2008c *ortho*-dihydroxylierte aromatische Verbindungen (Catechole) zur Derivatisierung der *β*-Lactam-Antibiotika Ampicillin, Amoxicillin, Cefadroxil und Loracarbef (Abb. 14).

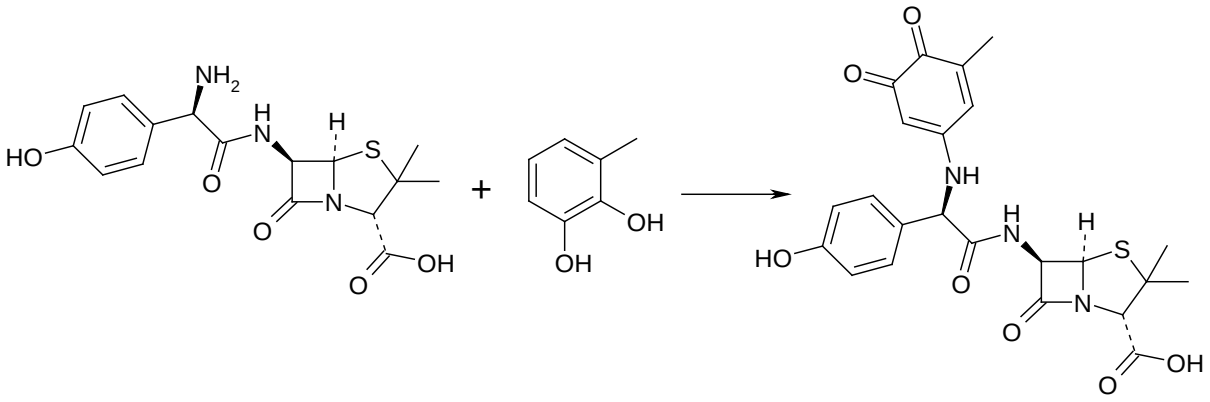


Abb. 14 Bildung eines heteromolekularen Dimers bei der laccasekatalysierten Reaktion von Amoxicillin und 3-Methylcatechol (nach Mikolasch et al. 2008c)

Catecholderivatisierte *β*-Lactame zeigen eine höhere Penetrationsfähigkeit in Bakterienzellen durch eine verstärkte Aufnahme über Eisentransportsysteme (Mochizuki et al. 1988, Nakagawa et al. 1989, Erwin et al. 1991, Jones und Erwin 1992). Die Wirkung der von Mikolasch et al. (2008c) isolierten Produkte unterschied sich in Abhängigkeit von ihrer Antibiotika-Komponente. Demnach wiesen die Penicillin-Derivate eine stärkere antibakterielle Wirkung auf als die Cephalosporin-Derivate. Allgemein konnte die antibakterielle Aktivität nicht nur im Agardiffusionstest sondern auch *in vivo* bestätigt werden. Nach der Applikation der Produkte überlebten 30-60 % der Mäuse, während mit den zur Synthese eingesetzten Antibiotika alle Mäuse überlebten. Daneben konnte eine leichte Toxizität gegenüber einer humanen amniotischen Epithelzelllinie festgestellt werden. Die Methylcatechole, also die Ausgangsstoffe der Produktsynthese wiesen eine relativ hohe Zytotoxizität auf. Die Autoren geben dafür keine Erklärung aber theoretisch wäre eine Reaktion mit Bestandteilen des verwendeten Mediums denkbar, bei der Produkte mit einer hohen Toxizität entstehen könnten.

Ein Vergleich der einzelnen Reaktionspartner hinsichtlich ihrer Tauglichkeit für die Synthese von Wirkstoffen ergibt, dass die eingesetzten *para*-dihydroxylierten Benzoesäurederivate besser zur Derivatisierung von Penicillinen und Cephalosporinen geeignet waren als die genutzten *ortho*-dihydroxylierten Verbindungen. Aus diesem Grund wurden auch bei den eigenen Untersuchungen ausschließlich *para*-dihydroxylierte Substanzen für die laccasevermittelte Derivatisierung von Wirkstoffen bzw. Wirkstoffgrundstrukturen genutzt.

Die gezeigten Beispiele belegen, dass selbst bei Substanzklassen, die lange Zeit bekannt sind und mehrfach auf chemischem Wege derivatisiert wurden, neue Verbindungen mit Hilfe der Laccase synthetisierbar sind und in vielen Fällen die biologische Aktivität der gebildeten Produkte im Vergleich zu den Ausgangsstoffen zumindest erhalten bleiben kann. Die biologische Wirkung ist aber nicht das einzige, obgleich ein entscheidendes Merkmal von Arzneimitteln, auch die Stabilität gegenüber Resistenzstrategien von Mikroorganismen, sowie die Toxizität und Verteilung im Organismus sind wichtige Eigenschaften. Die laccasevermittelte Synthese kann zur Verbesserung gerade dieser Eigenschaften wie von Mikolasch et al. (2006) gezeigt wurde, in besonderem Maße genutzt werden.

3.2.1.3 Derivatisierung von Corollosporin-Derivaten

Ein Beispiel für eine erhebliche Amplifikation der antibakteriellen Wirkung von Syntheseprodukten der Laccase im Vergleich zu den Ausgangsstoffen stellt die Derivatisierung von *N*-analogen Corollosporinen dar (Mikolasch et al. 2008a). Corollosporin ist eine antibakterielle Substanz, die aus dem marinen Pilz *Corollospora maritima* (gefunden auf Treibholz in der Nordsee) isoliert wurde (Liberra et al. 1998). In den Versuchen von Mikolasch et al. (2008a) wurden aminierte *N*-analoge Corollosporin-Derivate mit 2,5-Dihydroxybenzoesäurederivaten über C-N-Bindungen verknüpft (Abb. 15).

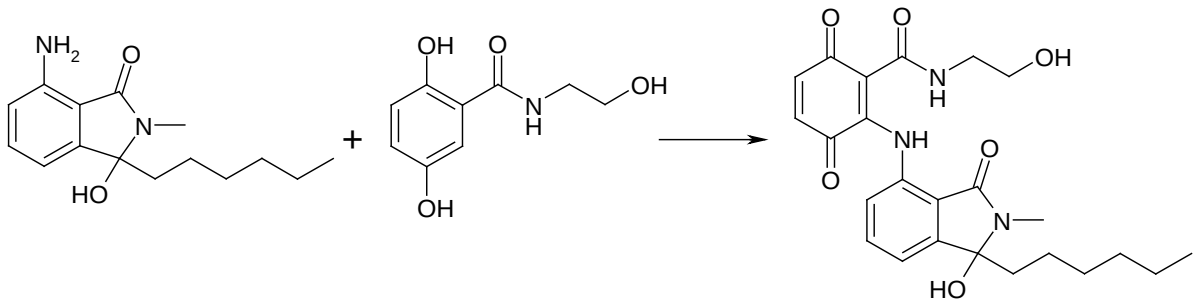


Abb. 15 Bildung eines heteromolekularen Dimers bei der laccasekatalysierten Reaktion eines *N*-analogen Corollosporin-Derivates und 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid (nach Mikolasch et al. 2008a)

Die *N*-analogen Corollosporin-Derivate zeigten eine geringere Wirkung als das Corollosporin. Durch die laccasevermittelte Derivatisierung konnte die Aktivität gesteigert werden. Die antibakterielle Aktivität der Produkte überstieg nicht nur die Wirkung der *N*-analogen Corollosporin-Derivate, sondern auch die des Corollosporins. Die Autoren führen die amplifizierte Wirkung der heteromolekularen Produkte auf einen synergistischen Effekt der chinoiden und Corollosporin-Komponente des Hybridmoleküls zurück.

3.2.1.4 Antimikrobielle Substanzen zur Herstellung funktionalisierter Oberflächen

Antibiotika können mittels Laccase auch an Oberflächen gebunden werden, was im weiteren Sinne ebenfalls als Derivatisierung angesehen werden kann. Die Laccase ermöglicht also eine Funktionalisierung von Oberflächen. Aufgrund der phenolischen Bestandteile von Materialien wie Holz ist eine Verknüpfung mit bioaktiven Verbindungen beispielsweise antibakteriellen oder antifungalen Substanzen möglich, um so dem Holz eine neue Funktion zu geben. Kudanga et al. (2008) verknüpften Ligninmodellverbindungen mit phenolischen Aminen, wobei die Bildung von heteromolekularen Produkten nur nachgewiesen wurde, wenn mindestens eine der beiden Verbindungen ein Laccasesubstrat darstellte. Dieses Prinzip wurde dann auf Holz übertragen. Der Anteil an gebundenen Molekülen einer antifungalen Verbindung (Thiabendazol oder Propiconazol) an Buchenholzstücken, die mit phenolischen Aminen funktionalisiert wurden, war bis zu 58 % höher im Vergleich zu Stücken die allein mit Laccase aktiviert wurden. Die Autoren gehen davon aus, dass die phenolischen Amine über Etherbindungen an die Holzoberfläche gebunden werden und die noch freie Aminogruppe für eine Kopplung mit funktionalisierten Molekülen (z.B. Azole) zur Verfügung steht. Die Bildung von Etherbindungen wurde auch für die laccasekatalysierte Funktionalisierung von Cellulosefasern mit aromatischen Aminen beschrieben (Kim et al. 2007). Allerdings ließen Kudanga et al. (2008) die Frage offen, wieso auch eine Bindung der Azole an das Holz ohne vorherige Funktionalisierung erfolgte. Die eingesetzten Azole besitzen keine Hydroxylgruppen, sodass nach eigenen Erfahrungen eine Etherbindung sehr unwahrscheinlich ist.

3.2.2 Derivatisierung von antioxidativen Substanzen

Neben Antibiotika können aber auch andere Wirkstoffe wie beispielsweise antioxidative Substanzen für die laccasekatalysierte Derivatisierung genutzt werden. Die *para*-dihydroxylierte Substanz 1,4-Hydrochinon wurde von Hosny und Rosazza (2002) mit Hilfe der Laccase von *Rhus vernicifera* mit (+)-Catechin verknüpft, wobei zwei heteromolekulare Dimere gebildet wurden (Abb. 16). Die Autoren nehmen an, dass die Produktbildung über eine Radikal-Radikal-Reaktion verläuft. Dabei würde das Phenoxy-Radikal des Catechins mit einem Semichinon unter Bildung eines hydrochinoiden heteromolekularen Dimers koppeln. Die bei dem jeweiligen Produkt entstandene C-C-Bindung befindet sich am B-Ring des Catechins. Die isolierten Produkte wurden hinsichtlich ihrer Lipidperoxidproduktion in Rattenhirnhomogenaten und Ratenlebermikrosomen untersucht und zeigten eine zwei- bis viermal höhere antioxidative Wirkung als der Ausgangsstoff (+)-Catechin.

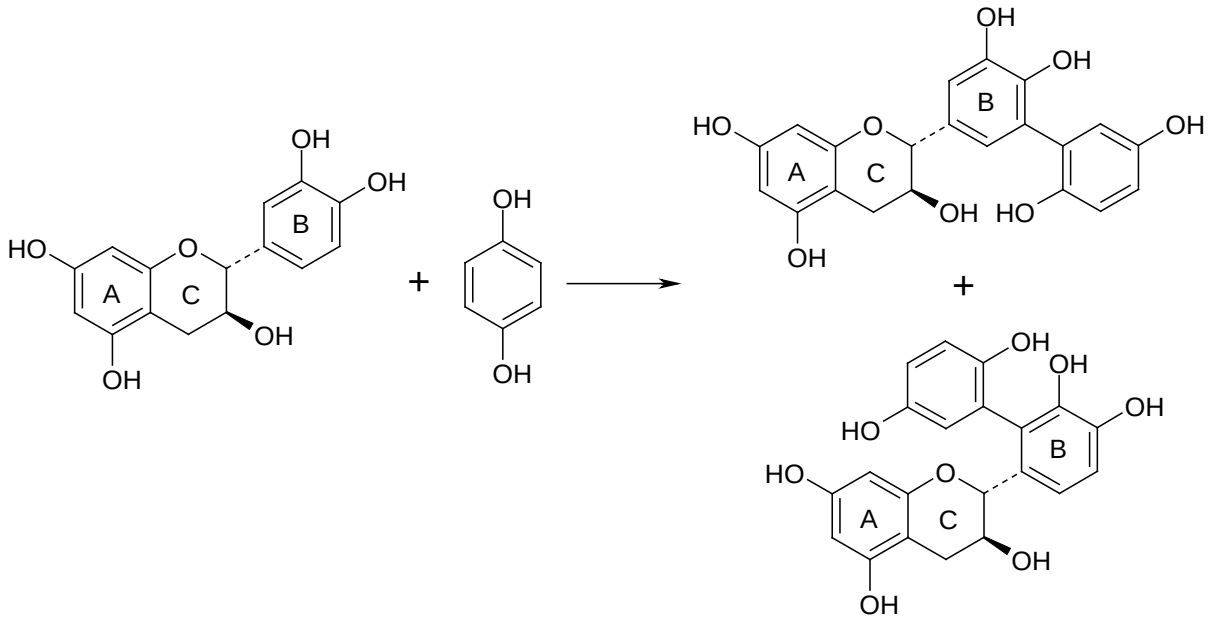


Abb. 16 Bildung heteromolekularer Dimere bei der laccasekatalysierten Reaktion von (+)-Catechin und 1,4-Hydrochinon (nach Hosny und Rosazza et al. 2002)

3.2.3 Derivatisierung von primären Aminen zur Synthese von zytotoxisch und antineoplastisch wirkenden Substanzen

Ebenso vielversprechend wie die bisher vorgestellten Beispiele zur laccasekatalysierten Synthese von neuen Wirkstoffen ist auch die Derivatisierung von primären Aminen. Allerdings wurde die Aktivität dieser mittels Laccase synthetisierten Produkte bislang wenig untersucht. Ein Beispiel für die Testung von Derivaten primärer Amine, die mit Hilfe der laccasevermittelten Reaktion hergestellt wurden, beschrieben Poeckel et al. (2006). Ausgehend von der Isolation verschiedener Aminochinone durch Niedermeyer et al. (2005) bestimmten Poeckel et al. (2006) sowohl die Zytotoxizität als auch die antineoplastische Aktivität dieser Verbindungen. Die für die Synthese der Aminochinone als Laccasesubstrate eingesetzten 2,5-Dihydroxybenzoesäurederivate und alkylierten 1,4-Hydrochinone wurden dabei mit verschiedenen primären aromatischen Aminen z.B. 4-Aminobenzoesäure und 4-Propylphenylamin über stabile C-N-Bindungen verknüpft. Unter den gebildeten Produkten waren nicht nur mono- sondern auch diaminierte Derivate. Die Produktbildung war sowohl von den Reaktionspartnern abhängig als auch von der Art der eingesetzten Laccase bzw. dem pH-Wert des genutzten Puffers. Poeckel et al. (2006) charakterisierten einen Teil der di- und trimeren Produkte hinsichtlich der antineoplastischen Aktivität und der hemmenden Wirkung auf die humane 5-Lipoxygenase. Das Enzym 5-Lipoxygenase regt die Bildung von Leukotrienen an (Werz et al. 2001, Werz 2002), die u.a. an der Krebsentstehung beteiligt

sind (Clària und Romano 2005). Im Hinblick auf einen antineoplastischen Effekt und einem Einsatz als Hemmstoff für die 5-Lipoxygenase schlagen die Autoren für die isolierten Aminochinone einen Einsatz in der Krebstherapie vor. Die biologische Testung der Aminochinone ergab eine antineoplastische Aktivität und eine hemmende Wirkung auf die 5-Lipoxygenase nur bei Produkten mit einem alkylierten Chinon als Molekülbestandteil und nicht bei den 2,5-Dihydroxybenzoesäurederivaten. Die getesteten trimeren Produkte zeigten keine Aktivität. Zudem waren lipophilere Substanzen bessere Inhibitoren der 5-Lipoxygenase als Verbindungen mit hydrophilen Resten an der Aminokomponente. Das Dimer der Reaktion von 4-Propylphenylamin mit 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon (Abb. 17A) hatte unter den getesteten Verbindungen die höchste antineoplastische Wirkung und hemmende Aktivität auf die 5-Lipoxygenase.

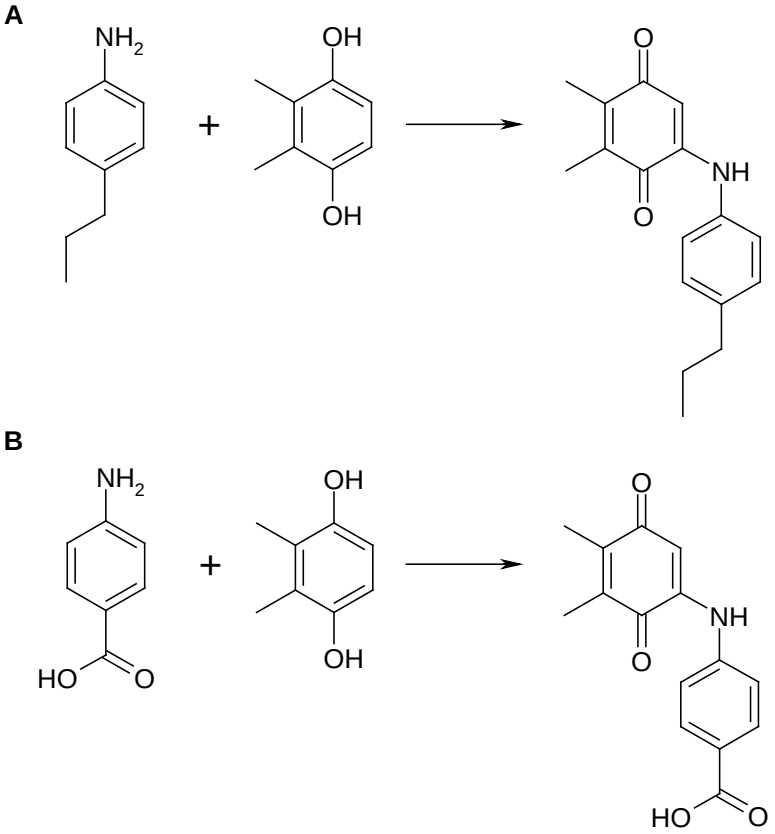


Abb. 17 Bildung eines heteromolekularen Dimers bei der laccasekatalysierten Reaktion von
(A) 4-Propylphenylamin und 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon sowie
(B) 4-Aminobenzoesäure und 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon (nach Niedermeyer et al. 2005)

Die hohe Aktivität wurde mit der Lipophilie der Verbindung erklärt, da diese Eigenschaft zu einer stärkeren Penetration durch die Plasmamembran führt. Trotzdem konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Lipophilie, der inhibitorischen Wirkung auf die 5-Lipoxygenase und einem antineoplastischen Effekt nicht gezeigt werden. So hatte das Produkt der

Reaktion von 4-Aminobenzoesäure und 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon (Abb. 17B) zwar eine antineoplastische aber keine hemmende Wirkung auf die 5-Lipoxygenase. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Lipophilität für die Enzyminhibition nötig, aber für einen zytotoxischen Effekt vernachlässigbar ist.

3.2.4 Derivatisierung aromatischer und aliphatischer Aminosäuren als potenzielle Wirkstoffe

Bislang stand bei den in der Literatur beschriebenen Reaktionen mit aromatischen und aliphatischen Aminosäuren v.a. die Analyse des Reaktionsmechanismus der Laccase und weniger die Bestimmung der Wirkung der neusynthetisierten Verbindungen im Mittelpunkt. Aber ausgehend von den Ergebnissen von Poeckel et al. (2006, vgl. Kap. 3.2.3) kann vermutet werden, dass die mit Hilfe der Laccase derivatisierten Aminoverbindungen auch zu Derivaten mit neuen Wirkungen führen können.

3.2.4.1 Derivatisierung der 4-Aminobenzoesäure

Die 4-Aminobenzoesäure besitzt eine antibakterielle Wirkung, z.B. gegen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Staphylococcus aureus* (Eagon und McManus 1990, Richards und Xing 1992a,b, Richards et al. 1995). Darüber hinaus ist sie ein Bestandteil verschiedener Arzneimittel. Derivate der 4-Aminobenzoesäure werden u.a. in Sonnenschutzmitteln (Dromgoole und Maibach 1990, Naylor und Farmer 1997), Lokalanästhetika (Butterworth und Strichartz 1990, Alqareer et al. 2006) oder auch antiviralen (Singh et al. 1995) sowie antineoplastischen und antileukämischen Medikamenten (Arcamone et al. 1989) verwendet. Zudem werden auch Analoga der 4-Aminobenzoesäure, beispielsweise die Sulfonamide, medizinisch eingesetzt. Sulfonamide werden als kompetitive Inhibitoren anstelle der 4-Aminobenzoesäure für die Folsäuresynthese genutzt, wodurch Folsäure synthetisierende Bakterien gehemmt werden können (Eagon und McManus 1990, Kluczyk et al. 2002).

Die Synthese von 4-Aminobenzoesäure-Derivaten mittels Laccase wurde bereits mehrfach beschrieben. Die Reaktion der *ortho*-dihydroxylierten Verbindung 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure mit 4-Aminobenzoesäure und der Laccase von *Pycnoporus cinnabarinus* wurde von Mikolasch et al. (2002) untersucht. Die Autoren beschrieben dabei die Bildung eines hydrochinoiden dimeren Produktes. Niedermeyer et al. (2005) stellten fest, dass das Produkt ein Chinonimin (Abb. 18A) und kein aminiertes Hydrochinon ist.

Die *para*-dihydroxylierte Verbindung 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid wurde zur Synthese von C-N verknüpften Dimeren (Manda et al. 2005, Niedermeyer et al. 2005) und Trimeren (Niedermeyer et al. 2005) mit 4-Aminobenzoesäure (Abb. 18B) genutzt.

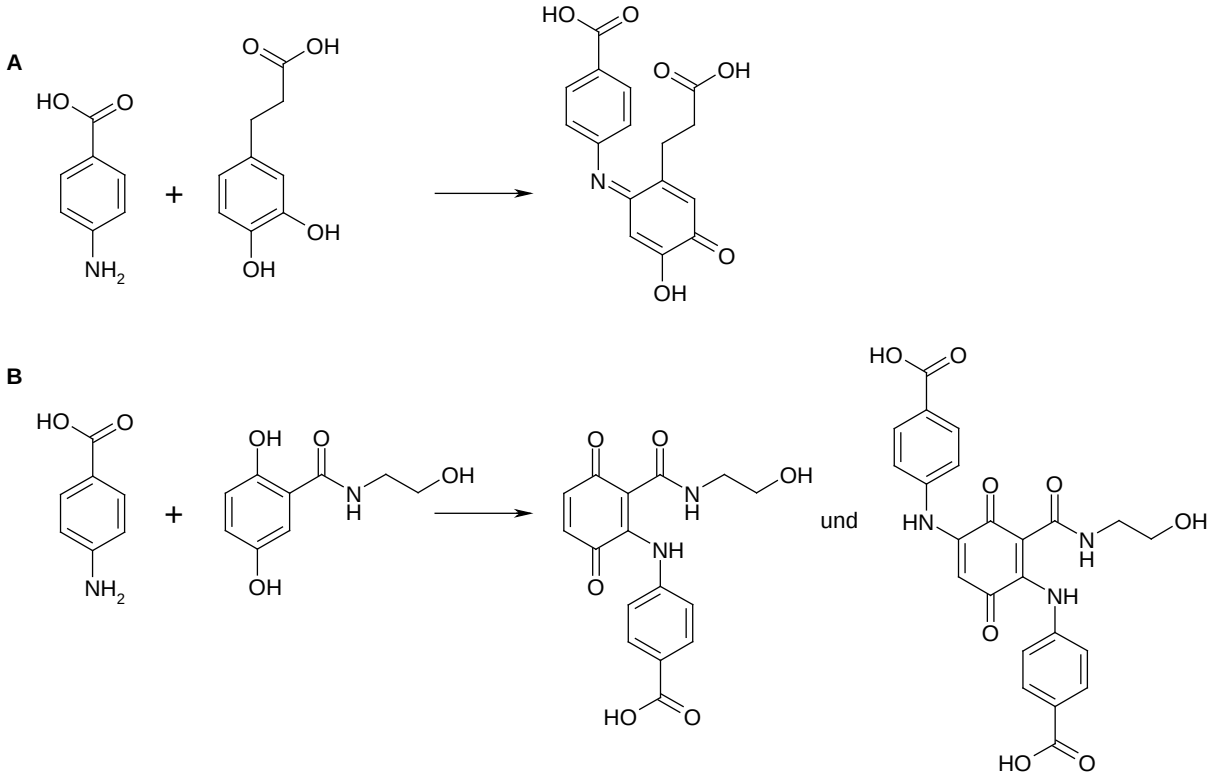


Abb. 18 Bildung von heteromolekularen Dimeren bei den laccasekatalysierten Reaktionen von
(A) 4-Aminobenzoesäure und 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure (Mikolasch et al. 2002, Niedermeyer et al. 2005) sowie
(B) 4-Aminobenzoesäure und 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid (nach Manda et al. 2005, Niedermeyer et al. 2005)

Niedermeyer und Lalk (2007) führten die Reaktionen von 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid bzw. 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon mit 4-Aminobenzoesäure (Niedermeyer et al. 2005) nicht nur mit Laccase sondern auch mit den chemischen Katalysatoren Natriumiodat, Kupferacetat und Silber(I)oxid durch. Die Oxidationsmittel Kupferacetat und Silber(I)oxid führten zu einer langsameren Reaktionsrate und damit geringeren Produktausbeuten bzw. zur Bildung einer Reihe von Nebenprodukten oder zu keiner Produktbildung. Im Gegensatz dazu waren mit Natriumiodat und Laccase die Reaktionsrate, Produktausbeute und Reinheit der Produkte vergleichbar. Daneben führte eine Konzentrationserhöhung sowohl der Laccase als auch des Natriumiodats zu einer Erhöhung der Reaktionsrate und keinen zusätzlichen Nebenprodukten.

Mikolasch et al. (2008b) setzten zusätzlich zum 1,4-Hydrochinon weitere verschieden substituierte *para*-hydrochinoide Verbindungen zur Synthese von heteromolekularen Dimeren mit der 4-Aminobenzoesäure ein. Die Bildung von Konstitutionsisomeren konnte bei

monomethylierten (C5- und C6-Position; Abb. 19A) und monohalogenierten (C3- und C5-Position; Abb. 19B) *p*-Hydrochinonen nachgewiesen werden. Neben der enzymatisch-katalysierten Reaktion wurde Natriumiodat als chemischer Katalysator eingesetzt. Bei einem Vergleich stellte sich die Laccase als besseres Oxidationsmittel heraus, da eine höhere Produktausbeute erzielt werden konnte, als bei der chemischen Katalyse. Gerade in Bezug auf die Produktbildung mit Natriumiodat als Katalysator, verglichen mit der laccasevermittelten Reaktion, wurden bei eigenen Untersuchungen erhebliche Unterschiede festgestellt.

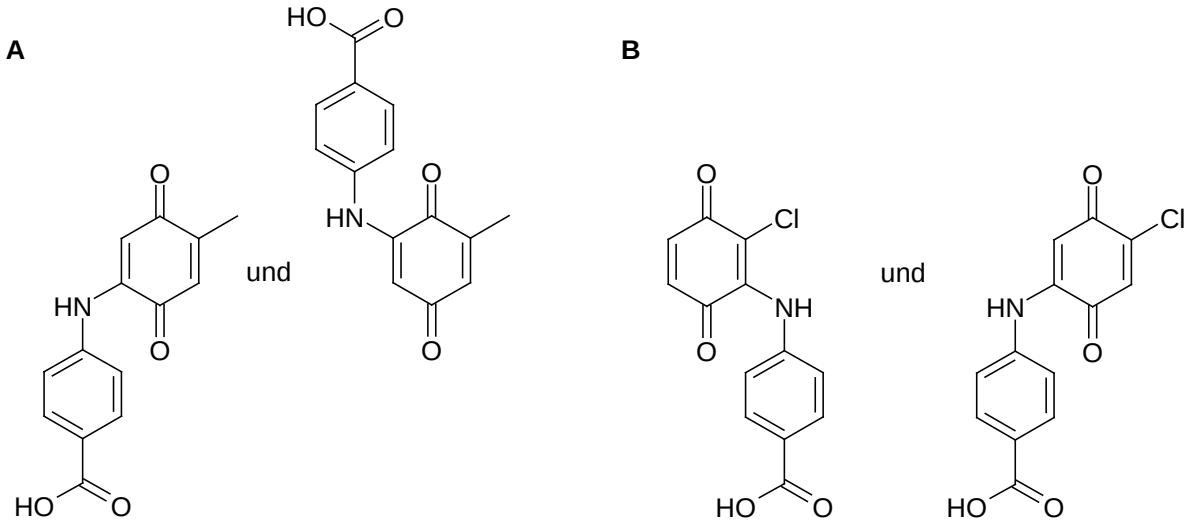


Abb. 19 Konstitutionsisomere der laccasekatalysierten Reaktionen von
(A) 4-Aminobenzoesäure und Methyl-1,4-hydrochinon bzw.
(B) 4-Aminobenzoesäure und Chlor-1,4-hydrochinon (Mikolasch et al. 2008b)

3.2.4.2 Derivatisierung verschiedener Aminosäuren

Neben der biologischen Funktion von Aminosäuren als Hauptbestandteil von Proteinen besitzen Aminosäuren und ihre Derivate neuroprotektive Eigenschaften bei Gehirnischämien -mangelnde Blutversorgung des Gehirns- (Kagiyama et al. 2004) und können bei Depressionen (Meyers 2000, Turner et al. 2006) sowie Migräne (Krymchantowski et al. 2001, 2008) eingesetzt werden. Die Aminosäure L-Arginin kann auch zur Verbesserung von Koronarerkrankungen und Diabetes beitragen (Maxwell und Cooke 1998, Regensteiner et al. 2003, Umathe et al. 2009). Zudem wird eine mögliche Anwendung von 3,5-Diiodo-L-thyronin bei Adipositas untersucht (Lanni et al. 2005, de Lange et al. 2008, Lombardi et al. 2009). Daneben wurde für L-Lysin eine hemmende Wirkung auf das Virus *Herpes simplex* Typ-1 nachgewiesen (Singh et al. 2005, Gaby et al. 2006). L-Lysin wird in Kombination mit verschiedenen Kräutern und anderen Inhaltsstoffen als alternatives Heilmittel SuperLysine Plus® zur Behandlung von Lippenbläschen von der Firma Quantum Inc. angeboten (Singh et al. 2005).

Die Derivatisierung von Aminosäuren mit Hilfe von Laccase wurde bereits 1959 von Michalek und Szarkowska beschrieben. Die Autoren untersuchten die Reaktionen von 1,4-Benzochinon mit 21 Aminosäuren und postulierten die Bildung von di- und trimeren Produkten. In allen Chromatogrammen (Papierchromatographie) der Inkubationsansätze mit Laccase bzw. mit inaktiviertem Enzym wurden jeweils zwei Flecken nachgewiesen, welche nicht-reduzierende Eigenschaften aufwiesen. Diese zwei Flecken wurden als benzochinoide Produkte, bestehend aus einem Molekül Benzochinon und einem bzw. zwei Molekülen Aminosäure beschrieben. Eine Ausnahme bildete ein Produkt der Reaktion mit Glycin, für das ein hydrochinoider Charakter angenommen wurde. Daneben wurde in Reaktionen mit inaktiviertem Enzym die Reduktion von Benzochinon festgestellt, die in einer Verminderung der Produktbildung resultierte. In laccasekatalysierten Reaktionen wurde das entstandene Hydrochinon sofort wieder enzymatisch oxidiert, was die Produktausbeute erhöhte.
Die laccasevermittelte Reaktion macht die Nutzung von Schutzgruppen insbesondere bei der Aminosäurederivatisierung unnötig, sodass eine sog. “one-pot“ Synthese möglich ist. Dementsprechend beschrieben Manda et al. (2006) die Derivatisierung von L-Tryptophan mit 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid. Neben dem isolierten chinoiden Dimer (Abb. 20) konnte in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und der daraus resultierenden Produktstabilität auch das entsprechende hydrochinoide Produkt nachgewiesen werden.

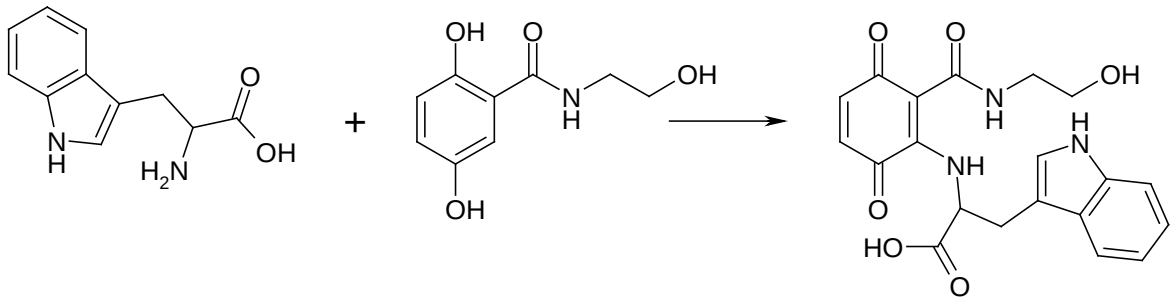


Abb. 20 Bildung eines heteromolekularen Dimers bei der laccasekatalysierten Reaktion von L-Tryptophan und 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid (nach Manda et al. 2006)

3.3 Polymerisationsreaktionen

Die mit Hilfe der Laccase induzierten Polymerisationsreaktionen können neben den homo- und heteromolekularen Reaktionen ebenfalls zur Synthese von Wirkstoffen und biologisch aktiven Substanzen genutzt werden. Sie ermöglichen darüber hinaus jedoch auch eine Herstellung von neuen Bio- und Beschichtungsmaterialien.

3.3.1 Synthese von physiologisch bedeutsamen Polymeren

Ein sehr gut untersuchtes Beispiel für die Nutzung der Laccase zur Synthese eines natürlichen Polymers ist die Melaninbildung von *Cryptococcus neoformans*. Mikroorganismen können Phenoloxidasen (Tyrosinase, Laccase) und/oder den Polyketid-Synthase-Weg zur Synthese des Pigments Melanin nutzen, während in Säugern Melanin vorwiegend aus Tyrosin oder 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) mittels Tyrosinase gebildet wird (Nosanchuk und Casadevall 2003). Melanin selbst bietet einen Schutz gegen eine Vielzahl von äußeren Einflüssen, was besonders für pathogene Mikroorganismen wie den hefeähnlichen Pilz *Cryptococcus neoformans*, der v.a. bei immunsupprimierten Patienten mit HIV-Infektion oder nach Transplantationen invasive Krankheiten hervorruft, von Bedeutung ist. Melanin dient beispielsweise zur Absorption von UV-Strahlung und aufgrund der Eigenschaft des Melanins als Radikalfänger bietet es Schutz vor Sauerstoff- und Stickstoff-Radikalen. Die zusätzliche negative Ladung der Zelloberfläche verhindert die Phagozytose durch Makrophagen und schützt *Cryptococcus neoformans* so vor der Wirtsabwehr des Makroorganismus. Zudem ist Melanin in der Lage potentiell toxische Schwermetalle und auch antimikrobielle Verbindungen, wie z.B. Amphotericin B und Caspofungin zu binden und den Mikroorganismus davor zu schützen (Bell und Wheeler 1986, Wang und Casadevall 1994, van Duin et al. 2002, Ikeda et al. 2003, Nosanchuk und Casadevall 2003). Durch gentechnisch erzeugte Deletionsmutanten wurde die Korrelation der laccasekatalysierten Melaninsynthese und der Virulenz von *Cryptococcus neoformans* bestätigt (Salas et al. 1996); damit ist die Laccase neben der Polysaccharid-Kapsel einer der Hauptvirulenzfaktoren dieses Pilzes. Die cryptococcale Laccase kann durch Glucose reprimiert werden und ist kovalent mit Kohlenhydraten der Zellwand verbunden (Nurudeen und Ahearn 1979, Polacheck et al. 1982, Zhu und Williamson 2004). Die Melaninsynthese erfolgt durch exogene *para*- oder *ortho*-Diphenole, zu denen Catecholamine wie z.B. Dopa und Dopamin gehören. Dopamin ist ein Precursor für die Synthese der Hormone Adrenalin und Noradrenalin. Die Nutzung dieser immunmodulatorischen Neurotransmitter erklärt den Neurotropismus von *Cryptococcus neoformans* (Bell und Wheeler 1986, Polacheck et al. 1982). Die genannten Verbindungen stellen Substrate der Laccase dar und werden folglich zu Chinonen oxidiert, die dann nicht-enzymatisch mit sich selbst oder anderen Metaboliten kondensieren (Zhu und Williamson 2004). Bei Dopa als Substrat würde zuerst die Bildung des entsprechenden *ortho*-Chinons (Dopachinon) erfolgen, welches dann über das Leucodopachrom, Dopachrom, 5,6-Dihydroxyindol und Indol-5,6-chinon zum Melanin weiterreagiert (Williamson 1997). Die gebildeten Intermediate Dopachrom und 5,6-Dihydroxyindol (Abb. 21) wurden bei der Melanogenese von *Cryptococcus neoformans* nachgewiesen (Polacheck et al. 1982, Polachek und Kwon-Chung 1988).

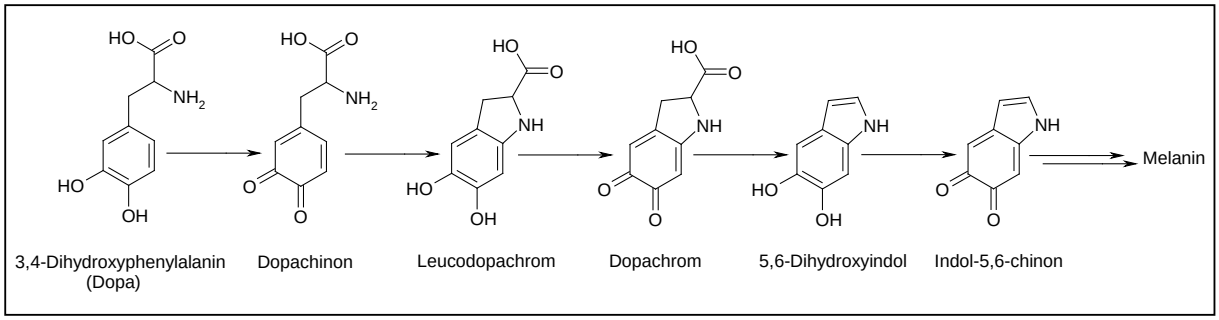


Abb. 21 Angenommene Melaninsynthese in *Cryptococcus neoformans* (nach Williamson 1997)

Die Melaninbildung ist - ähnlich zum Pilz *Cryptococcus neoformans* - offenbar auch bei den Pilzen *Histoplasma capsulatum* und *Paracoccidioides brasiliensis*, beides Erreger systemischer Mykosen, mit der Pathogenese assoziiert (Taborda et al. 2008). Obwohl bei beiden Pilzen eine Laccaseaktivität nachgewiesen wurde, erfolgt die Melaninsynthese wahrscheinlich auch über den Polyketid-Synthase-Weg (Gómez et al. 2001, Nosanchuk et al. 2002, Gómez und Nosanchuk 2003, Nosanchuk und Casadevall 2003, Taborda et al. 2008). Darüber hinaus wiesen Morris-Jones et al. (2005) bei *Candida albicans* ebenfalls eine Laccaseaktivität und eine Melaninbildung nach, wobei auch hier ein Zusammenhang zwischen der Melanogenese und der Virulenz angenommen wird. Die Verhinderung der Melaninsynthese stellt vor allem bei humanpathogenen Mikroorganismen eine Möglichkeit der Therapie dar. In diesem Zusammenhang könnte die Melaninsynthese durch Glyphosat oder die Bindung von monoclonalen Antikörpern gehemmt werden und eine synergistische Wirkung mit Medikamenten z.B. Amphotericin B oder Caspofungin erzeugen (Rosas et al. 2001, Nosanchuk et al. 2001). Neben Pilzen wird auch bei Bakterien ein Zusammenhang zwischen der Melaninbildung mittels Laccase und einem Schutz vor Umwelteinflüssen diskutiert. Die Laccase von *Streptomyces glaucescens* wird bei 42 °C aktiviert und dann zur Melaninsynthese genutzt (Kuznetsov et al. 1984).

3.3.2 Derivatisierung von antioxidativen Substanzen

Neben dem Biopolymer Melanin, das u.a. als Radikalfänger einen Schutz vor Sauerstoff-Radikalen bietet, wurden mit Hilfe der Laccase weitere antioxidative Polymere, aus Verbindungen mit einer bereits vorhandenen antioxidativen Wirkung, hergestellt. Als Ausgangsstoff diente beispielsweise Rutin (Quercetin-3-rutinosid). Das gebildete Polymer hatte im Vergleich zum Rutinmonomer eine deutlich gesteigerte Wirkung als Superoxidradikalfänger (Kurisawa et al. 2003a). Daneben schützte das Polymer Endothelialzellen vor oxidativer Schädigung effektiver als das Rutinmonomer und hatte einen hemmenden Effekt auf die humane LDL (low-density-lipoprotein) Oxidation.

Neben Rutin nutzten Kurisawa et al. (2003b) auch Catechin zur Polymersynthese. Catechin ist ein Flavonoid, welches u.a. in grünem Tee und Wein vorkommt. Das mittels Laccase synthetisierte Polymer hatte im Vergleich zum Catechinmonomer eine deutlich gesteigerte Wirkung als Superoxidradikalfänger und war ein stärkerer Xanthin-Oxidase Inhibitor. Die Xanthin-Oxidase ist u.a. eine biologische Quelle reaktiver Sauerstoffspezies.

Darüber hinaus wurden nicht nur Polymere, die aus einem Ausgangsstoff gebildet wurden hinsichtlich ihrer Wirkung untersucht, sondern auch Konjugate, die aus dem antioxidativ wirkenden Catechin und aminierten Verbindungen synthetisiert wurden, auf ihre antioxidative Aktivität hin geprüft.

Chung et al. (2003a) untersuchten die laccasekatalysierte Konjugation von Catechin an Polyamine. Die gebildeten Poly(allylamin)-Catechin-Konjugate zeigten gute antioxidative Eigenschaften gegenüber der LDL-Oxidation induziert durch freie Radikale.

Chung et al. (2003b) synthetisierten Gelatine-Catechin-Konjugate. Die Autoren nehmen an, dass das Catechin mit Lysinresten der Gelatine reagiert und dabei Konjugate entstehen. Das gebildete Konjugat zeigte eine leicht geringere Superoxidradikalfänger-Aktivität als das Catechin. Der schützende Effekt des Catechins vor einer radikalinduzierten LDL-Oxidation konnte aufgrund der Konjugation erhöht werden. Zudem stieg der hemmende Effekt auf die LDL-Oxidation mit zunehmender Konzentration von Catechinresten im Konjugat im Vergleich zum unkonjugierten Catechin.

3.3.3 Synthese von funktionellen Biomaterialien (Klebstoffe und Lacke)

Die laccasekatalysierte Verknüpfung verschiedener Substanzklassen wird, neben der bereits vorgestellten Derivatisierung von Wirkstoffen und Wirkstoffgrundstrukturen, auch bei der Herstellung von funktionellen Biomaterialien eingesetzt, für die natürliche Klebstoffe und Lacke als Vorlage dienten. So wurden die von Muscheln z.B. *Mytilus edulis* oder *Geukensia demissa* gebildeten Kleberproteine als Modell für die Synthese neuer Klebstoffe genutzt. Diese Kleberproteine besitzen einen hohen Anteil an 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) und Lysin (Waite 1983, Waite et al. 1985, 1989). Im Verlauf des Anheftungsprozesses der Muschel werden *ortho*-Diphenole (einschließlich Dopa) mit Hilfe einer Phenoloxidase oxidiert, die dann einer nukleophilen Addition mit Aminoverbindungen z.B. Lysin unterliegen (Waite 1983, 1990a,b, Waite et al. 1985, Burzio et al. 1997). Der dabei gebildete Klebstoff ist wasserresistent und sehr stark wirksam (Waite 1983, 1990a,b).

Neumann et al. (2007) beschrieben die Herstellung eines resorbierbaren Knochenersatzstoffes aus einer Mischung von Calciumphoshatpartikeln eingebettet in eine vernetzte Kollagenmatrix. Die Vernetzung des Kollagens sollte dabei durch eine laccaseinduzierte Peptidvernetzung und geeignete Brückenmoleküle (Laccasesubstrate) z.B.

ortho- und *para*- Diphenole oder auch hydroxylierte Biphenyle erreicht werden (Abb. 22). Das Grundprinzip dieser Reaktion wurde auch im Rahmen von eigenen Untersuchungen erforscht. Derartige Klebstoffe könnten beispielsweise in der Gesichtschirurgie zur Klebung von Knochensplittern oder zur Klebung von Weichgeweben eingesetzt werden (Deming 2007). Das Prinzip der laccasekatalysierten Vernetzung von Polymeren mit mindestens einer freien Aminogruppe und einem Brückenmolekül könnte auch in Kombination mit Hämostyptika eingesetzt werden (Speitling et al. 2007).

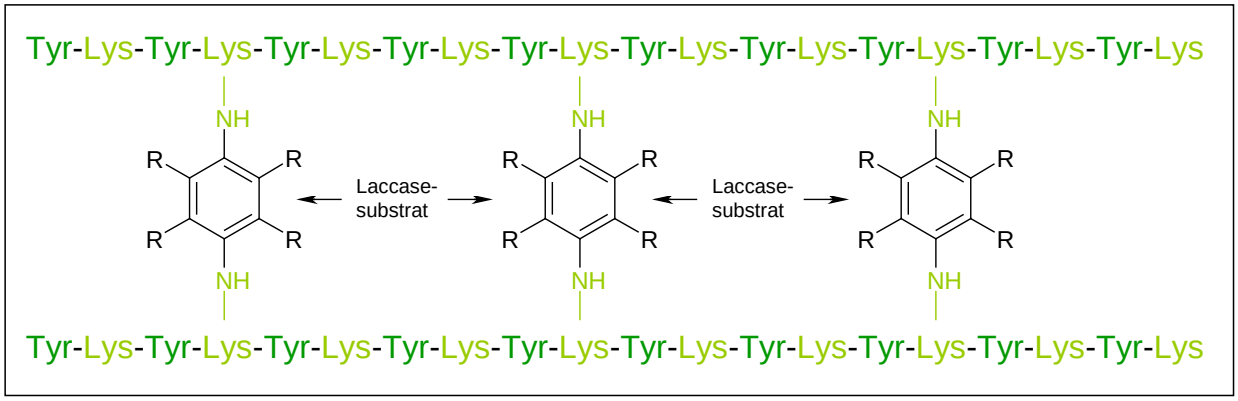


Abb. 22 Modell einer laccasevermittelten Peptidvernetzung

Peshkova und Li (2003) beschrieben die Herstellung eines Klebstoffes aus phenolischen Verbindungen und Chitosan mittels Laccase zur Verleimung von Holzfurnier. Chitosan ist ein Polysaccharid aus Glucosamin-Einheiten mit freien Aminogruppen, die die Vernetzung mit Hilfe von Brückenmolekülen ermöglichen. Die Autoren nehmen an, dass die Phenole von der Laccase oxidiert werden. Die dabei gebildeten Radikale können zu Chinonen disproportionieren, die dann wiederum mit den Aminoverbindungen zu heteromolekularen Polymeren reagieren können. Anhand von verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass für eine erfolgreiche Verleimung zweier Furnierplatten Chitosan, eine phenolische Verbindung und Laccase nötig waren. Des Weiteren war die Klebkraft stark abhängig von der Art des eingesetzten Phenols. Bei sieben der zehn getesteten Klebsysteme konnten mindestens 50 % der Klebkraft nach einer Wasserbehandlung erhalten werden, was auf eine starke Klebwirkung hinwies.

Neben der Synthese von Klebstoffen können auch Lacke mittels Laccase synthetisiert werden. Die Arbeitsgruppe um Kobayashi befasste sich eingehend mit der Synthese von “artificial urushi“, einem künstlichen Lack (Ikeda et al. 2000, 2001, Kobayashi et al. 2001a,b, Uyama und Kobayashi 2003, 2006). In diesem Fall diente der Lack des japanischen Lackbaumes (*Toxicodendron vernicifera*) als Vorlage, der sich als traditionell japanischer Überzug durch eine hohe Wiederstandsfähigkeit und Brillianz auszeichnet. Der Hauptbestandteil dieses natürlichen Lackes sind Catechole die mit ungesättigten

Kohlenwasserstoffketten derivatisiert sind (“Urushiole“). Zur Synthese von Urushiol Analoga nutzten die Forscher eine Lipase um Catechole mit ungesättigten Fettsäuren über eine Esterbrücke zu verknüpfen. Die sich daran anschließende Vernetzung der Catecholderivate erfolgte mit Hilfe der Laccase, um so eine Polymerisation und eine daraus resultierende Trocknung des künstlichen Lackes zu erreichen. Der gebildete Lack hatte einen hohen Härtegrad und Glanz vergleichbar mit dem natürlichen Vorbild. Der laccasekatalysierte Trocknungsprozess fand ohne den Einsatz von organischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur, also sehr umweltschonend statt. Zudem werden in der holzverarbeitenden Industrie meist Harze verwendet, die Formaldehyd eine potentiell karzinogene Verbindung enthalten, was bei laccaseinduzierten Prozessen nicht nötig ist (Kelly et al. 1999, Peshkova und Li 2003). Auch der Einsatz von erneuerbaren Ressourcen (wie Pflanzenölen) als billige Ausgangsstoffe anstelle von Petrochemikalien macht die Laccase und die durch sie katalysierten Prozesse für eine nachhaltige Anwendung in der Biotechnologie und insbesondere für die kombinatorische Biochemie interessant.

In den Tabellen A1-A4 im Anhang A (S. 176-180) sind Informationen zu den oben beschriebenen Reaktionen zusammengefasst.

4 Ziele und Ergebnisse der Dissertation

Der Einsatz der Laccase als Katalysator zur Synthese neuartiger Wirkstoffe und Biomaterialien erfordert detailierte Kenntnisse sowohl über den Ablauf der Laccasereaktion als auch die chemische Struktur der gebildeten Reaktionsprodukte. Die nachfolgend vorgestellten Publikationen und wissenschaftlichen Beiträge hatten das Ziel, das Wissen über die Laccase und deren katalytische Fähigkeiten zu erweitern, um so Verbindungen mit neuen Eigenschaften herstellen zu können. Die Synthese neuer Wirkstoffe erfolgt in der Regel ausgehend von mathematischen Berechnungen der Struktur-Wirkungsbeziehung (Bohacek et al. 1996, Klopman et al. 1997, Wang et al. 2000, Deuflhard 2001, Deuflhard und Schütte 2003). In dieser kumulativen Dissertation standen derartige Überlegungen nicht im Mittelpunkt, da zunächst weniger die Qualität der gebildeten Produkte, als vielmehr die grundlegenden und neuen Anwendungsmöglichkeiten der Laccase untersucht und die Prinzipien der durch sie katalysierten Reaktionen näher charakterisiert werden sollten.

Ausgehend von den heteromolekularen Kopplungsreaktionen von verschiedenen Aminoverbindungen mit Laccasesubstraten (Michalek und Szarkowska 1959, Mikolasch et al. 2002, 2006, 2007, 2008a-c, Manda et al. 2005, 2006, Niedermeyer et al. 2005, Niedermeyer und Lalk 2007, siehe Anhang A Tab. A1-A4, S. 176-180) wurden diverse primäre und sekundäre Amine mit *para*-dihydroxylierten aromatischen Verbindungen unter verschiedenen Gesichtspunkten derivatisiert und die Ergebnisse in Vorträgen, einem Poster und mehreren Publikationen veröffentlicht.

Das erste Manuskript, welches in der Zeitschrift *Biotechnology and Applied Biochemistry* veröffentlicht wurde, befasst sich mit der laccasekatalysierten Synthese von Morpholin-substituierten Chinonen und der Testung dieser neuartigen Verbindungen hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung. Es wurde gezeigt, dass mit Hilfe der Laccase Substanzen hergestellt werden konnten, die in ihrer antimikrobiellen und zytotoxischen Wirkung den für die Synthese zugrunde liegenden Ausgangsstoffen überlegen sein können.

Unter Einbeziehung dieser Ergebnisse wurde auf dem 9. Kongress für Infektiologie und Tropenmedizin ein Poster vorgestellt, das ebenfalls der Dissertation beigefügt ist. Der Abstract erschien in einem Supplement der Zeitschrift *Infection*. Des Weiteren wurden im Rahmen der 42. Wissenschaftlichen Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. in einem Vortrag die potentiellen Einsatzmöglichkeiten der Laccase bei der Behandlung von Erkrankungen, die durch *Cryptococcus neoformans* verursacht werden, vorgestellt. Der Abstract dieses Vortages, der in einem Supplement der Zeitschrift *Mycoses* erschien, wurde der Arbeit hinzugefügt. Hierbei wurde die Idee der Kopplung zweier für den Menschen (bzw. den mit *Cryptococcus neoformans* infizierten Patienten) nicht toxischer Verbindungen mit Hilfe der vom pathogenen Pilz im Zuge des Infektionsprozesses

gebildeten Laccase vorgestellt. Die dabei direkt an der Infektionsstelle entstehenden Kopplungsprodukte würden dann als antifungale Wirkstoffe den pathogenen Pilz hemmen. Auf diesem Wege wäre es möglich einen Erreger direkt am Infektionsort zu bekämpfen, um so eine Schädigung anderer Organe und eine weitere Ausbreitung zu verhindern.

Vier weitere Publikationen sowie ein unveröffentlichter Vortrag dienten der Erforschung von grundlegenden Prinzipien zur Herstellung neuartiger Klebstoffe, aufbauend auf Resultaten des Landesforschungsschwerpunkts M/V "Neue Wirkstoffe und Biomaterialien" (Teilprojekt 2.1, Behrend et al. 2006). Alternative Prinzipien zur Synthese von Klebstoffen, am Vorbild von muscheladhesiven Proteinen, wurden u.a. von Peshkova und Li (2003), sowie Neumann et al. (2007) im Zusammenhang mit Polymerisationsreaktionen untersucht.

Die zweite in dieser Dissertation vorgestellte Publikation wurde in der Zeitschrift *Amino Acids* veröffentlicht. Darin wird die Derivatisierung von L-Phenylalanin mittels Laccase beschrieben. Ohne die vorherige Einführung von Schutzgruppen erfolgte die laccasekatalysierte Synthese von mono- und diaminierten chinoiden Verbindungen. Im Rahmen eines Mikrobiologischen Seminars in Kloster auf Hiddensee wurde über die Herstellung von Wirkstoffen und Biomaterialien mittels Laccase referiert.

In diesem Zusammenhang wurde in der dritten Publikation, die im *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* erschienen ist, am Beispiel der Bildung von Phenylalanin- und Tryptophanderivaten die chemische Katalyse mittels Natriumiodat mit der laccasekatalysierten Reaktion verglichen und in Abhängigkeit von den Reaktionspartnern Unterschiede aufgezeigt. Dabei wurden Vorteile der laccaseinduzierten Synthese bei der Reaktion von 2,5-Dihydroxyacetophenon mit L-Phenylalanin bzw. L-Tryptophan gegenüber der chemisch katalysierten Reaktion beschrieben.

Daran anknüpfend wurde in der vierten Publikation, die in der Zeitschrift *Amino Acids* eingereicht wurde die Derivatisierung der Aminosäuren Tyrosin und Lysin sowie der aus ihnen zusammengesetzten Dipeptide und Oligopeptide mittels Laccase vorgestellt. Es wurde sowohl die Derivatisierung der Aminosäuren und Dipeptide als auch die Verknüpfung von Peptidsträngen über ein Laccasesubstrat mit Hilfe der Laccase gezeigt, was die Herstellung von neuartigen Biomaterialien, beispielsweise bioresorbierbaren Klebstoffen, erlaubt.

Ausgehend von den Möglichkeiten der Derivatisierung von Aminosäuren und Peptiden wurde in der fünften Publikation die Nutzung der Laccase zur Synthese von organischen Substanzen vorgestellt. Die begutachtete Publikation erschien in der Zeitschrift *Biospektrum*.

Das sechste in dieser kumulativen Dissertation vorgestellte Manuskript wurde im Journal *Green Chemistry* eingereicht. Die laccasekatalysierten Reaktionen von aminierten Carbonsäureamiden, darunter auch Imidazolderivate, mit *para*-Dihydroxybenzoesäure-derivaten resultierten in der Bildung von Zyklisierungsprodukten, die als Feinchemikalien genutzt werden könnten. Die Synthese von derartigen Zyklisierungsprodukten ist weder für

laccaseinduzierte noch für chemische Reaktionen zuvor beschrieben worden. Damit ermöglicht die Laccase die Herstellung neuartiger Verbindungen und eröffnet so neue Anwendungsmöglichkeiten für die Produktion von Wirkstoffen, aber auch von Feinchemikalien. Eine Publikation zur biologischen Wirkung dieser neuartigen Verbindungen gegenüber Bakterien und Hefen, sowie einer humanen Blasenkrebszelllinie wird vorbereitet.
Neben der laccasekatalysierten Reaktion mit Imidazolen wurde im siebten Manuskript das Azol 1-Aminobenzotriazol mit 2,5-Dihydroxybenzoesäureestern derivatisiert. Das Manuskript wurde in der Zeitschrift *Biotechnology and Applied Biochemistry* eingereicht. Die synthetisierten Produkte waren sowohl Di- als auch Oligomere. Die Dimere besaßen eine antimikrobielle und zytotoxische Wirkung, welche die Aktivität der zur Synthese eingesetzten Verbindungen überstieg. Darüber hinaus wurde der Einfluß von Methanol auf die Produktbildung untersucht. Die Kenntnis über den Einfluß von Lösungsmitteln auf die laccasekatalysierte Reaktion ermöglicht u.a. eine Anpassung der Reaktionsbedingungen an die eingesetzten Ausgangsstoffe, z.B. schlecht-wasserlöslichen Substanzen.
Ein Teil dieser Ergebnisse soll auf dem im April 2010 stattfindenden 20. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) mit einem Poster vorgestellt werden. Der eingereichte Abstract wurde der Dissertation beigefügt.

Im Folgenden sind die genannten und in den nächsten Kapiteln im Detail vorgestellten Publikationen und wissenschaftlichen Beiträge zusammenfassend aufgeführt:

<u>Publikationen</u>

- Hahn, V., Mikolasch, A., Wende, K., Bartrow, H., Lindequist, U., Schauer, F. (2009) Synthesis of model morpholine derivatives with biological activities by laccase-catalyzed reactions. Biotechnol. Appl. Biochem. DOI: 10.1042/BA20090219 (siehe Kapitel 4.1)
- Hahn, V., Mikolasch, A., Manda, K., Gördes, D., Thurow, K., Schauer, F. (2009) Laccase-catalyzed carbon–nitrogen bond formation: coupling and derivatization of unprotected L-phenylalanine with different *para*-hydroquinones. Amino Acids 37(2): 315-321. (siehe Kapitel 4.4)
- Hahn, V., Mikolasch, A., Manda, K., Gördes, D., Thurow, K., Schauer, F. (2009) Derivatization of amino acids by fungal laccases: Comparison of enzymatic and chemical methods. J. Mol. Catal. B: Enzym. 60: 76-81. (siehe Kapitel 4.5)

- Mikolasch, A., Hahn, V., Manda, K., Pump, J., Illas, N., Gördes, D., Lalk, M., Gesell Salazar, M., Hammer, E., Jülich, W.-D., Rawer, S., Thurow, K., Lindequist, U., Schauer, F. (2009) Laccase-catalyzed cross-linking of amino acids and peptides with dihydroxylated aromatic compounds. Amino Acids, Manuskript eingereicht. (siehe Kapitel 4.6)
- Hahn, V., Schauer, F. (2009) Mikrobielle Laccasen zur Synthese organischer Substanzen. Biospektrum 5: 526-528. (siehe Kapitel 4.7)
- Hahn, V., Davids, T., Lalk, M., Schauer, F., Mikolasch, A. (2009) Enzymatic cyclizations using laccases: Multiple bond formation between dihydroxybenzoic acid derivates and aromatic amines. Green Chemistry, Manuskript eingereicht. (siehe Kapitel 4.8)
- Hahn, V., Mikolasch, A., Wende, K., Bartrow, H., Lindequist, U., Schauer, F. (2009) Derivatization of 1-aminobenzotriazole using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila* influenced by methanol and biological evaluation of the derivatives. Biotechnol. Appl. Biochem., Manuskript eingereicht. (siehe Kapitel 4.9)

Vorträge

- Hahn, V., Mikolasch, A., Schauer, F. (2008) Application of a fungal virulence factor for the synthesis of new antifungal compounds. Mycoses 51(5): 374 (Journal compliation). Vortrag auf der 42. Wissenschaftlichen Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V., Jena, 05.09.2008. (siehe Kapitel 4.3)
- Hahn, V. (2006) Einsatz von Laccasen aus Pilzen zur Herstellung von Wirkstoffen und Biomaterialien. Vortrag beim 16. Mikrobiologischen Seminar, Kloster/Hiddensee, 12.06.2006.

Poster

- Hahn, V., Mikolasch, A., Schauer, F. (2008) A novel enzymatic process for the synthesis of new antifungals. Infection 36 (Suppl. I): 36. Posterbeitrag auf dem 9. Kongress für Infektiologie und Tropenmedizin, Innsbruck, 27.02.-01.03.2008. (siehe Kapitel 4.2)
- Hahn, V., Mikolasch, A., Schauer, F. (2010) New enzymatic principle for the synthesis of novel antimicrobials. Posterbeitrag auf dem 20. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Wien, 10.-13.04.2010, Abstract eingereicht. (siehe Kapitel 4.10)

4.1 Synthesis of model morpholine derivatives with biological activities by laccase-catalyzed reactions

Dieses Manuskript wurde in der Zeitschrift *Biotechnology and Applied Biochemistry* veröffentlicht und befasst sich mit der laccasekatalysierten Synthese von Morpholinderivaten und der biologischen Testung dieser Substanzen.

Es wurden diverse mono- und disubstituierte Verbindungen mit Hilfe der Laccase von *Myceliophthora thermophila* synthetisiert, isoliert und strukturell charakterisiert. Dabei wurde erstmals ein mittels Laccase hergestelltes, trimeres Produkt beschrieben, welches aus der nukleophilen Addition von Wasser aus dem Reaktionsgemisch und einem Molekül Morpholin an 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid resultierte.

Zur Prüfung der antimikrobiellen Aktivität der synthetisierten Verbindungen wurde neben dem Agardiffusionstest, die MHK-Bestimmung in Mikrotiterplatten unter Anwendung einer modifizierten Methode des EUCAST discussion document E.Dis 7.1 (Rodríguez-Tudela et al. 2002) durchgeführt. Zudem wurde die zytotoxische Aktivität an einer Krebszelllinie getestet.

Allgemein konnte festgestellt werden, dass die Dimere im Gegensatz zu den Trimeren eine moderate bis starke antibakterielle und antifungale Wirkung besaßen.

Synthesis of model morpholine derivatives with biological activities by laccase-catalyzed reactions

Veronika Hahn* [I], Annett Mikolasch*, Kristian Wende†, Hannelore Bartrow†, Ulrike Lindequist†, and Frieder Schauer*

* Institute of Microbiology, and † Institute of Pharmacy, Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald, F.-L.-Jahnstr. 15, 17487 Greifswald, Germany

[I] To whom correspondence should be addressed. e-mail: veronikahahn@gmx.at, tel.: ++49 3834 864225, fax: ++49 3834 864202

The efficient enzyme-catalyzed reaction of morpholines as model structures for bioactive compounds with *para*-dihydroxylated aromatic systems was carried out using the oxidoreductase laccase and atmospheric oxygen to produce eight novel morpholine-substituted aromatics. The laccase of *Myceliophthora thermophila* was used for cross-linking morpholines containing primary or secondary amino groups with *para*-dihydroxylated laccase substrates. We demonstrate that not only primary amino groups but also secondary amino groups are able to couple with *para*-dihydroxylated aromatic systems in laccase-catalyzed reactions. The resulting model products (yields up to 80%) were isolated, structurally characterized and tested for their antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities. Four of the eight products showed low to moderate growth inhibition against several gram positive and gram negative bacterial strains and against the yeasts *Candida maltosa* and *Candida albicans*. The antibacterial and antifungal activities were determined by an agar disc diffusion test and a modified method according to the EUCAST discussion document E.Dis 7.1 for the evaluation of minimal inhibitory concentration (MIC). Differences in cytotoxicity against the human urinary bladder carcinoma cell line 5637 are discussed.

Key words amination; antimicrobial; biotransformation; cytostatic; laccase; quinone

Introduction

The evolving demand for new antibiotics is undoubtedly a great challenge for the future, particularly in view of the increasing resistance of pathogens to currently available antibiotics. In this context new antibiotics are required not only for human medicine but also for veterinary and agricultural use. The derivatization of known biologically active substances is a promising way to generate novel molecules with improved therapeutic properties [1-3].

Since some morpholine derivatives have already been reported to have antibacterial and antifungal activities [4,5], we have used model morpholines with primary and secondary amino groups but without antimicrobial and cytotoxic activity for derivatization with *para*-dihydroxylated aromatic substances to produce model products.

An efficient method for derivatization of bioactive compounds containing primary amino groups is laccase-catalyzed coupling with dihydroxylated aromatic substances [6,7], which has been applied to synthesize novel penicillins [8,9] and cephalosporines [10,11] and to derivatize unprotected amino acids [12,13]. In all of these reactions the primary amino group of aliphatic or aromatic substances reacts with the aromatic ring system of the dihydroxylated aromatic laccase substrate. In the present study we used morpholine and 4-morpholinoaniline to determine (i) if only the primary amino group of 4-morpholinoaniline is able to aminate the aromatic ring system or if the secondary amino group of morpholine can also react with the aromatic ring forming amination products and (ii) if the model derivatization products have antibacterial and antifungal properties. Thus, in the case of a laccase-catalyzed synthesis of bioactive model products from substances without bioactivity such as morpholines, the laccase-catalyzed reaction may be used for the derivatization of substances with an already existing biological activity to achieve products which are more potent.

To this end we employed the laccase from *Myceliophthora thermophila* to derivatize the morpholines with *para*-hydroquinone, substituted *para*-hydroquinones, and with derivatives of 2,5-dihydroxybenzoic acid, all of which are *para*-dihydroxylated laccase substrates. The antimicrobial and cytotoxic activities of the novel model products were determined using three different test systems. For evaluation of the minimal inhibitory concentration (MIC) we used a modified method according to the EUCAST discussion document E.Dis 7.1. [14] Additionally, the agar disc diffusion method was chosen for the determination of antibacterial and antifungal activities. The test for the evaluation of cytotoxic activity was performed with human urinary bladder carcinoma cell line 5637 [ATCC HTB-9].

Materials and Methods

Synthesis and isolation of novel morpholine-substituted quinones

Chemicals

Morpholine, 4-morpholinoaniline, 1,4-hydroquinone, methyl-1,4-hydroquinone, 1,4-dihydroxynaphthaline, 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester and 2,5-dihydroxybenzoic acid ethyl ester were products of Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). 2,3-Dimethyl-1,4-hydroquinone was obtained from Arcos Organics (New Jersey, USA). 2,5-Dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide was purchased from Midori Kagaku Co. (Japan).

Enzyme

Laccase from *Myceliophthora thermophila* (expressed in genetically modified *Aspergillus* sp.) was obtained from Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). It was used as received (activity 623 U; substrate: ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) in citrate phosphate buffer (CPB, 18 mM citrate, 165 mM phosphate) at its pH optimum of pH 7.0 [15,16].

Measurement of laccase activity
The activity of laccase was determined spectrophotometrically at 420 nm with ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) as substrate [17] using the method described by Jonas et al. [18]. 1 U is defined as 1 $\mu mol \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$.

Experimental procedures
For analytical experiments and isolation of products morpholine or 4-morpholinoaniline (5 mM) and the respective dihydroxylated compound (1 mM) were incubated with laccase (activity 0.5 U). In controls the respective compounds were incubated in CPB without laccase. Reaction mixtures were incubated with agitation at 200 rpm at 23 °C in the dark.
For the isolation of products **3a-3c** and **4a-4d** a RP18 silicagel column (60 ml, 10 g adsorbent material, phenomenex, Strata, Germany) was charged with 40 ml of the respective reaction mixture. The following purification steps and elutions were used (Table 1).

Table 1. Purification steps and elution step of products **3a-3c** and **4a-4d**

product	purification steps			elution step	
	citrate phosphate buffer	solution of methanol [%] in distilled water		solution of methanol [%] in distilled water	
$3a_1$+$3a_2$	40 ml	100 ml	5%	60 ml	50%
3b	-	80 ml	5%	20 ml	100%
3c	-	60 ml	5%	30 ml	100%
		20 ml	50%		
4a	40 ml	150 ml	5%	25 ml	50%
		50 ml	50%		
4b	80 ml	-		40 ml	5%
4c, 4d	-	50 ml	5%	40 ml	100%
		70 ml	10%		
		100 ml	50%		

- not applicable

The isolated products were dried by lyophilization prior to mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

Analytical HPLC (high-pressure liquid chromatography)
For routine analysis, the reaction mixtures and isolated products were analyzed using an HPLC system LC-10AT VP (Shimadzu, Germany) consisting of a FCV-10AL VP pump, SPD-M10A VP diode array detector, and a SCL-10A VP control unit controlled by Class-VP version 6.12 SP5. The separation of the substances was achieved on an endcapped, 5-µm, LiChroCART® 125-4 RP18 column (Merck, Darmstadt, Germany) at a flow rate of 1 ml/min. A solvent system consisting of methanol (eluent A) and 0.1% phosphoric acid (eluent B), starting from an initial ratio of 10% A and 90% B and reaching 100% methanol within 14 min, was used.

Characterization of biotransformation products
The products were characterized by MS using a Bruker-Daltonics micrOTOF instrument (Bremen, Germany; ionization method: electrospray ionization [ESI], dry and nebulizer gas: nitrogen, software: HyStar).
The NMR spectra were obtained at 600 MHz (^{1}H), (HSQC, HMBC) in deuterate solvents on a Bruker Avance 600 instrument (Rheinstetten, Germany).

2-Methyl-6-morpholin-4-yl-[1,4]benzoquinone (3a$_1$) and 2-Methyl-5-morpholin-4-yl-[1,4]benzoquinone, $C_{11}H_{13}NO_3$ (3a$_2$)
Product **3a** is a mixture of at least two monoaminated dimers (**3a$_1$**, **3a$_2$**) confirmed by HPLC and MS. Synthesis and isolation as described above. Red orange solid. Yield 65.5%. **3a$_1$**: R_f (HPLC) 9.34 min, UV/VIS (MeOH) λ_{max} 227, 493 nm, **3a$_2$**: R_f (HPLC) 9.51 min, UV/VIS (MeOH) λ_{max} 225, 268, 497 nm. The MS elution profile showed two compounds with the same mass signal, indicating a product mixture of two constitution isomers. MS *m/z* AP-ESI: pos. ion mode $[M+H]^+$ 208.09703, 208.09709 (calculated 208.09681). The NMR spectra were uninterpretable, due to many overlaying signals.

2,3-Dimethyl-5-morpholin-4-yl-[1,4]benzoquinone, $C_{12}H_{15}NO_3$ (3b)
Synthesis and isolation as described above. Red orange solid. Yield 77.5%. ^{1}H-NMR (methanol-d$_4$) δ 1.96 (s, 3H, H7), 1.98 (s, 3H, H8), 3.38 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H, H9/H12), 3.77 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H, H10/H11), 5.72 (s, 1H, H6). ^{13}C-NMR (methanol-d$_4$) δ 12.0 (C7), 12.6 (C8), 50.3 (C9/C12), 67.6 (C10/C11), 108.8 (C6), 141.2 (C3), 141.8 (C2), 154.3 (C5), 186.2 (C4), 187.9 (C1). HMBC ^{1}H-^{13}C correlations H6 (C1, C2, C4, C5, C7), H7 (C1, C2), H8 (C3, C4), H9/H12 (C5, C9, C10, C11, C12), H10/H11 (C9, C10, C11, C12). R_f (HPLC) 10.73 min, UV/VIS (MeOH) λ_{max} 223, 300, 488 nm. MS *m/z* AP-ESI: pos. ion mode $[M+H]^+$ 222.08720 (calculated 222.11246).

2-Morpholin-4-yl-[1,4]naphthoquinone, $C_{14}H_{13}NO_3$ (3c)
Synthesis and isolation as described above. Brown solid. Yield 47.7%. ^{1}H-NMR (DMSO-d$_6$) δ 3.49 (s(broad), 4H, H3', H5'), 3.72 (s(broad), 4H, H2', H6'), 6.03 (s, 1H, H3), 7.75 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, H7), 7.79 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, H6), 7.91 (m, 2H, H5, H8). ^{13}C-NMR (DMSO-d$_6$) δ 48.3 (C3'/C5'), 65.4 (C2'/C6'), 109.4 (C3), 124.7 (C5), 126.1 (C8), 131.7 (C4a), 132.4 (C7, C8a), 133.7 (C6), 153.6 (C2), 182.0 (C4), 182.5 (C1). HMBC ^{1}H-^{13}C correlations H3 (C1, C2, C4, C5, C8a), H5 (C4, C7, C8a), H6 (C4a, C8), H7 (C5, C8a), H8 (C1, C4a, C6), H3'/H5' (C2, C3'/C5', C2'/C6'), H2'/H6' (C3'/C5', C2'/C6'). R_f (HPLC) 11.22 min, UV/VIS (MeOH) λ_{max} 237, 272, 459 nm. MS *m/z* AP-ESI: pos. ion mode $[M+H]^+$ 244.0679 (calculated 244.0968).

2,5-Dimorpholin-4-yl-[1,4]benzoquinone, $C_{14}H_{18}N_2O_4$ (4a)
Synthesis and isolation as described above. Brown solid. Yield 24.5%. ^{1}H-NMR (methanol-d$_4$) δ 3.55 (t, *J* = 4.7 Hz, 8H, H7/H7'/H10/H10'), 3.76 (t, *J* = 4.7 Hz, 8H, H8/H8'/H9/H9'), 5.57 (s, 2H, H2/H5). ^{13}C-NMR (methanol-d$_4$) δ 50.4 (C7/C10/ C7'/C10'), 67.5 (C8/C9/ C8'/C9'), 107.3 (C2/C5), 154.2 (C3/C6), 184.4 (C1/C4). HMBC ^{1}H-^{13}C correlations H2/H5 (C1/C4, C3/C6), H8/H8'/H9/H9' (C8/C9/ C8'/C9'). R_f (HPLC) 8.95 min, UV/VIS (MeOH) λ_{max} 229, 379, 536 nm. MS *m/z* AP-ESI: pos. ion mode $[M+Na]^+$ 301.120721 (calculated 301.11587).

2-Hydroxy-5-morpholin-4-yl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienecarboxylic acid (2-hydroxyethyl)-amide, $C_{13}H_{16}N_2O_6$ (4b)
Synthesis and isolation as described above. Red brown solid. Yield 54.9%. ^{1}H-NMR (DMSO-d$_6$) δ 3.24 (m, *J* = 5.5 Hz, 2H, H9), 3.44 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, H10), 3.47 (m (broad), 4H, H11, H-14), 3.66 (m (broad), 4H, H-12, H13), 4.70 (s (broad), 1H, OH), 5.53 (s, 1H, H4), 9.71 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, NH). ^{13}C-NMR (DMSO-d$_6$) δ 40.4 (C9), 48.9 (C11/C14), 60.2 (C10), 65.6 (C12/C13), 102.5 (C4), 107.1 (C1), 158.5 (C5), 167.5 (C7), 175.0 (C2), 179.3 (C6), 182.1 (C3). HMBC ^{1}H-^{13}C correlations NH (C7, C9), H4 (C1, C2, C3, C5, C6), H9 (C7, C10), H10 (C9), H11/H14 (C5, C11, C12, C13, C14), H12/H13 (C11, C12, C13, C14). R_f (HPLC) 7.73 min, UV/VIS (MeOH) λ_{max} 221, 278, 342, 504 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. ion mode $[M-H]^-$ 295.096382 (calculated 295.09356).

2,5-Bis-(4-morpholin-4-yl-phenylamino)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienecarboxylic acid methyl ester, $C_{28}H_{30}N_4O_6$ (4c)

Synthesis and isolation as described above. Dark violet solid. Yield 20.9%. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 3.00 (s, 3H, H8), 3.09 (t, *J* = 4.7 Hz, *J* = 9.4 Hz, 4H, H7', H10'/ H7", H10"), 3.13 (t, *J* = 4.7 Hz, *J* = 9.4 Hz, 4H, H7', H10'/ H7", H10"), 3.74 (m, *J* = 6.6 Hz, *J* = 9.7 Hz, 8H, H8', H9', H8", H9"), 5.66 (s, 1H, H4), 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H3', H5'/ H3", H5"), 6.96 (d, broad, 2H, H2', H6'/ H2", H6"), 7.00 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H, H3', H5'/ H3", H5"), 7.22 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H2', H6'/ H2", H6"), 9.43 (broad, 2H, NH). ^{13}C-NMR (DMSO-d_6) δ 48.2, 48.4 (C7', C10', C7", C10"); 50.6 (C8); 65.8, 65.9 (C8', C9', C8", C9"); 94.1 (C4); 101.5 (C1); 114.7, 115.3 (C3', C5', C3", C5"); 124.6, (C2', C6', C2", C6"); 148.2, 148.9 (C4', C4"); 164.5 (C7); 175.9 (C6); 178.2 (C3). HMBC ^{1}H-^{13}C correlations H4 (C1, C2, C5, C6); H8 (C7); H2', H6', H2", H6" (C2', C3', C4', C5', C6', C2", C3", C4", C5", C6"); H3', H5', H3", H5" (C2', C3', C4', C5', C6', C2", C3", C4", C5", C6"); H7', H10', H7", H10" (C4', C7', C8', C9', C10', C4", C7", C8", C9", C10"); H8', H9', H8", H9" (C7', C8', C9', C10', C7", C8", C9", C10"). R_f (HPLC) 11.80 min, UV/VIS (MeOH) λ_{max} 205, 259, 319, 448 nm. MS *m/z* AP-ESI: pos. ion mode $[M+H]^+$ 519.1666 (calculated 519.2238), AP-ESI: neg. ion mode $[M-H]^-$ 517.2029 (calculated 517.2092).

2,5-Bis-(4-morpholin-4-yl-phenylamino)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienecarboxylic acid ethyl ester, $C_{29}H_{32}N_4O_6$ (4d)

Synthesis and isolation as described above. Dark violet solid. Yield 19.3%. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 0.95 (s, t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H9), 3.09 (t, *J* = 4.8 Hz, *J* = 9.6 Hz, 4H, H7', H10'/ H7", H10"), 3.13 (t, *J* = 4.8 Hz, *J* = 9.6 Hz, 4H, H7', H10'/ H7", H10"), 3.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H8), 3.74 (m, *J* = 6.5 Hz, *J* = 9.7 Hz, 8H, H8', H9', H8", H9"), 5.67 (s, 1H, H4), 6.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H3', H5'/ H3", H5"), 7.01 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H, H3', H5'/ H3", H5"/ H2', H6'/ H2", H6"), 7.22 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H2', H6'/ H2", H6"), 9.43 (broad, 2H, NH). ^{13}C-NMR (DMSO-d_6) δ 13.5 (C9); 48.2, 48.4 (C7', C10', C7", C10"); 59.8 (C8); 65.8, 65.9 (C8', C9', C8", C9"); 94.0 (C4); 102.3 (C1); 114.7, 115.3 (C3', C5', C3", C5"); 124.7, 125.2 (C2', C6', C2", C6"); 147.9 (C5); 149.0, 149.4 (C4", C4"); 164.1 (C7); 176.4 (C6); 177.8 (C3). HMBC ^{1}H-^{13}C correlations H4 (C1, C2, C5, C6); H8 (C7, C9); H9 (C8); H2', H6', H2", H6" (C2', C3', C4', C5', C6', C2", C3", C4", C5", C6"); H3', H5', H3", H5" (C2', C3', C4', C5', C6', C2", C3", C4", C5", C6"); H7', H10', H7", H10" (C4', C7', C8', C9', C10', C4", C7", C8", C9", C10"); H8', H9', H8", H9" (C7', C8', C9', C10', C7", C8", C9", C10"). R_f (HPLC) 12.24 min, UV/VIS (MeOH) λ_{max} 208, 259, 319, 449 nm. MS *m/z* AP-ESI: pos. ion mode $[M+H]^+$ 531.2237 (calculated 531.2238).

Biological activity testing of novel morpholine-substituted quinones

EUCAST-test

A modified method according to the EUCAST discussion document E.Dis 7.1 [14] was used to determine the MIC (minimal inhibitory concentration). The yeasts *Candida maltosa* SBUG 700 deposited at the strain collection of the Department of Biology of the University Greifswald (SBUG) and *Candida albicans* ATCC 90028 (American Type Culture Collection) were chosen as test organisms. As recommended for the test RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Germany), without bicarbonate was supplemented to a final concentration of 2% glucose and buffered with 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Germany) to pH 7. The test compounds were dissolved in methanol, dimethyl sulfoxide (DMSO), distilled water or RPMI medium. In general a test range of 127-1000 µM with a 1,258-fold dilution was used. Amphotericin B (MP biomedicals; Solon, Ohio) fenpropimorph (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim,

Germany) and fluconazole (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Germany) were used as standard substances.
Sterile, disposable 96 well flat bottomed microtitration plates were used for the test. Three different methods were performed depending on the solubility properties of the test substances and the amounts of the isolated products available as well to reduce the amount of organic solvents (methanol, DMSO) to a minimum.
I. Method used for hydrophilic compounds (1,4-hydroquinone, methyl-1,4-hydroquinone, morpholine)
The test substance was dissolved in sterile RPMI medium at 20 fold the end concentration in the first well. The 1:1,258 dilution series was prepared in sterile Eppendorf tubes with medium. To 90 µl medium in each well was added 10 µl of the relevant dilution.
II. Method used for hydrophobic compounds (solvent methanol: 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone, 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester, 2,5-dihydroxybenzoic acid ethyl ester, 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide, 4-morpholinoaniline, fenpropimorph; solvent DMSO: amphotericin B, fluconazole)
The test substance was dissolved in methanol or DMSO at 200 fold the end concentration in the first well. First the 1:1,258 dilution was prepared with the solvent in Eppendorf tubes, followed by a 1:100 dilution. For this 5 µl of each tube was added to 495 µl RPMI medium in an additional Eppendorf tube. The concentration of solvent in each tube was 1%. Each well of the microtitration plate was filled with 100 µl from each tube.
III. Method used for all isolated coupling products and some other very poorly soluble compounds (solvent methanol: 1,4-dihydroxynaphthaline; solvent DMSO: products **3a-3c**, **4a**, **4c**, **4d**; solvent sterile distilled water: product **4b**)
This additional method was developed for poorly soluble compounds available in low amounts. The test substance was dissolved in methanol, DMSO or sterile distilled water at a concentration 100 fold the end concetration in the first well. From this stock solution 20 µl were added to 980 µl of RPMI medium in one Eppendorf tube, followed by a 1:1,258 dilution with medium. The concentration of solvent in the first tube was 2% and decreased with every dilution step. Each well of the microtitration plate was filled with 100 µl from each tube.

All samples were prepared in at least two dilution series in the microtitration plate, one for the incubation with cells and one with distilled water as control. The whole test was performed for all test substances at least twice.
For the preparation of the inoculum test organisms were incubated for 24 h at 30 °C on malt agar. The cells were suspended in distilled water and the cell density was adjusted to 0.5 McFarland by measuring absorbance at a wavelength of 550 nm. For the test the cells were diluted 1:10 with distilled water and 100 µl of this solution was added to each well. For the cell free controls distilled water was used in place of cells. Additionally a control with solvent alone was carried out. The solvents alone had negligible antifungal effect.
The microtitration plates were incubated at 30 °C for 24 hours. The absorbance was read with a microtitration plate reader at 550 nm. The plates were agitated for 10 seconds before reading to ensure uniform turbidity.

Agar disc diffusion test
For the determination of antibacterial and antifungal activity of the newly isolated compounds the bacteria *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and the yeast *Candida maltosa* SBUG 700 were chosen for a disc diffusion test.
The agar disc diffusion test was performed according to the European Pharmacopeia [19,20]. A loopful of an overnight culture of the respective strain grown on Standard nutrition II agar

(Merck, Darmstadt, Germany) was diluted in 3 ml of 0.9% NaCl solution. Sterilized nutrition agar was inoculated with 100 µl of this suspension per 20 ml for one Petri dish.
Sterile blank discs (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, 6 mm in diameter) containing the respective sample solution (10-30 µl) with a final concentration of 1000 nmol were placed on the solidified agar surface. The agar plates were preincubated for 4 hours at four degrees and then the bacteria plates were incubated at 37 °C for 24 hours. The plates with *Candida maltosa* were incubated at 30 °C for 48 hours. Amphotericin B (MP biomedicals; Solon, Ohio), ampicillin (pharmachim; Bulgarien), fenpropimorph (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Germany), fluconazole (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Germany) and gentamicine (Biochrom AG, Berlin, Germany) were used as standards for antibacterial and antifungal activity. The growth inhibition zones were measured in mm.

Cytotoxicity test of novel morpholine-substituted quinones

Cell culture and neutral red uptake assay

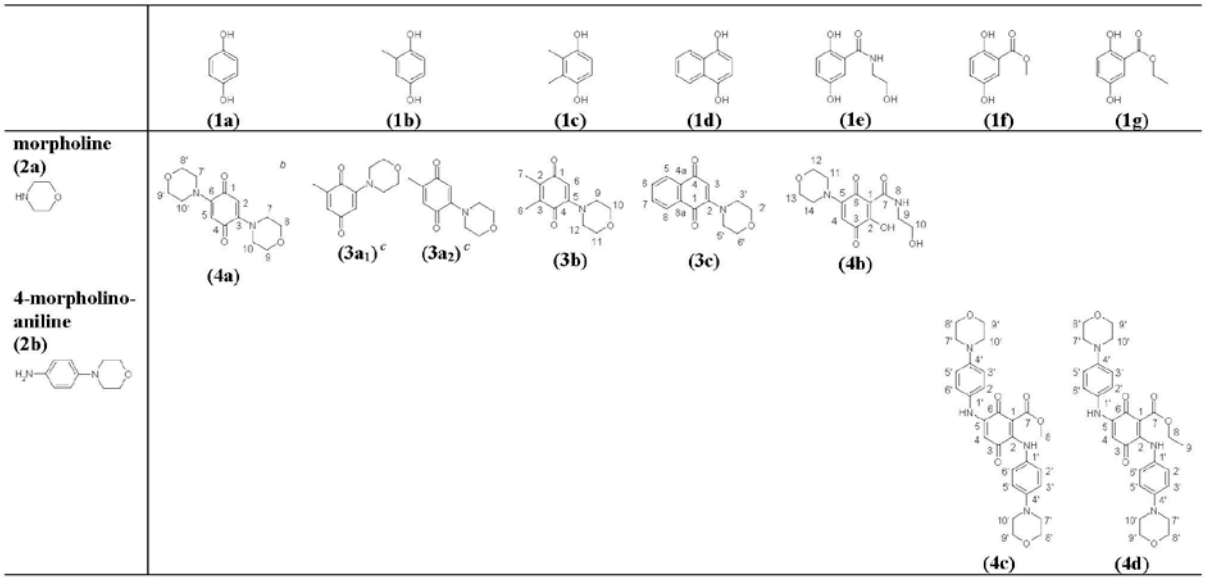
Human urinary bladder carcinoma cells 5637 [ATCC HTB-9] were grown as a monolayer in RPMI (Lonza, Verviers, BE) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma, Deisenhofen, D) and 1% penicillin-streptomycin solution (penicillin 10000 IE/ml; streptomycin 10000 µg/ml, Biochrom AG, Berlin, D). Cells were grown at 37 °C in 95% air humidity, and 5% CO_2, and sub-cultured twice weekly using trypsin/EDTA (0.05%/0.02%, Lonza).
For assays, 5637 cells were seeded at 2.5×10^3 cells/ml in 96-well plates (TPP, Trasadingen, CH) for 24 h. After washing with HBSS (PAA, Cölbe, D), fresh medium was added. Test substances were diluted in assay medium using a stock solution (40 mM in vehicle). Final vehicle concentration did not exceed 0.05%. Plates were left undisturbed for 70 h at 37 °C. Finally, plates were washed twice with HBSS and incubated with freshly prepared neutral red in RPMI (3.3 µg/ml) in the incubator for 3 h. After removing the supernatant and extensive washing, remaining neutral red was dissolved in acidic ethanol and the OD at 540 nm was measured. Etoposide was used as toxicity control, cell culture medium as non-toxic control. Cell viability was calculated as percentage of vehicle control after background reduction. All experiments were carried out twice with 6 replicates for each concentration tested. Where applicable, IC_{50} (inhibitory concentration, 50%) values were calculated by linear regression.

Results and Discussion

Biotransformation of morpholines by laccase

Laccase-catalyzed reaction of morpholine (**2a**) and 4-morpholinoaniline (**2b**) with seven *para*-dihydroxylated aromatic laccase substrates **1a** to **1g** resulted in the formation of eight coupling products (Table 2). These products consist either of one molecule of **2a** and one molecule of laccase substrate which are termed heteromolecular dimers, or of two molecules of **2a** or **2b** and one molecule laccase substrate which are termed heteromolecular trimers.

Table 2. Coupling of aromatic substrates (**1a-1g**) and reactants (**2a**, **2b**) and formed products (**3a$_1$-3c, 4a-4d**) [a]



[a] product number **3** was determined as the monoaminated product
product number **4** was determined as the diaminated product
[b] numbers of atoms for structural characterization
[c] product **3a** was isolated as a mixture of two constitution isomers with the most probable structures **3a$_1$** and **3a$_2$**

The product structures, determined by MS and NMR, demonstrate that not only the primary amino group of 4-morpholinoaniline is able to aminate the aromatic ring system but also the secondary amino group of morpholine can react with the aromatic ring forming amination products **3a$_1$-4b**. All dimer and trimer products consist of morpholine and *para*-quinone moieties as described for other aminations [6,13,21].

Different heteromolecular dimers (**3a$_1$-3c**) and trimers (**4a-4d**) were formed depending on the substitution grade of the dihydroxylated laccase substrates. During the reaction of methyl-1,4-hydroquinone (**1b**) with **2a**, two similar monoaminated products were formed which had comparable HPLC retention times (**3a$_1$**: R_f 9.34 min; **3a$_2$**: R_f 9.51 min) and UV/VIS-spectra. These two products could not be satisfactorily separated because of their similar chromatographic behaviours. According to the MS elution profile two compounds were found with the same mass signal, indicating a product mixture of two constitution isomers. In analogy to the isomers arising from the reaction of methyl-1,4-hydroquinone with *para*-aminobenzoic acid described by Mikolasch et al. [22], we suggest the two structures **3a$_1$** and **3a$_2$** (Table 2).

The laccase-catalyzed reactions of 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone (**1c**) and 1,4-dihydroxy-naphthaline (**1d**) with **2a** resulted in one monoaminated product per reaction (**3b**, **3c**). A second amination of the heteromolecular dimers is hindered by the methyl groups or by the annulated benzene ring.

In the course of the reactions of 1,4-hydroquinone (**1a**), 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide (**1e**), 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester (**1f**), and 2,5-dihydroxybenzoic acid ethyl ester (**1g**) with morpholine (**2a**) or 4-morpholinoaniline (**2b**) two types of heteromolecular trimers (**4a-4d**) were formed. One type (**4a**, **4c**, **4d**) is a heteromolecular trimer consisting of two molecules **2a** or **2b** and one molecule of the laccase substrate whereas the second type of trimer (**4b**) consists of one molecule of **2a**, one molecule of the laccase substrate, and one hydroxygroup derived from water. The reaction mechanism forming the first type of heteromolecular trimers (**4c**, **4d**) involves one first nucleophilic attack on **1f** or **1g** in the *ortho*-position of the carbonyl groups as described by Mikolasch et al. [9] for the reaction of penicillins with substituted dihydroxylated compounds, followed by

attack of a second molecule of **2b** in the *para*-position to the first one. The formation of the second type of heteromolecular trimers (**4b**) involves first an attack by water on **1e** as described by Manda et al. [23] after which a molecule of **2a** couples in the *para*-position to the hydroxygroup forming a heteromolecular hydroxylated monoaminated trimer (**4b**) resulting from the C-O and C-N bond formation. This is the first report of a laccase-mediated synthesis of heteromolecular trimers derived from three different molecular species.
In control reactions without laccase all products were formed to a lesser degree. In all cases the product yield was considerably higher in the reactions with laccase compared with the non-enzymatic reactions, as previously described by Hahn et al. [21] for the reaction of *para*-dihydroxylated compounds with amino acids.

Biological activity of novel morpholine-substituted quinones

All reactants and products were tested for their antimicrobial and cytotoxic activities using three different test systems. Antibacterial and antifungal properties were tested by the agar disc diffusion method, the MIC was determined with a modified method according to the EUCAST discussion document E.Dis 7.1 and cytotoxicity was evaluated using the human urinary bladder carcinoma cells 5637 [ATCC HTB-9].
Products **3a$_1$+3a$_2$**, **3b**, and **3c** showed low to moderate growth inhibition of the gram positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, as well as of the gram negative bacterium *Escherichia coli* and of the yeast *Candida maltosa* in the agar disc diffusion assay (Table 3).

Table 3. Results of the antimicrobial screening [a] of the agar disc diffusion test (test concentration: 1000 nmol) for products **3a$_1$-3c**, reactants **1b-1d**, **2a**, as well as for standard compounds

	Bacillus subtilis ATCC 6051	*Staphylococcus aureus* ATCC 6538	*Escherichia coli* ATCC 11229	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853	*Candida maltosa* SBUG 700
1b	30	27	17	15	11
1c	34	30	14	14	14
1d	32	34	20	11	31
2a	i	i	i	i	i
3a$_1$+3a$_2$	32	28	9	i	21
3b	21	18	7	i	14
3c	21	25	12	i	28
amphotericin B	i	i	i	i	26
ampicillin	38	36	29	i	i
fenpropimorph	i	i	i	i	56
fluconazole	i	i	i	i	44
gentamicine	32	31	25	30	i

[a] Inhibition zones are given in diameter [mm] including the diameter of the paper disc (6 mm); i = inactive (no inhibition zone)

Whereas the amino partner morpholine (**2a**) has no activity against the strains tested the *para*-dihydroxylated laccase substrates have activities comparable to those of the products. None of the other products or reactants showed activity against the strains tested. Interestingly the active compounds were not specific for bacteria or fungi, in contrast to the standard compounds amphotericin B, ampicillin, fenpropimorph, fluconazole, and gentamicine, which inhibit either bacteria or fungi but not both. This finding may allow a possible broad spectrum application against different pathogenic bacteria and fungi, though it may, of course, also hint at general cytotoxicity of the products. Because of this, the cytotoxic activity of the newly synthesized compounds **3a$_1$-3c** was tested (Table 4).

Table 4. Results of the cytotoxic activity tests on human urinary bladder carcinoma cells 5637 [ATCC HTB-9] (test concentration: maximum 100 µM) for products **3a$_1$-3c**, **4b-4d**, reactants **1b-1g**, **2a**, **2b**, as well as for standard compounds

	IC_{50} µM
1b	22
1c	22
1d	7
1e	67
1f	-
1g	-
2a	-
2b	-
3a$_1$+3a$_2$	16
3b	28
3c	7
4b	-
4c	17
4d	22
amphotericin B	8
ampicillin	-
fenpropimorph	46
fluconazole	-
gentamicine	-
etoposide	0.32

- not cytotoxic

The cytotoxicity of the products was similar to the cytotoxicity of the reactants **1b-1d**. The aminoquinones streptonigrin [24,25] and mitomycine C [26,27] are substances which have been shown previously to combine antibiotic and antitumor activity. Furthermore the standard substance amphotericin B also has a degree of cytotoxicity against the carcinoma cell line used here which is similar to that shown by the product **3c**. We note that despite amphotericin B's high cytotoxicity, it is nevertheless used as an antifungal drug in medical practice. Consequently, the broad spectrum effect on bacteria and fungi of product **3c** has not to be a result of general cytotoxicity and the cytotoxicity need not necessarily preclude its future use.
The MIC against *Candida maltosa* was determined using a modified method according to the EUCAST discussion document E.Dis 7.1 [14]. Three different methods were used depending on the solubility properties of the test substances and the amounts of the isolated products available (see Experimental Section, *EUCAST-test*).
Products **3a$_1$+3a$_2$**, **3b**, and **3c** showed lower MICs (Table 5) in comparison with most of the reactants.

Table 5. Results of the MIC determination by a modified method according to the EUCAST (test concentration: maximum 1000 µM) for products **3a$_1$-3c**, reactants **1b-1d**, **2a**, as well as for standard compounds using *Candida maltosa* and in part *Candida albicans* as test organisms

	Candida maltosa				*Candida albicans*			
	MIC		MIC_{50}		MIC		MIC_{50}	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM
1b	>110.11	>1000	>110.11	>1000	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
1c	>138.17	>1000	138.17	1000	>138.17	>1000	138.17	1000
1d	16.14	100.74	10.20	63.66	25.54	159.42	20.30	126.73
2a	>87.12	>1000	>87.12	>1000	>87.12	>1000	>87.12	>1000
3a$_1$+3a$_2$	164.73	794.91	130.95	631.89	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
3b	139.81	631.89	111.14	502.29	139.81	631.89	111.14	502.29
3c	39.10	159.42	24.71	100.74	49.19	200.56	39.10	159.42
amphotericin B	0.63	0.68	0.31	0.34	0.63	0.68	0.31	0.34
fenpropimorph	0.42	1.37	0.14	0.46	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.
fluconazole	1.91	6.25	0.24	0.78	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.

n. t. not tested

Comparison of laccase substrate MICs to product MICs showed that in particular product **3b** had a significantly lower MIC against *Candida maltosa* than the reactant 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone (**1c**). Thus the model product **3b** may be regarded as an example of the laccase-catalyzed creation of a compound with biological activity resulting from reactant **2a**, which has no activity. Reactant **1c** is an example of the amplification of biological activity through laccase-catalyzed reaction. Product **3b**, **3c**, and the corresponding reactants were also tested against *Candida albicans*. The results against *Candida maltosa* and *Candida albicans* were comparable.

The product **4b** and the reactant **2a** were not cytotoxic, whereas the other reactant 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide (**1e**) has low cytotoxicity (Table 4). The reason for the disappearance of cytotoxicity of product **4b** could be the completely altered structure of the reactant **1e** to a heteromolecular trimer consisting of three different molecular parts. This example shows clearly that the laccase-mediated reactions can lead to products with new structural and bioactive properties. The products **4c** and **4d** possess cytotoxicity against carcinoma cells in contrast to the reactants **1f** and **1g** (Table 4). This example shows that the laccase-catalyzed reaction can be used for the assembly of substances which are bioactive from compounds without biological activity.

Though the antimicrobial and cytotoxic activities of the products described were lower than the activities of the standard compounds, the laccase-catalyzed derivatization of a compound which already shows high biological activity with another bioactive compound may result in a more potent product.

Conclusion

Laccase-catalyzed reactions allow the synthesis of new morpholine-substituted quinones. Some of these morpholine derivatives have antibacterial and antifungal activities not shown by the corresponding reactants. A change in cytotoxicity is also seen. In this way the laccase-catalyzed synthesis of hybridmolecules may be a promising tool for providing new drugs for medical and agricultural purposes.

Acknowledgements

Financial support through a scholarship from the government of Mecklenburg-Vorpommern for Veronika Hahn is gratefully acknowledged. We thank Michael Lalk (Institute of Pharmacy, University of Greifswald) and Dirk Gördes (Center for Life Science Automation Celisca, Rostock) for providing MS and NMR data. Robert Jack (Institute of Immunology, University of Greifswald) is gratefully acknowledged for help in preparing the manuscript. We thank Gudrun Schröder (Institute of Medical Microbiology, University of Greifswald) for the obtained test organisms used.

List of abbreviations

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
ATCC	American Type Culture Collection
CPB	citrate phosphate buffer
DMSO	dimethyl sulfoxide
HPLC	high-pressure liquid chromatography
IC_{50}	inhibitory concentration, 50%
MeOH	methanol
MIC	minimal inhibitory concentration
MOPS	3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid

MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBUG	strain collection of the Department of Biology of the University Greifswald
UV/VIS	Ultraviolett/Visible

References

1 Luly, J. R. and Rapoport, H. (1983) J. Am. Chem. Soc. **105,** 2859-2866

2 Behforouz, M., Cai, W., Mohammadi, F., Stocksdale, M. G., Gu, Z., Ahmadian, M., Baty, D. E., Etling, M. R., Al-Anzi, C. H., Swiftney, T. M., Tanzer, L. R., Merriman, R. L. and Behforouz, N. C. (2007) Bioorg. Med. Chem. **15,** 495-510

3 Grüschow, S., Chang, L.-C., Mao, Y. and Sherman, D. H. (2007) J. Am. Chem. Soc. **129,** 6470-6476

4 Moellering, R. C. (2003) Ann. Intern. Med. **138,** 135-142

5 Flagothier, C., Piérard-Franchimont, C. and Piérard, G. E. (2005) Mycoses, **48,** 91-94

6 Niedermeyer, T. H. J., Mikolasch, A. and Lalk, M. (2005) J. Org. Chem. **70,** 2002-2008

7 Manda, K., Hammer, E., Mikolasch, A., Niedermeyer, T., Dec, J., Jones, A. D., Benesi, A. J., Schauer, F. and Bollag, J. M. (2005) J. Mol. Catal. B-Enzym. **35,** 86-92

8 Agematu, H., Tsuchida, T., Kominato, K., Shibamoto, N., Yoshioka, T., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T. and Murao, S. (1993) J. Antibiotics **46,** 141-148

9 Mikolasch, A., Niedermeyer, T. H. J., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E., Schauer, F., Gesell, M., Hessel, S., Jülich, W.-D. and Lindequist, U. (2006) Chem. Pharm. Bull. **54,** 632-638

10 Agematu, H., Kominato, K., Shibamoto, N., Yoshioka, T., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T. and Murao, S. (1993) Biosci. Biotech. Biochem. **8,** 1387-1388

11 Mikolasch, A., Niedermeyer, T. H. J., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E., Schauer, F., Salazar M., Hessel S., Jülich W.-D. and Lindequist U. (2007) Chem. Pharm. Bull. **55,** 412-416

12 Manda, K., Hammer, E., Mikolasch, A., Gördes, D., Thurow, K. and Schauer, F. (2006) Amino Acids **31,** 409-419

13 Hahn, V., Mikolasch, A., Manda, K., Gördes, D., Thurow, K. and Schauer, F. (2009) Amino Acids **37,** 315-321

14 Rodríguez-Tudela, J. L., Barchiesi, F., Bille, J., Chryssanthou, E., Cuenca-Estrella, M., Denning, D., Donnelly, J. P., Dupont, B., Fegeler, W., Moore, C., Richardson, M. and Verweij, P. E. (2002) Clin. Microbiol. Infect. Dis. **9,** 1-8

15 Feng, B. B., Voehler, M., Zhou, L., Passarelli, M., Harris, C. M., Harris, T. M. and Stone, M. P. (1996) Biochemistry **35,** 7316-7329

16 Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., Halkier, T., Mondorf, K. and Xu, F. (1997) Appl. Environ. Microbiol. **63,** 3151-3157

17 Bourbonnais, R. and Paice, M. G. (1990) FEBS Lett. **267,** 99-102

18 Jonas, U., Hammer, E., Schauer, F. and Bollag, J. M. (1998) Biodegradation **8,** 321-328

19 "Mikrobiologische Wertbestimmung von Antibiotika, Diffusionsmethode," in European Pharmacopeia (Europäisches Arzneibuch), 6. Ausgabe, Deutscher–Apotheker–Verlag, Stuttgart; Kap. 2.7.2., 1997.

20 “Mikrobiologische Wertbestimmung von Antibiotika, Diffusionsmethode,“ in Kommentar zum Europäischen Arzneibuch, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Kap. 2.7.2., 2008.
21 Hahn, V., Mikolasch, A., Manda, K., Gördes, D., Thurow, K. and Schauer F. (2009) J. Mol. Catal. B-Enzym. **60,** 76-81
22 Mikolasch, A., Matthies, A., Lalk, M. and Schauer, F. (2008) Appl. Microbiol. Biotechnol. **80,** 389-397
23 Manda, K., Gördes, D., Mikolasch, A., Hammer, E., Schmidt, E., Thurow, K. and Schauer F. (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. **76,** 407-416
24 Bolzán, A. D. and Bianchi, M. S. (2001) Mutat. Res. **488,** 25-37
25 Bringmann, G., Reichert, M. and Hemberger, Y. (2008) Tetrahedron **64,** 515-521
26 Takada, T., Kosugi, Y. and Akiba, M. (1977) Chem. Pharm. Bull. **25,** 259-264
27 Bradner W. T. (2001) Cancer Treat. Rev. **27,** 35-50

Reproduced with permission, from Annett Mikolasch, Kristian Wende, Hannelore Bartrow, Ulrike Lindequist, and Frieder Schauer, 2009, Biotechnol. Appl. Biochem., 54(4), 187-195.
© the Biochemical Society (http://www.babonline.org)

4.2 A novel enzymatic process for the synthesis of new antifungals

Unter Einbeziehung der Ergebnisse der eben vorgestellten Publikation wurde auf dem 9. Kongress für Infektiologie und Tropenmedizin 2008 in Innsbruck ein Poster vorgestellt. Der Abstract erschien in einem Supplement der Zeitschrift *Infection* und ist zusammen mit dem Poster auf den folgenden Seiten abgebildet.

Antimicrobial Substances – Basic Principles and Application

P183
A novel enzymatic process for the synthesis of new antifungals

V. Hahn, A. Mikolasch, F. Schauer (Greifswald, DE)

Introduction: Candida species are today the most important cause of opportunistic mycoses in the world (Cihlar, 2007). Therefore, we developed a new technology to synthesize novel antifungal substances using fungal laccases as catalyst. Laccases [E.C. 1.10.3.2] are polyphenoloxidases, which oxidize aromatic phenols to reactive radicals, which can undergo non-enzymatic coupling reactions. The heteromolecular coupling reactions mediated by laccases can be applied for an environmentally friendly synthesis of a variety of chemical substances and bioactive compounds (Mikolasch et al., 2007). According to these advantages we used this reaction for the derivatization of basic structures of antifungal compounds like azoles or morpholines to increase antifungal activities, to improve bioavailability or to reduce side effects.
Methods: The laccases were obtained from the ligninolytic fungi Pycnoporus cinnabarinus (Pcl) and Myceliophthora thermophila (Mtl). The reaction mixtures were analyzed using an HPLC system with DAD and a RP 18 column.
For mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy the products were isolated via solid phase extraction and dried by lyophilization. The antifungal susceptibility testing was performed with a modified method of E.Dis. 7.1 (Rodriguez-Tudela et al., 2003).
Results: In course of our investigations concerning the modifications of azoles and morpholines, Pcl and Mtl has been found to be able to catalyze the synthesis of novel antifungal compounds. During the laccase-catalyzed transformation of para-hydroxylated substrates into quinones a nucleophilic attack of azoles or morpholines occurs, resulting in C-N-coupled heteromolecular products. Depending on the substituents mono- or diaminated products were formed. Yields of 25-74% showed the high efficiency.
The MS and NMR analyses confirmed the supposed structures of the newly synthesized compounds. Among the isolated products we found substances with antifungal activity, although the substrates were not or less active.
Conclusions: Through the developed enzymatic process we could synthesize different potential antifungal substances.
This process of combinatorial biochemistry may be suitable for the production and improvement of properties of many other biological active substances.
Literature
Cihlar, R.: Candida albicans (2007) Humana Press
Mikolasch, A. et al. (2007) Chem. Pharm. Bull. 55(3). 412-416
Rodriguez-Tudela, J.L. et al., (2003) Clin. Microbiol. Infect. 9. 1-8

P184
Enhanced expression of RND efflux pumps in pairs of isogenic clinical strains of Pseudomonas aeruginosa with acquired multidrug resistance

E. Fähnrich, A. Huth, A. Sigge, M. Vavra, H. von Baum, W.V. Kern (Freiburg, Ulm, DE)

Background: P. aeruginosa (PA) is a nosocomial pathogen which often shows or develops multidrug resistance (MDR). Mechanisms of MDR in PA can be diverse and may include decreased intracellular penetration of antibiotics associated with overexpression of efflux pumps. Detailed information about the risks of efflux-associated MDR in PA is limited since pairs of isogenic isolates are infrequently available for further study.
Methods: Seven pairs of clinical PA isolates with identical genotypes (as assessed by pulsed-field electrophoresis PFGE) were isolated from adult patients hospitalized at an intensive care unit of Ulm University Hospital. Susceptibilities to a panel of different antibiotics were studied by microbroth dilution in the presence or absence of the putative efflux pump PAßN. The quinolone-resistance-determining regions (QRDRs) of gyrA and parC were sequenced. Intracellular dye (pyronin Y) and PAßN accumulation was measured by fluorometry. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed to determine the expression of different RND efflux pumps (mexA, mexD, mexE and mexX) and a porin (oprD). The expression of two independent housekeeping genes was used as a relative standard (rpsL and rpo). Wildtype strain PAO1, efflux-pump knockout strain PA1425 and mexAB/oprM overexpressing strain PA1426 were used as controls.
Results: MIC tests confirmed decreased susceptibility of the second isolate to ß-lactams, fluoroquinolones, tetracycline and/or other antibiotics compared to the parental isolate. A change in the QRDR of gyrA was documented in one pair (83 Thr ->Ile) although in 4 of the 7 cases, a fluoroquinolone had been given between isolation of the two strains. Interestingly, this was the only strain with increased intracellular dye and/or PAßN accumulation compared to the presumed parenteral strain. qRT-PCR revealed overexpression of mexD or mexA in the second compared to the initial isolate in 3 cases. PAßN and pyronin Y accumulation was not consistently correlated with efflux pump gene expression. PAßN accumulation, however, correlated well with the intrinsic antibacterial activity of PAßN.
Conclusions: Efflux mechanisms play an important role in the development of MDR resistance during therapy with antimicrobial substances. In 6 out of 7 pairs decreased dye or PAßN accumulation was observed, and in 3 an enhanced activity of efflux pumps was detected and likely responsible for reduced susceptibilty to different classes of antibiotics.

P185
Analysis of the beta-Tubulin Gene from Vittaforma corneae Suggests Benzimidazole Resistance

C. Franzen, B. Salzberger (Regensburg, DE)

Introduction: Vittaforma corneae is a microsporidium causing corneal and disseminated infections in humans. Benzimidazoles are widely used as antihelmintic drugs in veterinary and human medicine and as antifungal agents in agriculture, and albendazole is one of the most commonly used drugs for treating microsporidiosis in humans. However, clinical data show poor response of Vittaforma infections to albendazole.
Methods: We amplified, cloned, and sequenced the beta-tubulin gene of V. corneae and benzimidazoles were assayed for antimicrosporidial activity using an in vitro assay with V. corneae and Encephalitozoon cuniculi (as control). Microsporidian spores and drugs were added to monolayers of MRC-5 cells on day 0, and the numbers of organisms were measured on day 10.
Results: The sequence showed 72% similarity with the beta-tubulin of Enterocytozoon bieneusi and 72 to 74% similarity with beta-tubulins of Encephalitozoon spp. Analysis of the obtained sequence provides an explanation for the observed clinical resistance of V. corneae to albendazole. The beta-tubulin gene encoded by the sequence has a substitution at Glu198 (with glutamine), which is one of six amino acids reported to be associated with benzimidazole sensitivity. Albendazole expressed significant higher MIC50s for V. corneae than for E. cuniculi.
Conclusions: Molecular data explain the clinicaly observed resistance of V. corneae to benzimidazoles, that could be shown also in vitro. Infections with this microsporidium should not be treated with benzimidazoles and other treatment options should be used.

A novel enzymatic process for the synthesis of new antifungals

Ein neuartiger enzymatischer Prozess zur Synthese von neuen antifungalen Substanzen

V. Hahn, A. Mikolasch, F. Schauer (Greifswald, DE)*
Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Germany

Introduction

Candida species are today the most important cause of opportunistic mycoses in the world (Cihlar, 2007). Therefore, we developed a new technology to synthesize novel antifungal substances using fungal laccases as catalyst. Laccases [E.C. 1.10.3.2] are polyphenoloxidases, which oxidize aromatic phenols to reactive radicals, which can undergo non-enzymatic coupling reactions. The heteromolecular coupling reactions mediated by laccases can be applied for an environmentally friendly synthesis of a variety of chemical substances and bioactive compounds (Mikolasch *et al.*, 2007). According to these advantages we used this reaction for the derivatization of basic structures of antifungal compounds like azoles or morpholines to increase antifungal activities, to improve bioavailability or to reduce side effects.

Results

In course of our investigations concerning the modifications of azoles and morpholines, *Pc*l and *Mt*l has been found to be able to catalyze the synthesis of novel antifungal compounds. During the laccase-catalyzed transformation of *para*-dihydroxylated substrates into quinones a nucleophilic attack of azoles or morpholines occurs, resulting in C-N-coupled heteromolecular products. Depending on the substituents mono- or diaminated products were formed. Yields of 25-74% showed the high efficiency (tab. 1).
The MS and NMR analyses confirmed the supposed structures of the newly synthesized compounds (fig. 2).
Among the isolated products we found substances with antifungal activity, although the initial used compounds were not or less active.

Tab. 1: Products formed as a result of the reaction of compound A (amine) and B (*para*-dihydroxylated substrate) and the respective yields

Products formed as a result of the reaction of compound A and B		**Yield**
Compound A	Compound B	
1-aminobenzotriazole	2,5-dihydroxybenzoic acid ethyl ester	27,28
5-amino-4-imidazole-carboxamide	2,5-dihydroxybenzoic acid	25,04
	2,5-dihydroxybenzamide	27,89
	2,5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide	66,48
morpholine	1,4-hydroquinone	24,48
	2,3-dimethylhydroquinone	74,22
	1,4-dihydroxynaphthalene	47,74

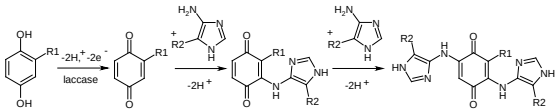


Fig. 2: Course of a laccase-mediated reaction of azoles with *para*-dihydroxylated substances

Methods

The laccases were obtained from the ligninolytic fungi *Pycnoporus cinnabarinus* (*Pc*l) and *Myceliophthora thermophila* (*Mt*l).
The reaction mixtures were analyzed using an HPLC system with DAD and a RP 18 column.
For mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy the products were isolated via solid phase extraction and dried by lyophilization (fig. 1).
The antifungal susceptibility testing was performed with a modified method of E.Dis. 7.1 (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2003).

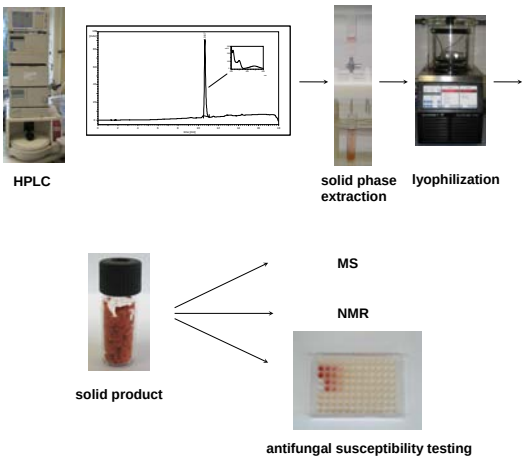


Fig. 1: Scheme for the purification of a laccase-mediated coupling product, analysis and susceptibility testing

Conclusions

Through the developed enzymatic process we could synthesize different potential antifungal substances.
This process of combinatorial biochemistry may be suitable for the production and improvement of properties of many other biological active substances.

Literature
Cihlar, R.: *Candida albicans* (2007) Humana Press
Mikolasch, A. *et al.* (2007) Chem. Pharm. Bull. 55(3). 412-416
Rodriguez-Tudela, J.L. *et al.* (2003) Clin. Microbiol. Infect. 9. 1-8

* e-mail: veronikahahn@gmx.at

4.3 Application of a fungal virulence factor for the synthesis of new antifungal compounds

Im Rahmen der 42. Wissenschaftlichen Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. 2008 in Jena wurden in einem Vortrag die potentiellen Einsatzmöglichkeiten der Laccase bei der Behandlung von Erkrankungen vorgestellt. Die Grundidee besteht darin, zwei für den Menschen nicht toxische Substanzen mit Hilfe der von *Cryptococcus neoformans* im Zuge des Infektionsprozesses gebildeten Laccase zu koppeln, um so einen Hemmstoff zu erhalten, der den Erreger direkt hemmt, um so eine Ausbreitung zu verhindern. Auf ähnliche Weise kann auch der von Weintrauben bei der Infektion mit *Botrytis cinerea* gebildete Metabolit Resveratrol wirken. *Botrytis cinerea* besitzt zwei Laccasen, von denen die eine als Virulenzfaktor zur Detoxifikation von Phytoalexinen wie Resveratrol genutzt wird während die andere Resveratrol in eine für den Pilz toxisch wirkende Verbindung umwandelt (Schouten et al. 2002). Die Aktivierung von Verbindungen bzw. die Verknüpfung von Substanzen mit Hilfe der vom Mikroorganismus gebildeten Laccase und die damit verbundene Hemmung eröffnen neue Möglichkeiten bei der Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen. Der Abstract dieses Vortrages, wurde in einem Supplement der Zeitschrift *Mycoses* veröffentlicht.

Deletion mutants of Pga29 show a significantly decreased virulence in an oral model of candidiasis and a reduced release of TH1-type cytokines. These findings might be related to the altered cell wall composition and host recognition of the mutants. In contrast to Pga29, the expression of Pga36 is increased during the yeast to hyphae transition and the latter protein can only be detected in the cell wall of the hyphal morphology. Functional analysis showed that the protein also plays a role in the stationary phase of the cells.

Unlike *C. albicans*, *C. glabrata* does not form hyphae during human infection. In the latter organism the Cwp1-family comprises the most abundant cell wall proteins. No homologues of these proteins are found in *C. albicans*. Deletion of the entire protein-family resulted in an increased sensitivity to cell wall active compounds and a reduced adhesion capacity. Using a proteomic approach, complex compensation mechanisms have been unraveled in the mutants.

From a medical point of view the cell wall of human pathogenic yeasts not only is a key organelle in the understanding of fungal virulence, but also is an interesting structure for improved sero-diagnosis and novel antifungal drug developments.

Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen, Nationales Referenzzentrum für Systemische Mykosen, Göttingen, Germany

R18
Application of a fungal virulence factor for the synthesis of new antifungal compounds

V. Hahn, A. Mikolasch and F. Schauer

Objectives: Cryptococcus neoformans is an imperfect fungus with basidiomycete cell structure that causes Cryptococcosis, the second most common opportunistic mycosis in AIDS-patients. Cryptococcus laccase is known as an enzyme acting as a major virulence factor in this yeast.[1] Laccase is responsible for melanization at which from hydroxylated amino acid DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine) quinones are formed and polymerized.

Laccases [E.C. 1.10.3.2] are polyphenoloxidases, which oxidize diphenols. We use laccases of basidiomycete white rot fungi for the synthesis of reactive quinonoid radicals, which further undergo non-enzymatic coupling reactions with compounds like azoles or morpholines. In contrast to the melanization our process aims the enzymatic production of antifungal heteromolecular di- or trimers. The laccase-mediated process can be applied to increase antifungal activities, to improve bioavailability or to reduce side effects.

Methods: The laccases were obtained from the apathogenic basidiomycete fungi *Pycnoporus cinnabarinus* (Pcl) and *Myceliophthora thermophila* (Mtl). The reaction mixtures were analyzed using an HPLC system with DAD and a RP 18 column.

For mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy the products were isolated via solid phase extraction and dried by lyophilization. The antifungal susceptibility testing was performed with a modified method of E.Dis. 7.1.

Results: Through our novel enzymatic process precursors and basic structures of antifungal compounds can be coupled with para-dihydroxylated substrates. Both used laccases Pcl and Mtl were able to catalyze the synthesis of new substances by C-N-coupling.[2] The process starts with the formation of quinones from the para-dihydroxylated compounds followed by a nucleophilic attack of azoles or morpholines, resulting in C-N-coupled heteromolecular products. Depending on the substituents mono- or diaminated products were formed. Yields of 25–78% showed the high efficiency of the reaction.

The MS and NMR analyses confirmed the supposed structures of the novel compounds. Among the isolated products we found substances with antifungal activity, although the initial used compounds were not or less active.

Conclusions: The introduced synthesis procedure revealed that even virulence factors such as laccase can be used for the formation of bioactive compounds including new antifungals. Catalyzed by laccases nontoxic precursors of antifungals can be coupled with laccase, resulting in an synthesis of antifungal compounds and acting at locations where laccase activity is present.

References:

1 Zhu XD, Williamson PR. Role of laccase in the biology and virulence of Cryptococcus neoformans. *FEMS Yeast Res* 2004; **5:** 1–10.

2 Manda K, Hammer E, Mikolasch A *et al.* Laccase-induced derivatization of unprotected amino acid L-tryptophan by coupling with p-hydroquinone 2,5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide. *Amino Acids* 2006; **31:** 409–419.

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Institut für Mikrobiologie, Greifswald, Germany

4.4 Laccase-catalyzed carbon–nitrogen bond formation: coupling and derivatization of unprotected L-phenylalanine with different *para*-hydroquinones

Diese Publikation wurde in der Zeitschrift *Amino Acids* veröffentlicht und beschäftigt sich mit der Derivatisierung von L-Phenylalanin ohne die vorherige Einführung von Schutzgruppen in einer sogenannten "one-pot" Reaktion.

Es wurde gezeigt, dass die Synthese von mono- und diaminierten chinoiden Produkten vom Substitutionsgrad des dihydroxylierten Reaktionspartners abhängt. Zudem ist die Ausbeute an Produkt abhängig von der Art der Laccase, dem pH-Wert des eingesetzten Puffers und der Konzentration des Aminopartners.

Diese Publikation bildete u.a. die Grundlage für Versuche zur Nachbildung von Verbindungen mit potentieller Klebkraft am Vorbild des von marinen Muscheln gebildeten Klebstoffes.

Amino Acids (2009) 37:315–321
DOI 10.1007/s00726-008-0154-2

ORIGINAL ARTICLE

Laccase-catalyzed carbon–nitrogen bond formation: coupling and derivatization of unprotected L-phenylalanine with different *para*-hydroquinones

V. Hahn · A. Mikolasch · K. Manda · D. Gördes · K. Thurow · F. Schauer

Received: 30 April 2008 / Accepted: 10 July 2008 / Published online: 10 August 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract Unprotected L-phenylalanine was derivatized by an innovative enzymatic method by means of laccases from *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila*. During the incubation of L-phenylalanine with *para*-hydroquinones using laccase as biocatalyst, one or two main products were formed. Dependent on the substitution grade of the hydroquinones mono- and diaminated products were detected. Differences of the used laccases are discussed. The described reactions are of interest for the derivatization of amino acids and a synthesis of pharmacological-active amino acid structures in the field of white biotechnology.

Keywords Laccase · Cross-coupling · Phenylalanine · Derivatization · Unprotected amino acid · Quinone

Introduction

Enzyme catalyzed reactions are currently of considerable interest for new biotechnological purposes. A great advantage of these reactions is the utilization of mild and environmental-friendly conditions, for example none or less toxic educts, ambient temperature and atmospheric pressure. Thus, also substances which are sensitive towards chemical synthesis procedures, e.g. amino acids can be derivatized. The so far known chemical derivatization methods of amino acids are complicate and mostly connected with a use of dangerous compounds, for example the usage of sodium periodate (Lai et al. 1996). The laccase-catalyzed reaction is an environmental-friendly method for the derivatization of unprotected amino acids.

Laccases [E.C. 1.10.3.2] are polyphenoloxidases, which oxidize aromatic phenols to reactive radicals, which can undergo non-enzymatic coupling reactions (Davin and Lewis 2005; Burton 2003; Claus 2003; Gianfreda et al. 1999; Thurston 1994; Bollag 1992). Therefore, interest in the potential of these enzymes in biotransformations used in organic synthesis has increased (Mikolasch et al. 2006; Niedermeyer et al. 2005; Schauer et al. 2001) especially to show great promise for the derivatization of amino acids (Manda et al. 2006).

To further determine the potential of laccases for amino acid derivatization, laccases of *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila* were used for reactions of L-phenylalanine with different *para*-hydroquinones. In this study, we show that L-phenylalanine can be derivatized by different substituted *para*-hydroquinones under laccase-catalyzed conditions. Depending on the substituents mono- or diaminated products were formed.

Material and methods

Chemicals

L-phenylalanine was purchased from Serva Feinbiochemica GmbH & Co. (Heidelberg, Germany). 1,4-Hydroquinone

V. Hahn (✉) · A. Mikolasch · F. Schauer
Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, F.-L.-Jahnstr. 15, 17487 Greifswald, Germany
e-mail: veronikahahn@gmx.at

K. Manda
Zentrum für Radiologie, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Rostock AöR, Rostock, Germany

D. Gördes · K. Thurow
Center for Life Science Automation Celisca, Rostock, Germany

and methyl-1,4-hydroquinone were products of Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany) and 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone was obtained from Arcos Organics (New Jersey, USA). Trimethyl-1,4-hydroquinone was purchased from Alfa Aesar GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany).

Enzymes

The laccase was obtained from *Pycnoporus cinnabarinus* SBUG-M 1044. The white rot fungus was isolated from an oak tree in northern Germany and is deposited at the strain collection of the Department of Biology of the University of Greifswald (SBUG).

Cultivation of *Pycnoporus cinnabarinus* SBUG-M 1044 and crude preparation of laccase as we reported previously (Jonas et al. 1998).

Myceliophthora thermophila laccase (expressed in genetically modified *Aspergillus* sp.) was obtained from Novozymes (Bagsværd, Denmark).

Measurement of laccase activity

The activity of laccase was determined spectrophotometrically at 420 nm using ABTS (2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) as substrate (Bourbonnais and Paice 1990) and the method described by Jonas et al. (1998).

Experimental procedures

For analytical experiments the educts L-phenylalanine (1 or 100 mM) and the respective 1,4-hydroquinone (1 mM) were incubated with laccase (activity 487 nmol ml^{-1} min^{-1}). For the reaction with *Pycnoporus cinnabarinus* laccase, 20 mM sodium acetate buffer (SAB) pH 5 was used and the reaction with the laccase of *Myceliophthora thermophila* proceeded in citrate phosphate buffer (CPB, 18 mM citrate, 165 mM phosphate) pH 7. The reaction mixture was incubated in 5-ml-brown-glass-bottles with 2 ml sample volume at room temperature with agitation at 200 rpm.

Analytical HPLC

For routine analysis, the reaction mixtures were analyzed using an HPLC system LC-10AT VP (Shimadzu, Germany) consisting of a FCV-10AL VP pump, SPD-M10A VP diode array detector, and a SCL-10A VP control unit controlled by Class-VP version 6.12 SP5. The separation of the substances was achieved on an endcapped, 5-µm, LiChroCART® 125-4 RP18 column (Merck, Darmstadt, Germany) at a flow rate of 1 ml/min. A solvent system consisting of methanol (eluent A) and 0.1% phosphoric acid (eluent B), starting from an initial ratio of 10% A and 90% B and reaching 100% methanol within 14 min, was used.

Isolation of transformation products

At first, a liquid–liquid-extraction with ethylacetate was performed to remove undesired byproducts.

Then a RP18 silicagel column (polypropylene 6 ml, 2000 mg adsorbent material, Merck, Darmstadt, Germany) was charged with 1 ml of the aqueous phase from the liquid–liquid-extraction. The amino acid L-phenylalanine was eluted with 30 ml citrate phosphate buffer, 1 ml 5%, 2 ml 10% methanol in water and 1 ml 100% methanol. The cross-coupling products were eluted with additional 1 ml 100% methanol. For mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy the isolated products (**3c** and **4a**) were dried by lyophilization.

Characterization

The products were characterized by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). The standard atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry experiments were performed using an Agilent Series 1100 HPLC system and an Agilent 1946C quadrupole mass spectrometer (Waldbronn, Germany). The MS was used with both, atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (API-ES) sources. HPLC separation was performed on a LiChroCART® 125-4, LiChrosphere® 100 RP-18e column (Merck, Darmstadt, Germany) at 25°C at a flow rate of 1 mL/min within a 14-min gradient from 10 to 100% methanol in 0.1% aqueous formic acid. APCI/API-ES MS conditions (positive and negative ion mode) were as follows: nebulizer and drying gas, nitrogen; nebulizer pressure, 30 psig; drying gas flow, 10 L/min; vaporizer temperature (for APCI), 350°C; drying gas temperature, 250°C; capillary voltage, 4 kV; corona current (for APCI), 4 µA.

The LC high-resolution mass spectrometry experiments were performed on an Agilent Series 1200 HPLC system and an Agilent 1969A time-of-flight mass spectrometer (Waldbronn, Germany). The TOF-MS conditions (neg. and pos. ion mode) with a dual sprayer API-ES source were as follows: nebulizer and drying gas, nitrogen; nebulizer pressure, 40 psig; drying gas flow, 10 L/min; drying gas temperature, 350°C; capillary voltage, 4 kV; fragmentor voltage, 175 V; skimmer voltage, 60 V; octopole voltage, 250 V; mass reference (*m/z*), 121.05087 and 922.00979 in pos. ion mode, and 112.98558 and 1033.98810 in neg. ion mode. HPLC separation was performed on a Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6 × 50 mm, 3.5 µm, column (Agilent, Germany) at 25°C at a flow rate of 0.5 mL/min within a 14-min gradient from 10 to 100% methanol in 0.1% aqueous formic acid.

The nuclear magnetic resonance (NMR) spectra for product **3c** and **4a** (^{1}H-, ^{13}C-NMR, DEPT) were recorded on different Bruker Avance 600 instruments (Karlsruhe, Germany) at 600 MHz in MeOH-d_4. Tetramethylsilane was used as internal standard.

2-(3,6-Dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-3-phenylpropionic acid (**3a**)

Synthesis and isolation as described above. **3a** was only present in a mixture with **4a**, due to the fast reaction of **3a** to **4a**. Yield for **3a** and **4a** 66.8%. R_f (HPLC) 10.52 min, UV/VIS λ_{max} 211, 260, 477 nm.

MS (LC/MS): *m/z* (relative intensity): API-ES, pos. ion mode 272 ($[M + H]^+$, 65), 226 ($[M - CO_2H–H]^+$, 100).

HRMS for **3a**: $[M + H]^+$ ($C_{15}H_{14}NO_4$): calcd.: 272.0917; found: 272.0911 (−2.4 ppm).

2-[4-(1-Carboxy-2-phenylethylamino)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino]-3-phenylpropionic acid (**4a**)

Synthesis and isolation as described above. Red brown solid. Yield 71.3%. R_f (HPLC) 12.95 min, UV/VIS λ_{max} 205, 342, 460 nm; 600 MHz ^{1}H-NMR (MeOH-d_4), see Table 1.

MS (LC/MS): *m/z* (relative intensity): API-ES, pos. ion mode 1325 ($[3 M + Na]^+$, 28), 891 ($[2 M + Na]^+$, 42), 457 ($[M + Na]^+$, 68), 435 ($[M + H]^+$, 100); APCI, pos. ion mode 435 ($[M + H]^+$, 15), 391 ($[M - COO + H]^+$, 100).

Table 1 ^{1}H-NMR data of the transformation product (**4a**) resulted from the reaction of 1,4-hydroquinone (**1a**) and L-phenylalanine (**2**) with laccase (MeOH-d_4 as solvent)

C	^{13}C	^{1}H	^{1}H–^{13}C correlations
2′, 6′	130.6	7.17, d, 4H, (7.4)	C3, C1′, C2′, C6′
3′, 5′	129.5	7.23, dd, 4H, (7.0, 7.8)	C1′, C3′, C5′
4′	127.8	7.15, m, 2H	C2′, C6′
2″, 5″	93.7	5.11, s, 2H	C1″, C3″, C4″, C6″
2	60.1	4.05, dd, 2H, (4.6, 6.8)	C1, C3, C1′, C1″, C4″
3	39.0	3.25, dd, 2H, (4.6, −13.7)	C1, C2, C1′, C2′, C6′
3	39.0	3.05, dd, 2H, (6.8, −13.7)	C1, C2, C1′, C2′, C6′
3″, 6″	179.1		
1	176.1		
1″, 4″	152.2		
1′	138.7		

[1] H, J (in Hz) values in parentheses. Chemical shifts are expressed in δ (ppm) calibrated on the resonances of TMS

HRMS for **4a**: $[M + H]^+$ ($C_{24}H_{23}N_2O_6$): calcd.: 435.1551; found: 435.1549 (−0.4 ppm).

$[M - H]^-$ ($C_{24}H_{21}N_2O_6$): calcd.: 433.1405; found: 433.1411 (+1.3 ppm).

2-(5-Methyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-3-phenylpropionic acid (**3b**)

R_f (HPLC) 11.75 min, UV/VIS λ_{max} 208, 275, 477 nm.

MS (LC/MS): *m/z* (relative intensity): API-ES, pos. ion mode 286 ($[M + H]^+$, 100), 240 ($[M - CO_2H–H]^+$, 83).

HRMS for **3b**: $[M + H]^+$ ($C_{16}H_{16}NO_4$): calcd.: 286.1074; found: 286.1081 (+2.7 ppm).

2-[4-(1-Carboxy-2-phenylethylamino)-5-methyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino]-3-phenylpropionic acid (**4b**)

R_f (HPLC) 13.57 min, UV/VIS λ_{max} 346, 515 nm.

MS (LC/MS): *m/z* (relative intensity): API-ES, pos. ion mode 919 ($[2 M + Na]^+$, 68), 471 ($[M + Na]^+$, 29), 449 ($[M + H]^+$, 100), 403 ($[M- CO_2H–H]^+$, 76).

HRMS for **3b**: $[M + H]^+$ ($C_{24}H_{23}N_2O_6$): calcd.: 449.1707; found: 449.1705 (−0.4 ppm).

$[M + Na]^+$ ($C_{24}H_{22}N_2O_6Na$): calcd.: 471.1527; found: 471.1524 (−0.7 ppm).

2-(4,5-Dimethyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-3-phenylpropionic acid (**3c**)

Synthesis and isolation as described above. Dark red to purple solid. Yield 60.5%. R_f (HPLC) 12.95 min, UV/VIS λ_{max} 204, 289, 477 nm. ^{1}H-NMR δ 7.20 (m, ^3J = 6.7 Hz, 4H, H-2′, H-3′, H-5′, H-6′), 7.15 (t, ^3J = 6.7 Hz, 1H, H-4′), 5.26 (s, 1H, H-2″), 3.97 (dd, ^3J = 4.6 Hz, ^3J = 7.7 Hz, 1H, H-2), 3.24 (dd, ^3J = 4.6 Hz, ^2J = −13.8 Hz, 1H, H-3), 3.04 (dd, ^3J = 7.7 Hz, ^2J = −13.8 Hz, 1H, H-3), 1.96 (d (s), ^5J = 1.0 Hz, 3H, aromatic methyl group), 1.95 (d (s), ^5J = 1.0 Hz, 3H, aromatic methyl group).

^{13}C-NMR δ 183.46 (C-3″); 180.60 (C-6″); 172.89 (C-1); 143.79; 141.18; 135.19; 133.91; 126.63; 126.19; 125.54; 124.58; 123.79; 94.05 (C-2″); 56.22 (C-2); 35.18 (C-3); 8.91 (aromatic methyl group); 7.99 (aromatic methyl group).

MS (LC/MS): *m/z* (relative intensity): APCI, pos. ion mode 300 ($[M + H]^+$, 26), 256 ($[M - CO_2 + H]^+$, 100); API-ES, neg. ion mode 298 ($[M - H]^-$, 30), 254 ($[M - COO-H]^-$, 100).

HRMS for **3c**: $[M + H]^+$ ($C_{17}H_{18}NO_4$): calcd.: 300.1230; found: 300.1228 (−0.6 ppm).

$[M + Na]^+$ ($C_{17}H_{17}NO_4Na$): calcd.: 322.1050; found: 322.1051 (+0.6 ppm).

3-Phenyl-2-(2,4,5-trimethyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)propionic acid (**3d**)

R_f (HPLC) 13.53 min, UV/VIS λ_{max} 203, 287, 494 nm.

MS (LC/MS): *m/z* (relative intensity): API-ES, pos. ion mode 336 ($[M + Na]^+$, 12), 256 ($[M + H]^+$, 63); 270 ($[M - COO\text{-}H]^-$, 100).

HRMS for **3c**: $[M + Na]^+$ ($C_{18}H_{19}NO_4Na$): calcd.: 336.1206; found: 336.1199 (−2.2 ppm).

Results

General observations

The heteromolecular transformation of 1,4-hydroquinone and methyl-1,4-hydroquinone with L-phenylalanine (educts **1a**, **1b** and **2**, Fig. 1) in the presence of lacccase from *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila* resulted in the formation of two main products for each reaction **3a**, **3b** and **4a**, **4b** (Fig. 1). Whereas in the reaction of 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone (**1c**) and L-phenylalanine only one main coupling product (**3c**) was formed. Due to their characteristic UV/VIS-spectra, formation of products and decrease of substrates could easily be detected by HPLC using a diode array detector (200–595 nm).

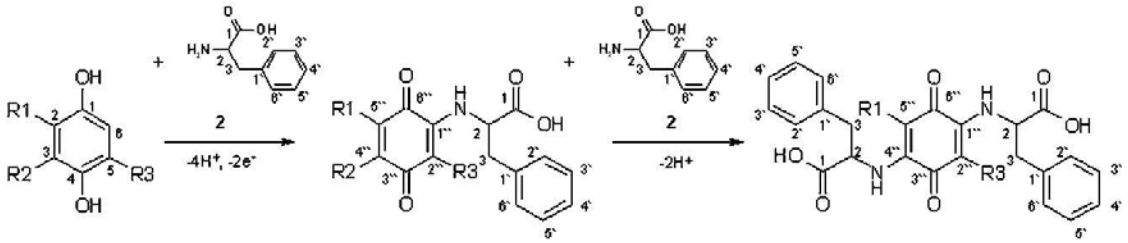
In all performed heteromolecular transformations, the product yield was low with an educt concentration of 1:1 mM, and in the reaction mixture of trimethyl-1,4-hydroquinone (**1d**) no products were detected. Through a rise of amino acid concentration from 1:1 to 1:100 mM the reaction rate and the product yield could be increased. The highest product yield was achieved with the laccase of *M. thermophila* at a pH of 7 and a 1:100 mM concentration of the educts.

Using *M. thermophila* laccase (1:100 mM, **1a**:**2**) the concentration of **3a** (first product) was approx. 13-fold higher after 20 min and those of **4a** (second product) approx. 3-fold higher after 24 h than in the reaction with *P. cinnabarinus* laccase (1:100 mM) (Fig. 2). By means of the laccase of *M. thermophila* the concentration of product **3c** was 27-fold higher in the 1:100 mM attempt (2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone:L-phenylalanine) after 24 h compared with the 1:1 mM reaction.

In the reaction mixture of **1d** and **2** (1:100 mM) only traces of one coupling product (**3d**) were detected, due to the characteristic UV/VIS-spectra and MS measurements (for data see "Characterization" section).

In all laccase-catalyzed reactions of **1a-d,** respectively, one product was detected, which was identified through the retention time (HPLC) and UV/VIS-spectrum as the corresponding quinonoid form of the substrate (data not shown), as described for other *para*-hydroquinones (Mikolasch et al. 2006; Manda et al. 2005; Niedermeyer et al. 2005). In all cross-coupling reactions, the respective hydroquinone was converted within 20 min completely into the corresponding quinone.

The concentration of these quinones decreased during the incubation of the reaction mixture, under simultaneous formation of heteromolecular coupling products. This means that the reactions proceeded in two steps. First the quinones are formed, which then react with the amino acid resulting in the development of a monoaminated heteromolecular coupling product, as recently described (Mikolasch et al. 2006; Manda et al. 2005; Niedermeyer et al. 2005). Further reactions with the amino partner to diaminated products are dependent on the substitution grade of the *p*-hydroquinone. Whereas **3a** reacted with **2** forming **4a**, an diaminated product, for **3c** no further reaction with **2** could be detected.



1	R1	R2	R3
a	H	H	H
b	CH_3	H	H
c	CH_3	CH_3	H
d	CH_3	CH_3	CH_3

3	R1	R2	R3
a	H	H	H
b	CH_3	H	H
c	CH_3	CH_3	H
d	CH_3	CH_3	CH_3

4	R1	R3
a	H	H
b	CH_3	H

Fig. 1 1,4-hydroquinone, methyl-1,4-hydroquinone, 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone and trimethyl-1,4-hydroquinone (substrates **1a–d**), respectively with L-phenylalanine (educt **2**) and the products (**3a–d**), (**4a, b**) as results of laccase-catalyzed reaction

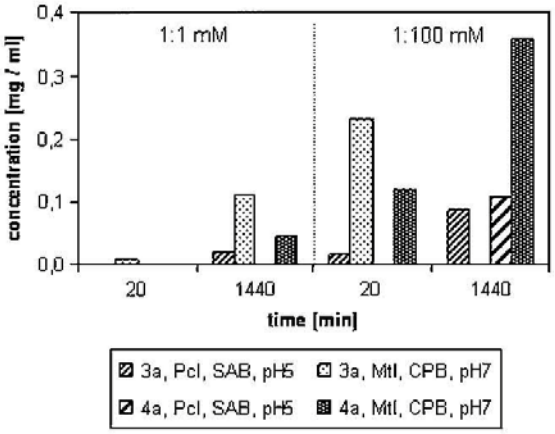


Fig. 2 Comparison of the formation of heteromolecular coupling products **3a** and **4a** in the reaction with *Pcl* and *Mtl* at educt concentrations of 1:1 and 1:100 mM (hydroquinone:L-phenylalanine)

Due to the highest yield of the main coupling products **3a**, **3c** and **4a**, the reaction with *Myceliophthora thermophila* laccase, 1:100 mM (1,4-hydroquinone/2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone:L-phenylalanine) was chosen for the characterization of the products.

Detailed structural characterization of three products

By means of HPLC-MS the reaction product **3a** was identified as quinonoid structure, arising from the oxidation of 1,4-hydroquinone and further coupling with one molecule L-phenylalanine.

In accordance with the first heteromolecular coupling product, the second coupling product **4a** was identified as quinonoid structure. But while **3a** was formed of one molecule benzoquinone and one molecule L-phenylalanine, product **4a** was constituted of one molecule benzoquinone and two molecules of the amino acid L-phenylalanine. The structure was revealed by MS measurements and NMR analysis. In the API-ES positive ion mode the typical fragment ion of the decarboxylated form of the product was found. The analysis of product **3a** by high-resolution mass spectrometry (HRMS) in positive ion mode showed the expected ions $[M + H]^+$ at $m/z = 272.0911$. This measured value, with an error of -2.4 ppm, was in adequate conformance with the calculated values for the formula $C_{15}H_{14}NO_4$. The HRMS of product **4a** in the positive ion mode showed a signal at $m/z = 435.1549$ for the quasi-molecular ion $[M + H]^+$. This value confirmed the calculated mass of the quasi-molecular ion $[M + H]^+$ with a deviation of -0.4 ppm. Additionally, an intensive signal was detected in negative ion mode at $m/z = 433.1411$ for the $[M - H]^-$ ion, in good accordance with the supposed value $m/z = 433.1405$, too.

^{1}H-NMR spectral data of **4a** showed characteristic signals for both educts (Table 1). Multiplicity of the H5″ and H2″ protons indicated substituents at the C1″ and the C4″ position. In the ^{13}C-NMR spectrum of **4a,** the signal for C3″ and C6″ in the range of 180 ppm indicated a quinonoid character of the product. The HMBC spectrum of **4a** (Table 1) showed correlations between the protons H5″/H2″ and the quinone carbonylcarbons confirming the oxidation of the *p*-hydroquinone to a quinone as described previously (Mikolasch et al. 2006; Manda et al. 2005; Niedermeyer et al. 2005; Tatsumi et al. 1994a, b). All facts together proved **4a** to be aminated at the C1″ and the C4″ position of the quinone ring.

The heteromolecular product **3c** has a monoaminated quinonoid structure, as shown with MS and NMR measurements. In the API-ES (neg. ion mode) and APCI (pos. ion mode) measurements the anticipated quasi-molecular ions $[M - H]^-$ at $m/z = 298$ and $[M + H]^+$ at $m/z = 300$ were detected. The investigations concerning product **3c** by high-resolution mass spectrometry in positive ion mode showed signals for the $[M + H]^+$ ion at $m/z = 300.1228$ and for the $[M + Na]^+$ ion at $m/z = 322.1051$ which were in good accordance with the theoretical values of $m/z = 300.1230$ (-0.6 ppm) and $m/z = 322.1050$ ($+0.6$ ppm), respectively.

The final confirmation of the structure was accomplished with different NMR measurements in deuterated methanol-d_4 (^{1}H-, ^{13}C-NMR, DEPT). In evaluation of the ^{1}H- and ^{13}C-NMR-spectra it could be stated that both the number and the multiplicity of resonance signals within the aromatic range changed in comparison with **1c**. In the ^{1}H-NMR-spectrum of **3c** appears a signal at 5.26 ppm, which could be assigned to the H6″. This could be attributed to the coupling of one molecule **2** at C1. The aromatic signals of **2** are high-field-shifted in the coupling product. Additionally all signals show more varied couplings due to the substitution at the amino group caused by steric effects of **1c**. In the ^{13}C-NMR-spectrum, two signals in the range of 180 ppm indicated a quinonoid character of the product. Including the results of DEPT the structure of **3c** could be confirmed, as 2-(4,5-dimethyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-3-phenylpropionic acid (Fig. 1).

Discussion

Structural characterization of three reaction products showed that in the case of laccase-catalyzed reaction, derivatization of the amino acid L-phenylalanine with *para*-dihydroxylated compounds depends on the number and position of substituents of the substrates.

The *p*-hydroquinone-substrates can be divided into two groups. There are on the one hand alkylated *p*-hydroquinones as used in this study and on the other hand

2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives as used by Mikolasch et al. (2006), Manda et al. (2005) and Niedermeyer et al. (2005).

We pointed out that enzymatic derivatization of amino acids is possible with alkylated *p*-hydroquinones, namely 1,4-hydroquinone as the basic structure, methyl-1,4-hydroquinone, 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone and trimethyl-1,4-hydroquinone, while Manda et al. (2006) derivatized L-tryptophane with 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide only. 2,5-Dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide is a substance of the 2,5-dihydroxybenzoic acid derivative group.

As mentioned above the laccase catalyzes a radical formation. The radicals can be transformed into quinones, and then a nucleophilic attack of the amino acid is possible. The nuclear amination resulting in the formation of a C–N-coupled heteromolecular product, consisting of the respective quinone and the amino acid L-phenylalanine, as described for other aminations (Mikolasch et al. 2006; Manda et al. 2005; Niedermeyer et al. 2005; Michalek and Szarkowska 1959).

In the reaction of hydroquinones with amines, two aminations dependent on the substitution grade are conceivable. First one amine is coupled to the hydroquinone, confirmed by the structural characterization of the products **3a** and **3c**. A further amine molecule can then react with the *para*-position to the first amine group, if there is no other substituent. That was confirmed by the structural analysis of **4a** (Fig. 1). The same reaction mechanism could be observed with **1b** and **2**. Nevertheless, the *ortho*-position for the diamination would be possible, but it is not very likely due to the steric covering of the *ortho*-position of the first amino substituent. The preferential substitution is in *para*-position (Yamaoka and Nagakura 1971), as described likewise for other diaminations (Niedermeyer et al. 2005; Berger 1988; Finley 1988) (Fig. 3).

Remarkable is the fact that small amounts of **3d** were formed from **1d** under the used reaction conditions (1:100 mM, **1d**:**2**), whereas Niedermeyer et al. (2005) did not detect any products in the reactions of trimethyl-1,4-hydroquinone and aromatic amines with a concentration of 1:5 mM. Our results suggest that changes in molarity can initiate the formation of products.

Altogether the amination of unsubstituted and monomethylated 1,4-hydroquinone leads to two coupling products, heteromolecular di- and trimer. In contrast to this reaction pattern, the heteromolecular dimer is the final product in the transformation reactions of 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone and trimethyl-1,4-hydroquinone respectively with L-phenylalanine, developed after the first nucleophilic addition. Due to the methyl groups at C2 and C3 at the aromatic ring of **1c** and additionally at C5 of **1d** a second amination is hindered. A diamination of substituted

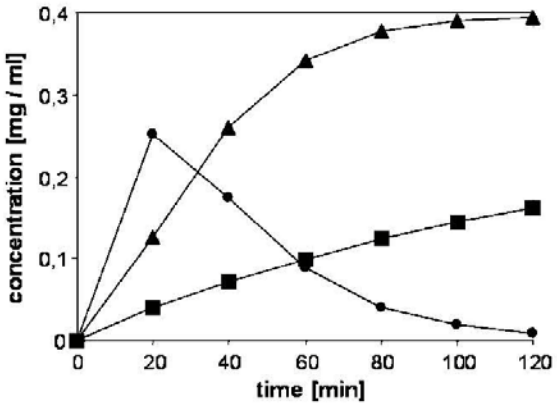


Fig. 3 Kinetics of product formations (**3a** *filled circle*; **3c** *filled square*, **4a** *filled triangle*) during laccase-catalyzed reaction of 1,4-hydroquinone (educt **1a**) and 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone (substrate **1c**), respectively, with L-phenylalanine (educt **2**) (1:100 mM)

1,4-benzoquinones is however not impossible in principle. With hydroxy, alkoxy or halogen substituents the reaction happens usually under substitution of the functional group and also alkyl groups can be replaced in some cases by amino groups (Ulrich and Richter 1977). Chakraborty et al. (1998) determined in the reaction of 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone and octadecylamine, a substitution of a methyl group, which was in *para*-position to the first bound octadecylamine.

Here it is to be pointed out that these reactions were chemically catalyzed, without participation of laccase. Due to the mild reaction conditions in laccase-catalyzed synthesis, compared to chemical methods, no diamination was determined with laccase.

The reactions of **1a** and **1c,** respectively, with **2** showed many parallels.

Concerning product concentration the heteromolecular transformation reactions were affected by laccase and pH-value of the used buffer solution respectively. Moreover, the product yields were depended on the quantity of the amino acid.

The highest product yield was reached with the laccase of *M. thermophila* and an excess of amino acid. This corresponds with the experiments of Niedermeyer et al. 2005. There it was stated that with *Trametes spec.* laccase (pH-optima 5) the product formation happens slower and with lower yield than with *M. thermophila* laccase (pH-optima 7). Furthermore, increasing the ratio of the amino partner in comparison with the alkylated hydroquinone of 5:1 led to faster turnover rates and higher product yields (Niedermeyer et al. 2005).

Nevertheless, an influence of organic acids of the buffer cannot be excluded, since these can already cause an oxidation of the substrate (Jonas 1997).

In summary, the experiments confirmed, that a derivatization of unprotected amino acids, like L-phenylalanine catalyzed by laccase is possible. The presented method is a new one pot synthesis for the production of molecules with probably new properties. So these derivatized amino acids could be the basis of new pharmaceuticals. Especially in the connection with quinones this could be promising. 1,4-Quinones are components of important bioactive compounds, for example antibiotics or chemotherapeutics (Pachatouridis et al. 2002; Mizushina et al. 2000; Fleck et al. 1978; Falci et al. 1977).

Our described synthesis method is suitable to render the properties of the amino acids and/or of the used hydroquinone. The biological characteristics of the new compounds will be prospectively tested in future.

The application possibilities of the new enzymatically synthesized compounds is manifold and the laccase could be specifically chosen for the respective utilization, for example temperature-resistance or pH-stability. In the future the applicability of laccase will be optimized and enhanced to improve the utilization of the coupling products.

Acknowledgments Financial support by means of a scholarship from the government of Mecklenburg-Vorpommern is gratefully acknowledged. We thank M. Lalk (Institute of Pharmacy, University of Greifswald), K. Weisz (Institute of Biochemistry, University of Greifswald) for providing NMR data and R. Jack (Institute of Immunology, University of Greifswald) for help in preparing the manuscript.

References

Berger S, Hertl P, Rieker A (1988) Physical and chemical analysis of quinones. In: Patai S, Rappoport Z (eds) The chemistry of the quinoid compounds, 2 edn. John Wiley and Sons Ltd., New York, pp 29–86

Bollag JM (1992) Enzymes catalyzing oxidative coupling reactions of pollutants. In: Sigel H, Sigel A (eds) Metal ions in biological systems, 28th edn. Marcel Dekker Inc, New York, pp 205–217

Bourbonnais R, Paice MG (1990) Oxidation of non-phenolic substrates—an expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Lett 267:99–102

Burton SG (2003) Laccases and phenol oxidases in organic synthesis—a review. Curr Org Chem 7:1317–1331

Chakraborty M, McConville DB, Niu Y, Tessier CA, Youngs WJ (1998) Reactions of primary and secondary amines with substituted hydroquinones: nuclear amination, side-chain amination, and indolequinone formation. J Org Chem 63:7563–7567

Claus H (2003) Laccases and their occurrence in prokaryotes. Arch Microbiol 179:145–150

Davin LB, Lewis NG (2005) Dirigent phenoxy radical coupling: advances and challenges. Curr Opin Biotechnol 16:398–406

Falci KJ, Franck RW, Smith GP (1977) Approaches to the mitomycins: photochemistry of aminoquinones. J Org Chem 42:3317–3319

Finley K (1988) In: Patai S, Rappoport Z (eds) The chemistry of the quinoid compounds. 2 edn. John Wiley and Sons Ltd., New York, pp 537–717

Fleck WF, Strauss DG, Meyer J, Porstendorfer G (1978) Fermentation, isolation, and biological activity of maduramycin: a new antibiotic from *Actinomadura rubra*. Z Allg Mikrobiol 18:389–398

Gianfreda L, Xu F, Bollag JM (1999) Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediat J 3:1–25

Jonas U (1997) Biotransformation von Biarylverbindungen durch Weißfäulepilze unter besonderer Berücksichtigung des ligninolytischen Enzymsystems von *Pycnoporus cinnabarinus* und *Trametes versicolor*. Dissertation, Mat. Nat. Fakultät. E.-M.-Arndt-Universität, Greifswald

Jonas U, Hammer E, Schauer F, Bollag JM (1998) Transformation of 2-hydroxydibenzofuran by laccases of white rot fungi *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus* and characterization of oligomerization products. Biodegradation 8:321–328

Lai JH, Pham H, Hangauer DG (1996) Synthesis of a vicinal tricarbonyl amide derivative of L-phenylalanine. J Org Chem 61:1872–1874

Manda K, Hammer E, Mikolasch A, Gördes D, Thurow K, Schauer F (2006) Laccase-induced derivatization of unprotected amino acid L-tryptophan by coupling with p-hydroquinone 2, 5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide. Amino Acids 31:409–419

Manda K, Hammer E, Mikolasch A, Niedermeyer T, Dec J, Jones AD, Benesi AJ, Schauer F, Bollag JM (2005) Laccase-induced cross-coupling of 4-aminobenzoic acid with para-dihydroxylated compounds 2, 5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide and 2, 5-dihydroxybenzoic acid methyl ester. J Mol Catal B Enzym 35:86–92

Michalek H, Szarkowska L (1959) The quinone–amino acid complexes and polyphenolase. Acta Biochimica Polonica 6:399–409

Mikolasch A, Niedermeyer THJ, Lalk M, Witt S, Seefeldt S, Hammer E, Schauer F, Gesell M, Hessel S, Jülich WD, Lindequist U (2006) Novel penicillins synthesized by biotransformation using laccase from Trametes spec. Chem Pharm Bull 54:632–638

Mizushina Y, Ueno T, Oda M, Yamaguchi T, Saneyoshi M, Sakaguchi K (2000) The biochemical mode of inhibition of DNA polymerase β by α rubromycin. Biochem Biophys Acta 1523:172–181

Niedermeyer THJ, Mikolasch A, Lalk M (2005) Nuclear amination catalyzed by fungal laccases: reaction products of *p*-hydroquinones and primary aromatic amines. J Org Chem 70:2002–2008

Pachatouridis C, Iakovidou Z, Myoglou E, Mourelatos D, Pantazaki AA, Papageorgiou VP, Kotsis A, Liakopoulou-Kyriakides M (2002) Synthesis and cytogenetic effects of aminoquinone derivatives with a di- and tripeptide. Anti Cancer Drugs 13:367–372

Schauer F, Lindequist U, Hammer E, Jülich WD, Schäfer A, Jonas U (2001) Biotransformation von biologisch aktiven Verbindungen aus verschiedenen chemischen Stoffklassen mittels der Enzyme Laccase und Manganperoxidase. Patentschrift. WO 01/98518 A2

Tatsumi K, Freyer A, Minard RD, Bollag JM (1994a) Enzymatic coupling of chloroanilines with syringic acid, vanillic acid and protocatechuic acid. Soil Biol Biochem 26:735–742

Tatsumi K, Freyer A, Minard RD, Bollag JM (1994b) Enzyme-mediated coupling of 3, 4-dichloroanilin and ferulic acid: a model for pollutant binding to humic materials. Environ Sci Technol 28:210–215

Thurston CF (1994) The structure and function of fungal laccases. Microbiol 140:19–26

Ulrich H, Richter R (1977) Die *para*-Chinone der Benzol- und Naphthalin-Reihe. In: Houben-Weyl (eds) Methoden der organischen Chemie. 4. Aufl. (Band VII/3a), Chinone, Teil 1. Thieme-Verlag, Stuttgart, pp 402–413

Yamaoka T, Nagakura S (1971) Reactions of aliphatic amines with *p*-benzoquinone and its chloro derivatives. Bull Chem Soc Jpn 44:2971–2975

4.5 Derivatization of amino acids by fungal laccases: Comparison of enzymatic and chemical methods

In dieser Publikation, die im *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* erschienen ist, wurde die chemische mit der enzymatisch-katalysierten Derivatisierung von L-Phenylalanin bzw. L-Tryptophan verglichen.

Dabei wurde festgestellt, dass - im Gegensatz zu den Reaktionen von 2,5-Dihydroxy-acetophenon mit L-Phenylalanin bzw. L-Tryptophan in Gegenwart von Natriumiodat (6 mM) als chemischem Katalysator - nur mittels Laccase mono- und diaminierte Produkte nachgewiesen werden konnten. Bei der Produktbildung aus einfachen Hydrochinonen und L-Phenylalanin bestanden die Unterschiede v.a. in der Ausbeute der Produkte, wobei z.T. der Vorteil bei den laccasekatalysierten Reaktionen lag.

Author's personal copy

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 60 (2009) 76–81

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb

Derivatization of amino acids by fungal laccases: Comparison of enzymatic and chemical methods

Veronika Hahn[a,*], Annett Mikolasch[a], Katrin Manda[b], Dirk Gördes[c], Kerstin Thurow[c], Frieder Schauer[a]

[a] Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, F.-L.-Jahnstr. 15, 17487 Greifswald, Germany
[b] Universitätsklinikum Rostock AöR, Zentrum für Radiologie, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie, Südring 75, 18059 Rostock, Germany
[c] Center for Life Science Automation Celisca, Friedrich-Barnewitz-Strasse 8, 18119 Rostock, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 October 2008
Received in revised form 9 January 2009
Accepted 2 April 2009
Available online 11 April 2009

Keywords:
Laccase
Sodium iodate
Quinone
Amino acids
Cross-coupling

ABSTRACT

Derivatization of the unprotected amino acids L-phenylalanine and L-tryptophan can be achieved by laccase-catalyzed cross linking to *para*-dihydroxylated compounds. The use of amino acids in laccase-catalyzed aminations may provide the basis of new adhesives modeled on mussel adhesive proteins. We have used laccases from *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila* for the enzymatic derivatization and compared its effectiveness to chemical catalysis by sodium iodate. Both types of catalysis resulted in the formation of mono- or diaminated products, depending on the degree of substitution of the dihydroxylated substances. However there were considerable differences in the courses of the chemically and enzymatically catalyzed reactions. Thus, the laccase-catalyzed reaction of 2,5-dihydroxyacetophenone with L-phenylalanine and L-tryptophan resulted in mono- and diaminated coupling products (yields 40–60%) while no transformation products were recovered from the reaction catalyzed by 6 mM sodium iodate. In this case the laccase-catalyzed derivatization is clearly more efficient than the chemically catalyzed counterpart.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Laccases [E.C. 1.10.3.2] are enzymes which currently excite great interest for their use in organic synthesis. As polyphenoloxidases laccases are able to oxidize dihydroxylated aromatic substances to reactive radicals, which can undergo non-enzymatic coupling reactions [1–6]. The enzymatic catalyzed reaction of dihydroxylated compounds and amines results in the formation of aminobenzoquinones connected via stable C—N bonds [7–11]. Laccases have been used for the synthesis of novel antibiotics [8,12–14], for compounds with antineoplastic activity [15] and for the derivatization of unprotected amino acids [7,16]. The use of amino acids as coupling partner for laccase-catalyzed aminations might serve as the basis for the synthesis of new adhesives modeled on mussel adhesive proteins [17,18] and such potentially biocompatible adhesives would be of interest for many medical applications. To broaden the spectrum of laccase substrates which might be used in this way and to determine the enzyme's reactivity towards different potential substrates we have used 2,5-dihydroxyacetophenone, 1,4-hydroquinone and 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone as substrates.

For this study we exploited laccases of *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila* to catalyze the reaction of these substrates with L-phenylalanine and L-tryptophan to produce mono- or diaminated products. To compare enzymatic and chemical methods we attempted in parallel to catalyze the same reactions with sodium iodate.

2. Experimental

2.1. Chemicals

L-phenylalanine and L-tryptophan were purchased from Serva Feinbiochemica GmbH & Co. (Heidelberg, Germany). 1,4-Hydroquinone and 2,5-dihydroxyacetophenone were from Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany) and 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone was obtained from Arcos Organics (NJ, USA).

2.2. Enzymes

Fungal strain. *Pycnoporus cinnabarinus* SBUG-M 1044 was isolated from an oak tree in northern Germany. This white rot fungus is deposited in the strain collection of the Department of Biology of the University Greifswald (SBUG).

* Corresponding author. Tel.: +49 3834 864225; fax: +49 3834 864202.
E-mail address: veronikahahn@gmx.at (V. Hahn).

1381-1177/$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi: 10.1016/j.molcatb.2009.04.002

Author's personal copy

Cultivation of *Pycnoporus cinnabarinus* SBUG-M 1044.: *P. cinnabarinus* was initially cultivated on malt agar plates that were incubated for 7 days at 30 °C and then kept at 4 °C. The liquid culture was prepared by inoculating a nitrogen-rich medium containing 5 g glucose, 1 g KH_2PO_4, 0.52 g L-asparagine, 0.5 g yeast extract, 0.5 g KCl, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mL mineral salt solution and 50 mL $FeSO_4$ solution (0.2 g L^{-1}) with three 1 cm^2 agar culture fragments. The mineral salt solution contained 1 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0.06 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, and 0.04 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ per liter modified according to Braun-Lüllemann et al. [19]. Incubation was performed without shaking at 30 °C for 7 days. A uniform inoculum was obtained by homogenization of this culture with an Ultra-Turrax homogenizer T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) at 8000 rpm. For the production of the ligninolytic enzyme laccase, 40 mL medium inoculated with 2 mL of the homogenized pre-culture was incubated in 100 mL Erlenmeyer flasks for 7 days with 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (10 mM), a known inducer of laccase. Cultures were shaken in a water bath (GFL model 1092, Burgwedel, Germany) at 30 °C and 158 rpm.

Preparation of laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* SBUG-M 1044.: Under these culture conditions *P. cinnabarinus* produced laccase as a single extracellular enzyme with an activity of 500 nmol mL^{-1} min^{-1}. The culture medium was filtered through a glass fiber filter in a Büchner funnel to separate the medium from whole cells. The cell-free culture medium was stirred with DEAE-Sephacel (Sigma, Steinheim, Germany) for 1 h and the adsorbed enzymes were eluted from the DEAE-Sephacel with 20 mM sodium acetate buffer (pH 5). The enzyme extract was desalted using a Sephadex G-25 Superfine column (Pharmacia, Freiburg, Germany). This enzyme preparation contains only isoenzymes of laccase, but no other enzymes and was used in 20 mM sodium acetate buffer (SAB) pH 5.0 which is close to its pH optimum [20–22].

Laccase from *Myceliophthora thermophila* (expressed in genetically modified *Aspergillus* sp.) was obtained from Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). It was used as received (activity 1000 U g^{-1}; substrate: syringaldazine) in citrate phosphate buffer (CPB, 18 mM citrate, 165 mM phosphate) at its pH optimum of pH 7.0 [21,23].

2.3. Measurement of laccase activity

The activity of laccases was determined spectrophotometrically at 420 nm with ABTS (2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) as substrate [24] using the method described by Jonas et al. [22]. 1 U is defined as 1 μmol mL^{-1} min^{-1}.

2.4. Experimental procedures

For analytical experiments the educts L-phenylalanine or L-tryptophan (1 mM, 10 mM or 100 mM) and the respective dihydroxylated compound (1 mM) were incubated with laccase (activity 0.5 U). In controls the respective compounds were incubated in SAB or CPB without laccase. For the chemical catalysis we used a final concentration of sodium iodate of 6 mM or 320 mM in distilled water [11,25–27].

2 mL reaction mixtures were incubated with agitation at 200 rpm in 5-mL-brown-glass-bottles at room temperature.

2.5. Analytical HPLC

For routine analysis, the reaction mixtures were analyzed using an HPLC system LC-10AT VP (Shimadzu, Germany) consisting of a FCV-10AL VP pump, SPD-M10A VP diode array detector, and a SCL-10A VP control unit controlled by Class-VP version 6.12 SP5. The separation of the substances was achieved on an endcapped, 5 μm, LiChroCART® 125-4 RP18 column (Merck, Darmstadt, Germany) at a flow rate of 1 mL min^{-1}. A solvent system consisting of methanol (eluent A) and 0.1% phosphoric acid (eluent B), starting from an initial ratio of 10% A and 90% B and reaching 100% methanol within 14 min, was used.

2.6. Isolation of transformation products

For the isolation of **4a**, a RP18 silicagel column (60 mL, 10 g adsorbent material, phenomenex, Strata, Germany) was charged with 8 mL of reaction mixture. Excess L-phenylalanine was eluted with 50 mL citrate phosphate buffer, 20 mL 30% methanol in water and 7 mL 100% methanol. The cross-coupling product was eluted with additional 7 mL 100% methanol. The isolated product was dried by lyophilization prior to mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

The isolation of **3c**, **4c** and **3d** was as described by Hahn et al. [16].

2.7. Characterization of the products

The products were characterized by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). The standard atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry experiments were performed using an Agilent Series 1100 HPLC system and an Agilent 1946C quadrupole mass spectrometer (Waldbronn, Germany). The MS was used with both, atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (API-ES) sources. HPLC separation was performed on a LiChroCART® 125-4, LiChrosphere® 100 RP-18e column (Merck, Darmstadt, Germany) at 25 °C at a flow rate of 1 mL min^{-1} within a 14-min gradient from 10% to 100% methanol in 0.1% aqueous formic acid. APCI/API-ES MS conditions (positive and negative ion mode) were as follows: nebulizer and drying gas, nitrogen; nebulizer pressure, 30 psig; drying gas flow, 10 L min^{-1}; vaporizer temperature (for APCI), 350 °C; drying gas temperature, 250 °C; capillary voltage, 4 kV; corona current (for APCI), 4 μA.

LC high-resolution mass spectrometry experiments were performed on an Agilent Series 1200 HPLC system and an Agilent 1969A time-of-flight mass spectrometer (Waldbronn, Germany). The TOF-MS conditions (negative and positive ion mode) with a dual sprayer API-ES source were as follows: nebulizer and drying gas, nitrogen; nebulizer pressure, 40 psig; drying gas flow, 10 L min^{-1}; drying gas temperature, 350 °C; capillary voltage, 4 kV; fragmentor voltage, 175 V; skimmer voltage, 60 V; octopole voltage, 250 V; mass reference (*m/z*), 121.05087 and 922.00979 in positive ion mode, and 112.98558 and 1033.98810 in negative ion mode. HPLC separation was performed on a Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6 mm × 50 mm, 3.5 μ, column (Agilent, Germany) at 25 °C at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} within a 14-min gradient from 10% to 100% methanol in 0.1% aqueous formic acid.

The nuclear magnetic resonance (NMR) spectra for product **4a** (^1H, ^{13}C NMR, HMBC) was recorded on a Bruker Avance 600 instrument (Karlsruhe, Germany) at 600 MHz in MeOH-d_4. Tetramethylsilane was used as internal standard.

2.7.1. 2-(2-Acetyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-3-phenylpropionic acid (3a)

Yield 29.67%. R_f (HPLC) 11.84 min, UV–vis (MeOH) λ_{max} 204, 277, 445 nm.

MS (LC/MS): *m/z* (relative intensity): API-ES, positive ion mode 314 ($[M+H]^+$, 92), 336 ($[M+Na]^+$, 85), 268 ($[M-CO_2H-H]^+$, 100).

HRMS for **3a**: $[M+Na]^+$ ($C_{17}H_{15}NO_5Na$): calculated: 336.08424; found: 336.08425 (+0.1 ppm).

Author's personal copy

*2.7.2. 2-(2-Acetyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-3-(1H-indol-3-yl)-propionic acid (**3b**)*

Yield 38.20%. R_f (HPLC) 11.31 min, UV–vis (MeOH) λ_{max} 216, 279, 447 nm.

MS (LC/MS): *m/z* (relative intensity): API-ES, positive ion mode 391 ($[M+K]^+$, 15), 375 ($[M+Na]^+$, 70), 353 ($[M+H]^+$, 8).

HRMS for **3b**: $[M+H]^+$ ($C_{19}H_{17}N_2O_5$): calculated: 353.11319; found: 353.11335 (+0.4 ppm). $[M+Na]^+$ ($C_{19}H_{16}N_2O_5Na$): calculated: 375.09514; found: 375.09538 (+0.6 ppm).

*2.7.3. 2-(3,6-Dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-3-phenylpropionic acid (**3c**)*

3c was only present in a mixture with **4c**, due to the fast reaction of **3c** to **4c**. Yield for **3c** and **4c** 66.80%. R_f (HPLC) 10.52 min, UV–vis (MeOH) λ_{max} 211, 260, and 477 nm. Structural characterization was previously published by Hahn et al. [16]

*2.7.4. 2-(4,5-Dimethyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino)-3-phenylpropionic acid (**3d**)*

Dark red to purple solid. Yield 60.50%. R_f (HPLC) 12.95 min, UV–vis (MeOH) λ_{max} 204, 289, and 477 nm. Structural characterization was previously published by Hahn et al. [16].

*2.7.5. 2-[2-Acetyl-4-(1-carboxy-2-phenylethylamino)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino]-3-phenylpropionic acid (**4a**)*

Synthesis and isolation as described above. Brown solid. Yield 39.52%. R_f (HPLC) 12.85 min, UV–vis (MeOH) λ_{max} 209, 338, and 479 nm.

MS (LC/MS): *m/z* (relative intensity): API-ES, positive ion mode 975.3 ($[2M+Na]^+$, 35), 499.2 ($[M+Na]^+$, 23), 477 ($[M+H]^+$, 100), 431 ($[M-CO_2H-H]^+$, 20).

HRMS for **4a**: $[M+H]^+$ ($C_{26}H_{25}N_2O_7$): calculated: 477.16562; found: 477.16556 (−0.1 ppm). $[M+Na]^+$ ($C_{26}H_{24}N_2O_7Na$): calculated: 499.14756; found: 499.14727 (−0.6 ppm).

^{1}H NMR (methanol-d_4) δ 7.23 (m, 2H, H-5, H-9), 7.17 (m, 2H, H-5", H-9"), 7.21 (m, 2H, H-6", H-8"), 7.19 (m, 2H, H-6, H-8), 7.15 (dd, J = 6.5, 6.6 Hz, 2H, H-7, H-7"), 5.6 (s, 1H, H-5′), 5.55 (dd, J = 4.4, 8.3 Hz, 1H, H-2), 4.02 (dd, J = 5.0, 6.4 Hz, 1H, H-2"), 3.35 (dd, J = −13.8, 4.3 Hz, 1H, H-3), 3.02 (dd, J = −13.8, 8.6 Hz, 1H, H-3), 3.23 (dd, J = −13.7, 4.6 Hz, 1H, H-3"), 3.07 (dd, J = −13.7, 6.9 Hz, 1H, H-3"), 2.47 (s, 3H, H-8′).

^{13}C NMR (methanol-d_4) δ 130.7 (C-5, C-9); 130.7 (C-5", C-9"); 129.4 (C-6", C-8"); 129.4 (C-6, C-8); 127.7 (C-7, C-7"), 98.2 (C-5′), 64.6 (C-2), 60.2 (C-2"), 41.6 (C-3), 39.0 (C-3"), 32.9 (C-8"), 201.4 (C-7′), 180.2 (C-6′), 177.9 (C-3′), 176.9 (C-1), 176.3 (C-1"), 158.4 (C-1′), 151.3 (C-4′), 138.4 (C-4"), 138.9 (C-4), 107.4 (C-2′).

HMBC ^{1}H–^{13}C correlations H-5, H-9 (C-3, C-7, C-5, C-9); H-5", H-9" (C-3", C-7", C-5", C-9"); H-6", H-8" (C-4", C-6", C-8"); H-6, H-8 (C-4, C-6, C-8); H-7, H-7" (C-5, C-9, C-5", C-9′); H-5′ (C-4′, C-1′, C-3′); H-2 (C-3, C-4, C-1′, C-1); H-2" (C-3", C-4", C-4′, C-1"); H-3 (C-2, C-5, C-9, C-4, C-1); H-3" (C-2", C-5", C-9", C-4", C-1").

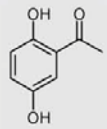
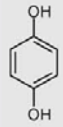
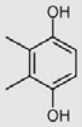
*2.7.6. 2-{2-Acetyl-4-[1-carboxy-2-(1H-indol-3-yl)-ethylamino]-3,6-dioxo-cyclohexa-1,4-dienylamino}-3-(1H-indol-3-yl)-propionic acid (**4b**)*

Yield 37.60%. R_f (HPLC) 12.18 min, UV–vis (MeOH) λ_{max} 218, 282, and 337 nm.

MS (LC/MS): *m/z* (relative intensity): API-ES, positive ion mode 577.1 ($[M+Na]^+$, 100), 555.1 ($[M+H]^+$, 51).

HRMS for **4b**: $[M+H]^+$ ($C_{30}H_{27}N_4O_7$): calculated: 555.18742; found: 555.18689 (−0.9 ppm). $[M+Na]^+$ ($C_{30}H_{26}N_4O_7Na$): calculated: 577.16946; found: 577.16827 (−2.1 ppm). $[2M+Na]^+$ ($C_{60}H_{52}N_8O_{14}Na$): calculated: 1131.34950; found: 1131.34687 (−2.3 ppm).

Table 1
Coupling of aromatic substrates (**1a–c**) and educts (**2a**, **2b**) and formation of products (**3a–4c**).

	Aromatic substrates		
	 (**1a**)	 (**1b**)	 (**1c**)
L-phenylalanine (2a)	**3a**, **4a**	**3c**, **4c**	**3d**
L-tryptophan (2b)	**3b**, **4b**	–[a]	–[a]

[a] No reaction performed.

*2.7.7. 2-[4-(1-Carboxy-2-phenylethylamino)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino]-3-phenylpropionic acid (**4c**)*

Red brown solid. Yield 71.30%. R_f (HPLC) 12.95 min, UV–vis (MeOH) λ_{max} 205, 342, and 460 nm. Structural characterization was previously published by Hahn et al. [16].

3. Results and discussion

The unprotected amino acids L-phenylalanine **2a** and L-tryptophan **2b** were subjected to laccase-catalyzed transformation with *p*-hydroquinone and two different substituted *p*-hydroquinones **1a–c** (Table 1).

Using 1 mM 2,5-dihydroxyacetophenone (**1a**) and 10 mM concentration of the amino acids (**2a**, **2b**) one monoaminated product per reaction (**3a**, **3b**) was detected after 20 min by HPLC (Fig. 1: A1, A2 and B1, B2). Extending the reaction time up to 24 h yielded one diaminated product (**4a**) in reactions using either of the laccases. Product **4b**, in contrast, was only detected in reactions in which the laccase from *Myceliophthora thermophila* was used. The C–N coupling products, consisting of *p*-quinone and amino acid moieties, were structurally characterized by HPLC using a diode array detector, by MS and NMR resulting in the structures **3a**, **3b** and **4a**, **4b** illustrated in Fig. 2.

The laccase substrate 2,5-dihydroxyacetophenone will be oxidized by laccase. The one-electron oxidation of the dihydroxylated aromatic substrate is accompanied by reduction of molecular oxygen to water by transfer of four electrons. The oxidation of a reducing substrate by laccase typically involves the loss of a single electron and the generation of a free radical [3,5]. The free radicals of the laccase substrate have been described to create new heteromolecular hybrid molecules (Fig. 2). Two molecules of the radical disproportionate to the laccase substrate and a quinone structure, which reacts with the amino acids forming aminated quinone derivatives **3a** and **3b**.

The coupling of **1a** with **2a** and **2b** respectively occurs in *ortho*-position of the $COCH_3$-group of **1a**, as described by Manda et al. [9] and Niedermeyer et al. [10] for the reactions of *para*-dihydroxylated benzoic acid derivatives with 4-aminobenzoic acid. Prolonged incubation and variation of the incubation conditions can lead to oligomerization reactions. After the formation of the monoaminated products **3a** and **3b** a second molecule of the amino partner may react *para* to the first amine group resulting in diaminated products (**4a**, **4b**) as described for other diaminations [10,28,29].

To determine the influence of the amount of amino partner on the product yields, we varied the concentration of L-phenylalanine (**2a**) (Fig. 3). The highest product concentration 0.33 mg mL^{-1} was

Author's personal copy

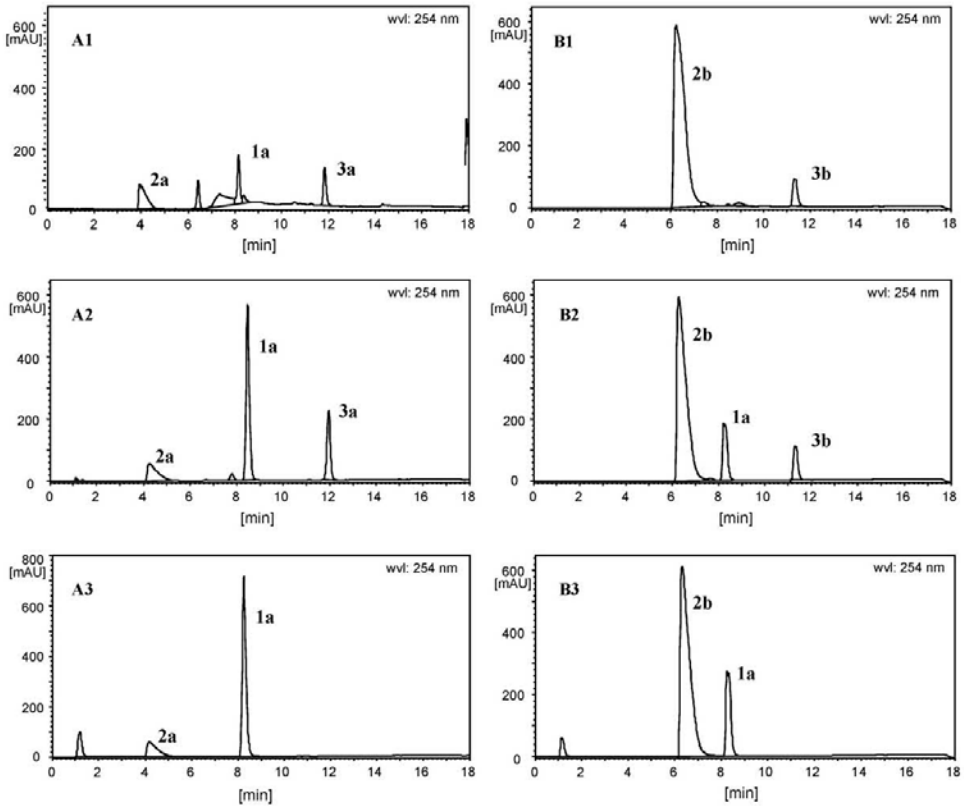


Fig. 1. HPLC chromatograms of the reaction of 2,5-dihydroxyacetophenone (**1a**) with (A) L-phenylalanine (**2a**) (injection volume: 20 μL) and (B) L-tryptophan (**2b**) (injection volume: 10 μL) respectively (1:10 mM) catalyzed by (1) *Pycnoporus cinnabarinus* laccase after 20 min reaction time; (2) *Myceliophthora thermophila* laccase after 20 min reaction time; (3) 6 mM sodium iodate after 120 min reaction time.

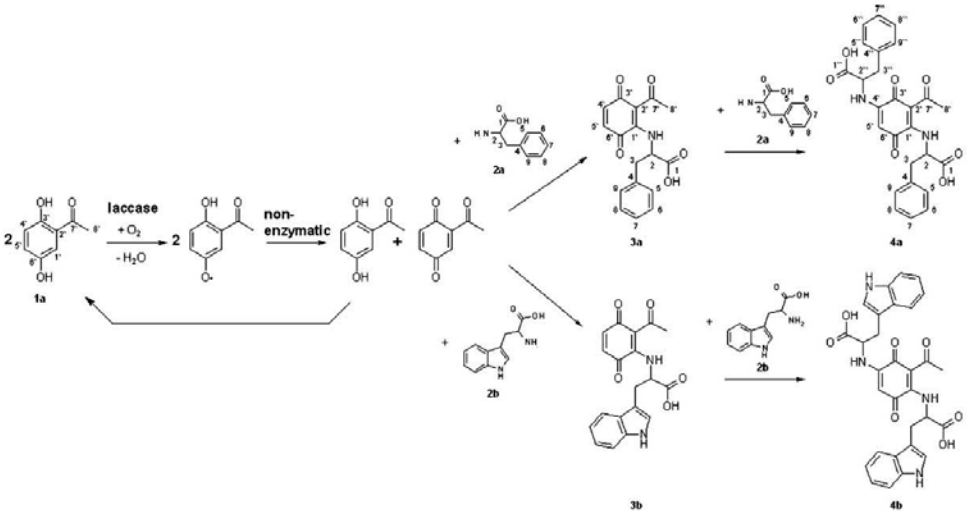


Fig. 2. 2,5-Dihydroxyacetophenone (substrate **1a**) with L-phenylalanine (**2a**) and L-tryptophan (**2b**) and the products (**3a, 3b**), (**4a, 4b**).

Author's personal copy

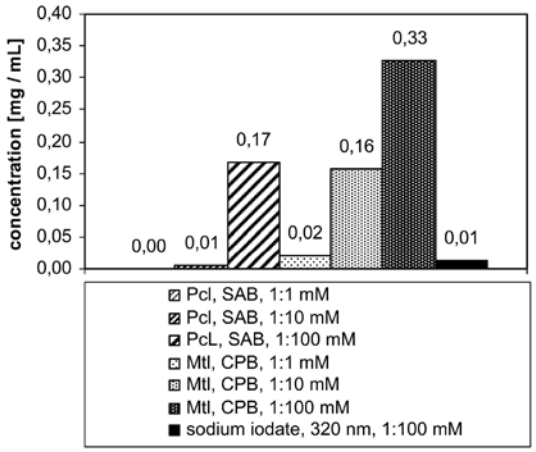


Fig. 3. Comparison of the product formation of **4a** for the reaction of 2,5-dihydroxyacetophenone (**1a**) and L-phenylalanine (**2a**) with different educt concentrations (1:1 mM; 1:10 mM; 1:100 mM) and catalysts. **Pcl SAB** reactions catalyzed by *Pycnoporus cinnabarinus* laccase in sodium acetate buffer; **Mtl CPB** reactions catalyzed by *Myceliophthora thermophila* laccase in citrate phosphate buffer.

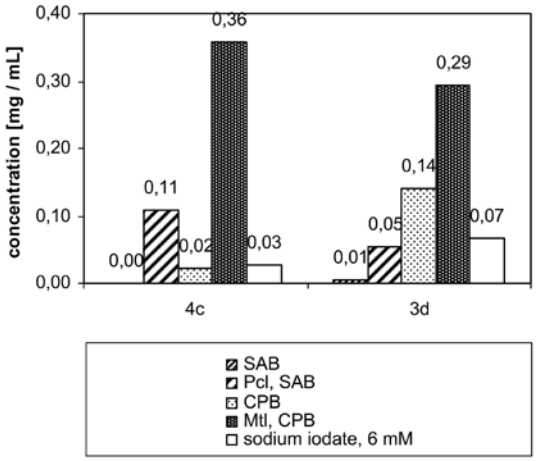


Fig. 4. Comparison of the formation of **4c** and **3d** formed in the 1:100 mM reactions of 1,4-hydroquinone (**1b**) and 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone (**1c**) with L-phenylalanine (**2a**) respectively without a catalyst, catalyzed by laccases or sodium iodate after 24 h.
SAB reactions without a catalyst in sodium acetate buffer; **CPB** reactions without a catalyst in citrate phosphate buffer; **Pcl SAB** reactions catalyzed by *Pycnoporus cinnabarinus* laccase in sodium acetate buffer; **Mtl CPB** reactions catalyzed by *Myceliophthora thermophila* laccase in citrate phosphate buffer.

achieved with the laccase from *M. thermophila* and a ratio of reactants of 1 mM **1a** to 100 mM **2a**. Whereas an educt concentration of 1:10 mM yielded only 0.16 mg mL^{-1}. Product yields are dependent on the amount of amino partner as described before [10,16]. In the case of L-tryptophan (**2b**) a ratio of 1:10 mM was the maximum that could be achieved because of its poor solubility.

In contrast to the enzymatic reaction, chemical catalysis using sodium iodate yielded only the untransformed reactants **1a** and **2a** or **2b** (Fig. 1: A3, B3). Extending the reaction time to 24 h did not lead to any detectable product formation, though increasing the catalyst concentration up to saturating levels (320 mM) did result in the detection of small amounts of the products **3a**, **3b** and **4a** (Fig. 3).

The laccase-catalyzed reaction of unprotected L-phenylalanine with 1,4-hydroquinone (**1b**) and 2,3-dimethyl-1,4-hydroquinone (**1c**) (Table 1) proceeds as described for 2,5-dihydroxyacetophenone (**1a**).

Whereas only one monoaminated product **3d** was formed during the reaction with **1c**, in the reaction mixture with **1b** two products (**3c** monoaminated product, **4c** diaminated product) were detected. A second amination of **3d** is hindered because of the two methyl groups on **1c**.

Aminated products were also detected using sodium iodate (6 mM) as catalyst (Fig. 4). However, the yield of **4c** was 73% higher when *Pycnoporus cinnabarinus* laccase was used and 92% higher with laccase from *Myceliophthora thermophila* than in the reaction catalyzed by sodium iodate. Whereas the yield of **3d** was similar for the *P. cinnabarinus* laccase and sodium iodate catalyzed reactions, the concentration achieved with *M. thermophila* laccase was 76% higher than in the reaction with sodium iodate.

In summary we demonstrate that the reaction of 2,5-dihydroxyacetophenone (**1a**) with L-phenylalanie (**2a**) or L-tryptophan (**2b**) was more efficiently catalyzed by laccase than by sodium iodate whereas with the compounds **1b** or **1c** the advantage of laccase as a catalyst was less pronounced. In contrast to our results Niedermeyer and Lalk [11] reported that laccase-catalyzed amination of simple *p*-hydroquinones with simple primary aromatic amines can be accomplished more conveniently using the well-known chemical oxidant sodium iodate. This underscores the important point that for each reaction undertaken the optimal catalyst and reaction conditions must be sought.

The laccase-catalyzed reaction can be optimized by variation of the concentration of the amino reaction partner, by variation of the pH value of the used buffer and the amount of the enzyme. Higher enzymatic activity of the laccase results in a faster reaction and thereby higher product yields can be obtained. Furthermore both the amount of enzyme and the type of laccase are variable. More than 60 laccases isolated from plants, insects, bacteria and fungi are conceivable [3] so that different types of laccase can be used to perform reactions, resulting in different product pattern.

In respect for the advantage of laccase it is worth noting that the laccase process is a catalytic cycle [30] (Fig. 2), whereas sodium iodate is needed in stoichometric amounts that means the chemical catalyst is consumed during reaction time. The interest in the use of laccases for derivatization of amino acids is mainly stimulated by the simple one-step coupling reaction and the gentle transformation of sensitive starting materials using environmental friendly conditions. The high stability of laccases in solution, the mild reaction conditions used in laccase-catalyzed reactions and the avoidance of toxic solvents, additives or catalysts make laccases attractive for derivatization of natural compounds e.g. amino acids.

4. Conclusions

In the presence of laccases it is possible to derivatize unprotected amino acids like **2a** and **2b**. Whereas with sodium iodate the product formation was very slow and resulted in little amount of products, the product formation with laccase mostly proceeded in 20 min and especially the reactions with the laccase of *M. thermophila* showed comparatively high product yields. There are many ways for the derivatization of compounds and stoichiometric chemical methods are in general not favorable. We could show that the enzymatic catalysis is more efficient than the chemical one for derivatization of amino acids with 2,5–dihydroxyacetophenone.

Author's personal copy

Acknowledgements

Financial support by means of a scholarship from the government of Mecklenburg-Vorpommern is gratefully acknowledged. We thank M. Lalk (Institute of Pharmacy, University of Greifswald) for providing NMR data and R. Jack (Institute of Immunology, University of Greifswald) for help in preparing the manuscript.

References

[1] J.M. Bollag, in: H. Sigel, A. Sigel (Eds.), Metal Ions in Biological Systems, 28 ed., Marcel Dekker Inc., New York, 1992, pp. 205–217.
[2] C.F. Thurston, Microbiology 140 (1994) 19–26.
[3] L. Gianfreda, F. Xu, J.M. Bollag, Bioremediat. J. 3 (1999) 1–25.
[4] S.G. Burton, Curr. Org. Chem. 7 (2003) 1317–1331.
[5] H. Claus, Arch. Microbiol. 179 (2003) 145–150.
[6] L.B. Davin, N.G. Lewis, Curr. Opin. Biotech. 16 (2005) 398–406.
[7] K. Manda, E. Hammer, A. Mikolasch, D. Gördes, K. Thurow, F. Schauer, Amino Acids 31 (2006) 409–419.
[8] A. Mikolasch, T.H.J. Niedermeyer, M. Lalk, S. Witt, S. Seefeldt, E. Hammer, F. Schauer, M. Gesell, S. Hessel, W.-D. Jülich, U. Lindequist, Chem. Pharm. Bull. 54 (2006) 632–638.
[9] K. Manda, E. Hammer, A. Mikolasch, T. Niedermeyer, J. Dec, A.D. Jones, A.J. Benesi, F. Schauer, J.M. Bollag, J. Mol. Catal. B-Enzym. 35 (2005) 86–92.
[10] T.H.J. Niedermeyer, A. Mikolasch, M. Lalk, J. Org. Chem. 70 (2005) 2002–2008.
[11] T.H.J. Niedermeyer, M. Lalk, J. Mol. Catal. B-Enzyme 45 (2007) 113–117.
[12] H. Agematu, T. Tsuchida, K. Kominato, N. Shibamoto, T. Yoshioka, H. Nishida, R. Okamoto, T. Shin, S. Murao, J. Antibiot. 46 (1993) 141–148.
[13] A. Mikolasch, T.H.J. Niedermeyer, M. Lalk, S. Witt, S. Seefeldt, E. Hammer, F. Schauer, M. Salazar, S. Hessel, W.-D. Jülich, U. Lindequist, Chem. Pharm. Bull. 55 (2007) 412–416.
[14] A. Mikolasch, A. Matthies, M. Lalk, F. Schauer, Appl. Microbiol. Biotechnol. 80 (2008) 389–397.
[15] D. Poeckel, T.H.J. Niedermeyer, H.T.L. Pham, A. Mikolasch, S. Mundt, U. Lindequist, M. Lalk, O. Werz, J. Med. Chem. 2 (2006) 591–595.
[16] V. Hahn, A. Mikolasch, K. Manda, D. Gördes, K. Thurow, F. Schauer, Amino Acids (2008), doi: 10.1007/s00726-008-0154-2.
[17] L.O. Burzio, V.A. Burzio, T. Silva, L.A. Burzio, J. Pardo, Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997) 309–312.
[18] L.A. Burzio, J.H. Waite, Biochemistry 39 (2000) 11147–11153.
[19] A. Braun-Lüllemann, A. Majcherczyk, A. Hüttermann, Appl. Microbiol. Biotechnol. 47 (1997) 150–155.
[20] C. Eggert, U. Temp, K.E.L. Eriksson, Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996) 1151–1158.
[21] B.B. Feng, M. Voehler, L. Zhou, M. Passarelli, C.M. Harris, T.M. Harris, M.P. Stone, Biochemistry 35 (1996) 7316–7329.
[22] U. Jonas, E. Hammer, F. Schauer, J.M. Bollag, Biodegradation 8 (1998) 321–328.
[23] R.M. Berka, P. Schneider, E.J. Golightly, S.H. Brown, M. Madden, K.M. Brown, T. Halkier, K. Mondorf, F. Xu, Appl. Environ. Microbiol. 63 (1997) 3151–3157.
[24] R. Bourbonnais, M.G. Paice, FEBS Lett 267 (1990) 99–102.
[25] W. Schaefer, A. Aguado, Angew. Chem. Internat. Edit. 10 (1971) 405–406.
[26] M. Pardo, K. Joos, W. Schäfer, Liebigs Ann. Chem. (1979) 503–521.
[27] T. Torres, S.V. Eswaran, W. Schäfer, J. Heterocyclic Chem. 22 (1985) 697–699.
[28] T. Yamaoka, S. Nagakura, Bull. Chem. Soc. Jpn. 44 (1971) 2971–2975.
[29] S. Berger, P. Hertl, A Rieker, Physical and chemical analysis of quinones, in: S. Patai, Z. Rappoport (Eds.), The chemistry of the Quinoid Compounds, 2 ed., John Wiley and Sons Ltd, New York, 1988, pp. 29–86.
[30] S. Riva, Trends Biotechnol. 24 (2006) 219–226.

4.6 Laccase-catalyzed cross-linking of amino acids and peptides with dihydroxylated aromatic compounds

Dieses vierte Manuskript wurde in der Zeitschrift *Amino Acids* eingereicht und umfasst die Derivatisierung der Aminosäuren Tyrosin und Lysin bzw. der aus ihnen zusammengesetzten Dipeptide und Oligopeptide sowohl mit *para*- als auch mit *ortho*-dihydroxylierten Verbindungen. Die zur Synthese eingesetzten Aminosäuren und Peptide waren z.T. mit Schutzgruppen versehen, um die Position der Aminierung eingrenzen zu können. Dabei wurde gezeigt, dass die Derivatisierung von Lysin nicht nur über die α-Aminogruppe sondern auch an der ε-Aminogruppe möglich ist. Auf diese Weise ist die Verknüpfung von Oligopeptiden über ein Laccasesubstrat mit Hilfe der Laccase möglich, da dort die α-Aminogruppe im Peptidstrang gebunden ist und nur die ε-Aminogruppe für eine laccasevermittelte Kopplung zur Verfügung steht. Die so hergestellten Polymere könnten zur Herstellung von neuartigen Biomaterialien, beispielsweise bioresorbierbaren Klebstoffen, genutzt werden.

Laccase-catalyzed cross-linking of amino acids and peptides with dihydroxylated aromatic compounds

Annett Mikolasch[1]*, Veronika Hahn[1], Katrin Manda[2], Judith Pump[1], Nicole Illas[1], Dirk Gördes[3], Michael Lalk[4], Manuela Gesell Salazar[5], Elke Hammer[5], Wolf-Dieter Jülich[4], Stephan Rawer[6], Kerstin Thurow[7], Ulrike Lindequist[4], Frieder Schauer[1]

[1] Institute of Microbiology, Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald, Friedrich-Ludwig-Jahn Straße 15, 17487 Greifswald, Germany
[3] Institute of Automation, University Rostock, R.-Wagner-Str. 31, 18119 Rostock, Germany
[2] Department of Radiotherapy, University Rostock, Südring 75, 18059 Rostock, Germany
[4] Institute of Pharmacy, Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald, Friedrich-Ludwig-Jahn Straße 17, 17487 Greifswald, Germany
[5] Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics, Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald, Friedrich-Ludwig-Jahn Straße 17, 17487 Greifswald, Germany
[6]Applied Biosystems, a part of Life technologies, Frankfurter Straße 129 B, 64293 Darmstadt, Germany
[7] Center for Life Science Automation, F.-Barnewitz-Str. 8, 18119 Rostock, Germany

*Corresponding author. Phone: +49-3834-864229, FAX: +49-3834-864202,
E-mail: annett.mikolasch@uni-greifswald.de

Abstract
In order to design possible biomaterials the laccase-catalyzed cross-linking between L-lysine or lysine-containing peptides and dihydroxylated aromatics was investigated. L-Lysin is one of the major components of naturally occurring mussel adhesive proteins (MAPs). Dihydroxylated aromatics are structurally related to 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (DOPA), the other main component of MAPs. From MS and NMR analyses it could be proven that the ε-amino group of L-lysine is able to cross-link dihydroxylated aromatics. Additional oligomer and polymer cross-linked products were obtained from di- and oligopeptides containing L-lysine. The potential as biomaterial in medical or industrial applications for the three component system consisting of the oligopeptide $[Tyr\text{-}Lys]_{10}$, dihydroxylated aromatics and laccase has been discussed.

Keywords: amination; biomaterial; cross-link; DOPA; mussel adhesive proteins; polymer

Introduction

Mussel adhesive proteins (MAPs) are remarkable materials having exciting abilities to adhere mussels to hard, wet surfaces. Investigations during the last decades have characterized the mussel adhesive proteins in different marine mussel species (Waite et al. 1985; Waite et al. 1989; Rzepecki et al. 1991; Vreeland et al. 1998; Zhao and Waite 2006; Zhao et al. 2006; Harrington and Waite 2007; Holten-Andersen et al. 2009b). The one common feature of all MAPs studied is the high level of the amino acid 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA). The DOPA residues are thought to play a key role in the chemisorption of the polymers to substrates underwater and covalent cross-linking of the adhesive (Waite 1990a; Burzio et al. 1997).

However, the abundance of potential reactions of DOPA and *ortho*-quinones (oxidation products of DOPA) creates considerable uncertainty to the roles played by different marine mussel species in the curing process (Waite 1990b; Vreeland et al. 1998).

Since all described mechanisms are more or less hypothetical; alternatively, synthetic DOPA-containing polypeptides were used for the experimentally identification of the functions and reactions of the amino acids which are active in the chemistry of the MAPs. Synthetic DOPA-containing polypeptides with L-lysine and L-glutamic acid were first reported by Yamamoto and Hayakawa (1979; 1982). The studies with the synthetic peptides showed that the adhesion and cross-linking capabilities of mussel adhesive proteins can be successfully reproduced using synthetic materials. But the mechanism of bonding is quite unclear.

A lot of applications have been proposed for the MAPs (Waite 2008); adhesives for medical (Strausberg and Link 1990), surgical (Green 1995), ophthalmic (Robin et al. 1988), and dental (Holten-Andersen and Waite 2008) applications, enzyme, cell, and tissue immobilizing agents, anticorrosives, and metal scavengers (Deming 1999).

Our efforts in this area are focused on the design of a potential biological adhesive for biomedical applications and on the description of the intermolecular bonding mechanisms.

We describe here the design of a potential biomaterial based on (i) MAPs and on (ii) the laccase-catalyzed amination of dihydroxylated aromatic compounds (laccase substrates) by amino acids and lysine-containing peptides. Different dihydroxylated laccase substrates (structurally related to DOPA) can be oxidized by the polyphenoloxidase laccase and subsequently aminated by the amino groups of the amino acids tryptophan and phenylalanine forming covalent C-N-bonds (Manda et al. 2006; Hahn et al. 2009a,b). Depending on the substitution grade of the dihydroxylated aromatics monoaminated (one amino acid couples) and also diaminated (two amino acids couple) products were detected. These results implicate that both the α- and the ε-amino group of the amino acid lysine, one important component of the MAPs, should be able to participate in the laccase-catalyzed C-N-coupling and subsequent cross-linking. Hence, these enzymatic reactions may be suitable also to cross-link proteins containing large amounts of lysine in presence of dihydroxylated aromatics. To design potential biomaterials we focused (i) to determine the reaction of lysine with dihydroxylated aromatic compounds, (ii) to analyze the reaction products of laccase-catalyzed reactions of dipeptides consisting of tyrosine and lysine with dihydroxylated aromatics, and (iii) to synthesize and analyze cross-linking products of synthetic tyrosine-lysine-containing decapeptides with dihydroxylated aromatics.

Material and methods

Chemicals. The laccase substrates were purchased from Sigma-Aldrich (2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester, *para*-hydroquinone), from Fluka (hydrocaffeic acid), and from Midori Kagaku Co., Japan (2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide). The amino acids and peptides were obtained from Bachem (lysine(Ac)-OH, Ac-lysine-OH, H-

Tyr-Lys-OH, Z-[Tyr-Lys]-OH), from Merck (L-lysine monochydrochloride), and from Sigma-Aldrich (L-tyrosine). All chemicals were used as received.

Peptide synthesis. The oligopeptide with the structure $[Tyr\text{-}Lys]_{10}$ was synthesized on an ABI 433A peptide synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) using Fmoc-chemistry with UV-Monitoring. For coupling, amino acid derivatives were activated by HBTU and the Fmoc–group was released with 20% piperidine in NMP. The following solvents and reagents were used: HBTU activator, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, and a preloaded Fmoc-Lys(Boc)-HMP-resin were obtained from Applied Biosystems, except piperidine (Sigma-Aldrich). After assembly, the peptide was cleaved from the resin in a mixture of triisopropylsilane / H_2O / triisopropylsilane (2,5% / 2,5% / 95%) for 2 hours at room temperature. The resin was filtered and the solution was added dropwise to cold methyl-tert-butylether (MTBE) in order to precipitate the peptide. After 5 min centrifugation at 3000 rpm the peptide pellet was resuspended in MTBE and the process repeated three times. The final pellet was dried on air and the sample was analysized by MALDI-MS on a Voyager-DE mass analyzer (Applied Biosystems).

Enzymes.

Fungal strain. ***Pycnoporus cinnabarinus*** **SBUG-M 1044** was isolated from an oak tree in northern Germany. This white rot fungus is deposited in the strain collection of the Department of Biology of the University Greifswald (SBUG).

Cultivation of *Pycnoporus cinnabarinus* SBUG-M 1044. *P. cinnabarinus* was initially cultivated on malt agar plates that were incubated for 7 days at 30 °C and then kept at 4 °C. The liquid culture was prepared by inoculating a nitrogen-rich medium containing 5 g glucose, 1 g KH_2PO_4, 0.52 g L-asparagine, 0.5 g yeast extract, 0.5 g KCl, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 50 ml mineral salt solution and 50 ml $FeSO_4$ solution (0.2 $g \cdot l^{-1}$) with three 1 cm^2 agar culture fragments. The mineral salt solution contained 1 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$, 0.06 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, and 0.04 g $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ per liter modified according to Braun-Lüllemann (Braun-Lüllemann et al. 1997). Incubation was performed without shaking at 30 °C for 7 days. A uniform inoculum was obtained by homogenization of this culture with an Ultra-Turrax homogenizer T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) at 8000 rpm. For the production of the ligninolytic enzyme laccase, 40 ml medium inoculated with 2 ml of the homogenized pre-culture was incubated in 100 ml Erlenmeyer flasks for 7 days with 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (10 mM), a known inducer of laccase. Cultures were shaken in a water bath (GFL model 1092, Burgwedel, Germany) at 30 °C and 158 rpm.

Preparation of laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* SBUG-M 1044 (PcL). Under these culture conditions *P. cinnabarinus* produced laccase as a single extracellular enzyme with an activity of 500 $nmol \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$. The culture medium was filtered through a glass fiber filter in a Büchner funnel to separate the medium from whole cells. The cell-free culture medium was stirred with DEAE-Sephacel (Sigma, Steinheim, Germany) for 1 h and the adsorbed enzymes were eluted from the DEAE-Sephacel with 20 mM sodium acetate buffer (pH 5). The enzyme extract was desalted using a Sephadex G-25 Superfine column (Pharmacia, Freiburg, Germany). This enzyme preparation contains only isoenzymes of laccase, but no other enzymes and was used in 20 mM sodium acetate buffer (SAB) pH 5.0 which is close to its pH optimum (Eggert et al. 1996; Feng et al. 1996; Jonas et al. 1998).

Laccase from ***Myceliophthora thermophila*** (**MtL**, expressed in genetically modified *Aspergillus* sp.) was obtained from Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). It was used as received (activity 1000 U/g; substrate: syringaldazine) in citrate phosphate buffer (CPB, 18 mM citrate, 165 mM phosphate) at its pH optimum of pH 7.0 (Feng et al. 1996; Berka et al. 1997).

Measurement of laccase activity. The activity of laccase was determined spectrophotometrically at 420 nm with ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) as substrate (Bourbonnais and Paice 1990) using the method described by Jonas et al. (Jonas et al. 1998). 1 U is defined as 1 $\mu mol \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$.

Experimental procedures. For analytical experiments the respective dihydroxylated compound (1 mM) and the reactants L-lysine, L-tyrosine, Ac-Lys-OH, Lys(Ac)-OH, H-Tyr-Lys-OH, or Z-[Tyr-Lys]-OH (1 mM, 2 mM or 10 mM) were incubated with laccase (activity 0.5 U). In controls the respective compounds were incubated in SAB or CPB without laccase. 2 ml reaction mixtures were incubated with agitation at 200 rpm in 5-ml-brown-glass-bottles at room temperature.

Analytical HPLC. For routine analysis, the reaction mixtures were analyzed using an HPLC system Agilent Technolgies, 1200 Series (Waldbronn) consisting of a G1311A quaternary pump, G1322A degaser, G1329A auto sampler, G1315D diode array detector, and Agilent ChemStation. The separation of the substances was achieved on an endcapped, 5 µm, LiChroCART® 125-4 RP18 column (VWR, Darmstadt, Germany) at a flowrate of 1 $ml \cdot min^{-1}$. A solvent system consisting of methanol (eluent A) and 0.1% phosphoric acid (eluent B), starting from an initial ratio of 10% A and 90% B and reaching 100% methanol within 14 min, was used.

Isolation of transformation products. For the isolation of products for MS and NMR analyses, RP18 silicagel columns (60 ml, 10 g adsorbent material, phenomenex, Strata, Germany) were charged with 20 ml of the reaction mixture. An excess of amino acid or peptide was eluted with buffer and methanol water mixtures. The cross-coupling products were eluted with 100% methanol. The isolated products were dried by lyophilization prior to mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

Reactions of oligopeptides. For the isolation of oligomer products for MS analysis, 16 ml of the reaction mixture consisting of 1 mM hydrocaffeic acid or 2,5-Dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide and 1 mM $[Tyr\text{-}Lys]_{10}$ was used. After an incubation period of 24 h the mixtures were brown coloured and brown precipitates have been observed. The reaction mixtures were centrifuged (10 minutes, 16.060 x g) and the supernatants were discarded. The pellets were resuspended in aqua dest. and dried by lyophilisation.

Characterization of the products. The products **3a**, **3c**, **3d**, **3e**, **3f**, **3g$_1$**, **3g$_2$**, **3i**, **4a**, **4d$_1$-4d$_4$**, **4f$_1$**, and **4f$_2$** were characterized by **liquid chromatography/mass spectrometry** (LC/MS). The standard atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry experiments were performed using an Agilent Series 1100 HPLC system and an Agilent 1946C quadrupole mass spectrometer (Waldbronn, Germany). The MS was used with both, atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (API-ES) sources. HPLC separation was performed on a LiChroCART® 125-4, LiChrosphere® 100 RP-18e column (Merck, Darmstadt, Germany) at 25 °C at a flowrate of 1 ml min^{-1} within a 14-min gradient from 10% to 100% methanol in 0.1% aqueous formic acid. APCI/API-ES MS conditions (positive and negative ion mode) were as follows: nebulizer and drying gas, nitrogen; nebulizer pressure, 30 psig; drying gas flow, 10 L min^{-1}; vaporizer temperature (for APCI), 350 °C; drying gas temperature, 250 °C; capillary voltage, 4 kV; corona current (for APCI), 4 µA. LC high-resolution mass spectrometry experiments were performed on an Agilent Series 1200 HPLC system and an Agilent 1969A time-of-flight mass spectrometer (Waldbronn, Germany). The TOF-MS conditions (negative and positive ion mode) with a dual sprayer API-ES source were as follows: nebulizer and drying gas, nitrogen; nebulizer pressure, 40 psig; drying gas

flow, 10 L min^{-1}; drying gas temperature, 350 °C; capillary voltage, 4 kV; fragmentor voltage, 175 V; skimmer voltage, 60 V; octopole voltage, 250 V; mass reference (*m/z*), 121.05087 and 922.00979 in positive ion mode, and 112.98558 and 1033.98810 in negative ion mode. HPLC separation was performed on a Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6mm×50mm, 3.5µ, column (Agilent, Germany) at 25 °C at a flow rate of 0.5 ml min^{-1} within a 14-min gradient from 10% to 100% methanol in 0.1% aqueous formic acid.

All **FT-ICR MS high-resolution mass spectrometry** (HRMS) experiments were performed on a Bruker Daltonics APEX III FT-ICR mass spectrometer (Bremen, Germany) equipped with a 7.0 T shielded superconducting magnet. The flow rate for the eluent (H_2O/ACN/HCOOH 49/49/2, all HPLC-grade) was 2 µl/min using a syringe pump (Cole-Palmer 74900 series). The ions were generated from an external ESI source (Apollo ESI-Source) with the nebulizing gas pressure at 20 psi, heated drying gas at 20 psi and 150 °C, and a capillary entrance voltage of -4500 V in negative ion mode and +4500 V in positive ion mode (Marshall et al. 1992; Amster 1996; Marshall et al. 1998).

Mass spectra were acquired with both, positive and negative, ion modes with broadband detection (32 scans each experiment) from 100 to 2.000 Da using 1024 K data points. All experimental sequences, including scan accumulation and data processing, were performed with XMASS 6.1.2 on Windows 2000.

The products **3h**, **3i**, **4b$_1$-4b$_3$**, **4c**, **4e$_2$**, **4e$_3$**, **4f$_1$**, and **4f$_2$** were analyzed by LC/MS as described before (Donat et al. 2009). A C-18 column (Merck LichroSpher, 150 mm x 4.6 mm, 5µm) was used with solvent A: 0.1% formic acid in water and solvent B: acetonitrile. The gradient t= 0 min, 10% B; t= 6 min, 30% B; t= 11 min, 30% B; t= 17 min, 70% B; t= 20 min, 100% B was used at flow rate 0.5 ml/min. The mass spectrometric parameters were adjusted for positive mode detection as described before (Donat et al. 2009). Reference masses were used from the Agilent "ESI tune mix" as described above.

Digestion of the polymer mixture 5a of $[Tyr\text{-}Lys]_{10}$ and hydrocaffeic acid **2d** was performed 3 h at 37 °C using Lys C (Sigma) dissolved in 20 mM NH_4HCO_3 (pH 8.2) with a ratio 1:100. To purify peptides prior to LC/MS analyses a Zip-Tip method was used (Millipore Corporation). After equilibration of the C_{18} material and binding of the peptide extracts five wash steps were performed with 10µl 1% acetic acid to remove contaminations. Peptides were eluted using 5µl of 50% and subsequently 80% v/v acetonitril, 0.1% v/v acetic acid. The combined eluates were concentrated in a vacuum centrifuge, resolved in 10 µl of 2% v/v acetonitril, 0.1% acetic acid.

Samples were separated prior to mass spectrometric analyses by reverse phase nano HPLC on a 15 cm PepMap100-column (3 µl, 100 Å) using an Proxeon System (Odense, Dänemark) at a flow rate of 1µl/min. Separation was achieved in a linear gradient using 0.05% acetic acid, 2% acetonitrile in water (A) and 0.05% acetic acid in 45% acetonitrile (B) as eluents for 35 min MS-data were generated using the Orbitrap-MS equipped with a nanoelectrospray ion source (PicoTip Emitter FS360-20-20-CE-20-C12, New Objective). After a first survey scan (r= 60,000) MS^2 data were recorded for the five highest mass peaks in the linear ion trap at a collision induced energy of 35%. The exclusion time was set to 30s and the minimal signal for MS^2 was 1000.

The **nuclear magnetic resonance** (NMR) spectra for the products (^{1}H NMR, ^{13}C NMR, HSQC, HMBC) were recorded on a Bruker Avance 600 instrument (Karlsruhe, Germany) at 600 MHz.

Dimer **3a**

Synthesis (1:1 mM, PcL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 8.8 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 218, 273, 481 nm. MS (LC/MS): *m/z*: AP-ES, pos. ion mode 346 $[M+H]^+$, 368 $[M+Na]^+$; HRMS FT-ICR ($C_{17}H_{15}NO_7$) calcd: [M] 345.08485; found: $[M+H]^+$ *m/z* 346.09279 (1.94 ppm), $[M+Na]^+$ *m/z* 368.07493 (2.34 ppm)

Dimer **3b$_1$**
Synthesis (1:1 mM, PcL or MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 4.3 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 215, 269, 457 nm.
Dimer **3b$_2$**
Synthesis (1:1 mM, PcL or MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 4.9 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 217, 265, 469 nm.
Dimer **3c**
Synthesis (1:1 mM, PcL or MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 7.2 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 217, 265, 469 nm. HRMS FT-ICR ($C_{16}H_{20}N_2O_7$) calcd: [M] 352.12704; found: $[M+Na]^+$ *m/z* 375.11824 (5.28 ppm).
Dimer **3d**
Synthesis (1:1 mM, PcL or MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 8.3 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 218, 272, 482 nm. HRMS FT-ICR ($C_{17}H_{23}N_3O_7$) calcd: [M] 381.15359; found: $[M+H]^+$ *m/z* 382.16244 (4.15 ppm), $[M+Na]^+$ *m/z* 404.14447 (4.11 ppm)
Dimer **3e**
Synthesis (1:1 mM, PcL or MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 7.0 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 215, 269, 457 nm. HRMS FT-ICR ($C_{16}H_{20}N_2O_7$) calcd: [M] 352.12704; found: $[M+H]^+$ *m/z* 353.13625 (5.51 ppm), $[M+Na]^+$ *m/z* 375.11832 (5.49 ppm).
Dimer **3f**
Synthesis (1:1 mM, PcL or MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 7.8 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 213, 271, 479 nm. HRMS FT-ICR ($C_{17}H_{23}N_3O_7$) calcd: [M] 381.15359; found: $[M+H]^+$ *m/z* 382.16254 (4.41 ppm), $[M+Na]^+$ *m/z* 404.14487 (5.10 ppm)
Dimer **3g$_1$**
Synthesis (1:1 mM, PcL or MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 7.1 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 212, 271, 479 nm.
Dimer **3g$_2$**
Synthesis (1:1 mM, PcL or MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 7.5 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 212, 273, 489 nm.
MS (of the product mixture **3g$_1$** and **3g$_2$**): *m/z*: AP-ES, pos. ion mode 503 $[M+H]^+$, 525 $[M+Na]^+$; ($C_{24}H_{30}N_4O_8$) calcd: [M] 502.
Dimer **3h**
Synthesis (1:2 mM and MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 5.8 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 219, 293, 488 nm. AP-ES ($C_{24}H_{29}N_3O_8$) calcd: [M] 487.195465; found: pos. ion mode $[M+H]^+$ *m/z* 488.201872 (1.78 ppm); neg. ion mode $[M-H]^-$ *m/z* 486.190211 (6.42 ppm) molecular mass for the quinoid product.
^{1}H NMR (D_2O) δ 1.01 (m, J = 7.5, 7.9 Hz, H4''), 1.49 (m , J = 7.5, 7.3 Hz, H5''), 1.55 (m, J = 7.8 Hz, H3''), 2.33 (t, J = 7.7 Hz, H8), 2.67 (m, J = 7.5 Hz, H7b), 2.63 (m, J = 7.5 Hz, H7a), 2.94 (t, J = 7.4 Hz, H6''), 3.07 (m, H7'), 4.10 (m, J = 7.8 Hz H2''), 4.13 (m, H8'), 6.34 (s, H3), 6.69 (s, H6), 6.86 (d, J = 7.5 Hz, H3', H5'), 7.20 (d, J = 7.6 Hz, H2', H6'). ^{13}C-NMR (D_2O) δ 24.7 (C4''), 29.3 (C5''), 29.4 (C7), 34.4 (C3''), 40.3 (C7'), 40.4 (C8), 42.3 (C6''), 57.4 (C2''), 64.4 (C8'), 107.0 (C3), 118.7 (C3'/C5'), 120.6 (C6), 124.1 (C1), 131.7 (C1'), 133.6 (C2'/C6'), 139.8 (C5), 140.5 (C2), 145.7 (C4), 157.4 (C4'), 185.0 (C9). HMBC ^{1}H-^{13}C correlations H3 (C1, C4, C5), H6 (C2, C4, C7), H7a (C1, C2, C8), H7b (C1, C6,C8), H8 (C1, C7, C9), H2'/H6' (C2', C4', C6', C7'), H3'/H5' (C1', C3', C5'), H8' (C7'), H2'' (C3''), H3'' (C2'', C4''), H4'' (C3'', C5''), H5'' (C4'', C6''), H6'' (C4'', C5'') NMR data for the hydroquinoid product.
Dimer **3i**
Synthesis (1:1 mM, PcL or MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 10.6 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 212, 273, 480 nm. MS: *m/z*: AP-ES, pos. ion mode 637 $[M+H]^+$, 659 $[M+Na]^+$; ($C_{32}H_{36}N_4O_{10}$) calcd: [M] 636. AP-ES ($C_{32}H_{36}N_4O_{10}$) calcd: [M] 636.243144; found: pos. ion mode $[M+H]^+$ *m/z* 637.258109 (12.07 ppm); neg. ion mode $[M-H]^-$ *m/z* 635.240286 (8.68 ppm)

Trimer **4a**
Synthesis (1:10 mM, PcL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 8.0 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 285, 321, 499 nm. MS (LC/MS): *m/z*: AP-ES, pos. ion mode 525 $[M+H]^+$, 547 $[M+Na]^+$; HRMS FT-ICR ($C_{26}H_{24}N_2O_{10}$) calcd: [M] 524.14309; found: $[M+H]^+$ *m/z* 525.15109 (1.39 ppm), $[M+Na]^+$ *m/z* 547.13295 (1.17 ppm)
N(alpha)-acetyllysine **1c** (Ac-Lys-OH) with *para*-hydroquinone **2b**
Trimer **4b$_1$**
Synthesis (1:10 mM, MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 6.2 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 212, 252(s), 345, 503 nm. MS and NMR data are the same as those of **4b$_2$** except from the following NMR data of the quinone moiety: ^{1}H NMR (D_2O) δ 5.22 (s, 2H). ^{13}C-NMR (D_2O) δ 95.2. HMBC ^{1}H-^{13}C correlations H 5.22 (C 156.3, C 180.4).
Trimer **4b$_2$**
Synthesis (1:10 mM, MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 7.1 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 212, 252(s), 345, 503 nm. AP-ES ($C_{22}H_{32}N_4O_8$) calcd: [M] 480.222014; found: pos. ion mode $[M+H]^+$ *m/z* 481.233060 (7.84 ppm), $[M+Na]^+$ *m/z* 503.214047 (5.59 ppm)
^{1}H NMR (D_2O) δ 1.39 (m, 4H, H4/H3"), 1.67 (m, 4H, H5/H2"), 1.70 (m, 2H, H3/H4"), 1.82 (m, 2H, H3/H4"), 2.02 (s, 6H, H8/H8"), 3.28 (m, 4H, H6/H1"), 4.14 (dd, 2H, H2/H5"), 5.36 (s, 2H, H2'/H5'). ^{13}C-NMR (D_2O) δ 24.7 (C8/C8"), 25.5 (C4/C3"), 29.8 (C5/C2"), 34.0 (C3/C4"), 45.1 (C6/C1"), 57.9 (C2/C5"), 94.8 (C2'/C5'), 156.8 (C1'/C4'), 176.5 (C7/C7"), 180.1 (C3'/C6'), 182.2 (C1/C6"). HMBC ^{1}H-^{13}C correlations H2/H5" (C1/C6", C3/C4", C4/C3", C7/C7"), H3/H4" (C1/C6", C2/C5", C4/C3", C5/C2"), H4/H3" (C2/C5", C5/C2", C6/C1"), H5/H2" (C3/C4", C4/C3", C6/C1"), H6/H1" (C4/C3", C5/C2", C1'/C4'), H8/H8" (C2/C5", C7/C7"), H2'/H5' (C4'/C1', C6'/C3').
Trimer **4b$_3$**
Synthesis (1:10 mM, MtL) and isolation as described above. HPLC/UV-Vis, MS, and NMR data are the same as those of **4b$_2$** except from the following NMR data of the quinone moiety: ^{1}H NMR (D_2O) δ 5.39 (s, 2H). ^{13}C-NMR (D_2O) δ 94.8. HMBC ^{1}H-^{13}C correlations H 5.39 (C 156.5, C 181.3).
Trimer **4c**
Synthesis (1:10 mM, PcL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 7.9 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 212, 278, 349, 503 nm. AP-ES ($C_{25}H_{37}N_5O_{10}$) calcd: [M] 567.254043; found: pos. ion mode $[M+H]^+$ *m/z* 568.262128 (1.43 ppm), $[M+Na]^+$ *m/z* 590.243015 (0.42 ppm)
^{1}H NMR (D_2O) δ 1.38 (m, 2H, H4), 1.42 (m, 2H, H3"), 1.67 (m, 2H, H2"), 1.67 (m, 2H, H5), 1.70 (m, 1H, H3), 1.70 (m, 1H, H4"), 1.82 (m, 1H, H3), 1.82 (m, 1H, H4"), 2.01 (s, 3H, H8), 2.02 (s, 3H, H8"), 3.30 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H1"), 3.37 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H6), 3.46 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, H9'), 3.75 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, H10'), 4.18 (dd, 1H, H2, H2), 4.18 (dd, 1H, H2, H5"), 5.48 (s, 1H, H5'). ^{13}C-NMR (D_2O) δ 24.6 (C8), 24.6 (C8"), 25.2 (C4), 25.2 (C3"), 29.6 (C2"), 31.1 (C5), 33.6 (C3), 33.6 (C4"), 33.6 (C3/C4"), 45.1 (C1"), 46.5 (C6), 44.9 (C9'), 57.3 (C2), 57.3 (C5"), 62.6 (C10'), 94.8 (C5'), 152.2 (C1'), 155.5 (C4'), 176.3 (C7/C7"), 180.9 (C1/C6"). HMBC ^{1}H-^{13}C correlations H1" (C2", C3", C4'), H2 (C1, C3, C4, C7), H2" (C3"), H3 (C1, C2, C4, C5), H3" (C2", C4", C5"), H4 (C2, C3, C5, C6), H4" (C2", C3", C5", C6"), H5 (C4), H5" (C3", C4", C6", C7"), H6 (C1', C4, C5), H8 (C2, C7), H8" (C5", C7"), H9' (C7', C10'), H10' (C9').
Trimer **4d$_1$**
Synthesis (1:1 mM, PcL or MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 6.5 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 212, 275, 349 nm
Trimer **4d$_2$**
Synthesis (1:1 mM, PcL or MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 7.4 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 212, 275, 350 nm
Trimer **4d$_3$**

Synthesis (1:1 mM, PcL or MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 8.7 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 212, 275, 349 nm
Trimer **4d$_4$**
Synthesis (1:1 mM, PcL or MtL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 9.4 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 212, 275, 347 nm
MS (of the product mixture **4d$_1$ - 4d$_4$**): *m/z* AP-ES, pos. ion mode 810 $[M+H]^+$, 832 $[M+Na]^+$; ($C_{24}H_{30}N_4O_8$) calcd: [M] 809.
Trimer **4e$_1$**
Synthesis (1:10 mM, PcL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 7.1 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 224, 275, 399 nm
Trimer **4e$_2$**
Synthesis (1:10 mM, PcL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 8.4 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 224, 272, 395 nm. AP-ES ($C_{39}H_{48}N_6O_{11}$) calcd: $[M-H_2O]$ 776.338107; found: pos. ion mode $[M-H_2O+H]^+$ *m/z* 777.344541 (1.08 ppm); neg. ion mode $[M-H_2O-H]^-$ *m/z* 775.330408 (0.87 ppm)
Trimer **4e$_3$**
Synthesis (1:10 mM, PcL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 8.4 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 224, 272, 395 nm. AP-ES ($C_{39}H_{48}N_6O_{11}$) calcd: $[M-H_2O]$ 776.338107; found: pos. ion mode $[M-H_2O+H]^+$ *m/z* 777.343541 (2.35 ppm); neg. ion mode $[M-H_2O-H]^-$ *m/z* 775.330158 (0.55 ppm)
ESI-MS/MS measurement of a trimer mixture **4e** resulted in 3 different products: calcd: $[M-H_2O]$ 776.338107; found: pos. ion mode $[M-H_2O+H]^+$ *m/z* 389.1767, 389.1768, and 389.1770 (z=2).
^{1}H NMR (D_2O) of four trimers from a product mixture **first trimer** δ 1.30 – 1.83 (4xm, H3", H4", H5"), 2.39 (t, J = 7.1 Hz, 2H, H8), 2.94 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H7), 3.21 – 3.92 (6xm, H6", H7', H8'), 4.20 (dd, 1H, H2"), 6.33 (s, 1H, H3 or H6), 6.85 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H3', H5'), 7.18 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H2', H6'); **second trimer** δ 1.30 – 1.83 (4xm, H3", H4", H5"), 2.39 (t, J = 7.1 Hz, 2H, H8), 2.94 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H7), 3.21 – 3.92 (6xm, H6", H7', H8'), 4.20 (dd, 1H, H2"), 5.55 (s, 1H, H6 or H3), 6.85 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H3', H5'), 7.18 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H2', H6'); **third trimer** δ 1.40 – 1.69 (4xm, H3", H4", H5"), 2.34 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H8), 2.85 (2xt, J = 7.5 Hz, 2H, H7), 3.04 – 3.95 (4xm, H6", H7', H8'), 4.11 (dd, 1H, H2"), 6.71 (s, 1H, H3 or H6), 6.88 (d, J = 7.7 Hz, 2H, H3', H5'), 7.20 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H2', H6'); **fourth trimer** δ 1.40 – 1.69 (4xm, H3", H4", H5"), 2.34 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H8), 2.85 (2xt, J = 7.5 Hz, 2H, H7), 3.04 – 3.95 (4xm, H6", H7', H8'), 4.11 (dd, 1H, H2"), 5.28 (s, 1H, H6 or H3), 6.88 (d, J = 7.7 Hz, 2H, H3', H5'), 7.20 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H2', H6')
Trimer **4f$_1$**
Synthesis (1:10 mM, PcL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 10.2 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 212, 273, 345 nm
Trimer **4f$_2$**
Synthesis (1:10 mM, PcL) and isolation as described above. R_f (HPLC) 11.7 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 212, 277, 347 nm
MS (of the product mixture **4f$_1$** and **4f$_2$**): *m/z*: AP-ES, pos. ion mode 1078 $[M+H]^+$, 1100 $[M+Na]^+$; ($C_{32}H_{36}N_4O_{10}$) calcd: [M] 1077. AP-ES ($C_{32}H_{36}N_4O_{10}$) calcd: [M] 1077.433129; found: pos. ion mode $[M+H]^+$ *m/z* 1078.443139 (2.54 ppm); neg. ion mode $[M-H]^-$ *m/z* 1076.429393 (4.31 ppm)
After digestion of the polymer mixture **5a** using Lys C three products were detected by ESI-MS/MS, which correspond to products **4e**. calcd: $[M-H_2O]$ 776.338107; found: pos. ion mode $[M-H_2O+H]^+$ *m/z* 389.1768, 389.1771, and 389.1770, (z=2), fragmentation: 129.08, 147.06, 293.27, 302.29, 380.24, 457.16, 485.28, 585.27, 603.27, 631.28, 649.22.

Results and discussion

The laccase-catalyzed reactions of four amino acids **1a – 1d** and two dipeptides **1e** and **1f** with dihydroxylated aromatics **2a – 2d** were analyzed by HPLC using a diode array detector. Diverse product pattern of dimers and trimers could be detected for the reaction mixtures (Tab. 1). Some dimers (named **3**) and some trimers (named **4**) were detectable in higher concentration, were isolable and at least slightly stable for further structural characterization to determine the reaction mechanism.

Tab. 1 Products obtained in laccase-catalyzed transformation

Reactants	2,5-Dihydroxy-benzoic acid methyl ester **2a**	*para*-Hydroquinone **2b**	2,5-Dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide **2c**	Hydrocaffeic acid **2d**
L-Tyrosine **1a**	Dimer **3a**[1] (8.8)[2] (218, 273, 481)[3]	Dimer (7.8) (216, 266, 480)	Dimer (8,4) (221, 271, 481)	/[4]
	Trimer **4a** (8.0) (285, 321, 499)	Trimer (7.6) (210, 340, 480) Trimer (8.6) (212, 341, 492) Trimer (9.2) (210, 272, 342, 454)	Trimer (8.0), (217, 273, 347) Trimer (8.9) (219, 275, 348) Trimer (9.6) (219, 275, 349)	
L-Lysine **1b**	Dimer **3b$_1$** (4.3) (215, 269, 457 Dimer **3b$_2$** (4.9) (217, 265, 469)	Dimer (3.4) (214, 262, 482)	Dimer (4.9) (219, 271, 479) Dimer (5.7) (219, 275, 481)	/
	some heteromolecular trimers and oligomers with overlapping chromatographical behaviours	Trimer (3.7) (212, 344, 484)	Trimer (4.7) (215, 275, 349) Trimer (5.3) (215, 275, 349) Trimer (5.8) (215, 275, 347) Trimer (6.5) (217, 273, 345)	
Ac-Lys-OH **1c**	Dimer **3c** (7.2) (217, 265, 469)	Dimer (6.2) (218, 262, 496)	Dimer **3d** (8.3) (218, 272, 482)	/
	-[5]	Trimer **4b$_1$** (6.2) (212, 252(s), 345, 503) Trimer **4b$_2$** (7.1) (212, 252(s), 345, 503) Trimer **4b$_3$** (7.1) (212, 252(s), 345, 503)	Trimer **4c** (7.9) (212, 278, 349, 503)	
Lys(Ac)-OH **1d**	Dimer **3e** (7.0) (215, 269, 457)	Dimer (6.2) (214, 261, 478)	Dimer **3f** (7.8) (213, 271, 479)	/
	Trimer (7.7) (273, 339)	Trimer (7.1) (342, 504) Trimer (6.2) (342)	Trimer (8.3) (211, 273, 488)	
H-Tyr-Lys-OH **1e**	some heteromolecular dimers and trimers with overlapping chromatographical behaviours	some heteromolecular dimers and trimers with overlapping chromatographical behaviours	Dimer **3g$_1$** (7.1) (212, 271 479) Dimer **3g$_1$** (7.5) (212, 273 489)	Dimer **3h** (5.8) (219, 293, 488)
			Trimer **4d$_1$** (6.5) (212, 275, 349) Trimer **4d$_2$** (7.4) (212, 275, 350) Trimer **4d$_3$** (8.7) (212, 275, 349) Trimer **4d$_4$** (9.4) (212, 275, 347)	Trimer **4e$_1$** (7.1) (224, 275, 399) Trimer **4e$_2$** (8.4) (224, 272, 395) Trimer **4e$_3$** and **4e$_4$** differ only in MS and NMR
Z-[Tyr-Lys]-OH **1f**	/	/	Dimer **3i** (10.6) (212, 273, 480)	Dimer (9.5) (211, 283, 501)
			Trimer **4f$_1$** (10.2) (212, 273, 345) Trimer **4f$_2$** (11.7) (212, 277, 347)	-
[Tyr-Lys]$_{10}$	/	/	three-dimensional network	three-dimensional network **5a**

[1] Product description only for MS and/or NMR analyzed products
[2] R_f-HPLC (in min) values in parentheses
[3] UV-Vis (MeOH) λ_{max} (in nm) values in parentheses
[4] Reaction not performed
[5] No products identified

Reaction of tyrosine, lysine and lysine derivatives with dihydroxylated aromatic compounds

L-Tyrosine **1a** and L-lysine **1b** were subjected to laccase-catalyzed transformation of 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester **2a**. L-Lysine was used as it is beside DOPA the other major component of synthetic DOPA-containing polypeptides and sequentially random copolypeptides since it (i) is present in large quantities in MAPs, (ii) is thought to be involved in protein cross-linking reactions (Holl et al. 1993), and (iii) provided good water solubility to copolymers (Deming 2007).

L-Tyrosine was applied as it is a precursor of DOPA (Marumo and Waite 1986) and less reactive than DOPA and it is a further component of MAPs (Waite et al. 1985; Rzepecki et al. 1991).

Resulting from the laccase-catalyzed reactions of L-tyrosine **1a** with 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester **2a** one C-N coupling dimer **3a** (equimolar reaction mixture) and one C-N coupling timer **4a** (1:10 mM reaction mixture) could easily be detected by HPLC using a diode array detector (Tab. 1). **3a** consists of one *p*-quinone and one amino acid moiety, whereas **4a** includes beside the *p*-quinone component two amino acid molecules as described for other aminations (Niedermeyer et al. 2005; Hahn et al. 2009a). The identification of the cross-couplings between **2a** and L-tyrosine is based on UV-Vis and different mass spectral data listed in **Material and methods**.

Whereas L-tyrosine has only the α-amino group in the molecule structure and can only aminate the laccase substrate once to produce one dimer or two L-tyrosine molecules can react to one trimer, L-lysine has beside the α-amino group the ε-amino group and should be able to aminate twice to produce different dimers and trimers and oligomers (Fig. 1).

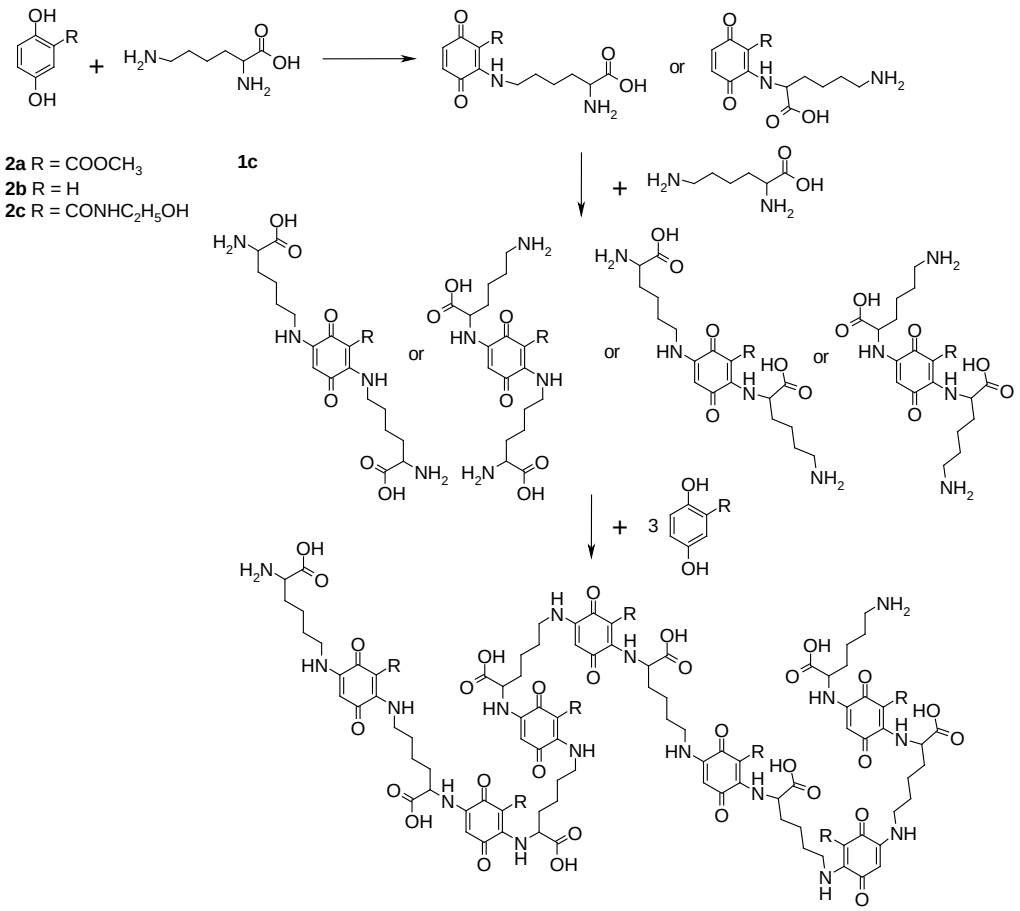


Fig. 1 Reactions of the α- and ε-amino group of lysine with dihydroxylated aromatic compounds forming dimers, trimers and postulated oligomer as one example of a lot of possible oligomers

According to this hypothesis laccase-catalyzed reaction of equimolar amounts of 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester **2a** and L-lysine **1b** resulted in the formation of two dimers **3b$_1$** and **3b$_2$** with slightly different chromatographical behaviours (Tab. 1). The isolation and further structural characterization of the dimers did not lead to usable results because of the high reactivity and tendency to form higher molecular weight products. So we used the N-derivatized L-lysines N(alpha)-acetyllysine **1c** (Ac-Lys-OH) and N(epsilon)-acetyllysin **1d** (Lys(Ac)-OH) for the laccase-catalyzed reaction with **2a.** In theory we should obtain only one dimer per reaction since both derivatized amino acids have only one free amino group for cross-linking. In fact, **1c** and **1d** reacted rapidly to only one dimer (**3c** from **1c** and **3e** from **1d**) consisting of one *p*-quinone and one amino acid moiety based on UV-Vis and mass spectral data listed in **Material and methods**.

As the UV-Vis spectra of **3b$_1$** (formed from **2a** and lysine) and **3e** (formed from **2a** and Lys(Ac)-OH) are identical (Tab. 1) we deduced that the free α-amino group of both **1b** and **1d** is responsible for the cross-link between **2a** and the amino acids. The UV-Vis spectra of **3b$_2$** (formed from **2a** and lysine) and **3c** (formed from **2a** and Ac-Lys-OH) are also equal (Tab. 1) and so the free ε-amino group of both **1b** and **1c** reacted with the laccase substrate **2a** to form dimers. So we could show that both amino groups of L-lysine are able to react with the laccase substrate **2a**. To further determine the bonding points between the amino acids and **2a** we tried to analyze the dimers with NMR. However, NMR experiments were not possible, because of the low stability of highly concentrated solutions of the dimers in methanol and its insufficient solubility in chloroform and water. Also other dimers formed from *para*-hydroquinone **2b** or 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide **2c** with **1c** (Ac-Lys-OH) or **1d** (Lys(Ac)-OH) could not be analyzed by MS or NMR based on low stability and insufficient solubility concerning the high reactivity of the dimers.

Regarding to the design of potential biomaterials for medical or industrial applications it is essential to determine the structure of the reaction products by MS and NMR. Therefore we synthesized some trimers consisting of one molecule dihydroxylated aromatic compound and two molecules amino acid hoping for less reactivity of these products. From the laccase-catalyzed reaction of *para*-hydroquinone **2b** (1 mM) and **1c** (Ac-Lys-OH; 10 mM) we obtained two trimers **4b$_1$** and **4b$_2$** with slightly different chromatographical behaviours (Tab. 1) and useable stability. Corresponding to the similar retention times the trimers could not be separated from each other. MS and NMR analyses of the trimer mixture documented for **4b$_2$** (main product) the coupling of the ε-amino group of one molecule **1c** to the C1'-atom of **4b$_2$** and the coupling of the ε-amino group of a second molecule **1c** to the C4'-atom of **4b$_2$** (Fig. 2). Therefore the aminations occur in *para*-position to each other like described for structural related trimers (Niedermeyer et al. 2005; Hahn et al. 2009a).

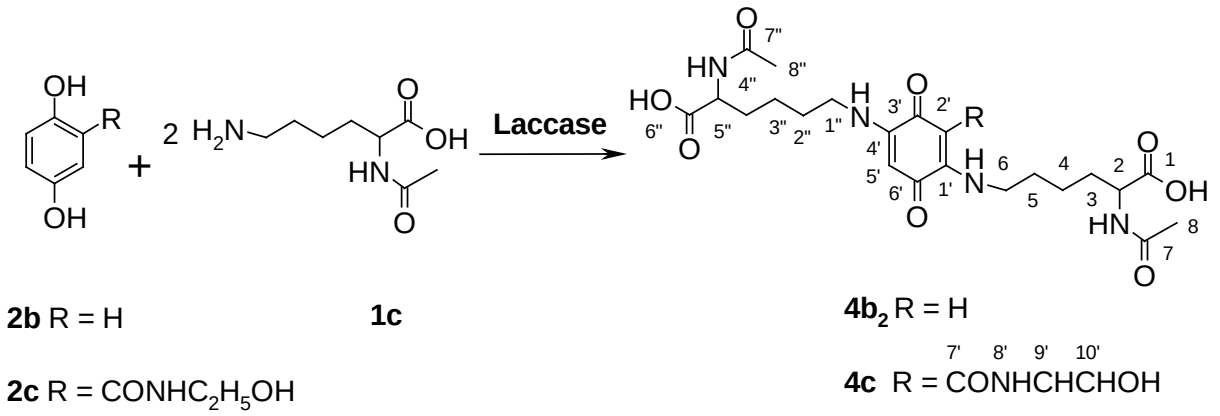


Fig. 2 *para*-Hydroquinone and 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide (laccase substrates **2b** and **2c**), Ac-Lys-OH (reactant **1c**), and the trimers **4b$_2$** and **4c** as results of laccase-catalyzed reactions

Beside main trimer **4b$_2$** NMR analyses showed additional signals for supposable two additional trimers in very small concentrations, one of them should be **4b$_1$** and the other one **4b$_3$**, which probably has the same retention time like **4b$_2$**. Due to the low signal intensity we could not determine the cross-linking points of **4b$_1$** and **4b$_3$**. Furthermore, one trimer **4c** could be analyzed from the reaction of 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide **2c** (1 mM) and **1c** (Ac-Lys-OH; 10 mM) with comparable structure to **4b$_2$** (Fig. 2). With the structures of **4b$_2$** and **4c** we could show that the ε-amino group of **1c** is able to cross-link dihydroxylated aromatics in different ways.
Studies on adhesion mechanisms of MAPs have described adhesions, oxidations and cross-linking reaction pathways for peptidyl DOPA and DOPA *ortho*-quinone; (i) formation of DOPA-metal complexes (Hansen and Waite 1991; Deming 1999; Ooka and Garrell 2000; Holten-Andersen et al. 2009a), (ii) adsorption of DOPA to metal- or metal-oxid-bearing surfaces through hydrogen bonding (McBride and Wesselink 1988; Deming, 1999), (iii) physical interactions rather than chemical bonding (Lin et al. 2007), (iv) reaction of DOPA or DOPA-quinone to form free radicals which result in dimeric cross-linked biarylic products (Waite 1990b; Waite 1992; McDowell et al. 1999; Burzio et al. 2000), and (v) coupling of DOPA-quinone with a free amino group to form an interchain imine cross-link or in a Michael addition reaction to form an amine cross-link (Waite 1990b; Yamamoto et al. 1997; Yamamoto et al. 2000). Our results support thesis (v) the formation of amine cross-link. We demonstrated that the ε-amino group of lysine is able to cross-link dihydroxylated aromatics.
Based on the results of the tyrosine and lysine cross-linking with dihydroxylated aromatics the laccase-catalyzed reactions of dipeptides consisting of tyrosine and lysine or their derivatives with dihydroxylated aromatics were the next step on the way to biological adhesives for biomedical applications.

Reactions of dipeptides and their derivatives with dihydroxylated aromatic compounds
The dipeptide H-Tyr-Lys-OH **1e** was subjected to laccase-catalyzed transformations with the dihydroxylated aromatic compounds: 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester **2a**, *para*-hydroquinone **2b**, 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide **2c**, and hydrocaffeic acid **2d**. The reactions of 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide **2c** and of hydrocaffeic acid **2d** showed utilizable results for structural characterization of the reaction products.
The MS analysis of the reaction products of **1e** with 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide **2c** resulted in the description of dimer products (**3g$_1$** and **3g$_2$** as mixture) consisting of a quinone and a dipeptide moiety and trimer products (**4d$_1$** to **4d$_4$** as mixture) composed of one quinone and two dipeptide moieties. Due to the high reactivity of the dimers and trimers NMR analyses could not be performed with satisfying results.
Resulting from the reaction of H-Tyr-Lys-OH **1e** (2 mM) and hydrocaffeic acid **2d** (1 mM) a hydroquinonoid dimer **3h** could be determined by NMR (Fig 3), whereas by MS analysis a quinonoid dimer could be detected, like described for the other reactions. But both the NMR and the MS data support the cross-linking between H-Tyr-Lys-OH and hydrocaffeic acid.

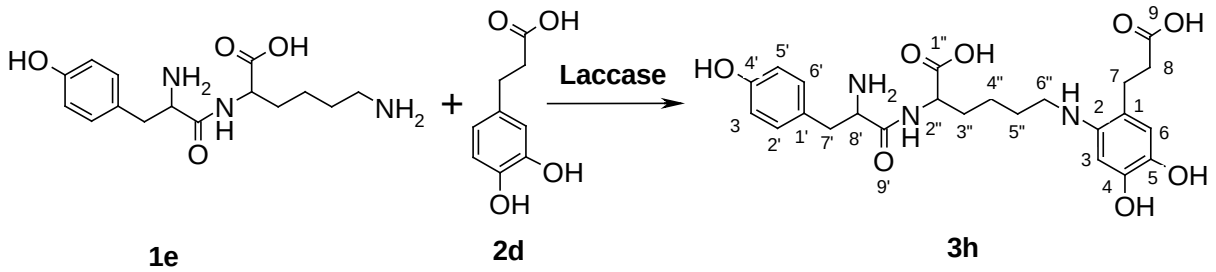


Fig. 3 H-Tyr-Lys-OH (reactant **1e**), hydrocaffeic acid (laccase substrates **2d**), and the dimer **3h** as a result of laccase-catalyzed reaction

Additional to the dimer product **3h** two trimers could be analyzed by MS and four trimer products **4e$_1$**, **4e$_2$**, **4e$_3$**, and **4e$_4$** were detected by NMR from a product mixture. Due to the low signal intensity we could only determine the existence of four different trimers, but we could not assign the direct coupling points between H-Tyr-Lys-OH **1e** and hydrocaffeic acid **2d**. The structures should be similar complex as demonstrated for the reaction of lysine in Fig. 1 according to the free α-amino group of the Tyr-part and the free ε-amino group of the Lys-part of **1e**.
Additionally we tried to analyze the reactions of 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide **2c** and hydrocaffeic acid **2d** with Z-[Tyr-Lys]-OH **1f**. As expected dimers and trimers could be detected by HPLC. The MS analysis of the reaction products of **1f** with **2c** resulted in the description of one dimer **3i** consisting of a quinone and a dipeptide moiety and two trimer products **4f$_1$** and **4f$_2$** consisting of one quinone and two dipeptide moieties.
Our results with dipeptides support the thesis of the formation of amine cross-link by adhesion mechanisms of MAPs. The ε-amino group of lysine in dipeptides is able to cross-link dihydroxylated aromatics forming dimers and trimers and supposable higher molecular weight products.
The next step on the way to potential biomaterials was the laccase-catalyzed reactions of dihydroxylated aromatics with oligopeptides.

Reactions of oligopeptides with dihydroxylated aromatic compounds
The oligopeptide with the structure [Tyr-Lys]$_{10}$ was used in laccase-catalyzed reactions with dihydroxylated aromatics because synthetic polypeptides were also prepared and used to mimic marine adhesives (Yu and Deming 1998; Yamamoto et al. 2000). According to the results with L-lysine **1a** and the dipeptide H-Tyr-Lys-OH **1e** a three-dimensional network should be built from the reaction of [Tyr-Lys]$_{10}$ and 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide **2c** or hydrocaffeic acid **2d** (Fig. 4).

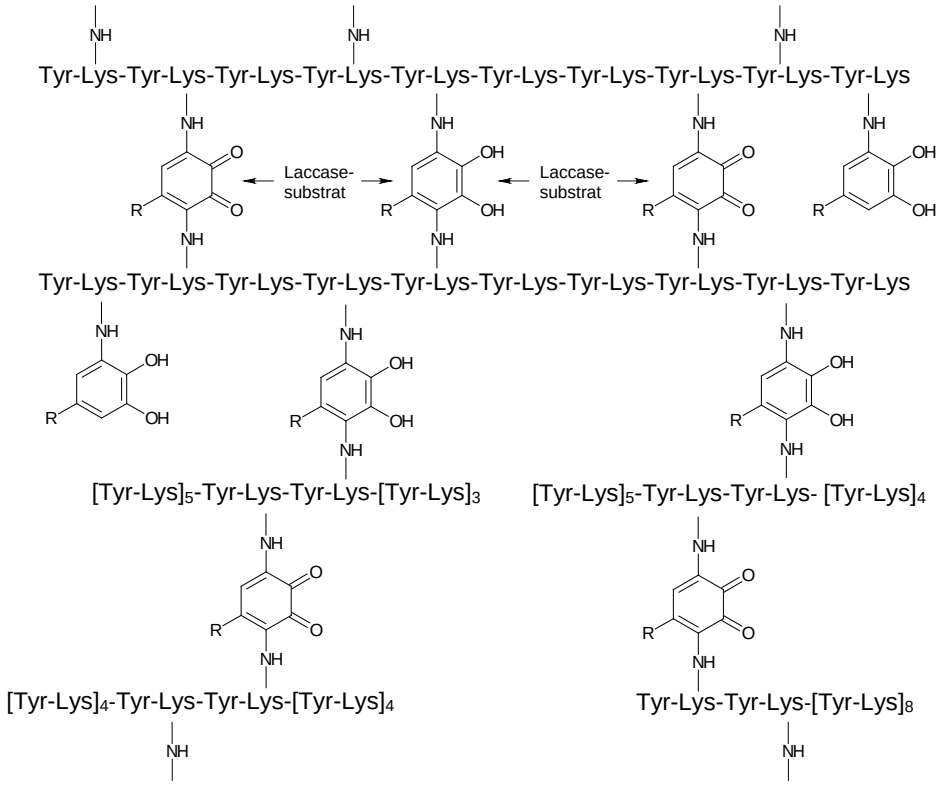


Fig. 4 Model of a three-dimensional network (**5a**) resulting from the laccase-catalyzed reaction of [Tyr-Lys]$_{10}$ and hydrocaffeic acid **2d** (R = CH_2CH_2COOH)

Theses networks should be cross-linked by the free ε-amino groups of the Lys-parts of [Tyr-Lys]$_{10}$ and consist of a variety of polymers. The reaction mixtures of [Tyr-Lys]$_{10}$ and 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide **2c** or hydrocaffeic acid **2d** turned from liquid colourless to brown with brown precipitate and neither reaction products nor the reactants were detectable by HPLC indicating the formation of a lot of different high molecular weight products which are not isolable or analyzable by MS or NMR because of the diversity of structures. [Tyr-Lys]$_{10}$ contains ten free ε-amino groups which can all but must not all react with laccase substrate molecules forming diverse structures. To determine the cross-link between [Tyr-Lys]$_{10}$ and the dihydroxylated aromatics the polymer mixture **5a** of [Tyr-Lys]$_{10}$ and hydrocaffeic acid **2d** was digested by lys C, which separates the bonds between the Tyr-Lys-units of the oligopeptide forming low-molecular weight products resulting in trimers like **4e$_1$ – 4e$_4$** by completed digest. The digested mixture was analyzed by MS and the MS data were compared with those of the trimer mixture formed from H-Tyr-Lys-OH **1e** and **2d**. In both analyses the mass of trimer **4e** (mixture of **4e$_1$ – 4e$_4$**) could be detected indicating the cross-link of free ε-amino groups of [Tyr-Lys]$_{10}$ with hydrocaffeic acid **2d**. Hydrocaffeic acid is an *ortho*-dihydroxylated aromatic compound structurally related to DOPA. The single difference is the missing amino group of hydrocaffeic acid. Due to this fact and the described results in this work it can be assumed that the adhesion mechanisms of MAPs result at least in one part from Michael addition reaction to form amine cross-link as supposed by (Waite 1990b; Burzio et al. 1997; Yamamoto et al. 1997; Yamamoto et al. 2000).
For the MAPs several applications have been proposed due to the adhesive properties for medical applications (Strausberg and Link 1990; Green 1995; Robin et al. 1988; Holten-Andersen and Waite 2008), enzyme, cell, and tissue-immobilizing agents, anticorrosives, and metal scavengers (Deming 1999; Waite 2008).
Due to the brown precipitate and the three-dimensional network formation our system of the three components - [Tyr-Lys]$_{10}$, dihydroxylated aromatic substrate and laccase – has potential as biomaterial for application in medicine or industry. The properties of our products have to be analyzed in further investigations for different applications.

Acknowledgment
We thank R. Jack (Institute of Immunology, University of Greifswald) for help in preparing the manuscript.

References

Amster IJ (1996) Fourier transform mass spectrometry. J Mass Spectrom 31:1325-1337

Berka RM, Schneider P, Golightly EJ, Brown SH, Madden M, Brown KM, Halkier T, Mondorf K, Xu F (1997) Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. Appl Environ Microbiol 63:3151-3157

Bourbonnais R, Paice MG (1990) Oxidation of nonphenolic substrates - an expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Lett 267:99-102

Braun-Lüllemann A, Majcherczyk A, Hüttermann A (1997) Degradation of styrene by white-rot fungi. Appl Microbiol Biotechnol 47:150-155

Burzio LA, Burzio VA, Pardo J, Burzio LO (2000) In vitro polymerization of mussel polyphenolic proteins catalyzed by mushroom tyrosinase. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 126:383-389

Burzio LO, Burzio VA, Silva T, Burzio LA, Pardo J (1997) Environmental bioadhesion: themes and applications. Curr Opin Biotechnol 8:309-312

Deming TJ (1999) Mussel byssus and biomolecular materials. Curr Opin Chem Biol 3:100-105

Deming TJ (2007) Synthetic polypeptides for biomedical applications. Prog Polym Sci 32:858-875

Donat S, Streker K, Schirmeister T, Rakette S, Stehle T, Liebeke M, Lalk M, Ohlsen K (2009) Transcriptome and Functional Analysis of the Eukaryotic-Type Serine/Threonine Kinase PknB in Staphylococcus aureus. J Bacteriol 191:4056-4069

Eggert C, Temp U, Eriksson KEL (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. Appl Environ Microbiol 62:1151-1158

Feng BB, Voehler M, Zhou L, Passarelli M, Harris CM, Harris TM, Stone MP (1996) Major groove (S)-α-(N^6-Adenyl)styrene oxide adducts in an oligodeoxynucleotide containing the human N-ras codon 61 sequence: conformation of the S (61,2) and S (61,3) sequence isomers from ^{1}H NMR. Biochemistry 35:7316-7329

Green K (1995) Mussel adhesive protein. In: Sierra DH, Saltz R (eds) Surgical adhesives and sealants. Current technology and applications. Lancaster: Technomic, pp 19-27

Hahn V, Mikolasch A, Manda K, Gördes D, Thurow K, Schauer F (2009a) Derivatization of amino acids by fungal laccases: Comparison of enzymatic and chemical methods. J Mol Catal B: Enzym 60:76-81

Hahn V, Mikolasch A, Manda K, Gördes D, Thurow K, Schauer F (2009b) Laccase-catalyzed carbon-nitrogen bond formation: coupling and derivatization of unprotected L-phenylalanine with different *para*-hydroquinones. Amino Acids 37:315-321

Hansen DC, Waite JH (1991) Marine metal chelating proteins. Am Chem Soc Symp Ser 444:256-262

Harrington MJ, Waite JH (2007) Holdfast heroics: comparing the molecular and mechanical properties of *Mytilus californianus* byssal threads. J Exp Biol 210:4307-4318

Holl SM, Hansen D, Waite JH, Schaefer J (1993) Solid-state NMR analysis of cross-linking in mussel protein glue. Arch Biochem Biophys 302:255-258

Holten-Andersen N, Mates TE, Toprak MS, Stucky GD, Zok FW, Waite JH (2009a) Metals and the integrity of a biological coating: The cuticle of mussel byssus. Langmuir 25:3323-3326

Holten-Andersen N, Waite JH (2008) Mussel-designed protective coatings for compliant substrates. J Dent Res 87:701-709

Holten-Andersen N, Zhao H, Waite JH (2009b) Stiff coatings on compliant biofibers: The cuticle of *Mytilus californianus* byssal threads. Biochemistry 48:2752-2759

Jonas U, Hammer E, Schauer F, Bollag JM (1998) Transformation of 2-hydroxydibenzofuran by laccases of the white rot fungi *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus* and characterization of oligomerization products. Biodegradation 8:321-328

Lin Q, Gourdon D, Sun CJ, Holten-Andersen N, Anderson TH, Waite JH, Israelachvili JN (2007) Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp-1 and mfp-3. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 104:3782-3786

Manda K, Hammer E, Mikolasch A, Gördes D, Thurow K, Schauer F (2006) Laccase-induced derivatization of unprotected amino acid L-tryptophan by coupling with *p*-hydroquinone 2,5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide. Amino Acids 31:409-419

Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.; Jackson (1998) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. Mass Spectrom Rev 17:1-35

Marshall AG, Schweikhard L (1992) Fourier-Transform Ion-Cyclotron Resonanc Mass-Spectrometry - Technique Developments. Int J Mass Spectrom Ion Processes 118/119:37-70

Marumo K, Waite JH (1986) Optimization of hydroxylation of tyrosine and tyrosine-containing peptides by mushroom tyrosinase. Biochim Biophys Acta 872:98-103

McBride MB, Wesselink LG (1988) Chemisorption of catechol on gibbsite, boehmite, and noncrystalline alumina surfaces. Environ Sci Technol 22:703-708

McDowell LM, Burzio LA, Waite JH, Schaefer J (1999) Rotational echo double resonance detection of cross-links formed in mussel byssus under high-flow stress. J Biol Chem 274:20293-20295

Niedermeyer THJ, Mikolasch A, Lalk M (2005) Nuclear amination catalyzed by fungal laccases: Reaction products of *p*-hydroquinones and primary aromatic amines. J Org Chem 70:2002-2008

Ooka AA, Garrell RL (2000) Surface-enhanced Raman spectroscopy of DOPA-containing peptides related to adhesive protein of marine mussel, *Mytilus edulis*. Biopolymers 57:92-102

Robin JB, Picciano P, Kusleika RS, Salazar J, Benedict C (1988) Preliminary evaluation of the use of mussel adhesive protein in experimental epikeratoplasty. Arch Ophthal 106:973-977

Rzepecki LM, Chin SS, Waite JH, Lavin MF (1991) Molecular diversity of marine glues: polyphenolic proteins from five mussel species. Mol Mar Biol Biotechnol 1:78-88

Strausberg RL, Link RP (1990) Protein-based medical adhesives. Trends Biotechnol 8:53-57

Vreeland V, Waite JH, Epstein L (1998) Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. J Phycol 34:1-8

Waite JH (1990a) Marine adhesive proteins - natural composite thermosets. Int J Biol Macromol 12:139-144

Waite JH (1990b) The phylogeny and chemical diversity of quinone-tanned glues and varnishes. Comp Biochem Physiol 97B:19-29

Waite JH (1992) The DOPA Ephemera - A recurrent motif in invertebrates. Biol Bull 183:178-184

Waite JH (2008) Surface chemistry - Mussel power. Nat Mater 7:8-9

Waite JH, Hansen DC, Little KT (1989) The glue protein of ribbed mussels (*Geukensia demissa):* a natural adhesive with some features of collagen. J Comp Physiol B 159:517-525

Waite JH, Housley TJ, Tanzer ML (1985) Peptide repeats in a mussel glue protein: theme and variations. Biochemistry 24:5010-5014

Yamamoto H, Hayakawa T (1979) Synthesis of sequential polypeptides containing L-beta-3,4-dihydroxyphenyl-alpha-alanine (Dopa) and L-glutamic acid. Biopolymers 18:3067-3076

Yamamoto H, Hayakawa T (1982) Synthesis of sequential polypeptides containing L-beta-3,4-dihydroxyphenyl-alpha-alanine (Dopa) and L-lysine. Biopolymers 21:1137-1151

Yamamoto H, Ogawa T, Nishida A (1997) Studies on quinone cross-linking adhesion mechanism and preparation of antifouling surfaces toward the blue mussel. J Mar Biotechnol 5:133-136

Yamamoto H, Sakai Y, Ohkawa K (2000) Synthesis and wettability characteristics of model adhesive protein sequences inspired by a marine mussel. Biomacromolecules 1:543-551

Yu M, Deming TJ (1998) Synthetic polypeptide mimics of marine adhesive. Macromolecules 31:4739-4745

Zhao H, Robertson NB, Jewhurst SA, Waite JH (2006) Probing the adhesive footprints of *Mytilus californianus* byssus. J Biol Chem 281:11090-11096

Zhao H, Waite JH (2006) Linking adhesive and structural proteins in the attachment plaque of *Mytilus californianus*. J Biol Chem 281:26150-26158

4.7 Mikrobielle Laccasen zur Synthese organischer Substanzen

Im fünften Artikel wird das Potential der Laccase zur Synthese von Feinchemikalien vorgestellt. Dabei wurde sowohl auf die Funktionen der Laccase allgemein und im Speziellen bei der Synthese neuer Verbindungen eingegangen. Des Weiteren wurden die Verfahren zur Herstellung von Feinchemikalien mittels Laccase im Einzelnen erläutert. Der Artikel wurde in der Zeitschrift *Biospektrum* veröffentlicht. Der Abstract und der komplette Text sind der Arbeit beigefügt.

Biokatalyse

Mikrobielle Laccasen zur Synthese organischer Substanzen

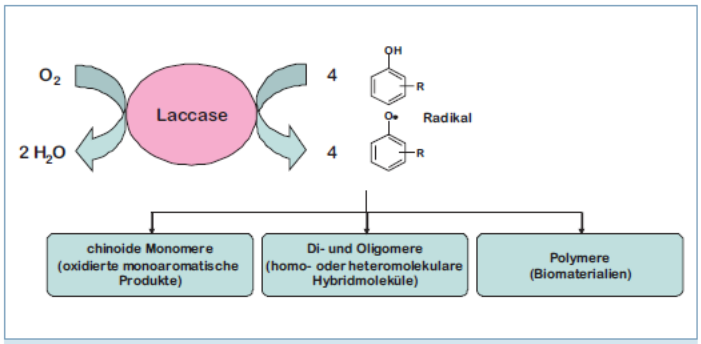
VERONIKA HAHN, FRIEDER SCHAUER
INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT GREIFSWALD

Das Enzym Laccase katalysiert Hunderte von Kopplungs- und Derivatisierungsreaktionen. Die Effizienz der Reaktion sowie umweltfreundliche Reaktionsbedingungen sind weitere Vorteile für die organische Synthese.

Exploiting the enzyme laccase as biocatalyst allows a variety of synthetic reactions with high effectiveness.

■ Die Laccase kommt sowohl in Insekten und Pflanzen als auch in Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen vor. So divers wie die Quellen der Laccasen sind auch ihre physiologischen Funktionen. Beispielsweise kann Laccase in Weißfäulepilzen beim Abbau von Lignin, aber auch von Kohle von Bedeutung sein. Daneben ist sie an der Humusbildung sowie an Polymerisations- und Syntheseprozessen in Zellen beteiligt, wie z. B. bei der Pigmentsynthese in Sporen von Bakterien und Pilzen oder der Sklerotisierung von Insektenzellen.

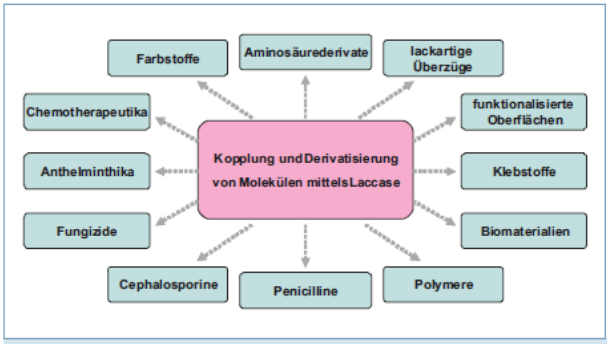
Bisherige biotechnische Anwendungen beziehen sich auf die chlorfreie Bleichung von Papier, die Entfernung von Farbstoffen bei der Textilherstellung sowie von unerwünschten Phenolen aus Most. Daneben wird die Laccase in Biosensoren und Brennstoffzellen eingesetzt. Dafür stehen verschiedene Laccasen, insbesondere aus Weißfäulepilzen zur Verfügung. Der zinnoberrote Zunderschwamm (*Pycnoporus cinnabarinus*) beispielsweise produziert große Mengen an extrazellulärer Laccase und scheidet dabei kaum Nebenenzyme aus, sodass die Laccase relativ einfach isoliert werden kann. Dabei können Verbindungen wie 2,5-Dimethylanilin oder 3,4-Dimethoxybenzylalkohol den Pilz anregen, Laccase zu produzieren, wodurch die Enzymausbeute gesteigert wird. Verschiedene Laccase-Präparate sind inzwischen käuflich, darunter die Laccase des Pilzes *Myceliophthora thermophila*. Das Laccase-Gen wird dabei in einem Schimmelpilz (*Aspergillus* spec.) überexprimiert, um eine höhere Ausbeute des Enzyms zu erreichen. Diese Art der Laccase-Produktion ermöglicht einen umfassenden Einsatz für die Herstellung neuer organischer Moleküle. In diesem Zusammenhang stellen vor allem die Synthese von Feinchemikalien und Biomaterialien sowie die Derivatisierung von Wirkstoffen neue Anwendungsgebiete dar.



▲ **Abb. 1:** Reaktionsprinzip der Laccase, Bildung von Radikalen und mögliche Reaktionsprodukte.

Laccase zur Herstellung von Feinchemikalien

Laccasen haben als kupferhaltige Oxidasen einige besondere Eigenschaften: Als extrazelluläre Enzyme besitzen sie eine außerordentlich hohe Enzymstabilität, etwa gegenüber erhöhter Temperatur oder Lösungsmitteln. Weiterhin ist das breite Spektrum von aromatischen Substraten hervorzuheben. Die Oxidation von hydroxylierten aromatischen Substanzen führt zum Abzug eines Elektrons und – unter gleichzeitiger Reduktion molekularen Sauerstoffs zu Wasser – zur Bildung von freien Radikalen (**Abb. 1**). Auf diese Weise können zahlreiche aromatische Laccase-Substrate „aktiviert" werden. Sie sind dann in der Lage, mit Molekülen der gleichen Art, anderen Laccase-Substraten oder auch mit Hunderten von Nicht-Laccase-Substraten zu reagieren und Kopplungsreaktionen mit verschiedenen Molekülen zu vollziehen. So können diverse chemische Substanzklassen mittels Laccasen verknüpft oder derivatisiert werden (**Tab. 1**), weshalb diese Art der Synthese als kombinatorische Biochemie bezeichnet wird. Als Ausgangssubstrat dient z. B. 2,5-Dihydroxyacetophenon (**Tab. 1C**), eine Substanz, die von Laccase oxidiert werden kann. Die durch die Oxidation von unterschiedlichen Laccase-Substraten entstehenden Radikale unterliegen je nach den gewählten Bedingungen verschiedenen Reaktionen. Dabei können homo- und heteromolekulare Reaktionen unterschieden werden. Bei der homomolekularen Reaktion werden zwei Moleküle der gleichen Substanz verknüpft; bei der heteromolekularen Kopplung erfolgt eine Reaktion zwischen unterschiedlichen Verbindungen. Dabei zählen zu den möglichen Reaktionspartnern sowohl Verbindungen, die durch Laccase oxidiert werden können, als auch Substanzen, die nicht oxidiert werden können wie L-Phenylalanin (**Tab. 1C**). Auf die-



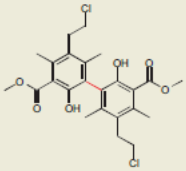
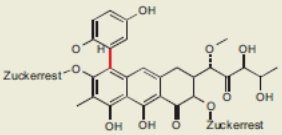
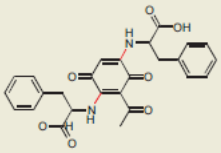
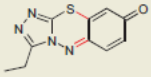
▲ **Abb. 2:** Überblick über die potenziellen Einsatzmöglichkeiten der mittels Laccase synthetisierten Produkte.

se Weise ist die Bildung von homo- oder heteromolekularen Hybridmolekülen und damit eine effiziente Synthese von zahlreichen Feinchemikalien möglich. Die Reaktionspartner können in Abhängigkeit von der Anzahl und Art der Substituenten sowie der Reaktionszeit einmal oder mehrmals verknüpft werden, was zur Bildung von Di-, Tri- oder Polymeren führt (**Tab. 1**). Die Verknüpfung der Moleküle und somit der Bindungstyp ist abhängig von den Reaktionspartnern. Die homomolekulare Reaktion führt zu C-C- (**Tab. 1A**) [1], C=C- [2] und auch C-O-Bindungen [3]. Die heteromolekularen Hybridmoleküle können bei phenolischen Reaktionspartnern über C-C- (**Tab. 1B**) [4], C=C- [2] und C-O-Bindungen [5] oder bei der Reaktion von aromatischen Aminen über C-N (**Tab. 1C**) [6] verknüpft sein. Bei Ringbildungen werden mehrere Bindungen geknüpft (z. B. C-S und C=N, **Tab. 1D**) [7]. Auf diese Weise können zahlreiche Wirkstoffe oder Grundstrukturen von medizinisch relevanten Verbindungen wie Antibiotika, Aminosäuren, Azole oder Salicylsäureester derivatisiert werden. Gerade die Synthese von C-N-verknüpften Hybridmolekülen eröffnet interessante Möglichkeiten. So können die mittels Laccase hergestellten Verbindungen nicht nur als Feinchemikalien für die Synthese weiterer organischer Substanzen genutzt werden, sondern auch als Ausgangsstoff für neue Wirkstoff-Derivate für die Herstellung oder weitere schonende Optimierung von verschiedenen Medikamenten fungieren [8].

Gewinnung von Hybridmolekülen mittels Laccase

Die Synthese von neuen Verbindungen mithilfe der Laccase eröffnet eine Vielzahl an Variationsmöglichkeiten. Die zahlreichen Laccase-Substrate und die – speziell bei der heteromolekularen Kopplung – große Auswahl an Reaktionspartnern erlaubt die Herstellung unterschiedlicher Substanzen (**Abb. 2**). Die Gewinnung von Hybridmolekülen umfasst mehrere Prozesse und Methoden, wobei die gewünschte Verbindung erst mittels Laccase synthetisiert, dann gereinigt wird, um letztlich als Reinsubstanz weiter charakterisiert und auf Anwendungseigenschaften geprüft zu werden. So wurde beispielsweise ein trimeres Produkt bei der Reaktion der dihydroxylierten Verbindung 2,5-Dihydroxyacetophenon und der Aminosäure L-Phenylalanin synthetisiert (**Tab. 1C**). Im Labor werden dazu die beiden Ausgangsstoffe mit der Laccase, z. B. aus *Myceliophthora thermophila* im wässrigen Milieu, meist in Puffer, inkubiert. Der pH-Wert des Puffers entspricht dabei dem pH-Optimum der jeweiligen Laccase; je nach gewünschtem pH-Bereich können Laccasen mit unterschiedlichen pH-Optima genutzt werden. Die Reaktion ist von Sauerstoff abhängig, aber Kofaktoren sind nicht erforderlich. Die Bildung der angestrebten Hybridmoleküle wird meist von einer Farbreaktion begleitet und kann mithilfe der HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatografie) verfolgt und mittels geeigneter Detektoren, etwa einem UV/Vis-Detektor,

Tab. 1: Übersicht über mögliche Laccase-katalysierte Reaktionen, die Bindungs- und Produkttypen sowie die Quelle der für die Synthese genutzten Laccase und die Ausbeute des Produkts. Die Bindung zwischen den Reaktionspartnern ist rot gekennzeichnet.

	Reaktionspartner	Bindungstyp, Produkttyp	Strukturformel des Reaktionsprodukts	Quelle der Laccase	Ausbeute des Produkts	Literaturzitat
Homomolekulare Reaktion						
A	3-(2-Chloroethyl)-6-hydroxy-2,4-dimethylbenzoesäure methylester (Salicylsäureester)	C-C, Dimer		*Pycnoporus cinnabarinus; Trametes* spec. Laccase C	85 %	[1]
Heteromolekulare Reaktion						
B	1,4-Hydrochinon; Mithramycin (Antitumor-Antibiotikum)	C-C, Dimer		*Polyporus anceps*	25 %	[4]
C	2,5-Dihydroxyacetophenon; L-Phenylalanin (Aminosäure)	C-N, Trimer		*Pycnoporus cinnabarinus; Myceliophthora thermophila*	40 %	[6]
D	1,4-Hydrochinon; 4-Amino-5-ethyl-3-mercapto-1,2,4-triazol (Azolderivat)	C-S, C=N Dimer		keine Angabe zur biologischen Quelle	95 %	[7]

elektronisch ausgewertet werden. Die Isolation des Produkts erfolgt mittels Festphasenextraktion. Die sich daran anschließende Gefriertrocknung ermöglicht die Gewinnung von Feststoffen. Auf diese Weise können sehr hohe Produktausbeuten von 20 bis 80 Prozent, bei ausgewählten Reaktionen sogar von 95 Prozent erzielt werden [7]. Vielfach wird eine weitere Optimierung der Laccase-vermittelten Reaktion angestrebt, das heißt die Reaktionsbedingungen wie die Menge der Laccase oder der Ausgangsstoffe werden variiert, um eine möglichst hohe Produktausbeute zu erreichen. Die isolierten Produkte können unter anderem mittels massenspektroskopischer Methoden und NMR (Kernresonanz-Spektroskopie) strukturell charakterisiert werden. Der vorgestellte biokatalytische Prozess stellt aufgrund seiner Effizienz, den milden umweltschonenden Reaktionsbedingungen bei Atmosphärendruck und Raumtemperatur eine Alternative zu konventionellen chemischen Verfahren zur Synthese von organischen Substanzen dar. ■

Literatur

[1] Ciecholewski S, Hammer E, Manda K et al. (2005) Laccase-catalyzed carbon-carbon bond formation: oxidative dimerization of salicylic esters by air in aqueous solution. Tetrahedron 61:4615–4619

[2] Simmons KE, Minard RD, Bollag J-M (1989) Oxidative co-oligomerization of guaiacol and 4-chloroaniline. Environ. Sci. Technol. 23:115–121

[3] Jonas U, Hammer E, Schauer F et al. (1997) Transformation of 2-hydroxydibenzofuran by laccases of the white rot fungi *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus* and characterization of oligomerization products. Biodegradation 8:321–328

[4] Anyanwutaku IO, Petroski RJ, Rosazza JPN (1994) Oxidative coupling of mithramycin and hydroquinone catalyzed by copper oxidases and benzoquinone. Implications for the mechanism of action of aureolic acid antibiotics. Bioorg. Med. Chem. 2:543–551

[5] Bollag JM, Liu SY (1985) Copolymerization of halogenated phenols and syringic acid. Pest. Biochem. Physiol. 23:261–272

[6] Hahn V, Mikolasch A, Manda K et al. (2009) Derivatization of amino acids by fungal laccases: Comparison of enzymatic and chemical methods. J. Mol. Catal. B: Enzym. DOI: 10.1016/j.molcatb.2009.04.002

[7] Bhalerao UT, Muralikrishna C, Rani BR (1994) Laccase enzyme-catalyzed efficient synthesis of 3-substituted-1,2,4-triazolo(4,3-B)(4,1,2)benzothiadiazine-8-ones. Tetrahedron 50:4019–4024

[8] Mikolasch A, Hessel S, Gesell Salazar M et al. (2008) Synthesis of new N-analogous corollosporine derivatives with antibacterial activity by laccase-catalyzed amination. Chem. Pharm. Bull. 56:781–786

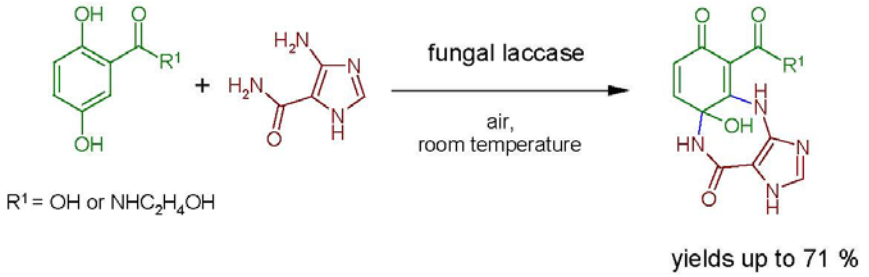
Korrespondenzadresse:
Prof. Dr. Frieder Schauer
Veronika Hahn
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Institut für Mikrobiologie
F.-L.-Jahn-Straße 15
D-17487 Greifswald
Tel.: 03834-864204
Fax: 03834-864202
schauer@uni-greifswald.de

4.8 Enzymatic cyclizations using laccases: Multiple bond formation between dihydroxybenzoic acid derivates and aromatic amines

Das sechste in dieser kumulativen Dissertation vorgestellte Manuskript wurde im Journal *Green Chemistry* eingereicht. Es konnten Zyklisierungsprodukte bei laccasekatalysierten Reaktionen von aromatischen Aminen mit *para*-Dihydroxybenzoesäurederivaten nachgewiesen werden. Der Ablauf der Zyklisierung war sowohl von der Ringgröße und den Substituenten des Aminopartners als auch von der Substitution des Laccasesubstrates sowie den Reaktionsbedingungen, wie der genutzten Laccase und dem pH-Wert des Puffers abhängig. Die Synthese von derartigen Zyklisierungsprodukten ist weder für laccasekatalysierte noch für chemische Reaktionen zuvor beschrieben worden. Damit ermöglicht die Laccase die Herstellung von neuartigen Ringstruktursystemen und eröffnet so neue Anwendungsmöglichkeiten für die Produktion von Wirkstoffen, aber auch von Feinchemikalien.

Die zu dieser Publikation gehörenden ergänzenden Informationen finden sich im Anhang B ab Seite 181.

Graphical Abstract



The laccase-catalyzed formation of cycloheptenes, cyclooctenes, diazaspiro cyclohexenes, and phenazines was investigated for the first time. The mild and environmentally friendly reaction conditions, which do not require high temperatures or pressures, are crucial factors for the choice of laccases as biocatalyst.

CREATED USING THE RSC ARTICLE TEMPLATE (VER. 3.1) - SEE WWW.RSC.ORG/ELECTRONICFILES FOR DETAILS

ARTICLE TYPE www.rsc.org/xxxxxx | XXXXXXXX

Enzymatic cyclizations using laccases: Multiple bond formation between dihydoxybenzoic acid derivates and aromatic amines

Veronika Hahn,*[a] Timo Davids,[a] Michael Lalk,[b] Frieder Schauer[a] and Annett Mikolasch[a]

Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXX 200X, Accepted Xth XXXXXXXXX 200X
First published on the web Xth XXXXXXXXX 200X
DOI: 10.1039/b000000x

Nuclear amination followed by cyclization of dihydroxybenzoic acid derivatives with aromatic and heteroaromatic amines was catalyzed in the presence of oxygen by laccases [E.C. 1.10.3.2] from the white rot fungi *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila*. The laccase-catalyzed formation of cycloheptenes, cyclooctenes, diazaspiro cyclohexenes, and phenazines was investigated for the first time with regard to the ring size and substituents of the aromatic amines as well as to the substitution patterns of the substrates. Differences to nuclear amination without cyclization are discussed.

Introduction

Enzyme-catalyzed oxidations using atmospheric oxygen as a non-toxic oxidant are of considerable general interest. Laccases (E.C. 1.10.3.2, benzenediol:dioxygen oxidoreductase) contain four copper atoms in the catalytic centre which are responsible for the electron transport during substrate oxidation.[1] The spectrum of laccase substrates is broad, ranging from monophenols[2] over anilines[3] to *ortho*- and *para*-dihydroxylated substrates.[4] The oxidation of suitable substrates results in radicals, which can undergo various reactions such as the coupling of two different reaction partners. In the case of phenolic compounds bond formations like C-C,[4b,5] C-O,[6] and C=C [7] or in case of reactions with amines C-N [4c-e,8] or C=N [4c,7,8] may be formed.

Laccase-catalyzed bond formation can be used in green chemistry for the synthesis of many different substances; e.g. the formation of different benzofurans and benzofuran-1-ones,[9] naphthoquinones,[10] aminobenzoquinones,[4c-e,11] substituted imidazoles,[12] 3-substituted -1,2,4-triazolo(4,3-b)(4,1,2)benzothiadiazine-8-ones,[13] and phenoxazinone derivatives,[14] as well as the dimerization of salicylic esters[2c] and penicillins.[15]

Thus the exploitation of laccases in organic synthesis is a promising field of application in addition to their use in biobleaching of pulp,[16] in textile dye degradation,[17] as biosensors,[18] and in the food industry.[19] The mild and environmentally friendly reaction conditions, which do not require high temperatures or pressures, are crucial factors for the choice of laccases as biocatalyst for example in fine chemical synthesis.[20]

Although the list of laccase-catalyzed reactions is long, the process of amine derivatization has so far been limited to the use of substituted hydroquinones as coupling partners for various aliphatic[21] or especially aromatic amines.[4c-e,11] As a result most of the laccase-mediated procedures described in the literature result in the formation of mono- or diaminated quinones[4c,e] or quinonimines.[4c,22]

To broaden the range of application of laccase in fine chemical synthesis, we exploited the laccases of *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila* for the synthesis of cycloheptenes, cyclooctenes, diazaspiro cyclohexenes, and phenazines. In the presence of oxygen and laccase, 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives and aromatic amines gave rise to cyclic products with different substitution patterns.

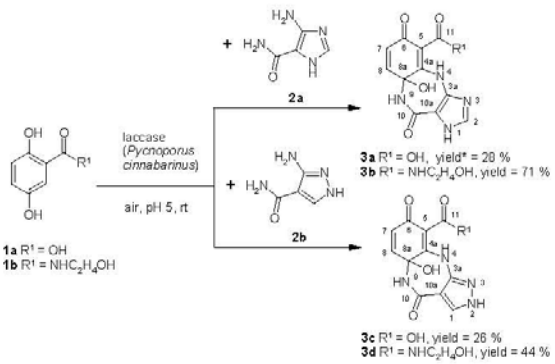
Results

General Observations. The amines (**2a-g**) used in this study consist of five or six membered rings containing in the aromatic ring either only carbon atoms or, alternatively, one or two nitrogen atoms. Furthermore all amines are substituted with at least one amino group and an additional carboxamide (**2a-d**), amino (**2e,f**), or carboxyl group (**2g**). The different amines were incubated with 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives (**1a-d**) and laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*. The predominant reaction was a nuclear amination followed by cyclization, resulting in heterocyclic heptenes (**3a-l**), which in a few cases can be converted into diazaspiro products (**5a,b**). Moreover cyclooctenes (**4a-f**) or phenazines (**6a-e**) were formed during laccase-catalyzed reaction.

The type of cyclization products recovered was dependent on the ring size, the amination grade of the amine, as well as on the structure of the 2,5-dihydroxybenzoic acid derivative used. The reaction course and product formation were followed using HPLC equipped with a diode array detector. The products were isolated by solid phase extraction, followed by lyophilization and structural characterization by MS and NMR.

Reaction of Five Membered Ring Amines with 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives. In the reactions of 2,5-dihydroxybenzoic acid (**1a**) and 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide (**1b**) with 5-aminoimidazole-4-carboxamide (**2a**) and 3-aminopyrazole-4-carboxamide (**2b**) the cycloheptenes **3a-d** were readily produced by laccase-mediated bond formation (Scheme 1). All reactions were performed with 0.5 U laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*

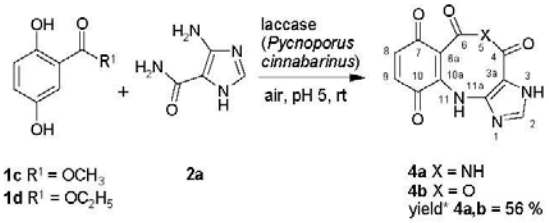
as catalyst in sodium acetate buffer pH 5.0 at room temperature. The yields of the substituted cycloheptenes **3a-d** ranged from 25 to 70 %.



*Yields refer to isolated yields.

Scheme 1 Laccase-catalyzed reaction of 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives **1a,b** and five membered ring amines **2a,b** for the synthesis of cycloheptenes **3a-d**.

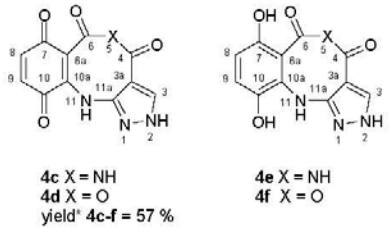
In the laccase-catalyzed reactions of 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester (**1c**) and of 2,5-dihydroxybenzoic acid ethyl ester (**1d**) with **2a** the cyclooctenes **4a,b** were isolated as product mixtures (Scheme 2). The presence of two products was established by mass spectra analysis (**4a** LC/MS *m/z* AP-ESI pos. mode $[M+H]^+$ 259.0513 (calculated 259.0462); **4b** LC/MS *m/z* AP-ESI pos. mode $[M+H]^+$ 260.0368 (calculated 260.0302)). However theses products had identical chromatographic behaviour and identical NMR spectra.



*Yields refer to isolated yields.

Scheme 2 Laccase-catalyzed reaction of 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives **1c,d** and the five membered ring amine **2a** for the synthesis of cyclooctenes **4a,b**.

The reactions of 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester (**1c**) and of 2,5-dihydroxybenzoic acid ethyl ester (**1d**) with **2b** also result in a product mixture consisting of four cyclooctenes (Figure 1). Additionally to the quinonoid cyclooctenes **4c,d** the corresponding hydroquinonoid products **4e,f** were analyzed by NMR and MS.



*Yields refer to isolated yields.

Figure 1 Cyclooctenes **4c-f**.

In addition to the cycloheptenes **3a-d**, the cyclooctenes **4a-f** were formed as by-products in small amounts. For structural characterization of the by-products we isolated the cyclooctene mixture resulting from **1a** and **2b** and detected the expected products **4c-f**.

In order to study the influence of different laccases on the product pattern or the product yields the laccase of *Myceliophthora thermophila* in citrate phosphate buffer (CPB) pH 7.0 were used additionally to the laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* in sodium acetate buffer (SAB) pH 5.0. Independent of the source of laccase the same spectrum of cycloheptenes or cyclooctenes was formed, though the amount of various products differed over a wide range. In course of the reactions of **1a-d** with **2a,b** the synthesis of the respective major products cycloheptenes or cyclooctenes proceeded very rapidly over the first 20 minutes and in general reached maximum yield after 2 hours (as example the product formation of **3a** and **4a,b** are shown in Figure 2). The highest product yields were achieved with *Pycnoporus cinnabarinus* laccase rather than with the enzyme from *Myceliophthora thermophila*. Reactions using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* resulted in an 89 % increase of product amount for **3a** and a 35 % increase for **4a,b** compared with the *Myceliophthora thermophila* laccase. Interestingly the *Pycnoporus cinnabarinus* enzyme leads to a more efficient formation of the cycloheptene **3a** than to the production of cyclooctenes **4a,b**.

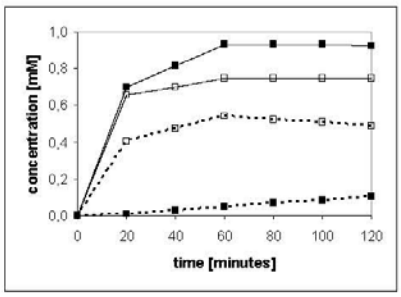


Figure 2 Reaction course of product formation for **3a** (■) and **4a,b** (□) at equimolar concentrations (1mM) of reactants 2,5-dihydroxybenzoic acid (**1a**) or 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester (**1c**) and 5-aminoimidazole-4-carboxamide (**2a**) using *Pycnoporus cinnabarinus* (solid lines) laccase in SAB pH 5.0 and *Myceliophthora thermophila* (dashed lines) laccase in CPB pH 7.0.

This journal is © The Royal Society of Chemistry [year]

Moreover using *P. cinnabarinus* laccase the substrates **1a,c** were consumed within 60 minutes and the concentration of amine **2a** decreased 89 % for the reaction with **1a** and 93 % for **1c**. Homomolecular products of **1a,c** were not detected or only in traces, indicating a nearly complete conversion of reactants to the products **3a** and **4a,b**. We attribute the less than theoretical yield to the isolation procedure which was not optimized. To address the question of the influence of the amount of reaction partners on the product pattern or the product yield, some of the reactions were run using different concentrations of the reactants (1:1, 1:2, 2:1 and 2:2 mM). Reaction of **1a** with **2a** to **3a** the product yield of **3a** was only influenced to a minor degree by the amount of reactants independent of the used laccase (Figure 3).

Increasing the concentration of **1a** or **2a** did not result in an increase either of product yield or of transformation rate. The only positive effect was that with 2:2 mM reactants approximately double the amount (but the same yield) of products was obtained with either laccases. The other reactions of **1** with **2** were also less influenced by the amount of reactants independent of the used laccase (data not shown).

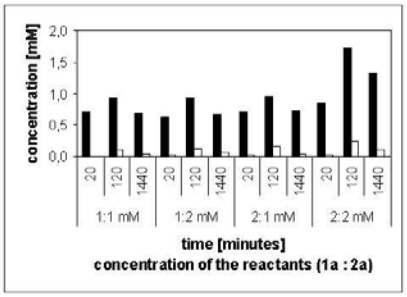
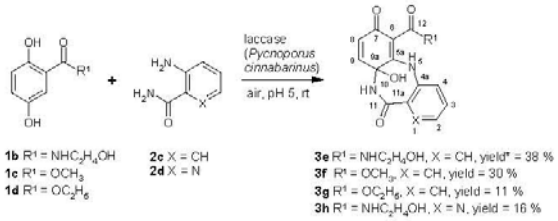


Figure 3 Reaction courses of product formation for **3a** at different concentrations of reactants 2,5-dihydroxybenzoic acid (**1a**) and 5-aminoimidazole-4-carboxamide (**2a**) using the laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* (black columns) and *Myceliophthora thermophila* (white columns).

Reaction of Six Membered Ring Amines with 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives.

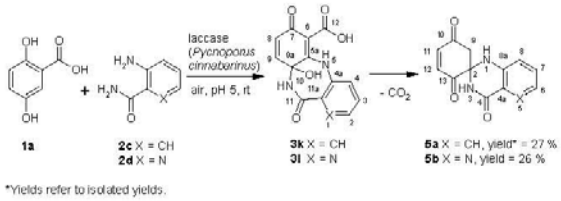
The reactions performed with six membered ring amines 2-aminobenzoic acid amide (**2c**) and 3-aminopyridine-2-carboxylic acid amide (**2d**) also resulted in the formation of cycloheptenes **3e-h** as the main products (Scheme 3). The product yields depend on both the 2,5-dihybroxybenzoic acid derivative and the amino partner used. The product yield decreased in the following order of laccase substrate **1b** > **1c** > **1d** and amino partner **2c** > **2d**. In the reaction of **1c** or **d** with **2d** the cycloheptene **3i,j** could not be isolated and was only detected with HPLC/UV-vis and MS.

The product yields were dependent on the laccase used. The yield of **3e** in the reaction of **1b** with **2c** performed with laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* was 46 % higher than with laccase of *Myceliophthora thermophila*. In the reaction of **1c** with **2c** only 16 % of **3f** was formed with *Myceliophthora thermophila* laccase compared with *Pycnoporus cinnabarinus* laccase.



Scheme 3 Laccase-catalyzed reaction of 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives **1b-d** and six membered ring amines **2c,d** for the synthesis of cycloheptenes **3e-h**.

In the reaction of **1a** with **2c** the cycloheptene product **3k** decreased within 24 hours and a new product **5a** was formed (Scheme 4). The conversion of the cycloheptene was also observed during stability measurements of the isolated product, indicating that a transformation of **3k** to **5a** is also possible during NMR analysis. A similar reaction was observed for **1a** and **2d** and this was also confirmed by HPLC/UV-vis and MS analyses. The diazaspiro structures of products **5a** and **b** may be attributed to the loss of the carboxyl group.

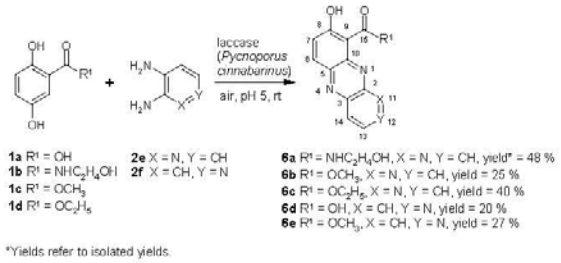


Scheme 4 Laccase-catalyzed reaction of 2,5-dihydroxybenzoic acid **1a** and six membered ring amines **2c,d** for the synthesis of diazaspiro cyclohexenes **5a,b**.

In some reactions of **2c** and **2d** cyclooctenes were detected by HPLC/UV-vis as unstable by-products in very low concentrations (data not shown).

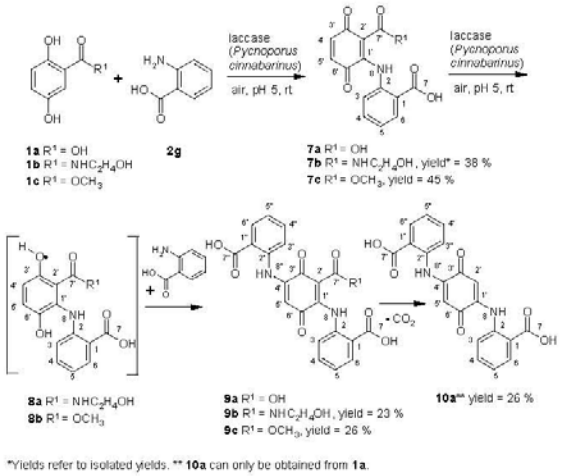
All amines **2a-d** have a carboxamide group in *ortho*-position to the amino group. To determine if reactants with a second amino group or a carboxyl group at *ortho*-position are also able to react with 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives **1a-d** to form cyclic products, we used diaminopyridines **2e,f** and 2-aminobenzoic acid **2g** as reactants in laccase-catalyzed reactions.

The two neighbouring amino groups on the heteroaromatic ring in **2e,f** resulted in the formation of phenazines **6a-e** as cyclization products (Scheme 5).



Scheme 5 Laccase-catalyzed reaction of 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives **1a-d** and six membered ring diamines **2e,f** for the synthesis of phenazines **6a-e**.

Though all of these laccase-catalyzed reactions with reactants **2a-f** yielded cyclic products, we were unable to detect cyclization between 2-aminobenzoic acid **2g** and 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives **1a-c.** In contrast to cyclization we obtained in reactions with **2g** as reactant mono- (**7a-c**) and diaminated (**9a-c**) products as well as reactive radical intermediates (**8a,b**) (Scheme 6). The monoaminated products and the reactive radical intermediates were isolated as mixtures of the quinonoid form and the hydroquinonoid radical, which have not so far been described elsewhere. The reactive radical intermediates were detected in NMR spectra as by-products which were present in low amounts. From the reaction mixture of **1a** with **2g** the monoaminated product **7a** and the simple diaminated product **9a** were only detected as intermediates (**7a** by HPLC/UV-vis and MS, **9a** as by-product of **10a** in MS and NMR analyses). The final product of the reaction of **1a** with **2g** is the decarboxylated diaminated product **10a**.



Scheme 6 Laccase-catalyzed reaction of 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives **1a-d** and 2-aminobenzoic acid **2g**.

Detailed Structural Characterization of **3a**, **4a,b**, and **5a**

The different types of laccase-synthesized products have different characteristic UV-vis spectra. The cycloheptenes were mostly coloured yellow to brown and the cylooctenes red violet to black. Product **3a** showed two absorption maxima under 240 nm and one around 380 nm. MS measurement with AP-ESI in both positive and negative modes showed the molecular mass of **3a** to be 276. This mass can be attributed to an amination of **2a** on the quinonoid form of **1a** and a cyclization via the carboxylamide group of **2a** on the carbonyl group (C-8a) of the quinone resulting in a seven membered non-aromatic ring. ^{1}H NMR spectral data of **3a** showed characteristic signals for both reactants (Table 1). Multiplicity of H-7 and H-8 suggests the first amination step takes place at C-4a. The chemical shift of the proton at N-4 was strongly shifted to lower field due to formation of a hydrogen bond with the amidic oxygen. The HMBC correlations (Figure 4A) of the proton H-4 unambiguously fixed the first amination at C-4a. Signals for the phenolic hydroxy group at 7.46 ppm and for the amidic amine group at 9.19 ppm were observed. Both signals showed HMBC correlations to C-4a (162.7 ppm), C-8 (142.7 ppm), and C-8a (73.8 ppm), supporting the concept of a cyclization step of the amidic amine group at C-8a and the removal of the *para*-quinonoid character. Additionally, ^{13}C NMR showed only one typical signal for quinones in the range of 180 ppm, indicating only one quinonoid carbonyl group for **3a**. The HMBC spectrum also showed correlations between the proton H-7 and C-8a and the proton H-8 and the quinonoid carbonyl carbon and the C-4a, unambiguously showing **3a** to be the aminated and cyclized product 8a-hydroxy-6,10-dioxo-1,4,6,8a,9,10-hexahydro-1,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azulene-5-carboxylic acid.

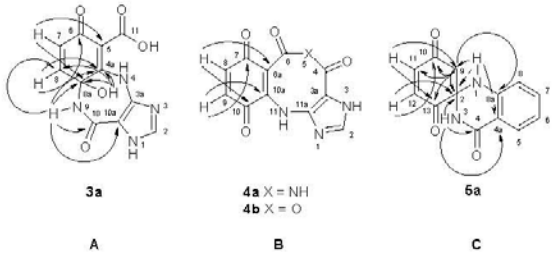


Figure 4 Product numbering and important HMBC correlations (H → C) of (A) **3a**, (B) **4a,b**, (C) **5a**.

This journal is © The Royal Society of Chemistry [year]

Table 1 ^{1}H and ^{13}C assignments and HMBC correlations for **3a**, **4a,b**, and **5a**.[a]

		3a	
C	^{13}C	^{1}H	^{1}H-^{13}C correlations
2	137.3	7.88, s, 1H	C-3a (139.5), C-10 (158.3)*, C-10a (114.9)
7	124.7	6.36, d, 1H, (10.1)	C-4a (162.7)**, C-5 (93.2), C-6 (185.5)**, C-8a (73.8), C-11 (170.6)*
8	142.7	6.79, d, 1H, (10.1)	C-4a (162.7), C-5 (93.2)*, C-6 (185.5), C-7 (124.7)**, C-8a (73.8)**
NH (N-1)		13.43, s, 1H	-
NH (N-4)		13.78, s, 1H	C-4a (162.7)*, C-5 (93.2), C-8a (73.8), C-10a (114.9)
NH (N-9)		9.19, s, 1H	C-4a (162.7), C-8 (142.7), C-8a (73.8), C-10 (158.3), C-10a (114.9)
OH (at C-8a)		7.46, s, 1H	C-4a (162.7), C-8 (142.7), C-8a (73.8)
OH (at C-11)		15.08, s, 1H	C-5 (93.2), C-11 (170.6)
		4a,b	
C	^{13}C	^{1}H	^{1}H-^{13}C correlations
2	126.4	8.26, s, 1H	C-3a (124.5), C-11a (139.8)
8	142.6	6.77, d, 1H, (10.3)	C-6 (153.1)*, C-6a (100.2), C-9 (134.2)*, C-10 (184.8)
9	134.2	6.84, d, 1H, (10.3)	C-7 (180.8), C-8 (142.6)*, C-10a (148.8)
NH		7.31, s, 1H	C-3a (124.5)*
NH		7.84, s, 1H	-
		5a	
C	^{13}C	^{1}H	^{1}H-^{13}C correlations
5	126.8	7.59, m, 1H, (7.7, 1.4)	C-4 (164.0), C-4a (114.4)**, C-7 (133.3), C-8a (144.7)
6	117.9	6.70, m, 1H, (7.8, 7.2, 0.9)	C-4 (164.0)**, C-4a (114.4), C-5 (126.8)*, C-7 (133.3)*, C-8 (114.0), C8a (144.7)*
7	133.3	7.23, m, 1H, (7.9, 7.3, 1.6)	C-5 (126.8), -C6 (117.9)**, C-8a (144.7), C-8 (114.0)*
8	114.0	6.66, d, 1H, (7.8)	C-4 (164.0)*, C-4a (114.4), C-5 (126.8)**, -C6 (117.9), C-8a (144.7)**
9	48.5	3.08, d, 1H (17.1, 0.9)	C-2 (70.7), C-10 (194.0), C-11 (141.4)*, C-13 (191.6)
		3.36, d, 1H, (17.1)	C-2 (70.7), C-8a (144.7)*, C-10 (194.0), C-13 (191.6)*
11	141.4	6.85, d, 1H, (10.3, 0.9)	C-6 (117.9)**, C-9 (48.5)*, C-13 (191.6), C-10 (194.0)**
12	137.7	6.88, d, 1H, (10.3)	C-2 (70.7), C-10 (194.0), C-11 (141.4)**, C-13 (191.6)**
NH (N-1)		7.64, s(b), 1H	C-2 (70.7), C-4a (114.4), C-9 (48.5)*
NH (N-3)		8.14, s(b), 1H	C-2 (70.7), C-4a (114.4), C-4 (164.0), C-9 (48.5)*, C-5 (126.8)**

[a] ^{1}H, *J* (in Hz) values in parentheses. Chemical shifts are expressed in δ (ppm) calibrated on the resonances of the residual nondeuterated solvent DMSO.
* Signals with low intensity
** Signals with very low intensity

The products **4a,b** could only be isolated as a mixture and this mixture has three absorption maxima under 400 nm and a weak maximum around 500 nm. MS with AP-ESI in positive mode showed two different mass peaks. The molecular mass of 259 was attributed to an amination of **2a** on the quinonoid form of **1c** and a cyclization via the amino group of the carboxylamide group of **2a** with the side chain of **1c** resulting in **4a**. The molecular mass of 260 was also attributed to an amination of **2a** on the quinonoid form of **1c** and a cyclization via the carboxylamide group of **2a** on the side chain of **1c** resulting in an ester bond formation of **4b**. Each of these products contains an eight membered non-aromatic ring due to the cyclization. The postulated product structures were confirmed by NMR. ^{1}H NMR spectral data of **4** showed characteristic signals for both reactants (Table 1). Multiplicity of H-8 and H-9 suggests that the first amination step takes place at C-10a. The HMBC spectrum showed correlations between the protons H-8 and H-9 and the quinone carbonyl carbons in the typical range of 180 ppm, unambiguously showing **4** to be quinonoid structures substituted at C-10a. Based on the NMR data we are not able to distinguish between **4a** and **4b**. ^{13}C NMR data of C-4 (163.8 ppm) and C-6 (153.1 ppm) are both in the ranges of anhydride and of imide carbon atoms.[23] All results together – MS and NMR – led to the identification of **4a,b** as 3,11-dihydro-1,3,5,11-tetraaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6,7,10-tetraone and 3,11-dihydro-5-oxa-1,3,11-triaza-benzo[a]cyclopenta[d]-cyclooctene-4,6,7,10-tetraone respectively.

Product **5a** showed one absorption maximum at 213 nm and a weak maximum under 400 nm. MS measurments with AP-ESI in both positive and negative modes showed the molecular mass of **5a** to be 242 indicating the coupling of the both reactants **1a** and **2c** and a decarboxylation. ^{1}H NMR spectral data of **5a** showed the presence of two aliphatic protons (Table 1). ^{13}C NMR, HSQC, and HMBC described these aliphatic protons as methylen protons of C-9. This methylen group could be formed by decarboxylation coupled with dearomatization. Additionally, ^{13}C NMR showed two typical signals for the aliphatic carbonyl carbons C-10 (194.0 ppm) and C-13 (191.6 ppm). ^{1}H-^{13}C correlations (Figure 4C) of H-11 and H-12 unambiguously showed the decaboxylation and dearomatization of **1a**. Multiplicity and ^{1}H-^{13}C correlations of H-11 and H-12 suggests that the amination steps have taken place at C-2. The HMBC correlations of the protons H-1 and H-3 showed multiple cross-signals with C-2, C-4a, and C-9 demonstrating the two N-C bond formations at C-2. The analyses confirmed the diazaspiro character of the product **5a** as 1'H,2H,3'H,5H-spiro[cyclohex-3-ene-1,2'-quinazoline]-2,4',5-trione.

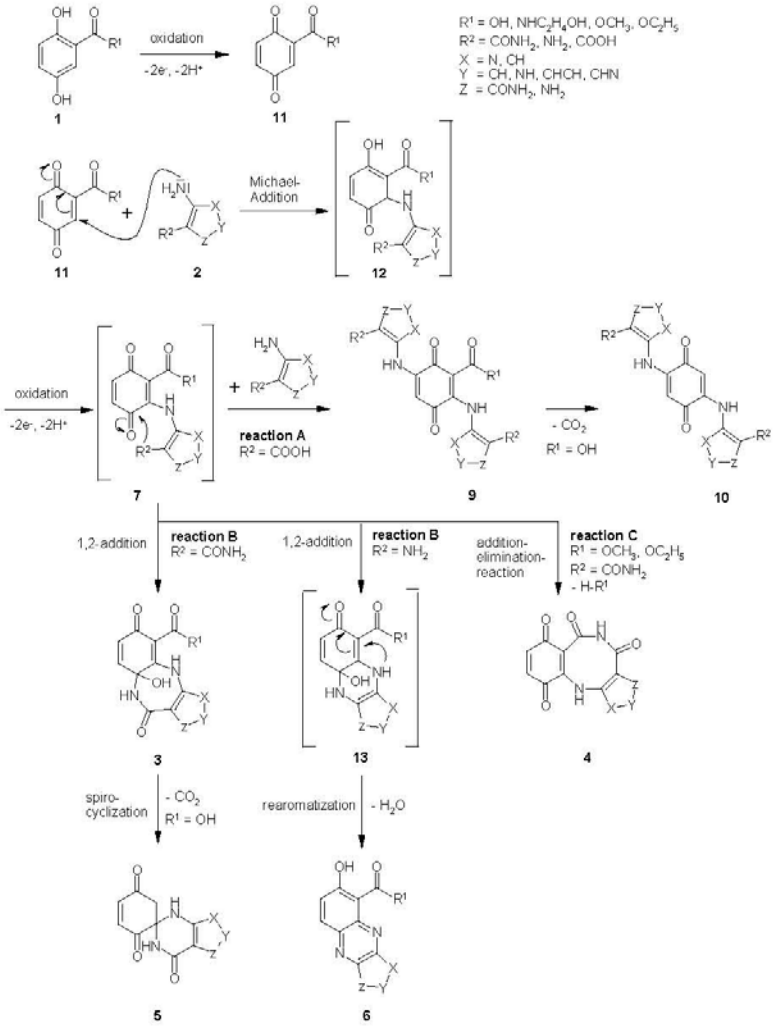
Discussion

The structures of the products synthesized with the aid of laccases were defined by MS, NMR and UV-vis spectral analyses. The course of reaction (whether cyclization or not) was dependent on the number of amino groups of the amino partners **2a-g**. The path of cyclization of aminated products is determined by the ring size and substituents of the aromatic or

heteroaromatic amino partner, by the substitution of the used laccase substrate as well as the reaction conditions such as the particular laccase used and buffer pH.

The synthesis of cyclic products can be described as a regioselective domino reaction (Scheme 7). The first step is the laccase-catalyzed oxidation of the respective 2,5-dihydroxybenzoic acid derivative with oxygen resulting in quinonoid derivatives, which then undergo an amination by intermolecular Michael addition (1,4-addition). The amination is affected by the amino group linked directly with the aromatic ring as in **2a-g**. The position of amination is the *ortho*-position to the COR-group of **1a-d** as described for other aminations.[4c,11a,c,g] After a second oxidation the monoaminated products **7**, which was isolated for R^2 = COOH but is only postulated for R^2 = $CONH_2$ or NH_2, are formed. Products **7** with R^2 = COOH undergo a second amination (reaction A Scheme 7) in the *para*-position to the first one, resulting in the formation of products **9**, which, in case of R^1 = OH, was decarboxylated to **10**. The analyzed hydroquinonoid radicals **8** as intermediates are described for the first time for laccase-mediated amination, though the formation of radicals in the course of laccase-catalyzed substrate oxidation is long known.[1b,7,24] The radicals described in our study could be formed during the second laccase-catalyzed oxidation before binding the second amine molecule. The chemical synthesis of trimers like **9** has been described in the past.[4c,25]

Scheme 7 Possible Reaction Mechanism.



This journal is © The Royal Society of Chemistry [year]

Starting from **7** different reaction courses for cyclization (reactions B and C, Scheme 7) are possible dependent on the ring size (X, Y, Z) and amino substituent R^2 of the amino partner **2** as well as on the substituent R^1 of the laccase substrate **1**. In case of R^1 = OH or NHC_2H_5OH and R^2 = $CONH_2$ the reaction step is a intramolecular 1,2-addition of the R^2-nitrogen to the carbonyl carbon C6' of **7** forming stable cycloheptenes **3**. The cycloheptene formation is dominant in the reactions of five membered **2** as well as for six membered **2** with R^2 = $CONH_2$ and this is independent of the laccase substrate used. In the case of R^1 = OH the cycloheptenes **3** are not final products of the reaction. **3** undergoes a decarboxylation coupled with a migration of amide nitrogen from C9a to C5a resulting in **5**. The formation of diazaspiro products was described for chemical spirocyclization e.g. by Kuckländer et al..[26]

In contrast to these products **3** and **5**, the intramolecular 1,2-addition is only the first reaction step in the case of **7** with R^2 = NH_2 forming **13** as hypothetical reactive intermediates. These reactive species can undergo rapid dehydratization coupled with rearomatization resulting in the isolated phenazines **6**. The chemical reaction of 2,3-dibromo-1,4-naphthoquinone with 1,2-diaminobenzole[27] proceeded in a similar way to our laccase-catalyzed reactions with **2e** and **2f**. The authors described also that the monoaminated product formed reacted further by attacking the carbonyl group of the quinone to yield an angular 5-bromo-6-hydroxy-benzo[a]phenazine. A similar product was described in the reaction of *o*-phenylenediamine with 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone. The formation of an *ortho*-quinone was postulated as an intermediate which further reacts with the diamine resulting in benzo[*a*]phenazin-5-ol.[28] The chemical synthesis of phenazines by amination and substitution of one hydroxyl group has been described by Fandy et al..[29]

Furthermore, **7** reacts mainly to **4** in the case of R^1 = OCH_3 or OC_2H_5 and R^2 = $CONH_2$ and X = N, Y = CH, Z = NH. The ester groups of **1** undergo an addition-elimination-reaction by the R^2 amino group and a loss of R^1 (reaction C, Scheme 7). The more reactive ester groups of **1c,d** can react with the amino group of R^2 = $CONH_2$ to produce a less reactive imide group, whereas the also less reactive substituted amide group of **1b** is more stable. The hydroxy proton of the carboxyl group of **1a** is acidic, so that both are rather involved in an acid-base-reaction than in amide formation, and this may explain why we could not detect products **4** from **1a**. Surprisingly, we also found acid anhydrides **4b,d,f** in MS analyses in addition to the **4a,c,e** products. Additionally it is not possible to distinguish between anhydride and imide structures by NMR. Because of this we can only postulate the structures from the reaction mechanisms. The reaction of the more reactive ester groups of **1c,d** can only react with the amino group of R^2 = $CONH_2$ to an imide group by loss of alcohol. The reaction of these ester groups with the amino group to acid anhydrides has not been described so far, so we propose that acid anhydrides as well as the hydroquinones from the quinones[11b] are generated during MS analyses.

Whereas the five membered amino partners **2a,b** react to **3** and/or **4** depending on the substituent R^1 of **1**, the six membered amino partners **2c,d** prefer to form **3** and react only further to **5** in the case of R^1 = OH.

Furthermore cycloheptene and cyclooctene formation was more effective with *P. cinnabarinus* laccase than with *M. thermophila* laccase contrary to the di- and trimer formation in reactions of 1,4-hydroquinones with amino acids described previously by Hahn et al..[4e] Although it is known that the pH value of the buffer may be important especially on the quinone formation, it is more important for high product yield to use the laccase in a reaction medium in which the highest possible activity of the enzyme can be achieved.[4c]

Furthermore, despite the utilization of an oxidative enzyme and oxygen hydroquinonoide products **4** were formed. Although aminohydroquinones are very susceptible to oxidation[26] these products were part of a mixture of four different products. This is one example for the unusual reaction course and reaction products described in this study. In particular, the formation of the cyclooctenes and cycloheptenes as well as the diazaspiro products is unique for enzymatic and chemical catalyzed reactions of amines containing a neighboring amino and carboxylamide group with 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives.

The cyclization products describe here could be the basis not only for the production of fine chemicals but also for the synthesis of new pharmaceuticals. Cycloheptenes are regarded as diazepines. A famous representative of this group is diazepam which is used as anti-convulsant and anti-anxiety agent.[30] Additionally diazepines possess antitumor,[31] antimicrobial and anthelmintic[32] as well as anti-HIV-activity.[33] Furthermore cyclooctenes are regarded as diazocines or oxazocines and possess for example anti-inflammatory properties.[34] In this context the novel synthetized compounds may enlage the spectrum of medically important substances. Further studies are ongoing to test the synthesized products for their biological activity.

Conclusion

In this study we described a new method for the synthesis of cycloheptenes, cyclooctenes, diazaspiro cyclohexenes, and phenazines catalyzed by laccase as a one-pot reaction sequence. The potential of laccase in organic chemistry is thus broaden towards the formation of cyclic compounds and thus constitutes an additional column to classical organic chemistry, for example in fine chemical synthesis. Furthermore the synthesis of substances, which are not accessible for chemical procedures and the use of environmentally friendly reaction conditions enable laccase-catalyzed processes to compensate deficits or gaps of classical organic chemistry.

Experimental

Enzymes. The used laccase was obtained from *Pycnoporus cinnabarinus* SBUG-M 1044. The white rot fungus was isolated from an oak tree in northern Germany and is deposited at the strain collection of the Department of Biology of the University of Greifswald (SBUG).

Cultivation of *Pycnoporus cinnabarinus* SBUG-M 1044 and

crude preparation of laccase as we reported previously.[35] This enzyme preparation contains only isoenzymes of laccase, but no other enzymes and was used always in 20 mM sodium acetate buffer (SAB) pH 5.0 because of the pH optimum around pH 5.0.[35,36]

Laccase from *Myceliophthora thermophila* (expressed in genetically modified *Aspergillus* sp.) was obtained from Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). It was used as received (activity 1000 U/g; substrate: syringaldazine) in citrate phosphate buffer (CPB, 18 mM citrate, 165 mM phosphate) at its pH optimum of pH 7.0.[36b,37]

Measurement of laccase activity. The activity of laccase was determined spectrophotometrically at 420 nm with ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) as substrate[38] using the method described by Jonas et al..[35] 1 U is defined as 1 $\mu mol \cdot mL^{-1} \cdot min^{-1}$.

Experimental procedures

Analytical procedure: For analytical experiments amines (1 mM, 2 mM) and the respective dihydroxylated compound (1 mM, 2 mM) were incubated with laccase (activity 0.5 U). Reaction mixtures were incubated with agitation at 200 rpm at room temperature in the dark. The reaction mixtures were analyzed by HPLC. The separation of the substances was achieved by RP18 column at a flow rate of 1 mL/min. A solvent system consisting of methanol (eluent A) and 0.1% phosphoric acid (eluent B), starting from an initial ratio of 10% A and 90% B and reaching 100% methanol within 14 min, was used.

Product isolation: All reaction mixtures for product isolation were performed with laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* (final activity 0.5 U) in SAB. Isolation steps were performed by solid-phase extraction with a RP18 silica gel column (60 mL, 10 g adsorbent material, phenomenex, Strata, Germany). Product **3a** was isolated from reaction mixture (340 mL) after an incubation period of two hours (**1a**:**2a**, 2:2 mM assay). After charging the column with 10 mL reaction mixture, 100 mL of methanol/distilled water (10:90 v/v) was used to remove undesired impurities. Elution of the yellow green fraction was performed with 30 mL of methanol/distilled water (40:60 v/v). Product **4a,b** was isolated from reaction mixture (460 mL) after an incubation period of 24 h (**1c**:**2a**, 2:2 mM assay). After charging the column with 20 mL reaction mixture and washing steps with 80 mL of methanol/distilled water (5:95 v/v) and 10 mL of methanol/distilled water (50:50 v/v), the product was eluted with 10 mL of methanol/distilled water (50:50 v/v). **5a** was a product resulted from conversion of **3k**. Product **3k** was isolated from reaction mixture (400 mL) after an incubation period of 20 min (**1a**:**2c**, 1:1 mM assay). After charging the column with 40 mL reaction mixture and washing steps with 50 mL of distilled water and 20 mL of methanol/distilled water (10:90 v/v) the product was eluted with 30 mL of methanol/distilled water (30:70 v/v).

For mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy the isolated products were dried by lyophilization.

The products were characterized by MS using electro spray ionization under atmospheric conditions (API-ES) (dry and nebulizer gas: nitrogen) on a Bruker-Daltoniks micrOTOF instrument (Bremen, Germany; software: HyStar). The NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 600 instrument (Rheinstetten, Germany) at 600 MHz. Solvent used was DMSO-d_6. Chemical shifts are expressed in δ (ppm) calibrated on the resonances of the residual nondeuterated solvent.

J values are given in Hz.

8a-Hydroxy-6,10-dioxo-1,4,6,8a,9,10-hexahydro-1,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azulene-5-carboxylic acid (3a). Synthesis and isolation as described above. Yellow green solid. Yield 27.82 % (51.9 mg): mp (decomposition) 168-170 °C. ^{1}H NMR: δ 6.36 (d, *J* = 10.1, 1H, H-7), 6.79 (d, *J* = 10.1, 1H, H-8), 7.46 (s, 1H, OH, on C-8a), 7.88 (s, 1H, H-2), 9.19 (s, 1H, NH, H-9), 13.43 (s, 1H, NH, H-1), 13.78 (s, 1H, NH, H-4), 15.08 (s, 1H, OH, on C-11). ^{13}C NMR: δ 73.8 (C-8a), 93.2 (C-5), 114.9 (C-10a), 124.7 (C-7), 137.3 (C-2), 139.5 (C-3a), 142.7 (C-8), 158.3 (C-10), 162.7 (C-4a), 170.6 (C-11), 185.5 (C-6). HMBC correlations see Table 1. R_f (HPLC) 6.1 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 204, 234, 387 nm. MS *m/z* AP-ESI: pos. ion mode $[M+H]^+$ 277.0610 (calculated 277.0567), $[2M+H]^+$ 553.1167 (calculated 553.1062); AP-ESI: neg. ion mode $[M-H]^-$ 275.0414 (calculated 275.0422), $[2M-H]^-$ 551.0892 (calculated 551.0917), $[3M-H]^-$ 827.1346 (calculated 827.1411).

product mixture: 3,11-Dihydro-1,3,5,11-tetraaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6,7,10-tetraone (4a), 3,11-Dihydro-5-oxa-1,3,11-triaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6,7,10-tetraone (4b). Synthesis and isolation as described above. Dark violet solid. Yield 47.70 % (90.6 mg): mp (decomposition) 149-153 °C. ^{1}H NMR: δ 6.78 (d, *J* = 9.7, 1H, H-8), 6.85 (d, *J* = 9.7, 1H, H-9), 7.32 (s, 1H, NH), 7.83 (s, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, H-2). ^{13}C NMR: δ 100.2 (C-6a), 125.0 (C-3a), 126.3 (C-2), 134.1 (C-9), 140.0 (C-11a), 142.5 (C-8), 149.1 (C-10a), 153.8 (C-6), 164.2 (C-4), 181.0 (C-7), 185.1 (C-10). HMBC correlations see Table 1. R_f (HPLC) 6.1 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 246, 265, 323, 503 nm. (**4a**) MS *m/z* AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 259.0513 (calculated 259.0462). (**4b**) MS *m/z* AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 260.0368 (calculated 260.0302).

9a-Hydroxy-7,11-dioxo-7,9a,10,11-tetrahydro-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepine-6-carboxylic acid (3k). Synthesis and isolation as described above. Yellow solid. Yield 26.99 % (31.3 mg): mp (decomposition) 130-134 °C, mp 156-160 °C. R_f (HPLC) 7.6 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 213, 366 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[MH]^-$ 285.0499 (calculated 285.0517).

1'H,2H,3'H,5H-spiro[cyclohex-3-ene-1,2'-quinazoline]-2,4',5-trione (5a). ^{1}H NMR: δ 3.08 (d, *J* = 17.1, *J* = 0.9, 1H, H-9), 3.36 (d, 1H, H-9), 6.66 (d, *J* = 7.8, 1H, H-8), 6.70 (m, *J* = 7.8, *J* = 7.2, *J* = 0.9, 1H, H-6), 6.85 (m, *J* = 10.3, *J* = 0.9, *J* = 0.7, 1H, H-11), 6.88 (d, *J* = 10.3, 1H, H-12), 7.23 (m, *J* = 7.9, *J* = 7.3, *J* = 1.6, 1H, H-7), 7.59 (m, *J* = 7.7, *J* = 1.4, 1H,

This journal is © The Royal Society of Chemistry [year]

H-5) 7.64 (s (br), 1H, NH, H-1), 8.14 (s (br), 1H, NH, H-3). ^{13}C NMR: δ 48.5 (C-9), 70.7 (C-2), 114.0 (C-8), 114.4 (C-4a), 117.9 (C-6), 126.8 (C-5), 133.3 (C-7), 137.7 (C-12), 141.4 (C-11), 144.7 (C-8a), 164.0 (C-4), 191.6 (C-13), 194.0 (C-10). HMBC correlations see Table 1. R_f (HPLC) 5.9 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 213, 366 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 241.0614 (calculated 241.0619). AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 243.0734 (calculated 243.0764).

Acknowledgements

Financial support by means of a scholarship from the government of Mecklenburg-Vorpommern is gratefully acknowledged. We thank R. Jack (Institute of Immunology, University of Greifswald) for help in preparing the manuscript.

Notes and references

[a] *Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Friedrich-Ludwig-Jahn Straße 15, 17487 Greifswald, Germany. Fax: ++49 3834 864202; Tel: ++49 3834 864229; E-mail: veronikahahn@gmx.at*

[b] *Institut für Pharmazie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Friedrich-Ludwig-Jahn Straße 17, 17487 Greifswald, Germany.*

† Electronic Supplementary Information (ESI) available: Experimental methods; ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, HSQC, HMBC spectra, ^{1}H, ^{13}C-NMR correlation, retention time, UV-vis, and MS-data. See DOI: 10.1039/b000000x/

1 (a) C. F. Thurston, *Microbiology*, 1994, **140**, 19; (b) E. I. Solomon, P. Chen, M. Metz, S. K. Lee and A. E. Palmer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40(24)**, 4570; (c) K. Piontek, M. Antorini and T. Choinowski, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277(40)**, 37663; (d) H. Claus *Arch. Microbiol.*, 2003, **179(3)**, 145; (e) E. I. Solomon, A. J. Augustine and J. Yoon, *Dalton Trans.*, 2008, **30**, 3921.

2 (a) J.-M. Bollag, K. L. Shuttleworth and D. H. Anderson, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, **54(2)**, 3086; (b) J.-M. Bollag, H.-L. Chu, M. A. Rao and L. Gianfreda, *J. Environ. Qual.*, 2003, **32(1)**, 63; (c) S. Ciecholewski, E. Hammer, K. Manda, G. Bose, V. T. H. Nguyen, P. Langer and F. Schauer, *Tetrahedron*, 2005, **61(19)**, 4615; (d) L. Gianfreda, G. Iamarino, R. Scelza and M. A. Rao, *Biocatal. Biotransform.*, 2006, **24(3)**, 177; (e) M. A. Tadesse, A. D'Annibale, C. Galli, P. Gentili and F. Sergi, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6(5)**, 868.

3 (a) T. Hoff, S. Y. Liu and J.-M. Bollag, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, **49(5)**, 1040; (b) T. Bertrand, C. Jolivalt, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak and C. Mougin, *Biochemistry*, 2002, **41**, 7325; (c) A. Kollmann, F. D. Boyer, P. H. Ducrot, L. Kerhoas, C. Jolivalt, I. Touton, J. Einhorn and C. Mougin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **68**, 251.

4 (a) G. Benfield, S. M. Bocks, K. Bromley and B. R. Brown, *Phytochemistry*, 1964, **3**, 79; (b) I. O. Anyanwutaku, R. J. Petroski and J. P. N. Rosazza, *Bioorg. Med. Chem.*, 1994, **2(6)**, 543; (c) T. H. J. Niedermeyer, A. Mikolasch and M. Lalk, *J. Org. Chem.*, 2005, **70(6)**, 2002; (d) A. Mikolasch, M. Wurster, M. Lalk, S. Witt, S. Seefeldt, E. Hammer, F. Schauer, W.-D. Jülich and U. Lindequist, *Chem. Pharm. Bull.*, 2008c, **56(7)**, 902; (e) V. Hahn, A. Mikolasch, K. Manda, D. Gördes, K. Thurow and F. Schauer, *Amino Acids*, 2009, **37(2)**, 315.

5 J.-M. Bollag, S.-Y. Liu and R. D. Minard, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, **38(1)**, 90.

6 J.-M. Bollag and S.-Y. Liu, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1985, **23(2)**, 261.

7 K. E. Simmons, R. D. Minard and J.-M. Bollag, *Environ. Sci. Technol.*, 1989, **23(1)**, 115.

8 K. Tatsumi, S. Wada, H. Ichikawa, S. Y. Liu and J.-M. Bollag, *Wat. Sci. Tech.*, 1992, **26(9-11)**, 2157.

9 (a) S. Witayakran, L. Geldbaum and A. J. Ragauskas, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 10958; (b) S. Witayakran and A. J. Ragauskas, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, 358; (c) H. Leutbecher, J. Conrad, I. Klaiber and U. Beifuss, *Synlett*, 2005, 3126; (d) S. Hajdok, H. Leutbecher, G. Greiner, J. Conrad and U. Beifuss, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 5073.

10 (a) S. Witayakran and A. J. Ragauskas, *Green Chem.*, 2007, **9**, 475; (b) S. Witayakran, A. Zettili and A. J. Ragauskas, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 2983.

11 (a) K. Manda, E. Hammer, A. Mikolasch, T. Niedermeyer, J. Dec, A. D. Jones, A. J. Benesi, F. Schauer and J.-M. Bollag, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2005, **35(4-6)**, 86; (b) K. Manda, E. Hammer, A. Mikolasch, D. Gördes, K. Thurow and F. Schauer, *Amino Acids*, 2006, **31**, 409; (c) A. Mikolasch, T. H. J. Niedermeyer, M. Lalk, S. Witt, S. Seefeldt, E. Hammer, F. Schauer, M. Gesell, S. Hessel, W.-D. Jülich and U. Lindequist, *Chem. Pharm. Bull.*, 2006, **54(5)**, 632; (d) A. Mikolasch, T. H. J. Niedermeyer, M. Lalk, S. Witt, S. Seefeldt, E. Hammer, F. Schauer, M. Gesell-Salazar, S. Hessel, W.-D. Jülich and U. Lindequist, *Chem. Pharm. Bull.*, 2007, **55(3)**, 412; (e) A. Mikolasch, S. Hessel, M. Gesell-Salazar, H. Neumann, K. Manda, D. Gördes, E. Schmidt, K. Thurow, E. Hammer, U. Lindequist, M. Beller and F. Schauer, *Chem. Pharm. Bull.*, 2008a, **56(6)**, 781; (f) A. Mikolasch, A. Matthies, M. Lalk and F. Schauer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008b, **80(3)**, 389; (g) V. Hahn, A. Mikolasch, K. Manda, D. Gördes, K. Thurow and F. Schauer, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, **60**, 76.

12 A. Schäfer, M. Specht, A. Hetzheim, W. Francke and F. Schauer, *Tetrahedron*, 2001, **57**, 7693.

13 U. T. Bhalerao, C. Muralikrishna and B. R. Rani, *Tetrahedron*, 1994, **50(13)**, 4019.

14 (a) C. Eggert, U. Temp, J. F. D. Dean and K. E. L. Eriksson, *FEBS Lett.*, 1995, **376**, 202; (b) J. Osiadacz, A. J. H. Al-Adhami, D. Bajraszewska, P. Fischer and W. Peczynska-Czoch, *J. Biotechnol.*, 1999, **72(1-2)**, 141; (c) F. Bruyneel, E. Enaud, L. Billottet, S. Vanhulle and J. Marchand-Brynaert, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, **1**, 70.

15 H. Agematu, T. Tsuchida, K. Kominato, N. Shibamoto, T. Yoshioka, H. Nishida, R. Okamoto, T. Shin and S. Murao, *J. Antibiot.* 1993, **46(1)**, 141.

16 (a) M. Balakshin, C.-L. Chen, J. S. Gratzl, A. G. Kirkman and H. Jakob, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2001, **16**, 205-215; (b) P. Widsten and A. Kandelbauer, *Enzyme Microb. Technol.*, 2008, **42**, 293.

17 (a) R. Campos, A. Kandelbauer, K. H. Robra, A. Cavaco-Paulo and G. M. Gubitz, *J. Biotechnol.*, 2001, **89(2-3)**, 131; (b) D. Wesenberg, I. Kyriakides and S. N. Agathos, *Biotechnol. Adv.*, 2003, **22(1-2)**, 161; (c) A. Zille, B. Górnacka, A. Rehorek and A. Cavaco-Paulo, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71(11)**, 6711.

18 (a) C. G. Bauer, A. Kühn, N. Gajovic, O. Skorobogatko, P.-J. Holt, N. C. Bruce, A. Makower, C. R. Lowe and F. W. Scheller, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1999, **364**, 179; (b) B. A. Kuznetsov, G. P. Shumakovich, O. V. Koroleva and A. I. Yaropolov, *Biosens. Bioelectron.*, 2001, **16**, 73; (c) Y. Ferry and D. Leech, *Electroanalysis*, 2005, **17(2)**, 113; (d) J. Kochana, P. Nowak, A. Jarosz-Wilkolazka and M. Bieron, *Microchem. J.*, 2008, **89**, 171.

19 (a) P. Piacquadio, G. De Stefano, V. Sciancalepore, *Ital. J. Food Sci.*, 2002, **14(3)**, 291; (b) R. C. Minussi, G. M. Pastore and N. Durán, *Trends Food Sci. Technol.*, 2002, **13**, 205; (c) E. Selinheimo, K. Kruus, J. Buchert, A. Hopia and K. Autio, *J. Cereal Sci.*, 2006, **43(2)**, 152.

20 F. Xu, *Encyclopedia of bioprocess technolog.: ferm., biocatalysis, and bioseparation*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1999.

21 A. Mikolasch, E. Hammer, U. Jonas, K. Popowski, A. Stielow and F. Schauer, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 7589.

22 K. Tatsumi, A. Freyer, R. D. Minard and J.-M. Bollag, *Soil Biol. Biochem.*, 1994, **26(6)**, 735.

23 M. Hesse, H. Meier and B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; 6. Auflage, Thieme Verlag: Stuttgart, 2002.

24 T. Nakamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1960, **2(2)**, 111.

25 C. Astre, *Bull. Soc. Chim.*, 1897, **15(iii)**, 1025.

26 U. Kuckländer, P. Ulmer and G. Zerta, *Chem. Ber.*, 1989, **122**, 1493.

27 H. Ulrich and R. Richter, *Methoden der organischen Chemie, Chinone, Teil 1*. 4. Aufl. (Band VII/3a), Thieme-Verlag: Stuttgart, 1977.
28 G. Kaupp and M. R. Naimi-Jamal, *Eur. J. Org. Chem.*, 2002, **8**, 1368.
29 R. F. Fandy, H. H. Abbas, A. S. Al-Hussaini and A. S. Hammam, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2001, **48(4)**, 795.
30 (a) S. J. Childress and M. I. Gluckman, *J. Pharm. Sci.*, 1964, **53(6)**, 577; (b) H. P. Goodkin and J. Kapur, *Epilepsia*, 2009, **50(9)**, 2011.
31 T. A. Andreyanova, A. S. Sokolova and T. S. Safonova, *Pharm. Chem. J.*, 1998, **32(7)**, 352.
32 R. Kumar and Y. C. Joshi, *J. Chem. Sci.*, 2009, **121(4)**, 497.
33 K. Görlitzer, C. Wilpert, H. Rübsamen-Waigmann, H. Suhartono, L. Wang and A. Immelmann, *Arch. Pharm.*, 1995, **328**, 247.
34 (a) M. R. Stillings, S. Freeman, P. L. Myers, M. J. Readhead, A. P. Welbourn, M. J. Rance and D. C. Atkinson, *J. Med. Chem.*, 1985, **28**, 225; (b) S. Seto and J. Asano, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, **15**, 5083.
35 U. Jonas, E. Hammer, F. Schauer and J.-M. Bollag, *Biodegradation*, 1997, **8**, 321.
36 (a) C. Eggert, U. Temp and K. E. L. Eriksson, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62(4)**, 1151; (b) B. B. Feng, M. Voehler, L. Zhou, M. Passarelli, C. M. Harris, T. M.; Harris and M. P. Stone, *Biochemistry*, 1996, **35**, 7316.
37 R. M. Berka, P. Schneider, E. J. Golightly, S. H. Brown, M. Madden, K. M. Brown, T. Halkier, K. Mondorf and F. Xu, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 3151.
38 R. Bourbonnais and M. G. Paice, *FEBS Lett.*, 1990, **267**, 99.

This journal is © The Royal Society of Chemistry [year]

4.9 Derivatization of the azole 1-aminobenzotriazole using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila:* influence of methanol on the reaction and biological evaluation of the derivatives

Das siebte Manuskript dieser kumulativen Dissertation wurde in der Zeitschrift *Biotechnology and Applied Biochemistry* eingereicht.

Das Azol 1-Aminobenzotriazol wurde mit 2,5-Dihydroxybenzoesäureestern derivatisiert, wobei sowohl Di- als auch Oligomere nachgewiesen wurden. Die synthetisierten Dimere besaßen eine antimikrobielle und zytotoxische Wirkung, welche die Aktivität der zur Synthese eingesetzten Verbindungen überstieg.

Darüber hinaus wurde mit einem monophasischen Wasser (Puffer) / wasser-mischbaren organischen Lösungsmittelsystem der Einfluß von Methanol auf die Produktbildung untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass selbst bei einem Methanolgehalt von 25 % und 50 % die Produktausbeute jeweils noch 33 % und 5 % betrug.

Die Tatsache, dass die Laccase auch in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln aktiv ist, ermöglicht den Einsatz von Ausgangsstoffen, die schlecht wasserlöslich sind und erweitert somit die Anwendungsmöglichkeiten der Laccase für die Synthese neuer Substanzen.

Derivatization of the azole 1-aminobenzotriazole using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila*: influence of methanol on the reaction and biological evaluation of the derivatives

Veronika Hahn* [I], Annett Mikolasch*, Kristian Wende†, Hannelore Bartrow†, Ulrike Lindequist†, and Frieder Schauer*

* Institute of Microbiology, and † Institute of Pharmacy, Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald, F.-L.-Jahnstr. 15, 17487 Greifswald, Germany

[I] To whom correspondence should be addressed. e-mail: veronikahahn@gmx.at, tel.: ++49 3834 864225, fax: ++49 3834 864202

The laccases of *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila* are extracellular enzymes with high protein stability. They were used for the "one pot" synthesis of azole derivatives from 1-aminobenzotriazole together with the *para*-dihydroxylated laccase substrates 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester and 2,5-dihydroxybenzoic acid ethyl ester. The reactions yielded heteromolecular dimers (in yields of up to 34%). Methanol was used as co-solvent to determine the influence of solvent concentration on the course of reaction.
The resulting products were isolated, structurally characterized and tested for their antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities. The products showed low antimicrobial activity and cytotoxicity compared with commercial available standard compounds but exceeded that of the initial reactants used for the synthesis.
In addition to the synthesis of heteromolecular dimers, oligomers were formed and structurally characterized by LC/MS.

Key words amination; antimicrobial; biotransformation; cytostatic; laccase; solvent

Introduction

Laccases are oxidoreductases found mainly in white rot fungi. Under starvation conditions they are able to degrade lignin substrates to provide a source of nutrients [1]. However, laccases are not merely catabolic but can be used for the derivatization of substances such as azoles [2]. Certain azoles are medically important as antifungal agents and these include N-substituted imidazole or triazole derivatives [3]. Since the derivatization of basic structures of antimicrobial substances may yield products with enlarged biological activity or reduced side effects for medical applications, laccase-catalyzed derivatization may provide a promising route to new medically valuable structures. Indeed these enzymes have been applied before in this sort of approach for the derivatization of many bioactive compounds including penicillins [4], cephalosporines [5] and amino acids [6].

The variation of the reaction medium permits modulation of the enzyme selectivity, transformation rate and product pattern and may be particularly important in laccase-catalyzed reactions using poorly water soluble bioactive substances like steroids [7]. Laccases are very robust enzymes and laccase-catalyzed reactions have been carried out in a wide range of conditions including monophasic organic solvents [7b,8]; monophasic water (buffer) / water-miscible organic solvent [7a,9]; or biphasic systems composed of water (buffer) and water-immiscible organic solvents [7,9,10]. This stability allows for "medium engineering" and hence makes laccase more widely applicable for biotechnological purposes [11].

In this study we used methanol as co-solvent in a monophasic water (buffer) / water-miscible organic solvent system. The reactions of 1-aminobenzotriazole with 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester and 2,5-dihydroxybenzoic acid ethyl ester catalyzed by the laccases of *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila* were analyzed and the influence of methanol on the reaction course was assessed. The reaction products were isolated, structurally characterized and tested for their antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities. Antibacterial and antifungal properties were tested by the agar disc diffusion method, the MIC was determined with a modified method according to the EUCAST discussion document E.Dis 7.1 and cytotoxicity was evaluated using the human urinary bladder carcinoma cell line 5637 [ATCC HTB-9].

Materials and Methods

Synthesis and isolation of novel 1-aminobenzotriazole derivatives

Chemicals

1-Aminobenzotriazole, 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester and 2,5-dihydroxybenzoic acid ethyl ester were products of Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany).

Enzyme

Laccase was purified from *Pycnoporus cinnabarinus* SBUG-M 1044. The white rot fungus was isolated from an oak tree in northern Germany and is deposited at the strain collection of the Department of Biology of the University of Greifswald (SBUG).

Cultivation of *Pycnoporus cinnabarinus* SBUG-M 1044 and the crude preparation of laccase were reported previously [12]. This enzyme preparation contains only isoenzymes of laccase, but no other enzymes and was used in 20 mM sodium acetate buffer (SAB) pH 5.0 because of the pH optimum around pH 5.0 [12,13].

Laccase from *Myceliophthora thermophila* (expressed in genetically modified *Aspergillus* sp.) was obtained from Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). It was used in citrate phosphate buffer (CPB, 18 mM citrate, 165 mM phosphate) at its pH optimum of pH 7.0 [13b,14].

Measurement of laccase activity
The activity of laccase was determined spectrophotometrically at 420 nm with ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) as substrate [15] using the method described by Jonas et al. [12]. 1 U is defined as 1 $\mu mol \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$.

Experimental procedures
For analytical experiments and isolation of products 1-aminobenzotriazole (1 mM) and the respective dihydroxylated compound (1 mM) were incubated with 0.5 U laccase. In controls the respective compounds were incubated in SAB or CPB without laccase. The evaluation of the effect of different concentrations (2%, 10%, 25%, 50%, 75%, 98%) of the water-miscible co-solvent methanol was carried out using the previously described assay conditions. Compound **2a** is poorly water soluble and was made up as a 50 mM stock solution in methanol. The laccase stock was in the appropriate buffer preparation.
Reaction mixtures were incubated with agitation at 200 rpm at 23 °C in the dark.

For the isolation of products **3a** and **3b** a RP18 silicagel column (60 ml, 10 g adsorbent material, phenomenex, Strata, Germany) was used. After charging the column with 8 ml of the respective reaction mixture (448 ml reaction mixture of **1** and **2a**; 288 ml reaction mixture of **1** and **2b**) 50 mL for product **3a** and 80 ml for product **3b** of methanol/distilled water (30:70 v/v) was used to remove 1-aminobenzotriazole and undesired impurities. Elution of the yellow fraction was performed with 20 mL of 100% methanol for both products.

The isolated products were dried by lyophilization prior to mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

Analytical HPLC (high-pressure liquid chromatography)
For routine analysis, the reaction mixtures and isolated products were analyzed using an HPLC system LC-10AT VP (Shimadzu, Germany) consisting of a FCV-10AL VP pump, SPD-M10A VP diode array detector, and a SCL-10A VP control unit controlled by Class-VP version 6.12 SP5. The separation of the substances was achieved on an endcapped, 5-µm, LiChroCART® 125-4 RP18 column (Merck, Darmstadt, Germany) at a flow rate of 1 ml/min. A solvent system consisting of methanol (eluent A) and 0.1% phosphoric acid (eluent B), starting from an initial ratio of 10% A and 90% B and reaching 100% methanol within 14 min, was used.

Characterization of biotransformation products
The products **3a** and **3b** were characterized by MS using a Bruker-Daltonics micrOTOF instrument (Bremen, Germany; ionization method: electrospray ionization [ESI], dry and nebulizer gas: nitrogen, software: HyStar).
The NMR spectra were obtained at 600 MHz (^1H), (HSQC, HMBC) in deuterate solvents on a Bruker Avance 600 instrument (Rheinstetten, Germany).
The products **4** and **5** were characterized by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) using an Agilent Series 1100 HPLC system and an Agilent 1946C quadrupole mass spectrometer (Waldbronn, Germany; ionization method: electrospray ionization [ESI], dry and nebulizer gas: nitrogen). HPLC separation was performed on a LiChroCART® 125-4, LiChrosphere® 100 RP-18e column (Merck, Darmstadt, Germany) at 25 °C at a flow rate of 1 ml/min within a 14-min gradient from 10 to 100% methanol in 0.1% aqueous formic acid.

2-(Benzotriazol-1-ylamino)-3,6-dioxo-cyclohexa-1,4-dienecarboxylic acid methyl ester, $C_{14}H_{10}N_4O_4$ (3a)
Synthesis and isolation as described above. Yellow green solid. Yield 33.78% (40.10 mg). ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 2.66 (s, 3H, H-8), 6.73 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H-4), 6.84 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, H-5), 7.43 (dd, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-14), 7.57 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-15), 7.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-16), 8.04 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-13). ^{13}C-NMR: was not measured. HMBC correlations: was not measured. The ^{1}H assignment was carried out by the results of product **3b**. R_f (HPLC) 8.30 min, UV/VIS (MeOH) λ_{max} 203, 257, 407 nm. MS *m/z* AP-ESI: pos. ion mode $[M+H]^+$ 299.07614 (calculated 299.07748), $[M-CH_3O]^+$ 267.04959 (calculated 267.05126), $[M-COCH_3O]^+$ 239.04353 (calculated 239.05635).

2-(Benzotriazol-1-ylamino)-3,6-dioxo-cyclohexa-1,4-dienecarboxylic acid ethyl ester, $C_{15}H_{12}N_4O_4$ (3b)
Synthesis and isolation as described above. Yellow orange solid. Yield 31.86% (30.20 mg). ^{1}H-NMR (methanol-d_4) δ 0.75 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-9), 3.12 (m, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-8), 6.76 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H-4), 6.84 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, H-5), 7.48 (dd, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-15), 7.62 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-16), 7.70 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-17), 8.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-14). ^{13}C-NMR: 13.7 (C-9), 62.3 (C-8), 107.9 (C-1), 111.6 (C-17), 120.5 (C-14) 126.3 (C-15), 129.8 (C-16), 134.2 (C-17a), 134.7 (C-5), 140.2 (C-4) 145.4 (C-13a), 152.4 (C-2), 165.7 (C-7), 183.9 (C-3), 184.6 (C-6). HMBC correlations: H-4 (C-6), H-5 (C-3), H-8 (C-7, C-9), H-9 (C-8), H-14 (C-15, C-16, C-17, C-17a), H-15 (C13a, C16, C-17, C17a), H-16 (C-14, C-17a), H-17 (C-1, C-2, C-13a, C-14, C-15, C-16). R_f (HPLC) 9.12 min, UV/VIS (MeOH) λ_{max} 204, 257, 406 nm. MS *m/z* AP-ESI: pos. ion mode $[M+Na]^+$ 335.07929 (calculated 335.07507).

2,5-Bis-(benzotriazol-1-ylamino)-3,6,3',6'-tetraoxo-bicyclohexyl-1,4,1',4'-tetraene-4,4'-dicarboxylic acid diethyl ester, $C_{30}H_{22}N_8O_8$ (4)
R_f (HPLC) 10.09 min, UV/VIS (MeOH) λ_{max} 261 nm. LC/MS *m/z* AP-ESI: pos. ion mode $[M+H]^+$ 623.2, $[M+Na]^+$ 645.2.

2,5,5'-Tris-(benzotriazol-1-ylamino)-3,6,3',6'-tetraoxo-bicyclohexyl-1,4,1',4'-tetraene-4,4'-dicarboxylic acid diethyl ester, $C_{36}H_{26}N_{12}O_8$ (5)
R_f (HPLC) 11.33 min, UV/VIS (MeOH) λ_{max} 252, 318 nm. LC/MS *m/z* AP-ESI: pos. ion mode $[M+H]^+$ 755.3, $[M+Na]^+$ 777.2.

Biological activity testing of novel 1-aminobenzotriazole derivatives
EUCAST-test
A modified method according to the EUCAST discussion document E.Dis 7.1 [16] was used to determine the MIC (minimal inhibitory concentration) as described previously [17]. The yeast *Candida maltosa* SBUG 700 deposited at the strain collection of the Department of Biology of the University Greifswald (SBUG) was chosen as test organism.

Agar disc diffusion test
For the determination of antibacterial and antifungal activity of the newly isolated compounds the bacterial strains *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and the yeast *Candida maltosa* SBUG 700 were chosen for a disc diffusion test.
The agar disc diffusion test was performed according to the European Pharmacopeia [18] as described previously [17].

Cytotoxicity test
A neutral red uptake assay on human urinary bladder carcinoma cells 5637 [ATCC HTB-9] was used to determine the cytotoxicity of the products as described previously [17].

Results and Discussion

Laccase-catalyzed reaction of 1-aminobenzotriazole (**1**) with 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester (**2a**) or 2,5-dihydroxybenzoic acid ethyl ester (**2b**) resulted in each case in the formation of two products (**3a,b**, Figure 1).

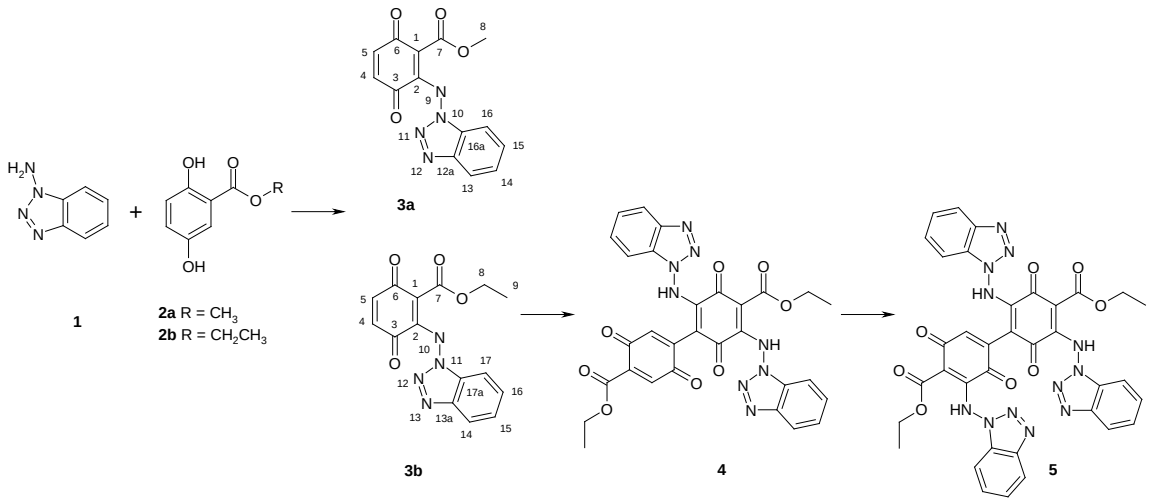


Figure 1. Laccase-catalyzed reaction of 1-aminobenzotriazole (**1**) with 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester (**2a**) and 2,5-dihydroxybenzoic acid ethyl ester (**2b**) for the synthesis of heteromolecular dimers (**3a,b**) and oligomers (**4**, **5**).

These products are composed of one molecule of **1** and one molecule of the respective laccase substrate **2a** or **2b**. The structure of these heteromolecular dimers, determined by MS and NMR, consists of 1-aminobenzotriazole and *para*-quinone moieties as described for other aminations [6b,19]. The reaction mechanism involves a nucleophilic attack of the free amino group of the azole on **2a** or **2b** respectively in the *ortho*-position of the ester groups. The amination in the *ortho*-position has been described, amongst others, for aminations of amino acids and *para*-dihydroxylated compounds with carbonyl groups [6a,19b]. The laccase-catalyzed synthesis of a heteromolecular dimer with 1*H*-benzotriazole and a substituted monophenol (3-(3-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) propionic acid methyl ester) has been described by Schroeder et al. [20]. In contrast to our results a product yield of only 5% was achieved after optimization of the reaction and the product was only characterized by MS. Thus the free amino group of **1** and the readily oxidizable *para*-dihydroxylated substances (**2a,b**) are ideal reactants for the laccase-catalyzed synthesis of heteromolecular dimers giving yields of more than 30%. In addition to these heteromolecular dimers **3a** and **3b**, oligomers (**4** and **5**) were formed (Figure 1). The products **4** and **5** were structurally characterized by LC/MS, as example for the reaction of **1** and **2b**.
The product yield was dependent on a number of factors such as the source of the laccase, the buffer pH, as well as on the amount of co-solvent present.
The highest product yield was achieved using laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. A 61% higher concentration of product **3a** was produced with the laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* (sodium acetate buffer (SAB) pH 5) in comparison with the reaction using *Myceliophthora thermophila* laccase (citrate phosphate buffer (CPB) pH 7). This is in line

with with previous results showing that product formation in reactions with 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives is typically higher with laccase of *P. cinnabarinus* while product formation with 1,4-hydroquinone derivatives is higher when the laccase of *M. thermophila* is used [19b].
The reactions of either of the laccases varied in a similar way as the content of co-solvent in the reaction mixtures was changed (data for *Myceliophthora thermophila* laccase not shown). To determine the influence of solvent concentration on the laccase-catalyzed reaction different methanol contents in 20 mM sodium acetate buffer (SAB) were tested. The consumption of reactants (**1**, **2a**) and as a result the formation of product **3a** decreased with increasing methanol content (Figure 2).

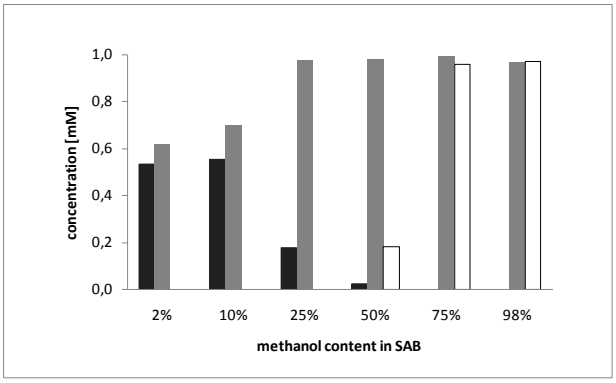


Figure 2. Concentration of product **3a** (black columns) and of reactants 1-aminobenzotriazole (**1**, grey columns) and 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester (**2a**, white columns) in reaction mixtures containing different concentrations of methanol in sodium acetate buffer (SAB) using *Pycnoporus cinnabarinus* laccase. Incubation time was 2 hours.

The influence of 10% methanol on product yield was negligible whereas with 25% and 50% of the co-solvent, 33% and 5% of product **3a** was formed respectively. A methanol content of 75% and 98% resulted in neither product formation nor consumption of the reactants. Thus the type of product formed and the type of solvent used can be crucial. The products we obtained are heteromolecular dimers whereas Osiadacz et al. [21] described the formation of actinocin, which is formed during oxidation of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid. The yield of actinocin was 72% in the course of a reaction with 60% acetonitrile in 0.1 M phosphate buffer. The type of solvent may not only influence the yield but also the ratio of products formed and this may be used to maximize the yield of the desired product. Thus in the laccase-catalyzed synthesis of two homomolecular dimers of totarol which was described by Ncanana et al. [9], the reaction with acetone as co-solvent resulted in an amplified formation of product **one** and a ratio of 25.8 (product **one :** product **two**) compared with the reaction using methanol which yielded a ratio of 8.2 [9].

The reactants **1**, **2a,b** and products **3a,b** were tested for their antimicrobial and cytotoxic activities using three different test systems [17]. Antibacterial and antifungal properties were tested by the agar disc diffusion method, the MIC was determined with a modified method according to the EUCAST discussion document E.Dis 7.1 and cytotoxicity was evaluated by neutral red uptake assay using the human urinary bladder carcinoma cell line 5637 [ATCC HTB-9]. Though both products had only low activity compared with the standard compounds used, both the antimicrobial activity and the cytotoxicity exceeded the properties of the reactants (Table 1).

Table 1. Results of the antimicrobial screening of the agar diffusion test (test concentration: 1000 nmol), MIC determination by a modified method according to the EUCAST (test concentration: maximum 1000 µM) and cytotoxic activity tests on human urinary bladder carcinoma cells 5637 [ATCC HTB-9] (test concentration: maximum 100 µM) for products **3a,b**, reactants **1**, **2a,b**, as well as for standard compounds.

	agar diffusion test [a]					MIC determination *Candida maltosa*				cytotoxic activity test
	B. s.	*S. a.*	*E. c.*	*P. a.*	*C. m.*	MIC [µg/ml]	[µM]	MIC_{50} [µg/ml]	[µM]	IC_{50} [µM]
1	i	i	i	i	i	>134.14	>1000			-
2a	i	i	i	i	7*	>168.15	>1000			-
2b	i	i	i	i	10*	>182.17	>1000	182.17	1000	-
3a	10	9	i	i	10*	>298.26	>1000	237.09	794.91	33
3b	10	13	i	i	12	>312.29	>1000	78.79	252.30	18
amphotericin B	i	i	i	i	26	0.63	0.68	0.31	0.34	8
fluconazole	i	i	i	i	44	1.91	6.25	0.24	0.78	-
ampicillin	38	36	29	i	i	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	-
gentamicine	32	31	25	30	i	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	-
etoposide	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	0.32

[a] Inhibition zones are given in diameter [mm] including the diameter of the paper disc (6 mm); *B. s. Bacillus subtilis* ATCC 6051; *C. m. Candida maltosa* SBUG 700; *E. c. Escherichia coli* ATCC 11229; *P. a. Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *S. a. Staphylococcus aureus* ATCC 6538; i = inactive (no inhibition zone); * no clear inhibition zones but less activity is possible; - not cytotoxic; n. t. not tested

In particular, the products showed an inhibitory effect on the gram positive bacteria *Bacillus subtilis* ATCC 6051 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 whereas the reactants were inactive. Thus the laccase-catalyzed reaction can be used for the synthesis of compounds with activities different from those of the reactants used for the synthesis.

Conclusion

The laccase-catalyzed derivatization of azoles leads to products with stronger and / or additional biological activities than the reactants used for the synthesis and may thus enlarge the application range of the laccase-catalyzed process. The fact that the enzyme still functions in the presence of organic solvents allows the use of laccase with reactants that are poorly water soluble. This broadens the range of possible laccase-catalyzed synthetic applications.

Acknowledgements

Financial support through a scholarship from the government of Mecklenburg-Vorpommern for Veronika Hahn is gratefully acknowledged. We thank Michael Lalk (Institute of Pharmacy, University of Greifswald) and Dirk Gördes (Center for Life Science Automation Celisca, Rostock) for providing MS and NMR data. Robert Jack (Institute of Immunology, University of Greifswald) is gratefully acknowledged for help in preparing the manuscript.

List of abbreviations

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
ATCC	American Type Culture Collection
CPB	citrate phosphate buffer
DMSO	dimethyl sulfoxide
HPLC	high-pressure liquid chromatography
IC_{50}	inhibitory concentration, 50%
LC/MS	liquid chromatography/mass spectrometry
MeOH	methanol
MIC	minimal inhibitory concentration
MOPS	3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid

MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAB	sodium acetate buffer
SBUG	strain collection of the Department of Biology of the University Greifswald
UV/VIS	Ultraviolett/Visible

References

1 Baldrian, P. (2006) FEMS Microbiol. Rev. **30,** 215-242

2 a) Bhalerao, U. T., Muralikrishna, C. and Rani, B. R. (1994) Tetrahedron **50,** 4019-4024; b) Schäfer, A., Specht, M., Hetzheim, A., Francke, W. and Schauer, F. (2001) Tetrahedron **57,** 7693-7699

3 a) Vanden Bossche, H., Willemsens, G., Marichal, P. Cools, W., Lauwers, W. in Trinci, A. P. J. and Ryley, J. F. (Ed.) Mode of action of antifungal agents. Cambridge Univ. Press; 321-341, 1984; b) Sheehan, D. J., Hitchcock, C. A. and Sibley, C. M. (1999) Clin. Microbiol. Rev. **12,** 40-79; c) Kale, P. and Johnson, L. B. (2005) Drugs Today (Barc.) **41,** 91-105

4 a) Agematu, H., Tsuchida, T., Kominato, K., Shibamoto, N., Yoshioka, T., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T. and Murao, S. (1993) J. Antibiotics **46,** 141-148; b) Mikolasch, A., Niedermeyer, T. H. J., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E., Schauer, F., Gesell, M., Hessel, S., Jülich, W.-D. and Lindequist, U. (2006) Chem. Pharm. Bull. **54,** 632-638

5 a) Agematu, H., Kominato, K., Shibamoto, N., Yoshioka, T., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T. and Murao, S. (1993) Biosci. Biotech. Biochem. **8,** 1387-1388; b) Mikolasch, A., Niedermeyer, T. H. J., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E., Schauer, F., Salazar M., Hessel S., Jülich W.-D. and Lindequist U. (2007) Chem. Pharm. Bull. **55,** 412-416

6 a) Manda, K., Hammer, E., Mikolasch, A., Gördes, D., Thurow, K. and Schauer, F. (2006) Amino Acids **31,** 409-419; b) Hahn, V., Mikolasch, A., Manda, K., Gördes, D., Thurow, K. and Schauer, F. (2009) Amino Acids **37,** 315-321

7 a) Lugaro, G., Carrea, G., Cremonesi, P., Casellato, M. M. and Antonini, E. (1973) Arch. Biochem. Biophys. **159,** 1-6; b) Nicotra, S., Intra, A., Ottolina, G., Riva, S. and Danieli, B. (2004) Tetrahedron: Asymmetry **15,** 2927-2931

8 Nicotra, S., Cramarossa, M. R., Mucci, A., Pagnoni, U. M., Riva, S. and Forti, L. (2004) Tetrahedron **60,** 595-600

9 Ncanana, S., Baratto, L., Roncaglia, L., Riva, S. and Burton, S. G. (2007) Adv. Synth. Catal. **349,** 1507-1513

10 a) Agematu, H., Tsuchida, T., Kominato, K., Shibamoto, N., Yoshioka, T., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T. and Murao, S. (1993) J. Antibiot. **46,** 141-148; b) Ponzoni, C., Beneventi, E., Cramarossa, M. R., Raimondi, S., Trevisi, G., Pagnoni, U. M., Riva, S. and Forti, L. (2007) Adv. Synth. Catal. **349,** 1497-1506

11 a) Ottolina, G., Gianinetti, F., Riva, S. and Carrea, G. (1994) J. Chem. Soc. Chem. Commun. **4,** 535-536; b) Wescott, C. R. and Klibanov, A. M. (1994) Biochim. Biophys. Acta **1206,** 1-9; c) Carrea, G. and Riva, S. (2000) Angew. Chem. Int. Ed. **39,** 2226-2254

12 Jonas, U., Hammer, E., Schauer, F. and Bollag, J. M. (1997) Biodegradation **8,** 321–328

13 a) Eggert, C., Temp, U. and Eriksson, K. E. L. (1996) Appl. Environ. Microbiol. **62,** 1151-1158; b) Feng, B. B., Voehler, M., Zhou, L., Passarelli, M., Harris, C. M., Harris, T. M. and Stone, M. P. (1996) Biochemistry **35,** 7316-7329

14 Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., Halkier, T., Mondorf, K. and Xu, F. (1997) Appl. Environ. Microbiol. **63,** 3151
15 Bourbonnais, R. and Paice, M. G. (1990) FEBS Lett. **267,** 99-102
16 Rodríguez-Tudela, J. L., Barchiesi, F., Bille, J., Chryssanthou, E., Cuenca-Estrella, M., Denning, D., Donnelly, J. P., Dupont, B., Fegeler, W., Moore, C., Richardson, M. and Verweij, P. E. (2002) Clin. Microbiol. Infect. Dis. **9,** 1-8
17 Hahn, V., Mikolasch, A., Wende, K., Bartrow, H., Lindequist, U. and Schauer, F. (2009) Biotechnol. Appl. Biochem. DOI: 10.1042/BA20090219
18 a) "Mikrobiologische Wertbestimmung von Antibiotika, Diffusionsmethode," in European Pharmacopeia (Europäisches Arzneibuch), 6. Ausgabe, Deutscher–Apotheker–Verlag, Stuttgart; Kap. 2.7.2., 1997; b) "Mikrobiologische Wertbestimmung von Antibiotika, Diffusionsmethode," in Kommentar zum Europäischen Arzneibuch, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Kap. 2.7.2., 2008
19 a) Niedermeyer, T. H. J., Mikolasch, A. and Lalk, M. (2005) J. Org. Chem. **70,** 2002-2008; b) Hahn, V., Mikolasch, A., Manda, K., Gördes, D., Thurow, K. and Schauer F. (2009) J. Mol. Catal. B-Enzym. **60,** 76-81
20 Schroeder, M., Pereira, L., Couto, S. R., Erlacher, A., Schoening, K.-U., Cavaco-Paulo, A. and Guebitz, G. M. (2007) Enzyme Microbiol. Technol. **40,** 1748-1752
21 Osiadacz, J., Al-Adhami, A. J. H., Bajraszewska, D., Fischer, P. and Peczynska-Czoch, W. (1999) J. Biotechnol. **72,** 141-149

4.10 New enzymatic principle for the synthesis of novel antimicrobials

Ein Teil der Ergebnisse des eben vorgestellten Manuskripts soll auf dem vom 10.-13.04.2010 stattfindenden 20. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) mit einem Poster vorgestellt werden. Der eingereichte Abstract ist auf den folgenden Seiten der Dissertation beigefügt.

New enzymatic principle for the synthesis of novel antimicrobials

Veronika Hahn, Annett Mikolasch and Frieder Schauer

Objectives: Still today the treatment of choice for *Candida* infections are azoles [1]. However, emerging resistance, decreasing susceptibility and a national cost of nosocomial candidemia of over $200 million per year [2] all increase the need for new antifungals. For this purpose we developed a new process for the synthesis of antimicrobials using fungal laccase as biocatalyst. Laccases [E.C. 1.10.3.2] are polyphenoloxidases which oxidize hydroxylated aromatic compounds. The resulting radicals can undergo various non-enzymatic reactions. A heteromolecular coupling reaction was used successfully for the derivatization of morpholines [3] and some of the products had antimicrobial and cytotoxic activities which were higher than the activities of the reactants. We therefore then applied the process to the synthesis of new azoles.

Methods: The laccase was obtained from the ligninolytic fungus *Pycnoporus cinnabarinus* (Pcl). The reaction mixtures were analyzed using an HPLC system with DAD and a RP 18 column. For mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy the products were isolated by solid phase extraction and dried by lyophilization. The antifungal susceptibility testing was performed with a modified method of the EUCAST discussion document E.Dis. 7.1 [3].

Results: 1-Aminobenzotriazole (**1**) was used as model substance for the derivatization by Pcl. During laccase-catalyzed transformation of the *para*-dihydroxylated substrates 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester (**2a**) and 2,5-dihydroxybenzoic acid ethyl ester (**2b**) into quinones a nucleophilic attack of the azole occurs, resulting in C-N-coupled heteromolecular products **3a** and **3b** respectively (yields up to 34%). Their structures were confirmed by MS and NMR analysis. The antifungal activity of **3a,b** against *Candida* species exceeded that of the reactants (Tab. 1).

Tab. 1. Results of the antifungal screening of MIC determination by a modified method according to the EUCAST (test concentration: maximum 1000 µM, test organism: *Candida maltosa*) for products **3a,b**, reactants **1**, **2a,b**.

	MIC		**MIC_{50}**	
	[µg/ml]	**[µM]**	**[µg/ml]**	**[µM]**
1	>134.14 [a]	>1000		
2a	>168.15	>1000		
2b	>182.17	>1000	182.17	1000
3a	>298.26	>1000	237.09	794.91
3b	>312.29	>1000	78.79	252.30

[a] The MIC was higher than the tested concentration of 1000 µM.

Conclusions: This novel synthesis principle makes it possible to produce compounds with antimicrobial activity. Our future aim is to amplify this effect by laccase-catalyzed derivatization of a compound which already shows high biological activity with another bioactive compound to synthesize products with increased activity, improved bioavailability and reduced side effects. In particular the laccase-catalyzed synthesis of substances which are not available by conventional chemical methods permits the creation of completely new biological active agents.

Keywords: azole, laccase, antifungal

References:

[1] Sable CA, Strohmaier KM, Chodakewitz JA. Advances in antifungal therapy. Annu Rev Med 2008; 59: 361-379.

[2] Rentz AM, Halpern MT, Bowden R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. Clin Infect Dis 1998; 27: 781-788.

[3] Hahn V, Mikolasch A, Wende K, Bartrow H, Lindequist U, Schauer F. Synthesis of model morpholine derivatives with biological activities by laccase-catalyzed reactions. Biotechnol Appl Biochem 2009; DOI: 10.1042/BA20090219.

5 Unveröffentlichte Ergebnisse

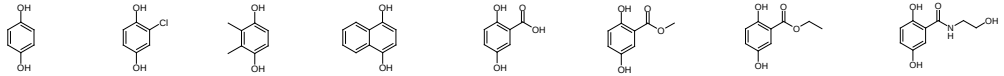
Im letzten Teil dieser Arbeit werden bisher unveröffentlichte Ergebnisse vorgestellt. Teilweise werden Ergebnisse der bereits publizierten Arbeiten zum Vergleich zitiert und für vergleichende Darstellungen herangezogen.
Der Schwerpunkt in diesem Teil der Dissertation liegt auf den Reaktionen zur Derivatisierung der Wirkstoffgrundstrukturen von Azolen und Morpholinen und der medizinisch genutzten Verbindung 5-Flucytosin mit *para*-dihydroxylierten aromatischen Substanzen. Die laccase-katalysierte Reaktion wurde genutzt, um neue Verbindungen zu synthetisieren. Dabei wurde sowohl die Synthese neuer antimikrobiell wirksamer Substanzen als auch die Steigerung der bereits vorhandenen Wirkung im Falle von 5-Flucytosin mit Hilfe der laccasevermittelten Derivatisierung angestrebt.

5.1 Strukturelle Charakterisierung der mittels Laccase synthetisierten Produkte

Im Rahmen der Dissertation wurden zahlreiche Aminoverbindungen mit mindestens einer freien und/oder ringgebundenen Aminogruppe ausgewählt. Als Laccasesubstrate dienten 1,4-Hydrochinon und 2,5-Dihydroxybenzoesäure, sowie deren jeweilige Derivate. In Abhängigkeit von den eingesetzten Reaktionspartnern unterschied sich die Anzahl und Konzentration der gebildeten heteromolekularen Kopplungsprodukte. Eine Darstellung sämtlicher Kopplungsreaktionen dieses Typs ist in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1 Übersicht zu den durchgeführten heteromolekularen Kopplungsreaktionen von Azolen, Morpholinen sowie 5-Flucytosin mit *para*-dihydroxylierten aromatischen Laccasesubstraten (5:1 mM) mittels Laccasen von *Myceliophthora thermophila* und *Pycnoporus cinnabarinus* sowie eine Einschätzung der Anzahl und Ausbeute der gebildeten hetermolekularen Kopplungsprodukte bei einer Inkubationszeit von 24 h (Auswertung bei 254 nm, Injektionsvolumen 20 µl) [a]

Laccasesubstrate



Aminopartner	1,4-Hydro-chinon		Chlor-1,4-hydro-chinon		2,3-Dimethyl-1,4-hydro-chinon		1,4-Dihydroxy-naphthalin		2,5-Dihydroxy-benzoesäure		2,5-Dihydroxy-benzoesäure-methylester		2,5-Dihydroxy-benzoesäure-ethylester		2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid	
	*Mt*L	*Pc*L	*Mt*L	*Pc*L	*Mt*L	*Pc*L	*Mt*L	*Pc*L	*Mt*L	*Pc*L	*Mt*L	*Pc*L	*Mt*L	*Pc*L	*Mt*L	*Pc*L
2-Amino-benzimidazol	++	++	+	+	+	-	-	-	++	++	++	+++	++	++	+	+
5-Aminoimidazol-4-carboxamid	(+)	+	+	+	-	-	+	(+)	++[1)]	+++[1)]	+++[1)]	+++[1)]	++[1)]	+++[1)]	+++[1)]	+++[1)]
1-(3-Aminopropyl)-imidazol	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+	+	++	++	+	++	+	+	(+)
2-Hydroxy-benzimidazol	++	+	+	-	+	-	-	-	++	-	-	-	+	(+)	-	-
2-(Hydroxymethyl)-benzimidazol	+	+	+	+	+	-	-	-	++	-	++	-	+	+	-	-
1-Aminobenzotriazol	++	+	++	++	+	-	+	+	-	++	+++	+++[2)]	+++	+++[2)]	++	+++
3-Amino-1,2,4-triazol	+	+	+	+	-	-	+	-	++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
Morpholin	+++[3)]	+++[3)]	+++	+++	+++[3)]	++[3)]	++[3)]	+[3)]	+	+	+	+	++	+	+++[3)]	++[3)]
4-(2-Aminoethyl)-morpholin	++	++	+	+	+	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4-Morpholinoanilin	++	+++	+	+++	+++	+	++	+	+++	++	+++[3)]	+++[3)]	+++[3)]	+++[3)]	+++	+++
5-Flucytosin	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	++	+	++	++	++

[a] +++ einzelne heteromolekulare Kopplungsprodukte und sehr hohe Konzentration an Produkten (> 5.000.000 mAU)
++ mittlere Anzahl an heteromolekularen Kopplungsprodukten und hohe Konzentration einzelner Produkte (1.000.000-5.000.000 mAU)
+ sehr geringe Anzahl an heteromolekularen Kopplungsprodukten und geringe Konzentration (40.000-1000.000 mAU)
(+) sehr geringe Konzentration weniger heteromolekularer Kopplungsprodukte (< 40.000 mAU)
- keine heteromolekularen Kopplungsprodukte

1) Hahn et al. 2009a
2) Hahn et al. 2009e
3) Hahn et al. 2009d

Für die heteromolekulare Kopplung waren Azole und Morpholine substituiert mit einer freien Aminogruppe direkt am aromatischen System (2-Aminobenzimidazol, 5-Aminoimidazol-4-carboxamid, 1-Aminobenzotriazol, 3-Amino-1,2,4-triazol, 4-Morpholinoanilin) besser geeignet als Verbindungen mit einer Aminoalkylgruppe (1-(3-Aminopropyl)-imidazol, 4-(2-Aminoethyl)-morpholin) oder Substanzen mit einer im Ring gebundenen Aminogruppe (2-Hydroxy-benzimidazol, 2-(Hydroxymethyl)-benzimidazol). Im Gegensatz zu den letztgenannten beiden Azolen wurde mit Morpholin, das ebenfalls eine ringgebundene Aminogruppe besitzt, jedoch keine aromatische Struktur aufweist z.T. eine Vielzahl von Produkten in hoher Konzentration nachgewiesen. Das bereits in der Medizin eingesetzte 5-Flucytosin war trotz seiner freien Aminogruppe kein effektiver Reaktionspartner. Die Produktbildung war sowohl von den Aminopartnern als auch von den eingesetzten Laccasesubstraten abhängig. Die Laccasesubstrate können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe umfasst 1,4-Hydrochinon und dessen substituierte Derivate (Chlor-1,4-hydrochinon, 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon, 1,4-Dihydroxynaphthalin); zur zweiten Gruppe gehören 2,5-Dihydroxybenzoe-säure bzw. deren Derivate (2,5-Dihydroxybenzoesäuremethylester, 2,5-Dihydroxy-benzoesäureethylester, 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid). Entsprechend dieser Unterteilung ergaben sich Unterschiede in der Produktanzahl und Produktausbeute. So reagierten die Azole bevorzugt mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure bzw. deren Derivaten während die Produktbildung mit 1,4-Hydrochinon bzw. dessen Derivaten im Vergleich dazu geringer war. Sehr geringe oder keine Produktbildung wurde mit Chlor- und Methylsubstitution bzw. mit dem benzoanellierten System nachgewiesen. Auch bei den Reaktionen mit 5-Flucytosin konnten mit den eingesetzen 1,4-Hydrochinonen nur in einem Fall (Reaktion: 5-Flucytosin und Chlor-1,4-hydrochinon, Laccase aus *Myceliophthora thermophila*) die Bildung von heteromolekularen Kopplungsprodukten nachgewiesen werden, während bei den Reaktionen mit der 2,5-Dihydroxybenzoesäure bzw. deren Derivaten in allen Fällen heteromolekulare Produkte gebildet wurden. Diese Unterscheidung der Produktbildung in Abhängigkeit von den beiden Laccasesubstratgruppen war bei den Reaktionen mit den verschiedenen Morpholinen in leichter Form lediglich beim 4-(2-Aminoethyl)-morpholin und 4-Morpholinoanilin erkennbar. Das Morpholin selbst bildete auch hier eine Ausnahme, indem v.a. mit dem 1,4-Hydrochinon und den substituierten 1,4-Hydrochinonen viele Produkte in hoher Konzentration gebildet wurden. Neben dem Laccasesubstrat und dem Reaktionspartner ist die Produktbildung auch von der Laccase (bzw. dem genutzten Puffer) abhängig. Ein Unterschied hinsichtlich der Effektivität der Reaktion in Abhängigkeit von der eingesetzten Laccase (bzw. dem genutzten Puffer) konnte nicht in allen Fällen festgestellt werden. Obwohl bei Reaktionen von Aminen mit *para*-dihydroxylierten Aromaten gezeigt wurde, dass sich die Laccase von *Myceliophthora thermophila* besonders für die Reaktionen mit 1,4-Hydrochinon bzw. den substituierten

1,4-Hydrochinonen eignet, während der Einsatz der Laccase von *Pycnoporus cinnabarinus* v.a. bei Reaktionen mit 2,5-Dihydroxybenzoesäurederivaten zu hohen Produktausbeuten führt (Niedermeyer et al. 2005, Hahn et al. 2009c), konnte das nicht immer bestätigt werden. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Struktur der Aminopartner. Eine weitere Erklärung (beispielsweise bei den Reaktionen mit 5-Aminoimidazol-4-carboxamid) wäre ein anderer Reaktionsmechanismus, der nicht wie sonst üblich in der Bildung von Di- und Trimeren resultiert sondern in heterozyklischen Verbindungen (Hahn et al. 2009a).

Die bei den durchgeführten Reaktionen gebildeten Produkte wurden, wenn möglich gereinigt, strukturell charakterisiert und anschließend hinsichtlich ihrer antibakteriellen, antifungalen und zytotoxischen Aktivität getestet. Die strukturelle Charakterisierung der einzelnen Verbindungen erfolgte mittels MS- und bei den meisten Produkten zusätzlich mit Hilfe von NMR-Analysen.

Ein Teil der Ergebnisse zu den Reaktionen der einzelnen Morpholine als Aminopartner für die heteromolekulare Kopplung mit *para*-dihydroxylierten Verbindungen wurde bereits publiziert (Hahn et al. 2009d). Einige zusätzliche Aspekte dieser Reaktionen sind für das Verständnis des Reaktionsmechanismus wichtig.

Die Reaktion der Morpholine erfolgt gemäß dem allgemeinen Schema einer nukleophilen Addition nach vorheriger Radikalisierung des Laccasesubstrates (Xu 1999, Claus 2003, Niedermeyer et al. 2005). Im Falle der Reaktion von Morpholin mit 1,4-Hydrochinon entstand dabei ein chinoides heteromolekulares Dimer (M+HC/P1, Abb. 23), das sofort unter Bildung von Trimeren (M+HC/P2, M+HC/P3) weiterreagierte, wobei das Trimer M+HC/P2 bestehend aus einem Molekül 1,4-Benzochinon und zwei Molekülen Morpholin das Hauptprodukt darstellte (strukturanalytische Daten zu den Produkten siehe Tab. 3, S.137, 138).

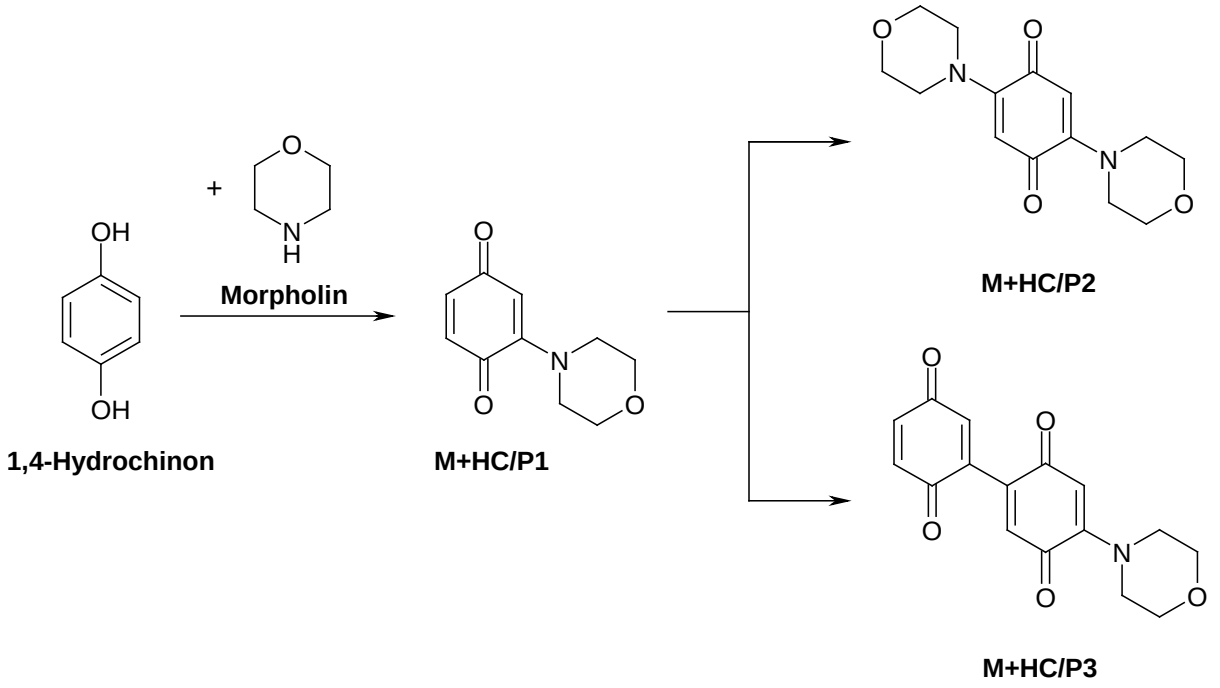


Abb. 23 Bildung der heteromolekularen Produkte M+HC/P1 bis M+HC/P3 bei der laccasekatalysierten Reaktion von Morpholin mit 1,4-Hydrochinon

Die Bindung eines zweiten Moleküls Morpholin in *para*-Stellung zur ersten Aminierung bei M+HC/P1 wurde mittels NMR-Analysen für das Produkt M+HC/P2 bestätigt, sodass auch bei M+HC/P3 von einer Bindung in *para*-Position ausgegangen werden kann. Natürlich wäre auch die *ortho*-Position für die zweite Bindung denkbar, aber diese wäre höchstwahrscheinlich bereits aufgrund der sterischen Abschirmung durch den ersten Aminosubstituenten für eine zweite Substitution nicht zugänglich. Eine Untersuchung der Stabilisierungsenergien von aminierten *p*-Benzochinonen ergab, dass das 2,5-Isomer das stabilste unter den Diaminobenzochinonen ist. Darauf beruht wahrscheinlich die bevorzugte Substitution in *para*-Position (Yamaoka und Nagakura, 1971). Finley (1988) und Berger et al. (1988) beschrieben ebenfalls die *para*-Position als Ort für die zweite Aminierung. Entsprechend der Reaktion des Morpholins mit 1,4-Hydrochinon erfolgte auch bei der Reaktion mit Chlor-1,4-hydrochinon zuerst eine Dimerbildung. Das entstandene chlorierte Dimer stellt vermutlich ein Isomerengemisch aus M+CHC/P3a und M+CHC/P3b dar (Abb. 24), wie es ebenfalls von Mikolasch et al. (2008b) für die Reaktion von 4-Aminobenzoesäure und Chlor-1,4-hydrochinon beschrieben wurde. Die Bildung von Isomeren erfolgte auch bei der Reaktion von Morpholin und Methyl-1,4-hydrochinon (Hahn et al. 2009d). Neben dem Isomerengemisch konnten, bei der Reaktion von Morpholin und Chlor-1,4-hydrochinon, auch dechlorierte Produkte M+CHC/P1 und M+CHC/P2 nachgewiesen werden, die den Produkten aus Morpholin und 1,4-Hydrochinon M+HC/P1

und M+HC/P2 in Retentionszeiten, UV/Vis-Spektren und massenspektroskopischen Daten entsprachen. Die Bildung der dechlorierten Produkte stellt eine Substitution im Zuge der Bindungsknüpfung und keine Abspaltung dar (Dec et al. 2003). Das Endprodukt der Reaktion war das heteromolekulare Trimer M+CHC/P2 aus einem Molekül 1,4-Benzochinon und zwei Molekülen Morpholin, das nach 24 h in einer hohen Konzentration detektiert wurde. Ein entsprechendes chloriertes Produkt konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden bei der von Chapyshev und Ibata (1996) chemisch durchgeführten Reaktion von 2,5-Dichlor-1,4-benzochinon und Morpholin sowohl das chlorierte als auch das unchlorierte Trimer beschrieben, wobei die Aminierung in beiden Fällen in *para*-Position erfolgte. Die bevorzugte *para*-Aminierung mit gleichzeitiger Debromierung wurde auch von Kallmayer und Fritzen (1987) nachgewiesen. Unter Einbeziehung der hohen Konzentration der gebildeten Produkte M+CHC/P3 und M+CHC/P2 kann bei der Reaktion von Morpholin mit Chlor-1,4-hydrochinon davon ausgegangen werden, dass das dimere Produkt M+CHC/P3a bevorzugt gebildet wird, welches dann unter Bindung eines weiteren Moleküls Morpholin in *para*-Stellung zur ersten Aminierung und daraus resultierender Substitution des Chlorid-Ions zum M+CHC/P2 reagiert (strukturanalytische Daten zu den Produkten siehe Tab. 3, S. 137).

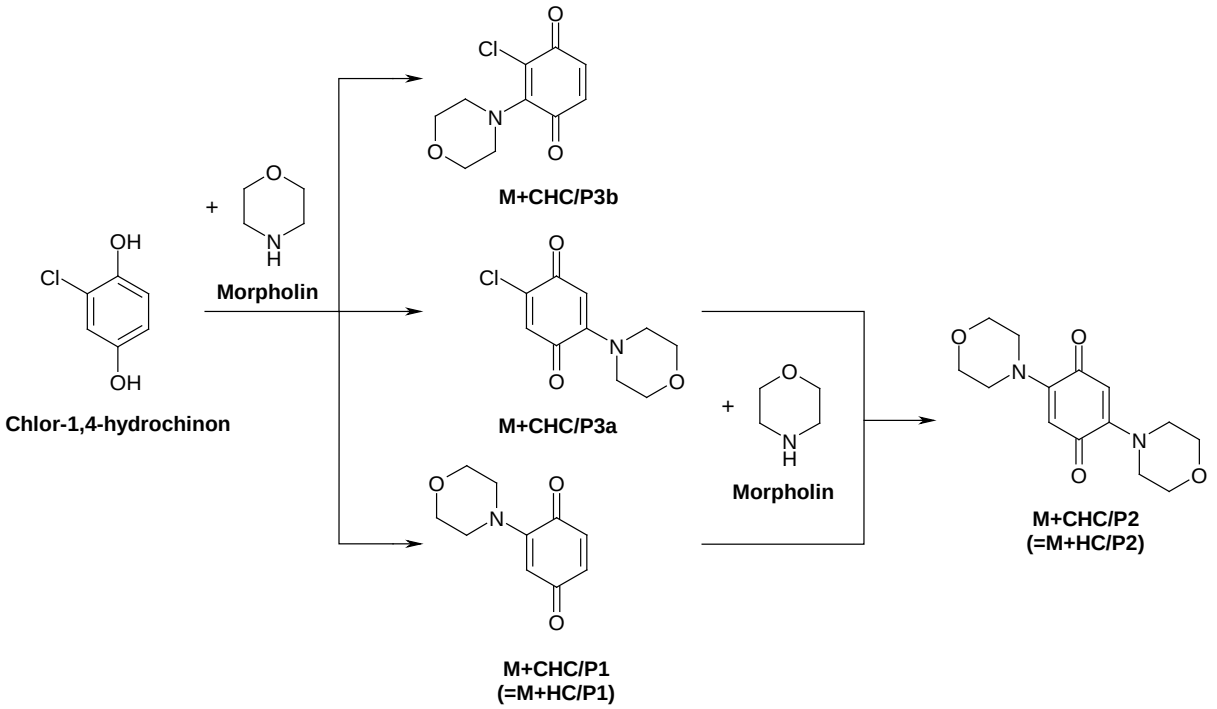


Abb. 24 Bildung der heteromolekularen Produkte M+CHC/P3a,b, M+CHC/P1 (entspricht M+HC/P1) und M+CHC/P2 (entspricht M+HC/P2) bei der laccasekatalysierten Reaktion von Morpholin mit Chlor-1,4-hydrochinon

Darüber hinaus konnten die Produkte M+CHC/P1 und M+CHC/P2 auch in den Kontrollen ohne Laccasezugabe in geringer Konzentration detektiert werden, was auf einen z.T. autokatalytisch ablaufenden Prozess hinweist. So betrug die Ausbeute des Endproduktes der Reaktion M+CHC/P2 nach 24 h im Inkubatiosansatz mit Phosphat-Citrat-Puffer (pH 7) ohne Laccase ca. 13 % der Produktausbeute, die mit der Laccase von *Myceliophthora thermophila* erzielt wurde (5:1 mM, Morpholin : Chlor-1,4-hydrochinon). Neben den bei der Reaktion von Morpholin und Chlor-1,4-hydrochinon eingehend vorgestellten di- und trimeren Produkten wurden zusätzlich zwei oligomere, chlorierte Produkte (M+CHC/P4 und M+CHC/P5) mittels MS-Analysen charakterisiert (Tab. 3, S. 137).

Die Variation der Laccasesubstrate führte im Falle der Reaktionen von 1,4-Hydrochinon bzw. Chlor-1,4-hydrochinon zu einer teilweisen Übereinstimmung der Produktspektren. Darüber hinaus konnten auch bei der Variation des Aminopartners ähnliche Produkte strukturell charakterisiert werden. So wurden mittels HPLC und Massenspektroskopie bei der Reaktion des 4-(2-Aminoethyl)-morpholin mit 1,4-Hydrochinon ähnliche Produkte wie beim Umsatz mit Morpholin nachgewiesen. Die Produkte AEM+HC/P1 und AEM+HC/P2 entsprachen jeweils M+HC/P1 und M+HC/P2, was wahrscheinlich auf eine Abspaltung der Aminoethylgruppe zurückzuführen ist (Abb. 25).

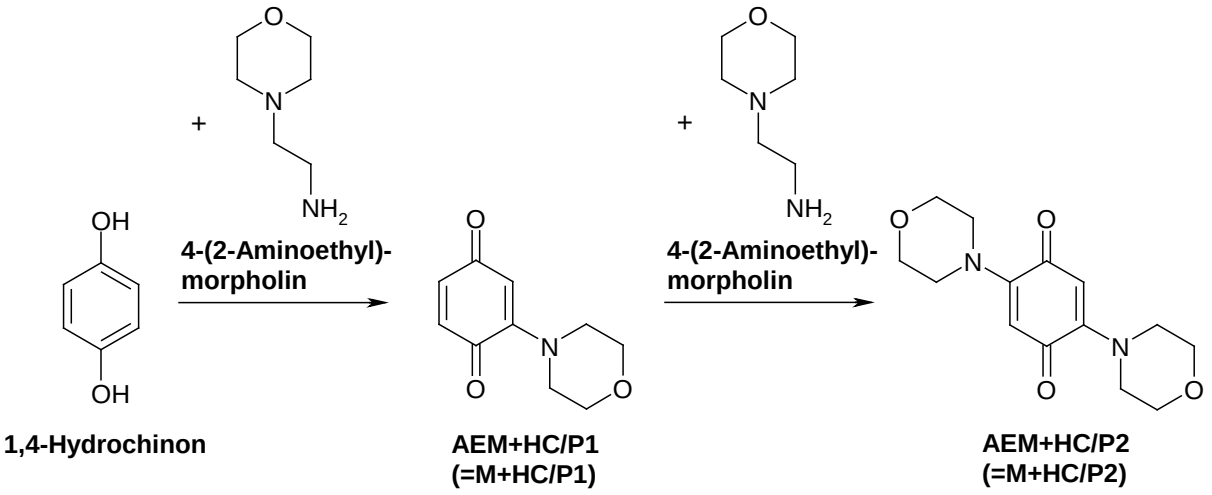


Abb. 25 Bildung der heteromolekularen Produkte AEM+HC/P1 (entspricht M+HC/P1) und AEM+HC/P2 (entspricht M+HC/P2) bei der laccasekatalysierten Reaktion von 4-(2-Aminoethyl)-morpholin mit 1,4-Hydrochinon

Die Abspaltung der Aminoethylgruppe könnte ähnlich wie die Abspaltung von Chlor bei der zuvor vorgestellten Reaktion von Morpholin und Chlor-1,4-hydrochinon im Zuge der Aminierung erfolgen. Denkbar wäre aber auch eine Abspaltung der Aminoethylgruppe des 4-(2-Aminoethyl)-morpholins direkt durch die Laccase. Das dabei entstehende Morpholin

würde dann als Ausgangsstoff für die Synthese von AEM+HC/P1 und AEM+HC/P2 dienen. Die Bildung dieser beiden Produkte erforderte die Anwesenheit der Laccase, sodass eine autokatalytische Reaktion ausgeschlossen wurde. Des Weiteren konnte die Möglichkeit des spontanen Zerfalls des 4-(2-Aminoethyl)-morpholins in das Morpholin und die Aminoethylgruppe bereits in der für die laccasekatalysierte Reaktion angefertigten Stammlösung mittels GC/MS ausgeschlossen werden. Darüber hinaus war die Produktausbeute bei der Reaktion von 1,4-Hydrochinon mit 4-(2-Aminoethyl)-morpholin geringer als bei der Reaktion mit Morpholin, was entweder auf eine geringe Rate an Aminierungen mit einhergehender Abspaltung der Aminoethylgruppe oder eine unvollständige laccasekatalysierte Abspaltung der Aminoethylgruppe des 4-(2-Aminoethyl)-morpholins unter Bildung von Morpholin hindeutet. So wurden innerhalb von 24 h nur 8 % AEM+HC/P2 im Vergleich zu dem entsprechenden Produkt mit Morpholin M+HC/P2 mit der Laccase von *Myceliophthora thermophila* (5:1 mM, 4-(2-Aminoethyl)-morpholin bzw. Morpholin : 1,4-Hydrochinon) gebildet. Zudem wurden neben den auch mit Morpholin detektierten Produkten weitere Produkte in geringer Konzentration nachgewiesen.

Näheren Aufschluss über die Frage, ob die Aminoethylgruppe im Zuge der Aminierung oder direkt durch die katalytische Aktivität der Laccase abgespalten wird, könnten weitergehende HPLC-Analysen erbringen, die speziell die Detektion des 4-(2-Aminoethyl)-morpholins und des Morpholins ermöglichen. 4-(2-Aminoethyl)-morpholin, wie auch Morpholin besitzen kein aromatisches System wodurch die Substanzen selbst und somit auch eine Umwandlung des 4-(2-Aminoethyl)-morpholins ins Morpholin mit Hilfe des UV/Vis-Detektors der HPLC nicht nachgewiesen werden konnte. Eine vorherige Derivatisierung des Morpholins mit einem Fluoreszenz-Farbstoff und anschließende Analyse mit einem Fluoreszenz-Detektor könnte nähere Aufschlüsse über den Reaktionsablauf geben.

In Übereinstimmung zu den Reaktionen mit 4-(2-Aminoethyl)-morpholin konnte auch mit 4-Morpholinoanilin eine Veränderung des Morpholinderivats gezeigt werden. 4-Morpholinoanilin stellt selbst ein Laccasesubstrat dar. Andere Aniline wie 4-Methoxyanilin, 4-Methylanilin, 2,5-Xylidin und 2,4-Dichloranilin können ebenfalls von der Laccase als Substrat genutzt werden und können dann zu verschiedenen Oligomeren reagieren (Hoff et al. 1985, Bertrand et al. 2002, Tadesse et al. 2008). Auf diese Weise werden in der Natur Schadstoffe detoxifiziert (Bollag und Leonowicz 1984, Collins und Dobson 1997). Im Verlauf der homomolekularen Reaktion von 4-Morpholinoanilin wurde neben verschiedenen hochmolekularen Produkten (Produkte mit hoher Retentionszeit) auch Benzochinon (bezeichnet als MA/P1) mit Hilfe des Vergleichs von Retentionszeit und UV/Vis-Spektrum mit der Standardverbindung 1,4-Benzochinon nachgewiesen (Abb. 26A). Zudem wurde eine Peakverstärkung mit 1,4-Benzochinon durchgeführt, wobei die Zugabe der Standardsubstanz eine Absorptionserhöhung des Produktpeaks zur Folge hatte (Abb. 26B).

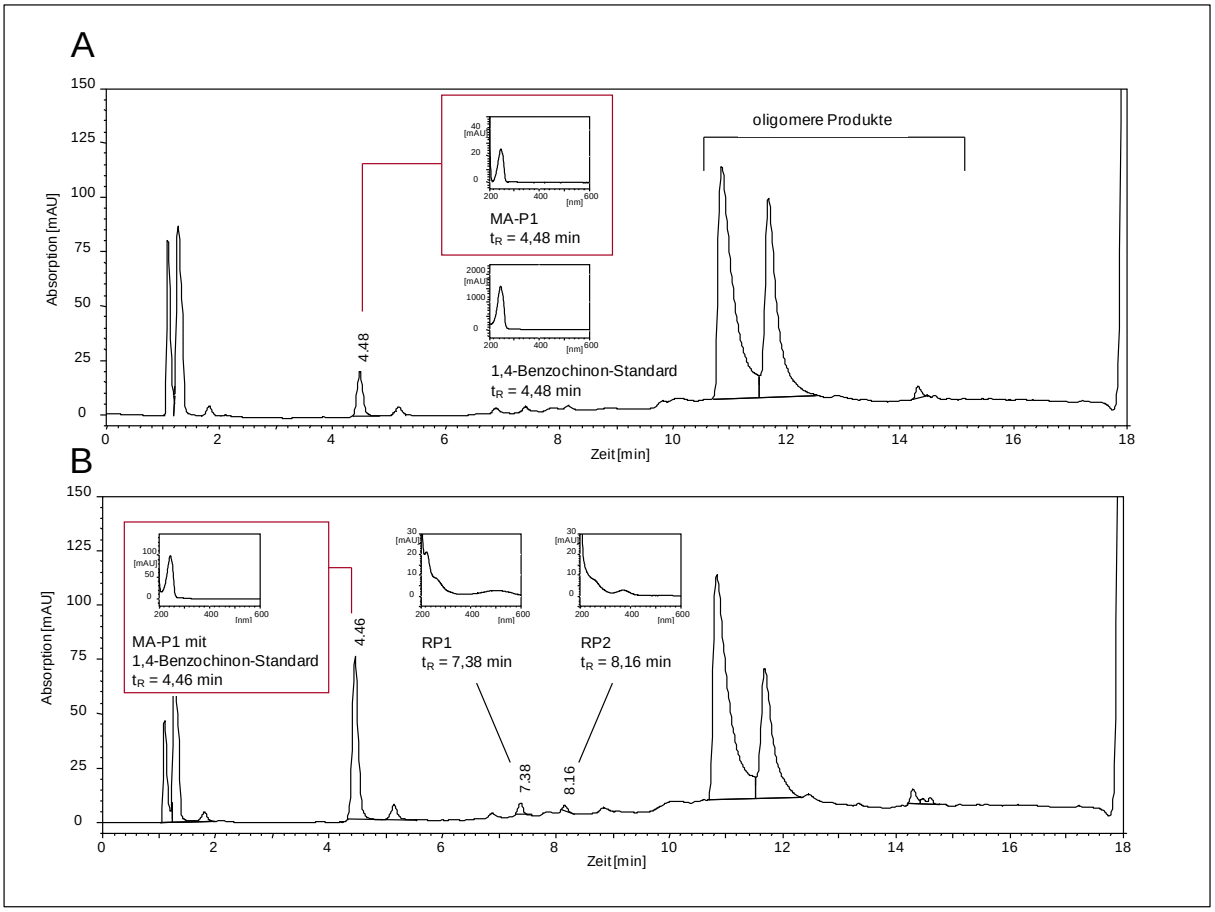


Abb. 26 HPLC-Elutionsprofile der homomolekularen Reaktion von 4-Morpholinoanilin mittels *Myceliophthora thermophila* Laccase (A) nach 2 h Inkubationszeit und (B) nach der Zugabe des 1,4-Benzochinon-Standards sowie UV/Vis-Spektren der Produkte und Angaben der Retentionszeiten (t_R)

Nach der Zugabe des 1,4-Benzochinons konnte auch die Bildung der Produkte RP1 und RP2 nachgewiesen werden, deren Retentionszeiten und UV/Vis-Spektren ähnlich denen von M+HC/P1 und M+HC/P2 waren. Daraus ergibt sich, dass es wahrscheinlich zu einer laccasevermittelten Spaltung des 4-Morpholinoanilins kam, die in der Bildung von Morpholin und 1,4-Benzochinon resultierte (Abb. 27).

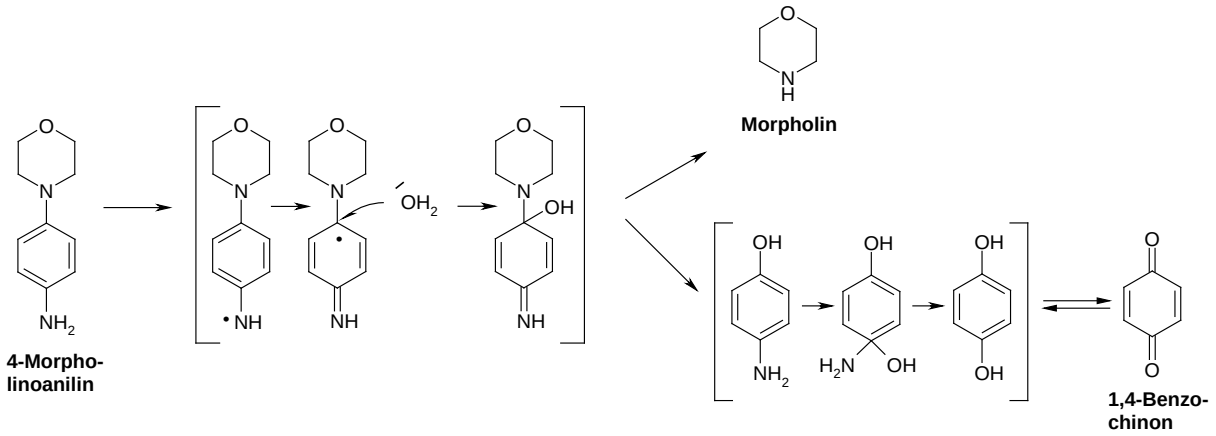


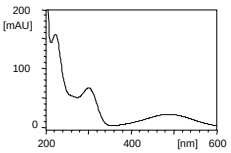
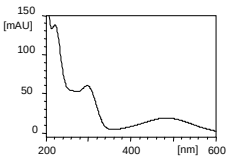
Abb. 27 Postulierte Spaltung von 4-Morpholinoanilin mittels Laccase in Morpholin und 1,4-Benzochinon abgewandelt nach Iimura et al. 1996 und Campos et al. 2001

Die Bildung von Benzochinonen im Verlauf der laccasekatalysierten Spaltung von Lignin (Kawai et al. 1988, Leonowicz et al. 2001) aber auch von Farbstoffen (Decolorisation) wurde bereits beschrieben (Chivukula and Renganathan 1995, Torres et al. 2003, Tauber et al. 2008). Dabei wird das Substrat mittels Laccase oxidiert. Das entstandene Radikal kann danach leicht von nukleophilen Verbindungen z.B. Wasser angegriffen werden und resultiert in der Inkorporation von Sauerstoff (Campos et al. 2001). Leonowicz et al. 2001 postulierten für ein Ligninmodeldimer, dass die nach dem nukleophilen Angriff durch Wassermoleküle stattfindende Spaltung spontan ohne eine Beteiligung der Laccase erfolgt, während Campos et al. (2001) einen zweiten laccasevermittelten Oxidationsschritt für die Spaltung des Azofarbstoffs Indigo annahmen. Im Fall von 4-Morpholinoanilin wäre eine dritte Oxidationsstufe denkbar, die zur Substitution der Aminogruppe führt. Die Substitution von Chlorsubstituenten durch Hydroxylgruppen wurde bereits bei laccasekatalysierten Reaktionen beschrieben (Minard et al. 1981, Iimura et al. 1996, Leontievsky et al. 2001). Die Dechlorierung erfolgte in *para*-Position zur Hydroxylgruppe, wobei 1,4-Hydrochinone und 1,4-Benzochinone nachgewiesen wurden (Minard et al. 1981, Iimura et al. 1996, Leontievsky et al. 2001). Iimura et al. (1996) bewiesen anhand von Inkorporationsversuchen mit ^{18}O, dass der eingebaute Sauerstoff aus dem Wasser des Reaktionsmediums stammte. Demnach erfolgte die Dechlorierung durch einen nukleophilen Angriff des Wassers auf das von der Laccase generierte Kationradikal und nicht durch oxidative Kopplung (Iimura et al. 1996). Im vorliegenden Fall kann also auch von einer Substitution der Aminogruppe durch eine Hydroxylgruppe ausgegangen werden. Die nukleophile Addition von Wasser unter Bildung einer Hydroxylgruppe wurde auch von Manda et al. (2007) und Hahn et al. (2009d) beschrieben.

Die Bildung des Benzochinons (MA/P1) konnte neben den homomolekularen Reaktionen mit 4-Morpholinoanilin auch bei allen damit durchgeführten heteromolekularen Reaktionen

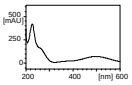
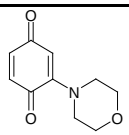
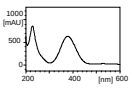
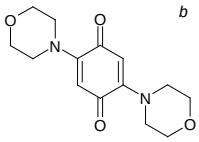
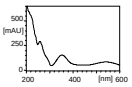
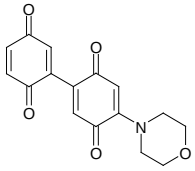
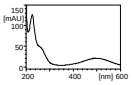
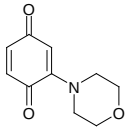
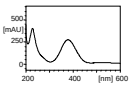
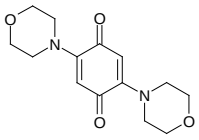
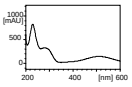
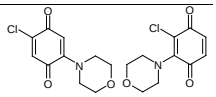
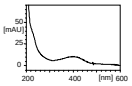
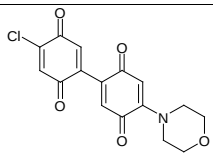
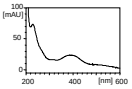
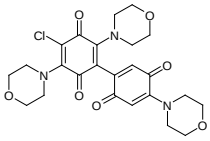
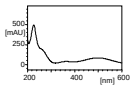
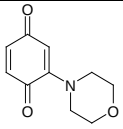
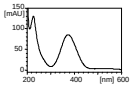
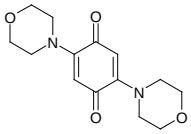
detektiert werden. Daneben wurde bei der Reaktion von 4-Morpholinoanilin mit 1,4-Hydrochinon ein Produkt, ähnlich dem M+HC/P1, gebildet und auch bei der Reaktion von 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon und *Myceliophthora thermophila* Laccase wurde ein heteromolekulares Kopplungsprodukt nachgewiesen, bei dem das UV/Vis-Spektrum und die Retentionszeit mit denen des Produkts der Reaktion mit Morpholin vergleichbar waren (Tab. 2), wodurch die Theorie der Spaltung des 4-Morpholinoanilins unter Bildung von Morpholin zusätzlich unterstützt wird. Eine Publikation über die laccasevermittelte Spaltung von 4-Morpholinoanilin wird vorbereitet.

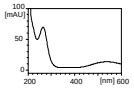
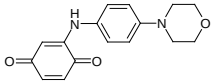
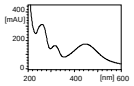
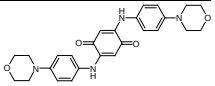
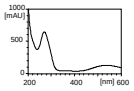
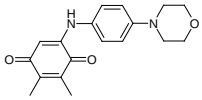
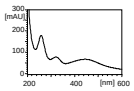
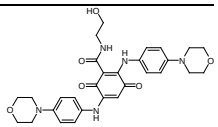
Tab. 2 UV/Vis-Spektren und Retentionszeiten der Produkte, die bei der laccasevermittelten Kopplung von 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon mit Morpholin bzw. 4-Morpholinoanilin gebildet wurden

Reaktionspartner	**Morpholin und 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon**	**4-Morpholinoanilin und 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon**
UV/Vis-Spektrum		
Retentionszeit [min]	10,80	10,84

Die potentiell mit Morpholin als Spaltprodukt gebildeten Produkte wurden in den einzelnen Reaktionen nur in geringer Konzentration nachgewiesen, die Hauptreaktion stellte die Aminierung des 4-Morpholinoanilins mit dem jeweiligen Laccasesubstrat dar. Dabei wurden zuerst die Dimere gebildet, welche dann zu Trimeren bestehend aus einem Molekül des chinoiden Laccasesubstrates und zwei Molekülen 4-Morpholinoanilin reagierten. Einige der Produkte wurden mittels Massenspektroskopie charakterisiert (Tab. 3), wobei die von Hahn et al. (2009d) vorgestellten Trimere aus 4-Morpholinoanilin und 2,5-Dihydroxybenzoesäure-methylester bzw. 2,5-Dihydroxybenzoesäureethylester nicht aufgeführt wurden.

Tab. 3 Ergebnisse der strukturellen Charakterisierung von heteromolekularen Produkten[a] der Reaktionen von Morpholinen: Morpholin (M), 4-(2-Aminoethyl)-morpholin (AEM), 4-Morpholinoanilin (MA) mit *para*-dihydroxylierten aromatischen Verbindungen: 1,4-Hydrochinon (HC), Chlor-1,4-hydrochinon (CHC), 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon (DMHC), 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid (DHBA) mittels Massenspektroskopie (LC/MS) und hochauflösender Massenspektroskopie (TOF-MS) sowie Retentionszeiten (t_R) und UV/Vis-Spektren der Produkte (Gliederung nach Retentionszeiten)

Ausgangs-stoffe	Pro-dukt	t_R [min]	UV/Vis-Spektrum	Formel	Masse / hochaufgelöste Masse theoretisch	experimentell (*m/z*)	Strukturformel
M+HC	**P1**	7,33		$C_{10}H_{11}NO_3$	[M] 193,2	$[M+H]^+$ 194,1 $[M+Na]^+$ 216,1	
M+HC	**P2**	8,90		$C_{14}H_{18}N_2O_4$	[M] 278,3 $[M+Na]^+$ 301,11587	$[M+H]^+$ 279,3 $[M+Na]^+$ 301,1 $[2M+Na]^+$ 579,3 $[M+Na]^+$ 301,12072	*b* 
M+HC	**P3**	10,89		$C_{16}H_{13}NO_5$	[M] 299,29 $[M+H]^+$ 300,08664 $[M-H]^-$ 298,07209	$[M+H]^+$ 300,1 $[M+Na]^+$ 322,1 $[2M+Na]^+$ 621,2 $[M+H]^+$ 300,05102 $[M-H]^-$ 298,07041	
M+CHC	**P1**	7,45		$C_{10}H_{11}NO_3$	[M] 193,2	$[M+H]^+$ 194,1	
M+CHC	**P2**	9,03		$C_{14}H_{18}N_2O_4$	[M] 278,3 $[M+H]^+$ 279,13393	$[M+H]^+$ 279,2 $[M+Na]^+$ 301,1 $[M+H]^+$ 279,13196	
M+CHC	**P3**	9,45		$C_{10}H_{10}ClNO_3$	[M] 227,65 $[M+H]^+$ 208.09681	$[M+H]^+$ 228,0 $[M+Na]^+$ 250,0 $[M+H]^+$ 208.09703, 208.09709	 **M+CHC/P3a und M+CHC-P3b**
M+CHC	**P4**	10,39		$C_{16}H_{12}ClNO_5$	[M] 333,73	$[M+H]^+$ 334,1 $[M+Na]^+$ 356,0	
M+CHC	**P5**	10,93		$C_{24}H_{26}ClN_3O_7$	[M] 503,94	$[M+H]^+$ 504,2 $[M+Na]^+$ 526,2	
AEM+HC	**P1**	7,39		$C_{10}H_{11}NO_3$	[M] 193,2	$[M+H]^+$ 194,1	
AEM+HC	**P2**	8,89		$C_{14}H_{18}N_2O_4$	[M] 278,3	$[M+H]^+$ 279,1 $[M+Na]^+$ 301,1	

Ausgangs-stoffe	Pro-dukt	t_R [min]	UV/Vis-Spektrum	Formel	Masse / hochaufgelöste Masse theoretisch	experimentell (*m/z*)	Strukturformel
MA+HC	**P1**	10,05		$C_{16}H_{16}N_2O_3$	[M] 284,32 $[M+H]^+$ 285,12336	$[M+H]^+$ 285,13345	
MA+HC	**P2**	13,00		$C_{26}H_{28}N_4O_4$	[M] 460,54 $[M+H]^+$ 461,21832	$[M+H]^+$ 461,23535	
MA+DMHC	**P1**	12,43		$C_{18}H_{20}N_2O_3$	[M] 312,37 $[M+H]^+$ 313,15466	$[M+H]^+$ 313,153931	
MA+DHBA	**P1**	10,86		$C_{29}H_{33}N_5O_6$	[M] 547,62 $[M+H]^+$ 548,25035	$[M+H]^+$ 548,251494	

[a] Im Folgenden wurden die Produkte zusammen mit den Ausgangsstoffen benannt.

[b] Die Struktur dieses Produkts wurde mittels NMR-Analysen bestätigt (Hahn et al. 2009d).

Neben den für die laccasevermittelte Kopplung eingesetzten Azolen und Morpholinen wurde 5-Flucytosin (5-Fluorcytosin) eingesetzt. Im Gegensatz zu den Azolen und Morpholinen, die die pilzliche Sterolbiosynthese hemmen (Vanden Bossche et al. 1984, Hitchcock et al. 1989, Mercer 1991, Ziogas et al. 1991), wirkt 5-Flucytosin auf die pilzliche RNA bzw. DNA Synthese (Polack und Wain 1979, Waldorf und Polak 1983).

Bei den durchgeführten heteromolekularen Kopplungsreaktionen mit 5-Flucytosin konnten nur selten einzelne heteromolekulare Produkte nachgewiesen werden, die darüber hinaus in einer sehr geringen Konzentration vorlagen. Das Produkt der Reaktion von 5-Flucytosin und 2,5-Dihydroxybenzoesäure konnte trotz einer Ausbeute von nur ca. 5 % isoliert werden. Die massenspektroskopische Analyse des Feststoffes ergab für das Molekül eine Masse von $[M+H]^+$ 264 m/z (AP-ESI positiv Modus). Diese Masse entspricht einem hydrochinoiden und dehalogenierten Heterodimer (Abb. 28). Die Bindung des 5-Flucytosins erfolgte wahrscheinlich in *ortho*-Position zur Säuregruppe, wie es bereits mehrfach im Rahmen der Arbeit für Aminierungen vorgestellt wurde (Hahn et al. 2009a,c).

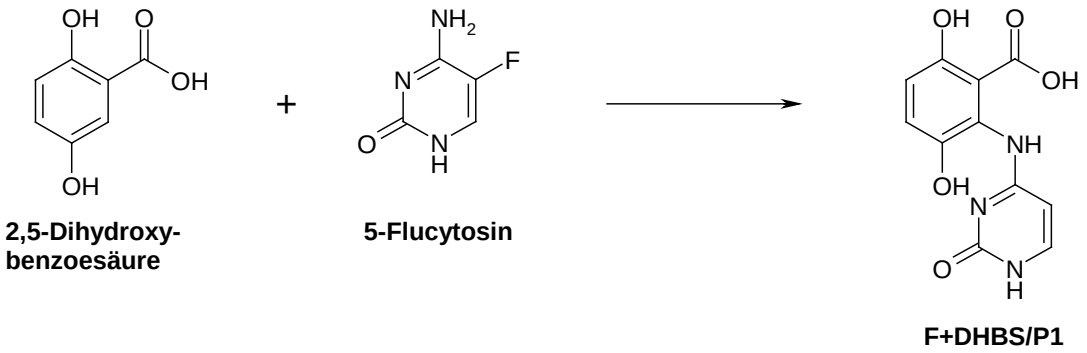


Abb. 28 Postulierte Bildung eines heteromolekularen Produktes (F+DHBS/P1) bei der laccasekatalysierten Reaktion von 5-Flucytosin mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure

Die vermutete Struktur konnte mittels NMR aufgrund der geringen Menge des Produktes und sich überlagernder Signale nicht eindeutig ausgewertet werden.

5.2 Bestimmung der biologischen Aktivität der mittels Laccase synthetisierten Produkte

Alle isolierten Verbindungen und die für deren Synthese eingesetzten Ausgangsstoffe wurden hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung getestet und mit der Wirkung von Standardverbindungen verglichen (Tab. 4, 5). Eine Ausnahme war das Produkt der Reaktion von 5-Flucytosin und 2,5-Dihydroxybenzoesäure. Aufgrund der Verunreinigung des Produktes mit 5-Flucytosin, welches nicht vollständig bei der Produktisolation entfernt werden konnte, war eine Testung der Wirkung nicht sinnvoll.

Die MHK-Bestimmung erfolgte mit dem Testorganismus *Candida maltosa* (z.T. auch mit *Candida albicans*) in Mikrotiterplatten unter Nutzung einer neu etablierten Methode auf der Basis des EUCAST discussion document E.Dis 7.1 (Rodríguez-Tudela et al. 2002, Hahn et al. 2009d). In Zusammenarbeit mit Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Lindequist (Dr. K. Wende, H. Bartrow) wurde zur Ermittlung der antimikrobiellen Aktivität der Agardiffusionstest mit verschiedenen Bakterien (*Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) und der Hefe *Candida maltosa* SBUG 700 eingesetzt sowie die Zytotoxizität der Substanzen gegenüber einer humanen Blasenkrebszelllinie 5637 bestimmt (Hahn et al. 2009d).

Tab. 4 Übersicht der Ergebnisse des antimikrobiellen Screenings des Agardiffusionstestes (Testkonzentration: 1000 nmol), der MHK-Bestimmung (maximale Testkonzentration: 1000 µM) sowie die Zytotoxizität gegenüber einer humanen Blasenkrebszelllinie (maximale Testkonzentration: 100 µM) der für die Synthese von potentiell antimikrobiellen Verbindungen eingesetzten Ausgangsstoffe

Nummer		Agardiffusionstest [a]					MHK-Bestimmung [b]				Zytotoxizitätstest	
		B. s.	*S. a.*	*E. c.*	*P. a.*	*C. m.*	MHK		MHK_{50}		Bewertung	IC_{50}
		HH [mm]	HH [mm]	HH [mm]	HH [mm]	HH [mm]	[µg/ml]	[µM]	[µg/ml]	[µM]		[µM]
	Aminopartner											
	Azole											
1	**5-Aminoimidazol-4-carboxamid**	i	i	i	i	i	>162,58 [c]	>1000			-	-
2	**1-Aminobenzotriazol**	i	i	i	i	i	>134,14	>1000			-	-
	Morpholine											
3	**Morpholin**	i	i	i	i	i	>87,12 (>87,12)	>1000 (>1000)			-	-
4	**4-Morpholinoanilin**	i	i	i	i	i	>178,24	>1000			-	-
	Aminosäure											
5	**L-Phenylalanin**	i	i	i	i	i	>165,19	>1000			-	-
	Laccasesubstrate											
6	**2,5-Dihydroxyacetophenon**	i	i	i	i	i	>152,14	>1000			-	-
7	**2,5-Dihydroxybenzoesäure**	i	i	i	i	i	>154,12	>1000			-	-
8	**2,5-Dihydroxy-benzoesäuremethylester**	i	i	i	i	7*	>168,15	>1000			-	-
9	**2,5-Dihydroxy-benzoesäureethylester**	i	i	7*	i	10*	>182,17	>1000	182,17	1000	-	-
10	**2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid**	i	i	i	i	i	>197,19	>1000			+	67
11	**2,5-Dihydroxybenzamid**	i	8	i	i	7*	>153,14	>1000	153,14	1000	++	33
12	**1,4-Hydrochinon**	20	17	i	12	i	>110,11	>1000			++	30
	1,4-Benzochinon [d]	15*	7*	8	8*	i	>108,10	>1000			++	22
13	**Methyl-1,4-hydrochinon**	30	27	17	15	11	>124,14	>1000			++	22
	Methyl-1,4-benzochinon [d]	25	22	10	7	12	38,76	317,39	30,81	252,30	+++	10
14	**2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon**	34	30	14	14	14	>138,17	>1000	138,17 (138,17)	1000 (1000)	++	22
15	**1,4-Dihydroxynaphthalin**	32	34	20	11	31	16,14 (25,54)	100,74 (159,42)	10,20 (20,30)	63,66 (126,73)	+++	7
	1,4-Naphthochinon [d]	30	28	15	8	24	10,07 (12,67)	63,66 (80,08)	8,00 (10,07)	50,60 (63,66)	++	15

Agardiffusionstest

[a] Angabe des Hemmhofdurchmessers in [mm] einschließlich des Plättchendurchmessers (6 mm)

- *B. s.* *Bacillus subtilis* ATCC 6051
- *C. m.* *Candida maltosa* SBUG 700
- *E. c.* *Escherichia coli* ATCC 11229
- *P. a.* *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *S. a.* *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- * kein klarer Hemmhof (geringe Wirkung nicht ausgeschlossen)
- i inaktiv (kein Hemmhof)

Bestimmung der MHK (Minimale Hemmkonzentration) in Mikrotiterplatten

[b] Testorganismus: *Candida maltosa* (bzw. *Candida albicans*)

- MHK Minimale Hemmkonzentration (niedrigste Konzentration einer Substanz, bei der das Wachstum eines Testorganismus vollständig gehemmt wird)
- MHK_{50} Minimale Hemmkonzentration 50 % (niedrigste Konzentration einer Substanz, bei der mindestens 50 % der Testorganismen vollständig gehemmt werden)

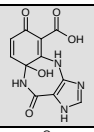
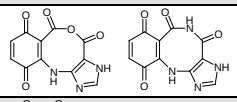
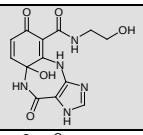
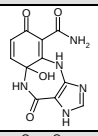
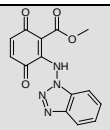
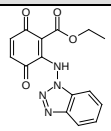
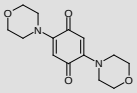
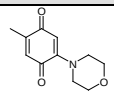
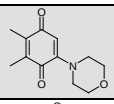
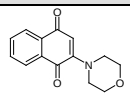
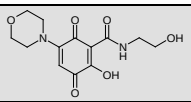
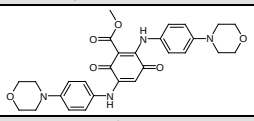
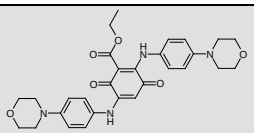
[c] Die MHK der Verbindung war größer als die maximal getestete Konzentration des Stoffes von 1000 µM.

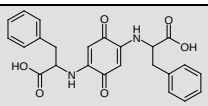
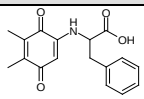
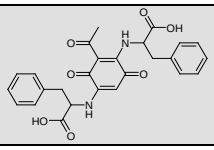
Zytotoxizitätstest

- IC_{50} Inhibitorische Konzentration 50 % (Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition erreicht wird)
- \- nicht zytotoxisch
- \+ wenig zytotoxisch
- ++ zytotoxisch
- +++ stark zytotoxisch

[d] Aufgrund einer möglichen autokatalytischen Umwandlung des hydrochinoiden Ausgangsstoffes im Verlauf der Testung, zusätzliche Testung der benzochinoiden Form des Ausgangsstoffes, wenn diese kommerziell verfügbar war.

Tab. 5 Übersicht der Ergebnisse des antimikrobiellen Screenings des Agardiffusionstestes (Testkonzentration: 1000 nmol), der MHK-Bestimmung (maximale Testkonzentration: 1000 µM) sowie die Zytotoxizität gegenüber einer humanen Blasenkrebszelllinie (maximale Testkonzentration: 100 µM) für die mittels Laccase synthetisierten heteromolekularen Produkte und die zum Vergleich der Wirkung eingesetzten Standardsubstanzen

Nummern	Strukturformeln der heteromolekularen Produkte	Agardiffusionstest [a]					MHK-Bestimmung [b]				Zytotoxizitätstest	
		B. s.	*S. a.*	*E. c.*	*P. a.*	*C. m.*	MHK		MHK_{50}		Be-wer-tung	IC_{50}
		HH [mm]	HH [mm]	HH [mm]	HH [mm]	HH [mm]	[µg/ml]	[µM]	[µg/ml]	[µM]		[µM]
	Azolprodukte											
1+7 [c]		i	i	i	i	14*	>276,12 [d]	>1000			++	24
1+8 bzw. 9 [e]		i	i	i	i	7*	>259,18	>1000			++	15
1+10		i	i	i	i	10*	>319,28	>1000			++	17
1+11		i	10	i	i	12*	>275,23	>1000			++	22
2+8		10	9	i	i	10*	>298,26	>1000	237,09	794,91	++	33
2+9		10	13	i	i	12	>312,29	>1000	78,79	252,30	++	18
	Morpholinprodukte											
3+12		12	i	i	i	i	>278,31	>1000			++	33
3+13		32	28	9	i	21	164,73	794,91	130,95	631,89	++	16
3+14		21	18	7	i	14	139,81 (139,81)	631,89 (631,89)	111,14 (111,14)	502,29 (502,29)	++	28
3+15		21	25	12	i	28	39,10 (49,19)	159,42 (200,56)	24,71 (39,10)	100,74 (159,42)	+++	7
3+10		i	i	i	i	i	>296,28	>1000			-	-
4+8		i	i	i	i	i	>518,57	>1000			++	17
4+9		i	i	i	i	i	>532.60	>1000			++	22

		B. s. HH [mm]	*S. a.* HH [mm]	*E. c.* HH [mm]	*P. a.* HH [mm]	*C. m.* HH [mm]	MHK [µg/ml]	[µM]	MHK_{50} [µg/ml]	[µM]	Be-wer-tung	IC_{50} [µM]
	Aminosäureprodukte											
5+12		**i**	**i**	**i**	**i**	**i**	**>434.45**	**>1000**			**-**	**-**
5+14		**i**	**i**	**i**	**i**	**i**	**>299.33**	**>1000**			**-**	**-**
5+6		**i**	**i**	**i**	**i**	**i**	**>476.49**	**>1000**			**-**	**-**
	Standardsubstanzen											
	Amphotericin B	**i**	**i**	**i**	**i**	**26**	**0,63 (0,63)**	**0,68 (0,68)**	**0,31 (0,31)**	**0,34 (0,34)**	**+++**	**8**
	Fluconazol	**i**	**i**	**i**	**i**	**44**	**1,91**	**6,25**	**0,24**	**0,78**	**-**	**-**
	Fenpropimorph	**i**	**i**	**i**	**i**	**56**	**0,42**	**1,37**	**0,14**	**0,46**	**+**	**46**
	Ampicillin	**38**	**36**	**29**	**i**	**i**	**n. g.**	**n. g.**	**n. g.**	**n. g.**	**-**	**-**
	Gentamicin	**32**	**31**	**25**	**30**	**i**	**n. g.**	**n. g.**	**n. g.**	**n. g.**	**-**	**-**
	Etoposid	**n. g.**	**n. g.**	**n. g.**	**n. g.**	**n. g.**	**n. g.**	**n. g.**	**n. g.**	**n. g.**	**+++**	**0,32**

Agardiffusionstest

[a] Angabe des Hemmhofdurchmessers in [mm] einschließlich des Plättchendurchmessers (6 mm)

- *B. s.* *Bacillus subtilis* ATCC 6051
- *C. m.* *Candida maltosa* SBUG 700
- *E. c.* *Escherichia coli* ATCC 11229
- *P. a.* *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *S. a.* *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- * kein klarer Hemmhof (geringe Wirkung nicht ausgeschlossen)
- i inaktiv (kein Hemmhof)

Bestimmung der MHK (Minimale Hemmkonzentration) in Mikrotiterplatten

[b] Testorganismus: *Candida maltosa* (bzw. *Candida albicans*)

- MHK Minimale Hemmkonzentration (niedrigste Konzentration einer Substanz, bei der das Wachstum eines Testorganismus vollständig gehemmt wird)
- MHK_{50} Minimale Hemmkonzentration 50 % (niedrigste Konzentration einer Substanz, bei der mindestens 50 % der Testorganismen vollständig gehemmt werden)

Zytotoxizitätstest

- IC_{50} Inhibitorische Konzentration 50 % (Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition erreicht wird)
- \- nicht zytotoxisch
- \+ wenig zytotoxisch
- ++ zytotoxisch
- +++ stark zytotoxisch

n. g. nicht getestet

[c] Die Numerierung ist bezogen auf die in Tab. 4 vorgestellten Ausgangsstoffe die zur Synthese der heteromolekularen Produkte mittels Laccase genutzt wurden.

[d] Die MHK der Verbindung war größer als die maximal getestete Konzentration des Stoffes von 1000 µM.

[e] Die Reaktion des 2,5-Dihydroxybenzoesäuremethylesters und des 2,5-Dihydroxybenzoesäure-methylesters mit 5-Aminoimidazol-4-carboxamid führte zur Bildung des gleichen Produktgemisches. Die Produktgemische wurden abhängig vom verwendeten Laccasesubstrat getestet und ergaben die gleichen Testresultate, weshalb dafür die Ergebnisse zusammen angegeben wurden.

Die meisten der getesteten Produkte zeigten im Gegensatz zu den zur Synthese eingesetzten Azolen und Morpholinen sowohl eine antimikrobielle als auch zytotoxische Aktivität. Die *para*-dihydroxylierten Aromaten konnten hinsichtlich ihrer Wirkung in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die getestete 2,5-Dihydroxybenzoesäure und deren Derivate (2,5-Dihydroxybenzoesäuremethylester, 2,5-Dihydroxybenzoesäureethylester, 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid, 2,5-Dihydroxybenzamid, Tab. 4: Nr. 7-11) hatten keine oder nur eine geringe antimikrobielle und zytotoxische Aktivität, während das 1,4-Hydrochinon und dessen Derivate (Methyl-1,4-hydrochinon, 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon, 1,4-Dihydroxynaphthalin sowie die entsprechenden benzochinoiden Verbindungen (Tab. 4: Nr. 12-15) z.T. sehr hohe Aktivitäten aufwiesen. Das ist wahrscheinlich ein Grund dafür, dass auch die Produkte, entstanden aus 1,4-Hydrochinon-Derivaten, eine höhere Wirkung besaßen als die Produkte bei denen 2,5-Dihydroxybenzoesäure-Derivate für die Synthese genutzt wurden (vgl. Tab. 5). Ausgehend von den Ergebnissen des Agardiffusionstests konnte in einigen Fällen die Wirkung der Ausgangsstoffe mit Hilfe der laccasekatalysierten Derivatisierung erhöht werden. So konnten beispielsweise für die Produkte der Reaktionen mit den Azolen (5-Aminoimidazol-4-carboxamid, 1-Aminobenzotriazol, Tab. 4: Nr. 1, 2, 7-11, vgl. Tab. 5) im Vergleich zu den Ausgangsstoffen aus denen sie gebildet wurden z.T. leicht größere Hemmhofdurchmesser oder überhaupt eine Wirkung, die bei den Ausgangsverbindungen nicht vorhanden war, ermittelt werden. Allerdings traf das für die Produkte aus 5-Aminoimidazol-4-carboxamid und dem 2,5-Dihydroxybenzoesäuremethylester bzw. 2,5-Dihydroxybenzoesäureethylester (Tab. 5: Nr. 1+8 bzw. 9) nicht zu. Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse innerhalb dieser Produkte könnte in den unterschiedlichen Strukturen liegen. Gerade die Produkte mit 5-Aminoimidazol-4-carboxamid als Strukturbestandteil stellten neue Substanzklassen dar, welche mit der Laccase synthetisiert werden konnten (Hahn et al. 2009a). Diese Produkte waren zwar stabil in DMSO, auch bei 30 °C (der Inkubationstemperatur für den Test zur Bestimmung der MHK), aber im Verlauf der MHK-Bestimmung erfolgte wahrscheinlich eine Polymerisation bzw. eine Reaktion mit Mediumbestandteilen, wobei braune bis schwarze Präzipitate gebildet wurden, die die Auswertung mittels Mikrotiterplattenreader erschwerten. Zur Unterstützung der Ergebnisse wurde deshalb der Inhalt der Mikrotiterplatten auf Malzagar-Platten ausgespatelt und die Zellen nach einer 24stündigen Inkubation bei 30 °C mit je 1 ml physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und die optische Dichte gemessen. Anhand einer Zellkontrolle konnte eine maximale Hemmung von 30 % der Zellen (*Candida maltosa*) gezeigt werden. Daraus folgt, dass die Verbindungen mit 5-Aminoimidazol-4-carboxamid als Strukturbestandteil in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Agardiffusionstestes nur eine mäßige antimikrobielle Wirkung hatten. Während die antimikrobielle Aktivität der

Azolprodukte im Vergleich zu den Ausgangsstoffen nur leicht gesteigert werden konnte, war die zytotoxische Aktivität der Produkte deutlich höher als die der Edukte. Auffällig war, dass die laccasekatalysierten Reaktionen mit dem 2,5-Dihydroxybenzoesäuremethylester bzw. 2,5-Dihydroxybenzoesäureethylester unabhängig vom Aminopartner (5-Aminoimidazol-4-carboxamid, 1-Aminobenzotriazol, 4-Morpholinoanilin) in Produkten resultierten (Tab. 5: 1+8 bzw. 9, 2+8, 2+9, 4+8, 4+9), die im Gegensatz zu den Ausgangsstoffen (Tab. 4: 1, 2, 4, 8, 9) eine zytotoxische Wirkung zeigten. Damit wurde bestätigt, dass die Laccase zur Verknüpfung von Substanzen ohne Wirkung eingesetzt werden kann, sodass Verbindungen mit einer speziellen Aktivität z.B. Zytotoxizität entstehen können. Im Vergleich zur eingesetzten Standardverbindung Fluconazol (Tab. 5) als ein Vertreter der Azole und Fenpropimorph als ein Vertreter der Morpholine war die zytotoxische Wirkung der Produkte ebenfalls höher, während allerdings die Wirkung von Etoposid und auch Amphotericin B nicht erreicht wurde. Allgemein konnten die Werte der Standardsubstanzen sowohl bei der zytotoxischen aber auch bei der antimikrobiellen Testung nur vereinzelt erreicht werden, z.B. entsprach der Hemmhofdurchmesser des Produkts der Reaktion von 1,4-Dihydroxy-naphthalin und Morpholin (Tab. 5: Nr. 3+15) gegenüber *Candida maltosa* dem der Standardverbindung Amphotericin B. Allerdings zeigten die meisten Produkte, v.a. die die aus 1,4-Hydrochinon und dessen Derivaten mit Morpholin gebildet wurden, eine inhibitorische Aktivität sowohl auf Bakterien als auch auf Pilze, während die Standardverbindungen diese Breitbandwirkung nicht aufwiesen. Das Argument einer allgemeinen Toxizität kann u.a. am Beispiel des Produktes der Reaktion von 1,4-Hydrochinon und Morpholin (Tab. 5: Nr. 3+12) entkräftet werden. Dieses trimere Produkt zeigte eine zytotoxische Wirkung, während es kaum eine antimikrobielle Wirkung aufwies. Zudem müßte, wenn es sich um einen Toxizitätseffekt handelt, die Standardverbindung Amphotericin B auch eine Wirkung auf Bakterien und nicht nur auf *Candida maltosa* haben, da eine hohe Zytotoxizität dieser Substanz festgestellt wurde (Hahn et al. 2009d). Ausgehend von diesen Vergleichen handelt es sich wahrscheinlich weniger um einen Toxizitätseffekt als vielmehr um einen unterschiedlichen Angriffspunkt der neusynthetisierten Verbindungen. Die in der Medizin oder Landwirtschaft eingesetzten Azole und Morpholine wirken auf die Sterolbiosynthese der Pilze (Vanden Bossche et al. 1984, Hitchcock et al. 1989, Mercer 1991, Ziogas et al. 1991), wobei schon zwischen diesen beiden Gruppen unterschiedliche Angriffspunkte beschrieben wurden. Azole hemmen v.a. die Cytochrom P450-abhängige 14α-Demethylase (Vanden Bossche et al. 1984, Hitchcock et al. 1989), während Morpholine auf die Sterol $\Delta^{8}\rightarrow\Delta^{7}$-Isomerase und die Δ^{14}-Reduktase (Baloch et al. 1984, Baloch und Mercer 1987, Mercer 1991) wirken. In beiden Fällen wird die Bildung von Ergosterol, einem Hauptbestandteil der pilzlichen Zellmembran, aus Lanosterol verhindert, was zu einer Störung der Membranstruktur und -funktion und letztlich zum Zelltod führt (Steel

et al. 1989, Ziogas et al. 1991). Ein alternativer oder zusätzlicher Angriffsort der getesteten Verbindungen im Vergleich zu den Azolen und Morpholinen ist anzunehmen und ermöglicht aufgrund der Breitbandwirkung gegenüber Bakterien und Pilze ein großes Anwendungsspektrum. Die Abhängigkeit der zytotoxischen und antimikrobiellen Aktivität vom Aminopartner, speziell vom Morpholin-Anteil des heteromolekularen Produktes wurde durch den Vergleich der Wirkungen mit Aminosäure-Derivaten (Tab. 5: 5+12, 5+14, 5+6) gezeigt. Während beispielsweise das Produkt aus der Reaktion von 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon und Morpholin (Tab. 5: 3+14) sowohl eine antimikrobielle als auch eine zytotoxische Wirkung aufwies, hatte das gleiche Produkt mit einem Phenylalanin-Anteil (Tab. 5: 5+14), anstelle des Morpholin-Anteils, weder eine antimikrobielle noch eine zytotoxische Aktivität.

Die Ergebnisse zur Bestimmung der antimikrobiellen und zytotoxischen Wirkung zeigen, dass die laccasevermittelte Synthese von neuen Wirkstoffen möglich ist und die Einsatzmöglichkeiten der Laccase durch derartige Synthesevarianten erweitert werden können.

6 Zusammenfassung

Die in dieser kumulativen Dissertation vorgestellten Publikationen und wissenschaftlichen Beiträge beinhalten die Untersuchungsergebnisse über laccasekatalysierte Reaktionen zur Synthese von neuen Wirkstoffen und Biomaterialien. In der Arbeit wurden sieben Publikationen und Manuskripte sowie drei Tagungsbeiträge vorgestellt. Zudem erfolgte eine Zusammenstellung von noch unveröffentlichten Ergebnissen, wofür zwei weitere Manuskripte vorbereitet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zahlreiche unterschiedliche Substanzklassen mit Hilfe der Laccase verknüpft werden. Die dabei synthetisierten Verbindungen können nicht nur als Feinchemikalien in der organischen Synthese sondern auch für die Herstellung von antimikrobiellen und antikanzerogenen Medikamenten oder funktionellen Biomaterialien genutzt werden.

Potential der Laccase zur Herstellung von Wirkstoffen

Die Synthese von antimikrobiellen Wirkstoffen durch die laccasekatalysierte Derivatisierung konzentrierte sich vor allem auf verschiedene Azole und Morpholine. Die isolierten Derivate wurden hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung untersucht. Azole und Morpholine sind Bestandteil verschiedener antifungaler Medikamente und Fungizide. Eine Derivatisierung dieser Substanzklassen könnte neue Verbindungen mit neuen Eigenschaften, wie z.B. einem erweiterten Wirkungsspektrum, führen.

Synthese der potentiellen Wirkstoffe

1. Für die laccasevermittelte Derivatisierung der Azole und Morpholine wurden *para*-dihydroxylierte aromatische Verbindungen (1,4-Hydrochinon und 2,5-Dihydroxybenzoesäure bzw. deren Derivate) als Ausgangsstoffe eingesetzt. Im Verlauf der Reaktion erfolgte eine laccasekatalysierte Oxidation der jeweiligen *para*-dihydroxylierten aromatischen Verbindung zum Chinon, welches dann einer Aminierung durch eine intermolekulare Michael-Addition (1,4-Addition) unterlag und in der Bildung von C-N verknüpften monoaminierten Produkten resultierte. Bei einer erneuten laccasevermittelten Oxidation des gebildeten monoaminierten Produktes und anschließender Aminierung entstanden diaminierte Produkte. So führte die laccasekatalysierte Reaktion von 1,4-Hydrochinon und Morpholin beispielsweise zur Bildung von 2-Morpholin-4-yl-[1,4]-benzochinon und 2,5-Dimorpholin-4-yl-[1,4]-benzochinon. Die gebildeten Hybridmoleküle bestanden folglich aus einem Molekül der *para*-dihydroxylierten aromatischen Verbindungen in chinoider Form und einem (monoaminiertes Produkt; Dimer) bzw. zwei (diaminiertes Produkt; Trimer) Molekül/en des Morpholins bzw. Azols.

Daneben wurde erstmals ein mittels Laccase hergestelltes, trimeres Produkt (2-Hydroxy-5-morpholin-4-yl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-diencarbonsäure-(2-hydroxyethyl)-amid) beschrieben, welches aus der nukleophilen Addition von Wasser aus dem Reaktionsgemisch und einem Molekül Morpholin an 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid resultierte.

2. Darüber hinaus wurde die laccasekatalysierte Synthese von neuartigen Zyklisierungsprodukten aus Azolen als Vertreter von Aminen mit einem Fünfring bzw. verschiedenen Aminen mit einem Sechsring (z.B. 4-Aminobenzoesäurederivate) und 2,5-Dihydroxybenzoesäurederivaten nachgewiesen, deren Bildung weder mittels Laccase noch mit chemischen Syntheseverfahren bislang beschrieben wurde. Die wichtigsten Gruppen dieser neuen Zyklisierungsprodukte sind Cycloheptene und Cyclooctene. Die Bildung erfolgte durch eine regioselektive Dominoreaktion. Nach der laccasekatalysierten Oxidation des 2,5-Dihydroxybenzoesäurederivats und einer Michael-Addition erfolgte eine Ringbildung entweder direkt mit dem Aromaten bzw. der Seitenkette des 2,5-Dihydroxybenzoesäurederivats was jeweils zur Synthese von Cycloheptenen bzw. Cyclooctenen führte. Die Bildung der einzelnen Zyklisierungsprodukte war sowohl von der Ringgröße und den Substituenten des Aminopartners als auch von der Substitution des 2,5-Dihydroxybenzoesäure-Derivats, sowie den Reaktionsbedingungen, wie der genutzten Laccase und dem pH-Wert des Puffers, abhängig. So resultierte beispielsweise die Reaktion von 5-Aminoimidazol-4-carboxamid und 2,5-Dihydroxybenzoesäure in der Bildung eines Cycloheptens (8a-Hydroxy-6,10-dioxo-1,4,6,8a,9,10-hexahydro-1,3,4,9-tetraaza-benzo[f]-azulen-5-carbonsäure) während bei der Reaktion mit dem 2,5-Dihydroxybenzoesäure-methylester verschiedene Cyclooctene nachgewiesen wurden (3,11-Dihydro-1,3,5,11-tetraaza-benzo[a]cyclopenta[d]cycloocten-4,6,7,10-tetraon; 3,11-Dihydro-5-oxa-1,3,11-triaza-benzo[a]cyclopenta[d]cycloocten-4,6,7,10-tetraon).

Neben Cycloheptenen und Cyclooctenen wurden auch Diazaspirocyclohexene und Phenazine, sowie Radikale monoaminierter Produkte für laccasekatalysierte Reaktionen beschrieben.

3. In einem monophasischen Wasser (Puffer) / wasser-mischbaren organischen Lösungsmittelsystem wurde der Einfluß von Methanol auf die Produktbildung untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass selbst bei einem Methanolgehalt von 25 % und 50 % noch jeweils 33 % und 5 % der Produktausbeute erzielt wurden.

Die Kenntnis über den Einfluß von Lösungsmitteln auf die laccasekatalysierte Reaktion ermöglicht eine Anpassung der Reaktionsbedingungen entsprechend den eingesetzten Ausgangsstoffen, z.B. schlecht-wasserlöslichen Wirkstoffen und den angestrebten Produkten.

Testung der potentiellen Wirkstoffe hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung

4. Zur Prüfung der antimikrobiellen Aktivität gegenüber *Candida maltosa* und bei ausgewählten Verbindungen gegenüber *Candida albicans* wurde die Methode des EUCAST discussion document E.Dis 7.1 über die MHK-Bestimmung in Mikrotiterplatten modifiziert. Ein Vergleich der hemmenden Wirkung von ausgewählten Produkten und der für deren Synthese genutzten Ausgangsstoffe gegenüber dem Testorganismus *Candida maltosa* mit *Candida albicans* ergab eine weitestgehende Übereinstimmung der MHK-Werte und ermöglicht in hohem Maße die Übertragung der ermittelten MHK-Werte mit *Candida maltosa* auf die medizinisch relevante Hefe *Candida albicans*. Zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität wurde ein Agardiffusionstest eingesetzt, der ebenfalls wie die Testung der zytotoxischen Aktivität gegenüber einer humanen Blasenkrebszelllinie in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Lindequist durchgeführt wurde.

5. Die neu synthetisierten Verbindungen wiesen sowohl eine antibakterielle und antifungale Aktivität als auch eine zytotoxische Wirkung auf. Die Dimere zeigten eine antibakterielle und antifungale Wirkung während die Trimere keine oder nur vereinzelt eine antimikrobielle Wirkung aufwiesen. Die getesteten Zyklisierungsprodukte zeigten meist nur geringe hemmende Wirkung auf *Candida maltosa*. Neben der antimikrobiellen Aktivität wiesen die Dimere auch eine mittlere bis starke zytotoxische Aktivität auf, die wahrscheinlich nur z.T. der Grund für die antimikrobielle Wirkung ist. Diese Annahme wurde anhand der Ergebnisse der diaminierten Produkte und Zyklisierungsprodukte bestätigt. Gerade bei diesen Produkten wurde meist eine mittlere Zytotoxizität nachgewiesen aber keine oder nur eine sehr geringe antimikrobielle Wirkung, sodass die erfaßte Zytotoxizität bei der antimikrobiellen Aktivität offenbar nur eine untergeordnete Rolle spielt. In einzelnen Fällen wurde auch eine Amplifizierung der biologischen Wirkung der Produkte, verglichen mit den Ausgangsstoffen, nachgewiesen. Zudem konnte anhand der Synthese und Testung von Phenylalanin-Derivaten und des Vergleiches mit den entsprechenden Morpholin-Derivaten die antimikrobielle und zytotoxische Wirkung auf den Morpholin-Anteil der heteromolekularen Produkte zurückgeführt werden.

Potential der Laccase zur Herstellung von Biomaterialien

Die Synthese von Wirkstoffen und Biomaterialien erfordert detailierte Kenntnisse über den Reaktionsablauf der laccasevermittelten Kopplung. Als Vorbild für die Herstellung von Biomaterialien diente der von marinen Muscheln zur Anheftung an den Untergrund gebildete Klebstoff, der durch Polymerisationsreaktionen von Peptiden entsteht. Im Rahmen der Dissertation wurden Grundlagen für die laccasevermittelte Synthese von Polymeren, ergänzend zu Resultaten des Landesforschungsschwerpunkts M/V "Neue Wirkstoffe und Biomaterialien" (Teilprojekt 2.1), untersucht. Derartige Polymere könnten zur Herstellung von

bioresorbierbaren Klebstoffen, z.B. für die Gesichtschirurgie zur Klebung von Knochensplittern, genutzt werden.

1. Die Derivatisierung von Aminosäuren und Peptiden mit *para*- und *ortho*-dihydroxylierten aromatischen Substanzen führte zu einem weitergehenden Verständnis des laccasekatalysierten Kopplungsmechanismus. Es wurde die Bildung sowohl von di- und trimeren als auch polymeren Reaktionsprodukten nachgewiesen. So resultierte die laccasevermittelte Reaktion von L-Phenylalanin und 1,4-Hydrochinon in der Bildung von 2-(3,6-Dioxo-cyclohexa-1,4-dienylamino)-3-phenylpropionsäure und 2-[4-(1-Carboxy-2-phenyl-ethylamino)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino]-3-phenylpropionsäure. Die Laccase ermöglichte die Derivatisierung von geschützten aber auch ungeschützen Aminosäuren und Peptiden in einer sogenannten "one pot" Reaktion. Die Produktbildung war vom Substitutionsgrad des dihydroxylierten Reaktionspartners, von der Art der Laccase, dem pH-Wert des eingesetzten Puffers und der Konzentration des Aminopartners abhängig.
2. Ein Vergleich der Reaktionen mit Laccase und dem chemischen Katalysator Natriumiodat ergab für die Reaktionen der Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tryptophan mit 2,5-Dihydroxyacetophenon einen klaren Vorteil der Laccase. So konnten im Gegensatz zu den Reaktionen mit Natriumiodat (6 mM) nur mittels Laccase mono- und diaminierte Produkte nachgewiesen werden. Bei der Produktbildung aus einfachen Hydrochinonen und L-Phenylalanin bestanden die Unterschiede v.a. in der Ausbeute der Produkte, wobei z.T. die laccasekatalysierten Reaktionen im Vorteil waren.

Die Ergebnisse der einzelnen Reaktionen belegen, dass eine effektive Derivatisierung von verschiedenen Substanzklassen mit Hilfe der Laccase als einem biologischen Katalysator möglich ist. Die relativ einfach durchführbare und effiziente laccasevermittelte Reaktion kann dabei auch für die Herstellung von neuartigen Verbindungen mit biologischer Wirkung genutzt werden. Die weitere Charakterisierung der Wirkstoffe wird zeigen, ob und inwieweit diese Verbindungen konkurrenzfähig gegenüber Standardverbindungen sind, die in der Human- und Veterinärmedizin aber auch der Landwirtschaft eingesetzt werden.

7 Literaturverzeichnis

Die in den Publikationen und Manuskripten (Kapitel 4.1 - 4.10) zitierten Arbeiten sind in diesem Literaturverzeichnis nicht gesondert aufgeführt.

d'Acunzo, F., Galli, C., Masci, B. (2002) Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems - Solubility and steric issues. Eur. J. Biochem. 269(21): 5330-5335.

Agematu, H., Tsuchida, T., Kominato, K., Shibamoto, N., Yoshioka, T., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T., Murao, S. (1993a) Enzymatic dimerization of penicillin X. J. Antibiot. 46(1). 141-148.

Agematu, H., Kominato, K., Shibamoto, N., Yoshioka, T., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T., Murao, S. (1993b) Transformation of 7-(4-hydroxyphenylacetamido)cephalosporanic acid into a new cephalosporin antibiotic, 7-[1-oxaspiro(2.5)octa-6-oxo-4,7-diene-2-carboxamido]cephalosporanic acid, by laccase. Biosci. Biotech. Biochem. 57(8): 1387-1388.

Agematu, H., Shibamoto, N., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T., Murao, S. (1993c) Oxidative decarboxylations of 4-hydroxymandelic acid and 2-(4-hydroxyphenyl)glycine by laccase from *Coriolus versicolor* and bilirubin oxidases from *Trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria*. Biosci. Biotech. Biochem. 57(11): 1877-1881.

Agematu, H., Shibamoto, N., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T., Murao, S. (1992) *Coriolus versicolor* laccase catalyzes the decarboxylation of 2-(4-hydroxyphenyl)-glycine and 4-hydroxymandelic acid. Biosci. Biotech. Biochem. 56(7): 1176-1177.

Ahn, M.-Y., Dec, J., Kim, J.-E., Bollag, J.-M. (2002) Treatment of 2,4-dichlorphenol polluted soil with free and immobilized laccase. J. Environ. Qual. 31: 1509-1515.

Alqareer, A., Alyahya, A., Andersson, L. (2006) The effect of clove and benzocaine versus placebo as topical anesthetics. J. Dent. 34: 747-750.

Amir, L., Tam, T.K., Pita, M., Meijler, M.M., Alfonta, L., Katz, E. (2009) Biofuel cell controlled by enzyme logic systems. J. Am. Chem. Soc. 131(2): 826-832.

Anyanwutaku, I.O., Petroski, R.J., Rosazza, J.P.N. (1994) Oxidative coupling of mithramycin and hydroquinone catalyzed by copper oxidases and benzoquinone. Implications for the mechanism of action of aureolic acid antibiotics. Bioorg. Med. Chem. 2(6): 543-551.

Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Beeman, R.W., Kanost, M.R., Kramer, K.J. (2005) Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(32): 11337-11342.

Arcamone, F.M., Animati, F., Barbieri, B., Configliacchi, E., D'Alessio, R., Geroni, C., Giuliani, F.C., Lazzari, E., Menozzi, M., Mongelli, N., Penco, S., Verini, M.A. (1989) Synthesis, DNA-binding properties, and antitumor activity of novel distamycin derivatives. J. Med. Chem. 32(4): 774-778.

Balakshin, M., Chen, C.-L., Gratzl, J.S., Kirkman, A.G., Jakob, H. (2001) Biobleaching of pulp with dioxygen in the laccase-mediator system - Effect of variables on the reaction kinetics. J. Mol. Catal. B: Enzym. 16: 205-215.

Baldrian, P. (2006) Fungal laccases - occurrence and properties. FEMS Microbiol. Rev. 30: 215-242.

Baloch, R.I., Mercer, E.I. (1987) Inhibition of sterol ^{8}-Δ^{7}-isomerase and Δ^{14}-reductase by fenpropimorph, tridemorph and fenpropidin in cell-free enzyme systems from *Saccharomyces cerevisiae*. Phytochemistry 26(3): 663-668.

Baloch, R.I., Mercer, E.I., Wiggins, T.E., Baldwin, B.C. (1984) Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Ustilago maydis* by tridemorph, fenpropimorph and fenpropidin. Phytochemistry 23(10): 2219-2226.

Bar-Nun, N., Lev, A.T., Harel, E., Mayer, A.M. (1988) Repression of laccase formation in *Botrytis cinerea* and its possible relation to phytopathogenicity. Phytochemistry 27(8): 2505-2509.

Barry, C.E., Nayar, P.G., Begley, T.P. (1989) Phenoxazinone synthase: Mechanism for the formation of the phenoxazinone chromophore of actinomycin. Biochemistry 28(15): 6323-6333.

Bauer, C.G., Kühn, A., Gajovic, N., Skorobogatko, O., Holt, P.-J., Bruce, N.C., Makower, A., Lowe, C.R., Scheller, F.W. (1999) New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. Fresenius J. Anal. Chem. 364: 179-183.

Behrend, D., Schmitz, K.P., Sternberg, K., Kramer, S., Schmohl, H., Schauer, F., Manda, K., Mikolasch, A., Lindequist, U., Jülich, W.D., Schomburg, J., Schultz, C. (2006) Neue Mittel zur Blutstillung und Klebstoffe für medizinische Anwendungen. DP 10 2006 006 904.8.

Bell, A.A., Wheeler, M.H. (1986) Biosynthesis and functions of fungal melanins. Ann. Rev. Phytopathol. 24: 411-451.

Benfield, G., Bocks, S.M., Bromley, K., Brown, B.R. (1964) Studies of fungal and plant laccases. Phytochemistry 3: 79-88.

Berger, S., Hertl, P., Rieker, A. (1988) Physical and chemical analysis of quinones. In: Patai, S., Rappoport, Z. (Ed.) The chemistry of the quinoid compounds. John Wiley and Sons Ltd., New York. 2. 29-86.

Bertrand, G. (1894) Recherches sur le latex de l'arbe à laque du Tonkin. B. Soc. Chim. Fr. 385: 717-721.

Bertrand, G. (1895) Sap of the lac tree. B. Soc. Chim. Fr. 11(3): 717-721.

Bertrand, G. (1931) Über die physiologische Bedeutung des Mangans und anderer Elemente, die sich in den Organismen spurenweise vorfinden. Z. Angew. Chem. 44(47): 917-928.

Bertrand, T., Jolivalt, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., Mougin, C. (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. Biochemistry 41: 7325-7333.

Bhalerao, U.T., Muralikrishna, C., Rani, B.R. (1994) Laccase enzyme catalysed efficient synthesis of 3-substituted-1,2,4-triazolo(4,3-b)(4,1,2)benzothiadiazine-8-ones. Tetrahedron 50(13): 4019-4024.

Bhat, M.K. (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnol. Adv. 18(5): 355-383.

Blaszczak, W., Sadowska, J., Rosell, C.M., Fornal, J. (2004) Structural changes in the wheat dough and bread with the addition of alpha-amylases. Eur. Food Res. Technol. 219(4): 348-354.

Bocks, S.M., Cambie, R.C. (1963) The enzymic coupling of totarol. Proc. Chem. Soc. Lond. (May): 143.

Bohacek, R.S., McMartin, C., Guida, W.C. (1996) The art and practice of structure-based drug design: A molecular modeling perspective. Med. Res. Rev. 16(1): 3-50.

Bollag, J.-M. (1992a) Decontaminating soil with enzymes. Environ. Sci. Technol. 26: 1876-1881.

Bollag, J.-M. (1992b) Enzymes catalyzing oxidative coupling reactions of pollutants. Met. Ions Biol. Syst. 28: 205-217.

Bollag, J.-M., Chu, H.-L., Rao, M.A., Gianfreda, L. (2003) Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. J. Environ. Qual. 32(1): 63-69.

Bollag, J.M., Leonowicz, A. (1984) Comparative studies of extracellular fungal laccase. Appl. Environ. Microbiol. 48(4): 849-854.

Bollag, J.-M., Liu, S.-Y. (1985) Copolymerization of halogenated phenols and syringic acid. Pestic. Biochem. Physiol. 23(2): 261-272.

Bollag, J.-M., Liu, S.-Y., Minard, R.D. (1979) Asymmetric diphenol formation by a fungal laccase. Appl. Environ. Microbiol. 38(1): 90-92.

Bollag, J.-M., Shuttleworth, K.L., Anderson, D.H. (1988) Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 54(2): 3086-3091.

Bollag, J.-M., Sjoblad, R.D., Minard, R.D. (1977) Polymerization of phenolic intermediates of pesticides by a fungal enzyme. Experientia 33(12): 1564-1566.

Bourbonnais, R., Paice, M.G. (1990) Oxidation of non-phenolic substrates - An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Lett. 267: 99-102.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, D., Lanthier, P., Yaguchi, M. (1995) Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. Appl. Environ. Microbiol. 61(5): 1876-1880.

Brenna, O., Bianchi, E. (1994) Immobilized laccase for phenolic removal in must and wine. Biotechnol. Lett. 16(1): 35-40.

Brown, B.R. (1967) Biochemical aspects of oxidative coupling of phenols. Chapter 4. In: Taylor, W.J., Battersby, A.R. (Ed.) Oxidative coupling of phenols. Marcel Dekker, New York. 167-201.

Bruyneel, F., Enaud, E., Billottet, L., Vanhulle, S., Marchand-Brynaert, J. (2008) Regioselective synthesis of 3-hydroxyorthanilic acid and its biotransformation into a novel phenoxazinone dye by use of laccase. Eur. J. Org. Chem. 1: 72-79.

Buchert, J., Ranua, M., Kantelinen, A., Viikari, L. (1992) The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of pine kraft pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 825-829.

Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C., Arnold, F.H. (2003) Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. Appl. Environ. Microbiol. 69(2): 987-995.

Burzio, L.O., Burzio, V.A., Silva, T., Burzio, L.A., Pardo, J. (1997) Environmental bioadhesion: Themes and applications. Curr. Opin. Biotechnol. 8(3): 309-312.

Butterworth, J. F., Strichartz, G.R. (1990) Molecular mechanisms of local anesthesia: A review. Anesthesiology 72(4): 711-734.

Call, H.P., Mücke, I. (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). J. Biotechnol. 53: 163-202.

Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A., Gubitz, G.M. (2001) Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. J. Biotechnol. 89(2-3): 131-139.

Carrea, G., Riva, S. (2000) Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. Angew. Chem. Int. Ed. 39: 2226-2254.

Chapyshev, S.V., Ibata, T. (1996) New type of quinone-quinone complexation in the reaction of 2,5-dichloro-1,4-benzoquinone with morpholine at high pressure. Russ. Chem. Bull. 45(2): 469-470.

Chen, T., Barton, S.C., Binyamin, G., Gao, Z.Q., Zhang, Y.C., Kim, H.H., Heller, A. (2001) A miniature biofuel cell. J. Am. Chem. Soc. 123(35): 8630-8631.

Chivukula, M., Renganathan, V. (1995) Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4374-4377.

Cho, N.S., Kim, D.H., Cho, H.Y., Ohga, S., Leonowicz, A. (2006) Effect of various compounds on the activity of laccases from basidiomycetes and their oxidative and demethoxylating activities. J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 51(2): 211-218.

Chung, J.E., Kurisawa, M., Tachibana, Y., Uyama, H., Kobayashi, S. (2003a) Enzymatic synthesis and antioxidant property of poly(allylamine)-catechin conjugate. Chem. Lett. 32: 620–621.

Chung, J.E., Kurisawa, M., Uyama, H., Kobayashi, S. (2003b) Enzymatic synthesis and antioxidant property of gelatin-catechin conjugates. Biotechnol. Lett. 25(23). 1993-1997.

Ciecholewski, S., Hammer, E., Manda, K., Bose, G., Nguyen, V.T.H., Langer, P., Schauer, F. (2005) Laccase-catalyzed carbon-carbon bond formation: oxidative dimerization of salicylic esters by air in aqueous solution. Tetrahedron 61(19): 4615-4619.

Clària, J., Romano, M. (2005) Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer. Curr. Pharm. Des. 11(26): 3431-3447.

Clarkson, C., Musonda, C.C., Chibale, K., Campbell, W.E., Smith, P. (2003) Synthesis of totarol amino alcohol derivatives and their antiplasmodial activity and cytotoxicity. Bioorg. Med. Chem. 11: 4417-4422.

Claus, H. (2003) Laccases and their occurrence in prokaryotes. Arch. Microbiol. 179(3): 145-150.

Claus, H. (2004) Laccases: structure, reactions, distribution. Micron 35(1-2): 93-96.

Collins, P.J., Dobson, A.D.W. (1997) Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 63(9): 3444-3450.

Coman, V., Vaz-Dominguez, C., Ludwig, R., Harreither, W., Haltrich, D., De Lacey, A.L., Ruzgas, T., Gorton, L., Shleev, S. (2008) A membrane-, mediator-, cofactor-less glucose/oxygen biofuel cell. Phys. Chem. Chem. Phys. 10: 6093-6096.

Couto, S.R., Herrera, J.L.T. (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. Biotechnol. Adv. 24: 500-513.

Couto, S.R., Toca-Herrera, J.L. (2007) Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. Biotechnol. Adv. 25: 558-569.

Dec, J., Haider, K., Bollag, J.-M. (2003) Release of substituents from phenolic compounds during oxidative coupling reactions. Chemosphere 52(3): 549-556.

Deming, T.J. (2007) Synthetic polypeptides for biomedical applications. Prog. Polym. Sci. 32(8-9): 858-875.

Deng, L., Wang, F., Chen, H.J., Shang, L., Wang, L., Wang, T., Dong, S.J. (2008) A biofuel cell with enhanced performance by multilayer biocatalyst immobilized on highly ordered macroporous electrode. Biosens. Bioelectron. 24: 329-333.

Deuflhard, P. (2001) From molecular dynamics to conformational dynamics in drug design. In: Brandt, A., Bernholc, J., Binder, K. (Ed.) NATO science series, sub-series III: Computer and systems sciences. 177: 306-308.

Deuflhard, P., Schütte, C. (2003) Molecular conformation dynamics and computational drug design. In: Hill, J.M., Moore, R. (Ed.) Applied mathematics entering the 21st century: invited talks from the ICIAM 2003 Congress. 91-119. SIAM, 2004.

Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P., Bally, R. (2000) Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. Soil Biol. Biochem. 32(7): 919-927.

Dittmer, J.K., Patel, N.J., Dhawale, S.W., Dhawale, S.S. (1997) Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. FEMS Microbiol. Lett. 149: 65-70.

Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H., Zhu, Y.C., Gorman, M.J., Kramer, K.J., Kanost, M.R. (2004) Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. Insect Biochem. Mol. Biol. 34(1): 29-41.

Domínguez, A., Gómez, J., Lorenzo, M., Sanromán, A. (2007) Enhanced production of laccase activity by *Trametes versicolor* immobilized into alginate beads by the addition of different inducers. World J. Microbiol. Biotechnol. 23: 367-373.

Durán, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A, Gianfreda, L. (2002) Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: A review. Enzyme Microb. Technol. 31(7): 907-931.

Eagon, R.G., McManus, A.T. (1990) The effect of mafenide on dihydropteroate synthase. J. Antimicrob. Chemother. 25(1): 25-29.

Eggert, C. (1997) Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid is responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. Microbiol. Res. 152: 315-318.

Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E.L. (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. Appl. Environ. Microbiol. 62(4): 1151-1158.

Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L. (1995) Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. FEBS Lett. 376: 202-206.

Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriques, A.O., Carrondo, M.A. (2003) Crystal structure of a bacterial endospore coat component - A laccase with enhanced thermostability properties. J. Biol. Chem. 278(21): 19416-19425.

Erwin, M.E., Jones, R.N., Barrett, M.S., Briggs, B.M., Johnson, D.M. (1991) In vitro evaluation of GR69153, a novel catechol-substituted cephalosporin. Antimicrob. Agents Chemother. 35(5): 929-937.

Evans, D.E., Li, C.D., Eglinton, J.K. (2008) Improved prediction of malt fermentability by measurement of the diastatic power enzymes beta-amylase, alpha-amylase, and limit dextrinase: I. Survey of the levels of diastatic power enzymes in commercial malts. J. Am. Soc. Brew. Chem. 66(4): 223-232.

Ferry, Y., Leech, D. (2005) Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic substrate recycling at a laccase electrode. Electroanalysis 17(2): 113-119.

Finley, K. (1988) In: Patai, S., Rappoport, Z. (Ed.) The chemistry of the quinoid compounds. John Wiley and Sons Ltd, New York. 2: 537-717.

Fukuda, T., Uchida, H., Suzuki, M., Miyamoto, H., Morinaga, H., Nawata, H., Uwajima, T. (2004) Transformation products of bisphenol A by a recombinant *Trametes villosa* laccase and their estrogenic activity. J. Chem. Technol. Biotechnol. 79: 1212-1218.

Fukuda, T., Uchida, H., Takashima, Y., Uwajima, T., Kawabata, T., Suzuki, M. (2001) Degradation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 284: 704-706.

Gaby, A.R. (2006) Natural remedies for *Herpes simplex*. Altern. Med. Rev. 11(2): 93-101.

Galante, Y.A., Formantici, C. (2003) Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries. Curr. Org. Chem. 7(13): 1399-1422.

Garcia-Borron, J.C., Solano, F. (2002) Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: Beyond the histidine-bound metal catalytic center. Pigment Cell Res. 15(3): 162-173.

Garg, S.K., Johri, B.N. (1993) Immobilization of milk-clotting proteases. World J. Microbiol. Biotechnol. 9: 139-144.

Gianfreda, L., Iamarino, G., Scelza, R., Rao, M.A. (2006) Oxidative catalysts for the transformation of phenolic pollutants: a brief review. Biocatal. Biotransform. 24(3): 177-187.

Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.-M. (1999) Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediat. J. 3(1): 1-25.

Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M.L., Bally, R. (1993) Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. FEMS Microbiol. Lett. 108(2): 205-210.

Glykys, D.J., Banta, S. (2009) Metabolic control analysis of an enzymatic biofuel cell. Biotechnol. Bioeng. 102(6): 1624-1635.

Goldberg, I.H., Rabinowicz, M., Reich, E. (1962) Basis of actinomycin action, I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2094-2101.

Gómez, B.L., Nosanchuk, J.D. (2003) Melanin and fungi. Curr. Opin. Infect. Dis. 16(2): 91-96.

Gómez, B.L., Nosanchuk, J.D., Díez, S., Youngchim, S., Aisen, P., Cano, L.E., Restrepo, A., Casadevall, A., Hamilton, A.J. (2001) Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. Infect. Immun. 69(9): 5760-5767.

Gripenberg, J. (1951) Fungus Pigments. 1. Cinnabarin, a colouring matter from *Trametes cinnabarina* Jacq. Acta Chem. Scand. 5: 590-595.

Hahn, V., Davids, T., Lalk, M., Schauer, F., Mikolasch, A. (2009a) Enzymatic cyclizations using laccases: Multiple bond formation between dihydroxybenzoic acid derivates and aromatic amines. Green Chemistry, Manuskript eingereicht.

Hahn, V., Mikolasch, A., Manda, K., Gördes, D., Thurow, K., Schauer, F. (2009b) Laccase-catalyzed carbon–nitrogen bond formation: Coupling and derivatization of unprotected L-phenylalanine with different *para*-hydroquinones. Amino Acids 37(2): 315-321.

Hahn, V., Mikolasch, A., Manda, K., Gördes, D., Thurow, K., Schauer, F. (2009c) Derivatization of amino acids by fungal laccases: Comparison of enzymatic and chemical methods. J. Mol. Catal. B: Enzym. 60: 76-81.

Hahn, V., Mikolasch, A., Wende, K., Bartrow, H., Lindequist, U., Schauer, F. (2009d) Synthesis of model morpholine derivatives with biological activities by laccase-catalyzed reactions. Biotechnol. Appl. Biochem. DOI: 10.1042/BA20090219.

Hahn, V., Mikolasch, A., Wende, K., Bartrow, H., Lindequist, U., Schauer, F. (2009e) Derivatization of 1-aminobenzotriazole using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila* influenced by methanol and biological evaluation of the derivatives. Biotechnol. Appl. Biochem., Manuskript eingereicht.

Heinzkill, M., Messner, K. (1997) The ligninolytic system of fungi. In: Anke, T. (Ed.) Fungal biotechnology. Chapman & Hall, Weinheim. 213-227.

Hermann, T.E., Kurtz, M.B., Champe, S.P. (1983) Laccase localized in hülle cells and cleisthothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. J. Bacteriol. 154(2): 955-964.

Hiramatsu, R., Hara, T., Akimoto, H., Takikawa, O., Kawabe, T., Isobe, K.I., Nagase, F. (2008) Cinnabarinic acid generated from 3-hydroxyanthranilic acid strongly induces apoptosis in thymocytes through the generation of reactive oxygen species and the induction of caspase. J. Cell. Biochem. 103(1): 42-53.

Hitchcock, C.A., Brown, S.B., Evans, E.G.V., Adams, D.J. (1989) Cytochrome P-450-dependent 14α-demethylation of lanosterol in *Candida albicans*. Biochem. J. 260: 549-556.

Hoff, T., Liu, S.Y., Bollag, J.-M. (1985) Transformation of halogen-, alkyl-, and alkoxy-substituted anilines by a laccase of *Trametes versicolor.* Appl. Environ. Microbiol. 49(5): 1040-1045.

Hölker, U., Dohse, J., Hofer, M. (2002) Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. Folia Microbiol. 47(4): 423-427.

Hosny, M., Rosazza, J.P.N. (2002) Novel oxidations of (+)-catechin by horseradish peroxidase and laccase. J. Agric. Food Chem. 5: 5539-5545.

Huang, J., Fang, H., Liu, C., Gu, E., Jiang, D.S. (2008) A novel fiber optic biosensor for the determination of adrenaline based on immobilized laccase catalysis. Anal. Lett. 41(8): 1430-1442.

Hullo, M.-F., Moszer, I., Danchin, A., Martin-Verstraete, I. (2001) CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. J. Bacteriol. 183(18): 5426-5430.

Iimura, Y., Hartikainen, P., Tatsumi, K. (1996) Dechlorination of tetrachloroguaiacol by laccase of the white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 434-439.

Ikeda, R., Sugita, T., Jacobson, E.S., Shinoda, T. (2003) Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. Microbiol. Immunol. 47(4): 271-277.

Ikeda, R., Tanaka, H., Oyabu, H., Uyama, H., Kobayashi, M. (2001) Preparation of artificial urushi via an environmentally benign process. Bull. Chem. Soc. Jpn. 74: 1067-1073.

Ikeda, R., Tsujimoto, T., Tanaka, H., Oyabu, H., Uyama, H., Kobayashi, S. (2000) Man-made urushi - preparation of crosslinked polymeric films from renewable resources via air-oxidation processes. Proc. Japan Acad. 76(B): 155-160.

Johannes, C., Majcherczyk, A. (2000) Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. Appl. Environ. Microbiol. 66(2): 524-528.

Jonas, U., Hammer, E., Haupt, E.T.K., Schauer, F. (2000) Characterization of coupling products formed by biotransformation of biphenyl and diphenyl ether by white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. Arch. Microbiol. 174(6): 393-398.

Jonas, U., Hammer, E., Schauer, F., Bollag, J.-M. (1997) Transformation of 2-hydroxydibenzofuran by laccases of white rot fungi *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus* and characterization of oligomerization products. Biodegradation 8: 321-328.

Jones, R.N., Erwin, M.E. (1992) In vitro evaluation of Ro 09-1227, a novel catechol-substituted cephalosporin. Antimicrob. Agents Chemother. 36(1): 233-238.

Kagiyama, T., Glushakov, A.V., Sumners, C., Roose, B., Dennis, D.M., Phillips, M.I., Ozcan, M.S., Seubert, C.N., Martynyuk, A.E. (2004) Neuroprotective action of halogenated derivatives of L-phenylalanine. Stroke 35: 1192-1196.

Kallmayer, H.J., Fritzen, W. (1987) Quinone-amine reactions. 25. 2-Amino-3,5,6-tribromo-1,4-benzoquinones and their instability in daylight. Arch. Pharm. 320(9): 769-775.

Kantelinen, A., Hatakka, A., Viikari, L. (1989) Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlebia radiata*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 234-239.

Kawai, S., Umezawa, T., Higuchi, T. (1988) Degradation mechanisms of phenolic *β*-1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. Arch. Biochem. Biophys. 262(1): 99-110.

Keilin, D., Mann, T. (1939) Laccase, a blue copper-protein oxidase from the latex of *Rhus succedanea*. Nature 143(3610): 23-24.

Keller, U. (1984) Acyl pentapeptide lactone synthesis in actinomycin-producing Streptomycetes by feeding with structural analogs of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid. J. Biol. Chem. 259(13): 8226-8231.

Kelly, T.J., Smith, D.L., Satola, J. (1999) Emission rates of formaldehyde from materials and consumer products found in California homes. Environ. Sci. Technol. 33(1): 81-88.

Keskin, S.O., Sumnu, G., Sahin, S. (2004) Usage of enzymes in a novel baking process. Nahrung-Food 48(2): 156-160.

Kim, S.Y., Zille, A., Murkovic, M., Güebitz, G., Cavaco-Paulo, A. (2007) Enzymatic polymerization on the surface of functionalized cellulose fibers. Enzyme Microb. Technol. 40: 1782-1787.

Klopman, G., Shi, L.M., Ramu, A. (1997) Quantitative structure-activity relationship of multidrug resistance reversal agents. Mol. Pharmacol. 52(2): 323-334.

Kluczyk, A., Popek, T., Kiyota, T., de Macedo, P., Stefanowicz, P., Lazar, C., Konishi, Y. (2002) Drug evolution: *p*-aminobenzoic acid as a building block. Curr. Med. Chem. 9(21): 1871-1892.

Kobayashi, S., Uyama, H., Ikeda, R. (2001a) Artificial urushi. Chem. Eur. J. 7(22): 4755-4760.

Kobayashi, S., Uyama, H., Kimura, S. (2001b) Enzymatic polymerization. Chem. Rev. 101(12): 3793-3818.

Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., Bieron, M. (2008) Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. Microchem. J. 89: 171-174.

Kollmann, A., Boyer, F.D., Ducrot, P.H., Kerhoas, L., Jolivalt, C., Touton, I., Einhorn, J., Mougin, C. (2005) Oligomeric compounds formed from 2,5-xylidine (2,5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in *Trametes versicolor* ATCC 32745. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68: 251-258.

Kramer, K.J., Kanost, M.R., Hopkins, T.L., Jiang, H., Zhu, Y.C., Xu, R., Kerwin, J.L., Turecek, F. (2001) Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. Tetrahedron 57: 385-392.

Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D. (1993) Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinology 132(6): 2279-2286.

Krymchantowski, A.V., Barbosa, J.S., Cheim, C., Alves, L.A. (2001) Oral lysine clonixinate in the acute treatment of migraine - A double-blind placebo-controlled study. Arq. Neuropsiquiatr. 59(1): 46-49.

Krymchantowski, A.V., Carneiro, H., Barbosa, J., Jevoux, C. (2008) Lysine clonixinate versus dipyrone (metamizole) for the acute treatment of severe migraine attacks: A single-blind, randomized study. Arq. Neuropsiquiatr. 66(2-A): 216-220.

Kubo, I., Muroi, H., Himejima, M. (1992) Antibacterial activity of totarol and its potentiation. J. Nat. Prod. 55(10): 1436-1440.

Kudanga, T., Prasetyo, E.N., Sipila, J., Nousiainen, P., Widsten, P., Kandelbauer, A., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G. (2008) Laccase-mediated wood surface functionalization. Eng. Life Sci. 8(3): 297-302.

Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F.J., Ballesteros, A., Alcalde, M. (2008) Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. Microb. Cell Fact. 7:32 doi:10.1186/1475-2859-7-32.

Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H., Kobayashi, S. (2003a) Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). Biomacromolecules 4(5): 1394-1399.

Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H., Kobayashi, S. (2003b) Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin). Macromol. Biosci. 3: 758-764.

Kuznetsov, V.D., Filippova, S.N., Rybakova, A.M. (1984) Nature of the brown pigment and the composition of the phenol oxidases of *Streptomyces galbus*. Mikrobiologiia 53: 251–256.

Kuznetsov, B.A., Shumakovich, G.P., Koroleva, O.V., Yaropolov, A.I. (2001) On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. Biosens. Bioelectron. 16: 73-84.

Lang, G., Cotteret, J. (1999) Hair dye composition containing a laccase. (L'Oreal, Fr.). Int. Pat. Appl. WO9936036.

de Lange, P., Senese, R., Cioffi, F., Moreno, M., Lombardi, A., Silvestri, E., Goglia, F., Lanni, A. (2008) Rapid activation by 3,5,3 '-L-triiodothyronine of adenosine 5 ' 3-monophosphate-activated protein kinase/acetyl-coenzyme A carboxylase and akt/protein kinase B signaling pathways: relation to changes in fuel metabolism and myosin heavy-chain protein content in rat gastrocnemius muscle in vivo. Endocrinology 149(12): 6462-6470.

Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A., de Lange, P., Silvestri; E., Ragni, M., Farina, P., Baccari, G.C., Fallahi, P., Antonelli, A., Goglia, F. (2005) 3,5-diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats. FASEB J. 19(11): 1552-1554.

Lante, A., Crapisi, A., Pasini, G., Zamorani, A., Spettoli, P. (1992) Immobilized laccase for must and wine processing. Ann N.Y. Acad. Sci. 672 (Enzyme Engineering XI): 558–562.

Lee, I.Y., Jung, K.H., Lee, C.H., Park, Y.H. (1999) Enhanced production of laccase in *Trametes vesicolor* by the addition of ethanol. Biotechnol. Lett. 21: 965-968.

Leonowicz, A., Cho, N.-S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., Rogalski, J. (2001) Fungal laccase: Properties and activity on lignin. J. Basic Microbiol. 41(3-4): 185-227.

Leonowicz, A., Edgehill, R.U., Bollag, J.-M. (1984) The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. Arch. Microbiol. 137: 89-96.

Leonowicz, A., Grzywnowicz, K., Malinowska, M. (1979) Oxidative and demethylating activity of multiple forms of laccase from *Pholiota mutabilis*. Acta Biochim. Polon. 26(4): 431-434.

Leonowicz, A., Trojanowski, J., Nowak, G. (1972) Ferulic acid as inductor of messenger RNA synthesis related to laccase formation in wood rotting fungus *Pleurotus ostreatus*. Microbios 6(21): 23-28.

Leontievsky, A.A., Myasoedova, N.M., Baskunov, B.P., Golovleva, L.A., Bucke, C., Evans, C.S. (2001) Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 85-91.

Leontievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N., Golovleva, L. (1997a) "Yellow" laccase of Panus tigrinus oxidizes non-phenolic substates without electron-transfer mediators. FEBS Lett. 413: 446-448.

Leontievsky, A.A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J.K., Pozdnyakova, N.N., Myasoedova, N.M., Kalkkinen, N., Golovleva, L.A., Cammack, R., Thurston, C.F., Hatakka, A. (1997b) Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. FEMS Microbiol. Lett. 156: 9-14.

Lerner, A.B., Fitzpatrick, T.B., Calkins, E., Summerson, W.H. (1950) Mammalian tyrosinase: The relationship of copper to enzymatic activity. J. Biol. Chem. 187(2): 793-802.

Li, K.C., Xu, F., Eriksson, K.E.L. (1999) Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. Appl. Environ. Microbiol. 65(6): 2654-2660.

Lombardi, A., de Lange, P., Silvestri, E., Busiello, R.A., Lanni, A., Goglia, F., Moreno, M. (2009) 3,5-Diiodo-L-thyronine rapidly enhances mitochondrial fatty acid oxidation rate and thermogenesis in rat skeletal muscle: AMP-activated protein kinase involvement. Am. J. Physiol. 296(3): E497-E502.

Lugaro, G., Carrea, G., Cremonesi, P., Casellato, M.M., Antonini, E. (1973) The oxidation of steroid hormones by fungal laccase in emulsion of water and organic solvents. Arch. Biochem. Biophys., 159(1): 1-6.

Mai, C., Schormann, W., Hüttermann, A. (2001) Chemo-enzymatically induced copolymerization of phenolics with acrylate compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: 177-186.

Manda, K., Gördes, D., Mikolasch, A., Hammer, E., Schmidt, E., Thurow, K., Schauer, F. (2007) Carbon-oxygen bond formation by fungal laccases: cross-coupling of 2,5-dihydroxy-*N*-(2-hydroxyethyl)-benzamide with the solvents water, methanol, and other alcohols. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76: 407-416.

Manda, K., Hammer, E., Mikolasch, A., Gördes, D., Thurow, K., Schauer, F. (2006) Laccase-induced derivatization of unprotected amino acid L-tryptophan by coupling with *p*-hydroquinone 2,5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide. Amino Acids 31: 409-419.

Manda, K., Hammer, E., Mikolasch, A., Niedermeyer, T., Dec, J., Jones, A.D., Benesi, A.J., Schauer, F., Bollag, J.-M. (2005) Laccase-induced cross-coupling of 4-aminobenzoic acid with *para*-dihydroxylated compounds 2,5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide and 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester. J. Mol. Catal. B-Enzym. 35(4-6): 86-92.

Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G.H., Henriques, A.O. (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. J. Biol. Chem. 277(21): 18849-18859.

Maurer, K.-H. (2004) Detergent proteases. Curr. Opin. Biotechnol. 15: 330-334.

Maxwell, A.J., Cooke, J.P. (1998) Cardiovascular effects of L-arginine. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 7: 63-70.

Mayer, A.M., Staples, R.C. (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry 60(6): 551-565.

Mercer, E.I. (1991) Morpholine antifungals and their mode of action. Biochem. Soc. Trans. 19(3): 788-793.

Messerschmidt, A. (1993) Blue copper oxidases. Adv. Inorg. Chem. 40: 121-185.
Meyers, S. (2000) Use of neurotransmitter precursors for treatment of depression. Altern. Med. Rev. 5(1): 64-71.

Meza, J.C., Auria, R., Lomascolo, A., Sigoillot, J.C., Casalot, L. (2007) Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in *Pycnoporus cinnabarinus* ss3. Enz. Microb. Technol. 41: 162-168.

Michalek, H., Szarkowska, L. (1959) The quinose-amino acid complexes and polyphenolase. Acta Biochim. Pol. 6(4): 399-409.

Mikolasch, A., Hammer, E., Jonas, U., Popowski, K., Stielow, A., Schauer, F. (2002) Synthesis of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propionic acid derivatives by N-coupling of amines using laccase. Tetrahedron 58: 7589-7593.

Mikolasch, A., Hessel, S., Gesell-Salazar, M., Neumann, H., Manda, K., Gördes, D., Schmidt, E., Thurow, K., Hammer, E., Lindequist, U., Beller, M., Schauer, F. (2008a) Synthesis of new *N*-analogous corollosporine derivatives with antibacterial activity by laccase-catalyzed amination. Chem. Pharm. Bull. 56(6): 781-786.

Mikolasch, A., Matthies, A., Lalk, M., Schauer, F. (2008b) Laccase-induced C-N coupling of substituted *p*-hydroquinones with *p*-aminobenzoic acid in comparison with known chemical routes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80(3): 389-397.

Mikolasch, A., Niedermeyer, T.H.J., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E., Schauer, F., Gesell, M., Hessel, S., Jülich, W.-D., Lindequist, U. (2006) Novel penicillins synthesized by biotransformation using laccase from *Trametes spec*. Chem. Pharm. Bull. 54(5): 632-638.

Mikolasch, A., Niedermeyer, T.H.J., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E., Schauer, F., Gesell-Salazar, M., Hessel, S., Jülich, W.-D., Lindequist, U. (2007) Novel cephalosporins synthesized by amination of 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives using fungal laccases II.[1)] Chem. Pharm. Bull. 55(3): 412-416.

Mikolasch A., Schauer F. (2009) Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82(4): 605-624.

Mikolasch, A., Wurster, M., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E., Schauer, F., Jülich, W.-D., Lindequist, U. (2008c) Novel *β*-lactam antibiotics synthesized by amination of catechols using fungal laccase.[1)] Chem. Pharm. Bull. 56(7): 902-907.

Minard, R.D., Liu, S.Y., Bollag, J.-M. (1981) Oligomers and quinones from 2,4-dichlorophenol. J. Agric. Food. Chem. 29(2): 250-253.

Minussi, R.C., Pastore, G.M., Durán, N. (2002) Potential applications of laccase in the food industry. Trends Food Sci. Technol. 13: 205-216.

Minussi, R.C., Rossi, M., Bologna, L., Rotilio, D., Pastore, G.M., Durán, N. (2007) Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase. J. Mol. Catal. B: Enzym. 45(3-4): 102-107.

Mochizuki, H., Yamada, H., Oikawa, Y., Murakami, K., Ishiguro, J., Kosuzume, H., Aizawa, N., Mochida, E. (1988) Bactericidal activity of M14659 enhanced in low-iron environments. Antimicrob. Agents Chemother. 32(11): 1648-1654.

Monteiro, M.C., de Carvalho, M.E.A. (1998) Pulp bleaching using laccase from *Trametes versicolor* under high temperature and alkaline conditions. Appl. Biochem. Biotechnol. 70-72: 983-993.

Morioka, H., Takezawa, M., Shibai, H. (1985) Actinomycin V as a potent differentiation inducer of F5-5 friend leukemia cells. Agric. Biol. Chem. 49(10): 2835-2842.

Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I. (2007a) "Blue" laccases. Biochemistry (Mosc) 72(10): 1136-1150.

Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V., Yaropolov, Y.I. (2007b) Laccase-mediator systems and their applications: A review. Appl. Biochem. Microbiol. 43(5): 523-535.

Morris-Jones, R., Gomez, B.L., Diez, S., Uran, M., Morris-Jones, S.D., Casadevall, A., Nosanchuk, J.D., Hamilton, A.J. (2005) Synthesis of melanin pigment by *Candida albicans* in vitro and during infection. Infect. Immun. 73(9): 6147–50.

Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Ogawa, M., Saito, K., Takesawa, T., Kanda, K., Sato, T. (2003) Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. Microbiology-SGM. 149: 2455-2462.

Nakagawa, S., Sanada, M., Matsuda, K., Hashizume, T., Asahi, Y., Ushijima, R., Ohtake, N., Tanaka, N. (1989) In vitro and in vivo antibacterial activities of BO-1341, a new antipseudomonal cephalosporin. Antimicrob. Agents Chemother. 33(9): 1423-1427.

Nakamura, T. (1960) On the process of enzymatic oxidation of hydroquinone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2(2): 111-113.

Ncanana, S., Baratto, L., Roncaglia, L., Riva, S., Burton, S.G. (2007) Laccase-mediated oxidation of totarol. Adv. Synth. Catal. 349: 1507-1513.

Neumann, H.-G., Klinkenberg, E.-D., Schauer, F., Lindequist, U., Juelich, W.-D., Mikolasch, A., Manda, K. (2007) Resorbable calcium phosphate based biopolymer-crosslinked bone replacement material. PCT Int. Appl. WO2007090880

Nicotra, S., Cramarossa, M.R., Mucci, A., Pagnoni, U.M., Riva, S., Forti, L. (2004a) Biotransformation of resveratrol: synthesis of *trans*-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophtora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. Tetrahedron 60: 595-600.

Nicotra, S., Intra, A., Ottolina, G., Riva, S., Danieli, B. (2004b) Laccase-mediated oxidation of the steroid hormone 17ß-estradiol in organic solvents. Tetrahedron: Asymmetry 15: 2927-2931.

Niedermeyer, T.H.J., Lalk, M. (2007) Nuclear amination catalyzed by fungal laccases: Comparison of laccase catalyzed amination with known chemical routes to aminoquinones. J. Mol. Catal. B-Enzym. 45: 113-117.

Niedermeyer, T.H.J., Mikolasch, A., Lalk, M. (2005) Nuclear amination catalyzed by fungal laccases: Reaction products of *p*-hydroquinones and primary aromatic amines. J. Org. Chem. 70(6): 2002-2008.

Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cell. Microbiol. 5(4): 203-223.

Nosanchuk, J.D., Gómez, B.L., Youngchim, S., Díez, S., Aisen, P., Zancopé-Oliveira, R.M., Restrepo, A., Casadevall, A., Hamilton, A.J. (2002) *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. Infect. Immun. 70(9): 5124-5131.

Nosanchuk, J.D., Ovalle, R., Casadevall, A. (2001) Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. J. Infect. Dis. 183(7): 1093-1099.

Nurudeen, T.A., Ahearn, D.G. (1979) Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 10(5): 724-729.

Ohmiya, K., Tanimura, S., Kobayashi, T., Shimizu, S. (1979) Application of immobilized alkaline protease to cheese-making. J. Food Des. 44: 1584-1588.

Osiadacz, J., Al-Adhami, A.J.H., Bajraszewska, D., Fischer, P., Peczynska-Czoch, W. (1999) On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. J. Biotechnol. 72(1-2): 141-149.

Ottolina, G., Gianinetti, F., Riva, S., Carrea, G. (1994) Solvent configuration influences enzyme activity in organic media. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 4: 535-536.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., Sannia, G. (1997) A novel white laccase from Pleurotus ostreatus. J. Biol. Chem. 272(50): 31301-31307.

Panke, S., Wubbolts, M. (2005) Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. Curr. Opin. Chem. Biol. 9(2): 188-194.

Peshkova, S., Li, K.C. (2003) Investigation of chitosan-phenolics systems as wood adhesives. J. Biotechnol. 102(2): 199-207.

Pezet, R., Pont, V., Hoang-Van, K. (1991) Evidence for oxidative detoxication of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 39: 441-450.

Piacquadio, P., De Stefano, G., Sciancalepore, V. (2002) Phenolic composition of apple juice treated by laccase immobilized on copper-chelate regenerable carrier. Ital. J. Food Sci. 14(3): 291-294.

Pilz, R., Hammer, E., Schauer, F., Kragl, U. (2003) Laccase-catalysed synthesis of coupling products of phenolic substrates in different reactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60(6): 708-712.

Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T. (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus Trametes versicolor at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. J. Biol. Chem. 277(40): 37663-37669.

Poeckel, D., Niedermeyer, T.H.J., Pham, H.T.L., Mikolasch, A., Mundt, S., Lindequist, U., Lalk, M., Werz, O. (2006) Inhibition of human 5-lipoxygenase and anti-neoplastic effects by 2-amino-1,4-benzoquinones. J. Med. Chem. 2: 591-595.

Polacheck, I., Hearing, V.J., Kwonchung, K.J. (1982) Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. J. Bacteriol. 150(3): 1212-1220.

Polacheck, I., Kwonchung, K.J. (1988) Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. J. Gen. Microbiol. 134: 1037-1041.

Polak, A., Wain, W.H. (1979) The effect of 5-fluorocytosine on the blastospores and hyphae of *Candida albicans*. J. Med. Microbiol. 12(1): 83-97.

Ponzoni, C., Beneventi, E., Cramarossa, M.R., Raimondi, S., Trevisi, G., Pagnoni, U.M., Riva, S., Forti, L. (2007) Laccase-catalyzed dimerization of hydroxystilbenes. Adv. Synth. Catal. 349: 1497-1506.

Regensteiner, J.G., Popylisen, S., Bauer, T.A., Lindenfeld, J., Gill, E., Smith, S., Oliver-Pickett, C.K., Reusch, J.E., Weil, J.V. (2003) Oral L-arginine and vitamins E and C improve endothelial function in women with type 2 diabetes. Vasc. Med. 8(3): 169-175.

Reich, E., Goldberg, I.H., Rabinowitz, M. (1962) Structure-activity correlations of actinomycins and their derivatives. Nature 196(4856): 743-748.

Richards, R.M.E., Xing, D.K.L. (1992a) Enhancement of antibacterial activity by *p*-aminobenzoic acid and sulphadiazine. Int. J. Pharm. 82(1-2): 107-115.

Richards, R.M.E., Xing, D.K.L. (1992b) Investigation of the antibacterial activity of *p*-aminobenzoic acid against *P. aeruginosa* and *E. cloacae*. Int. J. Pharm. 87(1-3): 195-201.

Richards, R.M.E., Xing, D.K.L., King, T.P. (1995) Activity of p-aminobenzoic acid compared with other organic acids against selected bacteria. J. Appl. Bacteriol. 78(3): 209-215.

Ricupito, A., Del Pozzo, G., Diano, N., Grano, V., Portaccio, M., Marino, M., Bolli, A., Galluzzo, P., Bontempo, P., Mita, L., Altucci, L., Mita, D.G. (2009) Effect of bisphenol A with or without enzyme treatment on the proliferation and viability of MCF-7 cells. Environ. Int. 35: 21-26.

Riva, S. (2006) Laccases: blue enzymes for green chemistry. Trends Biotechnol. 24(5): 219-226.

Rodríguez-Tudela, J.L., Barchiesi, F., Bille, J., Chryssanthou, E., Cuenca-Estrella, M., Denning, D., Donnelly, J.P., Dupont, B., Fegeler, W., Moore, C., Richardson, M. and Verweij, P.E. (2002) Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts Clin. Microbiol. Infect. 9(8): 1-8.

Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A., Hatakka, A. (1991) Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions. Acta Microbiol. Polon. 40(3/4): 221-234.

Rosas, A.L., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. (2001) Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection. Infect. Immun. 69(5): 3410-3412.

Roy-Arcand, L., Archibald, F.S.J. (1991) Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccase from *Trametes (coriolus) versicolor*. Enzyme Microb. Technol. 13: 194-203.

Rubilar, O., Diez, M.C., Gianfreda, L. (2008) Transformation of chlorinated phenolic compounds by white rot fungi. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 38(4): 227-268.

Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T., Ito, S. (2007) Detergent alkaline proteases: Enzymatic properties, genes, and crystal structures. J. Biosci. Bioeng. 103(6): 501-508.

Salas, S.D., Bennett, J.E., Kwon-Chung, K.J., Perfect, J.R., Williamson, P.R. (1996) Effect of the laccase gene, *CNLAC1*, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. J. Exp. Med. 184: 377-386.

Sanchez-Amat, A., Lucas-Elio, P., Fernandez, E., Garcia-Borron, J.C., Solano, F. (2001) Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. Biochim. Biophys. Acta 1547(1): 104-116.

Sanchez-Amat, A., Solano, F. (1997) A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 240(3): 787-792.

Sbaghi, M., Jeandet, P., Bessis, R., Leroux, P. (1996) Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. Plant Pathol. 45(1): 139-144.

Schauer, F., Borriss, R. (2004) Biocatalysis and biotransformation. In: Tkacz, J.S., Lange, L. (Ed.) Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. 237-305.

Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. Nature 409: 258-268.

Schouten, A., Wagemakers, L., Stefanato, F.L., van der Kaaij, R.M., van Kan, J.A.L. (2002) Resveratrol acts as a natural profungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. Mol. Microbiol. 43(4): 883-894.

Schultz, A., Jonas, U., Hammer, E., Schauer, F. (2001) Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccase. Appl. Environ. Microbiol. 67(9): 4377-4381.

Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A., Autio, K. (2006) Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. J. Cereal Sci. 43(2): 152-159.

Sharma, P., Goel, R., Capalash, N. (2007) Bacterial laccases. World J. Microbiol. Biotechnol. 23(6): 823-832.

Sigoillot, J.C., Herpoel, I., Frasse, P., Moukha, S., Lesage-Meessen, L., Marcel, A. (1999) Laccase production by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* derived from a dikaryotic strain. World J. Microbiol. Biotechnol. 15: 481-484.

Simmons, K.E., Minard, R.D., Bollag, J.-M. (1989) Oxidative co-oligomerization of guaiacol and 4-chloroaniline. Environ. Sci. Technol. 23(1): 115-121.

Singh, S., Jedrzejas, M.J., Air, G.M., Luo, M., Laver, W.G., Brouillette, W.J. (1995) Structure-based inhibitors of influenza virus sialidase. A benzoic acid lead with novel interaction. J. Med. Chem. 38(17): 3217-3225.

Singh, B.B., Udani, J., Vinjamury, S.P., Der-Martirosian, C., Gandhi, S., Khorsan, R., Nanjegowda, D., Singh, V. (2005) Safety and effectiveness of an L-lysine, zinc, and herbal-based product on the treatment of facial and circumoral herpes. Altern. Med. Rev. 10(2): 123-127.

Slomczynski, D., Nakas, J.P., Tanenbaum, S.W. (1995) Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. Appl. Environ. Microbiol. 61(3): 907-912.

Smith, E.C.J., Kaatz, G.W., Seo, S.M., Wareham, N., Williamson, E.M., Gibbons, S. (2007) The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 51(12): 4480-4483.

Soden, D.M., Dobson, A.D. (2001) Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. Microbiology 147: 1755-1763.

Solomon, E.I., Augustine, A.J., Yoon, J. (2008) O_2 Reduction to H_2O by the multicopper oxidases. Dalton Trans. 30: 3921-3932.

Solomon, E.I., Chen, P., Metz, M., Lee, S.K., Palmer, A.E. (2001) Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. Angew. Chem. Int. Ed. 40(24): 4570-4590.

Speitling, A.W., Procter, P., Schomburg, J., Schultz, C., Juelich, W.-D., Lindequist, U., Schauer, F., Mikolasch, A., Manda, K. (2007) Adhesive for medical applications and in hemostasis. PCT Int. Appl. WO2007090673.

Sreenath, H.K., Santhanam, K. (1992) The use of commercial enzymes in white grape juice clarification. J. Ferment. Bioeng. 73(3): 241-243.

Srinivasan, C., D'Souza, T.M., Boominathan, K., Reddy, C.A. (1995) Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. Appl. Environ. Microbiol. 61(12): 4274-4277.

Steel, C.C., Baloch, R.I., Mercer, E.I., Baldwin, B.C. (1989) The intracellular location and physiological effects of abnormal sterols in fungi grown in the presence of morpholine and functionally related fungicides. Pestic. Biochem. Physiol. 33: 101-111.

Suderman, R.J., Dittmer, N.T., Kanost, M.R., Kramer, K.J. (2006) Model reactions for insect cuticle sclerotization: Cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. Insect Biochem. Mol. Biol. 36: 353-365.

Sullivan, G., Henry, E.D. (1971) Occurrence and distribution of phenoxazinone pigments in genus *Pycnoporus*. J. Pharm. Sci. 60(7): 1097-1098.

Svobodová, K., Majcherczyk, A., Novotný, Č., Kües, U. (2008) Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. Bioresource Technol. 99(3): 463-471.

Taborda, C.P., da Silva, M.B., Nosanchuk, J.D., Travassos, L.R. (2008) Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. Mycopathologica 165(4-5): 331-339.

Tadesse, M.A., D'Annibale, A., Galli, C., Gentili, P., Sergi, F. (2008) An assessment of the relative contributions of redox and steric issues to laccase specificity towards putative substrates. Org. Biomol. Chem. 6(5): 868-878.

Tatsumi, K., Freyer, A., Minard, R.D., Bollag, J.-M. (1994a) Enzymatic coupling of chloranilines with syringic acid, vanillic acid and protocatechuic acid. Soil Biol. Biochem. 26(6): 735-742.

Tatsumi, K., Freyer, A., Minard, R.D., Bollag, J.-M. (1994b) Enzyme mediated coupling of 3,4-dichloroaniline and ferulic acid: A model for pollutant binding to humic materials. Environ. Sci. Technol. 28: 210-215.

Tatsumi, K., Wada, S., Ichikawa, H., Liu, S.Y., Bollag, J.-M. (1992) Cross-coupling of a chloroaniline and phenolic acids catalyzed by a fungal enzyme. Wat. Sci. Tech. 26(9-11): 2157-2160.

Tauber, M.M., Gubitz, G.M., Rehorek, A. (2008) Degradation of azo dyes by oxidative processes - Laccase and ultrasound treatment. Bioresource Technol. 99(10): 4213-4220.

Thakker, G.D., Evans, C.S., Rao, K.K. (1992) Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 321-323.

Thanikaivelan, P., Rao, J.R., Nair, B.U., Ramasami, T. (2004) Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. Trends Biotechnol. 22(4): 181-188.

Thomas, B.R., Yonekura, M., Morgan, T.D., Czapla, T.H., Hopkins, T.L., Kramer, K.J. (1989) A trypsin-solubilized laccase from pharate pupal integument of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochem. 19(7): 611-622.

Thurston, C.F. (1994) The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140: 19-26.

Torres, E., Bustos-Jaimes, I., Le Borgne, S. (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. Appl. Catal. B: Environ. 46(1): 1-15.

Turner, E.H., Loftis, J.M., Blackwell, A.D. (2006) Serotonin a la carte: Supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. Pharmacol. Ther. 109: 325-338.

Uchida, H., Fukuda, T., Miyamoto, H., Kawabata, T., Suzuki, M., Uwajima, T. (2001) Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 287(2): 355-358.

Umathe, S.N., Kochar, N.I., Jain, N.S., Dixit, P.V. (2009) Gastrointestinal dysfunction in diabetic rats relates with a decline in tissue L-arginine content and consequent low levels of nitric oxide. Nitric Oxide 20: 129-133.

Uyama, H., Kobayashi, S. (2003) Enzymatic synthesis of polyphenols. Curr. Org. Chem. 7(13): 1387-1397.

Uyama, H., Kobayashi, S. (2006) Enzymatic synthesis and properties of polymers from polyphenols. Adv. Polym. Sci. 194: 51-67.

Valls, C., Roncero, M.B. (2009) Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. Bioresour. Technol. 100: 2032-2039.

Vanden Bossche, H., Willemsens, G., Marichal, P. Cools, W., Lauwers, W. (1984) The molecular basis for the antifungal activities of N-substituted azole derivatives. Focus on R51 211. In: Trinci, A.P.J., Ryley, J.F. (Ed.) Mode of action of antifungal agents. Cambridge Univ. Press. 321-341.

Van Duin, D., Casadevall, A., Nosanchuk, J.D. (2002) Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. Antimicrob. Agents Chemother. 46(11): 3394-3400.

Verenich, S., Arumugam, K., Shim, E., Pourdeyhimi, B. (2008) Treatment of raw cotton fibers with cellulases for nonwoven fabrics. Textile Res. J. 78(6): 540-548.

Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., Linko, M. (1994) Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. FEMS Microbiol. Rev. 13: 335-350.

Viterbo, A., Yagen, B., Mayer, A.M. (1993) Cucurbitacins, attack enzymes and laccase in *Botrytis cinerea*. Phytochemistry 32(1): 61-65.

Wahleithner, J.A., Xu, F., Brown, K.M., Brown, S.H., Golightly, E.J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A., Schneider, P. (1996) The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Curr. Genet. 29(4): 395-403.

Waite, J.H. (1983) Evidence for a repeating 3,4-dihydroxyphenylalanine- and hydroxyproline-containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel, *Mytilus edulis* L.. J. Biol. Chem. 258(5): 2911-2915.

Waite, J.H. (1990a) Marine adhesive proteins: natural composite thermosets. Int. J. Biol. Macromol. 12(2): 139-144.

Waite, J.H. (1990b) The phylogeny and chemical diversity of quinone-tanned glues and varnishes. Comp. Biochem. Physiol. 97B(1): 19-29.

Waite, J.H., Hansen, D.C., Little, K.T. (1989) The glue protein of ribbed mussels (*Geukensia demissa*): a natural adhesive with some features of collagen. J. Comp. Physiol. B 159: 517-525.

Waite, J.H., Housley, T.J., Tanzer, M.L. (1985) Peptide repeats in a mussel glue protein: Theme and variations. Biochemistry 24(19): 5010-5014.

Waldorf, A.R., Polak, A. (1983) Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. Antimicrob. Agents Chemother. 23(1): 79-85.

Wang, J.L., Liu, D.X., Zhang, Z.J., Shan, S.M., Han, X.B., Srinivasula, S.M., Croce, C.M., Alnemri, E.S., Huang, Z.W. (2000) Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(13): 7124-7129.

Wang, Y., Xu, H., Zhang, J.M., Li, G. (2008) Electrochemical sensors for clinic analysis. Sensors 8(4): 2043-2081.

Wang, Y.L., Casadevall, A. (1994) Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-Dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. Antimicrob. Agents Chemother. 38(11): 2648-2650.

Weegels, P.L., Marseille, J.P., Hamer, R.J. (1992) Enzymes as a processing aid in the separation of wheat flour into atarch and gluten. Starch/Stärke 44(2): 44-48.

Weld, R.J., Plummer, K.M., Carpenter, M.A., Ridgway, H.J. (2006) Approaches to functional genomics in filamentous fungi. Cell Res. 16: 31-44.

Werz, O. (2002) 5-Lipoxygenase: Cellular biology and molecular pharmacology. Curr. Drug Targets. 1: 23-44.

Werz, O., Klemm, J., Radmark, O., and Samuelsson, B. (2001) p38 MAP kinase mediates stress-induced leukotriene synthesis in a human B-lymphocyte cell line. J. Leukoc. Biol. 70: 830-838.

Wescott, C.R., Klibanov, A.M. (1994) The solvent dependence of enzyme specificity. Biochim. Biophys. Acta 1206: 1-9.

Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N. (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnol. Adv. 22(1-2): 161-187.

Whetten, R.W., MacKay, J.J., Sederoff, R.R. (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 585-609.

Widsten, P., Kandelbauer, A. (2008) Laccase applications in the forest products industry: A review. Enzyme Microb. Technol. 42: 293-307.

Williamson, P.R. (1997) Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. Front. Biosci. 2. e99-107.

Woodley, J.M. (2008) New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. Trends Biotechnol. 26(6): 321-327.

Xu, F. (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. Biochemistry 35: 7608-7614.

Xu, F. (1997) Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. J. Biol. Chem. 272(2): 924-928.

Xu, F. (1999) Laccase. In: Fleckinger, M.C., Drew, S.W. (Ed.) Encyclopedia of bioprocess technolog.: ferm., biocatalysis, and bioseparation. John Wiley & Sons, Inc, New York. 1545-1553.

Xu, F., Berka, R.M., Wahleithner, J.A., Nelson, B.A., Shuster, J.R., Brown, S.H., Palmer, A.E., Solomon, E.I. (1998) Site-directed mutations in fungal laccase: Effect on redox potential, activity and pH profile. Biochem. J. 334: 63-70.

Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K.C., Krikstopaitis, K., Deussen, H.J.W., Abbate, E., Galinyte, V., Schneider, P. (2000) Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. Appl. Environ. Microbiol. 66(5): 2052-2056.

Yamaoka, T., Nagakura, S. (1971) Reactions of aliphatic amines with *p*-benzoquinone and its chloro derivatives. Bull. Chem. Soc. Jpn. 44(11): 2971-2975.

Yamazaki, H.I. (1972) Cuticular phenoloxidase from silkworm, *Bombyx mori*: Properties, solubilization, and purification. Insect Biochem. 2: 431-444.

Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S., Varfolomeyev, S.D. (1994) Laccase - Properties, catalytic mechanism, and applicability. Appl. Biochem. Biotechnol. 49: 257-280.

Yatsu, J., Asano, T. (2009) Cuticle laccase of the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, gene identification and presence of its inactive precursor in the cuticle. Insect Biochem. Mol. Biol. 39: 254-262.

Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K., Dalboge, H. (1996) Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. Appl. Environ. Microbiol. 62(3): 834-841.

Yoshida, H. (1883) Chemistry of Lacquer (Urushi). Part I. J. Chem. Soc. 472-486.

Yoshikawa, A., Isono, K. (1991) Construction of an ordered clone bank and systematic analysis of the whole transcripts of chromosome VI of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. 19(6): 1189-1195.

Zhu, X.D., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A., Williamson, P.R. (2001) Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. Infect. Immun. 69(9): 5589-5596.

Zhu, X.D., Williamson, P.R. (2004) Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Res. 5(1): 1-10.

Zille, A., Górnacka, B., Rehorek, A., Cavaco-Paulo, A. (2005) Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions. Appl. Environ. Microbiol. 71(11): 6711-6718.

Ziogas, B.N., Oesterhelt, G., Masner, P., Steel, C.C., Furter, R. (1991) Fenpropimorph: A three site inhibitor of ergosterol biosynthesis in *Nectria haematococca* var. *cucurbitae*. Pestic. Biochem. Physiol. 39(1): 74-83.

A Zusammenfassende Darstellung der laccasekatalysierten Reaktionen zur Derivatisierung bzw. Synthese von Wirkstoffen und funktionellen Biomaterialien

In den Tabellen A1-A4 auf den folgenden Seiten sind die im Kapitel 3 aufgeführten Reaktionen zur Derivatisierung bzw. Synthese von Wirkstoffen und funktionellen Biomaterialien zusammengefasst worden. Dabei standen die eingesetzten Verbindungen und die mittels Laccase synthetisierten Produkte, ihre biologische Aktivität und die zur Bestimmung der Wirkung eingesetzten Testsysteme im Mittelpunkt der Betrachtung.

Tab. A1 Anwendungsmöglichkeiten der Laccase zur Derivatisierung bzw. Synthese von biologisch aktiven Substanzen im Rahmen von homomolekularen Reaktionen, also Reaktionen mit nur einem Ausgangsstoff [a]

Laccasesubstrat	Aktivität	Quelle der Laccase	Reaktionsprodukte	Testsystem	Aktivität der Produkte im Vergleich zum Ausgangsstoff [b] (potentielle Aktivitä)	Referenz
Östrogene Wirkung						
Östradiol	östrogen	*Polyporus versicolor* Laccase A	C-C-Dimere	uterotrophischer Test nach Rubin	0; (östrogen)	Lugaro et al. 1973
Östradiol	östrogen	*Myceliophthora* spec. Novozymes A/S, Dänemark; *Trametes pubescens*	C-C- und C-O-Dimere	-	nicht getestet; (östrogen)	Nicotra et al. 2004b
Bisphenol A	östrogen	*Trametes villosa* Novozymes Japan, Dänemark	C-C-Dimer, diverse Oligomere, Abbauprodukte	Luciferase Reporter Test mittels COS-7 Zellen	0; (östrogen)	Fukuda et al. 2001, 2004; Uchida et al. 2001
Antioxidative Wirkung						
trans-Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxy-stilben)	antioxidativ	*Myceliophthora thermophila* Novozymes A/S, Dänemark; *Trametes pubescens*	Dehydrodimer	Reduktionsmethode nach Berset mit einem 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl freien Radikal (DPPH) nach Berset	2; (antioxidativ)	Nicotra et al. 2004a
3-Hydroxy-anthranilsäure	antioxidativ	*Pycnoporus cinnabarinus*	*o*-Chinonimin (Cinnabarinsäure)	Verdünnungsmethode in LB Flüssigmedium (pH 7)	keine Angaben für Ausgangsverbindung; Aussage: antibiotische Wirkung (antibakteriell)	Eggert et al. 1995, 1997
4-Methyl-3-hydroxy-anthranilsäure	-	*Trametes versicolor*	*o*-Chinonimin (Actinocin)	-	nicht getestet (zytotoxisch, antibakteriell)	Osiadacz et al., 1999
3-Hydroxy-orthanilinsäure	-	*Trametes versicolor* Bioscreen e. K. Deutschland	*o*-Chinonimin (2-Amino-3-oxo-3*H*-phenoxazin-1,9-disulfonsäure)	-	nicht getestet (antibakteriell)	Bruyneel et al. 2008
Antibakterielle Wirkung						
(+)-Totarol	antibakteriell (antiplasmodial)	*Trametes pusbescens*	C-C- und C-O-Dimere	-	nicht getestet (antibakteriell)	Ncanana et al., 2007
		Cryptomeria japonica	C-C-Dimer	-	nicht getestet	Bocks und Cambie 1963
Penicillin X Methylester	antibakteriell	*Coriolus versicolor*	3 Typen von Dimere	Verdünnungsmethode in Mueller-Hinton Flüssigmedium (pH 7)	0; (antibakteriell)	Agematu et al., 1993a
Penicillin X Pivaloyloxy-methylester	antibakteriell	*Coriolus versicolor*	C-C-Dimer	Verdünnungsmethode in Mueller-Hinton Flüssigmedium (pH 7)	1; antibakteriell bei Anwesenheit einer Esterase	Agematu et al., 1993a
7-(4-Hydroxy-phenyl-acetamido)-cephalo-sporinsäure	antibakteriell	*Coriolus versicolor*	7-[1-Oxaspiro(2.5)octa-6-oxo-4,7-dien-2-carboxamido]-cephalosporinsäure	Verdünnungsmethode in Mueller-Hinton Flüssigmedium (pH 7)	1; (antibakteriell)	Agematu et al. 1993b

[a] Die Tabelle ist nach der Wirkung der Ausgangsstoffe eingeteilt, die für die laccasekatalysierte Reaktion genutzt wurden.

[b] Die synthetisierten Verbindungen werden i.d.R. mit den Ausgangsstoffen aus denen sie gebildet wurden hinsichtlich ihrer Wirkung verglichen. Dabei kann die neue Substanz im Vergleich zur Ausgangsverbindung: (4) eine sehr viel höhere (3) eine leicht höhere Aktivität, (2) die gleiche, (1) eine geringere oder (0) keine Aktivität aufweisen.

- keine Angaben

Tab. A2 Anwendungsmöglichkeiten der Laccase zur Derivatisierung bzw. Synthese von biologisch aktiven Substanzen im Rahmen von heteromolekularen Reaktionen, also Reaktionen mit zwei verschiedenen Ausgangsstoffen [a]

Laccasesubstrat	Aktivität	Reaktions-partner	Aktivität	Quelle der Laccase	Reaktions-produkte	Testsystem	Aktivität der Produkte im Vergleich zum Ausgangsstoff [b] (potentielle Aktivitä)	Referenz
Antimikrobielle Wirkung								
1,4-Hydrochinon	oxidativ (Oxida-tionsmittel)	Mithramycin	antitumor, antibakteriell	*Polyporus anceps*	C-C-Dimer	in vivo P388 leukämisches Antitumortestsystem	0; (antitumor)	Anyanwutaku et al. 1994
Mithramycin	antitumor, antibak-teriell	1,4-Hydro-chinon	oxidativ (Oxidations-mittel)					
2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid 2,5-Dihydroxy-benzamid 2,5-Dihydroxy-benzoesäure-methylester 2,5-Dihydroxy-benzoesäure-ethylester	-	Amoxicillin Ampicillin	antibakteriell	*Trametes* spec. Laccase C ASA Spezial-enzyme GmbH, Deutschland	C-N-Dimer	Agardiffusionstest nach Burkhardt (Mueller-Hinton-Agar II)	1 bis 2; (antibakteriell)	Mikolasch et al. 2006
						Neutralrottest mit FL-Zelllinie	keine Daten, Aussage: keine bis geringe Zytotoxizität	
						Staphylococcus-infizierte, immunsuppremiertes Maus Modell	2; (antibakteriell)	
						Agardiffusionstest mit *Staphylococcus aureus* SG10 (Stabilität gegenüber *β*-Lactamase-1 und -2)	3 (für ein Produkt gezeigt); (stabil gegenüber *β*-Lactamase-1 und -2)	
						Bestimmung des Octanol-Wasser Verteilungs-koeffizienten nach Donovan und Pescatore	4; (Absorption)	
2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid 2,5-Dihydroxy-benzamid 2,5-Dihydroxy-benzoesäure-methylester 2,5-Dihydroxy-benzoesäure-ethylester	-	Cefadroxil Cefalexin Cefaclor Loracarbef	antibakteriell	*Trametes* spec. Laccase C ASA Spezial-enzyme GmbH, Deutschland; *Myceliophthora thermophila* NovoNordisk, Dänemark	C-N-Dimer	Agardiffusionstest nach Burkhardt (Mueller-Hinton-Agar II)	1 bis 2; (antibakteriell)	Mikolasch et al. 2007
						Neutralrottest mit FL-Zelllinie	keine Daten, Aussage: keine bis geringe Zytotoxizität	
						Staphylococcus-infizierte, immunsuppremiertes Maus Modell	2; (antibakteriell)	
Catechol 3-Methylcatechol 4-Methylcatechol	-	Amoxicillin Ampicillin Cefadroxil Loracarbef	antibakteriell	*Trametes* spec. Laccase C ASA Spezial-enzyme GmbH, Deutschland	C-N-Dimer	Agardiffusionstest nach Burkhardt (Mueller-Hinton-Agar II)	1 bis 2; (antibakteriell)	Mikolasch et al. 2008c
						Neutralrottest mit FL-Zelllinie	1 bis 3 (zytotoxisch)	
						Staphylococcus-infizierte, immunsuppremiertes Maus Modell	1 (antibakteriell)	
2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid 2,5-Dihydroxy-benzoesäure-methylester 4-Methylcatechol	-	*N*-analoge Corollo-sporine	antibakteriell	*Trametes* spec. Laccase C ASA Spezial-enzyme GmbH, Deutschland	C-N-Dimere	Agardiffusionstest nach Burkhardt (Mueller-Hinton-Agar II)	4; (antibakteriell)	Mikolasch et al. 2008c
Ligninmodell-verbindungen Holz	-	phenolische Amine	-	*Trametes hirsuta*	C-O-, C-N-Bindungen	-	funktionalisierte Oberfläche z.B. antifungal	Kudanga et al. 2008
phenolische Amine	-	Ligninmo-dellverbin-dungen Holz	-					
		Propico-nazol Thiaben-dazol	antifungal					

Laccasesubstrat	Aktivität	Reaktions-partner	Aktivität	Quelle der Laccase	Reaktions-produkte	Testsystem	Aktivität der Produkte im Vergleich zum Ausgangsstoff [b] (potentielle Aktivitä)	Referenz
Antioxidative Wirkung								
1,4-Hydrochinon	-	(+)-Catechin	antioxidativ	*Rhus vernicifera*	C-C-Dimere	Thiobarbitursäure-methode zur Bestimmung der Lipidperoxid-produktion in Ratten-hirnhomogenat Methode nach Hino zur Bestimmung der Fe^{3+}-ADP/NADPH-abhängigen Lipid-peroxidproduktion in Rattenleber Mikrosomen	3; (antioxidativ)	Hosny und Rosazza 2002
(+)-Catechin	antioxidativ	1,4-Hydro-chinon	-					
eine Reihe von 2,5-Dihydroxy-benzoesäure-derivaten und alkylierte Hydrochinone	-	eine Reihe von primären aroma-tischen Aminen	-	*Trametes* spec. Laccase C ASA Spezial-enzyme GmbH, Deutschland *Myceliophthora thermophila* NovoNordisk, Dänemark	C-N-Dimere, C-N-Trimere	eigene Methode zur Bestimmung der 5-Lipoxygenase Produkte;	keine Angaben für Ausgangs-verbindungen (Hemmung der 5-Lipoxygenase)	Niedermeyer et al. 2005, Poeckel et al. 2006
						eigene Methode unter Verwendung von FL-Zellen, sowie Blasen- (5637) und Brustkrebszelllinien (MCF-7)	keine Angaben für Ausgangs-verbindungen (zytotoxisch, anti-proliferativ)	

[a] Die Tabelle ist nach der Wirkung der Ausgangsstoffe eingeteilt, die für die laccasekatalysierte Reaktion genutzt wurden.

[b] Die synthetisierten Verbindungen werden i.d.R. mit den Ausgangsstoffen aus denen sie gebildet wurden hinsichtlich ihrer Wirkung verglichen. Dabei kann die neue Substanz im Vergleich zu der/den Ausgangsverbindung/en: (4) eine sehr viel höhere (3) eine leicht höhere Aktivität, (2) die gleiche, (1) eine geringere oder (0) keine Aktivität aufweisen.

- keine Angaben

Tab. A3 Anwendungsmöglichkeiten der Laccase zur Derivatisierung von primären Aminen und Aminosäuren im Rahmen von heteromolekularen Reaktionen, also Reaktionen mit zwei verschiedenen Ausgangsstoffen

Laccasesubstrat	Reaktionspartner	Quelle der Laccase	Reaktions-produkte	Referenz
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure	4-Aminobenzoesäure	*Pycnoporus cinnabarinus*	Chinonimin	Mikolasch et al. 2002, Niedermeyer et al. 2005
2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid 2,5-Dihydroxybenzoesäuremethylester	4-Aminobenzoesäure	*Trametes villosa* Novo Nordisk, USA	C-N-Dimer	Manda et al. 2005
2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid 2,3-Dimethyl-1,4-hydrochinon	4-Aminobenzoesäure	*Trametes* spec. Laccase C ASA Spezialenzyme GmbH, Deutschland *Myceliophthora thermophila* NovoNordisk, Dänemark	C-N-Dimere, C-N-Trimer	Niedermeyer und Lalk 2007
1,4-Hydrochinon alkyl-, alkoxy-, halogen- und carbonylsubstituierte 1,4-Hydrochinone	4-Aminobenzoesäure	*Pycnoporus cinnabarinus* *Myceliophthora thermophila* NovoNordisk, Dänemark	C-N-Dimer	Mikolasch et al. 2008b
1,4-Benzochinon	21 Aminosäuren	*Boleus badius*	C-N-Dimer C-N-Trimer	Michalek und Szarkowska 1959
2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid	L-Tryptophan	*Pycnoporus cinnabarinus*	C-N-Dimer	Manda et al. 2006

Tab. A4 Anwendungsmöglichkeiten der Laccase zur Derivatisierung bzw. Synthese von biologisch aktiven Substanzen im Rahmen von Polymerisationsreaktionen [a]

Laccasesubstrat	Akti-vität	Reaktions-partner	Akti-vität	Quelle der Laccase	Reaktions-produkte	Testsystem	Aktivität der Produkte im Vergleich zum Ausgangsstoff [b] (potentielle Aktivitä)	Referenz
Antioxidative Wirkung								
ortho- und *para-* dihydroxylierte aromatische Verbindungen	-	k. Rp.		*Cryptococcus neoformans*	Melanin	u.a. Deletionsmutationen	(Virulenz u.a. aufgrund von antioxidativer Wirkung)	Salas et al. 1996; Nosanchuk und Casadevall 2003
Rutin (Quercetin-3-rutinosid)	anti-oxidativ	k. Rp.		*Myceliophthora* Novozymes Japan Ltd.	Poly(rutin) Polymer	Superoxidanionenfänger-eigenschaft ermittelt durch Chemilumineszenz Superoxid Untersuchungsmethode	4; (antioxidativ)	Kurisawa et al. 2003b
						eigene Methode zur Bestimmung der LDL-Empfindlichkeit gegenüber Oxidation	3; (antioxidativ)	
						eigene Methode zur Bestimmung des schützenden Effektes auf radikalinduzierte Zytotoxizität bei bovinen, aortischen Endothelialzellen	4; (antioxidativ)	
(+)-Catechin	anti-oxidativ	k. Rp.		*Myceliophthora* Novozymes Japan Ltd.	Poly(catechin) Polymer	Superoxidanionenfänger-eigenschaft ermittelt durch Chemilumineszenz Superoxid Untersuchungs-methode	4; (antioxidativ)	Kurisawa et al. 2003a
						Xanthin Oxidase Aktivität ermittelt durch spektro-photometrische Bestimmung der Bildung von Urinsäure	4; (antioxidativ)	
Catechin	anti-oxidativ	Poly(allyl-amin)	-	*Myceliophthora*	Konjugat	eigene Methode zur Bestimmung von oxidierten LDL-Phopholipiden	3; (antioxidativ)	Chung et al. 2003a
Catechin	anti-oxidativ	Gelatine	-	-	Konjugat	Cytochrom c Reduktionsmethode;	1; (antioxidativ)	Chung et al. 2003b
						eigene Methode zur Bestimmung von oxidierten LDL-Phopholipiden	3; (antioxidativ)	
Klebstoffe und Lacke								
mono-, bi- und polyzyklische Mono-, Di- und Trihydroxy-aromaten	-	Collagen bzw. Poly-mere mit mindestens einer freien Amino-gruppe	-	-	Klebstoff bzw. Hämo-stryptikum	-	-	Neumann et al. 2007; Speitling et al. 2007
phenolische Verbindungen mit einer bzw. zwei oder drei benachbarten Hydroxylgruppen	-	Chitosan	-	keine Angaben Novozymes, Inc. USA	Klebstoff	Brookfield Viskometer; Klebeversuche mit Ahornfurnier; Wasseresistenztest	keine Angaben für Ausgangs-verbindungen Aussage: z.T. klebend und wasserbeständig (klebend); (wasser-beständig)	Peshkova und Li 2003
Catecholderivate mit ungesättigten Kohlenwasser-stoffketten (“Urushiole“)	-	k. Rp.		*Pycnoporus coccineus*	künstlicher Lack	Fischer Mikrohärtetester	keine Angaben für Ausgangs-verbindungen; Aussage: hoher Härtegrad und Glanz	Ikeda et al. 2000

[a] Die Tabelle ist nach der Wirkung der Ausgangsstoffe eingeteilt, die für die laccasekatalysierte Reaktion genutzt wurden bzw. nach der Aktivität und Einsatzmöglichkeit der mittels Laccase gebildeten Produkte.

[b] Die synthetisierten Verbindungen werden i.d.R. mit den Ausgangsstoffen aus denen sie gebildet wurden hinsichtlich ihrer Wirkung verglichen. Dabei kann die neue Substanz im Vergleich zu der/den Ausgangsverbindung/en: (4) eine sehr viel höhere (3) eine leicht höhere Aktivität, (2) die gleiche, (1) eine geringere oder (0) keine Aktivität aufweisen.

- keine Angaben

k. Rp. kein Reaktionspartner

B Supporting Information - Enzymatic cyclizations using laccases: Multiple bond formation between dihydroxybenzoic acid derivates and aromatic amines

Auf den folgenden Seiten finden sich die ergänzenden Informationen der im Kapitel 4.8 ab Seite 101 vorgestellten Publikation

Hahn, V., Davids, T., Lalk, M., Schauer, F., Mikolasch, A. (2009) Enzymatic cyclizations using laccases: Multiple bond formation between dihydroxybenzoic acid derivates and aromatic amines. Green Chemistry, Manuskript eingereicht.

Supplementary Data

Enzymatic cyclizations using laccases: Multiple bond formation between dihydoxybenzoic acid derivates and aromatic amines

Veronika Hahn,*[a] Timo Davids,[a] Michael Lalk,[b] Frieder Schauer[a] and Annett Mikolasch[a]

[a] *Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Friedrich-Ludwig-Jahn Straße 15, 17487 Greifswald, Germany. Fax: ++49 3834 864202; Tel: ++49 3834 864229; E-mail: veronikahahn@gmx.at*

[b] *Institut für Pharmazie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Friedrich-Ludwig-Jahn Straße 17, 17487 Greifswald, Germany.*

List of contents

Additional Information to Experimental Section	**S4**
Purification scheme	**S5**
Structural data of 3a	**S7**
Structural data of 3b	**S8**
Structural data of 3c	**S10**
Structural data of 3d	**S11**
Structural data of 3e	**S13**
Structural data of 3f	**S15**
Structural data of 3g	**S17**
Structural data of 3h	**S18**
Structural data of 3i	**S20**
Structural data of 3j	**S20**
Structural data of 3k	**S21**
Structural data of 3l	**S21**
Structural data of 4a,b	**S22**
Structural data of 4c-f	**S26**
Structural data of 5a	**S31**
Structural data of 5b	**S33**
Structural data of 6a	**S34**
Structural data of 6b	**S36**
Structural data of 6c	**S37**
Structural data of 6d	**S39**
Structural data of 6e	**S40**
Structural data of 7a	**S41**
Structural data of 7b and 8a	**S42**

Structural data of 7c and 8b **S44**

Structural data of 9a and 10a **S46**

Structural data of 9b **S48**

Structural data of 9c **S50**

Additional Information to Experimental Section

General Methods. The products were characterized by mass spectrometry (MS) using electro spray ionization under atmospheric conditions (API-ES) (dry and nebulizer gas: nitrogen) on a Bruker-Daltoniks micrOTOF instrument (Bremen, Germany; software: HyStar). The nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker Avance 600 instrument (Rheinstetten, Germany) at 600 MHz. Solvent used was DMSO-d_6. Chemical shifts are expressed in δ (ppm) calibrated on the resonances of the residual nondeuterated solvent.

For routine analysis, the reaction mixtures were analyzed using an HPLC system LC-10AT VP (Shimadzu, Germany) consisting of a FCV-10AL VP pump, SPD-M10A VP diode array detector, and a SCL-10A VP control unit controlled by Class-VP version 6.12 SP5. The separation of the substances was achieved on an endcapped, 5-µm, LiChroCART® 125-4 RP18 column (Merck, Darmstadt, Germany) at a flow rate of 1 mL/min. A solvent system consisting of methanol (eluent A) and 0.1% phosphoric acid (eluent B), starting from an initial ratio of 10% A and 90% B and reaching 100% methanol within 14 min, was used.

Chemicals were purchased from commercial suppliers. All chemicals were used as received.

All reaction mixtures for product isolation were performed with laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* (final activity 0.5 U) in SAB. Isolation steps were performed by solid-phase extraction with a RP18 silicagel column (60 mL, 10 g adsorbent material, phenomenex, Strata, Germany). The reactants, molarity of the reaction partners, incubation time before isolation, volume of the complete reaction mixture and volume of the reaction mixture per purification run as well as the purification steps are described in Table 1.

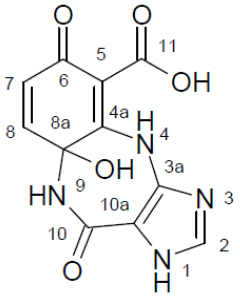
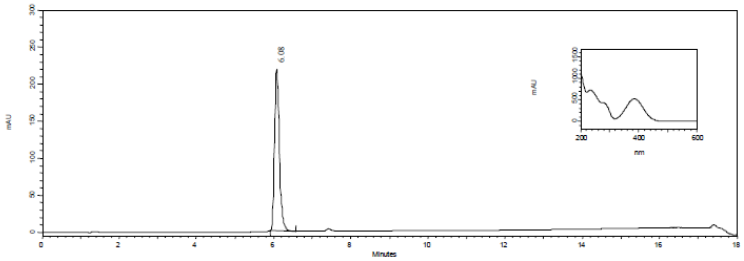
Table 1. Synthesis and purification scheme

Product	Reactants	Molarity of the reaction partners (compound 1: compound 2)	Incu-bation time before isola-tion	Volume of the complete reaction mixture	Volume of the reaction mixture per puri-fication run	Washing steps (part of methanol in distilled water)	Elution
3a	**1a, 2a**	2:2 mM	2 h	340 mL	10 mL	100 mL 10 %	30 mL 40 %
3b	**1b, 2a**	2:2 mM	2 h	144 mL	8 mL	100 mL 10 %	20 mL 100 %
3c	**1a, 2b**	1:1 mM	2 h	360 mL	40 mL	15 mL 0 % 30 mL 10 %	20 mL 30 %
3d	**1b, 2b**	1:1 mM	2 h	120 mL	40 mL	20 mL 0 % 30 mL 10 %	30 mL 30 %
3e	**1b, 2c**	1:1 mM	2 h	120 mL	40 mL	10 mL 0 % 50 mL 10 % 40 mL 20 %	40 mL 30 %
3f	**1c, 2c**	1:1 mM	2 h	120 mL	40 mL	40 mL 0 % 20 mL 30 %	20 mL 50 %
3g	**1d, 2c**	1:1 mM	2 h	200 mL	40 mL	20 mL 0 % 30 mL 30 % 10 mL 50 %	20 mL 50 %
3h	**1b, 2d**	1:1 mM	2 h	200 mL	40 mL	40 mL 0 % 40 mL 10 %	30 mL 30 %
3i	**1c, 2d**	1:1 mM	2 h	120 mL	40 mL	20 mL 0 % 20 mL 10 % 40 mL 50 %	30 mL 100 %
3k and 5a	**1a, 2c**	1:1 mM	20 min	400 mL	40 mL	50 mL 0 % 20 mL 10 %	30 mL 30 %
3l and 5b	**1a, 2d**	1:1 mM	1 h	200 mL	40 mL	35 mL 0 % 70 mL 10 % 20 mL 20 %	30 mL 30 %
4a,b	**1c, 2a**	2:2 mM	24 h	460 mL	20 mL	80 mL 5 %; 10 ml 50 %	10 ml 50 %
4a,b	**1d, 2a**	2:2 mM	24 h	240 mL	20 mL	80 mL 5 %; 10 ml 50 %	10 ml 50 %
4c-f	**1c, 2b**	1:1 mM	2 h	120 mL	40 mL	40 mL 0 %	60 mL 10 %
4c-f	**1d, 2b**	1:1 mM	2 h	120 mL	40 mL	40 mL 0 %	60 mL 10 %
4c-f	**1a, 2b**	1:1 mM	2 h	360 mL	40 mL	20 mL 0 %	30 mL 10 %
6a	**1b, 2e**	1:1 mM	2 h	120 mL	40 mL	30 mL 0 % 20 mL 30 % 20 mL 50 %	30 mL 100 %
6b	**1c, 2e**	1:1 mM	2 h	120 mL	40 mL	30 mL 0 % 20 mL 30 % 20 mL 50 %	30 mL 100 %
6c	**1d, 2e**	1:1 mM	2 h	120 mL	40 mL	30 mL 0 % 20 mL 30 % 20 mL 50 %	30 mL 100 %

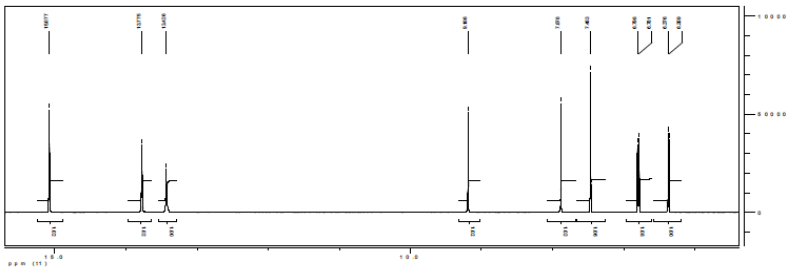
6d	**1a, 2f**	1:1 mM	2 h	200 mL	40 mL	40 mL 10 % 10 mL 50 %	30 mL 100 %
6e	**1c, 2f**	1:1 mM	2 h	200 mL	40 mL	20 mL 0 % 20 mL 10 % 30 mL 50 %	20 mL 100 %
7a	**1a, 2g**	1:1 mM	2 h	320 mL	40 mL	30 mL 0 % 10 mL 10 %	30 mL 30 %
7b and 8a	**1b, 2g**	1:1 mM	2 h	120 mL	40 mL	30 mL 0 % 40 mL 10 %	20 mL 50 %
7c and 8b	**1c, 2g**	1:1 mM	20 min	120 mL	40 mL	30 mL 0 % 40 mL 10 %	15 mL 50 %
9a and 10a	**1a, 2g**	1:1 mM	2 h	320 mL	40 mL	30 mL 0 % 10 mL 10 % 20 mL 50 % 30 mL 30 %	10 mL 100 %
9b	**1b, 2g**	1:2 mM	24 h	120 mL	40 mL	40 mL 0 % 40 mL 10 % 20 mL 50 %	40 mL 100 %
9c	**1c, 2g**	1:2 mM	24 h	120 mL	40 mL	40 mL 0 % 40 mL 10 % 20 mL 50 %	40 mL 100 %

Structural Data of All Compounds

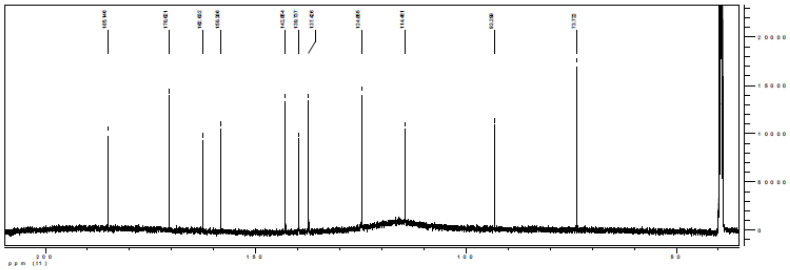
3a: product resulted from **1a** and **2a**

3a	**8a-Hydroxy-6,10-dioxo-1,4,6,8a,9,10-hexahydro-1,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azulene-5-carboxylic acid**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum 

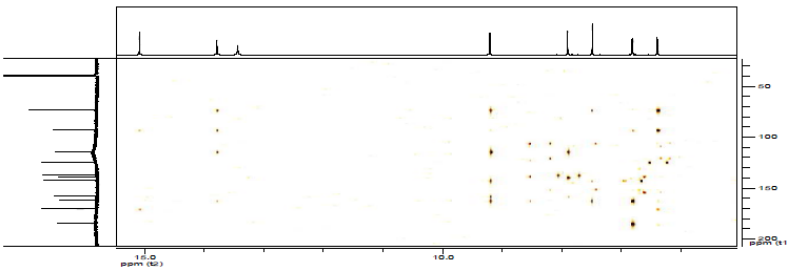
^{1}H NMR



^{13}C NMR

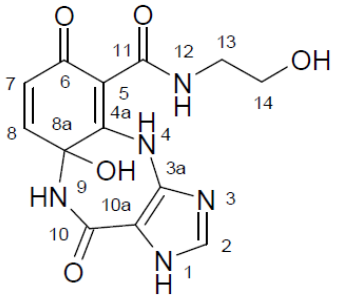
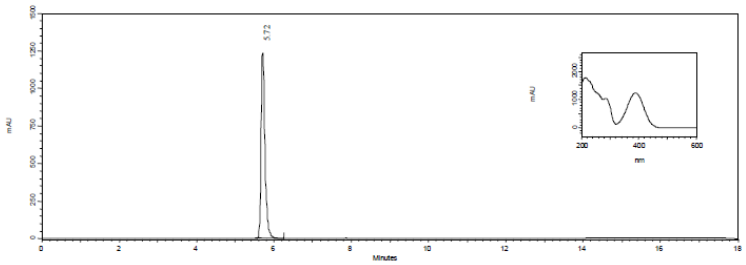
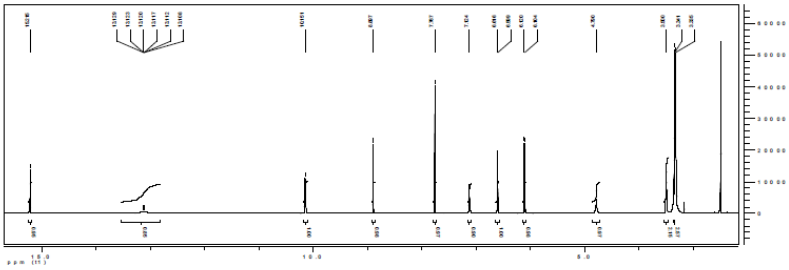


HMBC

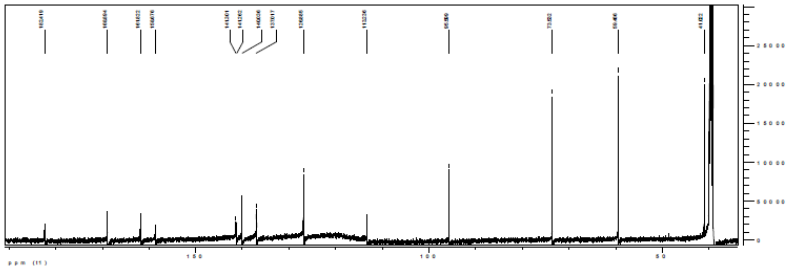


Synthesis and isolation as described above. Yellow green solid. Yield 27.82 % (51.9 mg): mp (decomposition) 168-170 °C. ^{1}H NMR: δ 6.36 (d, J = 10.1, 1H, H-7), 6.79 (d, J = 10.1, 1H, H-8), 7.46 (s, 1H, OH, on C-8a), 7.88 (s, 1H, H-2), 9.19 (s, 1H, NH, H-9), 13.43 (s, 1H, NH, H-1), 13.78 (s, 1H, NH, H-4), 15.08 (s, 1H, OH, on C-11). ^{13}C NMR: δ 73.8 (C-8a), 93.2 (C-5), 114.9 (C-10a), 124.7 (C-7), 137.3 (C-2), 139.5 (C-3a), 142.7 (C-8), 158.3 (C-10), 162.7 (C-4a), 170.6 (C-11), 185.5 (C-6). HMBC correlations: H-2 (C-3a, C-10, C-10a), H-4 (C-4a, C-5, C-8a, C-10a), H-7 (C-4a, C-5, C-6, C-8a, C-11), H-8 (C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8a), H-9 (C-4a, C-5, C-8, C-8a, C-10, C-10a), OH on C-8a (C-4a, C-8, C-8a), OH on C-11 (C-5, C-11). R_f (HPLC) 6.1 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 204, 234, 387 nm. MS m/z AP-ESI: pos. ion mode $[M+H]^+$ 277.0610 (calculated 277.0567), $[2M+H]^+$ 553.1167 (calculated 553.1062); AP-ESI: neg. ion mode $[M-H]^-$ 275.0414 (calculated 275.0422), $[2M-H]^-$ 551.0892 (calculated 551.0917), $[3M-H]^-$ 827.1346 (calculated 827.1411).

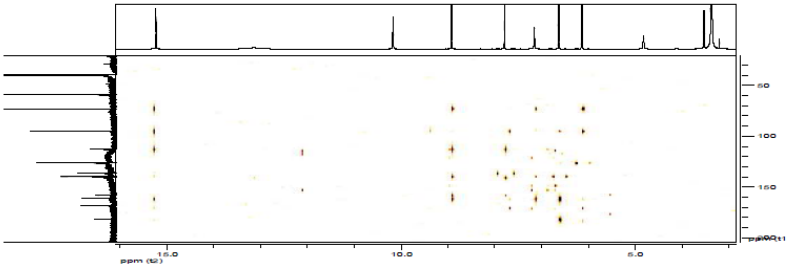
3b: product resulted from **1b** and **2a**

3b	**8a-Hydroxy-6,10-dioxo-2,4,6,8a,9,10-hexahydro-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azulene-5-carboxylic acid**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum  ^{1}H NMR 

^{13}C NMR

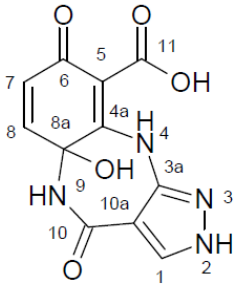
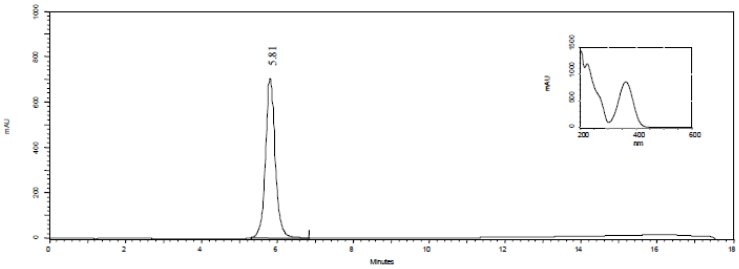
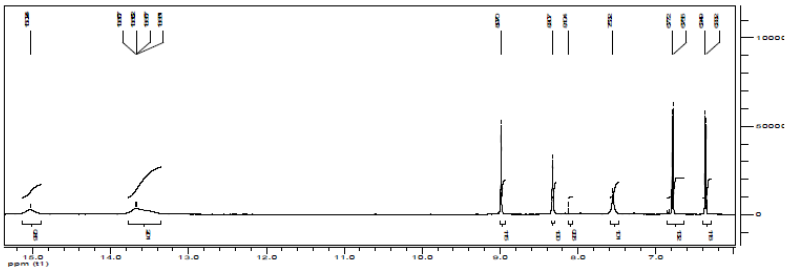
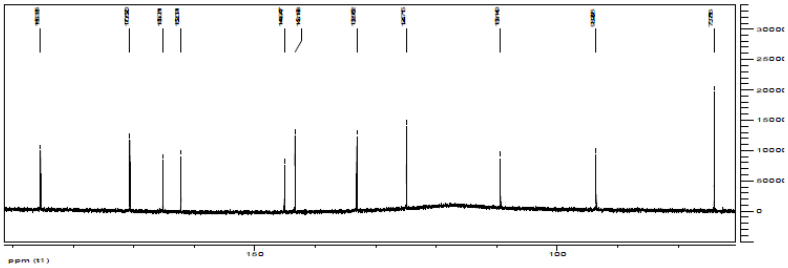
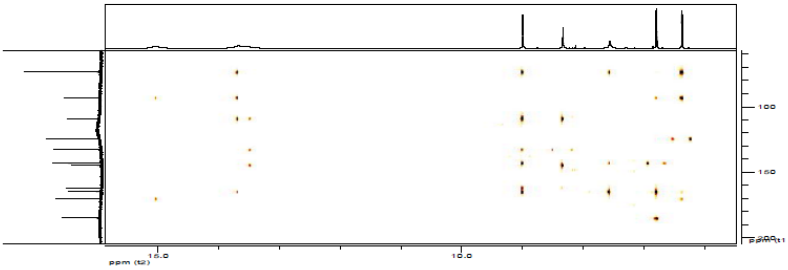


HMBC



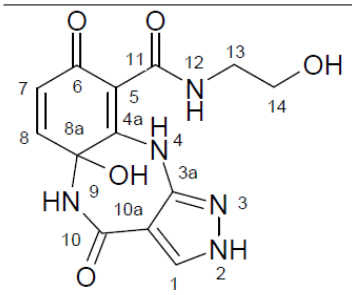
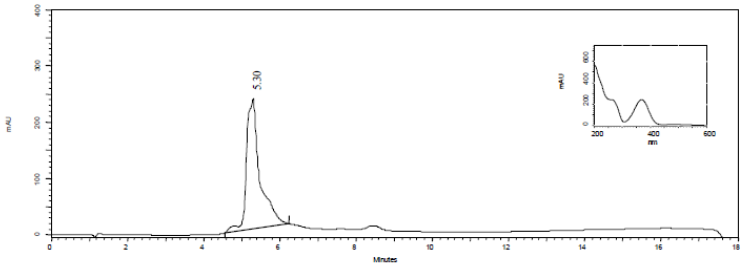
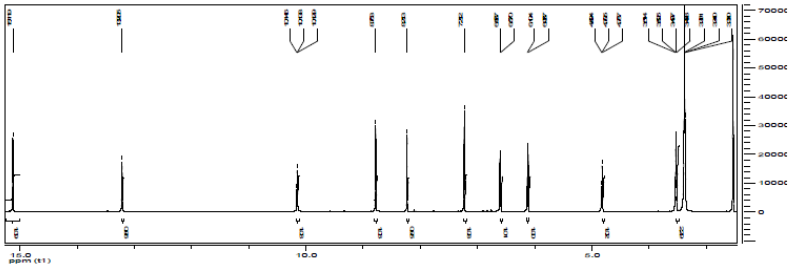
Synthesis and isolation as described above. Brown green solid. Yield 70.73 % (54.4 mg): mp (decomposition) 175-177 °C. ^{1}H NMR: δ 3.35 (m, *J* = 5.6, 2H, H-13), 3.50 (m, *J* = 5.6, 2H, H-14), 4.79 (s (broad), 1H, OH, on C-14), 6.11 (d, *J* = 10.1, 1H, H-7), 6.60 (d, *J* = 10.0, 1H, H-8), 7.12 (s, 1H, OH, on C-8a), 7.77 (s, 1H, H-2), 8.90 (s, 1H, NH, H-9), 10.15 (t, *J* = 5.5, 1H, NH, H-12), 13.12 (s (broad), 1H, NH, H-1), 15.21 (s, 1H, NH, H-4). ^{13}C NMR: δ 41.0 (C-13), 49.5 (C-14), 73.5 (C-8a), 95.6 (C-5), 113.2 (C-10a), 126.9 (C-7), 137.0 (C-2), 140.0 (C-8), 141.3 (C-3a), 158.7 (C-10), 161.8 (C-4a), 168.9 (C-11), 182.4 (C-6). HMBC correlations: H-2 (C-3a, C-10, C-10a), H-4 (C-4a, C-5, C-6, C-8, C-8a, C-10a, C-11), H-7 (C-4a, C-5, C-6, C-8, C-8a, C-11), H-8 (C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8a), H-9 (C-4a, C-5, C-8, C-8a, C-10, C-10a), H-12 (C-5, C-11, C-13, C-14), H-13 (C5, C-11, C-15), H-14 (C-13), OH on C-8a (C-4a, C-8, C-8a), OH on C-14 (C-13, C-14). R_f (HPLC) 5.7 min, UV-vis λ_{max} 230, 387 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M+H]^+$ 318.0838 (calculated 318.0844).

3c: product resulted from **1a** and **2b**

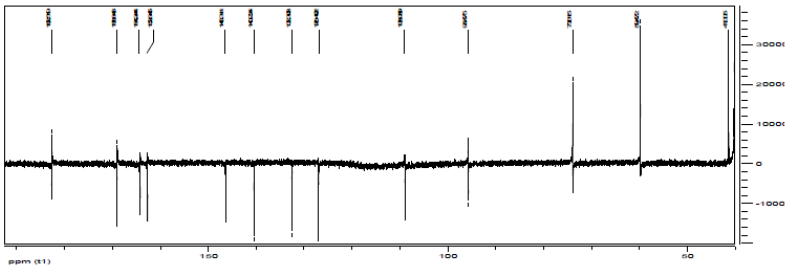
3c	**8a-Hydroxy-6,10-dioxo-2,4,6,8a,9,10-hexahydro-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azulene-5-carboxylic acid**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum  ^{1}H NMR  ^{13}C NMR  HMBC 

Synthesis and isolation as described above. Yellow brown solid. Yield 44.08 % (17.1 mg): mp (decomposition) 176-178 °C. ^{1}H NMR: δ 6.40 (d, J = 10.1, 1H, H-7), 6.76 (d, J = 10.1, 1H, H-8), 7.53 (s, 1H, OH, on C-8a), 8.31 (s, 1H, H-1), 8.97 (s, 1H, NH, H-9), 13.53 (s, 1H, NH, H-2), 13.66 (s (broad), 1H, NH, H-4), 15.02 (s (broad), 1H, OH, on C-11). ^{13}C NMR: δ 73.8 (C-8a), 93.3 (C-5), 109.1 (C-10a), 124.7 (C-7), 133.0 (C-1), 143.2 (C-8), 144.9 (C-3a), 162.1 (C-10), 165.1 (C-4a), 170.5 (C-11), 185.3 (C-6). HMBC correlations: H-1 (C-3a, C-10, C-10a), H-2 (C-1, C-3a, C-10a), H-4 (C-4a, C-5, C-8a, C-10a), H-7 (C-4a, C-5, C-6, C-8a, C-11), H-8 (C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8a), H-9 (C-1, C-4a, C-5, C-8, C-8a, C-10, C-10a), OH on C-8a (C-4a, C-5, C-8, C-8a), OH on C-11 (C-5, C-11). R_f (HPLC) 5.8 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 224, 364 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 275.0396 (calculated 275.0416). AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 277.0591 (calculated 277.0573).

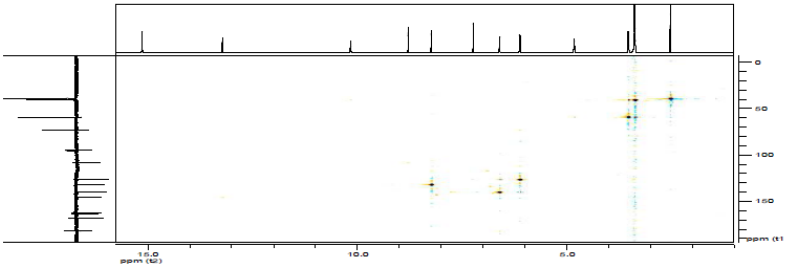
3d: product resulted from **1b** and **2b**

3d	**8a-Hydroxy-6,10-dioxo-2,4,6,8a,9,10-hexahydro-2,3,4,9-tetraaza-benzo[f]azulene-5-carboxylic acid (2-hydroxy-ethyl)-amide**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum  ^{1}H NMR 

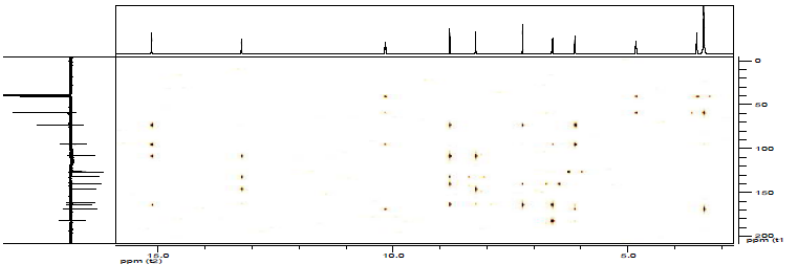
^{13}C NMR



HSQC



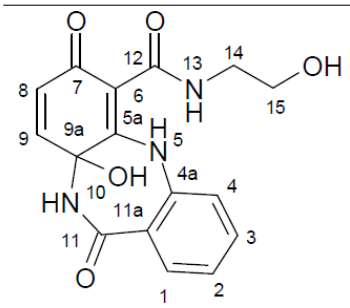
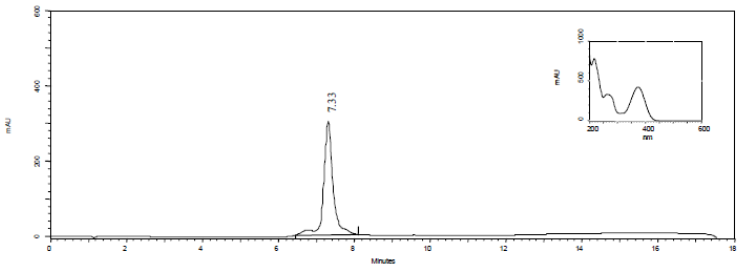
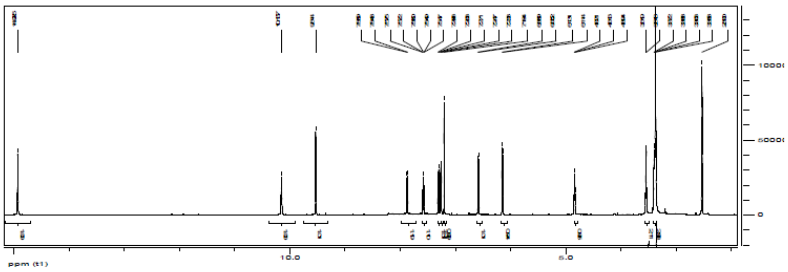
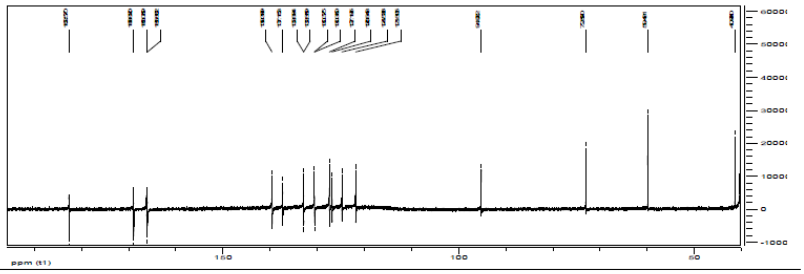
HMBC



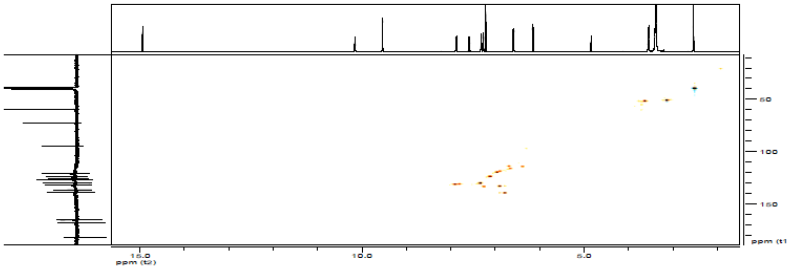
Synthesis and isolation as described above. Yellow brown solid. Yield 26.37 % (26.6 mg): mp (decomposition) 177-179 °C. ^{1}H NMR: δ 3.34 (m, J = 5.5, 2H, H-13), 3.50 (m, J = 5.3, 2H, H-14), 4.79 (t, J = 5.0, 1H, OH, on C-14), 6.09 (d, J = 10.0, 1H, H-7), 6.58 (d, J = 10.0, 1H, H-8), 7.21 (s, 1H, OH, on C-8a), 8.21 (s, 1H, H-1), 8.76 (s, 1H, NH, H-9), 10.14 (t, J = 5.4, 1H, NH, H-12), 13.21 (s, 1H, NH, H-2), 15.12 (s, 1H, NH, H-4). ^{13}C NMR: δ 40.8 (C-13), 59.3 (C-14), 73.5 (C-8a), 95.5 (C-5), 108.7 (C-10a), 126.6 (C-7), 132.1 (C-1), 140.0 C-8, 146.2 (C-3a), 163.8 (C-10), 164.2 (C-4a), 168.8 (C-11), 182.7 (C-6). HMBC correlations: H-1 (C-3a, C-10, C-10a), H-2 (C-1, C-3a, C-10, C-10a), H-4 (C-4a, C-5, C-8, C-8a, C-10a), H-7 (C-4a, C-5, C-6, C-8a, C-11), H-8 (C-4a, C-5, C-6, C-7), H-9 (C-1, C-4a, C-5, C-8,

C-8a, C-10, C-10a), H-12 (C-5, C-11, C-13, C-14), H-13 (C-11, C-14), H-14 (C-13), OH on C-8a (C-4a, C-8, C-8a), OH on C-14 (C-13, C-14). R_f (HPLC) 5.3 min, UV-Vis (MeOH) λ_{max} 206, 370 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. $[M-H]^-$ 318.0829 (calculated 318.0838). AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 320.1031 (calculated 320.0995).

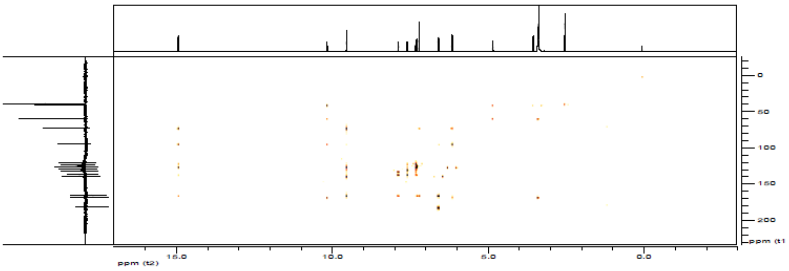
3e: product resulted from **1b** and **2c**

3e	**9a-Hydroxy-7,11-dioxo-7,9a,10,11-tetrahydro-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepine-6-carboxylic acid (2-hydroxy-ethyl)-amide**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum  ^{1}H NMR  ^{13}C NMR 

HSQC

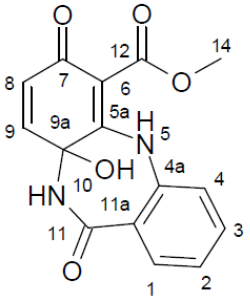
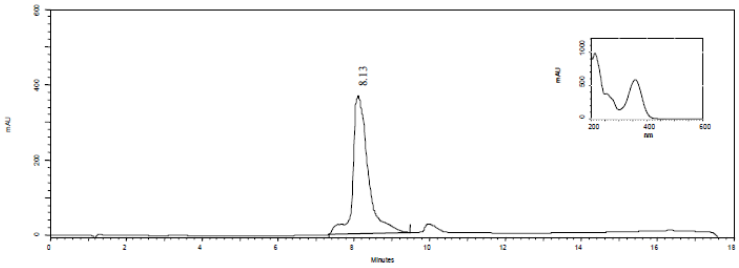
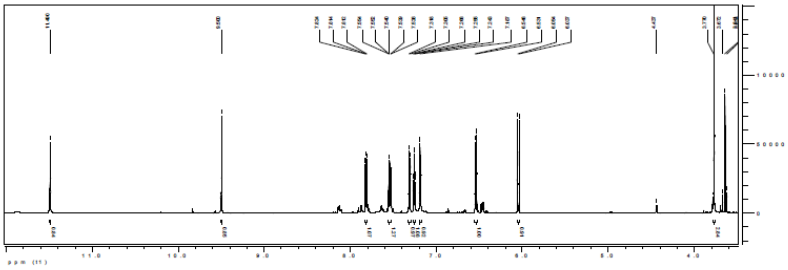
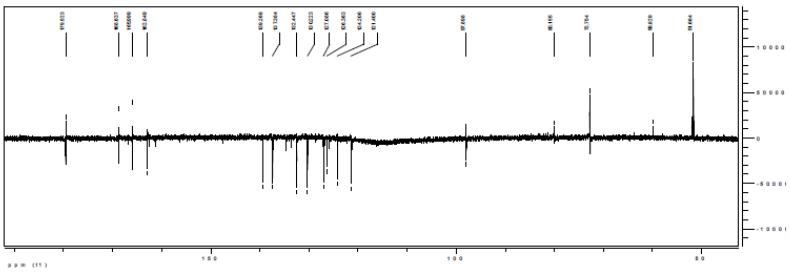
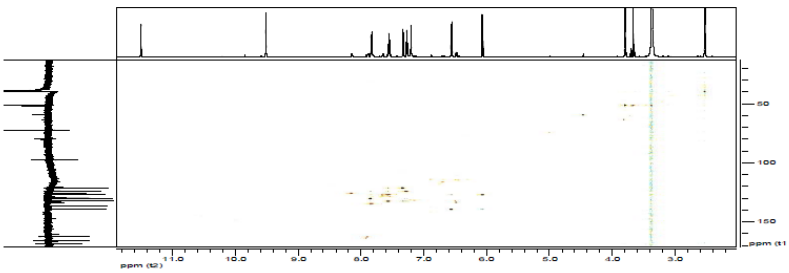


HMBC

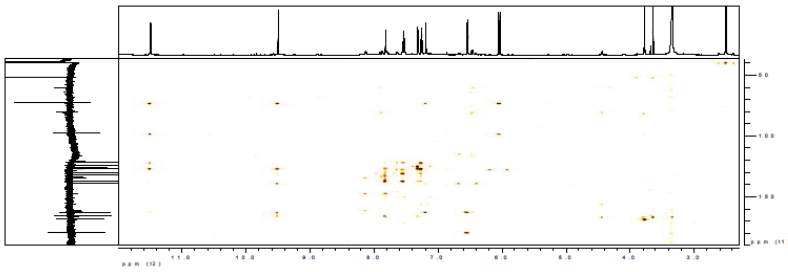


Synthesis and isolation as described above. Yellow solid. Yield 38.25 % (15.3 mg): mp (decomposition) 158-162 °C, mp 204-208 °C. ^{1}H NMR: δ 3.36 (m, J = 5.4, J = 2.4, 2H, H-14), 3.51 (m, J = 5.3, 2H, H-15), 4.81 (t, J = 5.0, 1H, OH, on C-15), 6.12 (d, J = 10.0, 1H, H-8), 6.56 (d, J = 10.0, 1H, H-9), 7.18 (s, 1H, OH, on C-9a), 7.24 (d, J = 8.0, 1H, H-4), 7.28 (dd, J = 7.9, J = 7.7, 1H, H-2), 7.56 (m, J = 7.9, J = 7.4, J = 1.4, 1H, H-3), 7.85 (d, J = 7.8, J = 1.2, 1H, H-1), 9.51 (s, 1H, NH, H-10), 10.14 (t, J = 5.4, 1H, NH, H-13), 14.92 (s, 1H, NH, H-5). ^{13}C NMR: δ 40.9 (C-14), 59.5 (C-15), 72.7 (C-9a), 94.9 (C-6), 121.6 (C-4), 124.5 (C-2), 126.6 (C-11a), 127.2 (C-8), 130.4 (C-1), 132.7 (C-3), 137.1 (C-4a), 139.4 (C-9), 165.9 (C-11), 166.1 (C-5a), 182.6 (C-7). HMBC correlations: H-1 (C-3, C-4, C-4a, C-11), H-2 (C-1, C-3a, C-4, C-4a, C-11a), H-3 (C-1, C-4, C-4a, C-11a), H-4 (C-2, C-4a, C-5, C-11a), H-5 (C-4, C-4a, C-5a, C-6, C-7, C-9a, C-11a), H-8 (C-6, C-7, C-9a, C-12), H-9 (C-5a, C-6, C-7, C-8), H-10 (C-5a, C-9, C-9a, C-11, C-11a), H-13 (C-6, C-12, C-14, C-15), H-14 (C-12, C-15), H-15 (C-14), OH on C-9a (C-5a, C-9, C-9a), OH on C-15 (C-14, C-15). R_f (HPLC) 7.3 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 224, 262, 374 nm. MS m/z AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 328.0928 (calculated 328.0933). AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 330.1129 (calculated 330.1090).

3f: product resulted from **1c** and **2c**

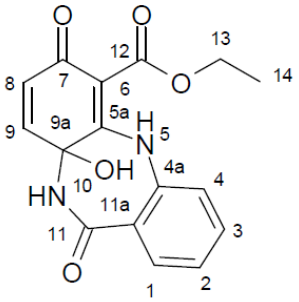
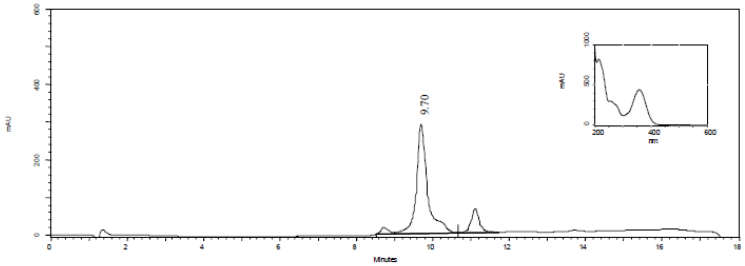
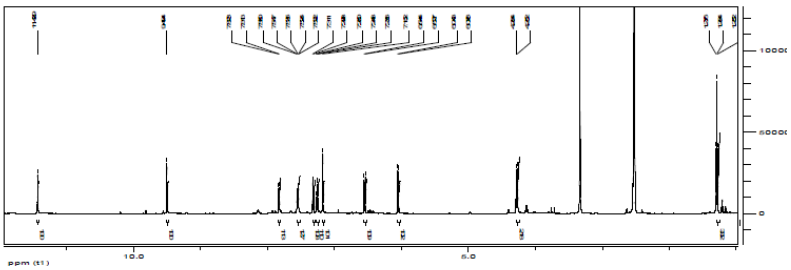
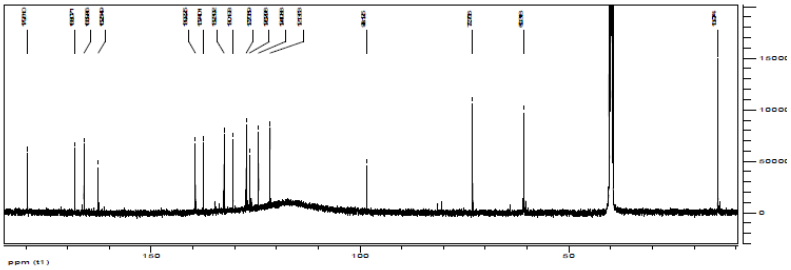
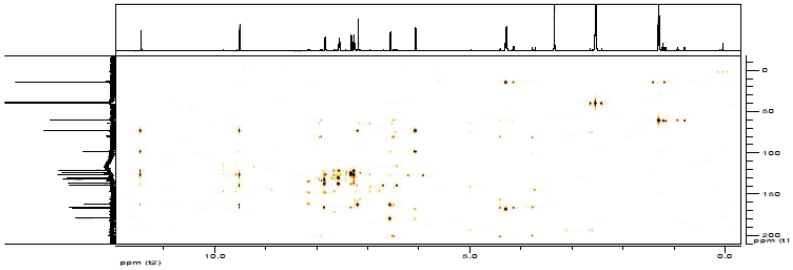
3f	**9a-Hydroxy-7,11-dioxo-7,9a,10,11-tetrahydro-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepine-6-carboxylic acid methyl ester**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum  ^{1}H NMR  ^{13}C NMR  HSQC 

HMBC



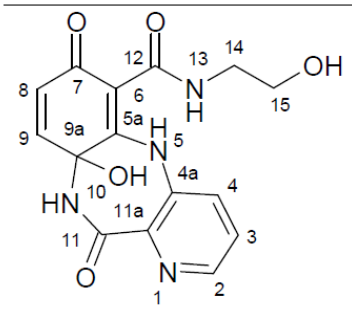
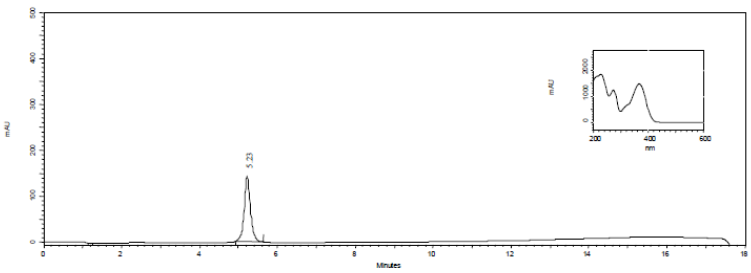
Synthesis and isolation as described above. Yellow solid. Yield 29.30 % (10.7 mg): mp (decomposition) 135-139 °C, mp 181-185 °C. ^{1}H NMR: δ 3.77 (s, 3H, H-14), 6.04 (d, J = 10.0, 1H, H-8), 6.54 (d, J = 10.0, 1H, H-9), 7.19 (s, 1H, OH, on C-9a), 7.26 (m, J = 7.9, J = 0.6, H-2), 7.31 (d, J = 7.9, 1H, H-4), 7.54 (m, J = 8.0, J = 1.4, 1H, H-3), 7.81 (d, J = 7.8, J = 1.3, 1H, H-1), 9.50 (s, 1H, NH, H-10), 11.49 (s, 1H, NH, H-5). ^{13}C NMR: δ 51.7 (C-14), 121.4 (C-2), 124.2 (C-2), 127.1 (C-8), 130.2 (C-1), 132.4 (C-3), 139.3 (C-9). HMBC correlations: H-1 (C-3, C-4a, C-11), H-2 (C-1, C-3, C-4, C-4a, C-11a), H-3 (C-1, C-4a), H-4 (C-2, C-4a, C-11, C-11a), H-5 (C-4, C-4a, C-5a, C-6, C-9a, C-11a), H-8 (C-6, C-9a, C-12), H-9 (C-5a, C-7), H-10 (C-5a, C-9, C-9a, C-11, C-11a), H-14 (C-6, C-12), OH on C-9a (C-5a, C-9, C-9a). R_f (HPLC) 8.1 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 214, 256, 359 nm. MS m/z AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 299.0655 (calculated 299.0668). AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 301.0464 (calculated 301.0824).

3g: product resulted from **1d** and **2c**

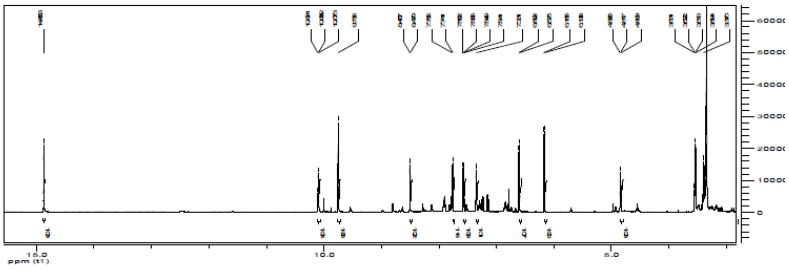
3g	**9a-Hydroxy-7,11-dioxo-7,9a,10,11-tetrahydro-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepine-6-carboxylic acid ethyl ester**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum  ^{1}H NMR  ^{13}C NMR  HMBC 

Synthesis and isolation as described above. Yellow solid. Yield 11.47 % (7.3 mg): mp (decomposition) 126-130 °C, mp 169-173 °C. ^{1}H NMR: δ 1.26 (t, J = 7.1, 3H, H-14), 4.26 (m, J = 7.0, 2H, H-13), 6.03 (d, J = 10.1, 1H, H-8), 6.56 (d, J = 10.1, 1H, H-9), 7.16 (s, 1H, OH, on C-9a), 7.25 (m, J = 7.6, J = 0.5, 1H, H-2), 7.30 (d, J = 7.9, 1H, H-4), 7.54 (m, J = 8.0, J = 1.5, 1H, H-3), 7.80 (d, J = 7.8, J = 1.3, 1H, H-1), 9.49 (s, 1H, NH, H-10), 11.43 (s, 1H, NH, H-5). ^{13}C NMR: δ 14.0 (C-14), 60.3 (C-13), 72.7 (C-9a), 98.1 (C-6), 121.4 (C-4), 124.1 (C-2), 126.3 (C-11a), 127.1 (C-8), 130.2 (C-1), 132.4 (C-3), 137.4 (C-4a), 139.2 (C-9), 162.6 (C-5a), 166.0 (C-10), 168.1 (C-12), 179.5 (C-7). HMBC correlations: H-1 (C-3, C-4a, C-10, C-11a), H-2 (C-1, C-4, C-4a, C-11a), H-3 (C-1, C-4, C-4a), H-4 (C-2, C-4a, C-10, C-11a), H-5 (C-4, C-4a, C-5a, C-6, C-9a, C-11a), H-8 (C-5a, C-6, C-7, C-9a, C-12), H-9 (C-5a, C-6, C-7, C-8), H-10 (C-5a, C-9, C-9a, C-10, C-11a), H-13 (C-12, C-13), H-14 (C-13), OH on C-9a (C-5a, C-9, C-9a). R_f (HPLC) 9.7 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 214, 256, 359 nm. MS m/z AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 312.8888 (calculated 313.0824).

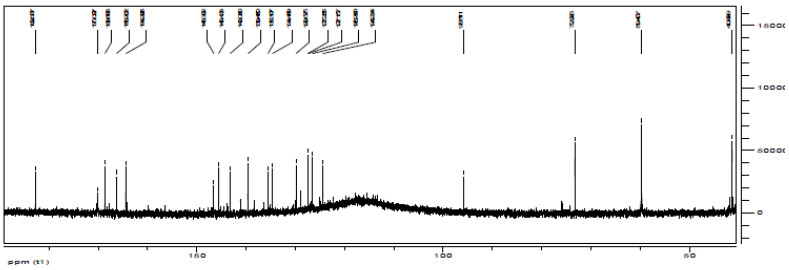
3h: product resulted from **1b** and **2d**

3h	**9a-Hydroxy-7,11-dioxo-7,9a,10,11-tetrahydro-5H-1,5,10-triaza-dibenzo[a,d]cycloheptene-6-carboxylic acid (2-hydroxy-ethyl)-amide**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum 

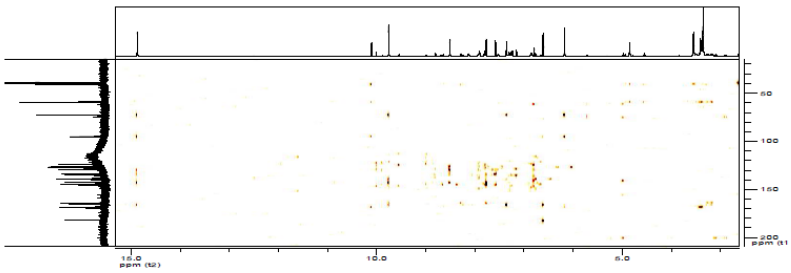
^{1}H NMR



^{13}C NMR



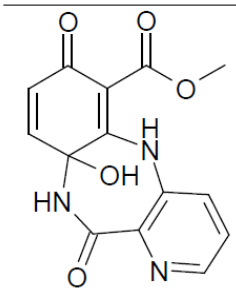
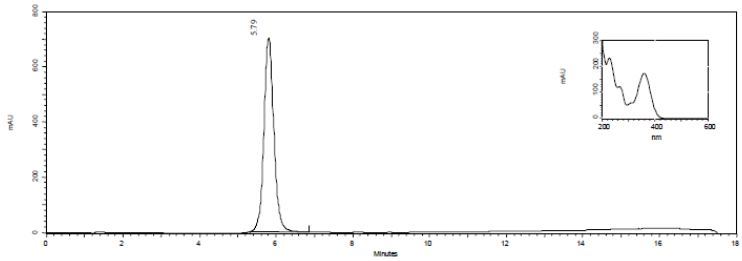
HMBC



Synthesis and isolation as described above. Yellow solid. Yield 15.55 % (10.4 mg). ^{1}H NMR: δ 3.37 (m, *J* = 5.6, 2H, H-14), 3.52 (m, *J* = 5.4, 2H, H-15), 4.82 (t, *J* = 5.1, 1H, OH, on C-15), 6.15 (d, *J* = 10.0, 1H, H-8), 6.58 (d, *J* = 10.0, 1H, H-9), 7.33 (s, 1H, OH, on C-9a), 7.55 (d, *J* = 8.2, *J* = 4.5, 1H, H-3), 7.75 (d, *J* = 8.2, *J* = 1.2, 1H, H-4), 8.48 (d, *J* = 4.5, *J* = 1.2, 1H, H-2), 9.74 (s, 1H, NH, H-10), 10.08 (t, *J* = 5.4, 1H, NH, H-13), 14.86 (s, 1H, NH, H-5). ^{13}C NMR: δ 41.0 (C-14), 59.4 (C-15), 72.9 (C-9a), 95.5 (C-6), 126.3 (C-3), 127.3 (C-8), 129.7 (C-4), 134.5 (C-4a), 139.4 (C-9), 143.1 (C-11a), 145.4 (C-2), 164.3 (C-11), 166.2 (C-5a), 168.6 (C-12), 182.7 (C-7). HMBC correlations: H-2 (C-3, C-4, C-4a, C-11a), H-3 (C-2, C-4, C-4a), H-4 (C-2, C-4a, C-11, C-11a), H-5 (C-4, C-4a, C-5a, C-6, C-9a, C-11a), H-8

(C-6, C-9a, C-12), H-9 (C-5a, C-6, C-7), H-10 (C-5a, C-9, C-9a, C-11, C-11a), H-13 (C-6, C-12, C-15), H-14 (C-12, C-15), H-15 (C-14), OH on C-9a (C-5a, C-9, C-9a), OH on C-15 (C-14, C-15). R_f (HPLC) 5.2 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 227, 273, 368 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 329.0868 (calculated 329.0891).

3i: product resulted from **1c** and **2d**

3i	**9a-Hydroxy-7,11-dioxo-7,9a,10,11-tetrahydro-5H-1,5,10-triaza-dibenzo[a,d]cycloheptene-6-carboxylic acid methyl ester**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum 

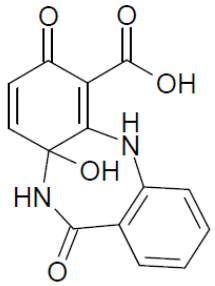
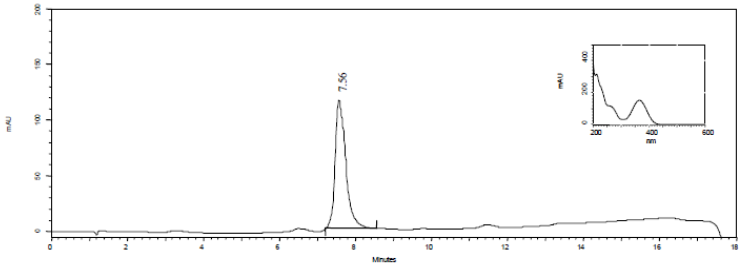
Synthesis and isolation as described above. Yellow solid. Yield 1.36 % (0.5 mg): mp (decomposition) 182-186 °C. R_f (HPLC) 5.8 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 227, 273, 368 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 300.0575 (calculated 300.0625).

3j: product resulted from **1d** and **2d**

R_f (HPLC) 6.5 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 214, 256, 359 nm received only from HPLC elution profile of the reaction mixture.

3k: product resulted from **1a** and **2c**

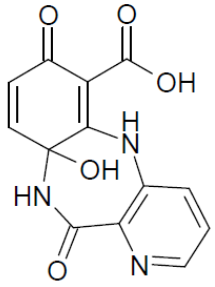
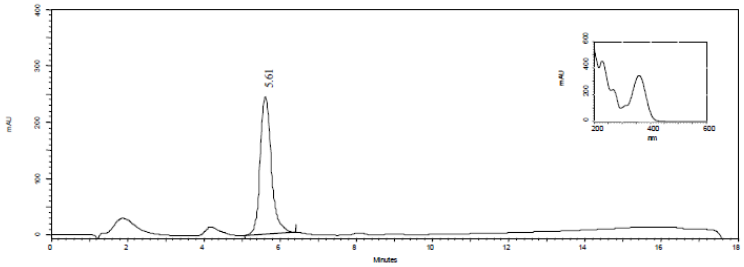
3k reacted to **5a**

3k	**9a-Hydroxy-7,11-dioxo-7,9a,10,11-tetrahydro-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepine-6-carboxylic acid**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum 

Synthesis and isolation as described above. Yellow solid. Yield 26.99 % (31.3 mg): mp (decomposition) 130-134 °C, mp 156-160 °C. R_f (HPLC) 7.6 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 213, 366 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 285.0499 (calculated 285.0517).

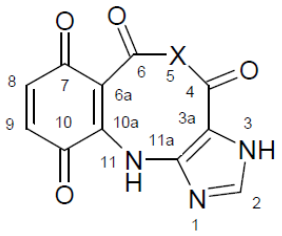
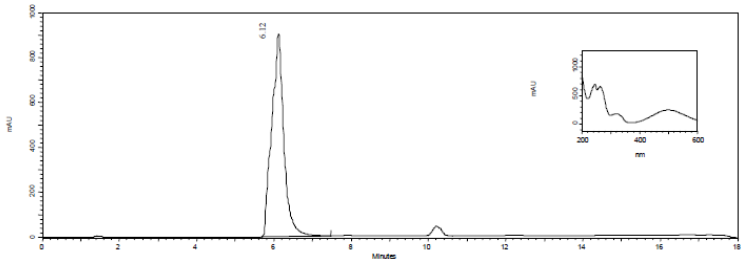
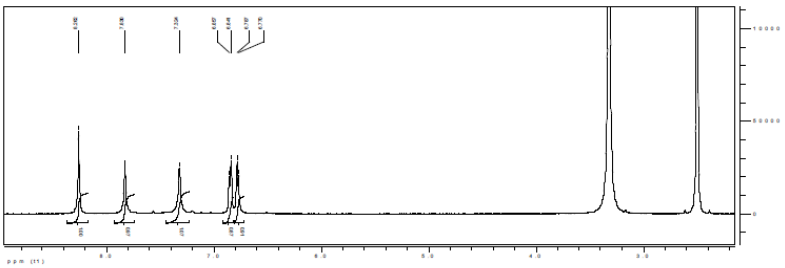
3l: product resulted from **1a** and **2d**

3l reacted to **5b**

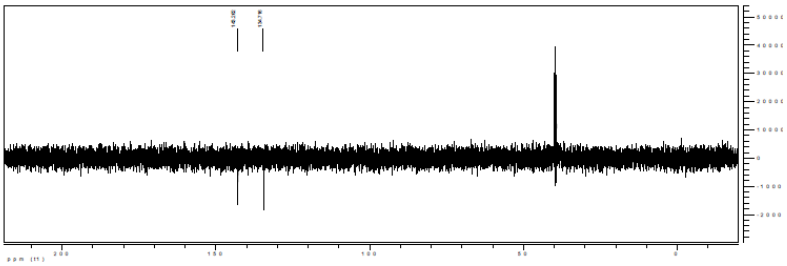
3l	**9a-Hydroxy-7,11-dioxo-7,9a,10,11-tetrahydro-5H-1,5,10-triaza-dibenzo[a,d]cycloheptene-6-carboxylic acid**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum 

Synthesis and isolation as described above. Yellow solid. Yield 26.44 % (15.4 mg): mp (decomposition) 134-138 °C. R_f (HPLC) 5.6 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 229, 267, 360 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 288.0590 (calculated 288.0626).

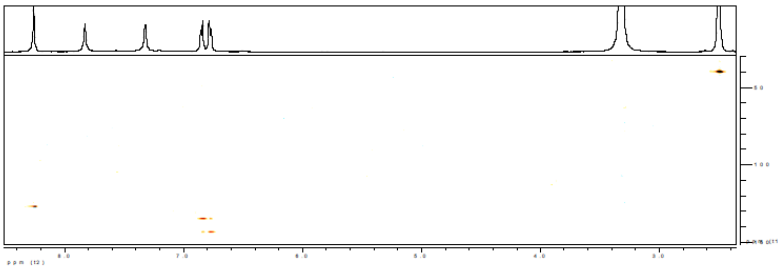
4a,b: products resulted from **1c** and **2a**

4a	**3,11-Dihydro-1,3,5,11-tetraaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6,7,10-tetraone**
4b	**3,11-Dihydro-5-oxa-1,3,11-triaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6,7,10-tetraone**
 **4a** X = NH **4b** X = O	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum  ^{1}H NMR 

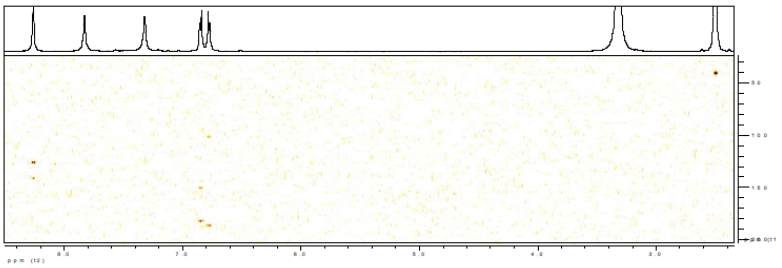
DEPT



HSQC



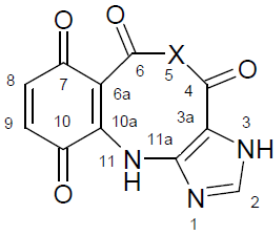
HMBC



Synthesis and isolation as described above. Dark violet solid. Yield 47.70 % (90.6 mg): mp (decomposition) 149-153 °C. ^{1}H NMR: δ 6.78 (d, J = 9.7, 1H, H-8), 6.85 (d, J = 9.7, 1H, H-9), 7.32 (s, 1H, NH), 7.83 (s, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, H-2). ^{13}C NMR: δ 100.2 (C-6a), 125.0 (C-3a), 126.3 (C-2), 134.1 (C-9), 140.0 (C-11a), 142.5 (C-8), 149.1 (C-10a), 153.8 (C-6), 164.2 (C-4), 181.0 (C-7), 185.1 (C-10). HMBC correlations: H-2 (C-3a, C-11a), H-8 (C-6a, C-10), H-9 (C-7, C-10a), NH (C-3a). R_f (HPLC) 6.1 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 246, 265, 323, 503 nm. (**4a**) MS *m/z* AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 259.0513 (calculated 259.0462). (**4b**) MS *m/z* AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 260.0368 (calculated 260.0302).

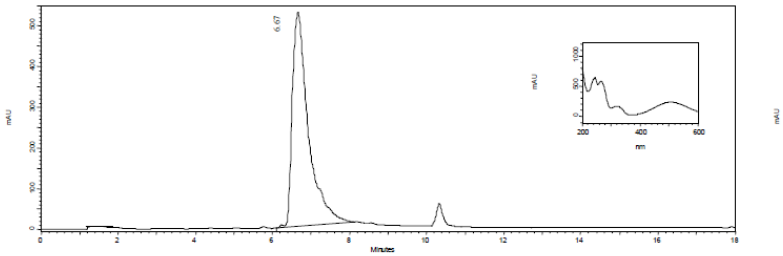
4a,b: products resulted from **1d** and **2a**

4a	**3,11-Dihydro-1,3,5,11-tetraaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6,7,10-tetraone**
4b	**3,11-Dihydro-5-oxa-1,3,11-triaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6,7,10-tetraone**

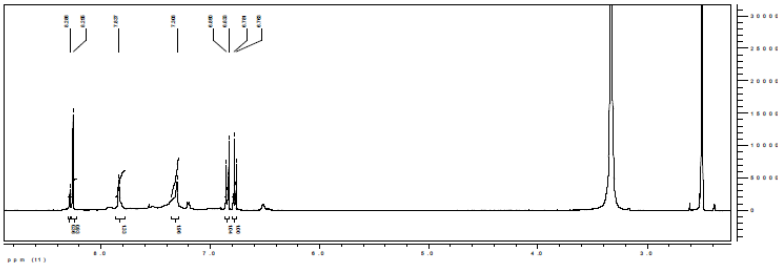


4a X = NH
4b X = O

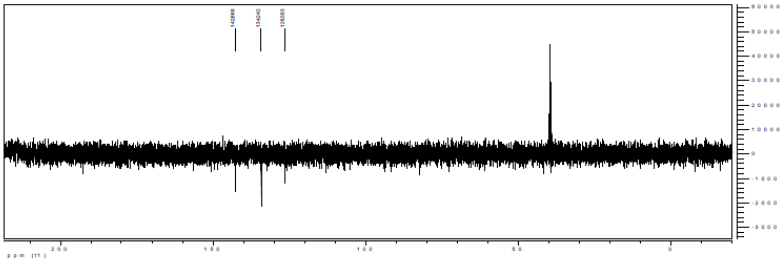
HPLC chromatogram and UV-vis spectrum



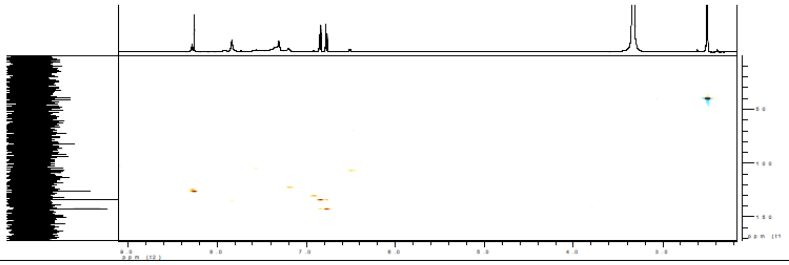
^{1}H NMR



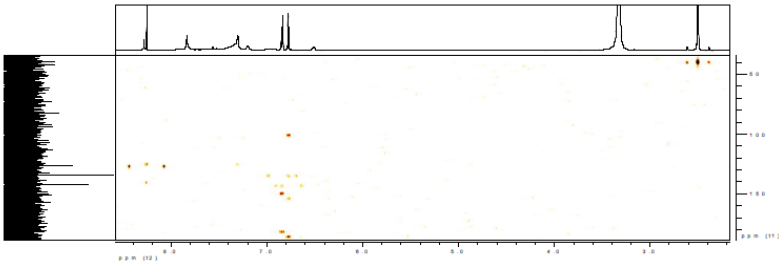
DEPT



HSQC



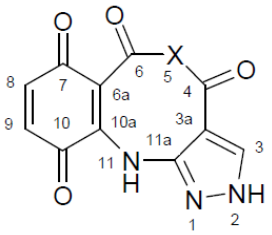
HMBC



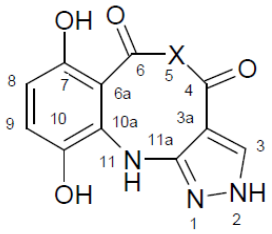
Synthesis and isolation as described above. Dark violet solid. Yield 63.4 % (78.9 mg): mp (decomposition) 148-150 °C. ^{1}H NMR: δ 6.77 (d, J = 10.3, 1H, H-8), 6.84 (d, J = 10.3, 1H, H-9), 7.31 (s, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, H-2). ^{13}C NMR: δ 100.2 (C-6a), 124.5 (C-3a), 126.4 (C-2), 134.2 (C-9), 139.8 (C-11a), 142.6 (C-8), 148.8 (C-10a), 153.1 (C-6), 163.8 (C-4), 180.8 (C-7), 184.8 (C-10). HMBC correlations: H-2 (C-3a, C-11a), H-8 (C-6, C-6a, C-9, C-10), H-9 (C-7, C-8, C-10a), NH (C-3a). R_f (HPLC) 6.7 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 246, 265, 323, 503 nm. (**4a**) MS *m/z* AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 259.0539 (calculated 259.0463). (**4b**) MS *m/z* AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 260.0396 (calculated 260.0302).

4c-f: products resulted from **1c** and **2b**

4c	**2,11-Dihydro-1,2,5,11-tetraaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6,7,10-tetraone**
4d	**2,11-Dihydro-5-oxa-1,2,11-triaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6,7,10-tetraone**
4e	**7,10-Dihydroxy-2,11-dihydro-1,2,5,11-tetraaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6-dione**
4f	**7,10-Dihydroxy-2,11-dihydro-5-oxa-1,2,11-triaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6-dione**

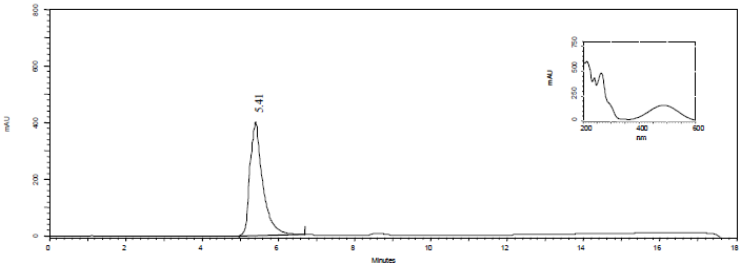


4c X = NH
4d X = O

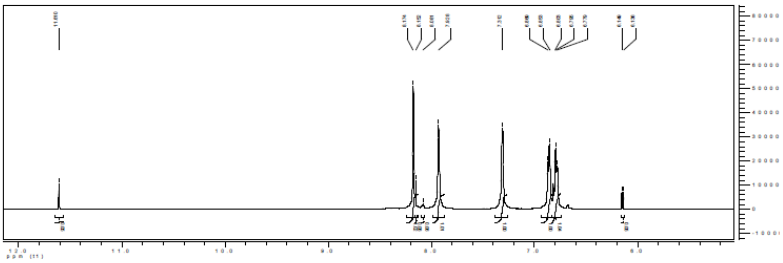


4e X = NH
4f X = O

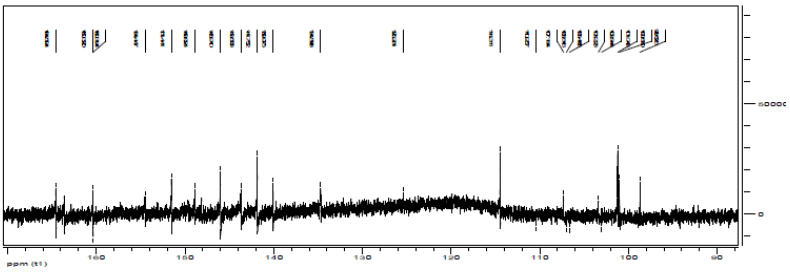
HPLC chromatogram and UV-vis spectrum



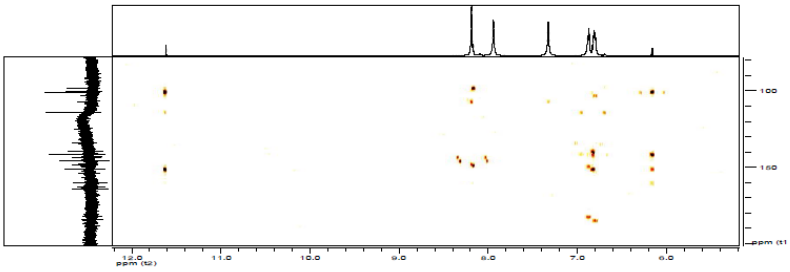
^{1}H NMR



^{13}C NMR



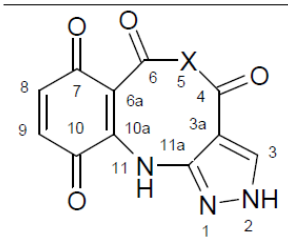
HMBC



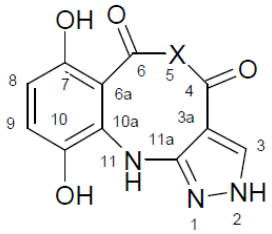
Synthesis and isolation as described above. Red solid. Yield 56.64 % (20 mg): mp (decomposition) 141-143 °C. R_f (HPLC) 5.4 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 214, 241, 265, 487 nm. NMR data of quinonoid and hydroquinonoid products are available from one ^{1}H NMR, one ^{13}C NMR, one HSQC, and one HMBC spectrum. (**4c,d**) ^{1}H NMR: δ 6.78 (d, *J* = 9.7, 1H, H-8), 6.86 (d, *J* = 9.8, 1H, H-9), 7.31 (s, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, NH), 8.17 (s, 1H, H-3). ^{13}C NMR: δ 100.2 (C-6a), 124.5 (C-3a), 126.4 (C-2), 134.2 (C-9), 139.8 (C-11a), 142.6 (C-8), 148.8 (C-10a), 153.1 (C-6), 163.8 (C-4), 180.8 (C-7), 184.8 (C-10). HMBC correlations: H-2 (C-3a, C-11a), H-8 (C-6, C-6a, C-9, C-10), H-9 (C-7, C-8, C-10a), NH (C-3a). (**4e,f**) ^{1}H NMR: δ 6.14 (d, *J* = 8.1, 1H, H-8), 6.80 (d, *J* = 8.2, 1H, H-9), 8.15 (s, 1H, H-3), 11.61 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR: δ 98.4 (C-3a), 100.1 (C-8), 100.8 (C-6), 101.1 (C-8), 114.2 (C-9), 139.9 (C-10a), 141.7 (C-10), 145.7 (C-3), 149.1 (C-11a), 151.3 (C-7), 160.4 (C-6/C-4). HMBC correlations: H-3 (C-3a, C-4, C-11a), H-8 (C-6, C-6a, C-7, C-10), H-9 (C-7, C-10, C-10a), OH (C-6a, C-7). (**4c**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 257.0293 (calculated 257.03163). (**4d**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 258.0323 (calculated 258.0206). (**4e**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 259.0449 (calculated 259.0473). (**4f**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 260.0482 (calculated 260.0313).

4c-f: products resulted from **1d** and **2b**

4c	**2,11-Dihydro-1,2,5,11-tetraaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6,7,10-tetraone**
4d	**2,11-Dihydro-5-oxa-1,2,11-triaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6,7,10-tetraone**
4e	**7,10-Dihydroxy-2,11-dihydro-1,2,5,11-tetraaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6-dione**
4f	**7,10-Dihydroxy-2,11-dihydro-5-oxa-1,2,11-triaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6-dione**

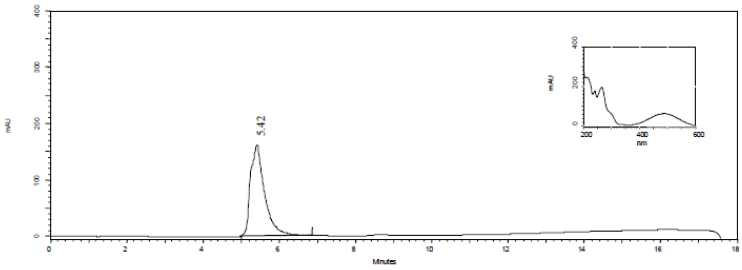


4c X = NH
4d X = O

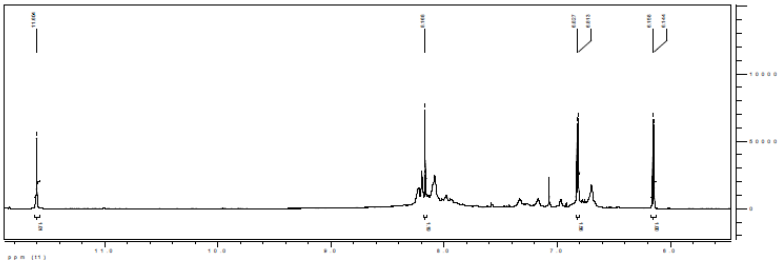


4e X = NH
4f X = O

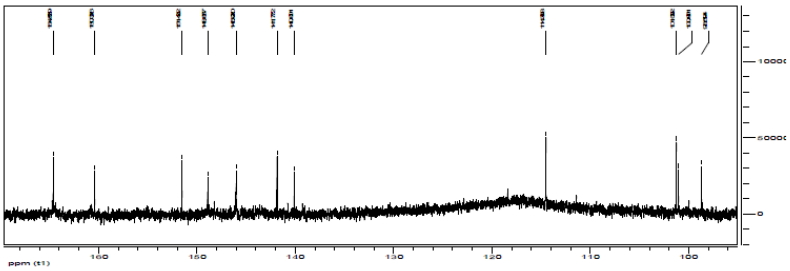
HPLC chromatogram and UV-vis spectrum



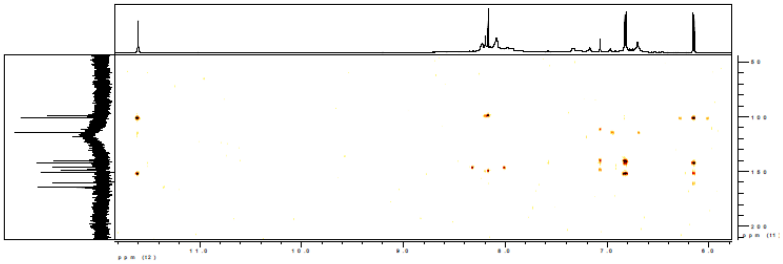
^{1}H NMR



^{13}C NMR



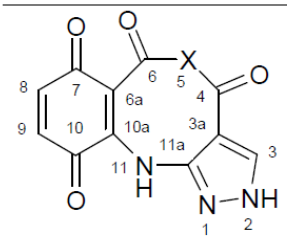
HMBC



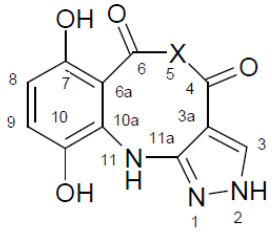
Synthesis and isolation as described above. Red solid. Yield 56.76 % (21 mg). R_f (HPLC) 5.4 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 214, 240, 265, 488 nm. (**4e,f**) ^{1}H NMR: δ 6.15 (d, J = 8.1, 1H, H-8), 6.82 (d, J = 8.1, 1H, H-9), 8.17 (s, 1H, H-3), 11.60 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR: δ 98.4 (C-3a), 100.8 (C-6a), 101.1 (C-8), 114.4 (C-9), 140.0 (C-10a), 141.7 (C-10), 145.7 (C-3), 149.1 (C-11a), 151.4 (C-7), 160.3 (C-6), 160.4 (C-4). HMBC correlations: H-3 (C-3a, C-4, C-11a), H-8 (C-6, C-6a, C-7, C-10), H-9 (C-7, C-10, C-10a), OH (C-6a, C7). (**4c**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 257.0298 (calculated 257.03163). (**4d**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 258.0329 (calculated 258.0206). (**4e**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 259.0454 (calculated 259.0473). (**4f**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 260.0485 (calculated 260.0313).

4c-f: products resulted from **1a** and **2b**

4c	**2,11-Dihydro-1,2,5,11-tetraaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6,7,10-tetraone**
4d	**2,11-Dihydro-5-oxa-1,2,11-triaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6,7,10-tetraone**
4e	**7,10-Dihydroxy-2,11-dihydro-1,2,5,11-tetraaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6-dione**
4f	**7,10-Dihydroxy-2,11-dihydro-5-oxa-1,2,11-triaza-benzo[a]cyclopenta[d]cyclooctene-4,6-dione**

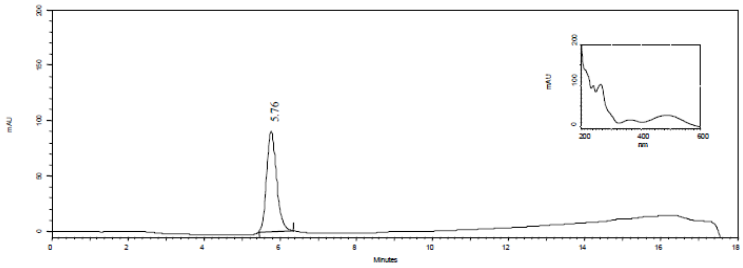


4c X = NH
4d X = O

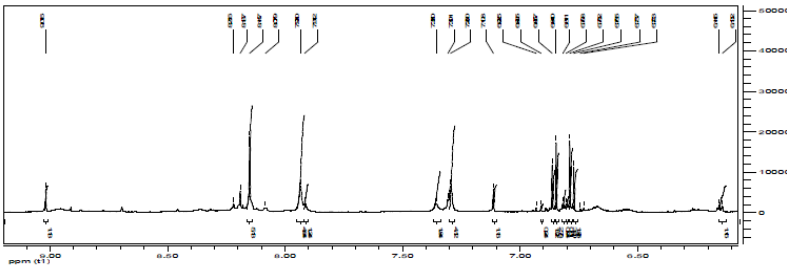


4e X = NH
4f X = O

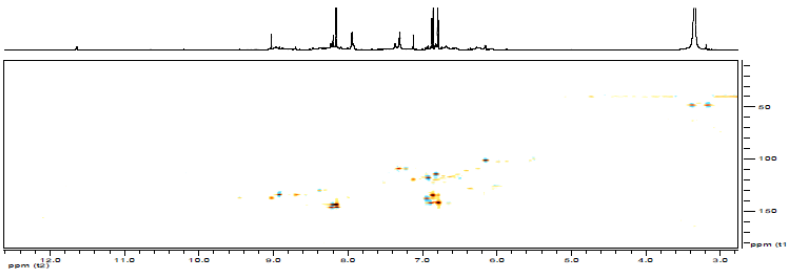
HPLC chromatogram and UV-vis spectrum



^{1}H NMR

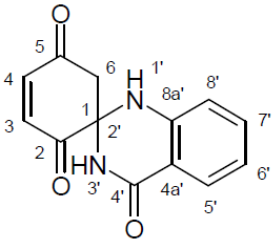
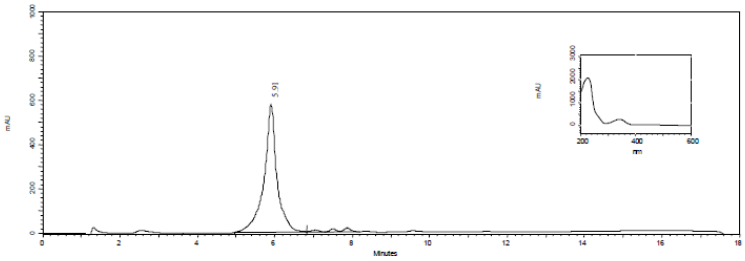


HSQC

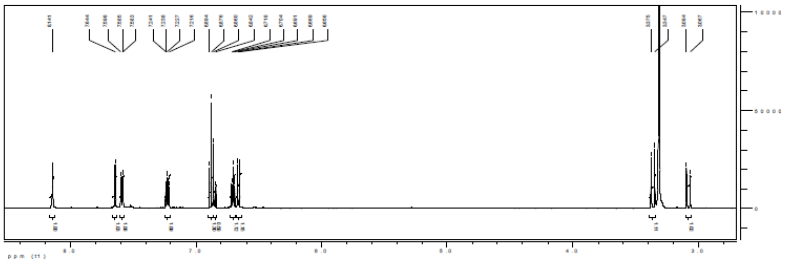


Synthesis and isolation as described above. Red solid. Yield 10.01 % (10.1 mg). R_f (HPLC) 5.5 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 210, 240, 265, 487 nm. NMR data of quinonoid and hydroquinonoid products are available from one ^{1}H NMR and one HSQC spectrum. (**4c,d**) ^{1}H NMR: δ 6.77 (d, *J* = 10.3, 1H, H-8), 6.85 (d, *J* = 10.3, 1H, H-9), 7.29 (s, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, NH), 8.15 (s, 1H, H-3). ^{13}C NMR: δ 134.3 (C-9), 141.3 (C-8), 143.3 (C-3). HMBC correlations: HMBC was not measured. (**4e,f**) ^{1}H NMR: δ 6.14 (d, *J* = 8.1, 1H, H-8), 6.80 (d, *J* = 8.2, 1H, H-9), 8.14 (s, 1H, H-3), 11.63 (s, 1H, NH or OH). ^{13}C NMR: δ 100.7 (C-8), 114.0 (C-9), 145.5 (C-3). HMBC correlations: HMBC was not measured. (**4c**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 257.0305 (calculated 257.0316). AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 259.0495 (calculated 259.0462). (**4d**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 258.0333 (calculated 258.0206). (**4e**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 259.0457 (calculated 259.0473). (**4f**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 260.0489 (calculated 260.0313).

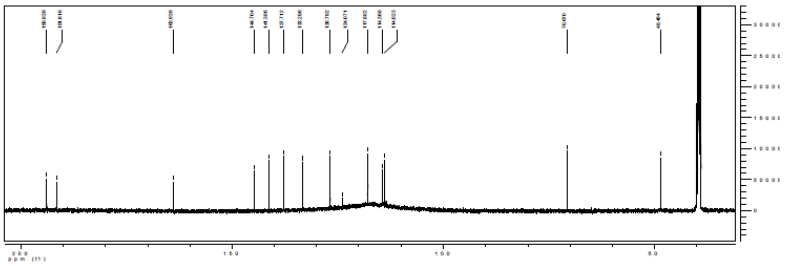
5a: product resulted from conversion of **3k**

5a	**1'H,2H,3'H,5H-spiro[cyclohex-3-ene-1,2'-quinazoline]-2,4',5-trione**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum 

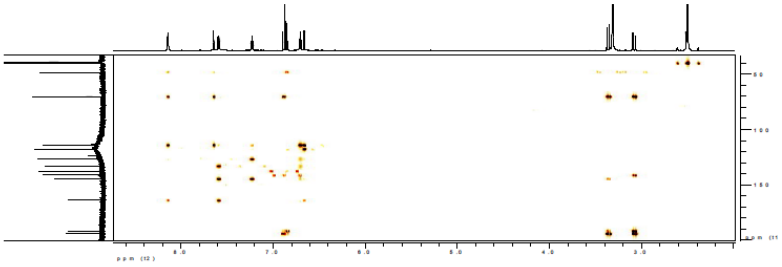
^{1}H NMR



^{13}C NMR



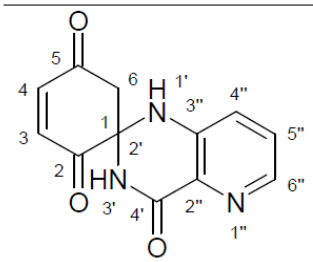
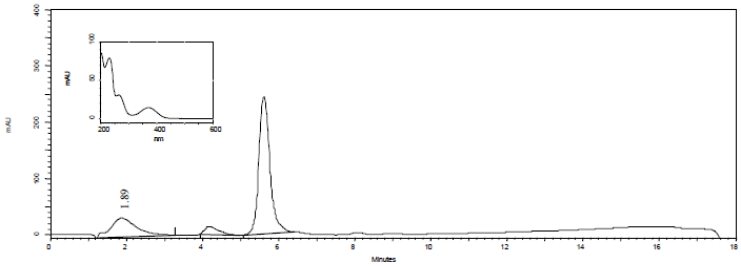
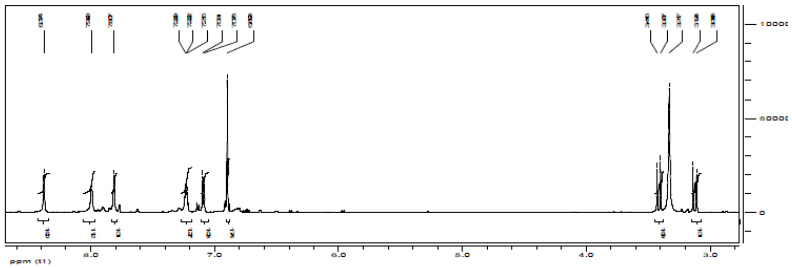
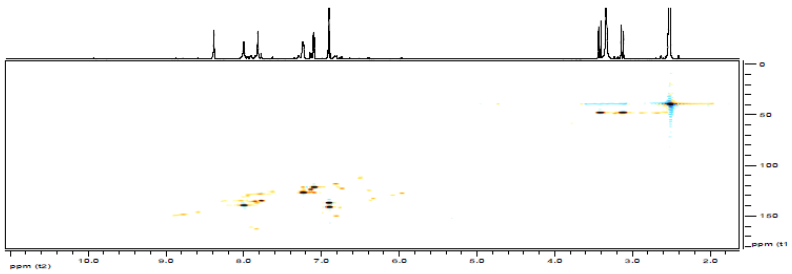
HMBC



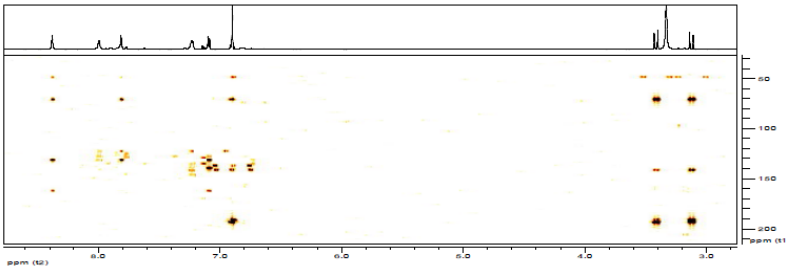
^{1}H NMR: δ 3.08 (d, J = 17.1, J = 0.9, 1H, H-6), 3.36 (d, 1H, H-6), 6.66 (d, J = 7.8, 1H, H-8'), 6.70 (m, J = 7.8, J = 7.2, J = 0.9, 1H, H-9), 6.85 (m, J = 10.3, J = 0.9, J = 0.7, 1H, H-4), 6.88 (d, J = 10.3, 1H, H-3), 7.23 (m, J = 7.9, J = 7.3, J = 1.6, 1H, H-7'), 7.59 (m, J = 7.7, J = 1.4, 1H, H-5') 7.64 (s (broad), 1H, NH, H-1'), 8.14 (s (broad), 1H, NH, H-3'). ^{13}C NMR: δ 48.5 (C-6), 70.7 (C-1), 114.0 (C-8'), 114.4 (C-4a'), 117.9 (C-6'), 126.8 (C-5'), 133.3 (C-7'), 137.7 (C-3), 141.4 (C-4), 144.7 (C-8a'), 164.0 (C-11), 191.6 (C-2), 194.0 (C-5). HMBC correlations: H-1' (C-1, C-4a', C-6), H-3 (C-1, C-2, C-4, C-5), H-3' (C-1, C-4', C-4a', C-5', C-6), H-4 (C-2, C-5, C-6, C-6'), H-5' (C-4', C-4a', C-7', C-8a'), H-6 (C-1, C-2, C-4, C-5), H-6' (C-4', C-4a', C-5', C-7', C-8', C-8a'), H-7' (C-5', C-6', C-8', C-8a'), H-8'

(C-4', C-4a', C-5', C-6', C-8a'). R_f (HPLC) 5.9 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 213, 366 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 241.0614 (calculated 241.0619). AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 243.0734 (calculated 243.0764).

5b: product resulted from conversion of **3l**

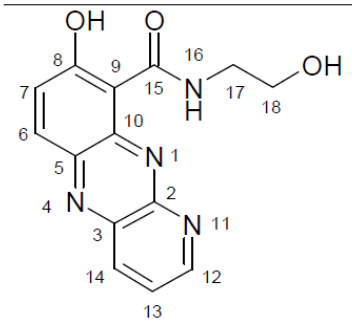
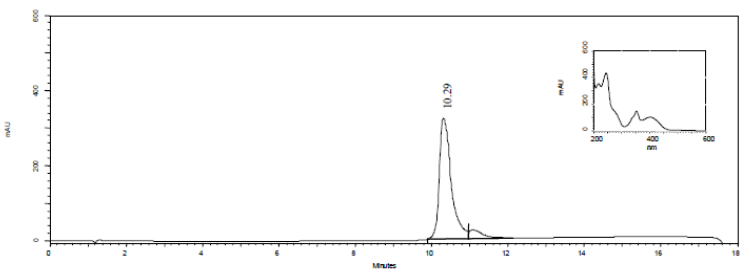
5b	**1'H,2H,3H',5H-spiro[cyclohex-3-ene-1,2'-pyrido[3'',2''-d]pyrimidine-2,4',5-trione**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum  ^{1}H NMR  HSQC 

HMBC

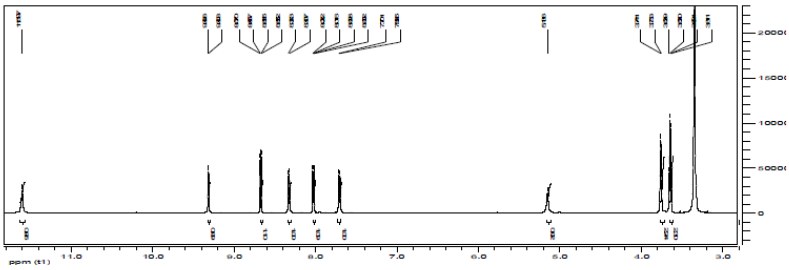


^{1}H NMR: δ 3.11 (d, *J* = 17.0, 1H, H-6), 3.40 (d, *J* = 17.1, 1H, H-6), 6.88 (d, *J* = 10.9, 1H, H-4), 6.90 (d, *J* = 10.4, 1H, H-3), 7.08 (d, *J* = 8.2, 1H, H-4''), 7.22 (m, *J* = 8.5, *J* = 4.4, 1H, H-5''), 7.81 (s, 1H, NH, H-1'), 7.99 (s (broad), 1H, H-6''), 8.37 (s, 1H, NH, H-3'). ^{13}C NMR: δ 48.1 (C-6), 70.5 (C-1), 121.8 (C-4''), 127.3 (C-5''), 131.9 (C-2''), 137.3 (C-3), 139.7 (C-6''), 141.6 (C-4), 142.0 (C-3''), 162.5 (C-4'), 191.5 (C-2), 193.5 (C-5). HMBC correlations: H-1 (C-1, C-2'', C-4', C-4'', C-6), H-3 (C-1, C-4, C-5), H-3' (C-1, C-2'', C-4', C-6), H-4 (C-2, C-3, C-6), H-4'' (C-2'', C-4', C-5'', C-6''), H-5'' (C-3'', C-6''), H-6 (C-1, C-2, C-4, C-5), H-6'' (C-2'', C-4'', C-5''). R_f (HPLC) 1.9 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 230, 254, 370 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 242.0535 (calculated 242.0571).

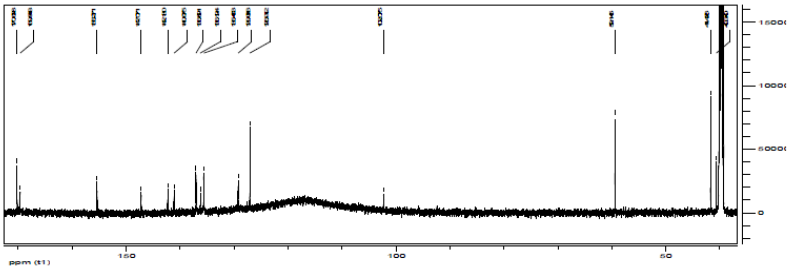
6a: product resulted from **1b** and **2e**

6a	**8-Hydroxy-pyrido[2,3-b]quinoxaline-9-carboxylic acid (2-hydroxy-ethyl)-amide**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum 

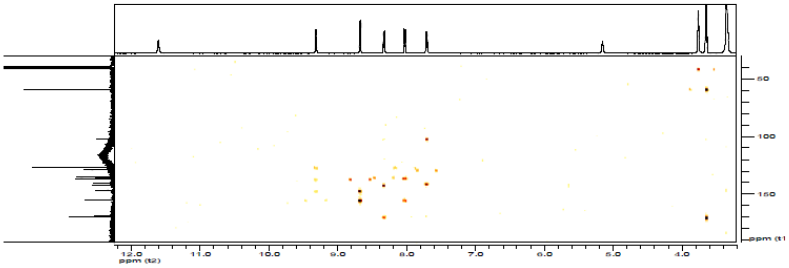
^{1}H NMR



^{13}C NMR



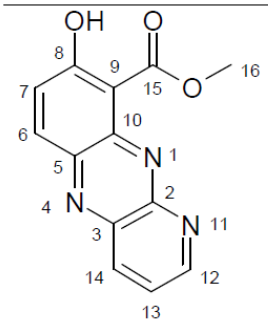
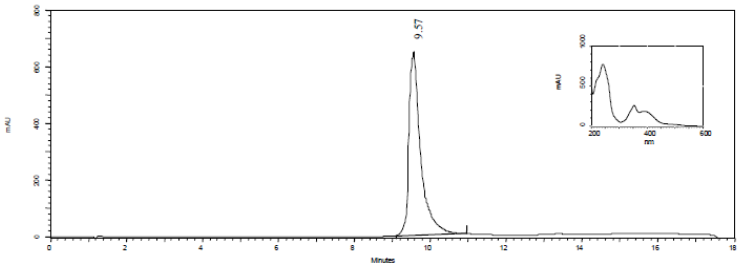
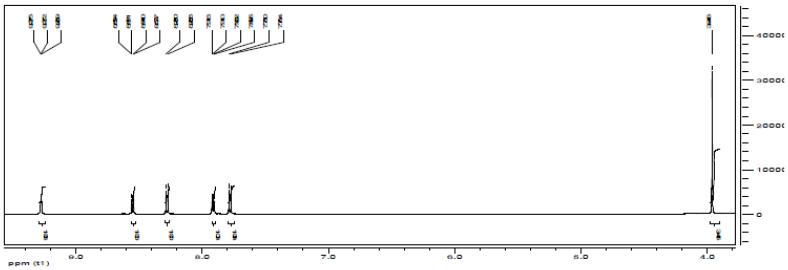
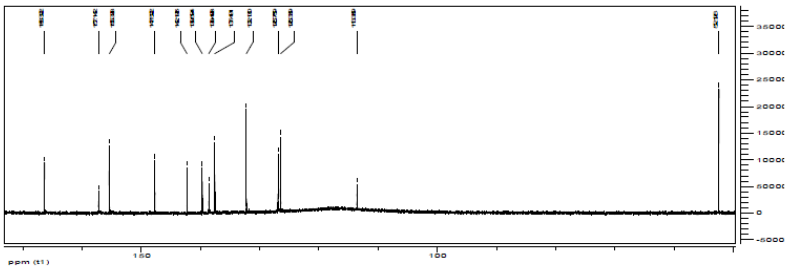
HMBC

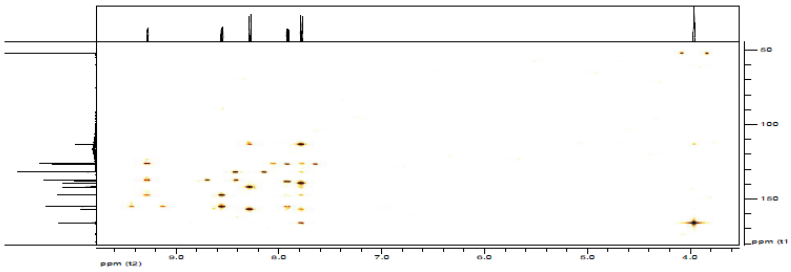


Synthesis and isolation as described above. Yellow solid. Yield 48.15 % (17.7 mg): mp (decomposition) 220-223 °C. ^{1}H NMR: δ 3.62 (m, J = 5.5, 2H, H-17), 3.74 (d, J = 5.0, 2H, H-18), 5.14 (s (broad), 1H, OH), 7.69 (d, J = 9.5, 1H, H-7), 8.01 (dd, J = 8.5, J = 3.9, 1H, H-13), 8.31 (d, J = 9.5, 1H, H-6), 8.66 (dd, J = 8.5, J = 1.8, 1H, H-14), 9.30 (dd, J = 1.7, 1H, H-12), 11.6 (s (broad), 1H, NH). ^{13}C NMR: δ 41.4 (C-17), 59.1 (C-18), 102.1 (C-9), 126.9 (C-13), 129.1 (C-7), 135.5 (C-6), 136.1 (C-3), 136.7 (C-14), 141.0 (C-5), 142.2 (C-10), 147.1 (C-2), 155.3 (C-12), 169.6 (C-8), 170.1 (C-15). HMBC correlations: H-6 (C-8, C-10), H-7 (C-5, C-9), H-12 (C-2, C-13, C-14), H-13 (C-3, C-12), H-14 (C-2, C-12), H-17 (C-15, C-18), H-18 (C-17). R_f (HPLC) 10.3 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 218, 245, 354, 402

nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 283.0818 (calculated 283.0831). AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 285.1012 (calculated 285.0988).

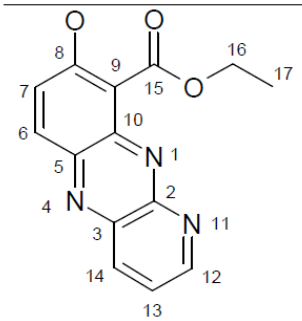
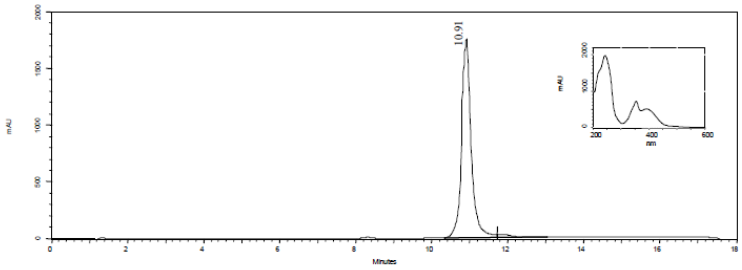
6b: product resulted from **1c** and **2e**

6b	**8-Hydroxy-pyrido[2,3-b]quinoxaline-9-carboxylic acid methyl ester**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum  ^{1}H NMR  ^{13}C NMR 

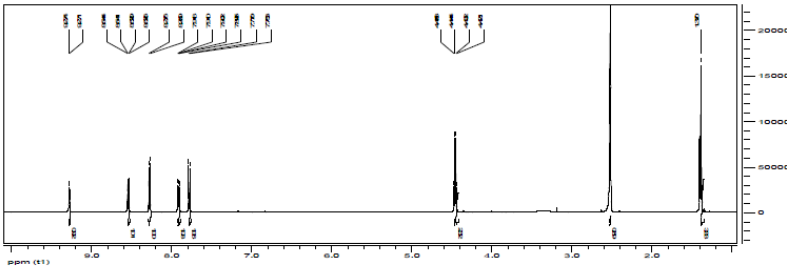
	HMBC 

Synthesis and isolation as described above. Yellow orange solid. Yield 25.25 % (8.4 mg): mp (decomposition) 188-191 °C. ^{1}H NMR: δ 3.95 (s, 3H, H-16), 7.77 (d, *J* = 9.5, 1H, H-7), 7.91 (dd, *J* = 8.6, *J* = 3.8, 1H, H-13), 8.27 (d, *J* = 9.5, 1H, H-6), 8.55 (dd, *J* = 8.6, *J* = 1.8, 1H, H-14), 9.27 (dd, *J* = 1.7, J = 3.6, 1H, H-12). ^{13}C NMR: δ 52.1 (C-16), 113.4 (C-9), 126.4 (C-13), 126.8 (C-7), 132.1 (C-6), 137.5 (C-14), 138.5 (C-3), 139.6 (C-5), 142.2 (C-10), 147.6 (C-2), 155.3 (C-12), 157.1 (C-8), 166.3 (C-15). HMBC correlations: H-6 (C-8, C-9, C-10), H-7 (C-5, C-6, C-8, C-9, C-15), H-12 (C-2, C-13, C-14), H-13 (C-2, C-3, C-12), H-14 (C-2, C-12), H-16 (C-9, C-15). R_f (HPLC) 9.6 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 243, 354, 390 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 254.0560 (calculated 254.0566). AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 256.0747 (calculated 256.0722).

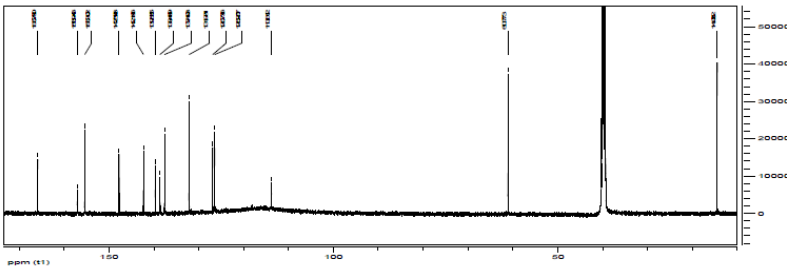
6c: product resulted from **1d** and **2e**

6c	**8-Hydroxy-pyrido[2,3-b]quinoxaline-9-carboxylic acid methyl ester**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum 

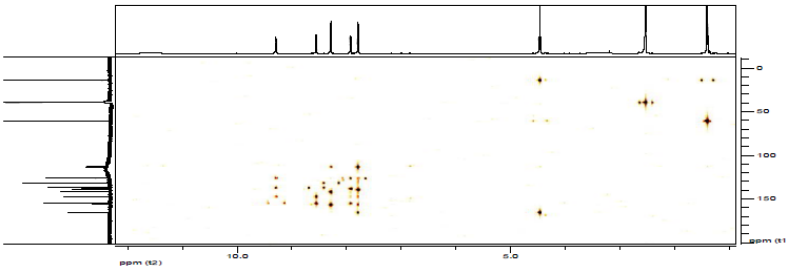
^{1}H NMR



^{13}C NMR



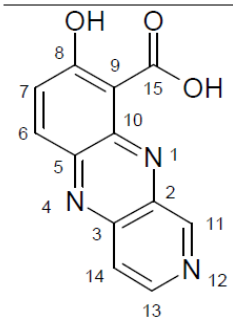
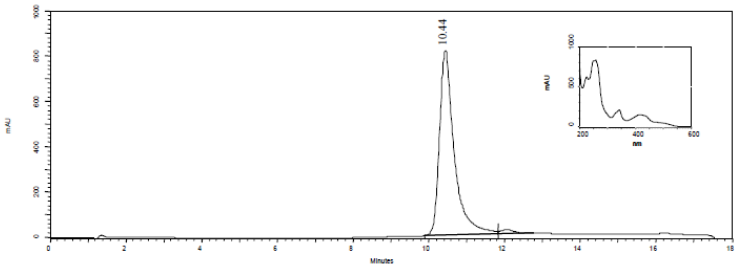
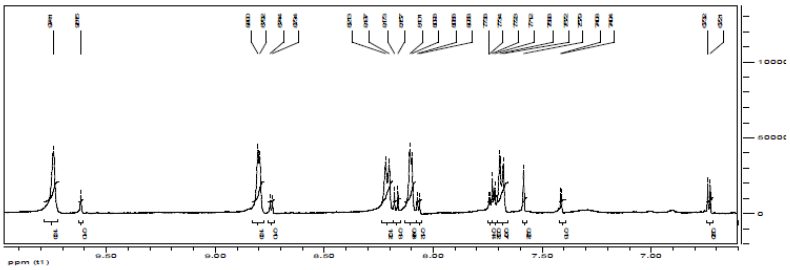
HMBC



Synthesis and isolation as described above. Dark yellow solid. Yield 40.05 % (14 mg): mp (decomposition) 180-182 °C. ^{1}H NMR: δ 1.37 (t, J = 7.1, 3H, H-17), 4.44 (q, J = 7.1, 2H, H-16), 7.77 (d, J = 9.5, 1H, H-7), 7.91 (dd, J = 8.6, J = 3.8, 1H, H-13), 8.27 (d, J = 9.5, 1H, H-6), 8.53 (dd, J = 8.6, J = 1.8, 1H, H-14), 9.27 (dd, J = 1.7, J = 3.6, 1H, H-12). ^{13}C NMR: δ 14.1 (C-17), 60.8 (C-16), 113.6 (C-9), 126.3 (C-13), 126.7 (C-7), 132.0 (C-6), 137.5 (C-14), 138.5 (C-3), 139.6 (C-5), 142.2 (C-10), 147.6 (C-2), 156.9 (C-8), 165.8 (C-15). HMBC correlations: H-6 (C-8, C-9, C-10), H-7 (C-5, C-8, C-9, C-15), H-12 (C-2, C-13, C-14), H-13 (C-3, C-12), H-14 (C-2, C-12), H-16 (C-9, C-15, C-17), H-17 (C-

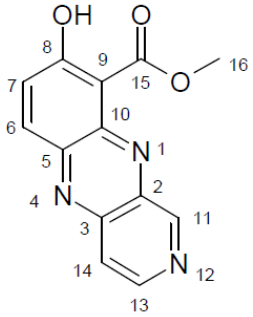
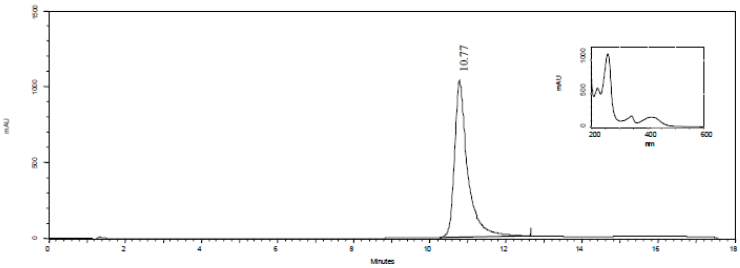
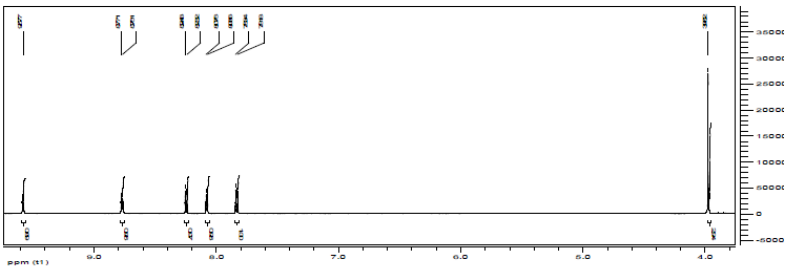
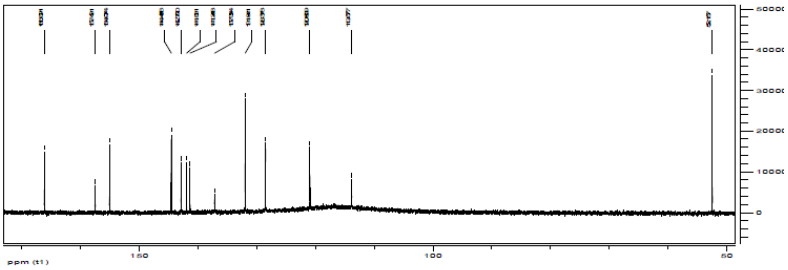
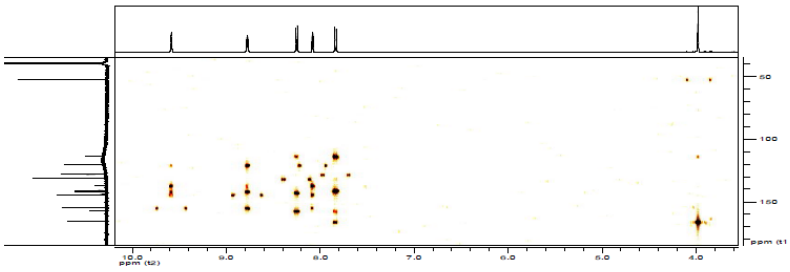
16). R_f (HPLC) 10.9 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 243, 355, 392 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 268.0717 (calculated 268.0728). AP-ESI: pos. mode $[M+H]^+$ 270.0862 (calculated 270.0873).

6d: product resulted from **1a** and **2f**

6d	**8-Hydroxy-pyridol[3,4-b]quinoxaline-9-carboxylic acid**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum  ^{1}H NMR 

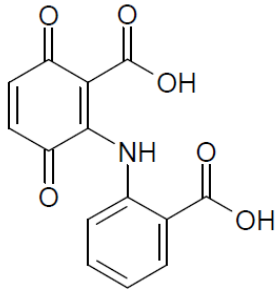
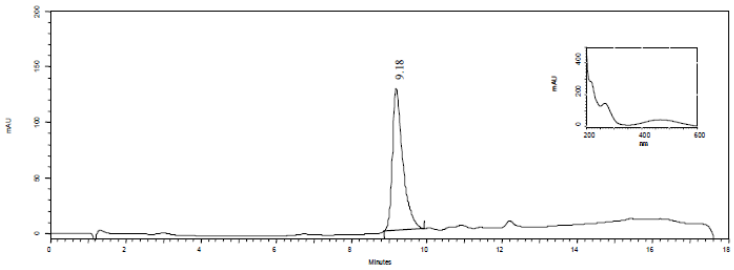
Synthesis and isolation as described above. Dark red solid. Yield 20.32 % (10.7 mg): mp (decomposition) 196-198 °C. ^{1}H NMR: δ 7.68 (d, J = 9.5, 1H, H-7), 8.10 (d, J = 5.2, 1H, H-14), 8.20 (d, J = 9.4, 1H, H-6), 8.80 (d, J = 5.3, 1H, H-13), 9.74 (s, 1H, H-11). R_f (HPLC) 10.4 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 224, 255, 342, 416 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 240.0375 (calculated 240.0415).

6e: product resulted from **1c** and **2f**

6e	**8-Hydroxy-pyrido[2,3-b]quinoxaline-9-carboxylic acid methyl ester**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum  ^{1}H NMR  ^{13}C NMR  HMBC 

Synthesis and isolation as described above.Yellow solid. Yield 26.51 % (14.7 mg): mp (decomposition) 187-189 °C. ^{1}H NMR: δ 3.96 (s, 3H, H-16), 7.82 (d, *J* = 9.5, 1H, H-7), 8.07 (dd, *J* = 6.0, 1H, H-14), 8.24 (d, *J* = 9.5, 1H, H-6), 8.77 (d, *J* = 6.0, 1H, H-13), 9.58 (s, 1H, H-11). ^{13}C NMR: δ 52.2 (C-16), 113.7 (C-9), 120.8 (C-14), 128.4 (C-7), 131.8 (C-6), 137.1 (C-2), 141.3 (C-5), 141.8 (C-3), 142.8 (C-10), 144.5 (C-13), 155.0 (C-11), 157.4 (C-8), 166.1 (C-15). HMBC correlations: H-6 (C-8, C-9, C-10), H-7 (C-5, C-6, C-8, C-9, C-15), H-11 (C-2, C-3, C-14), H-13 (C-2, C-3, C-11, C-14), H-14 (C-2, C-11, C-13), H-16 (C-9, C-15). R_f (HPLC) 10.8 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 221, 258, 342, 414 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 254.0543 (calculated 254.0571).

7a: product resulted from **1a** and **2g**

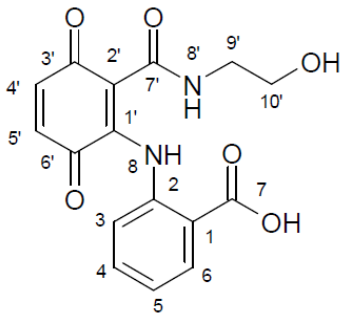
7a	**2-(2-Carboxy-3,6-dioxo-cyclohexa-1,4-dienylamino)-benzoic acid**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum 

Synthesis and isolation as described above. Dark red solid. Yield 13.16 % (12.3 mg): mp (decomposition) 95-99 °C, mp 197 °C. R_f (HPLC) 9.2 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 215, 267, 466 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 286.0332 (calculated 286.0357).

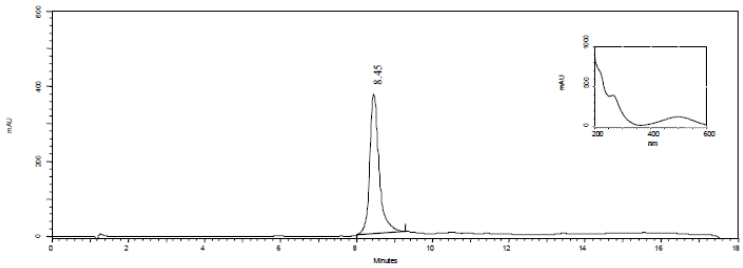
7b and **8a**: products resulted from **1b** and **2g**

7b	**2-[2-(2-Hydroxy-ethylcarbamoyl)-3,6-dioxo-cyclohexa-1,4-dienylamino]-benzoic acid**
8a	**2-[2-(2-Hydroxy-ethylcarbamoyl)-3,6-dioxo-cyclohexa-1,4-dienylamino]-benzoic acid radical**

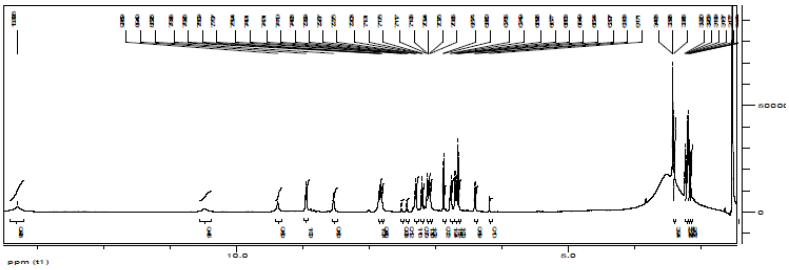
7b



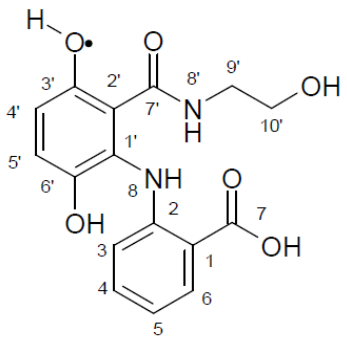
HPLC chromatogram and UV-vis spectrum



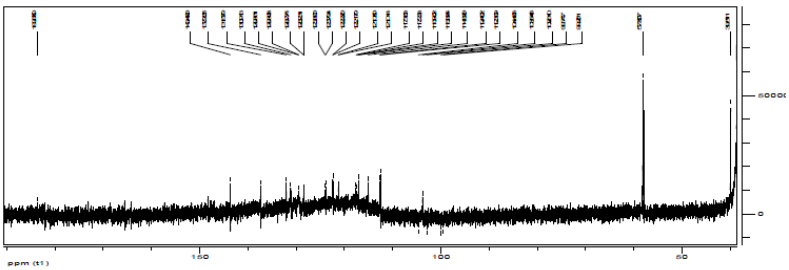
^{1}H NMR



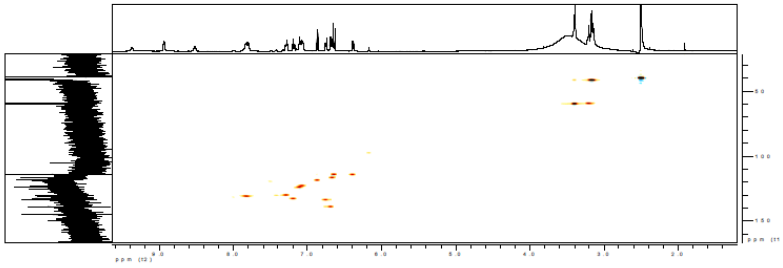
8a



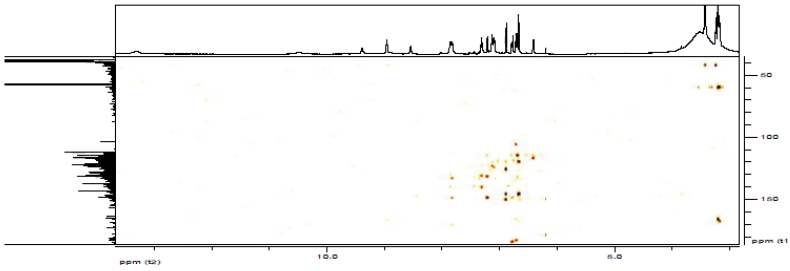
^{13}C NMR



HSQC



HMBC



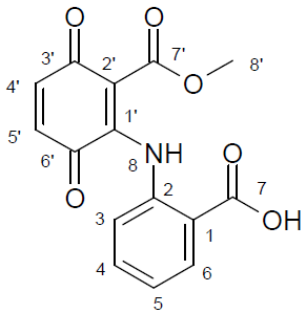
Synthesis and isolation as described above. Dark red solid. Yield 38.39 % (15.4 mg): mp (decomposition) 76-80 °C, mp 183 °C. R_f (HPLC) 8.5 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 211, 266, 499 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 329.0792 (calculated 329.0779). NMR data of quinonoid product and hydroquinonoid radical are available from one ^{1}H NMR, one ^{13}C NMR, one HSQC, and one HMBC spectrum. (**7b**) ^{1}H NMR: δ 3.17 (m, *J* = 5.7, 2H, H-9'), 3.39 (t, *J* = 5.8, 2H, H-10'), 6.68 (d, *J* = 10.0, 1H, H-4'), 6.76 (d, *J* = 10.0, 1H, H-5'), 7.07 (d, *J* = 7.9, 1H, H-3), 7.11 (dd, *J* = 7.3, *J* = 6.7, 1H, H-5), 7.29 (dd, *J* = 7.5, *J* = 7.4, 1H, H-4), 7.83 (d, *J* = 6.2, 1H, H-6), 8.94 (t, *J* = 5.6, 1H, H-8'), 13.32 (s (broad), 1H, NH). ^{13}C NMR: δ 41.2 (C-9'), 41.2 (C-9'), 105.2 (C-2'), 122.7 (C-3), 123.9 (C-5), 126.7 (C-1), 129.9 (C-4), 131.0 (C-6), 133.6 (C-5'), 138.9 (C-2), 138.9 (C-4'), 148.5 (C-1'), 165.7 (C-7'), 182.6 (C-6'), 183.6 (C-3'). HMBC correlations: H-3 (C-5), H-4 (C-2, C-3, C-6), H-4' (C-2', C-6', C-7'), H-5 (C-1, C-3), H-5' (C-1', C-3'), H-6 (C-2, C-4), H-8' (C-7', C-9'), H-9' (C-7', C-10'), H-10' (C-9'). (**8a**) ^{1}H NMR: δ 3.15 (m, *J* = 6.0, 2H, H-9'), 3.21 (t, *J* = 6.1, 2H, H-10'), 6.39 (d, *J* = 8.3, 1H, H-3), 6.64 (d, *J* = 8.8, 1H, H-4'), 6.66 (t, *J* = 8.1, 1H, H-5), 6.87 (d, *J* = 8.8, 1H, H-5'), 7.19 (t, *J* = 7.7, *J* = 7.3, 1H, H-4), 7.80 (d, *J* = 7.7, 1H, H-6), 8.53 (s, 1H, NH), 9.37 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR: δ 41.3 (C-9'), 59.2 (C-

10'), 114.0 (C-4'), 114,1 (C-3), 116.5 (C-5), 118.5 (C-5'), 118.9 (C-2'), 125.4 (C-3'), 131.1 (C-6), 132.6 (C-4), 145.2 (C-6'), 148.5 (C-2), 149.8 (C-1'), 167.2 (C-7'), 169.9 (C-7). HMBC correlations: H-3 (C-5), H-4 (C-2, C-3, C-6), H-4' (C-1', C-2', C-3', C-6', C-7'), H-5 (C-3, C-6), H-5' (C-1', C-2', C-3', C-6'), H-6 (C-2, C-4, C-7), H-9' (C-7', C-10'), H-10' (C-9').

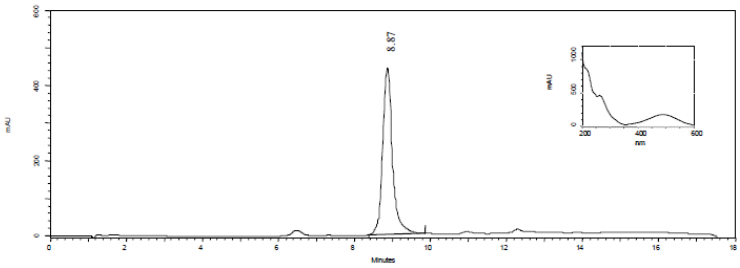
7c and **8b**: products resulted from **1c** and **2g**

7c	**2-(2-Methoxycarbonyl-3,6-dioxo-cyclohexa-1,4-dienylamino)-benzoic acid**
8b	**2-(2-Methoxycarbonyl-3,6-dioxo-cyclohexa-1,4-dienylamino)-benzoic acid radical**

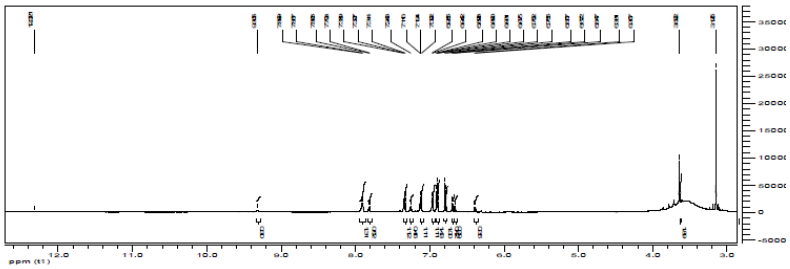
7c



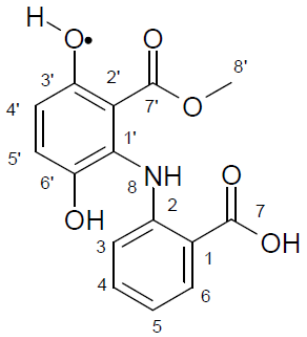
HPLC chromatogram and UV-vis spectrum



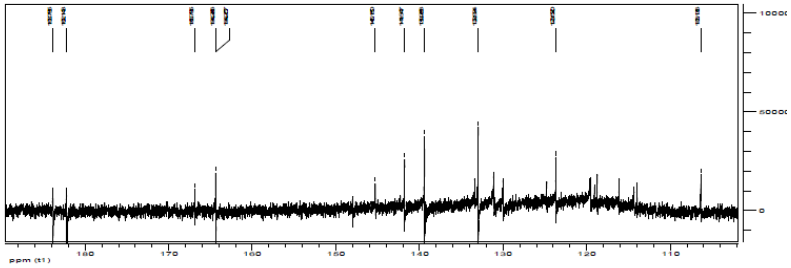
^{1}H NMR



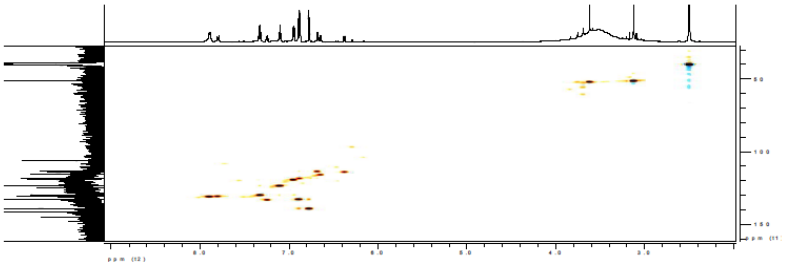
8b



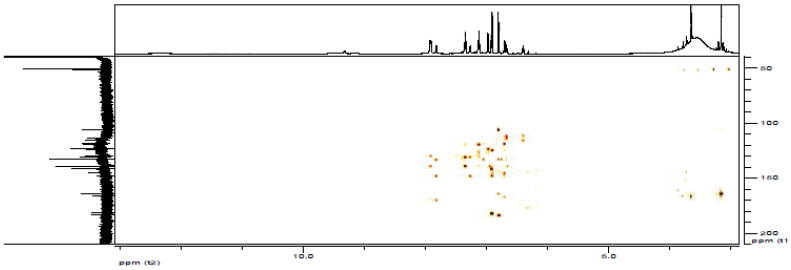
^{13}C NMR



HSQC



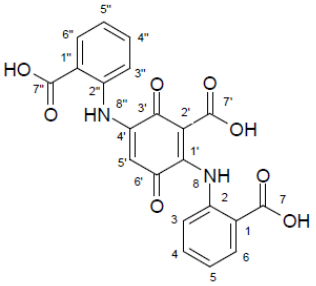
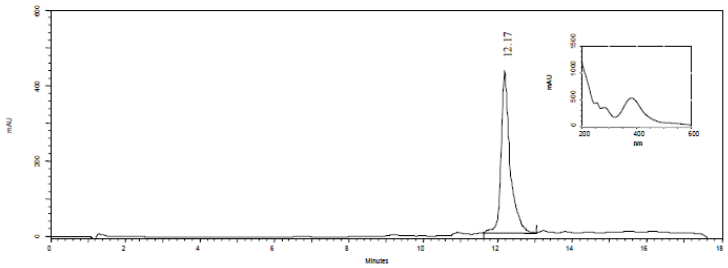
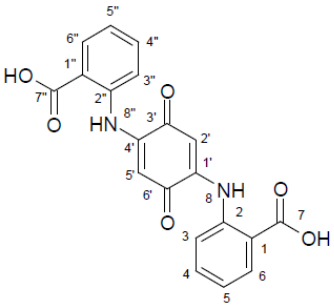
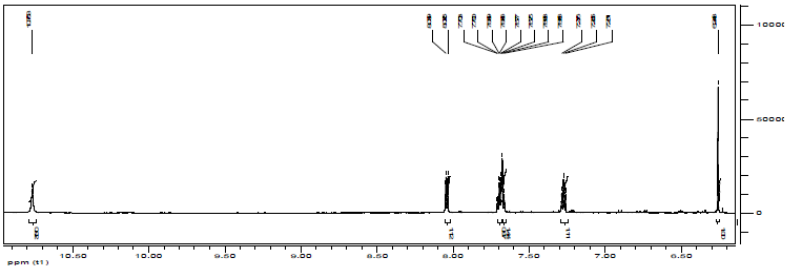
HMBC



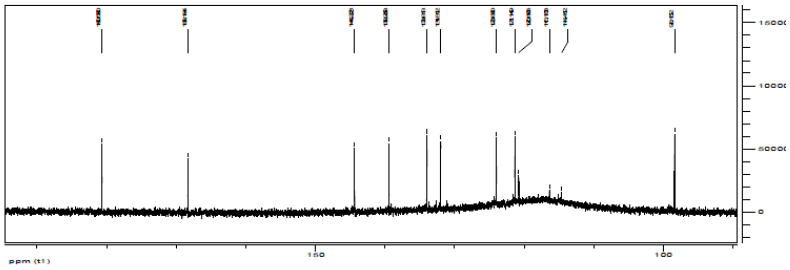
Synthesis and isolation as described above. Dark red solid. Yield 44.77 % (16.4 mg): mp (decomposition) 84-88 °C, mp 188 °C. R_f (HPLC) 8.9 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 210, 263, 487 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 302.0677 (calculated 302.0670). NMR data of quinonoid product and hydroquinonoid radical are available from one ^{1}H NMR, one ^{13}C NMR, one HSQC, and one HMBC spectrum. (**7c**) ^{1}H NMR: δ 3.12 (s, 3H, H-8'), 6.77 (d, *J* = 10.1, 1H, H-4'), 6.88 (t, *J* = 10.1, 1H, H-5'), 6.95 (d, *J* = 8.0, 1H, H-3), 7.10 (dd, *J* = 7.4, 1H, H-5), 7.33 (dd, *J* = 7.6, 1H, H-4), 7.89 (d, *J* = 7.2, 1H, H-6), 12.32 (s (broad), 1H, NH). ^{13}C NMR: δ 50.9 (C-8'), 106.1 (C-2'), 119.5 (C-3), 123.5 (C-5), 126.2 (C-1), 129.8 (C-4), 131.0 (C-6), 132.8 (C-5'), 139.3 (C-2), 139.3 (C-4'), 141.6 (C-1'), 164.3 (C-7'),

168.3 (C-7), 182.3 (C-3'), 183.8 (C-6'). HMBC correlations: H-3 (C-1, C-5), H-4 (C-2, C-3, C-6), H-4' (C-2', C-5', C-6', C-7'), H-5 (C-1, C-2, C-3), H-5' (C-1', C-3'), H-6 (C-2, C-4, C-7), H-8' (C-2', C-7'). (**8b**) ^{1}H NMR: δ 3.62 (s, 3H, H-8'), 6.37 (d, J = 8.4, 1H, H-3), 6.65 (t, J = 7.6, 1H, H-5), 6.68 (d, J = 8.8, 1H, H-4'), 6.87 (d, J = 8.8, 1H, H-5'), 7.24 (t, J = 7.7, J = 1.1, 1H, H-4), 7.80 (d, J = 7.6, 1H, H-6), 9.31 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR: δ 51.6 (C-8'), 111.4 (C-1), 113.8 (C-4'), 114.1 (C-3), 115.9 (C-5), 118.5 (C-5'), 118.9 (C-2'), 124.6 (C-3'), 130.5 (C-6), 133.3 (C-4), 145.2 (C-6'), 147.8 (C-1'), 147.8 (C-2), 166.8 (C-7'), 170.1 (C-7). HMBC correlations: H-3 (C-1, C-5, C-7), H-4 (C-2, C-3, C-6), H-4' (C-2', C-6'), H-5 (C-1, C-3, C-4, C-6), H-5' (C-1', C-3', C-6'), H-6 (C-2, C-4, C-7), H-8' (C-7').

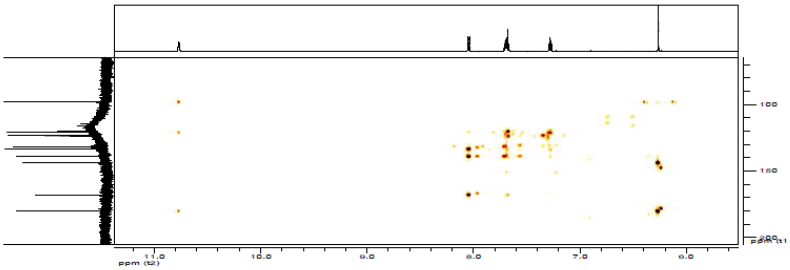
9a and **10a**: products resulted from **1a** and **2g**

9a	**2-{4-[2-(Carboxyphenyl)amino]-2-carboxy-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino}-benzoic acid**
10a	**2-{4-[2-(Carboxyphenyl)amino]-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino}-benzoic acid**
9a	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum
	
10a	^{1}H NMR
	

^{13}C NMR



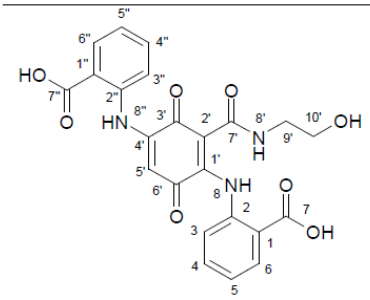
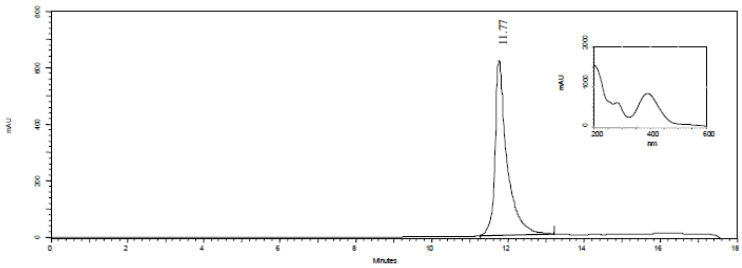
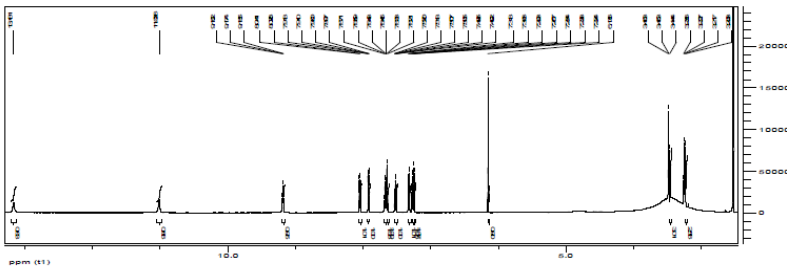
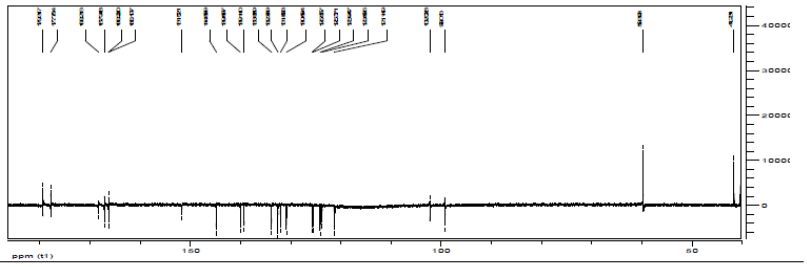
HMBC



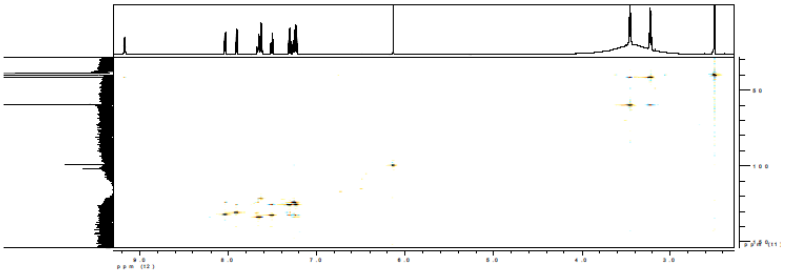
Synthesis and isolation as described above. Brown red solid. Yield 26.07 % (17.9 mg). R_f (HPLC) 12.2 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 255, 282, 382 nm. (**9a**) ^{1}H NMR: δ 6.22 (s, 1H, H-5'), 7.27 (m, *J* = 7.4, *J* = 1.4, 1H, H-5), 7.29 (d, 1H, H-3''), 7.33 (t, *J* = 7.6, 1H, H-5''), 7.55 (m, *J* = 8.3, *J* = 7.9, *J* = 1.4, 1H, H-4''), 7.67 (m, *J* = 8.1, *J* = 1.0, 2H, H-3), 7.68 (m, *J* = 8.2, *J* = 6.8, *J* = 1.5, 1H, H-4), 7.94 (m, *J* = 7.9, *J* = 1.4, 1H, H-6''), 8.02 (m, *J* = 7.8, *J* = 1.6, 1H, H-6). ^{13}C NMR: δ 98.9 (C-5'), 102.2 (C-2'), 120.6 (C-1), 121.1 (C-3), 122.8 (C-5), 123.3 (C-1''), 124.1 (C-3''), 125.7 (C-5''), 131.0 (C-6''), 131.8 (C-6), 132.5 (C-4''), 133,8 (C-4), 139.0 (C-2''), 139.3 (C-2), 148.0 (C-1'), 166.9 (C-7''), 168.2 (C-7), 178.3 (C3'). HMBC correlations: H-3 (C-1, C-5, C-7), H-3'' (C-1'', C-5''), H-4 (C-2, C-6), H-4'' (C-2'', C-3'', C-6''), H-5 (C-2, C-3, C-4, C-7), H-5' (C-1', C-2', C-3'), H-5'' (C-1'', C-6''), H-6 (C-1, C-2, C-4, C-7), H-6'' (C-2'', C-4'', C-7''). (**10a**) ^{1}H NMR: δ 6.25 (s, 2H, H-2'/H-5'), 7.27 (m, *J* = 7.4, *J* = 1.4, 2H, H-5/H-5''), 7.67 (m, *J* = 8.1, *J* = 1.0, 2H, H-3/H-3''), 7.68 (m, *J* = 8.2, *J* = 6.8, *J* = 1.5, 2H, H-4/H-4''), 8.03 (m, *J* = 7.8, *J* = 1.3, 2H, H-6/H-6''), 10.76 (s, 2H, NH, H-8/H-8''). ^{13}C NMR: δ 98.2 (C-2'/C-5'), 120.6 (C-1/C-1''), 121.1 (C-3/C-3''), 131.8 (C-6/C-6''), 133,8 (C-4/C-4''), 139.3 (C-2/C-2''), 144.2 (C-1'/C-4'), 168.2 (C-7/C-7''), 180.6 (C-3'/C-6'). HMBC correlations: H-2'/H-5' (C-1'/C-4', C-

2'/C-5', C-3'/C-6'), H-3/H-3'' (C-1/C-1'', C-5/C-5'', C-7/C-7''), H-4/H-4'' (C-2/C-2'', C-6/C-6''), H-5/H-5'' (C-2/C-2'', C-3/C-3'', C-4/C-4'', C-7/C-7''), H-6/H-s6'' (C-1/C-1'', C-2/C-2'', C-4/C-4'', C-7/C-7''), H-8/H-8'' (C-2'/C-5'), C-3/C-3'', C-3'/C-6'). (**9a**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 421.0659 (calculated 421.0677). (**10a**) MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 377.0753 (calculated 377.0779).

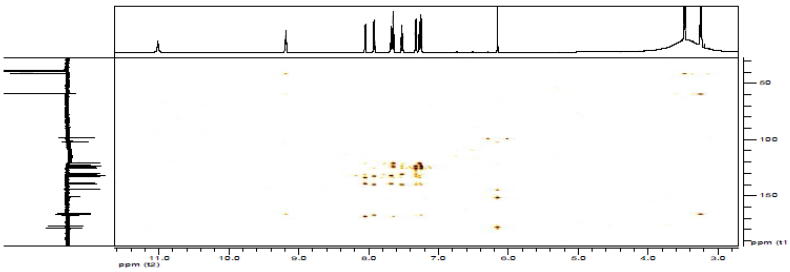
9b: product resulted from **1b** and **2g**

9b	**2-{4-[2-(Carboxyphenyl)amino]-2-(2-hydroxy-ethylcarbamoyl)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino}-benzoic acid**
	HPLC chromatogram and UV-vis spectrum  ^{1}H NMR  ^{13}C NMR 

HSQC



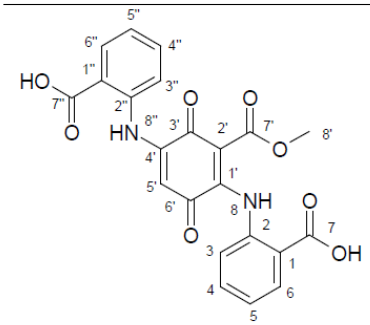
HMBC



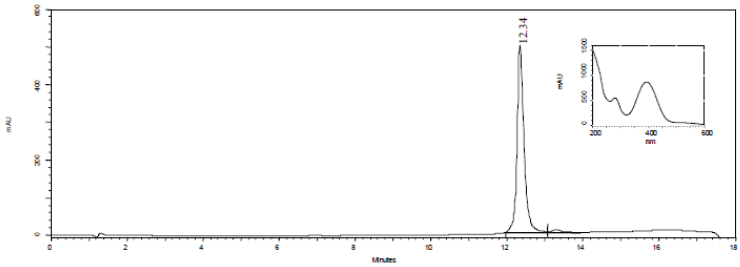
Synthesis and isolation as described above. Brown red solid. Yield 23.12 % (24.5 mg): mp 235 °C. ^{1}H NMR: δ 3.22 (q, *J* = 5.7, 2H, H-9'), 3.45 (t, *J* = 5.8, 2H, H-10'), 6.14 (s, 1H, H-5'), 7.23 (d, *J* = 8.1, 1H, H-3''), 7.25 (m, *J* = 7.5, *J* = 1.2, 1H, H-5), 7.31 (m, *J* = 7.3, *J* = 0.9, 1H, H-5''), 7.51 (m, *J* = 7.9, *J* = 1.5, 1H, H-4''), 7.63 (d, *J* = 7.4, 1H, H-3), 7.65 (m, *J* = 7.5, *J* = 8.1, *J* = 1.5, 1H, H-4), 7.91 (d, *J* = 7.9, *J* = 1.5, 1H, H-6''), 8.03 (d, *J* = 7.8, *J* = 1.3, 1H, H-6), 9.17 (t, *J* = 5.4, 1H, NH, H-8'), 11.01 (s, 1H, NH), 13.16 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR: δ 41.2 (C-9'), 59.4 (C-10'), 99.0 (C-5'), 102.0 (C-2'), 121.0 (C-1), 121.1 (C-3), 123.6 (C-1''), 123.9 (C-5), 125.4 (C-3''), 125.6 (C-5''), 130.7 (C-6''), 131.9 (C-6), 132.4 (C-4''), 133.7 (C-4), 139.1 (C-2), 139.9 (C-2''), 144.7 (C-4'), 151.5 (C-1'), 166.2 (C-7'), 167.0 (C-7''), 168.2 (C-7), 177.8 (C-3'), 179.3 (C-6'). HMBC correlations: H-3 (C-1, C-4, C-5, C-7), H-3'' (C-1'', C-2'', C-5'', C-7''), H-4 (C-2, C-6), H-4'' (C-1'', C-2'', C-3'', C-6''), H-5 (C-2, C-3, C-4, C-6), H-5' (C-1', C-2', C-2'', C-3', C-4', C-6'), H-5'' (C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-6'', C-7''), H-6 (C-1, C-2, C-4, C-7), H-6'' (C-2'', C-3'', C-4'', C-7''), H-8' (C-2', C-7', C-9', C-10'), H-9' (C-7', C-10'), H-10' (C-9'). R_f (HPLC) 11.8 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 280, 391 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 464.1125 (calculated 464.1094).

9c: product resulted from **1c** and **2g**

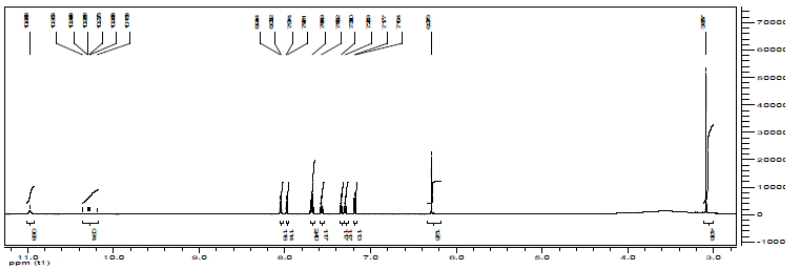
9c	**2-{4-[2-(Carboxyphenyl)amino]-2-methoxycarbonyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylamino}-benzoic acid**



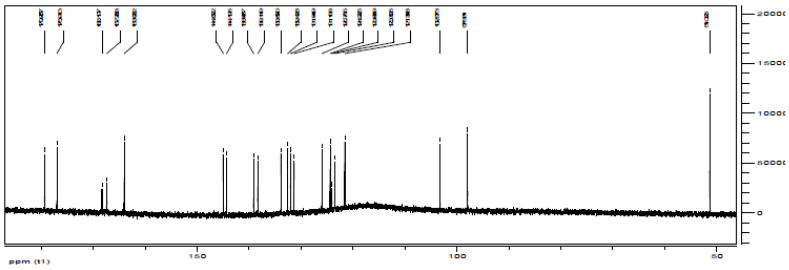
HPLC chromatogram and UV-vis spectrum



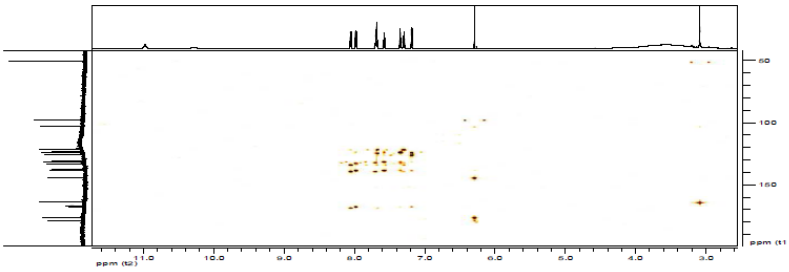
^{1}H NMR



^{13}C NMR



HMBC



Synthesis and isolation as described above. Brown red solid. Yield 25.86 % (26.5 mg): mp 246 °C. ^{1}H NMR: δ 3.07 (s, 3H, H-8'), 6.28 (s, 1H, H-5'), 7.17 (d, *J* = 7.7, *J* = 0.5, 1H, H-3''), 7.28 (m, *J* = 7.2, *J* = 1.7, 1H, H-5), 7.33 (m, *J* = 7.4, *J* = 7.7, *J* = 0.9, 1H, H-5''), 7.56 (m, *J* = 7.5, *J* = 1.5, 1H, H-4''), 7.66 (d, *J* = 7.5, *J* = 1.4, 1H, H-3), 7.68 (m, *J* = 8.2, *J* = 1.4, 1H, H-4), 7.97 (d, *J* = 7.9, *J* = 1.4, 1H, H-6''), 8.04 (d, *J* = 8.1, *J* = 1.3, 1H, H-6), 10.29 (s (broad), 1H, NH), 10.97 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR: δ 51.0 (C-8'), 97.7 (C-5'), 103.0 (C-2'), 121.3 (C-1), 121.4 (C-3), 123.3 (C-3''), 123.9 (C-1''), 124.2 (C-5), 125.8 (C-5''), 131.2 (C-6''), 131.8 (C-6), 132.4 (C-4''), 133.7 (C-4), 138.1 (C-2''), 139.0 (C-2), 144.2 (C-1'), 144.8 (C-4'), 163.9 (C-7'), 167.3 (C-7''), 168.2 (C-7), 176.9 (C-3'), 179.3 (C-6'). HMBC correlations: H-3 (C-1, C-4, C-5, C-7), H-3'' (C-1'', C-2'', C-5'', C-6'', C-7''), H-4 (C-2, C-6), H-4'' (C-2'', C-3'', C-6''), H-5 (C-2, C-3, C-4, C-6), H-5' (C-1', C-2', C-2'', C-3', C-4', C-6'), H-5'' (C-2'', C-3'', C-4'', C-6'', C-7''), H-6 (C-2, C-3, C-4, C-7), H-6'' (C-2'', C-3'', C-4'', C-7''), H-8' (C-2', C-7'). R_f (HPLC) 12.3 min, UV-vis (MeOH) λ_{max} 281, 393 nm. MS *m/z* AP-ESI: neg. mode $[M-H]^-$ 435.0845 (calculated 435.0828).

Danksagung

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit entstand unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Schauer in der Arbeitsgruppe für Angewandte Mikrobiologie des Instituts für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.
Herrn Prof. Dr. F. Schauer danke ich ganz herzlich für das von ihm zur Verfügung gestellte überaus interessante Thema sowie für die fachliche Unterstützung und vor allem für das in mich gesetzte Vertrauen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. A. Mikolasch für die fachlichen Diskussionen und Anregungen, ihr Verständnis und ihre persönliche Unterstützung sowie für die Interpretation der zahlreichen NMR-Spektren und die kritschen Anmerkungen beim Anfertigen dieser Arbeit.

Frau Dr. R. Sietmann und Frau Dr. K. Manda danke ich für die Einführung in die Laccasekatalyse schon während des Studiums, die meinen wissenschaftlichen Werdegang stark geprägt hat.

Ganz besonders gilt mein Dank denen, deren Hilfe direkt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat:

- Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Lalk vom Institut für Pharmazie (Pharmazeutische Biologie) danke ich für die Durchführung der zahlreichen massenspektroskopischen und NMR-Analysen, die diese Arbeit wesentlich bereichert haben.
- Herrn Dr. D. Gördes der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Thurow des Instituts für Automatisierungstechnik der Universität Rostock für die Aufnahmen von Massenspektren.
- Prof. Dr. U. Lindequist und ihrer Arbeitsgruppe des Instituts für Pharmazie (Pharmazeutische Biologie) der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, in der in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. K. Wende und Frau H. Bartrow die Zytotoxizitäts- und Agardiffusionstests durchgeführt wurden.
- Frau Dr. M. Wurster vom Institut für Pharmazie (Pharmazeutische Biologie) und Frau Dr. G. Schröder vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald sowie Frau Prof. Dr. H. Bernhard für die fachlichen Diskussionen bezüglich der biologischen Testsysteme.
- Prof. Dr. R. Jack des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald für die Überprüfung der Manuskripte.

Auch den hier namentlich nicht erwähnten Kollegen danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Landesregierung Mecklenburg-Vorpommern für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Landesgraduiertenstipendiums.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie für ihre fortwährende Unterstützung, ihr Verständnis und ihren großen Zuspruch.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Veronika Hahn
geboren am 19.12.1980 in Eberswalde-Finow
ledig

Schulbildung

09 / 1987 - 08 / 1993	10. Gesamtschule mit Grundschulteil, Eberswalde-Finow
09 / 1993 - 06 / 2000	Gymnasium Finow Abschluss: Abitur

Hochschulstudium

10 / 2000 - 09 / 2005	Biologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald Abschluss: Diplom Diplomarbeit: Derivatisierung von Aminoverbindungen unter besonderer Berücksichtigung des Einsatzes von Laccasen

Promotion

10 / 2005	Einschreibung als Promotionsstudent an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
04 / 2006 - 03 / 2009	Promotionsstudent unter Inanspruchnahme eines Landesgradiuiertenstipendiums des Landes Mecklenburg-Vorpommern am Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Praktische Erfahrungen

07 - 09 / 2003	Berufspraktikum am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch
11 - 12 / 2003	Studentische Tätigkeit als Hilfswissenschaftlerin am Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Berufliche Tätigkeit

11 / 2005 - 12 / 2005	Mitarbeit im Rahmen des Projektes: Untersuchung zum Einfluß von Plasmen generierten Radikalen zur Erzeugung von Hybridmolekülen und Wirkstoffen am Institut für Niedertemperatur-Plasmaphysik e.V., Greifswald
07 / 2008 - 09 / 2008	Mitarbeit im Rahmen des Projektes: Untersuchungen zur mikrobiellen Besiedlung und Beständigkeit von Reet als Dacheindeckungsmaterial am Institut für Marine Biotechnologie e.V., Greifswald
04 / 2009 - 08 / 2009	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
seit 09 / 2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Veröffentlichungen und wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

- Hahn, V., Mikolasch, A., Wende, K., Bartrow, H., Lindequist, U., Schauer, F. (2009) Synthesis of model morpholine derivatives with biological activities by laccase-catalyzed reactions. Biotechnol. Appl. Biochem. DOI: 10.1042/BA20090219.
- Hahn, V., Mikolasch, A., Manda, K., Gördes, D., Thurow, K., Schauer, F. (2009) Laccase-catalyzed carbon–nitrogen bond formation: coupling and derivatization of unprotected L-phenylalanine with different *para*-hydroquinones. Amino Acids 37(2): 315-321.
- Hahn, V., Mikolasch, A., Manda, K., Gördes, D., Thurow, K., Schauer, F. (2009) Derivatization of amino acids by fungal laccases: Comparison of enzymatic and chemical methods. J. Mol. Catal. B: Enzym. 60: 76-81.
- Mikolasch, A., Hahn, V., Manda, K., Pump, J., Illas, N., Gördes, D., Lalk, M., Gesell Salazar, M., Hammer, E., Jülich, W.-D., Rawer, S., Thurow, K., Lindequist, U., Schauer, F. (2009) Laccase-catalyzed cross-linking of amino acids and peptides with dihydroxylated aromatic compounds. Amino Acids, Manuskript eingereicht.
- Hahn, V., Schauer, F. (2009) Mikrobielle Laccasen zur Synthese organischer Substanzen. Biospektrum 5: 526-528.
- Hahn, V., Davids, T., Lalk, M., Schauer, F., Mikolasch, A. (2009) Enzymatic cyclizations using laccases: Multiple bond formation between dihydroxybenzoic acid derivates and aromatic amines. Green Chemistry, Manuskript eingereicht.
- Hahn, V., Mikolasch, A., Wende, K., Bartrow, H., Lindequist, U., Schauer, F. (2009) Derivatization of 1-aminobenzotriazole using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus* and *Myceliophthora thermophila* influenced by methanol and biological evaluation of the derivatives. Biotechnol. Appl. Biochem., Manuskript eingereicht.

Vorträge

- Hahn, V., Mikolasch, A., Schauer, F. (2008) Application of a fungal virulence factor for the synthesis of new antifungal compounds. Mycoses 51(5), 374 (Journal compliation). Vortrag auf der 42. Wissenschaftlichen Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V., Jena, 05.09.2008.
- Hahn, V. (2006) Einsatz von Laccasen aus Pilzen zur Herstellung von Wirkstoffen und Biomaterialien. Vortrag beim 16. Mikrobiologischen Seminar, Kloster/Hiddensee, 12.06.2006.

Poster

- Hahn, V., Mikolasch, A., Schauer, F. (2008) A novel enzymatic process for the synthesis of new antifungals. Infection 36 (Suppl. I): 36. Posterbeitrag auf dem 9. Kongress für Infektiologie und Tropenmedizin, Innsbruck, 27.02.-01.03.2008.
- Hahn, V., Mikolasch, A., Schauer, F. (2010) New enzymatic principle for the synthesis of novel antimicrobials. Posterbeitrag auf dem 20. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Wien, 10.-13.04.2010, Abstract eingereicht.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde. Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Veronika Hahn