

# Tyrosinase versus Catecholoxidase: ein Asparagin macht den Unterschied

Even Solem, Felix Tuczek und Heinz Decker\*

**Abstract:** Tyrosinasen ermöglichen die *ortho*-Hydroxylierung und Zwei-Elektronen-Oxidation von Monophenolen zu *ortho*-Chinonen. Catecholoxidasen katalysieren dagegen nur die Oxidation von Diphenolen. Obwohl diese Prozesse von signifikantem Interesse sind, ist die molekulare Basis des funktionellen Unterschiedes zwischen Tyrosinasen und Catecholoxidasen noch unklar. Vor kurzem wurde postuliert, dass eine Glutaminsäure und ein Asparagin ein konserviertes Wassermolekül binden und aktivieren, um dadurch Monophenole zu deprotonieren. Hier zeigen wir, dass eine Polyphenoloxidase, die nur eine Diphenolase-Aktivität besitzt, durch die Einführung eines Asparagins mittels Mutagenese in eine Tyrosinase umgewandelt werden kann. Das Asparagin und die konservierte Glutaminsäure sind für eine korrekte Orientierung und Aktivierung des konservierten Wassermoleküls notwendig, damit es die Hydroxygruppe des Monophenols deprotonieren kann.

Melanin kommt in allen Organismen vor. Das hochmolekulare Pigment spielt eine wichtige Rolle z.B. bei der Färbung der Haare und der Haut,<sup>[1–3]</sup> dem Schutz gegen UV- und ionisierende Strahlung,<sup>[4–6]</sup> der Immunabwehr<sup>[7,8]</sup> und bei vielen anderen biologischen Funktionen.<sup>[9–13]</sup> Es entsteht bei der Polymerisation von Dopachinon, das wiederum durch die Monohydroxylierung von Tyrosin mithilfe des Enzyms Tyrosinase (TY) gebildet wird. Alternativ kann Dopachinon auch aus L-Dopa mithilfe eines verwandten Enzyms gebildet werden, der Catecholoxidase (CO). In vivo katalysieren COs auch eine Zwei-Elektronen-Oxidation anderer Diphenole zu den entsprechenden *ortho*-Chinonen (Abbildung 1, links).

TY und CO werden üblicherweise zusammenfassend als Phenoloxidasen (PPOs) bezeichnet.<sup>[14]</sup> Diese Enzyme haben ähnliche aktive Zentren mit zwei Kupferionen, CuA und CuB, die jeweils durch drei Histidine koordiniert werden (Abbildung 1 rechts). Ein Molekül Sauerstoff wird reversibel als Peroxid in einer verbrückenden „Side-on“-Koordination gebunden.<sup>[15,16]</sup>

Neben dem natürlichen Substrat Tyrosin hydroxyliert TY auch andere Monophenole in *ortho*-Stellung zu Diphenolen, die zu *ortho*-Chinonen oxidiert werden (Monophenolase-Aktivität). CO kann dagegen nur die letzte Reaktion (Diphenolase-Aktivität) vermitteln.<sup>[15]</sup> Obwohl diese Reaktionen von signifikanter biologischer, medizinischer und ökonomischer Bedeutung sind, ist die molekulare Basis des funktionellen Unterschieds zwischen TY und CO noch unklar.<sup>[4,15,17,18]</sup>

Erst kürzlich hat die Fishman-Gruppe Kristallstrukturen von TY aus *Bacillus megaterium* (TyrBm) mit und ohne gebundene mono- und diphenolische Substrate wie Tyrosin, *p*-Tyrosol und L-Dopa beschrieben.<sup>[17,18]</sup> Die Autoren schlugen vor, dass eine hoch konservierte Glutaminsäure und ein Asparagin ein Wassermolekül binden und aktivieren. Dadurch werden Monophenole deprotoniert, was für eine TY-Aktivität erforderlich ist. Hier präsentieren wir den ersten direkten experimentellen Beweis für diese Hypothese.

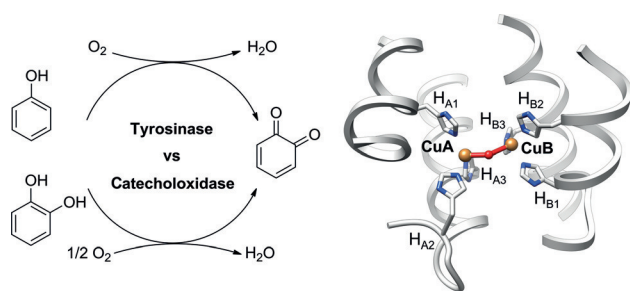
Ausgehend von Gesamt-RNA (extrahiert aus Weinblättern), cDNA-Synthese (komplementäre DNA) und anschließender DNA-Amplifikation gelang es uns, die kodierende Sequenz für eine spezifische latente Polyphenoloxidase (L-VvPPOcs-3) zu klonieren. In den letzten Jahren hat die AG Dirks-Hofmeister/Moerschbacher ein Expressionssystem für pflanzliche PPOs in *E. coli* etabliert.<sup>[20]</sup> Auf dieser Grundlage war es möglich L-VvPPOcs-3 nach einigen Modifikationen rekombinant herzustellen. Zur Herstellung des Expressionskonstrukts wurde das L-VvPPO-3-Gen partiell ohne Transitpeptide verwendet. Die rekombinante Expression des L-VvPPOcs-3-Gens erfolgte mittels eines pET51b-Expressionsvektors heterolog in *E. coli*, als N-terminales Strep-II-Fusionsprotein (Affinitätstag: WSHPOFEK). Die Isolierung der rekombinant erzeugten Proteine gelang über StrepTactin-Affinitätschromatographie mit einer geschätzten Reinheit von etwa 95 % (Abbildung S1).

L-VvPPOcs-3 hat eine molekulare Masse von etwa 60 kDa und ist in drei Domänen organisiert. Die N-terminale Domäne trägt das aktive Zentrum, das durch die C-terminale Domäne verdeckt wird. Ein kurzes flexibles Linkerpeptid verbindet die N- und C-terminalen Domänen. Das Sequenzmotiv –I-E236–N–V–P–H<sub>B1</sub>240–G–P–V–H<sub>B2</sub>–I– im Bereich der beiden CuB koordinierenden Histidine H<sub>B1</sub> und H<sub>B2</sub> (Abbildung 2) enthält eine streng konservierte Glutaminsäure (Abbildung 2). Durch native PAGE konnte mit einem Aktivitätsassay für den Wildtyp L-VvPPOcs-3 eine offensichtliche Oxidation von 4-Methylcatechol (4-MC) gezeigt werden (Abbildung 3), während *o*-Hydroxylierung und Oxidation von Monophenolen wie Tyramin oder *p*-Tyrosol zu den entsprechenden Chinonen, wenn überhaupt, nur in geringen Konzentrationen stattfindet. Im Unterschied zur Struktur von

[\*] E. Solem, Prof. Dr. H. Decker  
Institut für Molekulare Biophysik, Johannes Gutenberg Universität  
Jakob-Welder-Weg 26, 55128 Mainz (Deutschland)  
E-Mail: hdecker@uni-mainz.de

Prof. Dr. F. Tuczek  
Institut für Anorganische Chemie  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Max-Eyth-Straße 2, 24118 Kiel (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (einschließlich der experimentellen Methoden, ergänzende Resultate und Diskussion sowie die Referenzen, Tabellen und Abbildungen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201508534> zu finden.



**Abbildung 1.** Links: Reaktivitäten von TY (oben) und CO (unten). Rechts: Typ-3-Kupferzentrum von VvPPOg von Weinreben<sup>[19]</sup> im met-Zustand mit den Kupferionen A und B und den sechs Histidinen, die von vier  $\alpha$ -Helizes stammen.

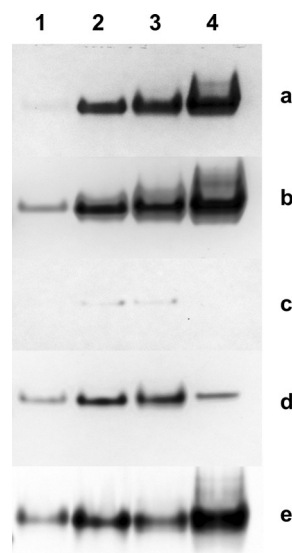
|                     | H <sub>B1</sub> | H <sub>B2</sub> |     |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----|
| VvPPOg              | LEHAPHNIVHK     |                 | 244 |
| L-VvPPOcs-3         | IENVPHGPHVI     |                 | 245 |
| G241N               | IENVPHNPHVI     |                 | 245 |
| G241N/P242I         | IENVPHNPHVI     |                 | 245 |
| P239del/G241N/P242I | IENVPHNPHVI     |                 | 244 |

**Abbildung 2.** Sequenzvergleich von *Vitis*-PPOs und dessen Muteinen. Das Alignment basiert auf der Struktur von Grenache-PPO (VvPPOg; PDB-ID 2P3X).<sup>[19]</sup> Der Wildtyp L-VvPPOcs-3 (Cabernet Sauvignon) und dessen Muteine G241N, G241N/P242I und P239del/G241N/P242I werden gezeigt.

TyrBm wird in diesem Sequenzabschnitt bei L-VvPPOcs-3 kein Asparagin gefunden. Diese Aminosäure sollte neben dem CuB koordinierenden H<sub>B1</sub>240 liegen (Abbildung 2). In L-VvPPOcs-3 ist an dieser Position ein Glycin (G241), wodurch die Monophenolase-Aktivität verloren geht. Ein Glycin wurde auch in den entsprechenden Positionen in ToPPO-1 und ToPPO-2 von Löwenzahn (*Taraxacum officinale*) gefunden, für die bis heute nur eine Diphenolase-Aktivität beobachtet wurden.<sup>[20]</sup>

Durch ortsgerichtete Mutagenese von G241N konnten wir L-VvPPOcs-3 in eine Monophenolase umwandeln. In Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) als Aktivator<sup>[21–23]</sup> werden die Monophenole Tyramin und *p*-Tyrosol sehr effizient in die entsprechenden *ortho*-Chinone umgewandelt (siehe Abbildung 3 und die Hintergrundinformationen). Dies bedeutet, dass neben dem konservierten Glu236 die Gegenwart eines Asparagins in unmittelbarer Nachbarschaft von H<sub>B1</sub> auf der C-terminalen Seite für die Monophenolase-Aktivität notwendig ist, was in völliger Übereinstimmung mit allen PPOs ist, die als TY wirken. Wenn andererseits das Asparagin durch andere Aminosäuren substituiert ist, wird für PPOs nur eine Diphenolase-Aktivität beobachtet.

Der Sequenzabschnitt von L-VvPPOcs-3 um H<sub>B1</sub> enthält zwei Proline, die Sekundärstrukturen stören können. In Pilz-TY wie z. B. *A. bisporus* nehmen die Glutaminsäure und das Asparagin nahezu identische topographische Positionen in einer durchgehenden  $\alpha$ -Helix ein, die zwei der drei CuB-koordinierenden Histidine (H<sub>B1</sub> und H<sub>B2</sub>; Abbildung 4a)<sup>[24]</sup> enthält. In pflanzlichen PPOs enthält dieser Sequenzabschnitt zwei Proline, wovon eines streng konserviert und das andere variabel ist. Letzteres (P242 in der PPO der Süßkartoffel,<sup>[25]</sup> *I. batatas*, 1BT3) ist zwischen H<sub>B1</sub> und H<sub>B2</sub> (Abbildung 4b) lokalisiert, ähnlich wie bei L-VvPPOcs-3. Wenn man dieses Prolin in L-VvPPOcs-3 durch ein Isoleucin zusätzlich zur

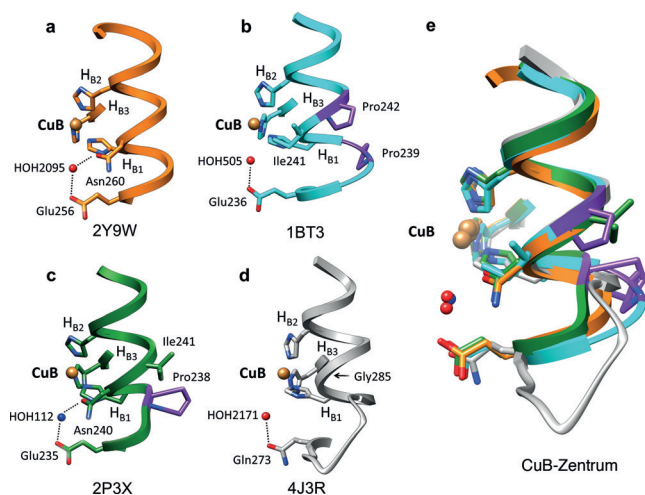


**Abbildung 3.** Aktivitätsassay in nativer PAGE für L-VvPPOcs-3 und Muteinen zur Überprüfung der Katalyse von Monophenolen (Tyramin und *p*-Tyrosol) und einem Diphenol (4-Methylcatechol). Die katalytische Aktivität wurde bei zwei verschiedenen Reaktionszeiten in Gegenwart des Aktivators SDS (1.5 mM) aufgenommen. a) *p*-Tyrosol (10 min), b) *p*-Tyrosol (120 min), c) Tyramin (10 min), d) Tyramin (120 min), e) 4-MC (5 min). Das Enzym und die Muteine waren: 1) L-VvPPOcs-3; 2) G241N-Mutein; 3) G241N/P242I-Mutein; 4) P239del/G241N/P242I-Mutein. Eine alkalische PAGE (10%) und ein 0.1 M Maleat/Tris-Puffer (pH 5.5) wurden verwendet. Die Empfindlichkeit des Assays wurde durch Zugabe von 6 mM MBTH bei Monophenolen und 10 mM beim Diphenol erhöht. Die Absorption wurde bei 505 nm aufgenommen. Die Konzentrationen von L-VvPPOcs-3 und dessen Muteinen waren 15  $\mu$ g. Die Konzentrationen der Substrate lagen bei 6 mM für Tyramin und *p*-Tyrosol und 10 mM für 4-MC.

Mutation G241N ersetzt, erhöht sich die Effizienz bei der Monooxygenierung von *p*-Tyrosol und Tyramin; zudem wird die katalytische Oxidation von 4-Methylcatechol erhöht (Abbildung 3). Die resultierende Sequenz stimmt mit denjenigen von VvPPOg<sup>[19]</sup> (Abbildung 4c) und der nahe verwandten VvPPOr (aus Riesling-Wein) überein, die ebenfalls TY-Aktivität aufweist.<sup>[26]</sup>

Das andere Prolin (P239 in L-VvPPOcs-3), das H<sub>B1</sub> auf der N-terminalen Seite flankiert, ist bei pflanzlichen PPOs streng konserviert, aber existiert nicht in den PPOs anderer Organismen (Abbildung S2). Offensichtlich ist die Gegenwart dieses Prolins vereinbar mit der Monophenolase-Aktivität, wie für die PPOs aus Weinbeeren<sup>[26]</sup> und Walnussblättern<sup>[27]</sup> gezeigt wurde, solange sowohl die Glutaminsäure als auch das Asparagin vorhanden sind. In L-VvPPOcs-3 führt die Deletion des konservierten Prolins (P239del) zusätzlich zu den Mutationen von G241N und P242I sogar zu einer höheren Umsatzrate für *p*-Tyrosol (Abbildung 3). Dagegen wird die katalytische Effizienz der Monooxygenierung von Tyramin drastisch herabgesetzt.

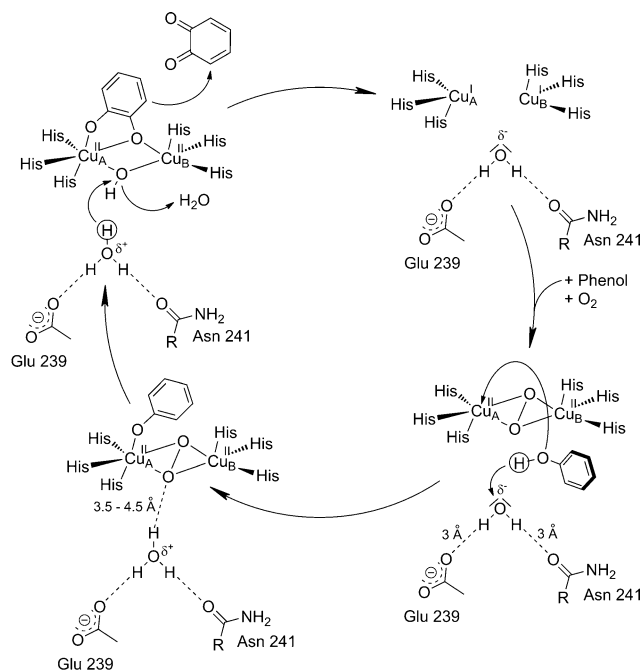
Das bedeutet, dass die Anwesenheit dieses Asparagins neben der hoch konservierten Glutaminsäure notwendig ist, um eine Monophenolase-Aktivität zu induzieren. Die konservierten Proline modulieren die katalytische Aktivität und/oder bewirken eine Substratspezifität. Wenn nur die beiden



**Abbildung 4.** Darstellung der Teile von  $\alpha$ -Helizes von verschiedenen PPO-Strukturen, die die beiden CuB-koordinierenden Histidine  $H_{B1}$  und  $H_{B2}$  liefern: a) AbTyr (Champignon, *A. bisporus*), PDB-ID 2Y9W (orange); b) IbPPO (Süßkartoffel, *I. batatas*), PDB-ID 1BT3 (cyan); c) VvPPOg (Wein, *V. vinifera*), PDB-ID 2P3X (grün); d) AoCO-4 (Schimmelpilz, *A. oryzae*), PDB-ID 4J3R (grau, hier ersetzt ein Gln die Glu); e) Überlagerung von a–d. Die Pyrrolidinderinge der Proline in direkter Nachbarschaft zu  $H_{B1}$  sind in Purpur eingefärbt; die Kupferatome des CuB-Zentrums sind hellbraun eingefärbt. Die Überlagerung (e) zeigt, dass die konservierten Glu und Asn (falls vorhanden) dieselbe topologische Positionen einnehmen unabhängig von der Gegenwart der Proline. Ein Wassermolekül (HOH112) ist in der VvPPOg-Struktur auf der Basis der erneuten Verfeinerung der publizierten Struktur<sup>[19]</sup> in Blau dargestellt (2P3X\*; siehe Abbildung S3, S4).

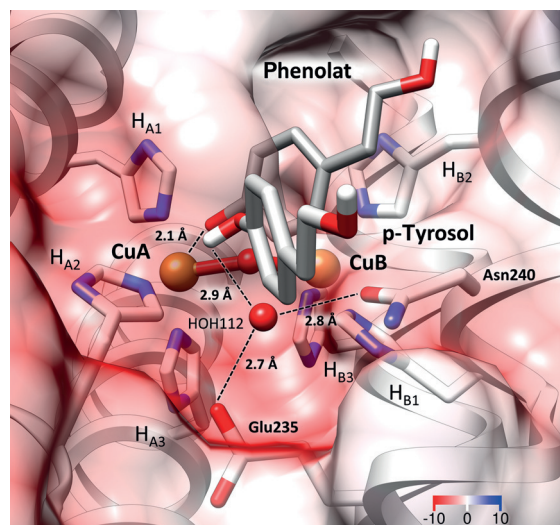
Proline anwesend sind, aber nicht das Asparagin, wird nur eine Diphenolase-Aktivität beobachtet (Abbildung 4b).<sup>[25]</sup> Wenn hingegen das Asparagin und die Glutaminsäure, aber keine der beiden Proline vorhanden sind, ist die Monooxygenase-Aktivität sehr ausgeprägt. Dies ist der Fall für TY aus anderen Organismen wie Bakterien und Pilzen (Abbildung 4a).<sup>[24]</sup> Falls das Asparagin in diesen Enzymen nicht vorliegt, geht die TY-Aktivität wieder verloren (Abbildung 4d).<sup>[28]</sup> Unabhängig von der Anwesenheit der Proline nehmen die konservierte Glutaminsäure, das Asparagin (falls vorhanden) und auch das konservierte Wassermolekül immer dieselben topologischen Positionen ein (Abbildung 4e). Dies gilt auch für die Grenache-PPO (VvPPOg, PDB-ID 2P3X), für die wir die Anwesenheit des konservierten Wassers durch eine weitere Verfeinerung der publizierten Struktur<sup>[19]</sup> nachweisen konnten (PDB-ID 2P3X\*; siehe Abbildung S3 und S4).

Durch die Wasserstoffbrücken zu den beiden Aminosäuren Glutaminsäure und Asparagin wird das konservierte Wassermolekül in einer Entfernung von etwa 3 Å zu den Seitenresten fixiert (Schema 1). Zudem wird es in einer Weise orientiert, dass seine negativ geladene Seite das Proton der Hydroxygruppe der Monophenole anzieht. Wenn das Substrat sich dem Dikupfer(II)-Peroxo-Zentrum nähert, passiert es das konservierte Wassermolekül, das dadurch zu einem Hydroniumion protoniert wird. Das entstehende Phenolat kann sich nun zur freien Koordinationsstelle von CuA<sup>[29]</sup> verschieben, an das es in einer Entfernung von etwa 2 Å ge-



**Schema 1.** Deprotonierung von monophenolischen Substraten im Tyrosinase-Zyklus.

bunden wird (Abbildung 5). Alternativ wird das Proton infolge der Bindung durch das freie phenolische Substrat an CuA abgegeben und auf das konservierte Wassermolekül



**Abbildung 5.** Deprotonierung und Annäherung von *p*-Tyrosol an das aktive Zentrum der weiter verfeinerten VvPPOg-Struktur (PDB-ID 2P3X\*, siehe die Hintergrundinformationen). Das ankommende *p*-Tyrosol koordiniert als Phenolat CuA in einer Entfernung von 2.1 Å. Das Proton des phenolischen Substrats wird über eine minimale Entfernung von 2.9 Å auf das konservierte Wassermolekül übertragen, das selber durch Glu235 und Asn240 gebunden wird. Die Position des *p*-Tyrosols wurde der Struktur von PPO aus *B. megaterium* entnommen, das mit dem *p*-Tyrosol kokristallisiert wurde<sup>[17]</sup> (PDB-ID 4P6T). Die elektrostatische Ladungsverteilung auf der Oberfläche wurde mit dem „Coulombic Surface Coloring Mode“ ermittelt (UCSF Chimera software, Version 10.1).



übertragen. Danach erfolgt ein elektrophiler Angriff des Peroxids auf die *ortho*-Position des Phenolats,<sup>[15,17,29]</sup> was zu einem unsymmetrisch gebundenem Catecholat führt. Das andere Sauerstoffatom des Peroxids bildet ein verbrückendes Hydroxid. Daraufhin wird das koordinierte Catecholat in einem Zwei-Elektronen-Prozess oxidiert und als Chinon abgegeben. Dieser Reaktionsschritt wird durch den Rücktransfer des Protons über eine Entfernung von 3.5–4.5 Å vom Hydroniumion zum Hydroxidliganden erleichtert, wobei ein Wassermolekül entsteht. Die beiden Kupferionen im katalytischen Zentrum werden zu Cu<sup>I</sup> reduziert und können so wieder mit O<sub>2</sub> reagieren.

In latenten PPOs verdeckt die C-terminale Domäne den Zugang zum katalytischen Zentrum.<sup>[15,23]</sup> In Gegenwart von SDS wird bei Wildtyp-L-VvPPOcs-3 eine Di- und sogar eine sehr schwache Monophenolase-Aktivität beobachtet. Dies lässt sich erklären durch kürzlich publizierte MD-Simulationen auf der Basis der Kristallstruktur des strukturell verwandten Hämocyanins aus dem Tintenfisch *Octopus dofleini* (PDB-ID 1JS8). Demnach ermöglicht eine SDS-induzierte Verschiebung der C-terminalen Domäne einen freien Zugang zum katalytischen Zentrum.<sup>[30]</sup>

Der Zugang des Substrats zum aktiven Zentrum wird auch durch eine Aminosäure mit Schrankenfunktion sterisch beeinflusst,<sup>[15,17–19,25]</sup> die in Pflanzen-PPOs Phenylalanin, Tyrosin oder Leucin sein kann. Im Gegensatz zu einer früheren Hypothese<sup>[25,29]</sup> deuten kürzlich durchgeführte Untersuchungen darauf hin, dass sperrige Seitenreste dieser „Schranken“-Aminosäuren nicht mit der enzymatischen Aktivität der betreffenden Systeme korrelieren.<sup>[18]</sup> Vielmehr zeigen MD-Simulationen an VvPPO von Riesling<sup>[26]</sup> auf der Basis der Kristallstruktur von Grenache-VvPPOg,<sup>[19]</sup> dass der aromatische Ring des Phenylalanins, der als potenzielle „Schranke“ dient, durch Rotation einen freien Zugang für monophenolische Substrate zu CuA eröffnet.<sup>[26]</sup>

Der funktionelle Unterschied zwischen TY und CO kann somit ausschließlich auf die Anwesenheit des Asparagins, das zusammen mit der Glutaminsäure ein konserviertes Wassermolekül bindet, zurückgeführt werden. Dadurch wird das Proton gebunden, das vom phenolischen Substrat abgegeben wird, damit dieses im katalytischen Zentrum als Phenolat koordiniert werden kann. Offensichtlich senkt die Wechselwirkung mit einer einzigen Aminosäure, z. B. Glutaminsäure, den pK<sub>B</sub> des konservierten Wassers nicht ausreichend, um diese Rolle zu spielen. In diesem Fall ist nur eine Diphenolase-Aktivität möglich, die nicht von einem Deprotonierungsweg abhängt. Diese Schlussfolgerung ist in vollständiger Übereinstimmung mit den Resultaten niedermolekularer Modellsysteme für Typ-3-Kupferproteine.<sup>[31]</sup> Im Unterschied zur CO-Mimetika erfordern TY-Modelle die Zugabe einer Base.<sup>[32]</sup> Neutrale, d. h. freie, Phenole reagieren zwangsläufig mit Cu-O<sub>2</sub>-Zentren zu Phenoxylradikalen, die zu unphysiologischen Reaktionsprodukten führen.<sup>[15]</sup> Während ursprünglich ein Überschuss an Triethylamin vorliegen musste, um phenolische Substrate zu deprotonieren,<sup>[33,34]</sup> wurde kürzlich gezeigt, dass die Anwendung von stöchiometrischen (oder leicht überstöchiometrischen) Mengen an Diamin-Liganden ausreicht, um eine katalytische Aktivität in diesen Modellsystemen zu erzielen.<sup>[35]</sup> Wie das aktivierte Wasser-

molekül in den Enzymen könnte dieser Ligand als eine „interne Base“ die katalytische Monooxygenierung der Phenole ermöglichen.<sup>[15,36]</sup>

Zusammenfassend demonstriert diese Studie die Abhängigkeit der TY-Aktivität von einem Asparagin, das mit einer Glutaminsäure ein konserviertes Wassermolekül bindet und dadurch für die Deprotonierung von monophenolischen Substraten aktiviert. Dieses Resultat wird durch die kürzliche Veröffentlichung der ersten Kristallstruktur einer Pflanzen-TY (aus Walnuss-Blättern)<sup>[37]</sup> unterstützt. Dies ermöglicht ein vollständiges Verständnis der Reaktivität von Typ-3-Kupfersystemen auf molekularer Ebene und liefert strukturelle Einblicke, um diese Enzyme zu modifizieren und sie in der Biotechnologie anzuwenden.<sup>[12]</sup>

## Danksagung

Wir danken Dr. H. Hartmann für das weitere Verfeinerung der VvPPOg-Struktur und J. Hamann für die Gestaltungen der Graphiken. Wir danken auch Dr. W. E. G. Müller für die Möglichkeit, die molekularbiologischen Arbeiten durchzuführen, sowie Dr. M. Dirks-Hofmeister und Prof. Dr. B. Moerschbacher für Hinweise bezüglich der Expression und Aufreinigung von pflanzlichen PPOs und kritischen Bemerkungen. Die Arbeit wurde durch die DFG (GRK 1043 (H.D., E.S.); TU58/15-1 (F.T.)) unterstützt.

**Stichwörter:** Catecholoxidase · Monophenolase-Aktivität · Polyphenoloxidase · Typ-3-Kupferproteine · Tyrosinase

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 2884–2888  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 2934–2938

- [1] A. Gibbons, *Science* **2014**, 346, 934–936.
- [2] R. A. Spritz, J. Oh, K. Fukai, S. A. Holmes, L. Ho, D. Chitayat, T. D. France, M. A. Musarella, S. J. Orlow, R. E. Schnur, R. G. Weleber, A. V. Levin, *Human Mutat.* **1997**, 10, 171–174.
- [3] M. Greaves, *Proc. R. Soc. B* **2013**, 281, 2955.
- [4] C. Olivares, F. Solano, *Pigment Cell Melanoma Res.* **2009**, 22, 750–760.
- [5] J.-S. Taylor, *Science* **2015**, 347, 824.
- [6] E. Dadachova, R. A. Bryan, X. Huang, T. Moadel, A. D. Schweitzer, P. Aisen, J. D. Nosanchuk, A. Casadevall, *PLoS ONE* **2007**, 2, e457.
- [7] C. J. Coates, J. Nairn, *Dev. Comp. Immunol.* **2014**, 38, 43–55.
- [8] L. Cerenius, K. Söderhäll, *Immunol. Rev.* **2004**, 198, 116–126.
- [9] T. Boeckx, A. L. Winters, K. J. Webb, A. H. Kington-Smith, *J. Exp. Bot.* **2015**, 66, 3571–3579.
- [10] M. Sugumaran, *Pigment Cell Res.* **2002**, 15, 2–9.
- [11] M. Martinez, J. Whitaker, *Trends Food Sci. Technol.* **1995**, 6, 195–200.
- [12] M. Fairhead, L. Thony-Meyer, *New Biotechnol.* **2012**, 29, 183–191.
- [13] S. Halaoui, M. Asther, J. C. Sigoillot, M. Hamdi, A. Lomascolo, *J. Appl. Microbiol.* **2006**, 100, 219–232.
- [14] K. E. van Holde, K. I. Miller, H. Decker, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 15563–15566.
- [15] M. Rolf, J. Schottenheim, H. Decker, F. Tuzcek, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 4077–4098.
- [16] E. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2563–2606.

- [17] M. Goldfeder, M. Kanteev, S. Isaschar-Ovdat, N. Adir, A. Fishman, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4505.
- [18] M. Kanteev, M. Goldfeder, A. Fishman, *Protein Sci.* **2015**, *24*, 1360–1369.
- [19] V. M. Virador, J. P. Reyes Grajeda, A. Blanco-Labra, E. Mendiola-Olaya, G. M. Smith, A. Moreno, J. R. Whitaker, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1189–1201.
- [20] M. E. Dirks-Hofmeister, S. Kolkenbrock, B. M. Moerschbacher, *PLoS ONE* **2013**, *8*(10), e77291; M. E. Dirks-Hofmeister, R. Singh, C. M. Leufken, J. K. Inlow, B. M. Moerschbacher, *PLoS ONE* **2014**, *9*(6), e99759.
- [21] M. Moore, W. H. Flurkey, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 4982–4988.
- [22] S. Baird, S. M. Kelly, N. C. Price, E. Jaenicke, C. Meesters, D. Nillius, H. Decker, J. Nairn, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2007**, *1774*, 1380–1394.
- [23] C. M. Leufken, B. M. Moerschbacher, M. E. Dirks-Hofmeister, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2015**, *1854*, 178–186.
- [24] W. T. Ismaya, H. J. Rozeboom, A. Weijn, J. J. Mes, F. Fusetti, H. J. Wichers, B. W. Dijkstra, *Biochemistry* **2011**, *50*, 5477–5486.
- [25] T. Klabunde, C. Eicken, J. C. Sacchettini, B. Krebs, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1998**, *5*, 1084–1090.
- [26] P. Fronk, H. Hartmann, M. Bauer, E. Solem, E. Jaenicke, S. Tenzer, H. Decker, *Food Chem.* **2015**, *183*, 49–57.
- [27] F. Zekiri, C. Molitor, S. G. Mauracher, C. Michael, R. L. Mayer, C. Gerner, A. Rempel, *Phytochemistry* **2014**, *101*, 5–15.
- [28] N. Hakulinen, C. Gasparetti, H. Kaljunen, K. Kruus, J. Rouvinen, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2013**, *18*, 917–929.
- [29] H. Decker, T. Schweikardt, F. Tuczek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4546–4550; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4658–4663.
- [30] K. N. Naresh, A. Sreekumar, S. S. Rajan, *J. Mol. Graphics Modell.* **2015**, *61*, 272–280.
- [31] E. A. Lewis, W. B. Tolman, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1047–1076.
- [32] L. M. Mirica, M. Vance, D. J. Rudd, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, T. D. Stack, *Science* **2005**, *308*, 1890–1892.
- [33] C. Wilfer, P. Liebhäuser, H. Erdmann, A. Hoffmann, S. Herres-Pawlis, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 494–502.
- [34] N. J. Hamann, F. Tuczek, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 2298–2300.
- [35] K. V. Esguerra, Y. Fall, J. P. Lumb, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5877–5881; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 5987–5991.
- [36] M. S. Askari, K. V. N. Esguerra, J.-P. Lumb, X. Ottenwaelde, *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 8665–8672.
- [37] A. Bijelic, M. Pretzler, C. Molitor, F. Zekiri, A. Rempel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14677–14680; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 14889–14893.

Eingegangen am 11. September 2015  
Online veröffentlicht am 15. Januar 2016