

Funktionelle Biodiversität

Unspezifische Peroxygenasen – Oxyfunktionalisierung außerhalb der Pilzhyphe

KATRIN SCHEIBNER¹, RENÉ ULLRICH², JAN KIEBIST¹, HARALD KELLNER², MARTIN HOFRICHTER²

¹ FAKULTÄT 2, BRANDENBURGISCHE TU COTTBUS-SENFTENBERG

² INTERNATIONALES HOCHSCHULINSTITUT ZITTAU, TU DRESDEN

Unspecific peroxygenases (UPOs) secreted by fungi represent an intriguing enzyme type that selectively transfers peroxide-borne oxygen with high efficiency to diverse substrates including unactivated hydrocarbons. They contain a cysteine-ligated heme and catalyze hydroxylation, epoxidation, dealkylation, deacylation as well as heteroatom, halide and one-electron oxidations. Substrate spectra of UPOs resemble both those of P450 monooxygenases and heme peroxidases.

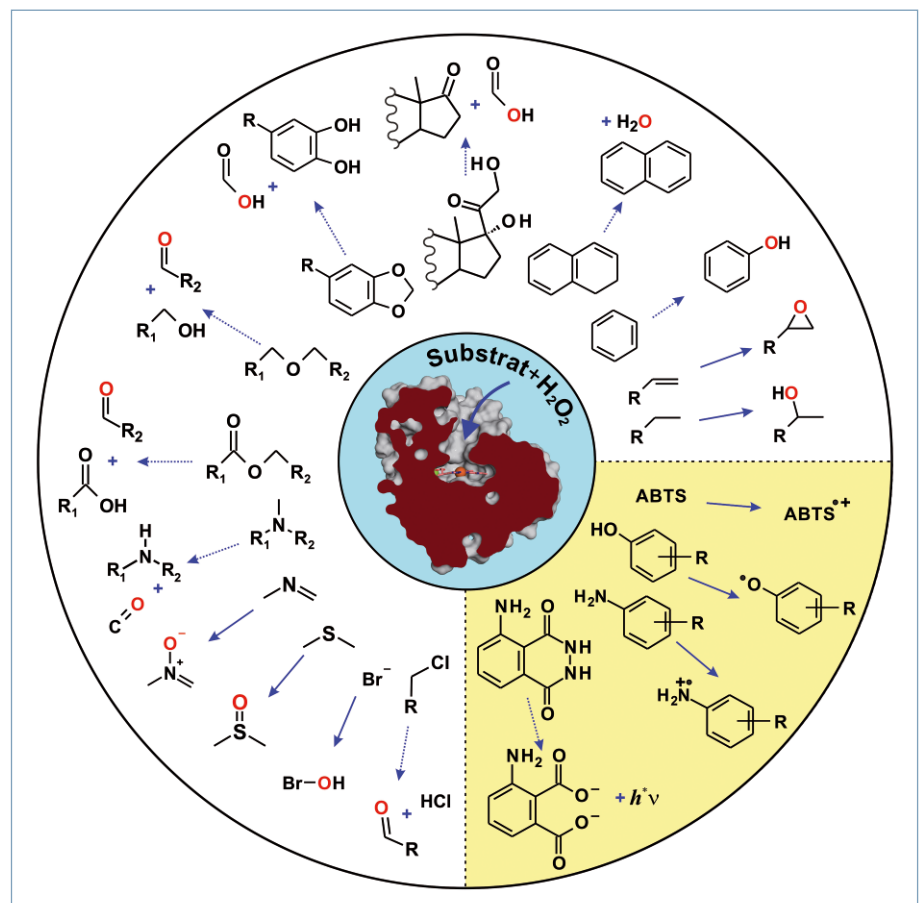
DOI: 10.1007/s12268-020-1338-x
© Die Autoren 2020

■ Unspezifische Peroxygenasen (UPOs, EC 1.11.2.1) gehören zu den Häm-Thiolat-Proteinen und verhalten sich „promiskuitiv“ bezüglich anspruchsvoller Sauerstoff-Transfer-Reaktionen. Die erste UPO wurde 2004 im Südlichen Ackerling (*Agrocybe aegerita*), einem Laubholz besiedelnden Speisepilz aus der weiteren Champignon-Verwandtschaft (Ordnung Agaricales), entdeckt [1]. Weitere Enzyme dieses Typs fanden sich in Kulturen anderer Pilze (z. B. *Marasmius rotula*, *Chaetomium globosum*) [2, 3], und die seit Langem bekannte Chlorperoxidase (CPO, EC 1.11.1.10) entpuppte sich als Spezialfall der UPOs [4]. Die heterologe Expression der UPOs ist mit größeren Schwierigkeiten verbunden und bisher nur in einigen Fällen gelungen (u. a. in *Saccharomyces*, *Pichia*); möglicherweise spielen dabei die komplexe Faltung sowie die Ausbildung von Disulfidbrücken eine Rolle [5, 6]. Die Kristallstrukturen der UPOs von *A. aegerita* und *M. rotula* wurden gelöst und offenbaren eine kompakte sphärische Gestalt, die von α -Helices dominiert wird und ein Häm-stabilisierendes Magnesium sowie ein hochkonserviertes PCP-Motiv enthalten. Letzteres exponiert ein Cystein als proximalen Häm-Liganden in idealer Weise in Richtung des Eisens. Die Häm-Zugangskanäle der UPOs sind mit hydrophoben Aminosäureresten (Phe oder Leu/Ile/Val) ausgekleidet, und ihre molekulare Architektur ist von entscheidender Bedeu-

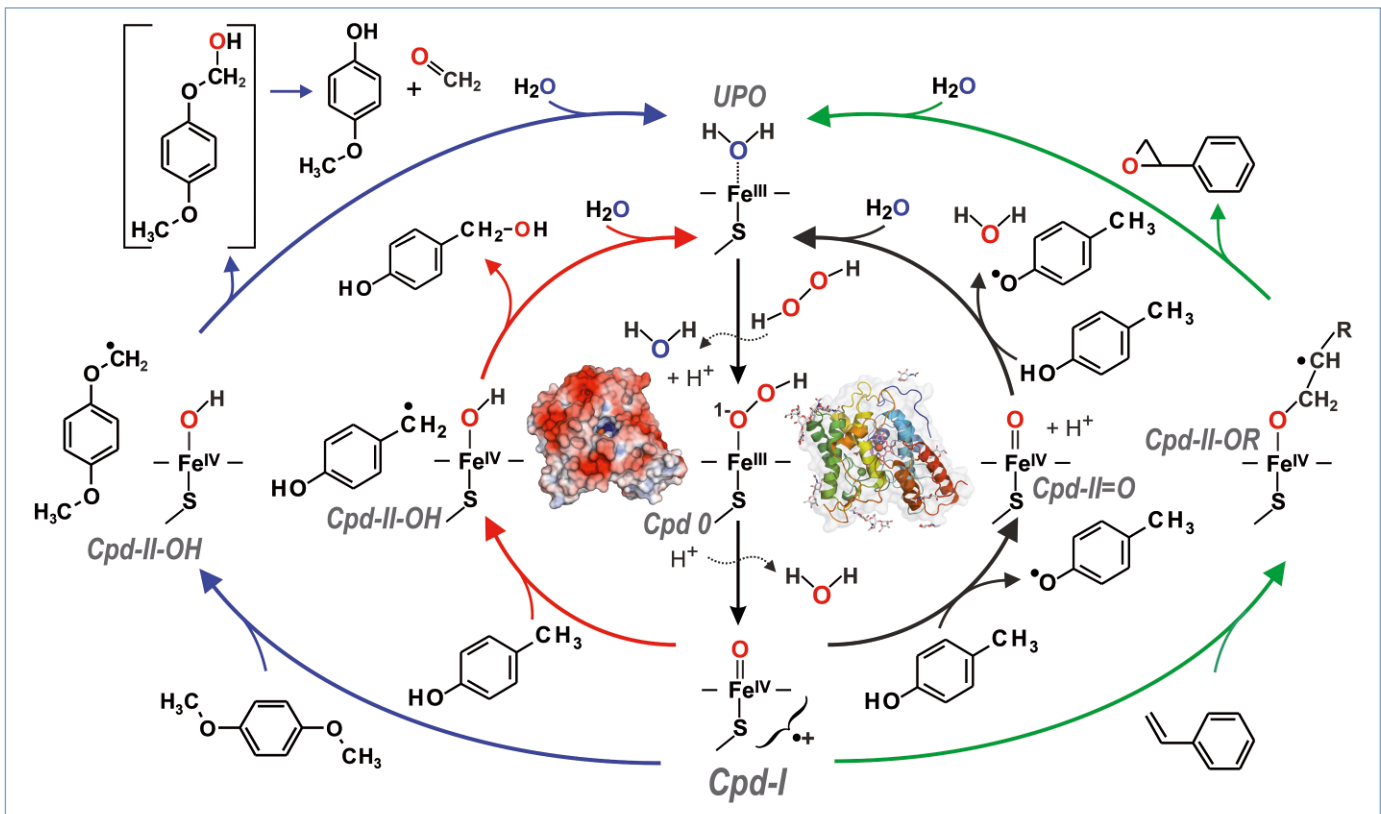
tung für die Substratspezifität des jeweiligen Enzyms [3, 5, 6].

UPO-Reaktionen und Mechanismus

Funktionell betrachtet sind UPOs außerhalb der Pilzhypfen agierende Monooxygenasen, die ein peroxidbürtiges Sauerstoffatom (H-O-O-R) auf diverse organische Substrate übertragen. Die Zielsubstrate sind dabei Gegenstand von Hydroxylierung, Epoxidierung, Dealkylierung, Deacylierung und Heteroatom-Oxygenierung; darüber hinaus werden Ein-Elektronen-Oxidationen analog zu den klassischen Peroxidasen katalysiert (Abb. 1, [4, 7]). Oftmals ähneln die Produktspektren der UPOs, z. B. hinsichtlich der Umsetzung



▲ **Abb. 1:** Reaktionen unspezifischer Peroxygenasen. Die Reaktionen im unteren rechten Viertel sind Ein-Elektronen-Oxidationen, während alle übrigen Reaktionen Sauerstoff-Transfer-Reaktionen darstellen. Im Zentrum der Abbildung wird die UPO aus *Agrocybe aegerita* im Querschnitt gezeigt (modifiziert nach [4, 12]). ABTS: 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure).



▲ **Abb. 2:** Katalytische Zyklen unspezifischer Peroxygenasen (UPOs) mit vier möglichen Routen, die auf der Stufe der UPO-Compound I (Cpd-I) in Abhängigkeit vom Substrat verzweigen. Die inneren Zyklen beschreiben die Oxygenierung (rote Pfeile) und Oxidation (schwarze Pfeile) von *p*-Kresol, die äußeren Zyklen die Epoxidierung von Styrol (grüne Pfeile) und die O-Dealkylierung von 1,4-Dimethoxybenzol (blaue Pfeile) (modifiziert und neu arrangiert nach [4, 5, 12]).

pharmazeutischer Wirkstoffe oder Xenobiotika, jenen von Cytochrom-P450-Monooxygenasen, die als universelle Entgiftungsenzyme in der menschlichen Leber aktiv sind [8–10]. **Abbildung 2** illustriert die Mechanismen UPO-katalysierter Umsetzungen anhand der Substrate *p*-Kresol, 1,4-Dimethoxybenzol und Styrol. Ersteres wird sowohl benzylich hydroxyliert als auch zum korrespondierenden Phenoxylradikal oxidiert, der aromatische Diether wird O-dealkyliert und Styrol epoxidiert. Schlüsselintermediat ist in jedem Fall die UPO-Compound I (Cpd-I), ein Oxoferryl-Kationradikal-Komplex des Häms, der nach Bindung und heterolytischer Spaltung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet wird [4, 11]. Cpd-I ist ein extrem starkes Oxidationsmittel, das u. a. C-H-Bindungen, Doppelbindungen und phenolische OH-Gruppen unter Radikalbildung angreift. Im Anschluss kommt es durch *rebound*-Mechanismen zur Übertragung des Sauerstoffs (Peroxygenierung eines C-Atoms oder Epoxidbildung) oder zu einer zweiten Radikalbindung (Phenoloxidation). Damit entsprechen die ablaufenden Reaktionen einer Kombination aus dem *peroxide shunt*

bestimmter P450-Enzyme und dem katalytischen Zyklus klassischer Hämperoxidasen [4].

Verbreitung im Pilzreich und Phylogenie

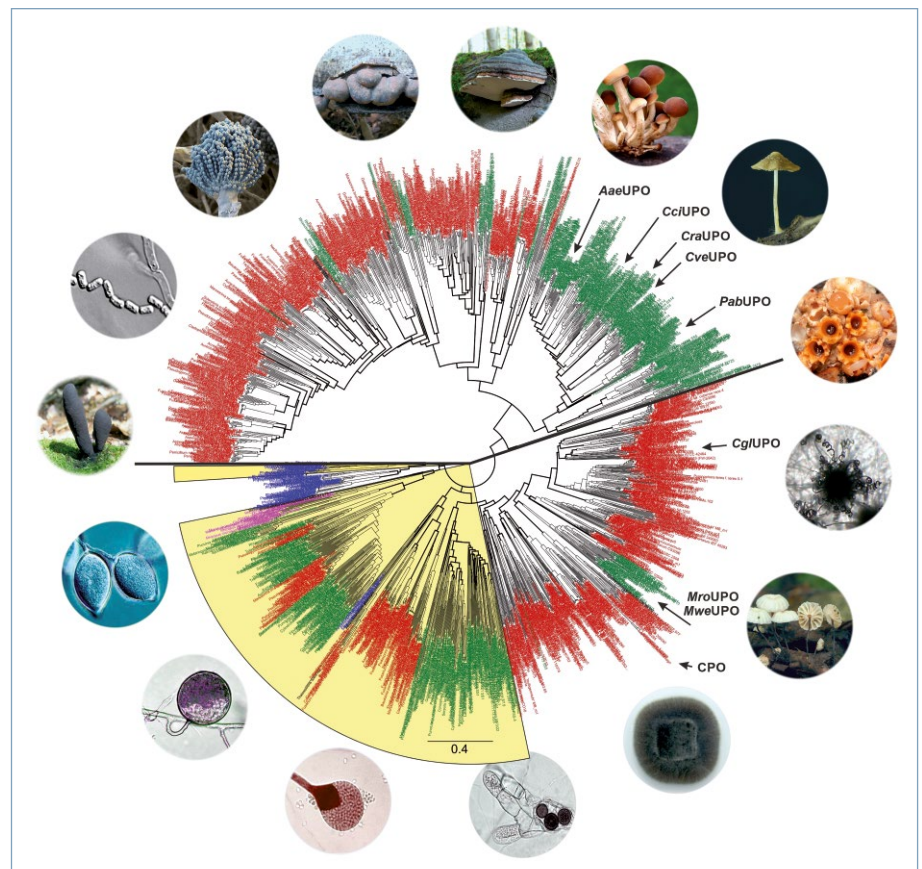
Mittlerweile sind einige Tausend putative UPO-Sequenzen in pilzlichen Genomen gefunden worden. Sie legen die weite Verbreitung dieser Enzyme im gesamten Pilzreich nahe, was alle Stämme der echten Pilze (Eumycota) sowie einige pilzähnliche Stramenopile einschließt [4, 12]. Innerhalb der basalen Schwestergruppe der übrigen Pilze, den Cryptomycota, wurde ein UPO-Gen in *Rozella allomyces* detektiert. Anderen basalen Pilzgruppen (Microsporidia, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Kickxellomycota) fehlen UPO-Gene; dasselbe gilt für die Schwestergruppe der Pilze, die Holozoa, die die Tiere (Metazoa) und ihre nächsten Verwandten (Choanoflagellata, Ichthyosporia) umfasst. Vertreter der Chytridiomycota (Flagellenpilze) besitzen hingegen bis zu sieben UPO-Gene; ihre Enzyme mögen der Ausgangspunkt für die evolutionäre Entwicklung der UPO-Multigenfamilie gewesen sein, die

schließlich zum Besitz von 70 und mehr UPO-Genen in einzelnen Arten höherer Pilze geführt hat. Außer den Mortierellomycota besitzen Vertreter der übrigen Gruppen der polyphyletischen Zygomycota (Jochpilze) und Glomeromycota ein bis zwei UPO-Gene.

Innerhalb des artenreichen Unterreichs der höheren Pilze (Dikarya, das heißt Ascomycota [Schlauchpilze] und Basidiomycota [Ständerpilze]) sind UPO-Gene besonders häufig. Ihre größte Zahl innerhalb der Ascomycota erreichen sie im Zitruspathogen *Zasmidium citri-griseum* (25 Gene) und in der halotoleranten schwarzen Hefe *Hortaea werneckii* (21 Gene) [12]. Innerhalb der Basidiomycota weisen Arten aus unterschiedlichen ökophysiologischen Pilzgruppen multiple UPO-Gene auf, besonders häufig die Zersetzer von Bodenstreu und Dung. So besitzt der Kugelschneller (*Sphaerobolus stellatus*), der auf Holzresten und Dung wächst, nicht weniger als 78 UPO-Gene. In eigenen, noch nicht veröffentlichten Studien fanden wir über 60 UPO-Gene im Halsbandschwinding (*Marasmius rotula*) und 48 Gene im neu entdeckten kenianischen Mürbling *Psathyrella aberdarensis* [12]; beide Pilze kolonisieren

bevorzugt Zweige und kleineres Totholzmaterial. Auch der bedeutendste kommerzielle Speisepilz, der Zucht-Champignon (*Agaricus bisporus*), ist reich an UPOs (24 Gene). Putative UPO-Gene außerhalb der Echten Pilze (Eumycota) wurden bisher nur in der Klasse der Peronosporomycetes (früher Oomycota) gefunden. Dabei handelt es sich um pilzähnliche Stramenopile, die sich phylogenetisch in der Nähe verschiedener Farbalgen (z. B. Phaeophyta) einordnen. So wurden entsprechende Gene in den Pathogenen *Aphanomyces astaci* (Krebspest) und *Phytophthora infestans* (Kartoffelfäule) detektiert. Es gibt Hinweise, dass diese „farblosen Algen“ ihre UPOs mehrfach über horizontalen Gentransfer von phytopathogenen Ascomyceten erhalten haben [4, 12]. Als weiteren phylogenetischen Trend haben wir festgestellt, dass bestimmte Hefen und Hefe-ähnliche Pilze innerhalb der Ascomycota und Basidiomycota keine UPO-Gene aufweisen (Saccharomycotina, Schizosaccharomycetes, *Malassezia* spp.).

Phylogenetisch lassen sich die UPO-Sequenzen in zwei Familien unterteilen. Familie I, die „kurzen“ UPO-Sequenzen, umfasst Vertreter aller oben genannten UPO-positiven Pilzgruppen. Familie II beherbergt die „langen“ UPOs, deren Vorkommen auf die Ascomycota und Basidiomycota beschränkt ist (Abb. 3). Einige distinkte basale Untergruppen in der Familie I enthalten UPO-Sequenzen ohne erkennbare Signalpeptide, weshalb es plausibel erscheint, dass es sich beim UPO-Archetyp um ein ähnliches intrazelluläres Enzym gehandelt hatte. Dies betrifft insgesamt ca. ein Viertel der analysierten UPO-Sequenzen (Abb. 3). Ob diese Enzyme frei im Cytosol arbeiten oder aber in speziellen Hyphenkompartimenten wirksam werden, ist unklar. Da UPOs ausschließlich im Pilzreich, einschließlich der basalen Cryptomycota, zu finden sind und bisher keine Hinweise auf ihre Präsenz in den Holozoa gefunden wurden, kann postuliert werden, dass sie bereits vor über 600 Millionen Jahren, nach der Trennung von Pilzen und Tieren, entstanden sind. Möglicherweise haben dabei die drastischen Bedingungen der sich entwickelnden Sauerstoffatmosphäre, ähnlich wie im Fall der P450-Enzyme, eine evolutive Rolle gespielt. Ob UPOs und P450s einen gemeinsamen Ursprung haben, ist noch ungeklärt. Obzwar beide Enzymtypen strukturelle und katalytische Gemeinsamkeiten aufweisen (Cystein als proximaler



▲ **Abb. 3:** Phylogenetischer Baum der UPO-Sequenzen auf Grundlage genetischer Distanzen (Jukes-Cantor). Die abgeleitete Phylogenie basiert auf den in der NCBI-Datenbank und in JGI MycoCosm frei verfügbaren, putativen 2.077 UPO-Sequenzen, darunter 1.250 Sequenzen aus den Ascomycota, 716 aus den Basidiomycota und 112 aus den übrigen Gruppen pilzlicher und pilzähnlicher Organismen [12]. Die Sequenzen zerfallen in zwei Familien: die „langen“ UPOs (oben) und die kurzen UPOs (unten). Biochemisch charakterisierte UPO-Enzyme sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Die gelb unterlegten Kreissektoren markieren UPOs ohne Signalsequenzen. Grün: Basidiomycota, rot: Ascomycota, pink: Mucoromycotina, blau: Oomycota; CPO: Chlorperoxidase; UPO: unspezifische Peroxygenase.

Häm-Ligand, *Compound-0, -I, -II*), besteht auf Sequenzebene keinerlei Homologie.

Ausblick

Trotz ihrer hohen Relevanz für enzymtechnologische Anwendungen sind bisher nur wenige UPOs verfügbar und nahezu nichts ist über ihre physiologische Bedeutung bekannt. Berücksichtigt man die weite Verbreitung im Pilzreich, ihre hohe Zahl in den Genomen mancher Pilze und ihre Vielseitigkeit bezüglich der katalysierten Reaktionen, sind unterschiedliche Funktionen denkbar. An erster Stelle wären sicherlich Entgiftungsreaktionen zu nennen, da UPOs Strukturen angreifen, die häufig in pflanzlichen und mikrobiellen Sekundärmetaboliten sowie Umweltschadstoffen vorkommen [9, 12]. In Anbetracht der hohen Diversität der UPO-Gene sollte auch eine Beteiligung am Pathogenitätsgeschehen oder an der Lignin-

und Humustransformation nicht ausgeschlossen werden. Für Letzteres wäre eine molekulare Architektur notwendig, die es über möglichst breite und flache Häm-Zugangskanäle erlaubt, aromatische Polymerstrukturen oberflächlich anzugreifen. In diesem Zusammenhang sei darauf verwiesen, dass die erst vor wenigen Jahren entdeckten, kristalline Cellulose spaltenden LPMOs (*lytic polysaccharide monoxygenases*) jüngsten Publikationen zufolge ebenfalls oberflächenwirksame, extrazelluläre Peroxygenasen sind (wenn auch auf Basis einer kupferabhängigen Katalyse) [13].

Moderne molekulare Techniken, wie die Genomeditierung mittels CRISPR-Cas, könnten helfen, die Frage nach der Funktion der UPOs zu beantworten. Hierzu müssten UPO-Knock-out-Mutanten geeigneter Modellorganismen erzeugt und anschließend physiologisch getestet werden. Auch molekulare und

enzymatische Feldstudien (z. B. im Kontext der Biodiversitäts-Exploratorien, DFG SPP-1374) könnten dazu beitragen, die Funktionen der UPOs zu klären (etwa in ähnlicher Weise, wie es kürzlich im Fall der Manganperoxidasen gelungen ist [14]). Um die Herstellung rekombinanter UPOs zu forcieren, böte sich – neben der Weiterentwicklung mikrobieller Expressionssysteme (Hefen, Schimmelpilze, Bakterien) – die zellfreie Expression mit isolierten Ribosomen als innovativer Ansatz an [15].

Danksagung

Die Autoren danken für die finanzielle Unterstützung durch die DFG (SPP 1374-BELong-Dead, PeroxiDiv5, INST 263/88-1 LAGG), die AiF (PeroxyMEER), das BMBF (CEFOX, Vnm-Div) und durch das Ministerium für Wirtschaft, Forschung und Kultur des Landes Brandenburg (Fraunhofer Projektgruppe PZ-SYN).

Literatur

- [1] Ullrich R, Nüske J, Scheibner K et al. (2004) Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes. *Appl Environ Microbiol* 70:4575–4581
- [2] Gröbe G, Ullrich R, Pecyna MJ et al. (2011) High-yield production of aromatic peroxxygenase by the agaric fungus *Marasmius rotula*. *AMB Express* 1:31
- [3] Kiebig J, Schmidtke KU, Zimmermann J et al. (2017) A peroxxygenase from *Chaetomium globosum* catalyzes the selective oxygenation of testosterone. *ChemBiochem* 18:563–569
- [4] Hofrichter M, Kellner H, Pecyna M et al. (2015) Fungal unspecific peroxxygenases: heme-thiolate proteins that com-

- bine peroxidase and cytochrome P450 properties. *Adv Exp Med Biol* 851:341–368
- [5] Piontek K, Strittmatter E, Ullrich R (2013) Structural basis of substrate conversion in a new aromatic peroxxygenase: cytochrome P450 functionality with benefits. *J Biol Chem* 288:34767–34776
 - [6] Ullrich R, Poraj-Kobielska M, Scholze S (2018) Side chain removal from corticosteroids by unspecific peroxxygenase. *J Inorg Biochem* 183:84–93
 - [7] Hofrichter M, Ullrich R (2014) Oxidations catalyzed by fungal peroxxygenases. *Curr Opin Chem Biol* 19:116–125
 - [8] Poraj-Kobielska M, Kinne M, Ullrich R et al. (2013) Preparation of human drug metabolites using fungal peroxxygenases. *Biochem Pharmacol* 82:789–796
 - [9] Kiebig J, Hofrichter M, Zuhse R et al. (2019) Oxyfunctionalization of pharmaceuticals by fungal peroxxygenases. In: Grunwald P (Hrsg) *Pharmaceutical Biocatalysis – Chemoenzymatic Synthesis of Active Pharmaceutical Ingredients*. Jenny Stanford Publishing, Singapur
 - [10] Karich A, Ullrich R, Scheibner K et al. (2017) Fungal unspecific peroxxygenases oxidize the majority of organic EPA priority pollutants. *Front Microbiol* 8:1463
 - [11] Wang X, Ullrich R, Hofrichter M et al. (2015) Heme-thiolate ferriyl of aromatic peroxxygenase is basic and reactive. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:3686–3691
 - [12] Hofrichter M, Kellner H, Herzog R et al. (2019) Fungal peroxxygenases: a phylogenetically old superfamily of heme enzymes with promiscuity for oxygen transfer reactions. In: Nevalainen H (Hrsg) *Grand Challenges in Fungal Biotechnology*. Springer International Publishing, Basel
 - [13] Forsberg Z, Sørlie M, Petrović D et al. (2019) Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monoxyperoxxygenases. *Curr Opin Struct Biol* 59:54–64
 - [14] Leonhardt S, Hoppe B, Stengel E et al. (2019) Molecular fungal community and its decomposition activity in sapwood and heartwood of 13 temperate European tree species. *PLoS One* 14:e0212120
 - [15] Thoring L, Zemella A, Kubick S (2019) Accelerating the production of druggable targets: eukaryotic cell-free systems come into focus. *Methods Protoc* 2, doi: 10.3390/mps2020030

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel

enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Katrin Scheibner und Martin Hofrichter

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Katrin Scheibner
Dr. Jan Kiebig
BTU Cottbus-Senftenberg, Fakultät 2
Institut für Biotechnologie
Universitätsplatz 1
D-01968 Senftenberg
katrin.scheibner@b-tu.de
jan.kiebig@b-tu.de

Prof. Dr. Martin Hofrichter
Dr. René Ullrich
Dr. Harald Kellner
Internationales Hochschulinstitut Zittau
Technische Universität Dresden
Markt 23
D-02763 Zittau
martin.hofrichter@tu-dresden.de
rene.ullrich@tu-dresden.de
harald.kellner@tu-dresden.de