

## Enzymkatalyse

## Regioselektive Oxidative Phenolkupplung durch eine Unspezifische Peroxygenase aus Ständerpilzen

Lukas Platz, Nikolai A. Löhr, Max P. Girkens, Frederic Eisen, Konstantin Braun,  
Nico Fessner, Christian Bär, Wolfgang Hüttel, Dirk Hoffmeister, und Michael Müller\*

Professor Dr. Wolfgang Steglich gewidmet

**Abstract:** Bioaktive dimere (Prä-)Anthrachinone sind in der Natur allgegenwärtig und kommen in Bakterien, Pilzen, Insekten und Pflanzen vor. Ihre Biosynthese durch oxidative Phenolkupplung (OPC) wird durch Cytochrom P450-Enzyme, Peroxidasen oder Laccasen katalysiert. Während die Biokatalyse der OPC in Schimmelpilzen (Ascomycota) bekannt ist, sind die entsprechenden Enzyme in Ständerpilzen (Basidiomycota) noch unbekannt. Hier stellen wir die Biosynthese der Atropisomere Phlegmacin A<sub>1</sub> und B<sub>1</sub> aus dem Pilz *Cortinarius odorifer* vor. Die Biosynthese des unsymmetrisch 7,10'-homogekuppelten Dihydroanthracenons wurde im Schimmelpilz *Aspergillus niger* heterolog rekonstruiert. Die Methylierung des Monomers Atrochryson zum 6-O-Methylether Torosachryson durch die O-Methyltransferase CoOMT1 geht der regioselektiven Homokupplung zu Phlegmacin voraus, welche durch das Enzym CoUPO1 katalysiert wird, die zu den als Unspezifische Peroxygenase (UPO) bezeichneten Enzymen Sequenzhomologie zeigt. Unsere Ergebnisse belegen eine noch unbeschriebene UPO-Reaktion und erweitern damit das biokatalytische Portfolio der OPC über die zuvor bekannten Enzyme hinaus. Die Ergebnisse zeigen, dass Basidiomycota Peroxygenasen nutzen, um Aryle selektiv zu kuppeln, und zwar unabhängig von und konvergent zu jeder anderen Organismengruppe, was die zentrale Rolle der OPC in der Naturstoffchemie unterstreicht.

Die Fähigkeit der Natur, verschiedene Lösungen für ein und dasselbe biokatalytische Problem zu entwickeln, ist faszinierend und erfolgt durch eine Vielfalt von Enzymen

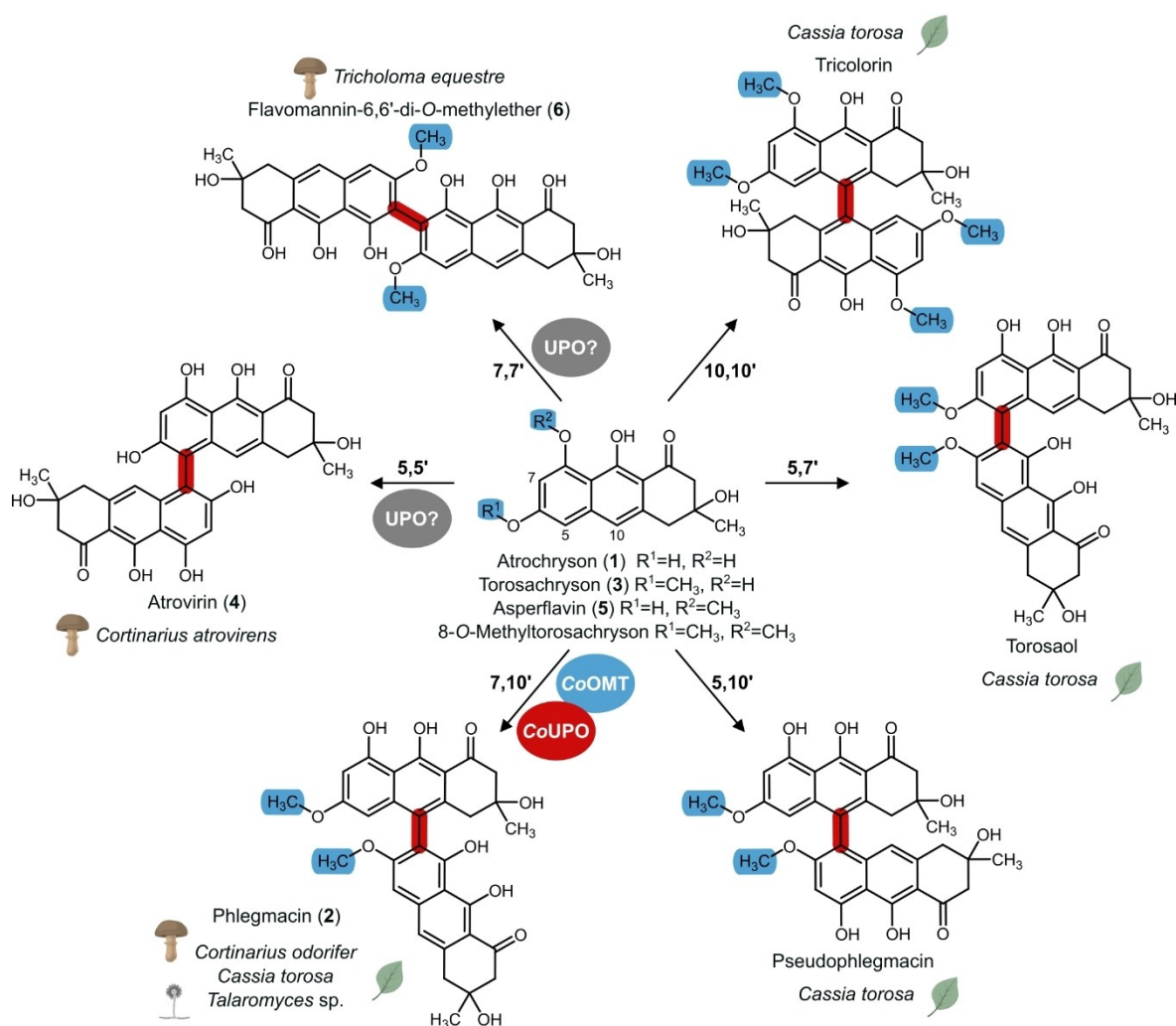
aus mitunter evolutionär nicht verwandten Organismen. So wurde beispielsweise die oxidative Phenolkupplung (OPC), die für die Biosynthese zahlreicher biarylischer Naturstoffe verantwortlich ist, in einer Vielzahl von Arten aller Lebensformen gefunden, z. B. in Bakterien, Pflanzen und Pilzen.<sup>[1]</sup> Die intermolekulare OPC wird von Laccasen, Peroxidasen oder Cytochrom P450 (CYP)-Enzymen katalysiert, welche in allen Reichen des Lebens vorkommen.<sup>[2–5]</sup> Die bislang biochemisch charakterisierten Enzyme aus dem Pilzreich entstammen ausschließlich Pilzen der Abteilung Ascomycota.<sup>[1,6]</sup>

Neuere Untersuchungen der enzymatischen OPC geben Aufschluss über die Komplexität dieser Reaktion. Sowohl Laccasen als auch CYP-Enzyme katalysieren die Kupplungsreaktion in verschiedenen Ascomyceten (Schlauchpilzen), z. B. in der Biosynthese von Ustilaginoidin A, Rufoschweinitzin und Sporandol.<sup>[2,7,8]</sup> Weiterhin wurde dies durch den Nachweis von Phlegmacin-8,8'-dimethylether aus dem Ascomyceten *Xylaria euglossa*<sup>[9]</sup> und Phlegmacin aus *Talaromyces* sp. bestätigt.<sup>[5]</sup> Diese und andere Beispiele unterstreichen die Komplexität der Biarylbiosynthese, die sich in der großen Zahl dimerer Produkte widerspiegelt.<sup>[10]</sup> So führt beispielsweise die regio- und stereoselektive OPC des zentralen Präanthrachinons Atrochryson (**1**) zur Bildung von sechs regioisomeren Dimeren (mit unterschiedlichen Modifikationen), die alle in der Natur nachgewiesen wurden (Schema 1). Die beiden Atropisomere Phlegmacin A<sub>1</sub> (**2a**) und B<sub>1</sub> (**2b**) aus dem Pilz *Cortinarius odorifer* (Abbildung 3A) und Phlegmacin A<sub>2</sub> und B<sub>2</sub> aus dem tropischen Strauch *Cassia torosa* (*Senna sophora*) sind unsymmetrische Homodimere.<sup>[11,12]</sup> Diese Verbindungen verfügen über ein bemerkenswert breites Spektrum an biologischen Aktivitäten, z. B. als Fraßschutz,<sup>[13]</sup> Antimalaria-Wirkstoff,<sup>[14]</sup> Antikarzinogen<sup>[15]</sup> und Antibiotikum.<sup>[16]</sup> Überraschenderweise

[\*] L. Platz, M. P. Girkens, Dr. F. Eisen, K. Braun, Dr. N. Fessner, Prof. Dr. M. Müller  
Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
Albertstrasse 25, 79104 Freiburg (Deutschland)  
E-mail: michael.mueller@pharmazie.uni-freiburg.de  
N. A. Löhr, C. Bär, Prof. Dr. D. Hoffmeister  
Department Pharmazeutische Mikrobiologie am Hans-Knöll-Institut  
Friedrich-Schiller-Universität  
Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena (Deutschland)

Dr. W. Hüttel  
Institut für Organische Chemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
Albertstrasse 21, 79104 Freiburg (Deutschland)

© 2024 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.



**Schema 1.** Die oxidative Phenolkupplung von dimeren Präanthrachinonen. Das Monomer Atrochryson (1), seine methylierten Derivate Torosachryson (3), Asperflavin (5) und 8-O-Methyltorosachryson sind symmetrisch oder unsymmetrisch zu zahlreichen dimeren Naturstoffen pilzlichen und pflanzlichen Ursprungs homogegekuppelt, wie Phlegmacin (2), Atrovirin (4), Flavomannin-6,6'-di-O-methylether (6), Tricolorin, Torosaol oder Pseudophlegmacin.

wurden die Basidiomycota (Ständerpilze) hinsichtlich der Aufklärung ihrer Biosynthese vernachlässigt, obwohl sie reiche Produzenten von dimeren Dihydroanthracenonen sind.<sup>[17,18]</sup> Die Gattung *Cortinarius* (Schleierlinge) stellt eine der artenreichsten Pilzgattungen dar, die bisher beschrieben wurden.<sup>[19]</sup>

Der Nachweis von Phlegmacin (2) aus zwei Molekülen Torosachryson (3), Atrovirin (4)<sup>[20]</sup> aus zwei Atrochryson (1)-Einheiten und das kreuzgekuppelte Rufoolivacin<sup>[17]</sup> in der Gattung *Cortinarius* deutet auf Enzyme in diesen Pilzen hin, die die intermolekulare regio- und stereoselektive OPC katalysieren. Vorangegangene Studien zeigten die Bildung von Naturstoffen aus Basidiomyceten durch Enzyme aus Ascomyceten. So wurde beispielsweise das Naphthalen-Derivat Torachryson-8-O-methylether aus *C. rufoolivaceus* durch CYP-Enzyme des Ascomyceten *Xylaria schweinitzii* dimerisiert.<sup>[2]</sup> Ein alternativer Mechanismus, der durch eine Laccase (PhlC) und ein Fasciclin-Protein (PhlB) vermittelt wird, wurde kürzlich in einem Ascomyceten der Gattung

*Talaromyces* nachgewiesen, der dieselbe enzymatische Abfolge für die Bildung von 2 aufweist.<sup>[5]</sup>

Die Enzyme, die die OPC in Basidiomyceten katalysieren, wurden bislang nicht identifiziert. Hier stellen wir anhand der Biosynthese von 2 in *C. odorifer* eine zuvor unbeschriebene, und für Basidiomyceten einzigartige Katalyse vor, die von einer Unspezifischen Peroxygenase (CoUPO1) katalysiert wird.

Pilze codieren Enzyme einer bestimmten Biosynthese typischerweise zusammenhängend in biosynthetischen Genclustern (BGC).<sup>[21]</sup> Die Gene der zuvor charakterisierten Polyketidsynthasen (PKS) *copks1* und *copks4*<sup>[22,23]</sup> dienen als Ausgangspunkte für Genomanalysen von *C. odorifer*. So wurden die flankierenden Genombereiche von *copks1* und *copks4* nach Genen untersucht, die für O-Methyltransferasen (OMT) und Laccasen bzw. CYP-Enzymen codieren, und putativ mit der Biosynthese von 2 assoziiert sind. Es wurde ein BGC nachgewiesen, das sich über 24 kb DNA erstreckt, welches *copks1* mit einem OMT-Gen (*coomt1*) verbindet

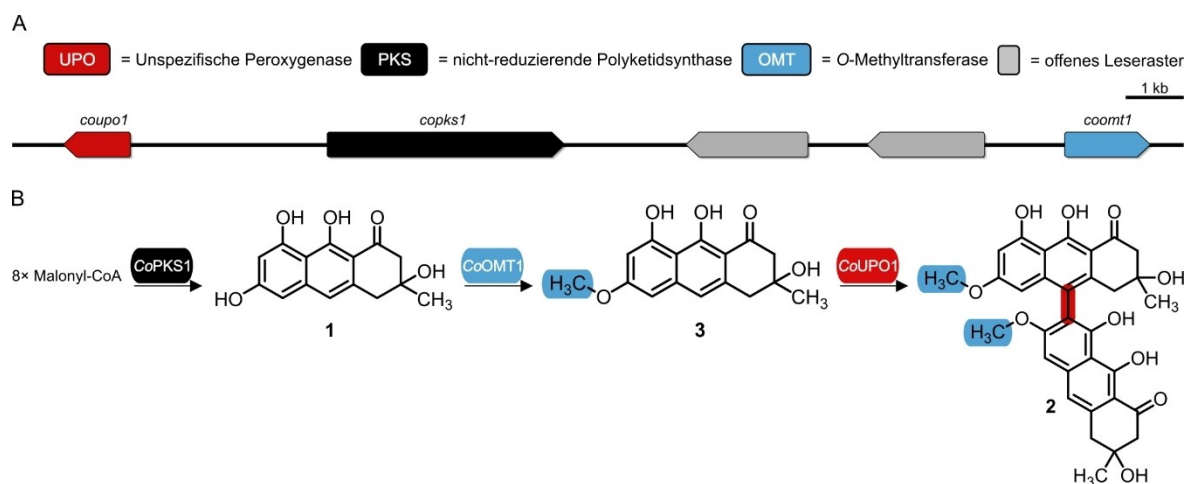
und unerwarteterweise ein Gen enthält, das für eine Unspezifische Peroxygenase (*coupo1*) codiert. Zusätzliche phylogenetische Analysen dieser Aminosäuresequenzen deuten auf eine enge evolutionäre Verwandtschaft von UPOs sowie OMTs zu weiteren Enzymen hin, die putativ an anderen biarylischen Naturstoffen in Basidiomyceten beteiligt sind, z.B. in *Tricholoma flavovirens* und anderen Cortinarien (Abbildungen S1 und S2). Bislang wurden in BGCs noch keine Gene für UPOs identifiziert, welche die Bildung eines Naturstoffes katalysieren (Abbildung 1).<sup>[24]</sup>

UPOs sind Oxidoreduktasen und gelten als attraktive biokatalytische Alternative zu CYP-Enzymen. Sie folgen dem Peroxy-Shunt-Weg über Zwei-Elektronenübertragung, um insbesondere Hydroxylierungsreaktionen zu katalysieren. UPOs können auch Oxidationen durch Ein-Elektronenübertragung an aromatischen Systemen katalysieren, was zur Oligomerisierung des Substrats durch C–C-Bindungsbildung führt.<sup>[25,26]</sup> Die Aminosäuresequenz von *CoUPO1* weist ein konserviertes Häm-Bindungsmotiv (PCP), eine Magnesium-Bindungsdomäne (EGD) und ein ladungs-stabilisierendes Arginin auf, das strukturell an Glutamat oder Aspartat angrenzt (R-x<sub>6</sub>-[ED]), welche als Säure-Base-Katalysator bei der Peroxidspaltung wirkt.<sup>[26]</sup> Entsprechende Motive finden sich in allen Mitgliedern der UPO-Familie (EC 1.11.2.1) und in ähnlicher Weise in Chloroperoxidasen und CYP-Enzymen, was sie als Häm-Thiolat-Enzyme klassifiziert (Abbildung S3).<sup>[27]</sup> Die Annahme, dass *CoUPO1* möglicherweise die OPC zur Biosynthese von Biarylverbindungen katalysiert, veranlasste uns, dieses BGC als wahrscheinlichen Kandidaten für die Biosynthese von **2** zu betrachten.

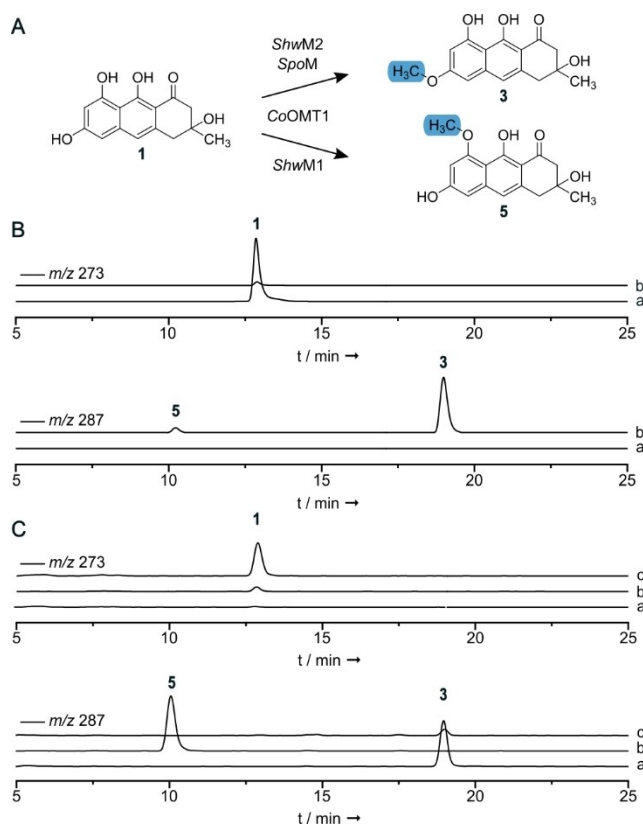
*C. odorifer* produziert Phlegmacin (**2**), Anhydrophlegmacin<sup>[11,28]</sup> und Rufoolivacin,<sup>[17]</sup> aber im Gegensatz zu *C. atrovirens*, dem Produzenten von Atrovirin (**4**), konnte kein nicht-methyliertes Dimer nachgewiesen werden. Daher gingen wir davon aus, dass die Methylierung von **1** eine Voraussetzung für die enzymatische Dimerisierung ist, wie zuvor mit Fütterungsexperimenten in den Pilzen *C. odorifer*

und *C. sinapicolor* nachgewiesen wurde.<sup>[18,28]</sup> Entsprechend wurde die Aktivität der OMT *CoOMT1*, die neben *CoPKS1* codiert wird, untersucht.

*CoOMT1* wurde heterolog in *E. coli* produziert und die Zellen wurden mit **1** versetzt. Die Tests wurden mittels HPLC-MS analysiert und belegten die Umsetzung von **1** und die Bildung von zwei Produkten mit identischer Masse (*m/z* 287), aber unterschiedlichen Retentionszeiten von *t<sub>R</sub>* = 10,22 min und *t<sub>R</sub>* = 18,98 min (Abbildung 2B). Wir vermuteten, dass die Methylgruppe auf zwei verschiedene Positionen (6-*O* bzw. 8-*O* von **1**) übertragen wurde, wodurch **3** und Asperflavin (**5**) gebildet wurden. Die Dimere **2a** und **2b** in *C. odorifer* sind an C-3 und C-3' (*R*)-konfiguriert und unterscheiden sich nur durch ihre absolute Konfiguration an der chiralen Achse.<sup>[11,12]</sup> Um die stereoselektive Kontrolle von *CoOMT1* für die C-3-Position der Monomere **3** und **5** zu untersuchen, wurden beide mittels chiraler HPLC getrennt. Dabei wurde festgestellt, dass **3** und **5** als Racemate anfallen. *CoOMT1* akzeptiert demnach beide Enantiomere von **1** und ist bei der Methylierung nicht stereoselektiv (Abbildung S4). Aufgrund der fehlenden Regioselektivität von *CoOMT1* sowie der insgesamt geringen Umsetzung von **1** (4,2 ± 0,4 %) haben wir andere OMTs aus Pilzen (ShwM1, ShwM2 und SpoM) untersucht, um die regioselektive Umsetzung von **1** zu testen und den Vorläufer von **2** zu generieren (Abbildung 2C). Diese OMTs konnten zuvor mit der regioselektiven Methylierung von Naphthalenen, wie z.B. 6-Hydroxymusizin in der Biosynthese von Rufoschweinitzin in *X. schweinitzii* und Sporandol in *Chrysosporium merdarium* assoziiert werden, wodurch die jeweiligen methylierten Produkte indirekt bestätigt wurden (Abbildung 2A).<sup>[2,8]</sup> Die selektive 8-*O*-Methylierung von **1** durch ShwM1 ergab **5** (Abbildung 2C, Spur b, *t<sub>R</sub>* = 10,22 min), während die Produkte von SpoM und ShwM2 der Retentionszeit von 6-*O*-methyliertem **3**, dem erwarteten nativen Substrat von *CoUPO1*, entsprachen (Abbildung 2C, Spur a und c, *t<sub>R</sub>* = 18,98 min).



**Abbildung 1.** Biosynthese des dimeren Präanthrachinons Phlegmacin (**2**). A) Das Gencluster für die Biosynthese des Phlegmacin-Typs in *Cortinarius odorifer*. B) Enzymatische Abfolge der Biosynthese von **2**, einschließlich einer nicht-reduzierenden Polyketidsynthase (CoPKS1), einer O-Methyltransferase (CoOMT1) und einer Unspezifischen Peroxygenase (CoUPO1). Hypothetische Gene mit unbekannter Funktion sind in grau dargestellt.



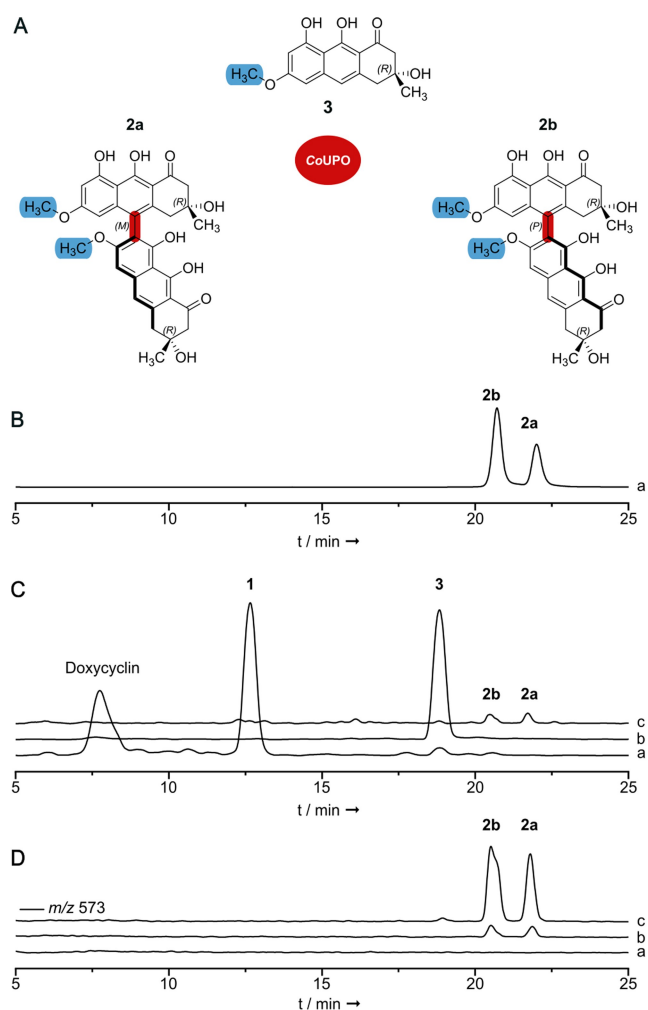
**Abbildung 2.** HPLC-Analyse der *in vivo*-Aktivitätsuntersuchungen der OMTs ShwM1, ShwM2, SpoM und CoOMT1. Die Extrakte wurden mittels HPLC-MS  $[M-H]^-$  analysiert. Die Signale des Substrats **1** ( $m/z$  273) und der Produkte **3** und **5** ( $m/z$  287) sind in den Chromatogrammen der extrahierten Ionen dargestellt. A) Methylierung von **1** durch pilzliche OMTs an Position 6-O oder 8-O zur Bildung der Produkte **3** bzw. **5**. B) Spur a: Extrakt des Assays mit *E. coli* pET28a ohne Insert (Negativkontrolle); b: *E. coli* pET28a::coomt1. C) Spur a: Extrakt des Assays mit *E. coli* pET19b::spoM; b: *E. coli* pET19b::shwM1; c: *E. coli* pET19b::shwM2.

Der Vergleich mit einer authentischen Referenz von **3**, produziert vom *A. niger*-Stamm tNAL015, der für CoPKS4 und die OMT SpoM codiert, diente zur Identifizierung des zweiten Signals als **3**. Dies wurde mittels Analyse durch NMR-Spektroskopie bestätigt (Tabelle S1, Abbildungen S5–S9). Somit wurde gezeigt, dass CoOMT1 **1** sowohl an der 6-O- als auch an der 8-O-Position methylieren kann.

Aufgrund der hohen Umsetzung von **1** (> 98 %) und der Regioselektivität wählten wir SpoM zur Produktion von **3**, und testeten, ob die Dimerisierung von **3** zu **2** durch CoUPO1 katalysiert wird. Dazu wurde CoUPO1 in *A. niger* ATNT16ΔpyrGx24 durch genomische Integration der cDNA und unter der Kontrolle eines Doxycyclin-induzierbaren Promotors heterolog produziert.<sup>[29]</sup> Um zu untersuchen, ob die Biosynthese von **2** heterolog rekonstruiert werden kann, wurden CoUPO1, CoPKS4 und SpoM in *A. niger* (tLP001) co-exprimiert. Während CoPKS1 ausschließlich **1** produziert, erzeugt die duale Hepta- und Octaketidsynthase CoPKS4<sup>[23]</sup> sowohl ein Naphthalen- als auch ein Präanthrachinon-Produkt, was eine Kreuzkupplung

zur Bildung anderer *C. odorifer* Metabolite, z. B. Rufooliva-  
cin, ermöglicht.<sup>[11]</sup>

Konidien der *A. niger* tLP001-Transformanten wurden zur Inokulation von Expressionskulturen für die Extraktion von Metaboliten oder für *in vivo*-Tests verwendet. In einem Ganzzellkatalyse-Ansatz wurde das Pilzmyzel 48 Stunden lang nach Doxycyclin-induzierter Transgen-Expression kultiviert und der Extrakt mittels HPLC-MS analysiert. Es wurde die Bildung von **1**, die regioselektive Methylierung zu **3** und schließlich die Dimerisierung zu **2** nachgewiesen. Bemerkenswerterweise wurden nur zwei Signale, **2a** und **2b**, detektiert, die in den Kontrollen fehlten (Abbildung 3C). Beide Verbindungen wiesen  $m/z$ -Verhältnisse auf, die mit den erwarteten Dimeren übereinstimmen ( $m/z$  573). Die Retentionszeit stimmte zudem mit dem authentischen Stan-



**Abbildung 3.** HPLC-MS  $[M-H]^-$  extrahierte Ionenchromatogramme der heterolog rekonstruierten Biosynthese von **2**. A) Dimerisierung von **3** zu den Atropisomeren **2a** und **2b**. B) Spur a: EIC ( $m/z$  573) von **2a** und **2b**, isoliert aus *Cortinarius odorifer*. C) Spur a: EIC ( $m/z$  273) von CoPKS4 Produkt **1**; b: EIC ( $m/z$  287), SpoM Produkt **3**; Spur c: EIC ( $m/z$  573) der CoUPO1-Produkte **2a** und **2b**. D) Assay von **3**, mit Myzel und zellfreiem Lysat von *A. niger* tLP002. Spur a: *A. niger*-Wirt, transformiert mit dem Vektor ohne Insert; b: *A. niger* tLP002 zellfreies Lysat, supplementiert mit **3**; c: *A. niger* tLP002-Myzel, versetzt mit **3**.



dard von **2** überein, der zuvor aus Fruchtkörpern von *C. odorifer* extrahiert wurde. Daher wurde die Vermutung geprüft, dass CoUPO1 die entsprechende Phenolkupplung katalysiert hatte. Zu diesem Zweck isolierten wir mithilfe etablierter Methoden das Homodimer **2** in den atropoisomeren Formen **2a** und **2b** aus *C. odorifer*.<sup>[30]</sup> Nach der Trennung durch präparative HPLC und der anschließenden Analyse durch NMR-Spektroskopie und Circular dichroismus (Tabellen S2–S3, Abbildungen S10–S19) wurde die Identität von **2a** und **2b** bestätigt, wobei Phlegmacin B<sub>1</sub> der erste und Phlegmacin A<sub>1</sub> der zweite Eluent war.<sup>[11]</sup> Dieses Ergebnis lieferte den experimentellen Beweis, dass CoUPO1 tatsächlich das Enzym ist, welches die OPC im Pilz *C. odorifer* katalysiert.

Als unabhängigen Beweis dafür, dass CoUPO1 die regioselektive OPC katalysiert, isolierten wir **3** aus dem Überstand von *A. niger* tNAL015 und bestätigten die Identität der Verbindung durch NMR-Spektroskopie (Tabelle S1, Abbildungen S5–S9). Anschließend wurde **3** als Substrat dem *A. niger*-Stamm tLP002 zugeführt, der *coupo1* als einzelnes Transgen exprimiert (Abbildung 3D). Sowohl im Myzel als auch im zellfreien Lysat von *A. niger* tLP002 konnten **2a** und **2b** nachgewiesen werden, wobei die Umsetzung von **3** zu **2** im Myzel stärker ausgeprägt war als im Lysat. Die Isolierung von **2** aus den Fruchtkörpern von *C. odorifer* ergab ein Verhältnis von 2:1 für **2b/2a**, das in *in vivo*- und *in vitro*-Tests mit dem heterologen Wirt nicht exakt reproduziert wurde (Abbildung 3, Teilabbildungen B und D). Daher könnte die atropselektive OPC durch Faktoren wie die Enzymkonzentration, Lösungsmittel oder dirigierende Proteine kontrolliert werden, ähnlich wie dies bei Laccasen nachgewiesen wurde.<sup>[7]</sup> Kein anderes der fünf weiteren Regioisomere (Schema 1) konnte detektiert werden, was auf eine ausgeprägte Regioselektivität hindeutet, die in ähnlicher Weise auch für Laccasen beschrieben wurde.<sup>[4,7,31]</sup> Dies steht im Gegensatz zur Bezeichnung „unspezifisch“ im Namen der Peroxygenase und könnte eine Untergruppe innerhalb der Enzymfamilie begründen, die eine regioselektive Kontrolle der neu gebildeten C–C-Bindung aufweist.

Somit konnten wir das BGC für **2** im Genom von *C. odorifer* identifizieren und die wichtigsten Modifikationen nach der PKS-katalysierten Bildung von **1** durch heterologe Expression und Fütterungsexperimente aufklären. Interessanterweise katalysiert die „unspezifische“ *C. odorifer* Peroxygenase CoUPO1 die regioselektive OPC von **3** zur Bildung von **2a** und **2b**. Dies ist der erste Nachweis eines Enzyms aus Basidiomyceten, welches diese Reaktion katalysiert sowie die Erstbeschreibung einer UPO-katalysierten C–C-Bindungsbildung zur Synthese von Naturstoffen im Allgemeinen.

Diese UPO-katalysierte Reaktion ist bislang präzedenzlos und erweitert das Portfolio von OPC-assoziierten Enzymen, das zuvor bereits Laccasen, Peroxidasen und CYP-Enzymen beinhaltete. Darüber hinaus könnten an der Biosynthese anderer dimerer Dihydroanthracenone wie Atrovirin (**4**) oder Flavomannin-6,6'-di-*O*-methylether (**6**) ebenfalls UPOs beteiligt sein, wie eine erste phylogenetische Analyse nahelegt (Abbildungen S1 und S2).

Die Erkenntnisse aus unserer Arbeit über CoUPO1 haben zwei weitreichende Auswirkungen. Erstens stellt dieses Enzym ein unerforschtes Werkzeug für die biokatalytische (selektive) Synthese chiraler Verbindungen mit biologischen Aktivitäten dar.<sup>[13–16]</sup> Zweitens stützen unsere Ergebnisse das sich abzeichnende Bild einer mehrfachen, unabhängigen und konvergenten Entstehungsgeschichte von Naturstoffen und biosynthetischen Reaktionen innerhalb der Basidiomycota gegenüber den Ascomycota, die zusammen mehr als 60.000 Arten umfassen. Jüngste Erkenntnisse der Naturstoffchemie haben gezeigt, dass diese beiden Pilzabteilungen evolutionär nicht verwandte Enzyme verwenden, um ähnliche Reaktionen zu katalysieren und dieselben Verbindungen zu produzieren. Beispiele hierfür sind i) nicht verwandte Prenyltransferasen für die Bildung von 4-*O*-prenyliertem L-Tyrosin,<sup>[32]</sup> ii) CYP-Monooxygenasen *versus* Enzymen vom Cupin-Typ für die Epoxycyclohexanon-Biosynthese,<sup>[33]</sup> und iii) nicht verwandte PKS für die Bildung von Atrovichryson (**1**) oder Orsellinsäure.<sup>[34]</sup> Unsere Arbeit unterstreicht diese Idee, da sie eine Reaktion zur Induktion axialer Chiralität in Naturstoffe einführt. Zunehmendes Verständnis der konvergenten Metaevolution von Verbindungen und Reaktionen kann dazu beitragen, den biologischen Druck zu identifizieren, der diese Verbindungen für die Produzenten vorteilhaft gemacht hat, oder um sich der grundlegenden Frage zu nähern, warum sich bestimmte Naturstoffe und deren Biosynthesemaschinerie entwickelt haben.

## Hintergrundinformationen

Die Autoren haben weitere Referenzen in der Hintergrundinformationen angegeben.

## Danksagung

Der *Aspergillus niger*-Stamm ATNT16ΔpyrGx24 und das Plasmid phis\_SM-Xpress wurden freundlicherweise von Prof. Matthias Brock (Universität Nottingham, UK) zur Verfügung gestellt. Die Autoren danken Adrian Neumann (Friedrich-Schiller-Universität Jena) für die Unterstützung bei der Klonierung und Charakterisierung der Methyltransferase-Gene und Sascha Ferlino (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) für die NMR-Analyse. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, Projekt HO2515/8-1 an D.H. und DFG RTG 1976 an M.M.) unterstützt. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

## Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

## Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind auf begründete Anfrage beim Autor erhältlich.

**Stichwörter:** Atropisomerie • Biosynthese • Dimerisierung • Stereoselektivität • C–C Kupplung

- [1] W. Hüttel, M. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, 38, 1011–1043.
- [2] W. Thiele, R. Froede, W. Steglich, M. Müller, *ChemBioChem* **2020**, 21, 1423–1427.
- [3] a) A. Präg, B. A. Grüning, M. Häckh, S. Lüdeke, M. Wilde, A. Luzhetsky, M. Richter, M. Luzhetska, S. Günther, M. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 6195–6198; b) C. R. Benedict, J. Liu, R. D. Stipanovic, *Phytochemistry* **2006**, 67, 356–361; c) L. B. Davin, D. L. Bedgar, T. Katayama, N. G. Lewis, *Phytochemistry* **1992**, 31, 3869–3874; d) L. E. Zetzsche, A. R. H. Narayan, *Nat. Chem. Rev.* **2020**, 4, 334–346.
- [4] L. Fürtges, S. Obermaier, W. Thiele, S. Foegen, M. Müller, *ChemBioChem* **2019**, 20, 1928–1932.
- [5] Q. Zhao, Z. Zhuang, T. Liu, Q. Yang, Q.-L. He, W. Liu, G.-Q. Lin, *ACS Chem. Biol.* **2022**, 17, 791–796.
- [6] H. Aldemir, R. Richarz, T. A. M. Gulder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 8286–8293.
- [7] S. Obermaier, W. Thiele, L. Fürtges, M. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 9125–9128.
- [8] W. Thiele, S. Obermaier, M. Müller, *ACS Chem. Biol.* **2020**, 15, 844–848.
- [9] X.-N. Wang, R.-X. Tan, F. Wang, W. Steglich, J.-K. Liu, *Z. Naturforsch. B* **2005**, 60, 333–336.
- [10] G. Bringmann, C. Günther, M. Ochse, O. Schupp, S. Tasler, W. Herz, H. Falk, G. W. Kirby, R. E. Moore, *Biaryls in nature: a multi-faceted class of stereochemically, biosynthetically, and pharmacologically intriguing secondary metabolites*, Springer, Vienna **2001**.
- [11] W. Steglich, E. Töpfer-Petersen, *Z. Naturforsch.* **1972**, 27, 1286–1287.
- [12] S. Takahashi, S. Kitanaka, M. Takido, U. Sankawa, S. Shibata, *Phytochemistry* **1977**, 16, 999–1002.
- [13] L. Chen, T. Liu, Y. Duan, X. Lu, Q. Yang, *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65, 3851–3857.
- [14] M. Gill, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 615–639.
- [15] K. D. Beattie, D. R. Thompson, E. Tiralongo, D. Ratkowsky, T. W. May, M. Gill, *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 5448–5451.
- [16] R. Bara, I. Zerfass, A. H. Aly, H. Goldbach-Gecke, V. Raghavan, P. Sass, A. Mándi, V. Wray, P. L. Polavarapu, A. Pretsch, et al., *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 3257–3272.
- [17] M. Gill, W. Steglich, *Pigments of fungi (Macromycetes)*, Springer, Vienna **1987**.
- [18] C. Elsworth, M. Gill, A. Giménez, N. M. Milanovic, E. Raudies, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1999**, 119–126.
- [19] S. Garnica, M. Weiß, B. Oertel, F. Oberwinkler, *Can. J. Bot.* **2005**, 83, 1457–1477.
- [20] A. Antonowitz, M. Gill, P. M. Morgan, J. Yu, *Phytochemistry* **1994**, 37, 1679–1683.
- [21] M. Gressler, N. A. Löhr, T. Schäfer, S. Lawrinowitz, P. S. Seibold, D. Hoffmeister, *Nat. Prod. Rep.* **2021**, 38, 702–722.
- [22] a) N. A. Löhr, F. Eisen, W. Thiele, L. Platz, J. Motter, W. Hüttel, M. Gressler, M. Müller, D. Hoffmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, 134, e202116142; b) N. A. Löhr, M. Rakhmanov, J. M. Wurlitzer, G. Lackner, M. Gressler, D. Hoffmeister, *Fungal Biol. Biotechnol.* **2023**, 10, 17.
- [23] N. A. Löhr, M. C. Urban, F. Eisen, L. Platz, W. Hüttel, M. Gressler, M. Müller, D. Hoffmeister, *ChemBioChem* **2023**, 24, e202200649.
- [24] L. Fürtges, *Dissertation*, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg (Germany) **2018**.
- [25] P. Molina-Espeja, E. Garcia-Ruiz, D. Gonzalez-Perez, R. Ullrich, M. Hofrichter, M. Alcalde, *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, 80, 3496–3507.
- [26] M. Hofrichter, R. Ullrich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 19, 116–125.
- [27] M. Ramirez-Escudero, P. Molina-Espeja, P. Gomez de Santos, M. Hofrichter, J. Sanz-Aparicio, M. Alcalde, *ACS Chem. Biol.* **2018**, 13, 3259–3268.
- [28] M. Müller, K. Lamottke, W. Steglich, S. Busemann, M. Reichert, G. Bringmann, P. Spiteller, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4850–4855.
- [29] a) E. Geib, M. Brock, *Fungal Biol. Biotechnol.* **2017**, 4, 13; b) M. Gressler, P. Hortschansky, E. Geib, M. Brock, *Front. Microbiol.* **2015**, 6, 184.
- [30] M. Müller, *Dissertation*, Ludwigs-Maximilians-Universität, München (Germany) **1995**.
- [31] M. Kawaguchi, T. Ohshiro, M. Toyoda, S. Ohte, J. Inokoshi, I. Fujii, H. Tomoda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 5115–5119.
- [32] T. Schäfer, F. Haun, M. Gressler, P. Spiteller, D. Hoffmeister, *J. Nat. Prod.* **2024**, 87, 576–582.
- [33] Y.-L. Yang, M. Zhou, L. Yang, M. Gressler, J. Rassbach, J. M. Wurlitzer, Y. Zeng, K. Gao, D. Hoffmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, 62, e202313817.
- [34] a) K. Ishiuchi, T. Nakazawa, T. Ookuma, S. Sugimoto, M. Sato, Y. Tsunematsu, N. Ishikawa, H. Noguchi, K. Hotta, H. Moriya, K. Watanabe, *ChemBioChem* **2012**, 13, 846–854; b) G. Lackner, M. Bohnert, J. Wick, D. Hoffmeister, *Chem. Biol.* **2013**, 20, 1101–1106; c) G. Lackner, M. Misiek, J. Braesel, D. Hoffmeister, *Fungal Genet. Biol.* **2012**, 49, 996–1003.

Manuskript erhalten: 18. April 2024

Akzeptierte Fassung online: 4. Juli 2024

Endgültige Fassung online: 12. September 2024