

Biosynthese

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, 61, e202116142

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202116142

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202116142

Neuartige Polyketidsynthasen aus Ständerpilzen Produzieren den Universellen Anthrachinon-Vorläufer

Nikolai A. Löhr, Frederic Eisen, Wiebke Thiele, Lukas Platz, Jonas Motter, Wolfgang Hüttel, Markus Gressler, Michael Müller, und Dirk Hoffmeister*

Professor Dr. Wolfgang Steglich gewidmet

Abstract: (Prä-)Anthrachinone sind weit verbreitete Naturstoffe, die in Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen vorkommen und deren biosynthetischer Vorläufer das Atrochryson (**1**) ist. Chemische Analysen zeigten, dass Pilze der Gattung *Cortinarius* – die Schleierlinge – Produzenten von Octaketid-Farbstoffen sind, die sich von **1** ableiten. Neuere genomische Daten lieferten jedoch keine Hinweise auf bekannte Atrochrysonsäure (**4**)-Synthasen oder andere Polyketidsynthasen (PKSs), die oligocyclische Metabolite produzieren. Hier beschreiben wir eine neuartige Klasse von nicht-reduzierenden Polyketidsynthasen (NR-PKS). In vitro-Versuche mit rekombinantem Enzym, verbunden mit Produktbildung in vivo im heterologen Wirt *Aspergillus niger* zeigten, dass CoPKS1 und CoPKS4 aus *C. odorifer* einer neuen Klasse von Atrochrysonsäuresynthasen angehören. CoPKS4 wies sowohl Hepta- als auch Octaketidsynthaseaktivität auf und katalysierte neben **4** auch die Bildung von 6-Hydroxymusizin (**6**). Diese ersten PKSs für oligocyclische Produkte aus Ständerpilzen (Basidiomyceten) illustrieren, wie sich die Biosynthese bioaktiver Naturstoffe in verschiedenen Organismengruppen unabhängig voneinander entwickelte.

haben sowohl Gefäßpflanzen, Pilze und Bakterien sowie einige wirbellose Tiere die metabolische Fähigkeit entwickelt, das Hauptintermediat Atrochryson (**1**, Abbildung 1) herzustellen und zu diversifizieren. Namen für Verbindungen wie Torosachryson (**2**), benannt nach dem tropischen Strauch *Cassia torosa*, oder Phlegmacin (**3**), nach der Pilz-Untergattung *Phlegmacium*, spiegeln die diversen Herkunft wider.^[2] Das chirale Octaketid Atrochrysonsäure (**4**, Abbildung 1), ein 3,4-Dihydroanthracen-1(2*H*)-on, ist das erste tricyclische biosynthetische Intermediat von **1**.

Die Vielfalt dieser tricyclischen, polyfunktionalen Verbindungen ist in den der Polyketidbiosynthese nachfolgenden Modifikationen von **1** begründet. Diese umfassen beispielsweise *O*-Methylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Oxidation, sowie regio- und atropselektive Dimerisierungen durch oxidative Phenolkupplung.^[3]

Das erste pilzliche Gen, das eine Atrochrysonsäuresynthase (AptA) codiert, wurde im Schimmelpilz *Aspergillus nidulans* identifiziert und seine Beteiligung an der Asperthecin-Biosynthese gezeigt.^[4a] Andere Beispiele sind MdpG für die Herstellung von Monodictyphenon, GedC der Geodin-Biosynthese, ClaG für die von Cladofulvin und ACAS, welche in die Biosynthese von Endocrocin (**8**) und Emodin (**9**) involviert ist.^[4b-c] Diese Beispiele zeigen übereinstim-

Einleitung

Anthrachinon- und Präanthrachinon-Polyketide stellen eine der größten Naturstoffklassen dar.^[1] Bemerkenswerterweise

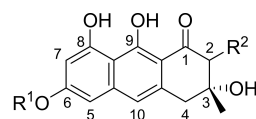
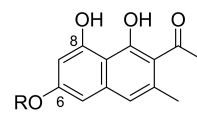
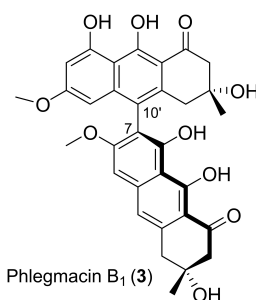
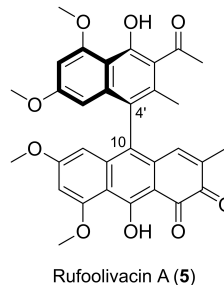
R¹=R²=H: (3*R*)-Atrochryson (**1**)R¹=CH₃, R²=H: (3*R*)-Torosachryson (**2**)R¹=H, R²=COOH: (3*R*)-Atrochrysonsäure (**4**)R=H: 6-Hydroxymusizin (**6**)R=CH₃: Torachryson (**7**)Phlegmacin B₁ (**3**)Rufoolivacin A (**5**)

Abbildung 1. Chemische Strukturen pilzlicher monomerer und dimerer Hepta- und Octaketide.

[*] N. A. Löhr, J. Motter, Dr. M. Gressler, Prof. Dr. D. Hoffmeister
Department Pharmazeutische Mikrobiologie am Hans-Knöll-Institut, Friedrich-Schiller-Universität
Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena (Deutschland)
E-mail: dirk.hoffmeister@leibniz-hki.de

F. Eisen, Dr. W. Thiele, L. Platz, Dr. W. Hüttel, Prof. Dr. M. Müller
Institut für Pharmazie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Albertstrasse 25, 79104 Freiburg (Deutschland)

© 2022 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.

mend, dass pilzliche Atrochrysonsäuresynthasen monomolar-iterative Enzyme sind, die keine eigene Thioesterase

(TE)-Domäne besitzen. Diese katalytische Aktivität wird in *trans* durch eine separat codierte Metallo- β -Lactamase-artige TE erbracht (Abbildung 2A, Abbildung S1).^[4e]

Mit weltweit mehr als 2000 Arten ist die Gattung *Cortinarius* eine der artenreichsten Ständerpilz-Gattungen.^[5] Diese Pilze sind reiche Produzenten von mono- oder dime- ren Dihydroanthracenonen und entsprechenden Anthronen oder Anthrachinonen, die von **1** abgeleitet sind.^[2,6] Es ist bislang jedoch noch ungeklärt, wie Ständerpilze oligocyclische Polyketide biosynthetisieren, obwohl Synthasen für monocyclische aromatische Tetraketide (beispielsweise die Orsellinsäuresynthase ArmB, Abbildung S1) beschrieben wurden.^[7] Angesichts wegweisender Experimente mit Stabilisotopenmarkierungen von *Cortinarius* Präanthrachinonen, die eindeutig ihren polyketidischen Ursprung bewiesen,^[8] lautete unsere Hypothese, dass die Biosynthese von **4** in Ständerpilzen ebenfalls durch AptA/ACAS-artige Synthasen katalysiert würde.

Ergebnisse und Diskussion

Um diese Hypothese zu testen, sequenzierten wir die genomische DNA von *Cortinarius odorifer*, einem nordhemisphärischen symbiotischen Pilz, der **3** und das Hepta-/Octaketid-Dimer Rufoolivacin (**5**) produziert.^[9] Entgegen unserer Hypothese codiert das Genom keine AptA/ACAS-artigen Synthasen. Es wurden jedoch sechs Gene für einen ungewöhnlichen Typus nicht-reduzierender (NR-)PKSs detektiert, die mit CoPKS1–6 bezeichnet wurden. Die vorhergesagten Enzyme sind 1627–1678 Aminosäuren lang (Tabelle 1) und aus kanonischen NR-PKS-Domänen zusammengesetzt: β -Ketoacylsynthase (KS), Acyltransferase (AT), Produkttemplate (PT), und Acyl-Carrier-Protein (ACP), die die typischen Sequenzmotive der aktiven Zentren aufweisen (Abbildungen 2A und S2A).^[10]

Im Gegensatz zu typischen pilzlichen NR-PKSs codieren die Gene in *C. odorifer* keine Startereinheit:ACP-Transacylase (SAT)-Domäne. Die Synthasen enthalten jedoch eine integrierte Domäne für eine TE vom Typ der α/β -Hydrolase-Überfamilie, was sie von AptA/ACAS-artigen Synthasen unterscheidet. Aufbauend auf eine früher publizierte Einteilung pilzlicher PKSs,^[11] zeigte die phylogenetische Einordnung auf Grundlage ihrer KS-Domänen, dass CoPKS1–6 zu einem eigenständigen evolutionären Zweig gehören, der i)

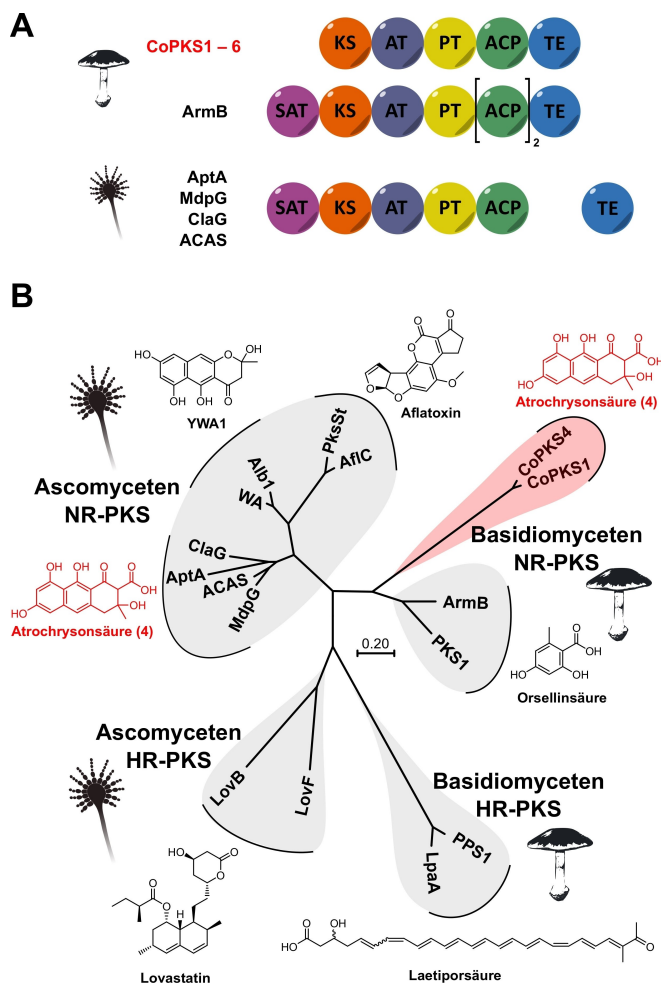


Abbildung 2. A) Vergleich der Domänenanordnung pilzlicher nicht-reduzierender Polyketidsynthasen. Abkürzungen für Domänen: SAT: Startereinheit: ACP-Transacylase; KS: β -Ketoacylsynthase; AT: Acyltransferase; PT: Produkttemplate; ACP: Acyl-Carrier-Protein; TE: Thioesterase. B) Phylogenetischer Stammbaum zur Rekonstruktion der Verwandtschaftsverhältnisse pilzlicher PKSs. Für die PKS-Gruppen sind entsprechende repräsentative Mitglieder dargestellt. Der Balken stellt die unkorrigierte paarweise Distanz dar. Die Astlängen sind proportional zur Zahl der Substitutionen pro Aminosäureposition. Die GenBank-Zugangsnummern und Aminosäuresequenzen sind in den Hintergrundinformationen angegeben.

Tabelle 1: Eigenschaften der *Cortinarius odorifer* SAT-domänenlosen Polyketidsynthasen.

Name	Länge (AS)	Produkt ^[a,b]	Motiv ^[c]	Identität [%] ^[d]	<i>A. niger</i> -Stamm
CoPKS1	1668	1 (R-Überschuß)	7	88.1	tNAL024
CoPKS2	1633	inaktiv	1	76.4	tNAL025
CoPKS3	1637	inaktiv	1	84.3	tNAL026
CoPKS4	1666	1 (S-Überschuß), 6	7	–	tNAL002
CoPKS5	1627	inaktiv	1	82.5	tNAL003
CoPKS6	1678	inaktiv	9	91.8	tNAL004

[a] Experimentell bestätigt durch Produktbildung im heterologen Wirt *Aspergillus niger*. [b] Das eigentliche enzymatische Produkt ist Atrochrysonsäure (**4**). Wegen seiner Instabilität ist die chromatographisch detektierte Verbindung das decarboxylierte Folgeprodukt Atrochryson (**1**). [c] Bezieht sich auf die Zahl eines repetitiven prolinreichen Sequenzmotivs zwischen der ACP- und TE-Domäne. [d] Sequenzidentität bezogen auf CoPKS4.

früh von anderen NR-PKSs aus Ständerpilzen abzweigt und ii) für den noch keine Vertreter existieren, die genetisch oder biochemisch charakterisiert wurden (Abbildung 2B).

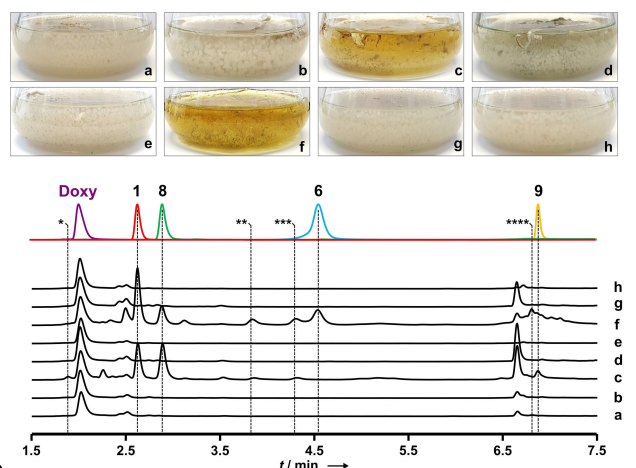
Eine weitere außergewöhnliche Eigenschaft von CoPKS1–6 ist eine wiederholt auftretende prolinreiche Region (9–20 % Prolinreste) zwischen der ACP- und der TE-Domäne, die in einer bis neun Kopien vorliegt (Tabelle 1, Abbildung S2B). Weil *C. odorifer* nur eine weitere NR-PKS codiert, deren phylogenetische Stellung mit den ArmB-artigen Orsellinsäuresynthasen übereinstimmt (Abbildung 2B), betrachteten wir CoPKS1–6 als wahrscheinlichste Kandidaten, um die Biosynthese von **4** zu katalysieren, obwohl ihr evolutiver Ursprung von dem der AptA/ACAS-artigen PKSs abweicht.

Cortinarius-Arten und die meisten anderen fruchtkörperbildenden Pilze sind für genetische Veränderungen und reverse Genetik nicht zugänglich. Daher brachten wir die Gene für CoPKS1–6 einzeln in *A. niger* als heterologen Wirt für nachfolgende Doxycyclin-induzierte Expression ein und nutzten die ATNT-Methode, welche auf dem *A. terreus* Transkriptionsaktivator TerR und seinem Zielpromotor *PterA* basiert.^[12] Für alle *C. odorifer* PKS-Gene wurde gDNA verwendet, um *A. niger* zu transformieren (Tabelle 1, Abbildung S3). Alle PKSs wurden in ihrer nativen Form produziert. Um auf ihre Funktion zu schließen, kultivierten wir die transformierten Aspergilli und analysierten chromatographisch die mit Ethylacetat aus der Kulturbrühe isolierten Stoffwechselprodukte.

Sowohl der untransformierte *A. niger* Ausgangsstamm als auch die Transformante tNAL000, die den insertlosen Expressionsvektor pHIS_SM-Xpress trug, wurden zum Vergleich als Negativkontrollen herangezogen. Die Expression des *C. odorifer copks1*-Gens (*A. niger* tNAL024) führte zu aktivem Enzym, wie aus der LC-MS-Analyse der Kulturüberstände ersichtlich war. Sechs zusätzliche Signale wurden detektiert (Abbildung 3), die bei $t_R = 2.6$ min, $t_R = 2.9$ min, $t_R = 3.9$ min (Signal **), $t_R = 4.4$ min (Signal ***), $t_R = 6.7$ min (Signal ****) und $t_R = 6.9$ min auftraten. Das Hauptsignal bei $t_R = 2.6$ min entspricht einer Masse von m/z 273.0766 [$M-H$][−] und wies daher auf Verbindung **1** hin. Dieser Befund wurde gestützt durch das UV/Vis-Spektrum mit lokalen Maxima bei $\lambda = 226, 272, 320$ und 398 nm (Abbildung S4), was mit Literaturdaten übereinstimmt.^[13] Wir beobachteten auch Spuren einer Verbindung ($t_R = 1.9$ min), deren Masse m/z 317.0667 [$M-H$][−] (Abbildung 3) mit der von **4** übereinstimmte, dem notorisch instabilen direkten Vorläufer von **1**.^[4e] Für den abschließenden Beweis reinigten wir **1** zur Homogenität. Aus insgesamt 15 L Kulturbrühe des Stammes tNAL024 wurden etwa 5 mg Reinsubstanz isoliert und deren Struktur durch ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie als **1** identifiziert (Abbildung 4, Abbildung S5, Tabelle S1).^[13]

Demnach weist CoPKS1 Atrochrysonsäuresynthase-Aktivität auf und stellt, als erster Repräsentant einer zuvor unbeschriebenen evolutionären Klade von NR-PKSs, die erste Octaketid-PKS aus Basidiomyceten dar. Die Identifikation der anderen Metabolite erfolgte durch i) HR-ESIMS (Abbildung 3), ii) UV/Vis-Spektren (Abbildung S4) und iii) LC-MS/MS-Analysen (Abbildung S6, S7). Das Signal bei

A



B

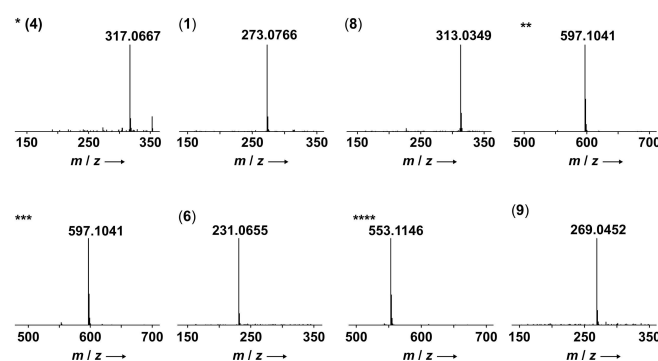


Abbildung 3. In vivo-Aktivitätsassays mit *Cortinarius*-PKSs. A) Flüssigkulturen und Chromatogramme von Ethylacetat-Extrakten von rekombinanten *A. niger*-Stämmen, die PKS-Gene aus *C. odorifer* exprimieren. Die gelbe Färbung mancher Kulturen zeigt Polyketid-Bildung durch rekombinante Stämme an. Die Chromatogramme wurden bei $\lambda = 395$ nm aufgenommen. Die oberste Spur in Teilabbildung A zeigt überlagerte individuelle Chromatogramme für Standards von Doxycyclin (Doxy), Atrochryson (**1**), Endocrocin (**8**), 6-Hydroxymusizin (**6**) und Emodin (**9**). Spur a: Untransformierter *A. niger*-Wirt; b: *A. niger* tNAL000; Spuren c–h: *A. niger*, der jeweils die Gene für CoPKS1 (c, *A. niger* tNAL024), CoPKS2 (d, *A. niger* tNAL025), CoPKS3 (e, *A. niger* tNAL026), CoPKS4 (f, *A. niger* tNAL002), CoPKS5 (g, *A. niger* tNAL003), oder CoPKS6 (h, *A. niger* tNAL004) enthält. B) Repräsentative HR-ESIMS-Spektren (negativer Modus) von Signalen aus der Analyse von *A. niger* tNAL002, dem Produktionsstamm von CoPKS4. Zusätzlich zu den Hauptsignalen (die als Verbindungen **1**, **6**, **8** und **9** identifiziert wurden, und vermutliche Dimere, markiert mit **, *** und ****) wurde das vermutete primäre PKS-Produkt Atrochrysonsäure (**4**) in Spuren nachgewiesen (markiert mit einem Stern). Berechnete Massen ($[M-H]^-$) sind: m/z 317.0667 (**4**), 273.0769 (**1**), 313.0354 (**8**), 597.1039 (**), 597.1039 (***), 231.0663 (**6**), 553.1140 (****) und 269.0456 (**9**).

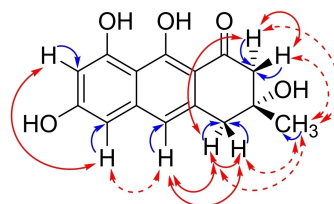


Abbildung 4. Struktur von Atrochryson (**1**). 1H - 1H COSY-Korrelationen sind in roter Farbe dargestellt, HSQC-Korrelationen in blau.

$t_R=2.9$ min wurde als Endocrocin (**8**) identifiziert. Die Signale ** und *** stellen wahrscheinlich isomere Endocrocinanthron-Homodimere dar,^[4c] **** das Heterodimer aus Emodinanthron und Endocrocinanthron,^[4d,e] und das Signal bei $t_R=6.9$ min wurde Emodin (**9**) zugeordnet. Die Identitäten von **8** und **9** wurden durch authentische Standards belegt. Überraschenderweise stimmt dieses Produktspektrum mit dem überein, das zuvor für die in vivo-Aktivität der phylogenetisch nicht verwandten Ascomyceten-PKS ACAS und ClAG gefunden wurden, was zu dem publizierten Modell der Biosynthesevorgänge führte (Schema 1).^[4d,e] Awakawa et al. spekulierten, dass die beobachteten Dimere (dargestellt durch die in Abbildung 3 mit **, *** und **** markierten Signale) durch eine dem Wirt *A. oryzae* intrinsische enzymatische Aktivität gebildet wurden.^[4c] Unsere beobachteten Dimerisierungen mit *A. niger* deuten an, dass Aspergilli im Allgemeinen zu entsprechenden Dimerisierungsreaktionen befähigt sein könnten.

Anschließend untersuchten wir CoPKSs 2–6. Die Expression der Gene für CoPKSs 2, 3, 5 und 6 (*A. niger*-Transformanten tNAL025, 026, 003 bzw. 004) führte im Vergleich zu den Negativkontrollen nicht zu einem veränderten Metabolitprofil (Abbildung 3), obwohl die entsprechenden Gene korrekt ins Wirtsgenom integriert waren (Abbildung S3). Die Expression des Gens, das für CoPKS4 in *A. niger* tNAL002 codiert, führte zu einer metabolischen Veränderung: Die Analyse der extrahierten Kulturbrühe resultierte in chromatographischen Signalen für **1**, **8**, **9** und die oben genannten Dimere. Wie im Falle von CoPKS1 waren auch Spuren der putativen Verbindung **4** vorhanden. Die Verbindung **1** wurde nachfolgend aus tNAL002 gereinigt. Die anschließende ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie ergab Spektren, die mit denen des CoPKS1-Produkts praktisch identisch waren. Daraus schließen wir, dass CoPKS4 ebenfalls Atrochrysonsäuresynthase-Aktivität aufweist. Dennoch unterschied sich das Produktspektrum

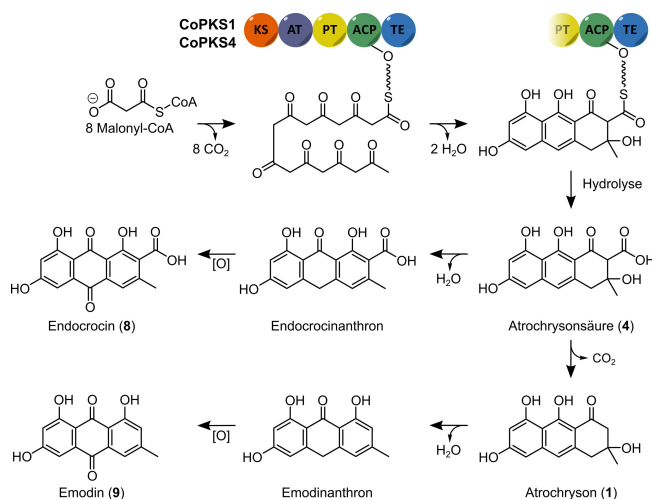
von CoPKS4 von dem von CoPKS1, da ein weiteres Signal detektiert wurde ($t_R=4.5$ min, m/z 231.0655 $[M-H]^-$, Verbindung **6** in Abbildung 3). Die abgeleitete Summenformel $C_{13}H_{12}O_4$ schien mit einem Octaketid unvereinbar zu sein, stimmte aber mit der des Heptaketids 6-Hydroxymusizin (**6**) überein, einem Naturstoff vom Naphthalen-Typ, das als Glycosid aus *Cassia angustifolia* beschrieben wurde.^[14] Den abschließenden Beweis lieferte der chromatographische Vergleich mit einem synthetischen Standard.^[15]

Interessanterweise wurden Heptaketide mit Naphthalen-Grundgerüst bereits aus *C. odorifer* isoliert, darunter als typischer Vertreter das Torachryson (**7**) (Abbildung 1), der 6-*O*-Methylether von **6**. Durch oxidative Phenolkupplung und weitere 8-*O*-Methylierung kann **7** mit einem tricyclischen Octaketid heterodimerisieren, um **5** zu bilden, einem Naturstoff, der bereits aus *C. odorifer* und anderen Arten isoliert wurde.^[2b,9a] Auf Grundlage unserer in vivo-Daten schließen wir daher, dass CoPKS4 duale Hepta- und Octaketidsynthase-Aktivität aufweist. Zusätzlich zu **6** wiesen wir noch eine weitere Verbindung ($t_R=2.5$ min) nach, deren Masse m/z 257.0452 $[M-H]^-$ und UV/Vis-Spektrum (Abbildung S8) mit dem von Pannorin übereinstimmt, was als nicht-enzymatisch gebildetes Heptaketid-Nebenprodukt betrachtet werden kann (Abbildung S9).

Durch die duale Aktivität unterscheidet sich CoPKS4 von der nahe verwandten CoPKS1 (Sequenzalignment in Abbildung S2) und den Ascomyceten-PKS vom AptA/ACAS-Typ. Im Reich der Pilze gibt es bereits Beispiele für Multiprodukt-PKSs, die Polyketide unterschiedlicher Kettenlängen synthetisieren, z.B. die reduzierenden Polyen-PKSs PPS1 und LpaA,^[16] PKS1 aus *Colletotrichum lagenarium*, die Tetra- bis Hexaketide bildet,^[17] und die Terreinsynthase TerA aus *A. terreus*, die Tri- bis Pentaketide biosynthetisiert.^[18]

Wir konnten nicht ausschließen, dass die unterschiedlichen Kettenlängen einen durch *A. niger* verursachten Wirtseffekt widerspiegeln. Daher wollten wir die unterschiedlichen Kettenlängen eindeutig als intrinsisches Merkmal von CoPKS4 bestätigen. Daher führten wir in vitro-Assays mit einem Fusionsprotein durch, das aus Strep-tag und CoPKS4 bestand. Dieses wurde heterolog in *A. niger* tNAL048 produziert und durch Affinitätschromatographie gereinigt (Abbildung S10). Interessanterweise führte die Reaktion mit Malonyl-CoA als alleinigem Substrat zur Bildung von **1**, wie die LC-MS-Analyse belegte (Abbildung 5). Neben geringen Mengen eines Heptaketid-Nebenprodukts, vermutlich Pannorin (Abbildung S8), konnten wir auch **6** nachweisen, was die gleichzeitige Heptaketid-Synthaseaktivität von CoPKS4 belegte. Keines der beiden Moleküle wurde in Kontrollreaktionen mit hitzeinaktiviertem Enzym oder in Abwesenheit von Malonyl-CoA nachgewiesen. Da für die Synthese von **1** und **6** kein weiteres Hilfsenzym, d.h. eine separate TE, erforderlich war, konnten wir eindeutig belegen, dass *Cortinarius* CoPKS4 allein ausreicht, um diesen Pilzen Hepta- und Octaketidsynthase-Aktivität zu verleihen.

Der SAT-domänenlose Aufbau von CoPKS4 impliziert, dass alle Bausteine für die Initiation und Elongation der Polyketidbiosynthese über die AT-Domäne aufgenommen werden, somit wird eine frühere Hypothese bestätigt.^[10c] Für



Schema 1. Abfolge der oligocyclischen Octaketid-Biosynthese und Modifikation nach heterologer Produktion von *C. odorifer* PKSs in *A. niger*. Für ein Modell der CoPKS4-katalysierten Heptaketid-Biosynthese siehe Abbildung S9.

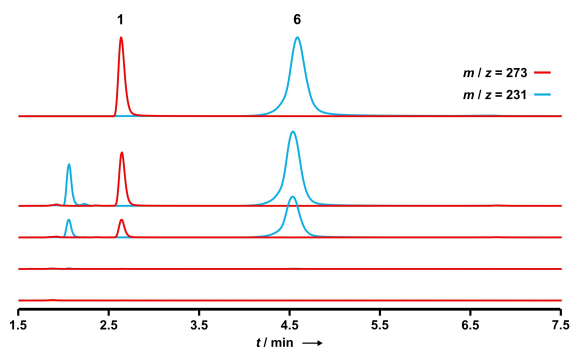


Abbildung 5. In vitro-Produktbildung durch CoPKS4. Extrahierte Ionenchromatogramme (EICs) von lyophilisierten Reaktionen sind für m/z 273 $[M-H]^-$ (rote Spuren) und m/z 231 $[M-H]^-$ (blaue Spuren) dargestellt, um das Octaketid Atrochryson (**1**) bzw. das Heptaketid 6-Hydroxymusizin (**6**) nachzuweisen. Die obere Spur entspricht einer Überlagerung der einzelnen EICs der Standards. Spuren a: Negativkontrolle mit intaktem CoPKS4, aber ohne jegliche Substrate; Spuren b: Negativkontrolle mit hitzebehandeltem CoPKS4, Acetyl-CoA und Malonyl-CoA; Spuren c: Reaktion mit CoPKS4, Acetyl-CoA und Malonyl-CoA; Spuren d: Reaktion mit CoPKS4 und nur Malonyl-CoA. Die in c und d dargestellten enzymatischen Reaktionen zeigten ein zweites Produkt bei m/z 231 ($t_R = 2.1$ min), das aufgrund der geringen Menge nicht identifiziert wurde.

die meisten PKSs ist der Ursprung der formalen Acetat-Einheit für die Ketteninitiation jedoch noch ungeklärt. Für bakterielle Typ II-PKSs wiesen Leadlay und Mitarbeiter eine nichtkondensierende KS-katalysierte Decarboxylierung von Malonyl-CoA für die Actinorhodin-PKS nach, die auch für eine PKS aus *Photorehabdus* gefunden wurde.^[19] Ähnliche Beobachtungen wurden für die multimodulare Typ I-PKS 6-Desoxyerythronolide-B-Synthase gemacht.^[20] Darüber hinaus zeigte ein Radioisotopen-Experiment mit $[1-^{14}C]$ Acetyl-CoA und der pilzlichen ACAS, dass keine Radioaktivität eingebaut wurde und Acetyl-CoA somit nicht als Startereinheit fungiert.^[4c] In der Vergangenheit wurden in vitro-Assays von PKSs mitunter aufgrund von Verunreinigungen kommerzieller CoA-Thioester dahingehend fehlinterpretiert, dass die Decarboxylierung enzymatisch erfolgt sei.^[21] Daher prüften wir das für unsere Experimente verwendete Malonyl-CoA intern auf seine Reinheit und konnten dadurch eine Verunreinigung mit Acetyl-CoA (Abbildung S11) ausschließen. Daher nehmen wir an, dass die KS-Domänen der pilzlichen CoPKSs eine vergleichbare intrinsische decarboxylierende Aktivität aufweisen.

Ausgehend von bekannten *Cortinarius*-Octaketiden vermuteten wir, dass die pilzliche Polyketidsynthese vorwiegend ein Enantiomer herstellt. Um festzustellen, welches Enantiomer produziert wurde, wurde **1** mittels Circular dichroismus-Spektroskopie untersucht (Abbildung S12). Interessanterweise produzierten beide PKS (CoPKS1/4) eine Enantiomeren-Mischung (3R und 3S) in unterschiedlichen Verhältnissen.

Zusammenfassung

Die weite Verbreitung von (Prä-)Anthrachinonen in der Natur deutet auf deren privilegierte Struktur hin, die einen wichtigen, aber noch unbekannten evolutionären Vorteil verleihen könnte. Aus Sicht der chemischen Ökologie betrachtet, muss der Selektionsdruck zur Synthese dieser oligocyclischen Verbindungen in verschiedenen Lebensformen – von Bakterien über Pilze und Pflanzen bis hin zu Wirbellosen – immens gewesen sein, da sich unabhängig mehrere enzymatische Lösungen zur Vermittlung dieser Biosynthesekapazität entwickelt haben. Neben der auf Shikimat basierenden Biosynthese des Anthrachinons Alizarin,^[22] Chalkon-Synthase-ähnlichen pflanzlichen Enzymen,^[23] bakteriellen Typ-II-PKSs^[24] und AptA/ACAS-artigen Ascomyceten-Synthasen^[4] konnten wir im Zuge dieser Arbeit die Existenz eines vierten unabhängigen Polyketidweges nachweisen.

Die strukturelle Vielfalt, die über wenige Post-PKS-Modifizierungsschritte erzeugt werden kann, könnte eine plausible Erklärung für den privilegierten Charakter der von **1** abgeleiteten Verbindungen darstellen. Zu diesen Modifikationen gehören regioselektive Methylierungen, Hydroxylierungen, Glycosylierungen, Dehydrierungen (z. B. Anthrone), Oxidationen (z. B. Chinone und Xanthone) und Prenylierungen (z. B. bei der Vismion-Gruppe der Anthranoiden) und führen zu Hunderten verschiedener Verbindungen, die alle auf **1** als Vorläufer basieren und von denen viele mit einer ausgeprägten Bioaktivität assoziiert sind.^[4,25]

Ferner wird die Strukturvielfalt durch regio- und stereoselektive enzymvermittelte oxidative Phenolkupplung weiter stark erhöht.^[3] Folgerichtig entstanden (nahezu) identische Atrochrysonderivate, unabhängig von den unterschiedlichen produzierenden Organismen, dem Habitat, in dem sie leben oder dem Enzym, das **1** biosynthetisiert. Belegt wird diese konvergente Entwicklung durch die Phlegmacine, die sowohl aus Pilzen als auch aus Pflanzen isoliert wurden.^[9,26] Unsere Arbeiten zur Chemie und Biosynthese von Polyketiden im Ständerpilz *Cortinarius odorifer* haben zur Entdeckung einer neuartigen Klasse von Polyketidsynthasen geführt, die entweder selektiv ein Octaketid produzieren oder intrinsisch flexibel sind und sowohl Hepta- als auch Octaketide biosynthetisieren. In früheren chemischen Analysen wurden zahlreiche Pilze innerhalb und außerhalb der Gattung *Cortinarius* als Produzenten von bi- und tricyclischen Hepta-/Octaketiden identifiziert.^[2b,27] Wir erwarten daher, dass unsere Arbeit ein grundlegendes und umfassend anwendbares Prinzip der Naturstoffchemie von Pilzen aufgedeckt hat.

Danksagung

Wir danken Andrea Perner, Paula Sophie Seibold, Mark Ellerhorst und Dr. Gerald Lackner (Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Jena) für die Durchführung von HR-ESIMS-Analysen bzw. die zusätzliche Proteinreinigung. Der *Aspergillus niger*-Stamm ATNT16ΔpyrGx24 sowie das Plasmid

pSM_StrepTag_X_URA wurden freundlicherweise von Prof. Matthias Brock (University of Nottingham, UK) zur Verfügung gestellt. Wir danken zudem Christian Bär und Jakob Worbs (Friedrich-Schiller-Universität Jena) für zusätzliche Klonierungsarbeiten und Probenvorbereitung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, Stipendium HO2515/8-1 für D.H.) 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 in GenBank unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> unter der Referenznummer 512945 frei zugänglich.

Stichwörter: Anthrachinone · Biosynthese · Octaketide · Pilze · Polyketidsynthase

- [1] G. Diaz-Muñoz, I. L. Miranda, S. K. Sartori, D. C. de Rezende, M. A. N. Diaz, *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2018**, 58, 313–338.
- [2] a) M. Takido, S. Takahashi, K. Masuda, K. Yasukawa, *Lloydia* **1977**, 40, 191–194; b) M. Gill, W. Steglich in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Bd. 51* (Hrsg.: W. Herz, H. Grisebach, G. W. Kirby, C. Tamm), Springer, Heidelberg, **1987**, S. 125–174.
- [3] W. Hüttel, M. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2021**, 38, 1011–1043.
- [4] a) E. Szewczyk, Y.-M. Chiang, C. E. Oakley, A. D. Davidson, C. C. C. Wang, B. R. Oakley, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74, 7607–7612; b) Y.-M. Chiang, E. Szewczyk, A. D. Davidson, R. Entwistle, N. P. Keller, C. C. C. Wang, B. R. Oakley, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, 76, 2067–2074; c) M. T. Nielsen, J. B. Nielsen, D. C. Anyaogu, D. K. Holm, K. F. Nielsen, T. O. Larsen, U. H. Mortensen, *PLoS One* **2013**, 8, e72871; d) S. Griffiths, C. H. Mesarich, B. Saccomanno, A. Vaisberg, P. J. G. M. De Wit, R. Cox, J. Collemare, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, 113, 6851–6856; e) T. Awakawa, K. Yokota, N. Funa, F. Doi, N. Mori, H. Watanabe, S. Horinouchi, *Chem. Biol.* **2009**, 16, 613–623.
- [5] K. Høiland, A. Holst-Jensen, *Mycologia* **2000**, 92, 694–710.
- [6] Z.-Y. Zhou, J.-K. Liu, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 1531–1570.
- [7] 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) P.-W. Yu, Y.-C. Chang, R.-F. Liou, T.-H. Lee, S.-S. Tzean, *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 1485–1491; d) J. Braesel, J. Fricke, D. Schwenk, D. Hoffmeister, *Fungal Genet. Biol.* **2017**, 98, 12–19; e) M. Gressler, N. A. Löhr, T. Schäfer, S. Lawrinowitz, P. S. Seibold, D. Hoffmeister, *Nat. Prod. Rep.* **2021**, 38, 702–722.
- [8] S. Elsworth, M. Gill, A. Giménez, N. M. Milanovic, E. Raudies, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1999**, 119–125.
- [9] a) W. Steglich, B. Oertel, *Sydowia* **1984**, 37, 284–295; b) W. Steglich, E. Töpfer-Petersen, *Z. Naturforsch. B* **1972**, 27, 1286–1287; c) W. Steglich, E. Töpfer-Petersen, I. Pils, *Z. Naturforsch. C* **1973**, 28, 354–355.
- [10] a) C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4688–4716; *Angew. Chem.* **2009**, 121, 4782–4811; b) J. M. Crawford, C. A. Townsend, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 8, 879–889; c) J. M. Crawford, B. C. R. Dancy, E. A. Hill, D. W. Udway, C. A. Townsend, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 16728–16733.
- [11] G. Lackner, M. Misiek, J. Braesel, D. Hoffmeister, *Fungal Genet. Biol.* **2012**, 49, 996–1003.
- [12] a) M. Gressler, P. Hortschansky, E. Geib, M. Brock, *Front. Microbiol.* **2015**, 6, 184; b) E. Geib, M. Brock, *Fungal Biol. Biotechnol.* **2017**, 4, 13.
- [13] M. Müller, K. Lamottke, E. Löw, E. Magor-Veenstra, W. Steglich, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 2483–2489.
- [14] J. Lemli, S. Toppet, J. Cuveele, G. Janssen, *Planta Med.* **1981**, 43, 11–17.
- [15] W. Thiele, S. Obermaier, M. Müller, *ACS Chem. Biol.* **2020**, 15, 844–848.
- [16] a) P. Brandt, M. García-Altares, M. Nett, C. Hertweck, D. Hoffmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 5937–5941; *Angew. Chem.* **2017**, 129, 6031–6035; b) P. S. Seibold, C. Lenz, M. Gressler, D. Hoffmeister, *J. Antibiot.* **2020**, 73, 711–720.
- [17] A. Watanabe, Y. Ebizuka, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1101–1106.
- [18] C. Zaehle, M. Gressler, E. Shelest, E. Geib, C. Hertweck, M. Brock, *Chem. Biol.* **2014**, 21, 719–731.
- [19] a) C. Bisang, P. F. Long, J. Cortés, J. Westcott, J. Crosby, A.-L. Matharu, R. J. Cox, T. J. Simpson, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Nature* **1999**, 401, 502–505; b) A. Bräuer, Q. Zhou, G. L. C. Grammbitter, M. Schmalhofer, M. Rühl, V. R. I. Kaila, H. B. Bode, M. Groll, *Nat. Chem.* **2020**, 12, 755–763.
- [20] a) T. Robbins, J. Kapilivsky, D. E. Cane, C. Khosla, *Biochemistry* **2016**, 55, 4476–4484; b) M. L. Heathcote, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 207–220.
- [21] K. J. Weissmann, M. Bycroft, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Biochemistry* **1998**, 37, 11012–11017.
- [22] E. Leistner, *Phytochemistry* **1973**, 12, 1669–1674.
- [23] S.-H. Kang, R. P. Pandey, C.-M. Lee, J.-S. Sim, J.-T. Jeong, B.-S. Choi, M. Jung, D. Ginzburg, K. Zhao, S. Y. Won, T.-J. Oh, Y. Yu, N.-H. Kim, O. R. Lee, T.-H. Lee, P. Bashyal, T.-S. Kim, W.-H. Lee, C. Hawkins, C.-K. Kim, J. S. Kim, B. O. Ahn, S. Y. Rhee, J. K. Sohng, *Nat. Commun.* **2020**, 11, 5875.
- [24] a) C. Zhang, C. Sun, H. Huang, C. Gui, L. Wang, Q. Li, J. Ju, *J. Nat. Prod.* **2018**, 81, 1570–1577; b) X. Yan, K. Probst, A. Linnenbrink, M. Arnold, T. Paululat, A. Zeeck, A. Bechthold, *ChemBioChem* **2012**, 13, 224–230; c) Q. Zhou, A. Bräuer, H. Adihou, M. Schmalhofer, P. Saura, G. L. C. Grammbitter, V. R. I. Kaila, M. Groll, H. B. Bode, *Chem. Sci.* **2019**, 10, 6341–6349.
- [25] a) K. D. Beattie, R. Rouf, L. Gander, T. W. May, D. Ratkovsky, C. D. Donner, M. Gill, I. D. Grice, E. Tiralongo, *Phytochemistry* **2010**, 71, 948–955; b) G. François, T. Steenackers, L. A. Assi, W. Steglich, K. Lamottke, J. Holenz, G. Bringmann, *Parasitol. Res.* **1999**, 85, 582–588.
- [26] S. Takahashi, S. Kitanaka, M. Takido, U. Sankawa, S. Shibata, *Phytochemistry* **1977**, 16, 999–1002.
- [27] W. Steglich, E. Töpfer-Petersen, W. Reininger, K. Gluchoff, N. Arpin, *Phytochemistry* **1972**, 11, 3299–3304.

Manuskript erhalten: 26. November 2021

Akzeptierte Fassung online: 26. Februar 2022

Endgültige Fassung online: 12. April 2022