

Homologe NRPS-ähnliche Genloci vermitteln eine redundante Naturstoff-Biosynthese in *Aspergillus flavus*^{**}

Ry R. Forseth, Saori Amaike, Daniel Schwenk, Kathryn J. Affeldt, Dirk Hoffmeister, Frank C. Schroeder* und Nancy P. Keller*

Pilze gehören zu den reichsten Quellen pharmazeutisch relevanter Naturstoffe.^[1] Diese große Diversität an pilzlichen niedermolekularen Verbindungen hat wichtige ökologische Funktionen, beispielsweise als Virulenzfaktoren oder als Mittel zur chemischen Verteidigung. Jedoch wurde nur ein Bruchteil der durch Genomanalysen zu erwartenden biosynthetischen Möglichkeiten unter Laborbedingungen beobachtet, da die Expression vieler, vermutlich sogar der meisten Biosynthesewege stark von den Umweltbedingungen abhängt.^[2] Hier zeigen wir die Anwendung der vergleichenden Metabolomik^[3] zur Analyse von Genaktivierungs-, Überexpressions- sowie Knock-down-Stämmen, um in *Aspergillus flavus* die Stoffwechselleistung zweier genetischer Loci zu bestimmen, die unter anderem für nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) codieren. *A. flavus* ist ein Aflatoxinproduzierender Schlauchpilz, der Lebensmittel kontaminiert,^[4] und ein opportunistischer Krankheitserreger, der Aspergillose in immungeschwächten Patienten verursacht.^[5]

Obwohl das Genom von *A. flavus* für mindestens 25 Polyketidsynthasen (PKS), 18 NRPS, und zwei hybride NRPS-PKS-Genloci codiert,^[6] sind diesen lediglich vier Metabolite zugeordnet.^[7] In *A. flavus* werden viele Sekundärstoff-Biosynthesen von dem kernlokalisierten Protein LaeA kontrolliert, einem globalen Regulator der Morphogenese und Virulenzfaktor in *A. flavus* und anderen pathogenen Pilzen.^[8] Zwei durch LaeA regulierte Loci, mit *lna* und *lnb* bezeichnet, zeigen starke genetische Ähnlichkeit (Abbildung 1, Tabelle S1). Die Loci *lna* und *lnb* umfassen zwei nicht-kanonische NRPS Gene, *lnaA* und *lnbA*, von hoher Sequenzhomologie (58% identisch auf der Ebene der Aminosäuren). Diese Gene werden begleitet von vergleichbaren Gruppen von Genen, welche vermutlich für modifizierende Enzyme co-

dieren. *lna* und *lnb* sind Loci unbekannter Funktion, die keinem bekannten Metaboliten zugeordnet sind, und sie beinhalten Gene für ungewöhnliche NRPSs, welche aus einer Adenylierungs(A)-Domäne, einem Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) und einer Thioesterreduktase(R)-Domäne bestehen, jedoch keine übliche Kondensations(C)-Domäne besitzen (Abbildung 1a). Die Funktion dieser ungewöhnlichen, den Reduktasen der L-Lysin-Biosynthese ähnelnden Familie von NRPSs wurde noch nicht erforscht.^[9] Wir weisen nach, dass die *lna*- und *lnb*-Loci Enzyme codieren, die überlappende Gruppen bislang unbeschriebener Metabolite produzieren, und zeigen, dass eine primäre Funktion der Enzyme LnaA und LnbA vermutlich in der Reduktion von L-Tyrosin besteht. Weiterhin scheinen die *lna*- und *lnb*-codierten Biosynthesewege Teil eines Signalnetzwerkes zu sein, welches die Bildung der Sklerotien, dies sind widerstandsfähige Überwinterungsstrukturen, steuert.

Um *lna*-assoziierte Metabolite durch vergleichende Metabolomik zu identifizieren, wurden Gendeletions- und Genüberexpressionsmutanten^[10] des NRPS-Gens *lnaA* ($\Delta lnaA$ und *OE::lnaA*) erzeugt, sowie als Doppelmutanten die Stämme $\Delta lnaA$, *KD::lnbA* und *OE::lnaA, KD::lnaB*, wobei KD eine Unterdrückung der Genexpression mittels RNA-Interferenz bedeutet (die Stämme sind in Tabelle S3 aufgelistet, die Methoden sind in den Hintergrundinformationen, Section 1, beschrieben). Unerwarteterweise zeigte es sich, dass in der *ΔlnaA, KD::lnbA*-Doppelmutante, in der sowohl der *lna*- als auch der *lnb*-Biosyntheseweg unterbrochen ist, die Sklerotienbildung im Vergleich zum Wildtyp überraschend stark unterdrückt war (siehe Hintergrundinformation, Abbildung S1).

[*] R. R. Forseth,^[+] Prof. Dr. F. C. Schroeder
Boyce Thompson Institute and Department of Chemistry and
Chemical Biology, Cornell University
1 Tower Road, Ithaca, NY 14850 (USA)
E-Mail: fs31@cornell.edu
Homepage: <http://www.bti.cornell.edu/schroeder/>
K. J. Affeldt, Prof. Dr. N. P. Keller
Department of Medical Microbiology and Immunology
University of Wisconsin-Madison
3476 Microbial Sciences Building, Madison, WI 53706 (USA)
E-Mail: npkeller@wisc.edu
Dr. S. Amaike^[+]
Department of Plant Pathology
University of Wisconsin-Madison (USA)
Prof. Dr. N. P. Keller
Department of Bacteriology
University of Wisconsin-Madison (USA)

D. Schwenk, Prof. Dr. D. Hoffmeister
Pharmazeutische Biologie, Hans-Knöll-Institut
Friedrich Schiller Universität
Beutenbergstraße 11a, 07745 Jena (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken J. A. Baccile, Y. Rokhlenko und J. A. Bernstein für Hilfe mit Synthesen und M. Kukula für Hilfe mit der Massenspektrometrie. Wir danken den National Institutes of Health (GM008500 an R.R.F. und GM084077 an N.P.K.), der International Leibniz Research School (ILRS) Jena (an D.S.), DuPont Corp. (an F.C.S.), dem United States Department of Agriculture (WIS01200 an N.P.K.) und dem Food Research Institute, National Science Foundation (Untervertrag IOS-0965649 an N.P.K.) für finanzielle Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201207456> zu finden.

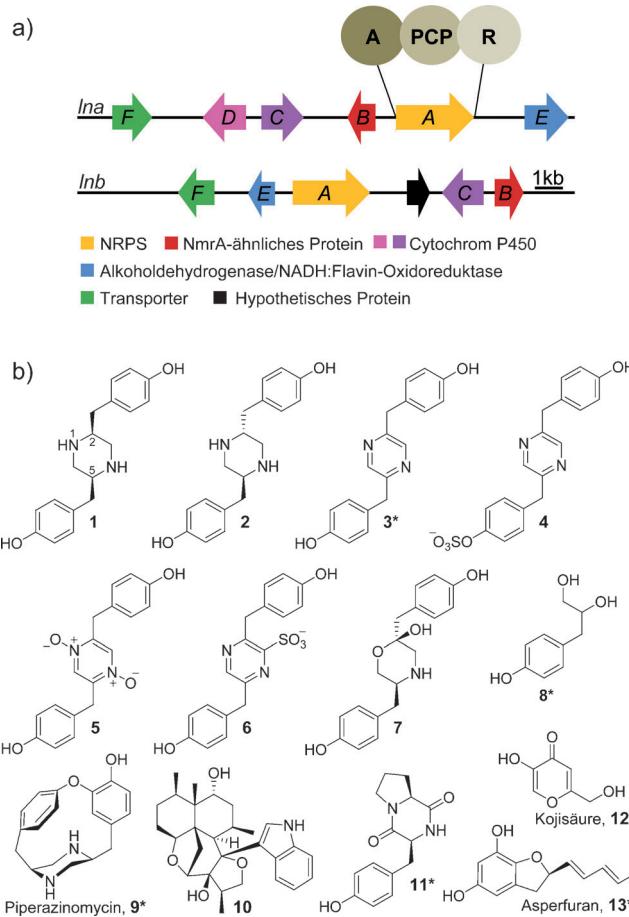


Abbildung 1. a) Die Genloci *Ina* und *Inb* in *A. flavus*.^[2c] Sowohl *Ina* als auch *Inb* enthalten nichtkanonische NRPS-Gene, deren Genprodukte Adenylierungs(A)-, Peptidyl-Carrier-Protein(PCP)- und Dehydrogenase/Reduktase(R)-Domänen beinhalten. Im *Inb*-Genlocus findet sich kein Ortholog zu *InaD*. Siehe auch Hintergrundinformationen, Tabelle S1. b) In dieser Studie beschriebene Metabolite und das bereits bekannte Piperazinomycin (9). Mit einem Stern * gekennzeichnete Substanzen wurden bereits früher beschrieben.

Die Metabolome des Wildtyps, von Δ *InaA* und $OE::InaA$ wurden durch differentielle Analyse mit 2D-NMR-Spektroskopie (DANS) verglichen, wie beschrieben.^[3b-d] Der Vergleich der $OE::InaA$ -Spektren entweder mit WT oder Δ *InaA* offenbarte eine große Anzahl von Spinsystemen, die nur in $OE::InaA$ vorhanden waren (siehe Abbildung S2). Die verfügbaren Substanz-Datenbanken zeigten, dass die meisten der $OE::InaA$ -spezifischen Signale nicht im Zusammenhang mit bekannten Metaboliten aus Aspergillen oder anderen Pilzen standen. Detaillierte NMR-spektroskopische und hochaufgelöste massenspektrometrische(HRMS)-Analysen von gereinigten Fraktionen, welche die $OE::InaA$ -spezifischen Bestandteile enthielten, legten die Anwesenheit eines Paars von diastereomeren Piperazinen **1** und **2** als Hauptmetabolite nahe (Abbildung 1b, für spektroskopische Daten siehe Tabellen S4–S10). Der Vergleich mit synthetischen Proben, die aus Derivaten des cyclo(L-Tyr-L-Tyr) und cyclo(D-Tyr-L-Tyr) hergestellt wurden, bestätigten diese strukturellen Zuordnungen (Hintergrundinformationen, Section 8). Die Strukturen von **1** und **2** erinnern an Piperazinomycin

(9),^[11] ein bakterieller Metabolit, der zuerst in *Streptomyces olivoreticuli* identifiziert wurde und sich durch oxidative Makrocyclisierung aus **1** ableiten könnte.

Die Piperazine **1** und **2** werden begleitet von einem Derivat, welches ein quartäres Kohlenstoffatom bei 93.1 ppm, zwei isolierte Methylengruppen sowie ein OCH₂-CH(N)-CH₂-Phenyl-Fragment aufweist. HRMS ergab eine Summenformel C₁₈H₂₁NO₄, die in Verbindung mit 2D-NMR-Daten (Tabelle S9) zur Identifikation eines ein Halbacetal enthaltenden Morpholins **7** führte. ROESY-Korrelationen zwischen dem Hydroxy-Proton und dem axialen Proton an C-6 definieren die relative Konfiguration von **7** als (2*R*^{*}, 5*S*^{*}). Weiterhin identifizierten wir ein gänzlich desaminiertes „Monomer“, 3-(*p*-Hydroxyphenyl)-1,2-propandiol (**8**), ein zuvor beschriebener Pilzmetabolit,^[12] sowie vier Pyrazin-Derivate. Dabei handelt es sich um das bekannte Actinopolymorphol C (**3**),^[13] ein *O*-sulfonierte Derivat (**4**) sowie zwei weitere stark polare Abkömmlinge. Die NMR-Spektren eines dieser Derivate legte eine *N*-Oxidation nahe, was durch eine sich aus HRMS ergebende Summenformel C₁₈H₁₆N₂O₄ bestätigt wurde. Auf diese Weise wurde ein ungewöhnliches *N,N*-Dioxid entdeckt (**5**, siehe Lit. [14] für eine verwandte synthetische Verbindung). NMR- und HRMS-Spektren des zweiten Abkömmlings von **3** zeigten eine Sulfonylierung an C-3 dieser Verbindung (**6**) an. Zusätzlich zu **1–8**, welche durchgängig von *OE::InaA*, jedoch nicht von Δ *InaA* produziert wurden, entdeckten wir die gelegentliche Produktion mehrerer anderer Verbindungen, deren Strukturen (**10–13**) nicht verwandt zu denen von **1–8** erschienen und sich daher vermutlich nicht aus dem *Ina*-Biosyntheseweg ableiten. Unter ihnen ist Verbindung **10** ein neuer Metabolit, der ein interessantes Ringsystem aufweist, welches vermutlich aus dem bekannten *A. flavus*-Terpenoid Aflavinin abgeleitet ist (siehe Hintergrundinformationen, Section 9).^[15]

Als nächstes untersuchten wir, ob die Produktion von **1–8** im *A. flavus*-Wildtyp unter bestimmten Bedingungen hervorgerufen werden kann, und ob diese Verbindungen tatsächlich strikt abhängig von *Ina*-Genen sind (siehe Tabelle 1). Hochsensitive Einzelion-beobachtende MS(SIMMS)-Analyse von Δ *InaA*-, WT- und $OE::InaA$ -Kulturen, die unter Bedingungen angezogen wurden, in denen zuvor bereits die

Tabelle 1: Verwendete *A. flavus*-Stämme (siehe auch Tabelle S3) und Vorkommen von *Ina*/*Inb*-assoziierten Metaboliten **1–8**.^[a]

Verbindung	$OE::InaA$ (Vollmedium)	$OE::InaA$ (KD:: <i>InaB</i>)	$OE::InaA$, Wildtyp	Δ <i>InaA</i>	Δ <i>InaA</i> , KD <i>InbA</i>	
1	+++	+++	+++	++	+	–
2	+++	+++	+++	++	+	–
3	+++	+++	+++	++*	–	–
4	+++	–	–	–	–	–
5	+++	–	–	–	–	–
6	+++	–	–	–	–	–
7	+++	+++	+++	–	–	–
8	+++	+++	+++	–	–	–

[a] „+++“=hohe Konzentrationen, detektiert mittels DANS und MS, „++“=nur durch MS detektiert („*“=nicht immer detektiert) und „+“=mittels MS detektiert, ca. 10-fach niedrigere Konzentrationen als im WT. Die Stämme wurden, soweit nicht anders kenntlich gemacht, in GMM-Medium kultiviert.

Expression von *lnaA* gezeigt werden konnte, belegte die Anwesenheit der Piperazine **1** und **2** im WT, obwohl die Konzentrationen ca. 100-fach niedriger lagen als bei *OE::lnaA* (siehe Hintergrundinformationen, Section 11). Das Pyrazin **3** wurde nur in einigen, jedoch nicht allen WT-Extrakten nachgewiesen, wohingegen **4–8** nicht detektiert wurden. *OE::lnaA* produzierte die Verbindungen **1–3**, **7** und **8**, wohingegen **4–6** unter diesen Kulturbedingungen fehlten. Bemerkenswerterweise wurden durch SIMMS auch sehr geringe Mengen (etwa zehnfach niedriger als in WT) **1** und **2** in Δ *lnaA*-Extrakten detektiert. Dies ließ vermuten, dass **1** und **2** vielleicht auch von Enzymen produziert werden, die im homologen *lnb*-Genlocus codiert sind. Um diese Hypothese zu testen, wurden Extrakte von zwei unterschiedlichen Δ *lnaA,KD::lnbA*-Doppelmutanten mittels HPLC/ESI⁺-SIMMS analysiert. Dies zeigte, dass die Verbindungen **1–8** in den Doppelmutanten vollständig fehlen, wohingegen WT und Δ *lnaA*, welche parallel als Positivkontrollen angezogen wurden, wie zuvor **1** und **2** produzierten (Abbildung S4). Diese Ergebnisse zeigen, dass die in Δ *lnaA* gefundenen Mengen von **1** und **2** durch die Expression von *lnbA* zustande kommen, und daher die *lna*- und *lnb*-Loci (Abbildung 1a) teilweise redundante Biosynthesewege codieren.

Da die Strukturen **1–8** von Tyrosin (Tyr) abgeleitet erscheinen, wurden die beiden vermuteten NRPS-Proteine LnaA und LnbA auf ihre Fähigkeit getestet, spezifisch Tyr zu aktivieren. Dies geschah, indem die Aminosäure-abhängige Aktivität zum ATP-[³²P]-Pyrophosphat-Austausch gemessen

wurde.^[16] Sowohl LnaA als auch LnbA aktivierten spezifisch L-Tyr, obwohl LnaA etwas d/L-unspezifisch war und auch D-Tyr aktivierte (Abbildung 2a). Weder LnaA noch LnbA besitzt jedoch eine Kondensationsdomäne und entsprechend umfasst keiner der *lna*- und *lnb*-assoziierten Metabolite, die in WT oder *OE::lnaA* identifiziert wurden, eine Peptidbindung. Hinzu kommt, dass keines der beiden Proteine das L-Tyr-L-Tyr-Dipeptid aktivierte (Abbildung S5). Hingegen besitzen sowohl LnaA als auch LnbA C-terminale R-(vermutete Reduktase und/oder Epimerase-)Domänen, deren Aminosäuresequenzen denen anderer mikrobieller Reduktase-Domänen ähneln.^[17] Basierend auf den chemischen Strukturen der identifizierten *lna*- und *lnb*-abhängigen Metabolite erschien es wahrscheinlich, dass die R-Domänen in LnaA und LnbA an der Reduktion von L-Tyr-Derivaten beteiligt sind. In einem Biosynthesemodell könnte der durch LnaA und/oder LnbA entstandene L-Tyr-Aldehyd (**15**) ein Dimer, möglicherweise **17**, bilden, vielleicht über ein gebundenes Intermediat, z.B. **16** (Abbildung 2b). Die Bildung der mengenmäßig überwiegenden *lna*- und *lnb*-assoziierten Verbindungen (**1**, **2**, **7**, **8**) erfordert eine zusätzliche Reduktion von Aldehyden oder Iminen zu entsprechenden Aminen und Alkoholen. An diesen reduktiven Schritten sind vermutlich NmrA-ähnliche Proteine beteiligt, die von *lnaB* und *lnbB* codiert werden (Abbildung 1a), da NmrA-ähnliche Proteine möglicherweise die enzymatische Funktion von Epimerasen oder Reduktasen erfüllen,^[18] zusätzlich zu möglichen Rollen in der Genregulation.^[19]

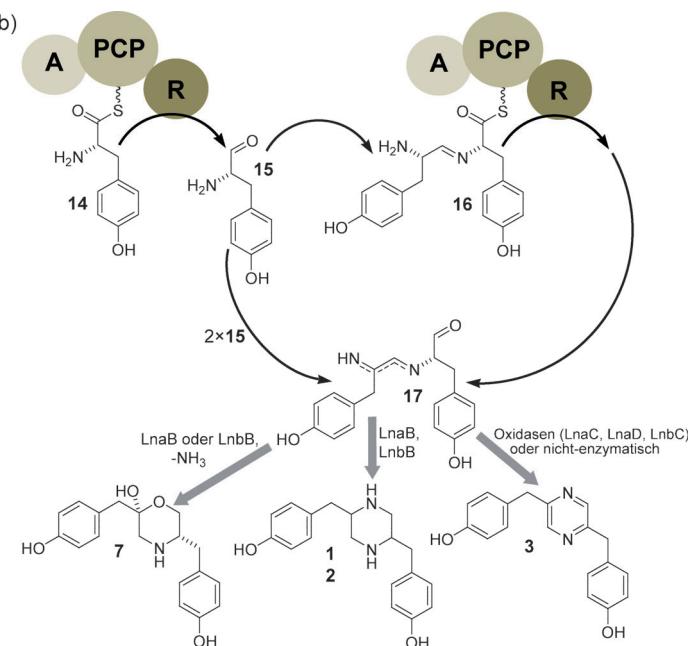
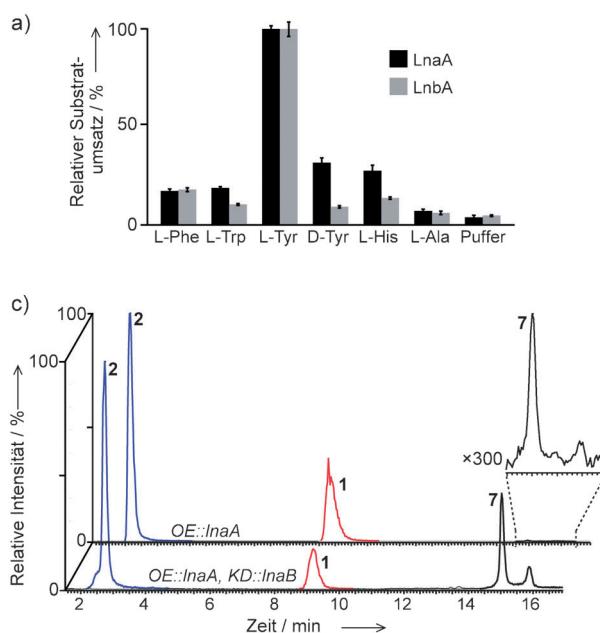


Abbildung 2. a) Substratspezifität von LnaA (schwarz) und LnbA (grau). Rekombinantes LnaA bzw. LnbA wurde hinsichtlich der Fähigkeit zur Adenylierung verschiedener Aminosäuren getestet. Gezeigt werden relative Aktivitäten, normiert auf die Aktivität in Gegenwart von L-Tyr. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichungen. b) Vereinfachtes Modell für die Biosynthese von *lna*A-abhängigen Metaboliten durch in den *lna*/*lnb*-Genloci codierte Enzyme (siehe auch Abbildung S6). Gebundenes L-Tyr (**14**) wird durch die R-Domäne von LnaA oder LnbA zu **15** reduziert, wodurch die Bildung des dimeren Imins (**17**), möglicherweise über eine gebundene Zwischenstufe (**16**), ermöglicht wird. Ringbildung und Reduktion durch LnaB (und eventuell LnbB) führen zur Bildung von **1** oder **2**. Oxidation hingegen führt zu **3**. Eine Isomerisierung von **17** (oder einer verwandten Zwischenstufe) zum Enamin, gefolgt vom Verlust von Ammoniak, führt in Abwesenheit von LnaB zu einer erhöhten Produktion von **7**. c) Einzelionen-Chromatogramme für **1**, **2** und **7** aus HPLC/ESI⁺-SIMMS-Analysen für die *OE::lnaA*- und *OE::lnaA, KD::lnbB*-Stämme. Verglichen zum *OE::lnaA*-Stamm zeigt der *OE::lnaA, KD::lnbB*-Stamm einen starken Anstieg der Produktion von **7**, relativ zu der von **1** und **2**.

Um die vermutete Funktion von LnaB in der Biosynthese von **1** und **2** zu überprüfen, wurde das Metabolitenprofil einer *OE::lnaA,KD::lnaB*-Doppelmutante per 2D-NMR-Spektroskopie und HPLC/ESI⁺-SIMMS mit dem von *OE::lnaA* verglichen. Diese Analysen zeigten, dass im Verhältnis zu den Piperazinen **1** und **2** das Morphinol **7** sehr viel stärker in *OE::lnaA,KD::lnaB* vorkommt als in *OE::lnaA* (Abbildung 2c). Diese Verschiebung hin zu einer relativ stärkeren Produktion des Morphinols **7**, dessen Biosynthese einen Reduktionsschritt weniger erfordert als die Produktion von **1** und **2**, weist darauf hin, dass LnaB an der Reduktion von Intermediaten beteiligt ist, die von LnaA hergestellt wurden. Eine Unterdrückung von *lnaB* würde in der verstärkten Akkumulation von **17** resultieren, welches dann teilweise hydrolysiert und so zur vermehrten Produktion von **7** führen würde (Abbildungen 2b, S6). Bemerkenswerterweise ist im *OE::lnaA,KD::lnaB*-Stamm die Produktion der Piperazine **1** und **2** nicht vollständig unterbrochen, obwohl die Bildung des Morphinols **7** aus L-Tyr-Aldehyd (**15**) oder **17** dennoch einen Reduktionsschritt erfordert. Diese restliche Reduktaseaktivität in der *OE::lnaA,KD::lnaB*-Doppelmutante könnte aus der Expression des zweiten *nmrA*-ähnlichen Gens *lnbB* (oder einem anderen Gen in der Nähe von *lnbB*, siehe Tabelle S1) resultieren, oder aus einer unvollständigen Unterdrückung der *lnaB*-Expression. Während die Cyclisierung von **17** zum entsprechenden Diimin, gefolgt von LnaB- (oder LnbB-)vermittelter Reduktion schließlich zu den Piperazinen **1** und **2** führt, würde eine Oxidation, nichtenzymatisch oder von den vermutlichen Oxidasen LnaC, LnaD oder LnbC katalysiert, die Bildung des Pyrazins **3** erklären.

HPLC/ESI⁺-SIMMS zeigte weiterhin, dass das Verhältnis der beiden Diastereomere **1** und **2** in WT signifikant größer ist als in *ΔlnaA* (Abbildung 3a und S7). Dies legt nahe, dass der *lnb*-Biosyntheseweg vergleichsweise größere Mengen des (2*R*^{*,} 5*S*^{*)}-Isomers **2** produziert als der *lna*-Weg. Da LnbA L-

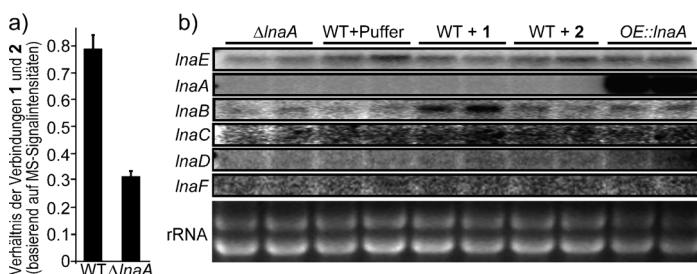


Abbildung 3. a) Vergleich des Verhältnisses der Diastereomeren **1** und **2** in Extrakten von WT und *ΔlnaA*. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichungen. b) Einfluss der Fütterung von synthetischem **1** oder **2** auf die Expression des *Ina*-Genlocus. Die Northern-Blot Analyse zeigt, dass nur die Zugabe von **1**, nicht aber von **2**, die *InaB*-Expression erhöht. rRNA diente als Beladungskontrolle.

Tyr mit hoher Selektivität aktiviert, erscheint es unwahrscheinlich, dass dieses relativ größere Auftreten von **2** auf den Einbau von sowohl D-Tyr als auch L-Tyr zurückzuführen ist. Diese stereochemischen Unterschiede entstammen wahrscheinlich einer unterschiedlich starken Epimerisierung im Stadium des Aldehyds oder des Imins. Als nächstes unter-

suchten wir, ob das Verhältnis der Diastereomeren aktiv durch das Ausmaß der Genexpression reguliert wird. Northern-Analysen von WT-Kulturen, die mit synthetischem **1** oder **2** inkubiert wurden, zeigten, dass die Behandlung mit **2** nicht zu signifikanten Veränderungen in der Expression der *Ina*-Gene führte, wohingegen die Zugabe von **1** zum WT die Expression von *InaB* stark erhöhte (Abbildung 3b). Diese Ergebnisse legen eine Metabolit-vermittelte Kommunikation zwischen dem *Ina*- und dem *Inb*-Biosyntheseweg sehr nahe.

Die vergleichende Metabolomik identifizierte acht *Ina*-assoziierte Metabolite, **1–8**, von denen **1–3** im *A. flavus*-WT detektiert werden konnten. Die beiden am durchgängigsten produzierten *Ina*-Metabolite, **1** und **2**, werden auch unter Beteiligung von *Inb*-Genen produziert, was ein erstes Beispiel für eine partiell redundante Biosynthese eines NRPS-artigen Stoffwechselweges darstellt. LnaA und LnbA weichen von den üblichen NRPS-Domänenstrukturen ab, da sie keine Kondensationsdomänen besitzen und daher nicht als Peptidsynthetase fungieren, wie die Strukturen der identifizierten Metabolite nahelegen. Stattdessen folgen LnaA und LnbA dem Domänenauflauf von Lys2 und verwandten pilzlichen Enzymen, die als α-Aminoadipat-Reduktasen der pilzlichen L-Lysin-Biosynthese dienen (24% bzw. 25% identische Aminosäuren zwischen LnaA und LnbA und *S. cerevisiae* Lys2^[19]). Die Überprüfung pilzlicher Genome zeigte, dass LnaA-artige Proteine hauptsächlich auf das Schlauchpilz-Taxon der Plectomycetes beschränkt sind und 1–5 solcher Proteine in Aspergillen auftreten. Kürzlich veröffentlichte Genome, beispielsweise das von *Serpula lacrymans* und *Herterobasidion annosum*,^[20] zeigen, dass LnaA/LnbA-artige Enzyme auch in Basidiomyceten codiert werden. Das Piperazinomycin-produzierende Bakterium (*Streptomyces* sp.) ist nicht sequenziert, jedoch enthalten verfügbare *Streptomyces*-Genome Gene, die Proteine mit großer Ähnlichkeit (bis 38% identische Aminosäuren) zu LnaA codieren. Obwohl Bakterien Lysin nicht über den Lys2 umfassenden Biosyntheseweg herstellen, legt diese hohe Ähnlichkeit mancher bakterieller NRPS-artiger Proteine zu LnaA/LnbA eine komplexe Evolution dieser Proteine nahe.^[21]

Unsere Arbeit erbringt erstmalig den Beweis, dass Lys2-artige Enzyme auch im Sekundärstoffwechsel eine Funktion ausüben, und sie legt zusätzlich nahe, dass NRPS-artige Proteine als Aminosäure-Reduktase dienen können. Dies zeigt, dass diese Reaktion eigenständig ist, obwohl sie bislang nur als Entlademodus von Peptidsynthetasen angesehen wurde. Diese Studie zeigt auch die Konsequenzen der *InaA/lnbA*-Genaktivierung/Unterdrückung und des damit einhergehenden Verlustes von Piperazin-/Pyrazin-/Morpholin-Sekundärstoffen auf die Entwicklung von Pilzen, was die Sklerotienbildung in *A. flavus* mit den *Ina/lnb*-Biosynthesewegen verknüpft. Den zuvor bekannten Funktionen pilzlicher NRPS-Gene fügt diese Beobachtung eine einzigartige Rolle hinzu. Das Vorkommen eines funktionell duplizierten Biosyntheseweges kann als Absicherung interpretiert werden, damit die rechtzeitige Sklerotienproduktion und damit die Überdauerung während ungünstiger Umweltbedingungen sichergestellt ist. Unsere Ergebnisse legen komplexe Signalwege nahe, welche die Biosynthese der *Ina*-

und *lnb*-Substanzen regulieren. Dies schließt möglicherweise Interaktionen zwischen den Biosynthesewegen ein, was durch die Wahrnehmung der Anwesenheit von **1** und **2** oder gemeinsamer biosynthetischer Zwischenprodukte vermittelt sein könnte. Eine detaillierte Analyse der Metabolome und assoziierter Phänotypen von einfachen oder doppelten *lna/lnb*-Genaktivierungs-Stämmen wird erforderlich sein, um das Ausmaß der Interaktionen zwischen den *lna/lnb*-Genloci aufzuklären und die Funktionen der identifizierten Metabolite für die Sklerotienbildung und andere Aspekte der Biologie von *A. flavus* aufzuklären.

Eingegangen am 15. September 2012,
veränderte Fassung am 8. November 2012
Online veröffentlicht am 20. Dezember 2012

Stichwörter: Genom-Mining · Naturstoffe · Piperazine · Sekundärmetabolismus · Vergleichende Metabolomik

- [1] P. Schneider, M. Misiek, D. Hoffmeister, *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 234.
- [2] a) J. M. Winter, S. Behnken, C. Hertweck, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 22; b) A. A. Brakhage, V. Schroekh, *Fungal Genet. Biol.* **2011**, *48*, 15; c) D. R. Georgianna, N. D. Fedorova, J. L. Burroughs, A. L. Dolezal, J. W. Bok, S. Horowitz-Brown, C. P. Woloshuk, J. Yu, N. P. Keller, G. A. Payne, *Mol. Plant Pathol.* **2010**, *11*, 213.
- [3] a) G. L. Challis, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2618; b) R. R. Forseth, E. M. Fox, D. Chung, B. J. Howlett, N. P. Keller, F. C. Schroeder, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9678; c) R. R. Forseth, F. C. Schroeder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 38; d) C. Pungaliya, J. Srinivasan, B. W. Fox, R. U. Malik, A. H. Ludewig, P. W. Sternberg, F. C. Schroeder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 7708.
- [4] a) M. A. Klich, *Mol. Plant Pathol.* **2007**, *8*, 713; b) T. Michailides, T. Thomidis, *Plant Pathol.* **2007**, *56*, 352.
- [5] a) M. T. Hedayati, A. C. Pasqualotto, P. A. Warn, P. Bowyer, D. W. Denning, *Microbiology* **2007**, *153*, 1677; b) A. Chakrabarti, S. S. Chatterjee, A. Das, M. R. Shivaprakash, *Med. Mycol.* **2011**, *49*, S35.
- [6] T. E. Cleveland, J. Yu, N. Fedorova, D. Bhatnagar, G. A. Payne, W. C. Nierman, J. W. Bennett, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 151.
- [7] J. Marui, N. Yamane, S. Ohashi-Kunihiro, T. Ando, Y. Terabayashi, M. Sano, S. Ohashi, E. Ohshima, K. Tachibana, Y. Higa, M. Nishimura, H. Koike, M. Machida, *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, *112*, 40.
- [8] a) S. Amaike, N. P. Keller, *Eukaryotic Cell* **2009**, *8*, 1051; b) J. W. Bok, S. A. Balajee, K. A. Marr, D. Andes, K. F. Nielsen, J. C. Frisvad, N. P. Keller, *Eukaryotic Cell* **2005**, *4*, 1574; c) D. Wu, S. Oide, N. Zhang, M. Y. Choi, B. G. Turgeon, *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002542.
- [9] D. E. Ehmann, A. M. Gehring, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6171.
- [10] S. Bergmann, J. Schümann, K. Scherlach, C. Lange, A. A. Brakhage, C. Hertweck, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 213.
- [11] D. L. Boger, J. C. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11426.
- [12] W. A. Ayer, P. P. Singer, *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2717.
- [13] a) E. Powell, S. X. Huang, Y. Xu, S. R. Rajski, Y. Wang, N. Peters, S. Guo, H. E. Xu, F. M. Hoffmann, B. Shen, W. Xu, *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80*, 1221; b) S. X. Huang, E. Powell, S. R. Rajski, L. X. Zhao, C. L. Jiang, Y. Duan, W. Xu, B. Shen, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3525.
- [14] J. H. Zhang, Q. R. Peng, S. X. Zhang, Y. B. Li, S. Q. Li, H. X. Gao, Z. Q. Zhou, *J. Mol. Struct.* **2011**, *987*, 34.
- [15] J. B. Gloer, M. R. TePaske, J. S. Sima, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5457.
- [16] P. Schneider, M. Weber, K. Rosenberger, D. Hoffmeister, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 635.
- [17] a) A. Pospiech, B. Cluzel, J. Bietenhader, T. Schupp, *Microbiology* **1995**, *141*, 1793; b) N. Kessler, H. Schuhmann, S. Morneweg, U. Linne, M. A. Marahiel, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 74137419.
- [18] K. L. Kavanagh, H. Jornvall, B. Persson, U. Oppermann, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 3895.
- [19] A. Andrianopoulos, S. Kourambas, J. A. Sharp, M. A. Davis, M. J. Hynes, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 1973.
- [20] a) D. C. Eastwood, et al., *Science* **2011**, *333*, 762; b) A. Olson, et al., *New Phytol.* **2012**, *194*, 1001.
- [21] K. E. Bushley, B. G. Turgeon, *BMC Evol. Biol.* **2010**, *10*, 26.