

Neue Lipoxygenase-/Hydroperoxid-Lyase-Bio-synthesewege im Moos *Physcomitrella patens*\*\*

Thomas Wichard, Cornelia Göbel, Ivo Feussner und Georg Pohnert\*

Lipoxygenasen (LOX) sind an der Biosynthese von zentralen Signal- und Verteidigungsmetaboliten in Säugetieren, höheren Pflanzen und Algen beteiligt.<sup>[1-4]</sup> Durch LOX katalysierte Biosynthesewege sind generell mit der Einführung von molekularem Sauerstoff in eine mehrfach ungesättigte Fettsäure verbunden. Die daraus resultierenden Hydroperoxide können zu kürzerkettigen sauerstoffhaltigen Produkten gespalten werden. Interessanterweise werden unterschiedliche Fettsäuren zur Produktion von Hydroperoxiden genutzt. Während Oxylipine in Pflanzen fast ausschließlich aus C<sub>18</sub>-Fettsäuren generiert werden,<sup>[1]</sup> nutzen sowohl Säugetiere als auch Algen bevorzugt C<sub>20</sub>-Fettsäuren.<sup>[3,5]</sup> Auch die weitere Umsetzung der intermediately auftretenden Hydroperoxide unterscheidet sich grundlegend: Aus Säugetieren sind bifunktionelle LOX bekannt, die auch die Hydroperoxidspaltung katalysieren, wogegen Pflanzen und Algen häufig Hydroperoxid-Lyasen (HPL) zur Generierung kürzerkettiger Oxylipine nutzen.<sup>[1-3]</sup> Wegen ihrer zentralen Stellung im Metabolismus sind LOX/HPL-Biosynthesewege in diesen Organismen gut untersucht. Dagegen ist nahezu nichts über verwandte Umsetzungen in Moosen bekannt. Da Moose phyletisch zwischen höheren Pflanzen und Algen eingeordnet werden, sind sie für die Untersuchung von LOX-Biosynthesewegen besonders interessant.

Von einigen Moosen ist bereits bekannt, dass sie unverzweigte C<sub>8</sub>- und C<sub>9</sub>-Alkohole sowie C<sub>8</sub>- und C<sub>9</sub>-Aldehyde über bisher unbekannte Biosynthesewege bilden.<sup>[6,7]</sup> Bei der Untersuchung von *Physcomitrella patens* fanden wir, dass auch dieses Laubmoos nach einer Gewebeverletzung flüchtige Oxylipine freisetzt. Darunter findet sich (E)-Non-2-enal (**4**), ein aus höheren Pflanzen bekannter, intensiv nach Gurken riechender Metabolit. Aber auch (R)-Oct-1-en-3-ol (**1**; 94 % ee),<sup>[8]</sup> eine Hauptaromakomponente aus Pilzen, und (E)-Oct-2-en-1-ol (**2**) sowie (E)-Oct-2-enal (**3**) konnten detektiert werden (Abbildung 1). (R)-**1** wird in Pilzen aus Linolsäure

[\*] T. WICHARD, DR. G. POHNERT

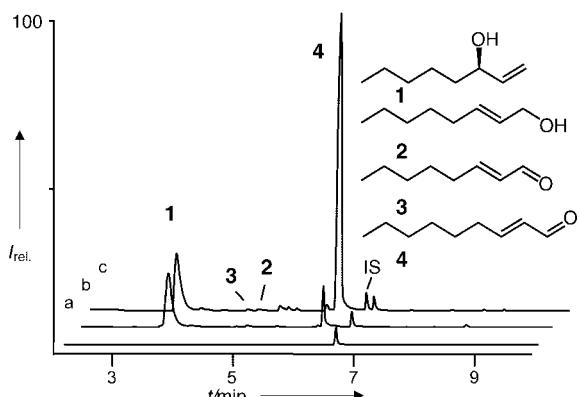
Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie  
Hans-Knöll-Straße 8, 07745 Jena (Deutschland)  
Fax: (+49) 3641-571-256  
E-mail: pohnert@ice.mpg.de

DR. C. GöBEL, PROF. DR. I. FEUSSNER  
Georg-August-Universität Göttingen  
Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften  
Justus-von-Liebig-Weg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)

[\*\*] Wir danken Prof. Dr. W. Boland für die Unterstützung dieser Arbeit.  
Der DFG (G.P.) und der EC (I.F.) danken wir für finanzielle  
Unterstützung.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter  
<http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor  
angefordert werden.



**Abbildung 1.** a) GC/MS des SPM-Extrakts (SPME = solid-phase micro-extraction, Festphasenmikroextraktion) von flüchtigen Verbindungen aus *P. patens*; b) wie a) aus dem verwundeten Moos; c) wie b) in Gegenwart von 200 µg Arachidonsäure pro ca. 100 mg *P. patens*. IS = Interner Standard; 2-Decanon.

generiert, die zunächst durch eine 10-LOX zum entsprechenden Hydroperoxid umgesetzt und dann durch eine Lyaseaktivität gespalten wird; dabei entsteht (*E*)-10-Oxodec-8-ensäure als zweites Bruchstück.<sup>[9–11]</sup> In höheren Pflanzen ist Linolsäure eine Vorstufe bei der Biosynthese von (*E*)-Non-2-enal (**4**) und (*Z*)-Non-3-enal (**8**). Hier sind eine 9-LOX und eine 9-HPL an der Produktion des C<sub>9</sub>-Aldehyds **8** und der 9-Oxononansäure beteiligt.<sup>[2,12]</sup>

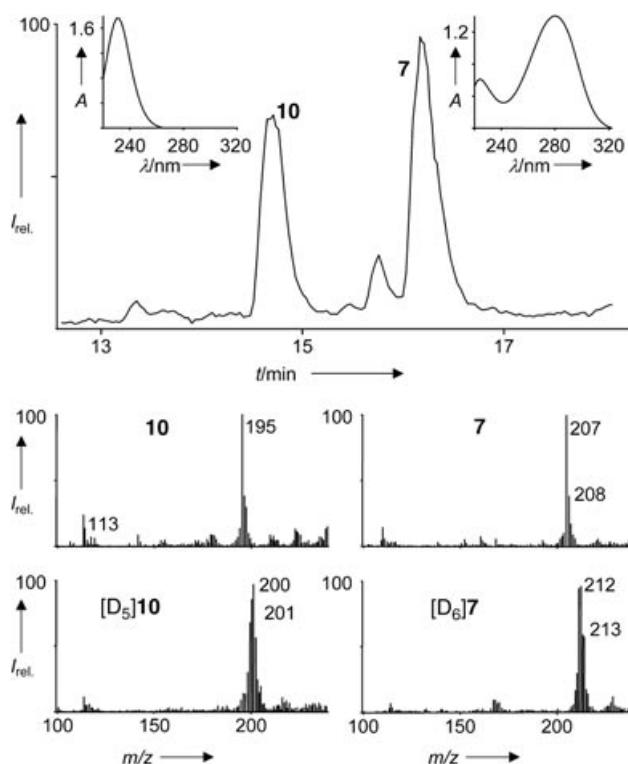
Wir fanden, dass eine Verwundung von *P. patens* in Gegenwart von Linol- oder  $\alpha$ -Linolensäure nicht zu einer signifikant erhöhten Produktion von **1–4** oder verwandten höher ungesättigten Metaboliten führt. Auch 10-Oxodec-8-ensäure oder 9-Oxononansäure, Verbindungen, die in Pflanzen oder Pilzen durch vergleichbare Umsetzungen gebildet werden, konnten in den Moospräparationen nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Moose offensichtlich andere Vorstufen zur Bildung von **1–4** nutzen. Anders als höhere Pflanzen enthält *P. patens* auch Arachidonsäure (**5**),<sup>[13]</sup> die wegen der Positionen der Doppelbindungen ebenfalls eine potenzielle Vorstufe der kurzkettigen Oxylipine sein könnte. Tatsächlich wird extern zugegebene Arachidonsäure (**5**) mit großer Effizienz zu **1–4** umgesetzt. Das wurde besonders bei der Umsetzung von [D<sub>8</sub>]Arachidonsäure durch *P. patens* deutlich: Nach Zugabe dieser markierten Fettsäure werden deuteriertes **1** (>400% Einbaurate), **2**, **3** und **4** (>1100% Einbaurate) gebildet (Abbildung 1). Dieser überraschende Befund – Arachidonsäure (**5**) wurde bisher noch nicht als Vorstufe von **1–4** identifiziert – motivierte uns zu einer genaueren Untersuchung der involvierten Biosynthesewege. Ablaufexperimenten zufolge ist eine Arachidonat-12-LOX an den Umsetzungen beteiligt. Durch das Reduktionsmittel Dimethylsulfid werden intermedial auftretende Hydroperoxide zu den entsprechenden Alkoholen umgesetzt, die keine Substrate für HPL sind.<sup>[3]</sup> Im intakten Moos fanden wir nach Reduktion keine endogenen hydroxylierten Fettsäuren, wohingegen schon Sekunden nach einer Verwundung (*S*)-12-Hydroxyarachidonsäure ((*S*)-12-HETE, 83% ee), (*S*)-15-HETE (56% ee) und Spuren von

nahezu racemischer 11-HETE nachgewiesen werden konnten. Das entsprechende 11-Hydroperoxid, 11-HPETE, könnte formal auch eine Zwischenstufe auf dem Weg zu den C<sub>9</sub>-Verbindungen sein, da es aber nur in geringen Mengen als Racemat vorkommt, handelt es sich eher um ein Autoxidationsprodukt der Arachidonsäure, das nicht aus enzymatischen Reaktionen hervorgegangen ist. Anders als die Menge an 11-HPETE steigt die Menge an 12-Hydroperoxyeicosatetraensäure (12-HPETE, **6**) während der ersten 30 Sekunden nach Zugabe von Arachidonsäure (**5**) zu verwundetem Moos stark an. Innerhalb der nächsten 16 Minuten – der Zeit, die auch für die Bildung der flüchtigen Verbindungen **1–4** und der Oxosäuren benötigt wird – nimmt die Menge an **6** dann wieder ab (siehe Hintergrundinformationen). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass (*S*)-12-HPETE aus der LOX-vermittelten Arachidonsäureoxidation ein Intermediat in der Biosynthese von **1–4** ist.

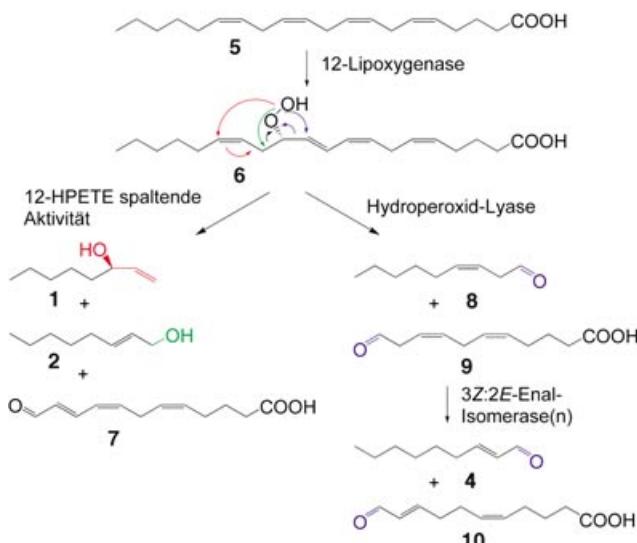
Zur weitergehenden Aufklärung des Mechanismus der Fettsäuretransformationen in *P. patens* haben wir die Natur der polaren Bruchstücke, die zusätzlich zu **1–4** aus der Spaltung von **6** resultieren, aufgeklärt. Die Identifizierung der Metaboliten gelang durch einen Vergleich der HPLC-MS-Chromatogramme von *P. patens*-Extrakten, die vor und nach der Verwundung angefertigt wurden. Eine Gewebeverletzung führt zur Neubildung von zwei dominanten, von Fettsäuren abgeleiteten Verbindungen. Das UV-Spektrum der weniger polaren Komponente ( $\lambda_{\text{max}} = 279$  nm) lässt auf eine  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -ungesättigte Carbonylverbindung schließen. Das Massenspektrum dieser Verbindung stimmt mit dem einer oxidierten C<sub>12</sub>-Säure wie (5Z,8Z,10E)-12-Oxododeca-5,8,10-triensäure (12-ODTE, **7**) überein (Abbildung 2). Eine Coinjektion mit synthetischem **7**<sup>[14]</sup> führte zum endgültigen Strukturdurchweis. Bei der anderen neu entstandenen Verbindung handelt es sich um 11-Oxoundeca-5,9-diensäure (11-OUDE, **10**).<sup>[15]</sup>

Die identifizierten Strukturen führen zu der in Schema 1 wiedergegebenen, postulierten Biosynthese für die Oxylipine: Demzufolge wird **5** zunächst, ohne vorhergehende Kettenverkürzung durch z. B.  $\beta$ -Oxidation, zum Hydroperoxid **6** umgewandelt, das dann zu den Oxosäuren und flüchtigen Verbindungen gespalten wird. Diese Biosynthesewege konnten durch Versuche mit [D<sub>8</sub>]Arachidonsäure bestätigt werden. Nach Applikation der markierten Fettsäure wiesen die Massenspektren von **6**, **7** und **10** Verschiebungen von +8, +6 oder +5 Masseneinheiten auf (Abbildung 2 und Hintergrundinformationen). Die übereinstimmend hohen Isotopen-einbauraten in **6** und in die kürzerkettigen Oxylipine zeigen, dass **5** die Vorstufe aller in Schema 1 gezeigten Oxylipine ist.

*P. patens* nutzt also bisher unbekannte Biosynthesewege zur Produktion bekannter LOX/HPL-Produkte. Die Biosynthese von **1**, **2** und **4** wird dabei durch eine 12-LOX initiiert, die **6** als Substrat für HPL oder andere Fettsäure spaltende Enzyme zur Verfügung stellt. Die weitere Umsetzung von **6** führt zur Bildung der C<sub>8</sub>-Metaboliten **1** und **2** sowie zu **7** als zweitem Bruchstück (Schema 1). Interessanterweise wurde **7** bereits aus Arachidonsäure-stimulierten menschlichen Blutplättchen nachgewiesen.<sup>[16]</sup> Dort fungiert diese Verbindung als Antagonist zu menschlichen Neutrophilen und interferiert wahrscheinlich mit der Leukotriens-B4-Bindungsstelle.<sup>[17]</sup> **7** wurde auch als Verteidigungsmetabolit in Diatomeen identi-



**Abbildung 2.** Oben: LC/MS eines Extrakts von *P. patens*, das in Gegenwart von 200 µg pro ca. 100 mg Moos verwundet wurde. Die Einschübe geben die UV-Spektren von **7** und **10** wieder. Unten: Massenspektren bei negativer Ionisierung der unmarkierten (oben) und markierten (unten) Oxosäuren, die nach Umsetzung mit **5** bzw. [D<sub>6</sub>]5 entstehen.



**Schema 1.** Vorgeschlagene Arachidonat-12-LOX/HPL-Biosynthesewege in *P. patens*. In Gegenwart von [D<sub>8</sub>]Arachidonsäure ([D<sub>8</sub>]5) kann [D<sub>8</sub>]HPETE ([D<sub>8</sub>]6) abgefangen werden. In den weiteren Reaktionen werden [D<sub>2</sub>]C8-Fragmente, [D<sub>6</sub>]7, [D<sub>3</sub>]4 und [D<sub>5</sub>]10 gebildet. Alle acht Deuteriummarkierungen aus [D<sub>8</sub>]5 werden somit in den Produkten gefunden.

fiziert.<sup>[18,19]</sup> Von diesen Algen wird allerdings (1E,3E)-Octa-1,3-dien als zweites Bruchstück von 12-HPETE freigesetzt. Das Moos produziert **7** also über einen gänzlich anderen Biosyntheseweg als Diatomeen.<sup>[14]</sup> In *P. patens* kann **6** auch zu (Z)-Non-3-enal (**8**) und (5Z,8Z)-11-Oxoundeca-5,8-diensäure (**9**) umgesetzt werden. Diese Transformation wird wahrscheinlich durch eine HPL katalysiert. Ähnlich wie bei gut untersuchten Umsetzungen in höheren Pflanzen könnten diese Intermediate dann schnell durch eine 3Z:2E-Enal-Isomerase zu **4** und **10** umgewandelt werden (Schema 1).<sup>[12,20]</sup>

Unsere Ergebnisse zeigen, dass das Moos *P. patens* neue LOX-Biosynthesewege für die Produktion von Oxylipinen mit vielfältigen Strukturen nutzt. Es setzt Metaboliten frei, die als typisch für Säugetiere, Pflanzen, Pilze oder Algen angesehen wurden. In bisher nicht bekannter Weise werden biosynthetische Motive all dieser Organismen dazu genutzt, Arachidonsäure zu transformieren. Es ist bekannt, dass Moose ausgesprochen resistent gegen Herbivore und Pathogene sind. In höheren Pflanzen werden derartige Resistenzen oft durch Lipoxygenasen vermittelt.<sup>[21]</sup> Es wird in Zukunft von besonderem Interesse sein, herauszufinden, ob und wie die hier neu identifizierten Biosynthesewege zur Produktion von Signal- oder Verteidigungsmetaboliten genutzt werden und so zur Resistenz der Moose beitragen können.

## Experimentelles

Allgemeine Methoden: *P. patens*-Kulturen wurden von Prof. Dr. Ralf Reski, Freiburg, zur Verfügung gestellt und mit bereits beschriebenen Methoden kultiviert.<sup>[22]</sup> Zur Vorbereitung der Proben für die MS-Analyse wurden 5 mL einer dichten Kultur zum Sedimentieren stehen gelassen und das überstehende Medium mit einer Pasteurpipette entfernt. Das so erhaltene Pellet von 100 bis 200 mg Feuchtgewicht wurde in 1 mL frischem Medium resuspendiert und entweder direkt oder nach Behandlung mit 20 µL einer Lösung der jeweiligen Fettsäuren (10 mg mL<sup>-1</sup> Ethanol) weiterverwendet. Die Suspensionen wurden 2 min im Eisbad mit einem Ultraschall-Desintegrator behandelt. Für die SPME-Analyse wurden die Probengefäße mit einem Teflonseptum versiegelt und 15 min mit einer Polydimethylsiloxanfaser (Supelco) extrahiert. Die GC/MS-Analyse erfolgte nach einer bekannten Methode.<sup>[14]</sup> Käufliche Standards wurden zur Identifizierung von **1–4** herangezogen. Teil der Probenvorbereitung für die LC/MS-Analyse war eine Ultraschallbehandlung wie oben beschrieben. 30 s oder 16 min nach Zellverletzung wurde 1 mL MeOH zugegeben, zentrifugiert (5 min, 12000 rpm) und der Überstand direkt zur Analyse an einer Agilent HP1100/Finnigan LCQ verwendet.

Die intermediären Hydroperoxide in den mit Arachidonsäure behandelten Suspensionen wurden durch Zugabe einer 10-proz. Dimethylsulfid-Lösung in MeOH reduziert. Der ee-Wert der resultierenden Alkohole wurde nach einer bekannten Methode bestimmt.<sup>[23]</sup> Mittelwerte aus Messungen nach 30 s, 2 min, 8 min, 15 min und 30 min wurden bestimmt.

Eingegangen am 17. Mai 2004,  
veränderte Fassung am 30. Juli 2004

**Stichwörter:** Biosynthese · Fettsäuren · Massenspektrometrie · Oxylipine · UV/Vis-Spektroskopie

- 
- [1] I. Feussner, C. Wasternack, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2002**, *53*, 275–297.
- [2] M. A. Noordermeer, G. A. Veldink, J. F. Vliegenthart, *Chem.-BioChem* **2001**, *2*, 494–504.
- [3] G. Pohnert, W. Boland, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 108–122.
- [4] A. R. Brash, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23679–23682.
- [5] W. H. Gerwick, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1211*, 243–255.
- [6] M. Toyota, T. Saito, J. Matsunami, Y. Asakawa, *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1265–1270.
- [7] V. M. Dembitsky, *Prog. Lipid Res.* **1993**, *32*, 281–356.
- [8] Die Enantiomerenreinheit von (3*R*)-**1** wurde nach Derivatisierung mit Trifluoressigsäureanhydrid/Pyridin durch GC im Vergleich mit käuflichen Standards bestimmt (GC-Säule: Macherey-Nagel, Hydrodex- $\beta$ -3P, 25 m, id 0.25 mm).
- [9] K. Matsui, S. Sasahara, Y. Akakabe, T. Kajiwara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 2280–2282.
- [10] M. Wurzenberger, W. Grosch, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *794*, 18–24.
- [11] M. Wurzenberger, W. Grosch, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1982**, *175*, 186–190.
- [12] M. A. Noordermeer, G. A. Veldink, J. F. G. Vliegenthart, *FEBS Lett.* **1999**, *443*, 201–204.
- [13] N. H. Grimsley, J. M. Grimsley, E. Hartmann, *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1519–1524.
- [14] G. Pohnert, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4506–4508; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4352–4354.
- [15] Das Massenspektrum von **10** legt die Struktur einer oxidierten C<sub>11</sub>-Fettsäure nahe, und das UV-Maximum bei 230 nm zeigt ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Aldehyd-Strukturelement an (Abbildung 2). Die Struktur von **11** wurde zusätzlich durch GC/MS der derivatisierten Extrakte bestätigt (siehe Hintergrundinformationen).
- [16] W. C. Glasgow, T. M. Harris, A. R. Brash, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 200–204.
- [17] P. H. Naccache, Y. Leblanc, J. Rokach, P. Patrignani, B. F. Delaclos, P. Borgeat, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1133*, 102–106.
- [18] S. Adolph, S. A. Poulet, G. Pohnert, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3003–3008.
- [19] G. Pohnert, O. Lumineau, A. Cueff, S. Adolph, C. Cordevant, M. Lange, S. Poulet, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2002**, *245*, 33–45.
- [20] D. R. Phillips, J. A. Matthew, J. Reynolds, G. R. Fenwick, *Phytochemistry* **1979**, *18*, 401–404.
- [21] P. Kenrick, P. R. Crane, *Nature* **1997**, *389*, 33–39.
- [22] T. Girke, U. Schmidt, R. Reski, E. Heinz, *Plant J.* **1998**, *15*, 39–48.
- [23] A. R. Brash, D. J. Hawkins, *Methods Enzymol.* **1990**, *187*, 187–195.