

Chemische Verteidigung

Neue acetylenische Oxylipine mit fraßhemmenden Eigenschaften gegen herbivore Schnecken aus dem Moos *Dicranum scoparium***

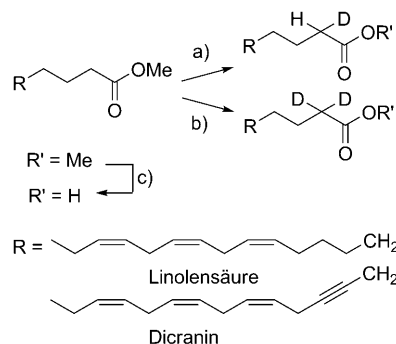
Martin Rempt und Georg Pohnert*

Professor Wilhelm Boland zum 60. Geburtstag gewidmet

Beobachtungen zeigen, dass selbst in Regionen, in denen Herbivore intensiv höhere Pflanzen befallen, Moose selten gefressen werden. Die ersten Untersuchungen von Ernst Stahl über die chemische Verteidigung von Pflanzen und Moosen gegen Schnecken liegen nun mehr als 100 Jahre zurück,^[1] dennoch wissen wir auch heute noch wenig über die Beschaffenheit und Biosynthesen der beteiligten Verteidigungsmetaboliten in Moosen.^[2,3] *Dicranum scoparium*, das in dichten Polstern in Wäldern der arktischen und gemäßigten Klimazonen vorkommt, ist ein Beispiel für ein gut verteidigtes Moos, das in der Natur wenige bis keine Fraßspuren aufweist. Unlängst zeigte ein Screening, dass *D. scoparium* durch die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren zahlreiche flüchtige Oxylipine produziert.^[4] Aus diesem Moos wurden außerdem ungewöhnliche acetylenische Cyclopentenone isoliert, die wahrscheinlich auch über Oxylin-Stoffwechselwege aus der im Moos dominanten acetylenischen Fettsäure Dicranin biosynthetisiert werden.^[5]

Motiviert durch die Beobachtung, dass in anderen Organismen Oxylipine oft direkt als Verteidigungsmetabolite fungieren oder an der Regulation von Verteidigungsreaktionen beteiligt sind,^[6,7] untersuchen wir die chemische Ökologie dieser Verbindungen aus *D. scoparium*. Analog zu höheren Pflanzen und Diatomeen wird auch in Moosen die Synthese von flüchtigen Oxylipinen durch mechanische Verwundung ausgelöst.^[6,8] Ein Vergleich der UPLC/MS-Profile (Ultra Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) der Methanolextrakte von intaktem und verwundetem Moos zeigt, dass eine Verwundung in der massiven Produktion einer komplexen Mischung von nichtflüchtigen Verbindungen resultiert (Abbildung 1). Da die Chromatogramme eine Vielzahl von Signalen lieferten, suchten wir nach Möglichkeiten, die Produkte einzelner Stoffwechselwege durch den Einsatz von markierten Biosynthesestufen zu identifizieren. Eine einfache Synthese mono- und dideuterierter Fettsäuren ermöglichte es, die notwendigen stabilisotop mar-

kiernten Vorstufen herzustellen (Schema 1). Diese wurden dann als wässrige Suspension zu feingemörstem gefrorenen Moos appliziert. Nach 10 Minuten konnten die de novo gebildeten Oxylipine extrahiert werden. Dabei stellte sich heraus, dass die acetylenische Fettsäure Dicranin als Vorstufe für zahlreiche, zum Teil bis dahin unbekannte, Oxylipine von besonderem Interesse ist.



Schema 1. Synthese mono- und dideuterierter Fettsäuren. a) LDA, Abfangen mit MeOD; b) NaOMe/MeOD; c) KOH/H₂O.

Da nicht alle Oxylipine chromatographisch getrennt werden konnten, gestaltete sich die manuelle Identifizierung aller relevanten Signale der UPLC/MS-Analysen schwierig. Wir entwickelten deshalb eine automatisierte Analysenmethode, die die markierten Metaboliten erfasst. Zunächst wurden alle Masse-Retentionszeit-Paare durch automatische Peakerkennung aus den Chromatogrammen extrahiert. Diese Datensätze wurden für nichtbehandelte Kontrollen und Umsetzungen in Gegenwart von einfach und doppelt deuterierten Fettsäuren erhoben. Die weitere Auswertung beruhte auf einer CAP-Analyse (Canonical Analysis of Principal components),^[9] die dann eine direkte Zuordnung von Dicranin abgeleiteter Signale ermöglichte (Abbildung 1; siehe die Hintergrundinformationen für Details). Im Vergleich zur etablierten manuellen Auswertung von Einbaumustern ermöglicht diese automatisierte Methode eine schnellere und vollständigere Analyse der Produkte spezifischer Stoffwechselwege. Somit kann der gesamte Polaritätsbereich abgedeckt werden, der in der LC/MS erfasst wird. Es werden auch Spurenkomponenten und chromatographisch nicht getrennte Metaboliten erkannt.

Der Einsatz zweier Vorstufen mit unterschiedlichem Markierungsgrad in unabhängigen Experimenten unterstützt die automatisierte Datenauswertung, ist aber nicht unbedingt

[*] M. Rempt, Prof. Dr. G. Pohnert

Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Bioorganische Analytik, Friedrich-Schiller-Universität
Lessingstraße 8, 07743 Jena (Deutschland)
Fax: (+49) 3641-948-172
E-Mail: Georg.Pohnert@uni-jena.de
Homepage: http://www.uni-jena.de/Prof_Dr_Georg_Pohnert.html

[**] Wir danken der DFG (PO628/5-1) und der Volkswagen-Stiftung für finanzielle Unterstützung. Paulina Dabrowska danken wir für die Unterstützung bei GC/MS-Untersuchungen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201000825> zu finden.

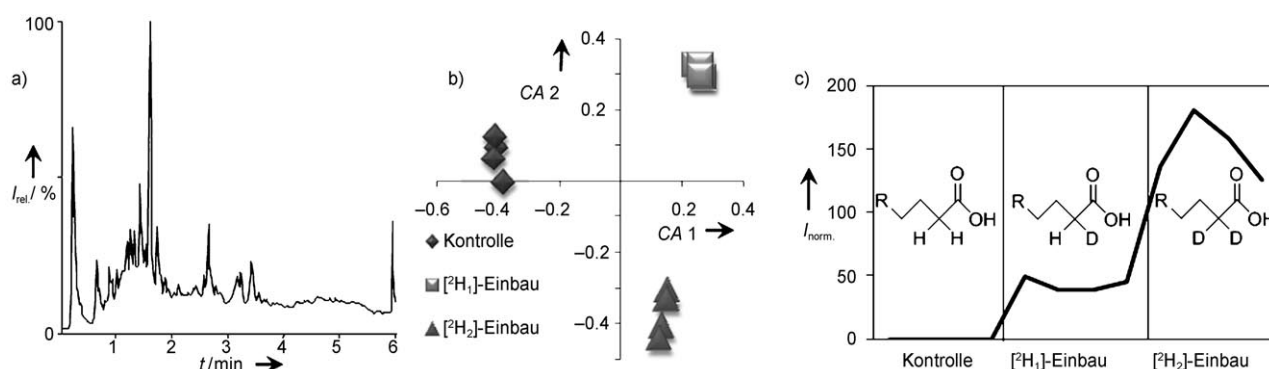
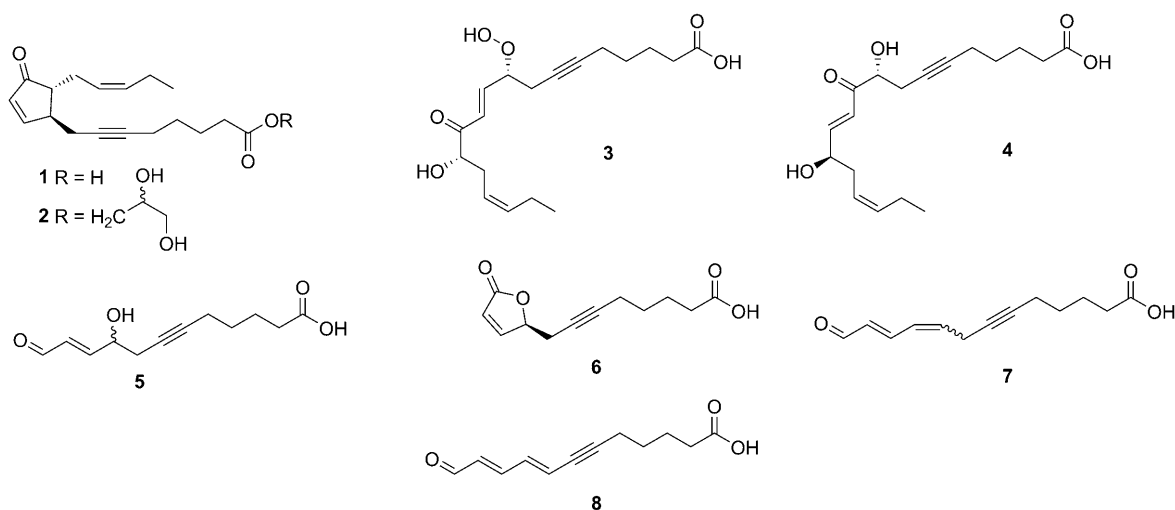


Abbildung 1. Suche nach von Dicranin abgeleiteten Metaboliten: a) Masse-Retentionszeit-Paare werden mit einer automatischen Routine aus UPLC/MS-Chromatogrammen (z. B. Kontrolle, nach Zugabe von $[^2\text{H}_1]$ - oder $[^2\text{H}_2]$ -markierten Fettsäuren) extrahiert. $I_{\text{rel.}}$ = relative Intensität im Vergleich zum höchsten Signal. b) Die Daten aller Replikate werden mit CAP evaluiert und in einem Diagramm mit kanonischen Achsen (CA) aufgetragen. Drei gut getrennte Gruppen, die für die unterschiedlich markierten Produkte stehen, sind erkennbar. c) Auftragung der auf die Gesamtintensität normierten Intensität $I_{\text{norm.}}$ eines Markersignals (hier 2 amu höher als das $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Signal der unmarkierten Verbindung).

erforderlich. In unserem Fall wurden die Daten aus der Umsetzung der zweiten markierten Vorstufe als unabhängige Kontrolle genutzt, und nur Verbindungen, die je nach applizierter Vorstufe einfach oder doppelt deuteriert nachgewiesen werden konnten, wurden weiterverfolgt (Abbildung 1 c). Wird nur eine markierte Vorstufe eingesetzt, empfiehlt sich eine manuelle Überprüfung der identifizierten Signale, um falsch-positive Zuordnungen zu vermeiden. Anhand der durch CAP identifizierten Masse-Retentionszeit-Paare konnten die von Dicranin abgeleiteten Verbindungen mithilfe von präparativer HPLC aufgereinigt werden. Die Strukturaufklärung der Verbindungen 2–6 und 8 stützt sich auf ein- und zweidimensionale NMR-Experimente sowie auf MS-, UV- und IR-Daten. Der Strukturvorschlag für 7 wurde anhand von GC/MS-Daten einer derivatisierten Probe dieser Verbindung erarbeitet. Die absoluten Konfigurationen der optisch aktiven Verbindungen wurden nach der Mosher-Methode oder durch Vergleich von gemessenen und berechneten CD-Spektren zugeordnet. (Ausführliche Beschreibungen der Strukturaufklärungen, spektroskopische Daten und Spektren

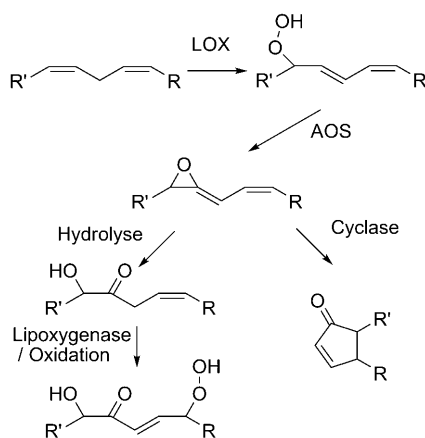
finden sich in den Hintergrundinformationen.) Nach dem oben beschriebenen Schema konnten sieben neue, von Dicranin abgeleitete Verbindungen charakterisiert werden (Schema 2).

Auch die literaturbekannten antimikrobiellen Cyclopentenone Dicranenon A (**1**) und B₁ wurden mit der CAP/NMR-Routine identifiziert.^[5] Diese chiralen Dicranenone wurden nach Applikation von markierten Vorstufen mit einem hohen Deuterierungsgrad (bis 80 %) nachgewiesen. Dies zeigt, dass alle Enzyme der Cyclopentenon-Biosynthesen nach Verwundung von *D. scoparium* aktiv sind. Wir konnten auch das markierte Monoacylglycerin **2** nachweisen, das vermutlich durch lipasekatalysierte Veresterung von de novo synthetisiertem Dicranenon A (**1**) mit Glycerin entsteht. Neben den Cyclopentenonen konnten auch die hoch funktionalisierten offenkettigen C₁₈-Oxylipine **3** und **4** nachgewiesen werden. Das (*E*)-5-Hydroperoxy-1-hydroxypent-3-en-2-on-Strukturmotiv von **3** kommt selten in Naturstoffen vor und ist bisher nur aus einem von Linolensäure abgeleiteten Metaboliten aus Flachssamen bekannt.^[10] Die (*E*)-1,5-Dihydroxypent-3-en-2-



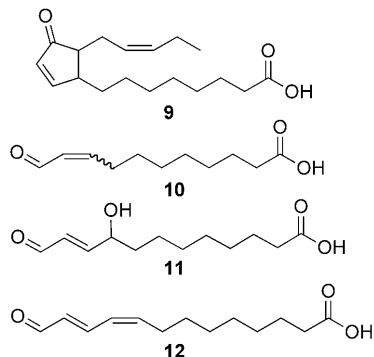
Schema 2. Neue von Dicranin abgeleitete Naturstoffe aus dem Moos *D. scoparium*.

on-Struktur von **4** wurde bisher nur für einen Linolensäure-metaboliten von Mais postuliert.^[11] Sowohl **3** als auch **4** sind optisch aktiv, was zeigt, dass zumindest die ersten Schritte der Fettsäuretransformation zu α -Ketolen und eventuell auch die weitere Oxidation enzymkatalysiert ablaufen (Schema 3).



Schema 3. Biosynthese der Verbindungen **1–4**. AOS = Allenoxid-Synthase.

Nach demselben experimentellen Schema konnten nach Applikation von anderen deuterierten Fettsäuren und CAP auch z. B. von Linolensäure abgeleitete Produkte identifiziert werden (Schema 4). Die Charakterisierung der literaturbekannten Verbindungen erfolgte in diesem Fall mit GC/MS-



Schema 4. Von Linolensäure abgeleitete Verbindungen.

Methoden nach Derivatisierung der Analyte. Der Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit synthetischen Verbindungen und isolierten bekannten Naturstoffen lieferte hier den Strukturbeweis (siehe die Hintergrundinformationen). 12-Oxophytodiensäure (**9**) konnte im Moos gefunden werden, hingegen war das Pflanzenhormon Jasmonsäure, dessen Biosynthese in höheren Pflanzen von **9** ausgeht, nicht nachweisbar.^[7] In den Extrakten konnten wir auch die kürzerkettigen Oxylipine **10–12** detektieren.

Die De-novo-Produktion aller identifizierten Oxylipine **1–12** kann mit Biosynthesewegen ausgehend von 9- oder 13-Lipoxygenasen erklärt werden. Die zunächst erzeugten 9-

oder 13-Hydroperoxide können über Allenoxid-Synthesewege weiter umgesetzt werden, und die intermediären Allenoxide können dann zu **1–4** und **9** cyclisiert oder hydrolysiert werden (Schema 3). Transformationen der Hydroperoxide durch Hydroperoxid-Lyasen oder Lipoxygenasen mit Hydroperoxid-Lyase-Aktivität würden die Biosynthesen von **5–8** und **10–12** erklären.^[12] Da die beobachteten C_{12} - und C_{13} -Verbindungen von C_{18} -Fettsäuren abgeleitet sind, könnten als zusätzliche Fragmente der Transformationen auch flüchtige C_5 - und C_6 -Verbindungen freigesetzt werden. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der berichteten Freisetzung von 1-Penten-3-on, (*E*)-2-Pentalen, Hexenol und Hexenal nach mechanischer Verwundung von *D. scoparium*.^[4]

Die aufgereinigten Verbindungen dienten als Standard für die Quantifizierung der Oxylinproduktion mit UPLC/MS. Oxyline wurden nur in den grünen, blattartigen Phylloiden des Mooses gebildet, nicht aber in den verholzten Stämmen. *D. scoparium*-Phylloide produzierten bis zu 4,5 mg des Hauptmetaboliten **1** pro Gramm Feuchtgewicht. Somit werden durch Verwundung große Mengen an zum Teil reaktiven Oxylinen freigesetzt.

Da Oxyline in höheren Pflanzen oft als Verteidigungsmetabolite diskutiert werden, überprüfen wir auch die fraßhemmende Wirkung dieser Verbindungen aus dem Moos.^[6,8] Wir testeten das nichtfraktionierte Oxylinextrakt und reines Dicranenon A (**1**) gegen die herbivore Nacktschnecke *Arion lusitanicus* Mabilie. Das Fraßverhalten dieser Schnecke, die in gemäßigten Klimazonen weit verbreitet ist,^[13] wurde einem Standardprotokoll für Bioassays folgend untersucht.^[14] Die Testsubstanzen wurden dazu in Methanol gelöst und auf frische Eisbergsalat-Blätter gesprüht. Mit Methanol besprühte Salatblätter dienten als Kontrolle. Die Fraßaktivität der Nacktschnecken konnte dann durch Auswiegen der Salatblätter nach Versuchsende bestimmt werden (siehe die Hintergrundinformationen für Details). Wurden die Salatblätter mit dem nichtfraktionierte Oxylinextrakt behandelt (appliziert in 10facher Verdünnung, verglichen zu der im verwundeten Moos vorliegenden Konzentration), wurde die Fraßaktivität der Schnecken stark herabgesetzt. Sogar in 1000facher Verdünnung war das Extrakt noch signifikant aktiv (Abbildung 2). Bei der Bewertung dieser Ergebnisse muss in Betracht gezogen werden, dass der Beitrag der Oxyline zur chemischen Verteidigung sogar noch unterbestimmt wurde, da einige der identifizierten reaktiven Verbindungen unter den Versuchsbedingungen nicht stabil sind. Selbst wenn aus dem komplexen Gemisch an Oxylinen nur die einzelne Verbindung Dicranenon A (**1**) als Reinsubstanz getestet wurde, konnte noch in 10facher Verdünnung verglichen zur Konzentration im verwundeten Moos eine signifikante Reduktion der Nahrungsaufnahme der Nacktschnecken beobachtet werden. Die Aktivität des Rohextrakts und der reinen Verbindung belegt einen signifikanten Beitrag von Oxylinen zur chemischen Verteidigung des Mooses.

Wir haben hier mit einer neuen Methode zur Untersuchung von Biosynthesen gezeigt, dass *D. scoparium* nach Verwundung eine komplexe Mischung an zum Teil hochreaktiven Oxylinen freisetzt, die stark zur chemischen Verteidigung dieses Mooses beiträgt. Da zahlreiche Moose nach Verwundung Oxyline produzieren^[4] kann vermutet werden,

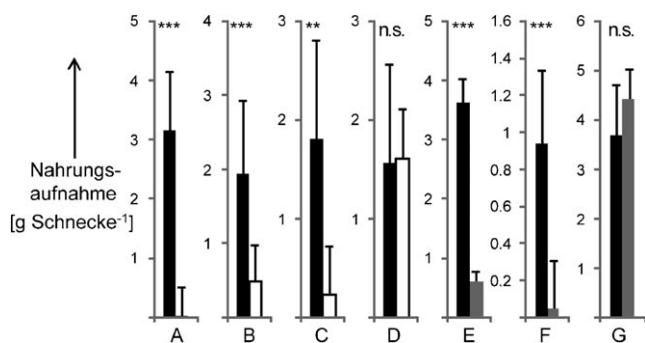


Abbildung 2. Fraßversuche mit dem Oxylin-reichen Rohextrakt (A–D) und aufgereinigtem Dicranenon A (1; E–G) aus *D. scoparium*. Weiße Balken zeigen die Fraßaktivität auf mit Rohextrakt behandeltem Salat und graue Balken die Aktivität auf mit 1 behandeltem Futter. Die schwarzen Balken repräsentieren die Ergebnisse der Lösungsmittelkontrolle (Methanol). Das Rohextrakt wurde im Vergleich zur natürlichen Konzentration in (A) 1:10 verdünnt, in (B) 1:100 verdünnt, in (C) 1:1000 verdünnt und in (D) 1:10000 verdünnt appliziert. (E) enthielt 1 in natürlicher Konzentration, (F) 1:10 verdünnt, (G) 1:100 verdünnt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an ($n = 15$). *** $p < 0.005$, ** $p = 0.010$, n.s. = nicht signifikant im t-test.

dass derartige Verbindungen generell an der chemischen Verteidigung der Moose mitwirken.

Experimentelles

Eine ausführliche Beschreibung der Experimente, die die Extraktion, die chemoinformatische Datenverarbeitung, die Strukturaufklärung,

Bioassays und die spektroskopischen Daten enthält, findet sich in den Hintergrundinformationen. Dort sind auch die für die Strukturaufklärung wichtigen Spektren wiedergegeben.

Eingegangen am 10. Februar 2010,
veränderte Fassung am 24. März 2010
Online veröffentlicht am 8. Juni 2010

Stichwörter: Biosynthese · Bryophyten ·
Chemische Verteidigung · Massenspektrometrie · Moose

- [1] E. Stahl, *Jena. Z. Naturwiss.* **1888**, 22, 557.
- [2] W. P. Haines, J. A. A. Renwick, *Entomol. Exp. Appl.* **2009**, 133, 296.
- [3] J. D. Parker, D. E. Burkepille, D. O. Collins, J. Kubanek, M. E. Hay, *Oikos* **2007**, 116, 302.
- [4] E. Croisier, M. Rempt, G. Pohnert, *Phytochemistry* **2010**, 71, 574.
- [5] T. Ichikawa, M. Namikawa, K. Yamada, K. Sakai, K. Kondo, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 3337.
- [6] K. Matsui, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, 9, 274.
- [7] E. Blée, *Prog. Lipid Res.* **1998**, 37, 33.
- [8] G. Pohnert, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 4506; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4352.
- [9] M. J. Anderson, T. J. Willis, *Ecology* **2003**, 84, 511.
- [10] A. N. Grechkin, R. A. Kuramshin, S. K. Latypov, Y. Y. Safonova, T. E. Gafarova, A. V. Ilyasov, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 199, 451.
- [11] J. Abian, E. Gelpi, M. Pages, *Plant Physiol.* **1991**, 95, 1277.
- [12] T. Wichard, C. Göbel, I. Feussner, G. Pohnert, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 161–164; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 158.
- [13] T. Briner, T. Frank, *Ann. Appl. Biol.* **1998**, 133, 123.
- [14] J. P. Frahm, K. Kirchoff, *Cryptogamie, Bryologie* **2002**, 23, 271.