



Einleitung

1.1. Verteidigungsmechanismen von Pflanzen

1.1.1. Die konstitutive Pflanzenabwehr

Die Ansiedlung von Pflanzen auf dem Land reicht bis zum mittleren Ordovizium (476-432 Mio. Jahren) zurück, als die ersten Sporttraden weite Gebiete bedeckten (Kenrick and Crane, 1997). Als sessile Organismen waren und sind Pflanzen sehr anfällig für Bedrohungen, jedoch kam es zu einer rasanten Entwicklung und Verbreitung und schon bald waren sie die vorherrschende Lebensform auf der Landoberfläche mit der größten Biomasse.

Damit stellt sich die Frage nach ihren Überlebensstrategien und Abwehrmechanismen (Howe and Schaller, 2008), die schon intensiv untersucht wurden, aber immer noch sehr viel Raum für Spekulationen bieten. Wegen ihrer sessilen Lebensweise entwickelten Pflanzen im Laufe der Evolution eine Vielzahl an effektiven Strategien, um sich gegen biotische und abiotische Stressformen zu verteidigen (Perez-Clemente et al., 2013). Da Pflanzen auch schon seit einigen Millionen Jahren mit ihren Fraßfeinden kompetitieren, führte dies zur Ausbildung komplexer Abwehrstrategien (Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

Den äußersten Schutzwall bilden mechanische Barrieren, die alle Pflanzenoberflächen einschließen. Die äußere Rinde, Dornen, Stacheln und Trichome sind nur einige Beispiele, die zeigen, dass Pflanzen sich wie eine Festung gegen Bedrohungen abkapseln (Horsfall and Cowling, 1980). Die Kutikula, die Epidermis, der Wurzelcortex, Zellulose, Hemizellulose, Lignin und die äußeren Membranen dienen zusätzlich nicht nur der mechanischen Stabilität, sondern sind auch sehr effektiv gegen biotische und abiotische Gefahren. Dies ist ein primärer Schutz gegen den Befall von herbivoren Fraßfeinden (Ryan 2000), aber auch gegen andere Pathogene wie Pilze, Viren



Einleitung

und Bakterien, die das Pflanzenwachstum behindern, die Entwicklung verändern und die Samenproduktion reduzieren (Brown and Tellier, 2011). Weiterhin wurde auch schon früh erkannt, dass Pflanzen sekundäre chemische Abwehrsubstanzen (Sekundärmetaboliten) und Proteine besitzen, die repellent auf Frassfeinde wirken (Thorsteinson et al., 1953). Hierbei wird differenziert zwischen konstitutiven (konstanten) und induzierbaren (regulierbaren) Pflanzenabwehrstoffen (Howe and Schaller, 2008). Die konstitutive Verteidigung wirkt vorbeugend, auch ohne Interaktion mit Frassfeinden, und es sind das Alter, die Lichtverhältnisse und andere Umweltfaktoren, die Einfluß auf die chemische Zusammensetzung von Pflanzen nehmen (Ehrlich and Raven, 1964). Diese Verteidigungsmechanismen müssen nicht erst durch bestimmte Faktoren wie Fraß oder Beschädigung aktiviert werden, sondern sie wurden durch Selektion und Ko-Evolution (Ehrlich und Raven, 1964; Brown und Tellier, 2011; War et al., 2012) präventiv bei der Pflanze ausgebildet. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei Terpenoide und Alkaloide, die toxisch auf Pathogene und herbivore Frassfeinde, aber auch auf Säugetiere wirken können (Gershenzon, 1994; Wittstock and Gershenzon, 2002). Terpenoide kommen in allen Pflanzen vor und repräsentieren die größte Klasse an Sekundärmetaboliten mit über 22,000 beschriebenen Verbindungen. Dazu gehört beispielsweise das Gossypol der Baumwolle (*Gossypium hirsutum*), das starke antifungale und antibakterielle Eigenschaften besitzt (Freeman and Beattie, 2008). Trichome spielen bei der konstitutiven Abwehr eine wesentliche Rolle, da sie ein breites Spektrum dieser spezialisierten Sekundärmetaboliten produzieren und speichern, welche toxische oder repellente Effekte gegen Pathogene ausüben (Agren et al., 2008). Tatsächlich scheinen sie auch die Hauptproduktionsstätte von Terpenoiden auf kultivierten Tomaten zu sein (Schillmiller et al., 2009; Kang et al., 2010). Alkaloide sind eine weitere Klasse bitter-schmeckender, stickstoffhaltiger Verbindungen, die in vielen Pflanzen identifiziert wurden (Freeman and Beattie, 2008). Ein gut bekanntes Beispiel aus der Familie der *Solanaceae* ist der Tabak, welcher das für Insekten toxische Alkaloid Nikotin konstitutiv produziert. Wohlwissend, dass Nikotin in der Wurzel produziert wird, wurden schon Mitte der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts



Einleitung

Experimente durchgeführt, bei denen Kartoffelpflanzen auf die Wurzel von Tabakpflanzen aufgepfropft wurden. Diese Pflanzen waren nun vollständig resistent gegen Kartoffelkäfer, da das Nikotin aus der Wurzel in sämtliche Gewebe transportiert wurde (Fraenkel, 1959).

Chemische Abwehrstoffe wurden aufgrund der aufwendigen Biosynthese und ihrer Toxizität lange für kostspielig gehalten (Wittstock and Gershenzon, 2002). Dies bestätigt sich durch die Behauptung, dass Pflanzen, die aufgrund fehlender Feinde einem weniger kontinuierlichen Selektionsdruck ausgesetzt sind, eine ausgeprägtere induzierbare Abwehr besitzen (Wittstock and Gershenzon, 2002), und dass bestimmte abwehrbezogene Metabolite ausschließlich in Geweben vorhanden sind, die von Pathogenen und Frassfeinden attackiert werden (Hrazdina et al., 1982).

Die Pflanzenabwehr wird durch eine Reihe von Signaltransduktionswegen reguliert und kontrolliert. Diese sind auch Bestandteil der induzierten Abwehr, die erst durch Pathogenbefall oder Insektenfraß aktiviert werden muss (Howe and Schaller, 2008).

1.1.2. Die induzierte Pflanzenabwehr

Ein Weg für die Pflanze die kostspielige konstitutive Synthese von Abwehrkomponenten zu reduzieren ist, die Synthese erst nach Beginn durch Schäden von Herbivoren oder Pathogenen zu starten (Wittstock und Gershenzon, 2002). Im Gegensatz zu konstitutiven Verteidigungsmechanismen entstehen bei der sogenannten induzierbaren Abwehr keine Fitnesskosten, wenn kein Befall durch Schädlinge vorliegt (Purrington, 2000). Die induzierte Pflanzenabwehr steigert allerdings die Fitness, wenn die Pflanzen einer Vielzahl an Schädlingen ausgesetzt sind (Howe and Schaller, 2008).

Die erste Stufe der induzierten Pflanzenabwehr ist die Basalabwehr, auch angeborene Immunität genannt und sie findet am Ort des Befalls (lokal) statt (Sequeira, 1983). Sie ist zuständig, um die Pflanze gegen zahlreiche Gruppen von Pathogenen zu schützen und wird durch die Erkennung von

Pathogen/Mikroben-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs/MAMPs) induziert, welche zur PAMP-ausgelösten Immunität (PTI; PAMP-triggered immunity) führt (Jones and Dangl, 2006). Dabei dienen spezifische Proteine, Lipopolysaccharide und Zellwandbestandteile, welche häufig in mikrobiellen Organismen gefunden werden, als Botenstoffe oder Elicitoren. Sowohl Pathogene, wie auch Nicht-Pathogene, sind aufgrund der weiten Verbreitung dieser Bestandteile in der Lage die PTI auszulösen (Freeman and Beattie, 2008). Das wohl bekannteste Beispiel ist bakterielles Flagellin, welches die Abwehr in zahlreichen Pflanzen auslöst (Gomez-Gomez and Boller, 2002). Pathogene haben allerdings Mechanismen entwickelt, um die basale Antwort in bestimmten Pflanzen durch Effektoren zu unterdrücken, welche auch als Effektor-ausgelöste Empfindlichkeit (ETS, Effector-triggered susceptibility) bezeichnet wird (Jones and Dangl, 2006). Wenn die Pflanze allerdings die Effektoren spezifisch durch NB-LRR Proteine erkennt, antwortet sie mit einem weiteren Verteidigungsmechanismus, der Effektor-ausgelösten Immunität (ETI; Effector-triggered immunity), auf welchen gewöhnlich die hypersensitive Antwort (HR; hypersensitive response) folgt (Jones and Dangl, 2006) (Abb. 1.1).

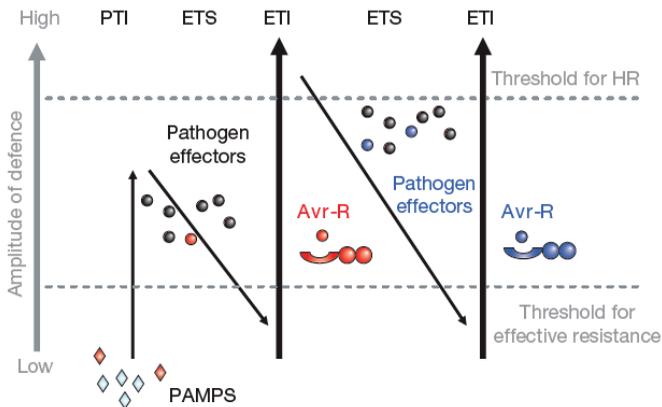


Abbildung 1.1: Ein „Zick-Zack“-Modell veranschaulicht den quantitativen „Ausstoß“ des pflanzlichen Immunsystems.

In diesem Modell ist die äußerste Amplitude der Krankheitsresistenz oder -empfindlichkeit proportional zu [PTI-ETS+ETI]. In Phase eins nimmt die Pflanze „microbial/pathogen-



Einleitung

associated molecular patterns (MAMPs/PAMPs, rote Diamanten)“ über „Pattern recognition receptors (PRRs)“ wahr, um die „PAMP-triggered immunity (PTI) auszulösen. In Phase zwei übermitteln Pathogene nach erfolgreicher Infektion Effektoren, die die PTI beeinträchtigen oder die Pathogenernährung und -ausbreitung ermöglichen, welche in der „Effector triggered susceptibility (ETS)“ resultiert. In Phase drei wird ein Effektor durch ein „NB-LRR“ Protein erkannt (rot dargestellt), welcher die „Effector triggered immunity (ETI)“ aktiviert. Dies ist eine verstärkte Version der PTI, die oft eine Feuerschwelle überschreiten muss um die „Hypersensitive response (HR)“ zu induzieren. In Phase vier werden Pathogenisolate selektiert, welche den roten Effektor verloren und möglicherweise neue Effektoren durch horizontalen Gentransfer erhalten haben (blau). Diese können Pathogenen helfen, die ETI zu unterdrücken. Selektion bevorzugt neue „NB-LRR“ Allele der Pflanze, die einen der neu erworbenen Effektoren erkennen können, was wiederum in der ETI endet (verändert nach Jones and Dangl, 2006).

Ein Charakteristikum der hypersensitiven Antwort ist der programmierte Zelltod an der Infektionsstelle, der durch die Perzeption von Effektormolekülen des Pathogens in Gang gesetzt wird (Greenberg, 1997; Heath, 2000). Dies löst eine Antwort auch in distalem Gewebe der Infektionsstelle (systemisch) aus, die als systemisch-erworbene Resistenz (SAR) bezeichnet wird (Sequeira, 1983). Sie ist das Resultat von Folgeinfektionen mit dem gleichen Pathogen und in manchen Fällen folgt die SAR direkt auf die lokale Antwort (Sequeira, 1983).

Das bekannteste Molekül als Auslöser der SAR ist das Pflanzenhormon Salicylsäure (SA) (Metraux et al., 1990; Pieterse et al., 2009; Gozzo and Faoro, 2013).

Sowohl lokal bei der Basalabwehr, wie auch systemisch in distalem Gewebe, durch die SAR, folgt die Induktion der Synthese von Abwehrproteinen, antimikrobiellen Sekundärmetaboliten (Phytoalexinen) und weiterer endogener Substanzen, die der Pflanzenabwehr dienen (Sequeira, 1983).

Bei der induzierten Antwort gegen herbivore Fraßfeinde spielen z.B. volatile Substanzen (HIPVs, herbivore-induced plant volatiles) eine wichtige Rolle, die die natürlichen karnivoren Fraßfeinde der Herbivoren anlocken (Arimura et al., 2009). Zu ihnen gehören volatile Terpene und Volatile aus grünen Blättern (GLVs, green leaf volatiles), deren Induktion durch Herbivorie



ausgelöst wird (Arimura et al., 2009). Jasmonsäure, ihre Vorläufer und nahverwandte Komponenten aktivieren hier bestimmte Genbereiche, die zur Induktion von Abwehrgenen führen, welche z.B. diese Terpenoidsynthese ankurbeln (Ament et al., 2004; Arimura et al., 2009). Bei Solanaceen werden aber auch Abwehrproteine, wie Proteinaseinhibitoren, die Enzyme im Verdauungstrakt von Herbivoren hemmen, induziert (Green and Ryan, 1972; Pearce et al., 1991; McGurl et al., 1992; McGurl et al., 1994).

Mechanische Verwundung, sowie chemische Bestandteile aus dem Speichel der Insekten lösen diese Reaktion aus (Green and Ryan, 1972; McGurl et al., 1992; Arimura et al., 2009).

Pflanzen sind daher in der Lage, Bedrohungen zu differenzieren (Fürstenberg-Hägg et al., 2013); dies zeigt, dass sowohl die konstitutive, wie auch die induzierte Abwehr zu einem optimalen Schutz der Pflanze gegen eine Vielzahl von herbivoren und mikrobiellen Feinden beitragen (Wittstock und Gershenzon, 2002).

1.2. **Die Pflanzenabwehr in der Tomate und die Entdeckung von Systemin**

Wie auch bei allen anderen Pflanzen befindet sich der primäre Schutz der Tomate gegen Fraßfeinde auf ihrer Oberfläche. Als erste Barriere der konstitutiven Abwehr dienen Trichome. Diese Differenzierungen der Epidermis fungieren als spezialisierte Strukturen gegen Pathogene und Herbivore und können außerordentlich in Form und Größe variieren (Kang et al., 2010; Tissier, 2012). Auf den Blättern und dem Stiel der Tomate befinden sich vier Haupttypen von glandulären Trichomen, die der Abwehr dienen. Typ 1 und 2, die sehr ähnlich sind und Acylzucker synthetisieren, Typ 3, der häufigste Typ, welcher unter anderem Terpene und Methylketone einlagert und Typ 4, der auch antifungale Phylloplatine produziert (Chatzivasileiadis and Sabelis, 1997; Shepherd et al., 2005; Schillmiller et al., 2009; McDowell et al., 2011; Li et al., 2014; Bergau et al., 2015).



Einleitung

Weiterhin reagieren Tomaten, wie alle anderen höheren Pflanzen auch, auf Insektenangriffe und Verwundung durch die Aktivierung von molekularen Abwehrmechanismen. Die Genexpression, die zuständig für Abwehrmaßnahmen und Regenerationsprozesse ist, wird verändert (Sun et al., 2011). Bei der gesamten Familie der Solanaceae ist zwar bekannt, dass durch eine Behandlung mit Auslösern der Pflanzenresistenz (PRI, plant resistance inducers) zahlreiche Abwehrmechanismen aktiviert werden, allerdings sind die Gene, welche in die induzierte Resistenz (IR) involviert sind größtenteils unbekannt (Alexandersson et al., 2016).

Green und Ryan zeigten 1972 (Green and Ryan, 1972), dass die Reaktion auf Verwundung durch herbivore Insekten, aber auch mechanische Verwundung, in Solanaceen, wie Tomate und Kartoffel, zur Synthese und Akkumulation von Proteinen führt, die schädlich für das Insekt sind. Sie fanden heraus, dass es lokal an der Verwundungsstelle zur Anreicherung eines Proteins, dem Proteinase Inhibitor I, führt. Dieser gut charakterisierte Inhibitor tierischer Endopeptidasen wie Trypsin und Chymotrypsin kommt sowohl in Kartoffeln, wie auch in Tomaten vor und wirkt effektiv im Verdauungstrakt von Herbivoren. Die Tatsache, dass es auch in distalem Gewebe, wie Speicherorganen, zur Anreicherung dieses Proteins kommt, führte zu der Annahme, dass es ein Signal in der Pflanze geben muss, das Proteinaseinhibitoren induziert (Green and Ryan, 1972). Auf der Suche nach dem systemischen Signal standen zuerst Zellwandbestandteile im Verdacht, dies konnte aber schnell widerlegt werden (Baydoun and Fry, 1985). Daraufhin zeigten Pearce et al. 1991, dass ein 18-Aminosäure langes Polypeptid, das aus Tomatenblättern isoliert wurde, zu einer Induktion und Akkumulation von Proteinaseinhibitoren führt. Auch das synthetisch produzierte identische Peptid löste diese Antwort aus. Da es auch aufgrund der Phloemmobilität in distalem Gewebe eine Akkumulation von Proteinaseinhibitoren auslöste und zunächst vermutet wurde, dass es das lang gesuchte systemische Signal ist, wurde es Systemin genannt (Pearce et al., 1991). Systemin war somit das allererste Peptidhormon, das in Pflanzen identifiziert wurde (Pearce et al., 1991). Heute ist bekannt, dass es eine essentielle Rolle in der Wundreaktion von Solanaceen spielt, die nach Befall

durch herbivore Insekten antinutritive Proteinaseinhibitoren akkumulieren, was eine induzierte Resistenz der Pflanze zur Folge hat (Green and Ryan, 1972; Pearce et al., 1991; McGurl et al., 1992; McGurl et al., 1994).

1.3. Die Rolle von Systemin bei der Wundantwort

Wie die Forschung der letzten Jahre zeigte spielen neben den klassischen Phytohormonen auch Peptide als Botenstoffe für die Koordinierung zellulärer Funktionen und die Zell-Zell-Kommunikation eine wichtige Rolle (Murphy et al., 2012). So übernehmen Peptidhormone wichtige Funktionen in der Kontrolle von Pflanzenwachstum und –entwicklung, die von der Regulation der Zellteilung und Meristemerhaltung über die zelluläre Differenzierung und Organentwicklung bis zur Unterscheidung von Selbst/Nicht-Selbst reichen (Boller, 2005; Matsubayashi and Sakagami, 2006; Katsir et al., 2011).

Auf der Suche nach dem Ursprung von Systemin wurde eine cDNA-Bank aus Tomatenblättern gesichtet und das korrespondierende Gen identifiziert (McGurl and Ryan, 1992). Das aus 10 Introns und 11 Exons bestehende Gen wurde komplett sequenziert und es stellte sich heraus, dass der offene Leserahmen, aus 600 Basenpaaren bestehend, für ein 200-Aminosäure langes Protein codiert, dem Vorläufer Prosystemin (McGurl et al., 1992; McGurl and Ryan, 1992). Prosystemin enthält einen hohen Prozentsatz an geladenen Aminosäuren und ist deshalb sehr hydrophil. Die Primärstruktur von Prosystemin entstand vermutlich durch mehrere Gen-Duplikationsereignisse, wohingegen die Systemin Sequenz in seinem Vorläufer einzigartig ist (McGurl et al., 1992; McGurl and Ryan, 1992). Die ersten zehn Exons von PS sind paarweise organisiert und das letzte Exon, das sich von allen anderen völlig unterscheidet, codiert für Systemin. Die Nukleotidsequenz jedes Exonpaars ist homolog zu allen anderen. Wenn man nun den Vorläufer PS näher betrachtet, fällt auf, dass er deshalb aus zahlreichen, sich wiederholenden Elementen aufgebaut ist, die alle zwischen sechs und neun Aminosäuren lang sind (McGurl et al., 1992) (Abb. 1.3). Die Funktion der repetitiven Elemente in PS wurde aber bisher noch nicht geklärt und auch bei anderen Proteinen werfen



Einleitung

diese Strukturen noch viele Fragen auf (Katti et al., 2000; Andrade et al., 2001).

```
MGTPSYDIKNKGDDMQEEPKVKLHH  
EKGGDEKEKIIEKETPSQDINNKDT  
ISSYVLRDDTQEIPKMEHEEGGYVK  
EKIVEKETISQYIIKIEGDDDAQEK  
LKVEYEEEEYEKEKIVEKETPSQDI  
NNKGDDAQEKPKVEHEEGDDKETPS  
QDIIKMEGEGALEITKVVCEKIIVR  
EDLAVQSKPPSKRDPPKMQTDNNKL
```

Abbildung 1.2: Die Aminosäuresequenz von Prosystemin.

Die Systeminsequenz wird kursiv dargestellt. Jedes der fünf repetitiven Elemente der Polypeptidsequenz ist dick hervorgehoben (verändert nach McGurl et al., 1992).

In Prosystemin sind die 18 Aminosäuren des Systeminpeptids (Aminosäuren 179-196) nahe des C-Terminus lokalisiert. Wie Peptidhormone in tierischen Systemen werden auch die meisten pflanzlichen Peptidhormone als Vorläuferproteine synthetisiert, die im Laufe ihrer Reifung posttranslational modifiziert werden (Matsubayashi, 2011-b). Unter den posttranslationalen Modifikationen von Prohormonen finden sich neben der Ausbildung von Disulfidbrücken, Prolinhydroxylierungen, Glykosylierungen, Tyrosinsulfatierungen, vor allem auch proteolytische Prozessierungen (Matsubayashi, 2011-a, -b; Murphy et al., 2012). Proteolytische Prozessierungen sind auch für die Freisetzung von Systemin erforderlich (Pearce et al., 1991). Es wird angenommen, dass Systemin in Folge einer Verwundung durch limitierte Proteolyse aus dem Vorläufer freigesetzt wird (Abb. 1.2) (Schaller and Ryan, 1995).

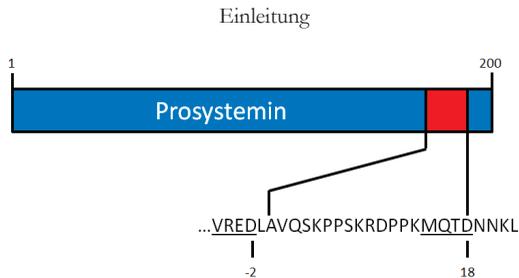


Abbildung 1.3: Primärstruktur von Systemin und Prosystemin. Schematische Darstellung des 200-Aminosäure Prosystemin Vorläuferproteins.

Die 18-Aminosäure Systemin Sequenz ist nahe des C-Terminus lokalisiert und rot dargestellt. Potentielle Erkennungsmotive für Reifungsenzyme sind unterstrichen. Potentielle Spaltstellen sind die Aspartate D-2 und D18 (verändert nach Schaller and Ryan, 1995).

Es ist aber durchaus möglich, dass noch weitere Polypeptide aus dem Vorläufer freigesetzt werden können, wie dies bei tierischen Prohormonen der Fall ist, auch McGurl und Ryan stellen diese Vermutung auf (McGurl and Ryan, 1992). Die Prosystemin RNA wurde in Tomatenpflanzen in allen Geweben, außer der Wurzel, identifiziert (McGurl et al., 1992) und es scheint so, als ob Prosystemin hauptsächlich in den Blütenorganen akkumuliert (Aviles-Arnaut and Delano-Frier, 2012). In *Arabidopsis* konnte heterolog gezeigt werden, dass eine sproß- und wurzelspezifische Expression von PS zu einer bidirektionalen Translokation der mRNA führt. Dies wurde auch durch Pfropfungsexperimente bestätigt (Zhang et al., 2017; Zhang and Hu, 2017). Ein Homolog von Prosystemin konnte auch bei einem nahen Verwandten der Tomate, der Kartoffel (*Solanum tuberosum*), nachgewiesen werden, wohingegen bei entfernteren Verwandten wie Tabak, Luzerne und *Arabidopsis* keines gefunden wurde (McGurl et al., 1992).

Zunächst wurde vermutet, dass es sich bei Systemin um das systemische Signal handelt, das über das vaskuläre Gewebe in distales transportiert wird und dort die Wundantwort induziert (Pearce et al., 1991; Narvaez-Vasquez and Pearce, 1995; Schaller and Ryan, 1995; Ryan, 2000). Es konnte jedoch bald gezeigt werden, dass Jasmonsäure oder ihre Derivate dafür verantwortlich sind, und dass Systemin nur lokal an der Verwundungsstelle