

- [9] Röntgenstrukturanalysen: STOE-IPDS (MoK_α -Strahlung); Datensammlung und Verfeinerung (SHELXS-86, SHELXL-93); empirische Absorptionskorrektur (Habitus). **1**: monoklin, Raumgruppe $P2_1/c$ (Nr. 14), $Z=4$, Gitterkonstanten (190 K): $a=1086.0(2)$, $b=4054.0(8)$, $c=2916.0(6)$ pm, $\beta=92.58(3)^\circ$, $V=12825.5(5) \times 10^6 \text{ pm}^3$, $\mu(\text{MoK}_\alpha)=13.498 \text{ mm}^{-1}$, $2\theta_{\text{max}}=46.38^\circ$, 19923 Reflexe, davon 12783 unabhängige Reflexe, 12759 Reflexe mit $I > 2\sigma(I)$, 1233 Parameter (Au, Se, P anisotrop, C isotrop); max. Restelektronendichte $3.3 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$; $R_1=0.05$; $wR_2=0.15$. **2a**: monoklin, Raumgruppe $P2_1/n$ (Nr. 14), $Z=4$, Gitterkonstanten (200 K): $a=1779.1(4)$, $b=3987.7(8)$, $c=2934.8(6)$ pm, $\beta=92.37(3)^\circ$, $V=20803 \times 10^6 \text{ pm}^3$, $\mu(\text{MoK}_\alpha)=14.433 \text{ mm}^{-1}$, $2\theta_{\text{max}}=46.52^\circ$, 28286 Reflexe, davon 28282 unabhängige Reflexe, 22915 Reflexe mit $I > 2\sigma(I)$, 1077 Parameter (Au, Se, P anisotrop, C isotrop); max. Restelektronendichte $8.5 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$; $R_1=0.10$; $wR_2=0.27$. Der schlechte R -Wert hängt mit den stark fehlgeordneten Lösungsmittelmolekülen, die nicht zugeordnet werden konnten, zusammen. Eine Lokalisierung der Anionen war ebenfalls nicht möglich. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no.“ CCDC-140363 (**1**) und -140364 (**2a**) beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Fax: (+44)1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [10] W.-F. Fu, K.-C. Chan, V. M. Miskowski, C.-M. Che, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2783.
- [11] a) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 46; b) *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (Hrsg.: R. B. Cole), Wiley, New York, **1997**, zit. Lit.
- [12] Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonance (FT-ICR)-Massenspektrometrie: A. G. Marshall, P. B. Grobans, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 215A.
- [13] P. Weis, O. Hampe, M. M. Kappes, T. Langetepe, D. Fenske, unveröffentlichte Ergebnisse.

Ionenkanalbildende Peptaibole sind hochwirksame Elicitoren des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels und der Rankenkrümmung**

Jürgen Engelberth, Thomas Koch, Frank Kühnemann und Wilhelm Boland*

Mikroorganismen und herbivore Insekten induzieren in vielen Pflanzen charakteristische lokale und/oder systemische Abwehrreaktionen. Dazu zählen die De-novo-Biosynthese von Phytoalexinen und, typisch für Insektenfraß, die Emission von Duftstoffen, die als Kairomone für Wechselwirkungen

mit anderen Organismen über weite Distanzen dienen können.^[1, 2] Die molekularen Grundlagen der Erkennung von Infektionsvorgängen oder Fraßschäden durch den pflanzlichen Organismus sind nur unvollständig bekannt. Abgesehen vom mechanischen Schaden kommt vor allem den nieder- und hochmolekularen (Salivar)komponenten des attackierenden Organismus Bedeutung als Elicitoren von Abwehrreaktionen zu. Letztere vermögen direkt oder rezeptorvermittelt die Ionenpermeabilität^[3] der Plasmamembran zu verändern und ein komplexes Netzwerk intrazellulärer Folgereaktionen auszulösen; am Ende steht die De-novo-Synthese von Abwehrsubstanzen. Die außerordentliche Bedeutung von Ionenkanälen für Elicitor-induzierte Abwehrreaktionen wurde bereits für einen Oligopeptidelicitor^[4] an Petersilienzellkulturen demonstriert. Ebenso induzieren Oligogalacturonide^[5] über Ionenkanäle die Biosynthese von Phytoalexinen in Tabakzellkulturen, und kürzlich wurde an künstlichen Lipidmembranen die Fähigkeit zur Kanalbildung einiger Protein-elicitor nachgewiesen.^[6]

Außer makromolekularen Elicitoren sind auch niedermolekulare, peptidische Antibiotika mit ausgeprägt membran-depolarisierenden Eigenschaften bekannt.^[7] Charakteristisch für den Aufbau solcher überwiegend aus Pilzen stammenden Verbindungen aus der Gruppe der Peptaibole sind ein N-acylierter Terminus, der Einbau von α -Aminoisobuttersäure (AIB) und ein zum α -Aminoalkohol reduzierter C-Terminus. Besonders häufig sind Peptaibole mit 18 bis 20 Aminosäureresten wie Alamethicin,^[7] Ampullosporin,^[8] und Chrysospermin.^[9] Kleinere Peptide mit 15 und 16 Aminosäureresten wie Antiamoebin^[10] sind ebenfalls bekannt. Ihre antibiotische Wirkung beruht auf ihrer Fähigkeit, α -helicale Strukturen zu bilden, die in biologischen Membranen als Oligomere zu spannungs(un)abhängigen Kanälen oder Poren aggregieren können.^[7, 11] Da die Induktion der Phytoalexinbiosynthese, wie zuvor erwähnt, an Ionenflüsse gekoppelt sein kann,^[3, 4] veranlasste uns diese spezielle Fähigkeit der Peptaibole, ihren möglichen Einfluss auf den pflanzlichen Sekundärstoffwechsel zu untersuchen.

Hier zeigen wir erstmals, dass fungale Peptaibole als hochwirksame Elicitoren mit Wirkung auf unterschiedliche Stoffwechselwege, etwa auf die Freisetzung von Ethylen oder die Bildung von flüchtigen Substanzen (Kairomonen), angesehen werden können. Auch die Spiralisierung von Ranken wird durch diese Substanzen äußerst effektiv ausgelöst.

Als repräsentative Modellverbindung mit ausgeprägt kanalbildenden Eigenschaften wurde Alamethicin (ALA) gewählt, das von *Trichoderma viride*, einem weit verbreiteten Bodenzpilz, als eine komplexe Mischung homologer Peptaibole produziert und ausgeschieden wird. Die Hauptkomponenten enthalten acht Aib- und zwei Prolinreste.^[7, 11] Der N-Terminus ist acyliert, den C-Terminus bildet Phenylalaninol (Tabelle 1). ALA bildet in (Bio)membranen als Octamer spannungsabhängige Kanäle mit hoher Leitfähigkeit.^[7, 11]

Wird ein frisch geschnittener Trieb der Limabohne (*Phaseolus lunatus*) als Modellsystem in eine Lösung mit ALA ($5 \mu\text{M}$) gestellt,^[12] lässt sich als erste Reaktion der Pflanze bereits nach ca. 3 h durch Photoakustikspektroskopie^[13, 14] eine deutliche Emission von Ethylen feststellen. Sie erreicht

[*] Prof. Dr. W. Boland, Dr. J. Engelberth, Dipl.-Chem. T. Koch
Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie
Carl-Zeiss-Promenade 10
07745 Jena
Fax: (+49)3641-64-3670
E-mail: Boland@ice.mpg.de
Dr. F. Kühnemann
Institut für Angewandte Physik der Universität
Wegelerstraße 8, 53115 Bonn

[**] Wir danken Herrn Prof. U. Gräfe (Hans-Knöll-Institut für Naturstoffforschung, Jena) für seine großzügige Unterstützung dieser Arbeit mit den Peptaibolen Ampullosporin A, Bergofungin A–C und Chrysospermin. Herrn Dr. T. Nürnberger (Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) danken wir für die Synthese von Systemin.

Tabelle 1. Peptaibole, Peptide und Ionophore als Elicitoren der Biosynthese von Duftstoffen.

Peptaibole und Peptide ^[12]	Bildung von Duftstoffen (<i>P. lunatus</i>)
Alamethicin F ^[7] [a]	
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol	+
Ampullosporin A ^[8]	
Ac-Trp-Ala-Aib-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Gln-Leu-Aib-Gln-Leuol	+
Bergofungine ^[25]	
a) Ac-Val-Aib-Aib-Aib-Val-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-iVal-Hyp-Aib-Pheol	+
b) Ac-Val-Aib-Aib-Aib-Val-Gly-Leu-Val-Aib-Hyp-Gln-iVal-Hyp-Aib-Pheol	+
c) Ac-Val-Aib-Aib-Aib-Val-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pheol	+
Chrysospermin A ^[9] [b]	
Ac-Phe-Aib-Ser-Aib-Aib-Leu-Gln-Gly-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Pro-Aib-Aib-Aib-Gln-Trpol	+
Melittin ^[21]	
Gln-Gln-Arg-Lys-Arg-Lys-Ile-Try-Ser-Ile-Leu-Ala-Pro-Leu-Gly-Thr-Thr-Leu-Val-Lys-Leu-Val-Ala-Gly-Ile-Gly	–
Valinomycin ^[22]	
Cyclo[-L-Val-D-Hylva-D-Val-L-Lac] ₃	–
Bradykinin ^[22]	
Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Argol	–
Systemin ^[24]	
Ala-Val-Gln-Ser-Lys-Pro-Pro-Ser-Lys-Arg-Asp-Pro-Pro-Lys-Met-Gln-Thr-Asp	–
Substanz P ^[23]	
Met-Leu-Gly-Phe-Phe-Gln-Gln-Pro-Lys-Pro-Arg	–

[a] Kommerziell erhältliches Alamethicin ist eine Mischung homologer Peptide.^[7, 12] [b] Eingesetzt wurde eine Mischung der Chrysospermine A–D. Aib: 2-Amino-2-methylpropionsäure, Argol: Argininol, Hyp: Hydroxyprolin, Hylva: α -Hydroxyisovaleriansäure, Lac: Milchsäure, Leuol: Leucinol, Pheol: Phenylalaninol, Trpol: Tryptophanol. Die Aminosäuren haben L-Konfiguration, wenn nicht anders indiziert.

nach 7.5 h ihr Maximum und klingt im Verlauf von weiteren 5 h wieder ab (Messungen in einer Durchflusszelle). Der Verlauf entspricht der bereits früher beschriebenen Ethylenemission aus Blättern von *P. lunatus* nach Behandlung mit dem Proteinelicitor Cellulysin^[14] oder mit Jasmonsäure (JA).^[15] Weitergehende Überwachung der Gasphase durch Adsorption flüchtiger Komponenten an Aktivkohle in einem geschlossenen System,^[12] anschließende Desorption und massenspektrometrische Analyse machten deutlich, dass durch ALA auch die Biosynthese terpenoider und aromatischer Komponenten angeregt wird. So zeigt das Gaschromatogramm (Abbildung 1 b) außer DMNT (5 %) und Methylsalicylat (MeSA; 4%) die Bildung von TMTT (91 %) als Hauptkomponente an. Ein vergleichbares Duftprofil (ohne MeSA) wurde bereits nach Behandlung der Limabohne mit 12-Oxophytodiensäure (12-OPDA), einer biosynthetischen Vorstufe von Jasmonsäure (JA), beobachtet.^[12] JA selbst induziert ein deutlich komplexeres Duftmuster.^[15] Die ALA-induzierte Emission flüchtiger Verbindungen ist konzentrationsabhängig und endet bei einer Grenzkonzentration von 0.5 μ M.

Wegen der Präsenz von MeSA und JA-induzierbaren Terpenen in der Gasphase wurde deshalb in den Pflanzen der Gehalt von endogener JA und SA zeitabhängig quantifiziert.^[16] Abbildung 2 lässt erkennen, dass in der Tat die Biosynthese beider Phytohormone stimuliert wird. Jasmonat zeigt einen charakteristischen transienten Anstieg innerhalb der ersten 80 min (20-facher Anstieg), während endogene SA erst nach etwa 2 h ansteigt und nach 6 h ein Plateau erreicht (ca. 90-facher Anstieg). Unbehandelte Kontrollpflanzen produzieren erwartungsgemäß weder Duftstoffe, noch zeigen sie einen Anstieg der beiden Phytohormone JA und SA. Werden Blätter der Limabohne mit Inhibitoren des Octadecanoid-Signalwegs vorbehandelt (Phenidon,^[17] Aristolochiasäure^[18]), unterbleibt die Biosynthese von Duftstoffen. Umgeht man die Blockade der Inhibitoren durch exogene Zugabe von JA, kann wieder das ursprüngliche Duftmuster beobachtet wer-

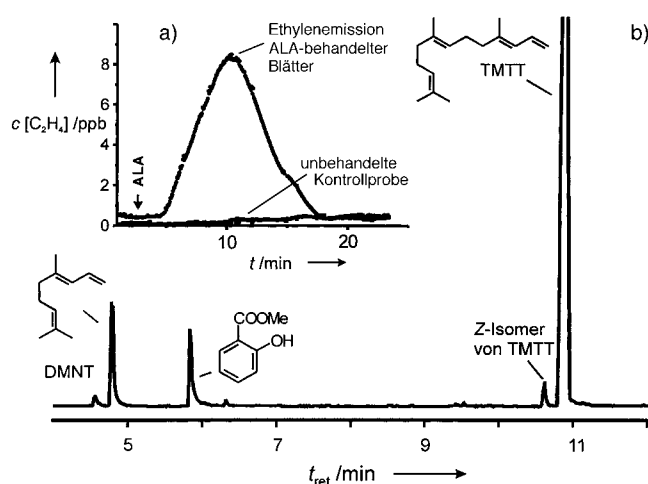


Abbildung 1. Profil induzierter Duftstoffe nach Applikation von Alamethicin an Blätter der Limabohne (*P. lunatus*). Die Ethylenabgabe wurde in einer kontinuierlichen Durchflusszelle durch Photoakustikspektroskopie^[13] bestimmt. a) Zeitverlauf der Ethylenbildung. b) Gaschromatographisches Profil flüchtiger Verbindungen. Die Intensität der Signale ist verstärkt, um Nebenprodukte sichtbar zu machen. Quantitative Zusammensetzung: 4,11-Dimethylnona-1,3,7-trien (DMNT), 5 %; Methylsalicylat (MeSA), 4 %; 4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen (TMTT), 91 %. Unbehandelte Kontrollpflanzen zeigen keine Emission flüchtiger Verbindungen.

den. Eine Beteiligung des Octadecanoid-Signalwegs ist damit sicher nachgewiesen.

Die Elicitoraktivität des Peptaibols ALA ist nicht auf die Limabohne beschränkt, sondern wird auch bei anderen Pflanzen gefunden. Der phylogenetisch alte Wurmfarne (*Dryopteris filix-mas*) reagiert mit sehr ausgeprägter Emission einer komplexen Mischung von Sesquiterpenen.^[15] Terpene Verbindungen dominieren auch im Duftmuster ALA-induzierter Mungbohnen (*Vigna radiata*), in der Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) oder im Mais (*Zea mays*).^[2, 15] Die Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) produziert ein der Lima-

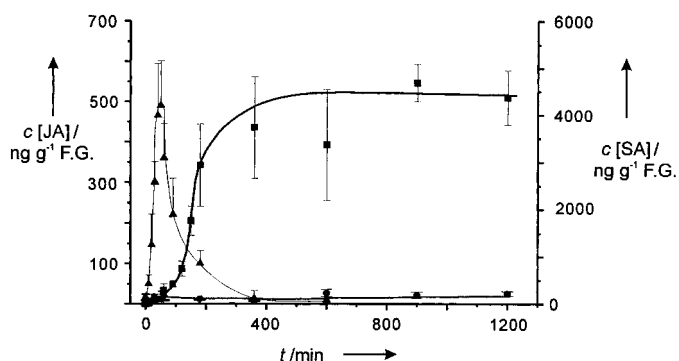


Abbildung 2. Quantifizierung und Zeitverlauf endogener Jasmonsäure und Salicylsäure nach Behandlung von Limabohnenblättern mit Alameithicin. (■) = Salicylat (SA), (▲) = Jasmonat (JA), (●) = SA oder JA in unbehandelten Kontrollpflanzen. (F.G. = Frischgewicht.)

bohne vergleichbares Substanzprofil (Abbildung 1), Sojabohne (*Glycine max*) und Gartenerbse (*Pisum sativum*) lassen keine signifikante Duftproduktion erkennen.

Ranken von *Bryonia dioica* reagieren auf JA, MeJA und 12-OPDA mit einer Krümmungsreaktion, die der bei mechanischer Reizung entspricht.^[19] Da in der Limabohne der Octadecanoid-Signalweg durch ALA stimuliert wird (Abbildung 2), wurde geprüft, ob ALA auch die Spiralisierung von Ranken induzieren kann. Dazu wurden frisch geschnittene Ranken von *Bryonia dioica*, *Pisum sativum* oder *Lathyrus* sp. in eine Lösung von ALA (5 μM) gestellt, und nach 20 h wurde ihr Krümmungsgrad bestimmt. Alternativ wurde entsprechend dem Rankenkrümmungstest nach Weiler verfahren.^[20] Alle Testpflanzen zeigten nach Behandlung mit ALA eine schnell einsetzende Spiralisierung. Vorbehandlung der Ranken mit Inhibitoren des Octadecanoid-Signalwegs (Phenidon) vermochte die ALA-induzierbare Spiralisierung nicht zu unterdrücken. Demnach muss zur Induktion der Rankenkrümmung der Octadecanoidweg nicht zwingend durchlaufen werden; Depolarisierung der Zellmembran durch einen Porenbildner scheint auszureichen.^[20]

Neben ALA sind weitere Peptaibole und Peptide als Porenbildner oder Ionentransporter bekannt. Um zu prüfen, ob die beobachteten Effekte auf Porenbildung oder Ionentransport zurückzuführen sind, wurden neben ALA deshalb weitere Porenbildner, aber auch kationenkomplexierende Ionentransporter getestet. Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, wirken alle Peptaibole stimulierend. Unabhängig von der Aminosäuresequenz der Testsubstanz wird von Blättern der Limabohne stets dasselbe Duftmuster freigesetzt, sodass auf Membrandepolarisierung als ein gemeinsames Wirkprinzip geschlossen werden kann.

Mellitin, ein Bienengift, das basische Aminosäuren enthält, ist zwar prinzipiell als ein Porenbildner^[21] bekannt, verursacht in der Limabohne aber keine Duftemission. Dies gilt auch für einen typischen Ionentransporter wie das K^+ -selektive Valinomycin^[22] (9 μM). Biologisch aktive Peptide (Tabelle 1), deren Wirkung über spezifische Rezeptoren vermittelt wird, etwa das Neuropeptid „Substanz P“,^[23] das Nonapeptid Bradykinin,^[22] oder auch Systemin, ein hochwirksames Signalpeptid der Tomate,^[24] zeigen ebenfalls keine Stimulierung der Duftbiosynthese; „Porenbildung“ und die damit verbun-

dene Membrandepolarisierung müssen deshalb als ursächlich für die Elicitierung angesehen werden.

Kanalbildner wie Alamethicin sollten sich deshalb besonders gut als Modellverbindungen zur Simulation und Analyse der frühen Wechselwirkungen zwischen Pflanze und Schadorganismus unter kontrollierten Bedingungen eignen. Erste Untersuchungen von Salivarsekreten herbivorer Insekten lassen auch hier auf kanalaktive Inhaltsstoffe schließen.^[26] Mithin dürfte der Membrandepolarisierung durch porenbildende Substanzen auch bei der Induktion von pflanzlichen Abwehrreaktionen durch Insekten eine große Bedeutung zukommen.

Eingegangen am 9. Dezember 1999 [Z14379]

- [1] M. G. Hahn, *Annu. Rev. Plant Pathol.* **1996**, *34*, 387–412.
- [2] P. W. Paré, J. H. Tumlinson, *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 325–331.
- [3] T. Jabs, M. Tschöpe, C. Colling, K. Hahlbrock, D. Scheel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4800–4805.
- [4] J. L. Dangel, K. D. Hauffe, S. Lipphardt, K. Hahlbrock, D. Scheel, *EMBO J.* **1987**, *6*, 2551–2556.
- [5] Y. Mathieu, A. Kurkdjian, H. Xia, J. Guern, A. Koller, M. D. Spiro, M. O'Neill, P. Albersheim, A. Darvill, *Plant J.* **1991**, *1*, 333–343.
- [6] B. Klüsener, E. W. Weiler, *FEBS Lett.* **1999**, *459*, 263–266.
- [7] D. S. Cafiso, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, *23*, 141–165.
- [8] M. Ritzau, S. Heinze, K.-J. Dornberger, A. Berg, W. Fleck, B. Schlegel, A. Härtl, U. Gräfe, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 722–728.
- [9] K.-J. Dornberger, W. Ihn, M. Ritzau, U. Gräfe, B. Schlegel, W. F. Fleck, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 977–989.
- [10] R. C. Pandey, J. C. Meng, C. Cook, R. L. Rinehardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8469–8483.
- [11] M. S. P. Sansom, *Quart. Rev. Biophys.* **1993**, *26*, 365–321.
- [12] Experimentelle Daten zur Pflanzenzucht, Applikation der Testverbindungen, Isolierung flüchtiger Verbindungen aus der Gasphase und ihrer massenspektrometrischen Analyse finden sich in: T. Koch, T. Krumm, V. Jung, J. Engelberth, W. Boland, *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 153–162. Alamethicin, Melittin und Valinomycin wurden von Sigma-Aldrich bezogen, Bradykinin und Substanz P von Calbiochem. Alle Testverbindungen wurden mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ appliziert.
- [13] B. Beßler, S. Schmitgen, F. Kühnemann, R. Gäbler, W. Urban, *Planta* **1998**, *205*, 140–144.
- [14] J. Piel, R. Atzorn, R. Gäbler, F. Kühnemann, W. Boland, *FEBS Lett.* **1997**, *416*, 143–148.
- [15] W. Boland, J. Hopke, J. Donath, F. Nüske, F. Bublitz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1715–1717; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1600–1602.
- [16] J. Engelberth, T. Koch, N. Bachmann, J. Rechtenbach, W. Boland, *Plant Physiol.* **1999**, im Druck.
- [17] C. Cucurou, J. P. Battioni, D. C. Thang, N. H. Nam, D. Mansuy, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8964–8970.
- [18] M. D. Rosenthal, B. S. Vishwanath, R. C. Franson, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1001*, 1–8.
- [19] E. W. Weiler, T. Albrecht, B. Groth, Z.-Q. Xia, M. Luxem, H. Liss, L. Andert, P. Spengler, *Phytochemistry* **1993**, *32*, 591–600.
- [20] B. Klüsener, G. Boheim, H. Liss, J. Engelberth, E. W. Weiler, *EMBO J.* **1995**, *14*, 2708–2714.
- [21] A. W. Bernheimer, B. Rudy, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *864*, 123–141.
- [22] D. W. Urry, *Top. Curr. Chem.* **1985**, *128*, 175–218.
- [23] M. M. Klavdieva, *Front. Neuroendocrinol.* **1996**, *17*, 155–179.
- [24] A. Schaller, C. A. Ryan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11802–11806.
- [25] A. Berg, B. Schlegel, W. Ihn, U. Demuth, U. Gräfe, *J. Antibiotics* **1999**, *52*, 666–669.
- [26] D. Spittler, V. Jung, W. Boland, unveröffentlichte Ergebnisse.