



1 Einleitung

Die Spaltung von Proteinen ist ein essentieller Bestandteil physiologischer Prozesse aller lebenden Organismen. Die Enzyme, welche die proteolytische Spaltung bewerkstelligen, bezeichnet man als Proteasen. Allgemein wird zwischen der Proteolyse, einer unspezifischen vollständigen Degradation von Proteinen in kurze Peptide und Aminosäuren, und der limitierten Proteolyse, einer hochspezifischen Spaltung einer bestimmten Aminosäure-Sequenz, unterschieden.

Die Proteolyse bildet im Rahmen der Proteinhomöostase „*protein turnover*“ den Gegenpol zur Proteinsynthese. Dies gewährleistet, dass das Proteom kontinuierlich an die sich ständig verändernden endo- und exogenen Einflüsse angepasst werden kann. Hierbei übernimmt die Proteolyse die Degradation von überflüssigen, beschädigten, fehlerhaft gefalteten oder gar schädlichen Proteinen. Außerdem werden nicht mehr benötigte regulatorische Proteine wie Peptidhormone, Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren und Enzyme, gezielt abgebaut. Die abzubauenen Proteine werden mit einer Polyubiquitin-Kette markiert, welche sie für die Degradation im 26S Proteasom markiert (Collins und Goldberg, 2017; Saeki, 2017; Bard *et al.*, 2018). Hierdurch werden deren Bestandteile der Proteinsynthese erneut zur Verfügung gestellt. Somit spielt die Proteolyse nicht nur eine wichtige Rolle bei der Degradation von Proteinen, sondern stellt auch den ersten Schritt des Protein-Ressourcen-Recycling dar (Voges *et al.*, 1999; Vierstra, 2009).

Im Gegensatz zu dem unspezifischen Abbau ubiquitnierter Proteine im 26S Proteasom hat die limitierte Proteolyse eine hohe Substratspezifität. Dies befähigt sie zur gezielten posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Das Aufgabenspektrum reicht von der Abspaltung von Signalpeptiden, im Zusammenhang mit dem subzellulären Transport von Proteinen, über die Reifungs-Spaltung von Proteinvorläufern (z.B. Peptidhormon-Vorläufer) bis hin zur Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsspaltung von regulatorischen Proteinen. Damit sind die Proteasen der limitierten Proteolyse selbst ebenfalls regulatorische Proteine (Xia, 2004; van der Hoorn, 2008; Schaller *et al.*, 2017).

1.1 Klassifizierung und Phylogenie von Subtilasen

Alle Proteasen werden, gemäß der MEROPS Peptidase-Datenbank (Version 12.0) (Rawlings *et al.*, 2018), nach den reaktiven Aminosäureresten im aktiven Zentrum in Serin-, Cystein-, Threonin-, Metallo-, Glutamin-, Asparagin-, Aspartat-Proteasen und eine Protease-Klasse mit gemischter katalytischer Domäne (Cys, Ser, Thr) klassifiziert. Außerdem ist eine Protease-



Einleitung: Klassifizierung und Phylogenie von Subtilasen

Klasse definiert, deren katalytischer Typ unbekannt ist. Trotz dieser Vielfalt ist der biochemische Prozess hinter der proteolytischen Spaltung bei allen Proteasen ähnlich. Sie katalysieren die Hydrolyse der Amidbindung des Peptidrückgrads durch einen nukleophilen Angriff am Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe. Das Nukleophil kann dabei die Seitenkette einer der Aminosäuren im aktiven Zentrum (Serin, Cystein, Threonin) oder ein Wassermolekül (Aspartat- und Metalloproteasen) sein (Barrett *et al.*, 2004; Mayer *et al.*, 2005). Die Subtilase-Familie (S8) soll in dieser Arbeit näher betrachtet werden. Sie wird zusammen mit den Sedolase (S53), auf Grund ihrer vermeintlichen Abstammung, zum SB Klan der Serin-Proteasen zusammengeschlossen (MEROPS Peptidase-Datenbank (Version 12.0) (Rawlings *et al.*, 2018). In Pflanzen haben die Serin-Proteasen, im Verhältnis zu den restlichen Protease-Klassen, die meisten Mitglieder.

Tabelle 1.1.1: Klassifizierung der Subtilase-Familie. Die Klassifizierung der S8 Familie sowie der S8A (Subtilisine) und S8B (Kexine) Subfamilien basiert auf ihrer vermeintlichen Abstammung und wird in der MEROPS-Peptidase Database Release 12.0 definiert (Rawlings *et al.*, 2018). Die Homologiegruppen wurden von (Siezen und Leunissen, 1997) festgelegt. Grün hervorgehoben ist die Homologiegruppe aus welcher alle Vertreter der Pflanzen-Subtilasen stammen.

Familie	Subfamilie	Homologie Gruppen
S8 (Subtilasen)	S8A (Subtilisine)	Subtilisin Thermitase Lantibiotische Peptidasen
		Pyrolysin Proteinase K
	S8B (Kexine)	Kexin (Proprotein Konvertasen)

Die Subtilase-Familie (S8) wird in zwei Subfamilien unterteilt (Tabelle 1.1.1). Die Subfamilie S8A der Subtilisine enthält die Homologiegruppen Subtilisin, Thermitase, Lantibiotische Peptidase, Pyrolysin und Proteinase K (Siezen and Leunissen, 1997). Vertreter der Homologiegruppen Subtilisin, Thermitase und die Lantibiotische Peptidase sind nur in Bakterien und Archaeen nachgewiesen. Diese bewerkstelligen unspezifischen Proteinabbau von proteinhaltigen Substraten und ermöglichen so das Wachsen auf diesen. Außerdem stellt der Abbau von Membranproteinen konkurrierender Bakterien einen wichtigen Verteidigungsmechanismus dar (Siezen und Leunissen, 1997). In Säugetieren sind neben den Homologiegruppen der Pyrolysin und der Proteinase K aus der Subfamilie S8A, auch Vertreter der S8B (Kexine) Subfamilie bekannt. Namensgeber für die Subfamilie ist die erste in Eukaryonten entdeckte Subtilase Kex2p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Julius *et al.*, 1984). Auf Grund ihrer hohen Substratspezifität spielen Kexine eine wichtige Rolle als Proprotein-Konvertasen (PC). Sie sind im Rahmen der Pathogenabwehr an der Spaltung von bakteriellen Toxinen und viralen Oberflächenproteinen beteiligt. Außerdem übernehmen sie regulatorische

Einleitung: Klassifizierung und Phylogenie von Subtilasen

Aufgaben durch die spezifische Prozessierung von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Peptidhormonen sowie deren Vorläufern (Steiner, 1998; Seidah *et al.*, 2013). Da Pflanzen keine Kexine besitzen liegt die Vermutung nahe, dass die Rolle der Kexine als Proprotein-Konvertasen (PC) von Pyrolysinen übernommen werden könnte.

Obwohl die Subtilasen in Pflanzen alle aus nur einer Homologiegruppe stammen, sind sie deutlich zahlreicher als in jeder anderen Organismen-Gruppe. Für den Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* wird aktuell eine Gesamtzahl von 907 Proteasen angenommen. Etwa 34 % (310) werden zu den Serin-Proteasen gerechnet. Unter diesen hat die Subtilase-Familie 56 Mitglieder, was ~ 6 % aller Proteasen ausmacht (Rautengarten *et al.*, 2005). Sie werden an Hand ihrer Sequenz in 7 Subgruppen untergliedert (Abbildung 1.1.1) (Rautengarten *et al.*, 2005; Taylor und Qiu, 2017). Wie in *Arabidopsis* machen die Subtilasen auch in anderen Pflanzen einen nicht unerheblichen Anteil der Proteasen aus. So wurden in Reis (*Oryza sativa*) 63 Subtilasegene identifiziert (Tripathi und Sowdhamini, 2006), was ~ 3% aller Reis-Proteasen ausmacht. Etwa 7 % (82) aller Proteasen der Weinrebe (*Vitis vinifera*) sind Subtilasen (Cao *et al.*, 2014; Figueiredo *et al.*, 2016) und in Kartoffel (*Solanum tuberosum*) sind es nach heutigem Stand sogar 10 % (82) (Norero *et al.*, 2016).

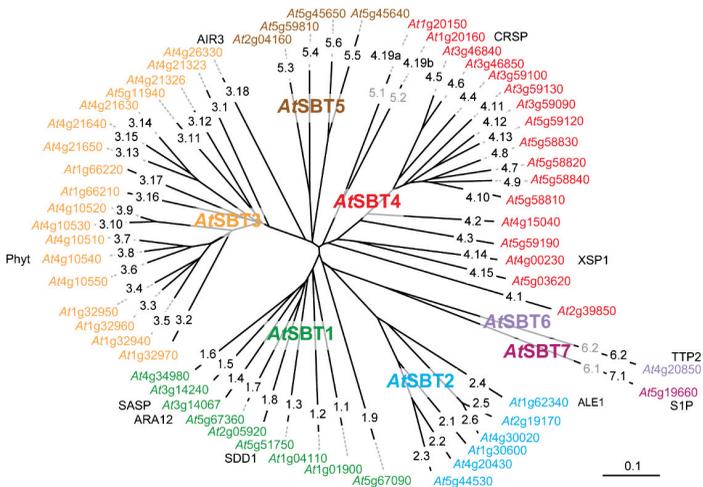


Abbildung 1.1.1: Phylogenetischer Stammbaum der 56 *Arabidopsis thaliana* Subtilasen. Der phylogenetische Baum stellt die Verwandtschaft der einzelnen Subtilasen und deren Subgruppen dar. Dem Vergleich liegen die Aminosäure-Sequenzen der 56 von Rautengarten *et al.*, 2005 beschriebenen Subtilasen zugrunde. Für das Alignment wurde die Sequenz der Protease mit Signalpeptid und mit Prodomäne verwendet. Die Subgruppen sind nach Taylor und Qiu (2017) modifiziert. Die Modifikationen beinhalten die Aufteilung von Subgruppe 6 (*AtSBT6.2*, TTP2 und *AtSBT6.1*, S1P) in zwei eigene Subgruppen. Außerdem werden *AtSBT5.1* und *AtSBT5.2* zur Subgruppe 4 gerechnet. Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur bezieht sich auf die Erstbenennung, welche in grau dargestellt ist. Des Weiteren wurden die Namen SASP, CRSP, Phyt, TTP2 und S1P ergänzt.

Einleitung: Charakteristische Präproprotein-Struktur der Subtilasen

Für Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) waren bis zu dieser Arbeit nur 15 Subtilasen beschrieben (Meichtry *et al.*, 1999). Darunter finden sich auch einige Mitglieder der P69 Gruppe; P69 wurde zunächst als PR (pathogenesis related) Protein nach Infektion mit *Citrus exocortis viroid* (CEV) (Granell *et al.*, 1987) oder *Phytophthora infestans* identifiziert (Christ und Möisinger, 1989; Fischer *et al.*, 1989). Durch die Klonierung der cDNAs konnten P69 PR-Proteine der Subtilase-Familie zugeordnet werden (Tornero *et al.*, 1996a; Tornero *et al.*, 1997; Jordá *et al.*, 1999).

1.2 Charakteristische Präproprotein-Struktur der Subtilasen

Der Name „Subtilase“ ist auf zwei bakterielle Subtilisine zurückzuführen, die in den Stämmen Carlsberg und BPN des gram-positiven *Bacillus subtilis* identifiziert wurden. Diese beiden Subtilisine werden durch eine spezifische Anordnung aus Aspartat-, Histidin- und Serin-Resten, der katalytischen Triade, charakterisiert. Außerdem besitzen sie eine charakteristische Präproprotein-Struktur (Smith *et al.*, 1966; Wright *et al.*, 1969). Bakterielle Subtilisine besitzen am N-Terminus ein Signalpeptid, das die Sekretion vermittelt. An dieses schließt sich eine Prodomäne an, die während der Enzymreife autokatalytisch gespalten wird. Nach der Spaltung der Prodomäne, wird die nun reife und aktive Subtilase in den extrazellulären Raum sekretiert. Sowohl die katalytische Triade als auch die Präproproteinstruktur teilen sich die Bakterien-Subtilisine mit Subtilasen in Pflanzen und anderen Eukaryonten (Schaller *et al.*, 2012).

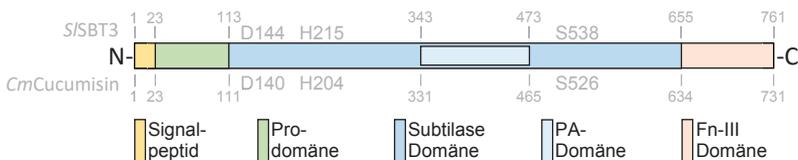


Abbildung 1.2.1: Charakteristische Subtilase-Präproproteinstruktur am Beispiel von SBT3 aus Tomate (*Solanum lycopersicum*) (UniProtKB-O82777) und Cucumis aus Zuckermelone (*Cucumis melo*) (UniProtKB-Q39547). Aufbau von S/STB3 im Detail: Signalpeptid (Met¹-Ala²²), Prodomäne (Thr²³-Glu¹¹²), katalytische Subtilasedomäne (Thr¹¹³-Tyr⁶⁵⁴), unterbrochen von einer Protease-assoziiert (PA) Domäne (Thr³⁴³-Tyr⁴⁷²) und einer C-terminalen Fibronektin (Fn)-III-Domäne (Pro⁶⁵⁵-Trp⁷⁶¹). Katalytische Triade S/STB3 [Aspartat (D¹⁴⁴), Histidin (H²¹⁵) und Serin (S⁵³⁸)] (Cedzich *et al.*, 2009; Ottmann *et al.*, 2009). Aufbau von CmCucumis im Detail: Signalpeptid (Met¹-Ser²²), Prodomäne (Arg²³-His¹¹⁰), katalytische Subtilasedomäne (Thr¹¹¹-Thr⁶³³), unterbrochen von einer Protease-assoziiert (PA) Domäne (Asp³³¹-Gly⁴⁶⁴) und einer C-terminalen Fibronektin (Fn)-III-Domäne (Gly⁶³⁴-Val⁷³¹). Katalytische Triade CmCucumis [Aspartat (D¹⁴⁰), Histidin (H²⁰⁴) und Serin (S⁵²⁶)] (Yamagata *et al.*, 1994; Murayama *et al.*, 2012).

Neben den aus Bakterien-Subtilisinen bekannten Domänen besitzen pflanzliche Subtilasen noch zwei weitere Domänen, die Protease-assoziierte (PA) Domäne und die Fibronektin (Fn)-III-Domäne (Abbildung 1.2.1). Die Prodomäne übernimmt während der Enzymreife die Funktion eines intramolekularen Chaperons. Für S/STB3 wurde gezeigt, dass Subtilasen ohne



Einleitung: Pflanzen-Subtilasen mit bekannten Substraten

Prodomäne nicht mehr sekretiert werden, da eine korrekte Faltung nicht zustande kommt (Cedzich *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2016b). Die Chaparon-Funktion von Prodomänen pflanzlicher Subtilasen deckt sich mit der bakterieller Subtilisine (Zhu *et al.*, 1989; Bryan, 2002). Während der Passage durch den Sekretorischen Weg wird die Prodomäne autokatalytisch gespalten (Cedzich *et al.*, 2009), bindet sich anschließend jedoch mit hoher Affinität an die Subtilase und inhibiert deren Aktivität bis zur finalen Sekretion des reifen Enzyms (Nakagawa *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2016b). Die am C-Terminus lokalisierte FnIII-like Domäne ist typisch für Pflanzen-Subtilasen. Für einige Subtilasen wie *SISBT3* ist sie funktionell erforderlich, da sie das aktive Zentrum stabilisiert (Cedzich *et al.*, 2009). Für die Funktionalität anderer Subtilasen ist sie nicht zwingend notwendig, wie für *CmCucumis* gezeigt (Yamagata *et al.*, 1994). Ebenfalls typisch für Pflanzen-Subtilasen ist die PA-Domäne. Sie ist in der katalytischen Domäne zwischen dem Histidin und dem Serin der katalytischen Triade lokalisiert. Für die PA-Domäne ist eine allgemeine Protein-Protein-Interaktionsfunktion beschrieben (Mahon und Bateman, 2000). Bei Proteasen spielt sie unter anderem eine Rolle bei der Substraterkennung (Bruinenberg *et al.*, 1994; Luo und Hofmann, 2001; Kagawa *et al.*, 2009; Kurata *et al.*, 2010). Die PA-Domäne der Subtilase C1-Protease aus Sojabohne interagiert mit längeren Peptidsubstraten und verbessert so die Substratspezifität zu deren Gunsten (Tan-Wilson *et al.*, 2012). Außerdem kann die PA-Domäne an der Dimerisierung beteiligt sein, wie für *SISBT3* gezeigt wurde (Ottmann *et al.*, 2009). Im Vergleich zur unspezifischen Spaltung von Bakterien-Subtilisinen ohne PA-Domäne mag die PA-Domäne in Pflanzen-Subtilasen zu einer erhöhten Substratspezifität beitragen.

1.3 Pflanzen-Subtilasen mit bekannten Substraten

Obwohl immer mehr Subtilasen in unterschiedlichen Pflanzen identifiziert werden, sind für die wenigsten physiologisch relevante Substrate bekannt, die auch in Verbindung mit einer phänotypischen Ausprägung gebracht werden können. Für zwei der pflanzlichen Pyrolysine existieren Orthologe in Säugetieren, nämlich die TPP2 „*Tripeptidyl-Peptidase II*“ und die S1P „*Site-1-Protease*“. TPP2 ist am „*protein turnover*“ und an der Bildung von Peptiden für die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation beteiligt (Tomkinson und Lindås, 2005). S1P hingegen ist an der UPR „*unfolded protein response*“ beteiligt, einer Stressreaktion die durch die Akkumulation fehlerhaft gefalteter Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) ausgelöst wird. Hierbei übernimmt S1P eine erste Spaltung, die zur Freisetzung des ATF6 „*Transkriptionsfaktors 6*“ führt, der dann im Nukleus die UPR Genexpression reguliert (Seidah und Chrétien, 1997; Sakai *et al.*, 1998; Seidah *et al.*, 1999).

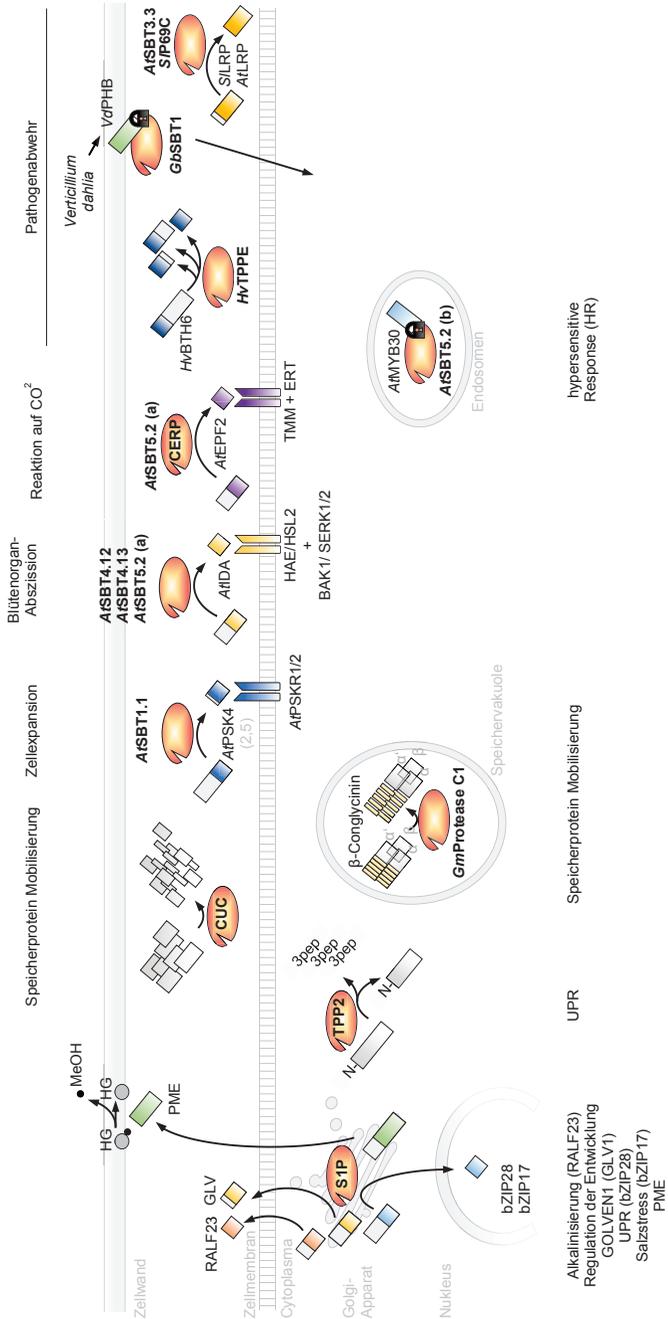


Einleitung: Pflanzen-Subtilasen mit bekannten Substraten

Die Funktion von S1P und TPP2 aus Säugern gab erste Indizien auf die Funktion der Orthologe in Pflanzen. Es zeigte sich, dass diese ähnliche Aufgaben übernehmen. Die S1P aus *Arabidopsis thaliana* (*AtSBT6.1*) ist, wie ihre Orthologe aus Säugern auch an der UPR beteiligt. Wenn fehlerhaft bzw. ungefaltete Proteine im ER akkumulieren, bewegt sich der im ER-befindliche bZIP28 „*Basic-leucine zipper 28*“ zum Golgi-Apparat. Dort wird die N-terminale bZIP-Domäne durch *AtSBT6.1* (*AtS1P*) und die Metalloprotease *AtS2P* „*Site-2-Protease*“ abgespalten. Die so freigesetzte bZIP-Domäne transloziert in den Nukleus und reguliert dort die UPR-Genexpression (Liu *et al.*, 2007; Che *et al.*, 2010; Liu und Howell, 2010). Neben bZIP28 wird auch der ebenfalls membrangebundene bZIP17 durch *AtSBT6.1* prozessiert. Dieser Transkriptionsfaktor ist an der Regulation der Antwort auf Salzstress beteiligt (Liu *et al.*, 2007). Neben der Freisetzung von Transkriptionsfaktoren ist *AtSBT6.1* auch für die Aktivierung von PME „Pektin-Methylesterasen“ verantwortlich. Die PME werden als Präproenzyme synthetisiert und für *AtSBT6.1* (wie auch für *AtSBT3.5*) konnte gezeigt werden, dass sie für die Spaltung der PME-Prodomäne und die anschließende Sekretion der reifen PME benötigt werden (Wolf *et al.*, 2009; Sénéchal *et al.*, 2014). PME katalysieren die Methylesterifizierung von Homogalacturonan (HG), dem Hauptbestandteil von Pektin in der Zellwand (Sénéchal *et al.*, 2014). Durch Vergleich mit dem bekannten *AtSBT6.1* Spaltungsmotiv [R(R,K)XL] konnten weitere Substrate gefunden werden. So spaltet *AtSBT6.1* den Vorläufer des Peptidsignals RALF23 „*Rapid alkalization factor 23*“ nach dem typischen Spaltungsmotiv [RRIL] und setzt so das aktive Peptid frei (Srivastava *et al.*, 2009). Als weiteres Peptidsignal wird auch der Vorläufer von GOLVEN1 (GLV1) gespalten, allerdings ist zur Freisetzung des bioaktiven Peptids eine weitere noch nicht identifizierte Protease notwendig, da *AtSBT6.1* nur eine „Vor“-Spaltung im N-terminalen Bereich des Peptidvorläufers bewerkstelligt (Ghorbani *et al.*, 2016).

Das Ortholog von TPP2 aus *Arabidopsis thaliana* *AtSBT6.2* wird mit dem Abbau von Proteinen in Verbindung gebracht, die durch Schwermetalle beschädigt worden sind (Polge *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu den meisten pflanzlichen Subtilasen ist sie zytoplasmatisch/nukleär lokalisiert. Ein „knock-out“-Phänotyp konnte bisher nicht gezeigt werden, was den Schluss zulässt, dass *AtSBT6.2* unter kontrollierten Bedingungen nicht essentiell ist (Book *et al.*, 2005). Außerdem ist *AtSBT6.2* die einzige bekannte Subtilase mit Exopeptidase-Charakter. Sie katalysiert die Freisetzung von Tripeptiden vom N-Terminus vielfältiger Substrate. Da ihr unspezifischer Spaltcharakter gut charakterisiert ist, ist sie hier unter den Subtilasen mit bekanntem Substrat aufgeführt, auch wenn bisher *in vivo* noch für kein bestimmtes Protein die Spaltung durch *SBT6.2* gezeigt worden ist.

Einleitung: Pflanzen-Subtilisinen mit bekannten Substraten



Einleitung: Pflanzen-Subtilasen mit bekannten Substraten

Abbildung 1.3.1: Bekannte Subtilase-Substrat Interaktionen. **SIP** „Site-1-Protease“ (*AtSBT6.1*) ist im Golgi-Apparat aktiv und spaltet die Transkriptionsfaktoren bZIP28 (Regulation des UPR – „*unfolded protein response*“) und bZIP17 (als Reaktion auf Salzstress), die so freigesetzten Transkriptionsfaktoren translozieren in den Nucleus wo sie die Expression der entsprechenden Gene regulieren. Weitere beschriebene Substrate sind das Peptidsignal RALF23 „*Rapid alkalinisierung factor 23*“, welches die Alkalinisierung reguliert und GLV6, das verschiedene Entwicklungsprozesse steuert. Der GLV6 Vorläufer wird durch SIP nicht aktivierend gespalten. Die für die Schnittpräferenz wichtige [R(R,K)XL] Erkennungssequenz wurde auch im Vorläufer von PME (Pektin-Methylesterase) gefunden und eine Spaltung nach dieser gezeigt. **TPP2** „*Tripeptidyl-Peptidase II*“ (*AtSBT6.2*) ist eine Exopeptidase und katalysiert die Abspaltung von Tripeptiden vom N-Terminus der Substrate. **CUC** „*Cucumisin*“ ist eine Subtilase aus der Zuckermelone (*Cucumis melo*) und ist am unspezifischen Proteinabbau während der Fruchtreife beteiligt. **GmProtease C1** aus Soja (*Glycine max*) initiiert den Abbau von Samenspeicherproteinen durch limitierte Proteolyse der 5 Schnittstellen im N-Terminus der α und der α' Untereinheit des β -Conglycinin Trimers. **AtSBT1.1** spaltet das Phytosulfokin *AtPSK4* mit hoher und *AtPSK2* und *AtPSK5* mit einer geringeren Präferenz *in vitro*; eine entsprechende Funktion *in vivo* ist noch nicht klar belegt. Das freigesetzte Peptidsignal gehört zu den Peptid-Wachstums-Faktoren und fördert das Zellwachstum, wirkt im Ruhenden Zentrum des Wurzelspitzenmeristems, ist an der Pollenschlauch-Führung beteiligt und passt die Immunantwort spezifisch an den Erreger an. Das Peptidsignal *IDA* „*Inflouescence deficient in abscission*“ ist an der Blütenorgan Abszission beteiligt und wird durch mehrere redundant wirkende Subtilasen [**AtSBT4.12**, **AtSBT4.13**, **AtSBT5.2a**] freigesetzt. **AtSBT5.2a** ist ebenfalls an der Freisetzung EPF2 „*Epidermal patterning factors 2*“, als Reaktion auf hohe CO₂ Konzentration, beteiligt. Die proteolytisch nicht aktive Variante von **AtSBT5.2b** akkumuliert in Endosomen und bindet dort den *AtMYB30* Transkriptionsfaktor (durch Schloss markiert), wodurch dieser nicht in den Nucleus gelangt, was die HR „*Hypersensitiv response*“ beeinflusst. **HvTPPE** „*Thionin proprotein-processing enzyme*“ aus Gerste (*Hordeum vulgare*) spaltet das HvBTH6-Propeptid; die so entstehenden Peptide haben antimikrobielle Wirkung. **GbSBT1** aus Baumwolle (*Gossypium barbadense*) bindet an PHB ein Prohibitin-ähnliches Protein (durch Schloss markiert), das von *Verticillium dahliae* während der Infektion exprimiert wird. **SIP69C** und das Ortholog **AtSBT3.3** spaltet ein LRP „*leucin-rich-protein*“ im Rahmen der Pathogen-Abwehr.

Dasselbe gilt für *CmCucumisin* aus der Zuckermelone (*Cucumis melo*), die erste in Pflanzen entdeckte Subtilase (Abbildung 1.3.1). Sie ist auf enzymatischer und struktureller Ebene weitestgehend charakterisiert (Kaneda and Tominaga, 1975; Yamagata *et al.*, 1994; Murayama *et al.*, 2012). Sie wird als ein 67 kDa großes Enzym gebildet und durch eine begrenzte Autolyse am C-Terminus entsteht mit 54 kDa eine verkürzte Form. Beide Formen sind proteolytisch aktiv und akzeptieren ein breites Spektrum von Aminosäure Resten auf beiden Seiten der Spaltstelle in der „non-prime“ (P1 – vor der Schnittstelle) und der „prime“ (P1' – nach der Schnittstelle) Position (Uchikoba *et al.*, 1995; Arima *et al.*, 2000b; Yonezawa *et al.*, 2000). Durch diese breite Substratspezifität und ihre Expression in reifenden Früchten ist es wahrscheinlich, dass sie am nichtselektiven Proteinabbau beteiligt ist. Sie soll hier exemplarische für alle Cucumisin-ähnlichen Subtilasen aus anderen Pflanzen stehen (Lynn und Clevette-Radford, 1988; Curotto *et al.*, 1989; Rudenskaya *et al.*, 1998; Uchikoba *et al.*, 1998; Arima *et al.*, 2000a; Terp *et al.*, 2000; Beilinson *et al.*, 2002; Fontanini und Jones, 2002; Roberts *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2007; Domsalla und Melzig, 2008; Singh *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2011).

Neben den beiden Orthologen der Säuger-Pyrollysine, die sich von den restlichen Subtilasen in Pflanzen deutlich unterscheiden (Abbildung 1.1.1), und den Subtilasen mit einer breiten Substratspezifität, sind in Pflanzen auch weitere Subtilasen mit Proprotein-Konvertase-



Einleitung: Pflanzen-Subtilasen mit bekannten Substraten

Charakter bekannt. Ein Beispiel für die mögliche Beteiligung einer Subtilase an der Reifung eines Pflanzenpeptid-Wachstumsfaktors ist die Prozessierung der *AtPSK* „Phytosulfokin“ Vorläufer durch *AtSBT1.1*. In *Arabidopsis thaliana* umfasst die PSK-Familie 6 PSK-Gene, die alle für ein Präproprotein zwischen 80-120 Aminosäuren kodieren. Wie Subtilasen besitzen sie am N-Terminus ein Signalpeptid, das sie für den Sekretorischen Weg markiert und eine Prodomäne deren Abspaltung während des Reifungsprozesses erforderlich ist. Des Weiteren ist für die Bildung des reifen Peptids eine Spaltung am C-Terminus notwendig (Yang *et al.*, 2001; Lorbiecke und Sauter, 2002). Die einzelnen Präproproteine werden unterschiedlich gut durch *AtSBT1.1* prozessiert. *AtSBT1.1* spaltet vom *AtPSK4* Vorläufer abgeleitete synthetische Peptide mit guter Effizienz drei Aminosäuren „*upstream*“ der PSK-Sequenz, während Peptide die den Vorläufern von *AtPSK2* und *AtPSK5* entsprechen weniger effizient und die von *AtPSK1*, *AtPSK3* und *AtPSK6* überhaupt nicht gespalten werden (Srivastava *et al.*, 2008; Sauter, 2015). Bei ektopischer (konstitutiver) Überexpression des *AtPSK4* Vorläufers wird eine *AtSBT1.1*-abhängige Spaltung auch *in vivo* beobachtet (Srivastava *et al.*, 2008). Das reife PSK ist ein sulfatiertes Pentapeptid (Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln). Die Sulfatierung der beiden Tyrosine wird im Sekretorischen Weg durch eine im trans-Golgi Netzwerk lokalisierte TPST „*Tyrosylprotein sulfotransferase*“ bewerkstelligt (Komori *et al.*, 2009). Sie führt zu einer tausendfachen Erhöhung der Aktivität des reifen PSK-Peptids (Sauter, 2015). Im weiteren Verlauf der PSK-Signalkaskade bindet das reife PSK als Ligand an LRR-RLKs „*leucine-rich repeats receptor-like protein kinases*“. Im Genom von *Arabidopsis thaliana* wurden mit *AtPSKR1* und *AtPSKR2* zwei Rezeptorkinasen identifiziert, die weitestgehend charakterisiert worden sind (Matsubayashi, 2006; Kutschmar *et al.*, 2009; Stührwohldt *et al.*, 2015). In Pflanzen wirkt PSK als zellautonomes Signal. So ist PSK an der Regulation der Zellexpansion, der Zellteilung im Wurzelapikalmeristem, der Pollenschlauchführung durch den Griffel und an Immunantworten auf verschiedene Krankheitserreger beteiligt (Matsubayashi und Sakagami, 1996; Sauter, 2015). Obwohl die bei ektopischer Expression beobachtete Spaltung von *AtPSK4* in der *sbt1.1*-Mutanten nicht nachgewiesen werden kann (Srivastava *et al.*, 2008), zeigt die *sbt1.1* Mutante keinen mit PSK verbundenen Phänotyp. Somit bleibt noch zu zeigen, ob es sich bei der Prozessierung von *AtPSK4* durch *AtSBT1.1* um eine physiologisch relevante Subtilase-Substrat Interaktion handelt.

Weitere Subtilasen mit Proprotein-Konvertase Charakter sind für die Prozessierung des IDA „*Inflorescence deficient in abscission*“-Peptidsignal Vorläufers verantwortlich. Dieses Peptidsignal ist neben klassischen Phytohormonen an der Regulation des Abwurfs von Blütenorganen beteiligt. Dies ist ein streng kontrollierter Prozess in einem speziellen Gewebe,

Einleitung: Pflanzen-Subtilasen mit bekannten Substraten

der Abszissionszone (AZ). Der Abszissionsprozess kann in vier Phasen unterteilt werden (Abbildung 1.3.2). Für die Bildung der Abszissionszone (AZ) in Phase 1 sind mehrere MADS-Box Transkriptionsfaktoren verantwortlich. An der Aktivierung der AZ in Phase 2 sind neben der IDA-Signalkaskade auch klassische Pflanzenhormone beteiligt. Ethylen ist für die Abszission in *Arabidopsis* und Kulturpflanzen weitgehend notwendig. In *Arabidopsis*-Mutanten mit defekter Ethylen-Wahrnehmung (*etr1* „ethylene response 1“) und Ethylen-Signaltransduktion (*ein2* „ethylene insensitive 2“) ist die Blütenorgan-Abszission verzögert (Patterson und Bleeker, 2004). „Downstream“ von Ethylen ist der MADS-Box-Transkriptionsfaktor FYF „forever young flowers“ an der Regulation der Abszission beteiligt. Die Überexpression von FYF führt zu einer verzögerten Abszission (Chen *et al.*, 2015). Auxin gilt allgemein als negativer Regulator der Abszission. Es wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von Auxin das Gewebe für Ethylen unempfindlich macht (Sexton und Roberts, 1982). Jasmonsäure hat einen positiven Effekt auf die Abszission. Die *coi1* „coronatin insensitiv 1“ Mutante, die Jasmonsäure nicht mehr detektieren kann, hat eine verzögerte Blütenorgan-Abszission (Kim *et al.*, 2013).

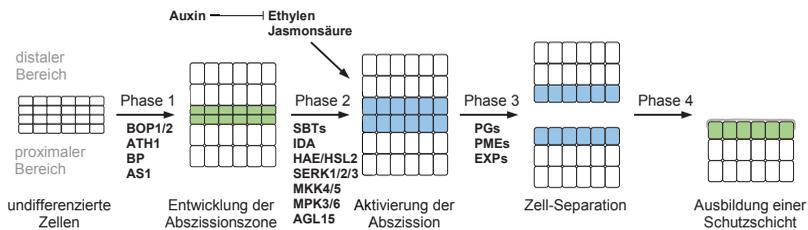


Abbildung 1.3.2: Physiologisches Modell der Blütenorgan-Abszission in *Arabidopsis thaliana*. **Phase 1:** Entwicklung der Abszissionszone abhängig von den Transkriptionsfaktoren BOP1/2, ATH1, BP und AS1. **Phase 2:** Aktivierung der Abszission durch den IDA „Inflorescence Deficient in Abscission“ - Signalweg, relevante Proteine sind IDA, die IDA freisetzenden Subtilasen (SBTs), die Rezeptoren HAE/HSL2 sowie die Co-Rezeptoren SERK1/2/3, die Vertreter der MAPK Signalkaskade MKK4/5 und MPK3/6 und der Repressor AGL15, der durch MPK3/6 phosphoryliert wird. Die Hormone Ethylen und Jasmonsäure regulieren die Abszission positiv, während Auxin die Wirkung von Ethylen negativ beeinflusst. Die Zellen der Abszissionszone vergrößern sich und der pH-Wert ihres Zytosols wird alkalisch. **Phase 3:** Polygalacturonasen (PGs), Pektin-Methyltransferasen (PMEs) und Expansine (EXPs) lösen die Zellwände auf und verursachen die Zellseparation. **Phase 4:** Versiegelung der Narbenzone mit einer Schutzschicht, pH-Wert kehrt in den Neutralbereich zurück. Grüne Zellen stehen für einen neutralen cytosolischen pH-Wert und blau für einen alkalischen pH-Wert. Abbildung basiert auf denen von Kim (2014) und Patharkar und Walker (2018).

Da Pflanzenhormone immer in einer Wechselwirkung „cross-talk“ zueinander stehen, ist es möglich, dass weitere Pflanzenhormone an der Regulation der Abszission beteiligt sind. Diese könnten zum Beispiel eine Rolle bei der Regulation der Seneszenz spielen, die der Organabszission in der Regel vorausgeht (Guiboileau *et al.*, 2010; Patharkar und Walker, 2015; Patharkar und Walker, 2016). Nach Aktivierung der Abszissionszone steigt der pH im Cytosol von AZ-Zellen (Sundaresan *et al.*, 2015). Außerdem machen die Zellen der AZ ein