

1 EINLEITUNG

Ein wichtiges Merkmal lebender Zellen ist ihre Fähigkeit, sowohl auf interne als auch auf externe Reize durch Feinabstimmung und Regulierung physiologischer Prozesse zu reagieren. Auf diese Weise kann sich der Organismus an Veränderungen anpassen, die sich während der individuellen Entwicklung oder aufgrund veränderter Umweltfaktoren ergeben. Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass der kontrollierte Abbau von Proteinen, d.h. die Proteolyse, eine Schlüsselrolle in der zellulären Regulation aller Organismen spielt. Eine wichtige Aufgabe der Proteolyse ist die Eliminierung von defekten sowie fremdartigen Polypeptiden und Proteinen und sie stellt somit einen hochkontrollierten Protein-Qualitätskontrollmechanismus dar. Gleichzeitig stehen die auf diese Weise frei werdenden Aminosäuren wieder für die Proteinbiosynthese oder die Energiegewinnung zur Verfügung. Die Bandbreite proteolytischer Prozesse beschränkt sich jedoch nicht nur auf die mehr oder weniger unspezifische Zerlegung von Proteinen in ihre Grundbausteine. Proteasen sind in der Lage, durch limitierte Proteolyse Enzyme spezifisch zu inaktivieren oder Präproproteine zu prozessieren und so eine Vielzahl von zellulären Abläufen zu regulieren. Auf diese Weise sind Proteasen wahrscheinlich direkt oder indirekt an fast allen Prozessen innerhalb einer Zelle beteiligt (CALLIS 1995, SCHALLER 2004).

Eine der am intensivsten erforschten Klasse von Proteasen sind die Serinproteasen, welche durch eine spezielle Anordnung dreier reaktiver Aminosäurereste, einer davon der namensgebende Serinrest, im aktiven Zentrum gekennzeichnet sind. Ein Vergleich der Aminosäurereste dieser so genannten katalytischen Triade ist, zusammen mit dem der Kristallstrukturen einzelner Vertreter dieser Klasse, Grundlage für die Unterteilung in verschiedene Familien und Klans (RAWLINGS & BARRET 1994).

Die Subtilasen gehören nach dieser Klassifizierung zur S8 Familie innerhalb des SB Klans der Serinproteasen (MEROPS Proteindatenbank, <http://merops.sanger.ac.uk>; RAWLINGS ET AL. 2008). Sie haben ihren Namen von Subtilisin, einer alkalischen extrazellulären Protease aus *Bacillus subtilis* und verwandten Arten. Allen Subtilasen gemeinsam ist die gut konservierte, einzigartige Anordnung der Aspartat- (Asp), Histidin- (His) und Serinreste (Ser) in der katalytischen Triade. Lange Zeit wurde angenommen, dass Subtilasen nur in Prokaryoten vorzufinden sind. Die bakteriellen Subtilasen sind intensiv untersucht und aufgrund ihrer weltweiten Nutzung als Zusätze in Waschmitteln von großer wirtschaftlicher Bedeutung.

Mit der Entdeckung der Subtilisin-ähnlichen Kex2p-Protease (Kexin) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, wurde der Weg für die Identifizierung von Subtilasen in nahezu allen eukaryotischen Organismen bereitet (JULIUS ET AL. 1984, THORNER 1985). Aufgrund hoher Sequenzähnlichkeit mit

dem katalytischen Zentrum des Kexins, konnte 1989 die erste tierische Subtilase, das Furin, identifiziert werden (FULLER ET AL. 1989).

Das Interesse an Subtilasen wuchs in den 90er Jahren, als entdeckt wurde, dass die dem Kexin homologen tierischen Subtilasen die lange gesuchten Proprotein-Konvertasen (PC) sind. Diese sind in Säugern für die Reifung von Peptidhormonen, Neuropeptiden, Wachstumsfaktoren und Rezeptorproteinen verantwortlich (BARR 1991, SEIDAH ET AL. 2003). Typisch für die PCs, welche aufgrund der oben genannten Sequenzähnlichkeiten zu der Kexin-Familie gehören (Abb. 1.1), ist die hochspezifische Proteolyse ihrer Substrate C-terminal von dibasischen (Lys-Arg oder Arg-Arg) Motiven.

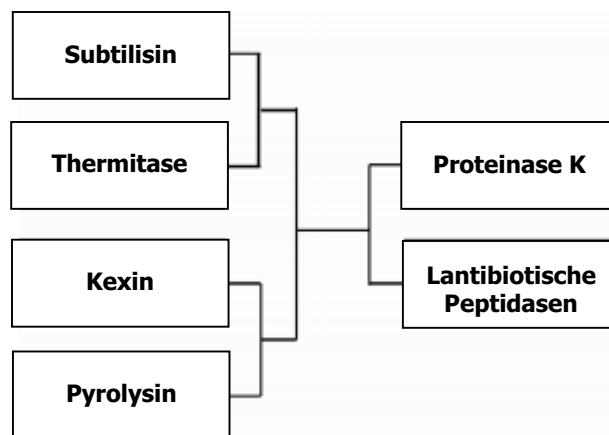


Abb. 1.1 Klassifizierung der Subtilasen

Die Verwandtschaft zwischen den Subtilasenfamilien ist in Form eines schematischen phylogenetischen Baumes dargestellt, der auf dem Sequenzvergleich der katalytischen Domänen einzelner Subtilasen basiert. Es besteht keine Proportionalität zwischen der Länge der Äste und der Sequenzähnlichkeit unter den Subtilasenfamilien (SIEZEN & LEUNISSEN 1997).

Ein weiterer Meilenstein in der Erforschung der Subtilasen war die Entschlüsselung der Kristallstrukturen von Kexin und Furin im Jahr 2003 (HOLYOAK ET AL. 2003, HENRICH ET AL. 2003), die Aufschluss über die molekulare Basis der ausgeprägten Substratspezifität der PCs brachte. Seitdem wurden weitere spektakuläre Entdeckungen bei den bakteriellen und tierischen Subtilasen gemacht.

Auf der Seite der prokaryotischen Subtilasen konnten PATON ET AL. (2004) mit der Subtilase Cytotoxin AB₅ (SubAB) eine neue Familie der AB₅ Cytotoxine identifizieren. Dieses Enzym, welches von bestimmten Stämmen Shiga Toxin-bildender *E. coli* Bakterien produziert wird, ist ein hoch wirksames Zellgift. Durch spezifische Proteolyse an einer einzigen Spaltstelle inaktiviert SubAB das essentielle molekulare Chaperon BiP (auch Immunglobulin-*heavy chain*-Bindeprotein genannt) des endoplasmatischen Retikulums (ER) (PATON ET AL. 2006). BiP ist ein hochkonserviertes Hauptregulator des ERs, der für die Funktionsfähigkeit eukaryotischer Zellen, angefangen bei der Hefe bis hin zu den Säugern, lebensnotwendig ist (KIM & ARVAN 1998, HENDERSHOT 2004). Die zentrale Funktion des multifunktionellen Proteins BiP (HENDERSHOT 2004, LUO ET AL. 2006) in

eukaryotischen Zellen erklärt den starken Einfluss auf die physiologischen Prozesse, welche SubAB durch seine Spaltung ausübt. Aufgrund der außerordentlichen Substratspezifität von SubAB und der hohen evolutionären Konservierung des BiP-Proteins, wird SubAB als ein erfolgreiches Instrument gesehen, um die verschiedenen Funktionen von BiP in der Zelle zu untersuchen. Besonders vielversprechend wäre eine medizinische Anwendung der SubAB. So ist ein unerwünschter Nebeneffekt der Chemotherapie bei Krebserkrankungen die Induktion der BiP-Expression, die z.B. mit Resistenzen gegenüber den eingesetzten Medikamenten oder der erneuten Ausbreitung von Tumoren einhergeht (DONG ET AL. 2005). Möglicherweise könnte der Einsatz von SubAB solche Nebenwirkungen in der Krebstherapie mildern (MONTECUCCO & MOLINARI 2006).

Auch bei den tierischen Subtilasen steht deren Erforschung für den Einsatz in der Medizin im Vordergrund. Neben der bereits erwähnten Rolle der tierischen PCs bei der Reifung von Prohormonen, Rezeptoren, Wachstumsfaktoren u.a., werden diese Enzyme auch von verschiedenen Pathogenen ausgenutzt. Virale Hüllproteine und bakterielle Toxine werden von den PCs ebenso prozessiert wie endogene Proteine, auf diese Weise aktiviert und können so schwere Krankheiten, wie z.B. Grippe, Diphtherie oder Milzbrand auslösen (THOMAS 2002, SHIRYAEV ET AL. 2007). Eine genaue Kenntnis der Wirkungsweise der einzelnen PCs, ihre Substratspezifität und Spalteffizienz, ist dabei die Voraussetzung, um neue Anwendungen in der Medizin zu finden. REMACLE ET AL. (2008) untersuchten daher die Spaltung von über 100 Peptiden bestehend aus 10 Aminosäuren durch alle sieben bekannten PCs der Kexinfamilie aus *Homo sapiens* (Furin, PC1/3, PC2, PC4, PACE4, PC5/6 und PC7). Ihre Ergebnisse liefern wichtige Erkenntnisse für die Entwicklung von Medikamenten, z.B. weisen Ihre Daten darauf hin, dass PC2 am effizientesten von allen Mitgliedern der PC-Familie das Vorläuferprotein des Parainfluenza-Virus spaltet und somit ein gutes mögliches Angriffsziel für ein Medikament gegen diese Krankheit ist.

Zwei weitere Säuger PCs, die Site-1-Protease (S1P, auch Subtilisin/Kexin-Isoenzym 1 (SKI1) genannt) und die PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9, auch NARC-1, Neural Apoptosis-Regulated Convertase-1 genannt) werden nicht der Kexin- sondern der Pyrolysin- bzw. Proteinase K-Familie zugeordnet und bilden daher eine Ausnahme (SAKAI ET AL. 1998, SEIDAH ET AL. 1999, SEIDAH ET AL. 2003). Beide spielen eine wichtige Rolle im Lipidmetabolismus.

PCSK9 inaktiviert den Low-Density-Lipoprotein (LDL)-Rezeptor und ist auf diese Weise indirekt an der Regulierung des LDL-Cholesterin-Spiegels im Blut beteiligt (SEIDAH & PRAT 2007, KWON ET AL. 2008). S1P reguliert durch die Spaltung der so genannten SREBPs (Sterol regulatory element-binding proteins) wichtige Elemente des Fettstoffwechsels (DUNCAN ET AL. 1997, SAKAI ET AL. 1998). Inhibitoren der S1P können die Cholesterin- und Fettsäuresynthese herabsetzen und stellen somit potentielle Therapeutika z.B. für die Behandlung von erhöhten Cholesterinwerten dar, welche eine Reihe von Erkrankungen zur Folge haben (HAWKINS ET AL. 2008).

Eine weitere wichtige Funktion der S1P in Säugerzellen ist die Spaltung des Transkriptionsfaktors ATF6 (YE ET AL. 2000) während der ER-Stressantwort, allgemein auch als Unfolded Protein Response (UPR) bezeichnet. Dieser Signalweg wird durch die Akkumulation nicht oder fehlerhaft gefalteter Proteine im ER ausgelöst und führt zur verstärkten Expression von Genen, die für die Proteinfaltung wichtig sind (RUTKOWSKI & KAUFMANN 2004).

Ungeachtet der Tatsache, dass die pflanzlichen Subtilasen erst nach den prokaryotischen und den tierischen entdeckt wurden, übersteigt ihre Anzahl deren mittlerweile bei weitem. Allein das Genom von *Arabidopsis thaliana* weist die Sequenz von 56 Genen auf, welche für Subtilasen kodieren (RAUTENGARTEN ET AL. 2005). Die Proteinstrukturen der pflanzlichen Subtilasen weisen starke Gemeinsamkeiten auf. Sie besitzen vier funktionelle Domänen, die Prä-, Pro-, katalytische und proteaseassoziierte (PA)-Domäne und werden als große Vorläuferproteine synthetisiert. Ausnahmen stellen lediglich die beiden Arabidopsis Subtilasen *ASBT6.1* und *ASBT6.2* dar, welche keine PA-Domäne aufweisen.

Durch Proteolyse der Prä- und Prodomäne werden Subtilasen zur aktiven Protease prozessiert (BEERS ET AL. 2004). Die katalytische Domäne beinhaltet die schon erwähnte Ser-His-Asp-Triade, die durch ihre räumliche Faltung die hydrolytische Reaktion im aktiven Zentrum der Protease bewirkt. Unterbrochen wird die katalytische Domäne von der PA-Domäne. Diese Struktur konnte bisher ausschließlich bei Mitgliedern pflanzlicher und prokaryotischer Subtilasen nachgewiesen werden. Ihre Funktion ist bis heute gänzlich ungeklärt, ein Einfluss auf die Substratspezifität oder Protein-Protein-Interaktionen wird vermutet (BRUINENBERG ET AL. 1994, LAWRENCE ET AL. 1999, MAHON & BATEMAN 2000). Aufschluss über die Funktion der PA-Domäne könnte eine Kristallstrukturanalyse liefern, bis jetzt konnte jedoch noch keine pflanzliche Subtilase kristallisiert werden.

Alle bis jetzt entdeckten pflanzlichen Subtilasen wurden aufgrund ihrer Sequenz den Pyrolysinen zugeordnet. Diese Familie zeichnet sich im Gegensatz zu den Kexinen, welche die bereits erwähnten PCs umfasst, durch eine große Heterogenität sowohl im Hinblick auf die Herkunft der in ihr vertretenen Enzyme als auch bezüglich der Substratspezifität aus (SIEZEN & LEUNISSEN 1997). Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass pflanzliche Subtilasen ausschließlich an der unspezifischen Proteolyse von Proteinen beteiligt sind. Ein Beispiel dafür ist Cucumisin, die erste Subtilase, welche aus einer höheren Pflanze isoliert wurde. Diese extrazelluläre Protease aus *Cucumis melo*, welche bis zu 10 % des löslichen Proteingehalts der Melonenfrucht ausmacht, schneidet eine breite Palette an Substraten, was auf eine eher degradative Funktion hindeutet (KANEDA & TOMINAGA 1975, YAMAGATA ET AL. 1994, UCHIKOBA ET AL. 1995). Dasselbe gilt für die

Subtilasen Taraxalisin aus *Taraxacum officinale* (RUDENSKAYA ET AL. 1998), Macluralisin aus *Maclura pomifera* (RUDENSKAYA ET AL. 1995) und Plantagolisin aus *Plantago major* (BOGACHEVA ET AL. 2001). Es gab allerdings schon seit Beginn der 90er Jahre indirekte Hinweise für die Existenz von Subtilasen mit enger Substratspezifität in Pflanzen.

In transgenen Tabakpflanzen konnte ein Pilztoxin aus *Ustilago maydis* exprimiert, korrekt prozessiert und sekretiert werden, dessen Prozessierung im Pilz eine Kex2p-ähnliche Proteaseaktivität im sekretorischen System erfordert (TAO ET AL. 1990). Außerdem wiesen GU ET AL. (1996) nach, dass die Proform der Leucinaminopeptidase a (LAP-A) aus Tomate nahe der Spaltstelle des Propeptids zwei dibasische Aminosäuremotive aufweist, welche für die Subtilasen der Kexin-Familie typisch sind. Die Autoren vermuteten daher, dass LAP-A an dieser Stelle durch eine Kex2p-ähnliche Protease gespalten wird, bevor eine autokatalytische Verkürzung des N-Terminus zum reifen LAP-A führt. Als drittes Indiz für die Existenz von Subtilasen mit Kex2p-ähnlicher Spezifität in Pflanzen kann die Identifizierung des Proteins SBP50 (Systemin-binding-protein 50), welches spezifisch mit dem Wundsignalpeptid Systemin der Tomate interagiert, herangezogen werden (SCHALLER & RYAN 1994). Auch Systemin weist das typische dibasische Spaltnmotiv für Subtilasen der Kexin-Familie auf. Zudem konnte SBP50 mit einem Antiserum gegen eine PC aus *Drosophila* immunodetektiert werden (SCHALLER & RYAN 1994). Aufgrund dieser Daten wurde angenommen, dass es sich bei SBP50 möglicherweise um eine PC-ähnliche Protease handelt. SCHALLER (1998) konnte später nachweisen, dass Systemin *in vivo* tatsächlich C-terminal der beiden basischen Aminosäuren prozessiert wird.

In Anbetracht dieser Hinweise und vor dem Hintergrund der wichtigen Funktionen, die PCs in Tieren einnehmen, lag die Vermutung nahe, dass Subtilasen in Pflanzen ähnlich wichtige Aufgaben erfüllen und vergleichbar mit diesen möglicherweise an der Prozessierung von Vorläuferproteinen pflanzlicher Peptidhormone beteiligt sind. Dies und die Annahme, dass unter den physiologischen Substraten der pflanzlichen Subtilasen neue pflanzliche Peptidhormone bzw. deren Vorläufer entdeckt werden können, macht die Erforschung der pflanzlichen Subtilasen und die Aufklärung ihrer Funktionen zu einem wichtigen Forschungsziel.

Auch wenn alle bisher identifizierten pflanzlichen Subtilasen aufgrund ihrer Sequenz den Pyrolysinen und nicht den Kexinen zugeordnet wurden, so zeigt das Beispiel der Säugersubtilase S1P jedoch, dass auch Mitglieder der Gruppe der Pyrolysine als PC fungieren können.

Mit Hilfe der biochemischen Charakterisierung konnten inzwischen einige Subtilasen in Pflanzen mit vergleichbar hoher Selektivität für spezifische Spaltstellen wie sie die PCs aufweisen, identifiziert werden. Die Subtilase C1 aus Sojabohne beispielsweise, weist eine hohe Präferenz für Glu-Glu und Glu-Gln Bindungen auf (BOYD ET AL. 2002). Die Tomaten-Subtilasen *SSBT1* und *Ara 12*, eine Subtilase aus *Arabidopsis thaliana*, zeigen eine Präferenz für Gln oder Leu bzw. Phe oder Ala in der

P₁-Position ihrer synthetischen Substrate (JANZIK ET AL. 2000, HAMILTON ET AL. 2003). Essentiell für die so genannten Saspasen aus Hafer ist Asp in der P₁-Position ihrer Substrate. Ihre Rolle bei einer proteolytischen Signalkaskade während der Apoptose wird diskutiert (COFFEEN & WOLPERT 2004). Für einige wenige pflanzliche Subtilasen konnten *in vivo*-Substrate identifiziert werden. Das Tomatenprotein LRP, welches in der Zellwand lokalisiert ist, wird in Virus-infizierten Pflanzen von einer pathogen-induzierbaren Subtilase der P69-Subfamilie prozessiert (TORNERO ET AL. 1996).

Die Subtilase *AtS1P* ist durch die Prozessierung des Transkriptionsfaktors *AtbZIP17*, welcher die Expression verschiedener Salzstressgene induziert, an der Signalkaskade während der Salzstressantwort in *Arabidopsis* beteiligt (LIU ET AL. 2007).

Die Aufreinigung und biochemische Charakterisierung von pflanzlichen Subtilasen sowie die Untersuchung ihrer Substratspezifität sind daher wichtige Schritte bei der Aufklärung ihrer Funktion, auch wenn erst für wenige dieser Enzyme physiologische Substrate entdeckt werden konnten und daher weiterhin offen bleibt, ob sie ähnlich den PCs eine Rolle als prozessierende Enzyme spielen.

Für die meisten pflanzlichen Subtilasen wurde deren mutmaßliche physiologische Rolle hauptsächlich anhand von gewebe- oder entwicklungspezifischen bzw. stressinduzierten Expressionsmustern postuliert.

Die Subtilase LIM9 aus *Lilium longiflorum* wird beispielsweise spezifisch während einer späten Phase der Microsporenentwicklung in Tapetumzellen exprimiert und ihr wird daher eine mögliche Beteiligung an der Pollenentwicklung zugesprochen (TAYLOR ET AL. 1997). Das Expressionsmuster zweier weiterer Subtilasen deutet auf eine Funktion bei der Knöllchenentwicklung im Rahmen der Symbiose mit Actinomyceten hin. Die mRNAs von ag 12 aus *Alnus glutinosa* und ihrem Homolog CG12 aus *Casuarina glauca*, eine in Australien endemische Art, werden nur in einem frühen Stadium der Nodulation gebildet (RIBEIRO ET AL. 1995, LAPLACE ET AL. 2000). Für zwei Subtilasen aus *Lotus japonicus* wurde eine Induktion in Wurzeln bei Ausbildung einer arbuskulären Mykorrhiza beobachtet und eine mögliche Funktion bei Ausbildung der Symbiose diskutiert (KISTNER ET AL. 2005). Als weiteres Beispiel kann die Subtilase SCS1 aus Sojabohne genannt werden, die ausschließlich in der Samenschale exprimiert wird (BATCHELOR ET AL. 2000). Ausführliche Expressionsstudien wurden auch an Subtilasen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der Subtilasen SLP2, SLP3 und ARA12 gewebe- und entwicklungspezifisch reguliert wird (GOLLDACK ET AL. 2003, HAMILTON ET AL. 2003). Die *Arabidopsis* Subtilasen XSP1 und AIR1 scheinen in Xylemdifferenzierung bzw. Seitenwurzelbildung involviert zu sein, wie die spezifische Expression in den jeweiligen Geweben andeutet (NEUTEBOOM ET AL. 1999, ZHAO ET AL. 2000).

Ein exakter Nachweis für die Verbindung zwischen dem beobachteten Expressionsmuster und der vermeintlichen Funktion der jeweiligen Subtilase fehlt jedoch in all den oben genannten Beispielen.

Expressionsstudien alleine reichen daher nicht aus, um die Funktionen von pflanzlichen Subtilasen zu identifizieren.

Genetische Daten lieferten die stärksten Argumente für die Hypothese, dass pflanzliche Subtilasen PC-ähnliche Funktionen innehaben. Mit Hilfe so genannter "loss-of-function"-Mutanten konnte einer Reihe von *Arabidopsis*-Subtilasen eine eindeutige Funktion in der hochspezifischen Regulation von Entwicklungsprozessen in der Pflanze zugewiesen werden. So ist SDD1 an der Steuerung der stomatären Dichte und Verteilung beteiligt (BERGER & ALTMANN 2000, VON GROLL ET AL. 2002). ALE1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Cutikula sowie bei der Differenzierung der Epidermis während der Embryogenese (TANAKA ET AL. 2001). LIU ET AL. (2007) konnten zeigen, dass die der schon erwähnten tierischen S1P Subtilase ähnliche *AtS1P* (entspricht *AtSBT6.2*) an der Salzstressantwort beteiligt ist. Die Autoren beobachteten, dass eine der T-DNA-Insertions-Mutanten empfindlich auf Salzstress reagierte und konnten demonstrieren, dass *AtS1P* im Golgi-Apparat lokalisiert und an einem durch Salzstress induzierten Signalweg beteiligt ist, der der ER-Stressantwort ähnelt.

RAUTENGARTEN ET AL. (2008) untersuchten T-DNA-Insertions-Mutanten, welche veränderte Eigenschaften in der Samenschale aufweisen. So konnte der Subtilase *AtSBT1.7* eine Funktion bei der Freisetzung von Schleim aus der Samenschale während der Samenquellung und -keimung zugeordnet werden.

Die Subtilasen in Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) fanden Beachtung nachdem die bereits erwähnten Untersuchungen von SCHALLER & RYAN (1994) nahe legten, dass eine PC an der Regulation der Wundantwort und der Abwehr von herbivoren Insekten beteiligt sein könnte. Tomatenpflanzen reagieren auf Verwundung durch Insektenfraß mit der Akkumulation von Abwehrproteinen. Dabei spielt das Signalmolekül Systemin, das erste hormonähnliche Peptid in Pflanzen, eine wichtige Rolle (PEARCE ET AL. 1991). Inzwischen ist bekannt, dass Systemin die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Signalkaskade auslöst, welche zur Jasmonsäure-Biosynthese führt und Jasmonsäure schließlich die Expression von Abwehrgenen induziert (RYAN 2000). Systemin weist am C-Terminus ein Spaltmotiv auf, das typisch für die Substrate der Säuger PC Furin ist, was auf die Existenz einer PC-ähnlicher Proteasen in Tomatenpflanzen schließen lässt (SCHALLER & RYAN 1994). Auf der Suche nach Proteinen, die mit Systemin interagieren und möglicherweise in den Systemin-Signalweg involviert sind, konnte das schon erwähnte Protein SBP50 identifiziert werden, welches mit Antikörpern gegen eine PC aus *Drosophila* interagiert (SCHALLER & RYAN 1994, SCHALLER 1998). Diese Entdeckung war Auslöser für die Suche nach PCs in Tomatenpflanzen. Allerdings konnte bis heute für keine der Tomaten-Subtilasen eine den PCs vergleichbare Funktion nachgewiesen werden.

Die Subtilasefamilie in Tomate umfasst 15 Mitglieder und ist in fünf Subfamilien unterteilt (JORDÁ ET AL. 1999, MEICHTRY ET AL. 1999, Abb. 1.2). Für die meisten von ihnen liegen auf DNA- und RNA-Ebene detaillierte Daten vor (MEICHTRY ET AL. 1999).

Die P96-Familie ist die größte Subfamilie. Das Expressionsprofil von P69A und P69D ist stark entwicklungsabhängig und gewebespezifisch. Daher wird ihnen eine Rolle bei der Pflanzenentwicklung zugesprochen (JORDÁ ET AL. 1999). P69E und P69F werden sehr restriktiv in Wurzeln bzw. Hydathoden, also potentiellen Eintrittsorten für Pathogene, exprimiert. JORDÁ ET AL. (2000) diskutieren daher eine mögliche Rolle dieser Subtilasen bei der primären Pathogenabwehr. Die Expression von P69B und P69C wird erst durch Pathogenbefall bzw. Behandlung mit Salicylsäure oder dem Pilztoxin Fusicoccin induziert. Sie scheinen demzufolge in die Pathogenantwort der Tomatenpflanze involviert zu sein (JORDÁ ET AL. 1999, JORDÁ & VERA 2000, SCHALLER ET AL. 2000).

Tmp wurde wie ihr Ortholog in Lilie (Lim9) aufgrund ihrer spezifischen Expression in Antheren während später Phasen der Pollenentwicklung mit dieser in Verbindung gebracht (RIGGS & HORSCH 1995, TAYLOR ET AL. 1997).

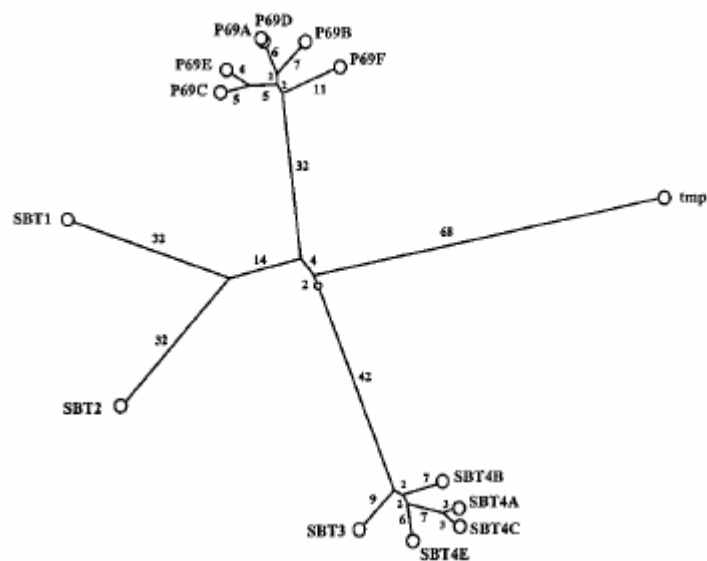


Abb. 1.2 Phylogenetischer Baum der Subtilasefamilie in Tomate (*S. lycopersicum*)

Basierend auf dem Vergleich von Aminosäuresequenzen, die von der gDNA und cDNA abgeleitet wurden, ist die phylogenetische Beziehung der Tomaten-Subtilasefamilie dargestellt. Die Zahlen stellen die PAM-Distanzen (accepted point mutations per 100 residues) zwischen den Sequenzen dar. Die Sequenz von SBT4D, wurde nicht in die Analyse mit einbezogen, da diese aufgrund einer Insertion einer Retrotransposon-ähnlichen Sequenz zerschnitten wird (MEICHTRY ET AL. 1999).

Auch bei der *SSBT*-Subfamilie (früher *LeSBT*-Subfamilie) beschränkten sich die funktionellen Hinweise zunächst auf die Ergebnisse von Expressionstudien. Die Expression von *SSBT1* ist auf Blüten, Wurzeln sowie Blüten- und Blattabschissionszonen begrenzt (MEICHTRY ET AL. 1999, JANZIK 2000, CEDZICH, mündliche Mitteilung).