

Speicherproteinmobilisierung und Proteinasen in Protein Bodies von Embryoachsen und Kotyledonen bei *Vicia sativa* L. während der Samenkeimung und des frühen Keimlingswachstums

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doktor rerum naturalium (Dr. rer. Nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Armin Schlereth
geb. am: 28.07.57 in: Heilbronn-Sontheim

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. Klaus Müntz
2. Prof. Dr. Claus Wasternack
3. Prof. Dr. Urs Feller

Halle (Saale), den 05.12.2001 (Datum der Verteidigung)

urn:nbn:de:gbv:3-000003295

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003295>]

FÜR ULRIKE, DAVID UND PHILIPP

ZU OASEN FÜHREN ALLE WEGE DURCH DIE WÜSTE

Werner Springer

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Speicherproteine	2
1.1.1 Nomenklatur der Speicherproteine	3
1.1.2 Speicherglobuline von Leguminosen und anderen dikotyledonen Pflanzen	5
1.1.3 Synthese und Deponie der Globuline während der Samenreifung	7
1.2 Keimung und Keimlingswachstum	10
1.3 Proteasen aus keimenden Samen und Keimlingen	11
1.3.1 Papain-artige Cystein-Endopeptidasen	13
1.3.2 Legumain-artige Cystein-Endopeptidasen	14
1.4 Mobilisierung der Speicherproteine und daran beteiligte Proteasen: Die besondere Rolle der Cystein-Endopeptidasen	15
1.4.1 Kontroverse Ergebnisse über Vorkommen und Funktion gespeicherter Proteasen in Protein Bodies von Speichergewebszellen	16
1.4.2 Neubildung von Proteinasen und ihre Funktion beim Abbau von Proteinen in Kotyledonen während des Keimlingswachstums	17
1.4.3 Wichtige offene Fragen	19
1.5 Ziele der Arbeit	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Versuchspflanzen	23
2.2 Plasmide und Vektoren	23
2.3 Bakterienstämme	23
2.4 Tabellarische Zusammenfassung der angewandten Methoden	24
2.5 Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen	26
2.6 PCR-Amplifikation von cDNA	26
2.7 Erzeugung einer durch Aminosäureaustausch mutierten rekombinanten Proteinase B	27
2.7.1 <i>in vitro</i> -Mutation	27

2.7.2	Isolation der mutierten Proteinase B-cDNA	27
2.7.3	Klonierung der mutierten Proteinase B-cDNA	28
2.7.4	Erzeugung und Isolation der mutierten Proteinase B	28
2.8	Herstellung des Proteinase B-spezifischen Antikörpers	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Publikationen M1 bis M5	30
3.1.1	Keimung und Keimlingswachstum	30
3.1.2	Mengenbilanzen von löslichen Proteinen und Aminosäuren während der Keimung und des frühen Keimlingswachstums	32
3.1.3	Abbau spezifischer Proteine in Embryoachsen und Kotyledonen während der Keimung und der ersten Tage des Keimlingswachstums	32
3.1.4	Elektrophoretische Analyse von Proteinasen während der Keimung und des Keimlingswachstums	33
3.1.5	mRNA- und Immunoblot-Analyse von CPR während der Keimung und der ersten Tage der Keimlingsentwicklung	34
3.1.6	Globulinabbau bei gehemmter cytoplasmatischer Proteinbiosynthese	35
3.1.7	Globulinabbau in Lysaten von Protein bodies aus trockenen Samen	35
3.1.8	Proteinasen in Protein bodies aus trockenen Samen	36
3.2	Vorkommen von Protonenpumpen in Protein body-Membranen	37
3.3	Arbeitsanteil an den verschiedenen Manuskripten	38
4	Die der Dissertation zugrundeliegenden veröffentlichten Originalarbeiten	39
4.1	Protein degradation and nitrogen supply during germination and seedling growth of vetch (<i>Vicia sativa</i> L.). <i>J. Plant Physiol.</i> 152: 683 – 691 (1998)	39
4.2	The families of papain- and legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of <i>Vicia</i> seeds: developmental patterns, intracellular localization and functions in globulin proteolysis. <i>Plant Mol. Biol.</i> 43: 83 -101 (2000)	39

4.3	Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (<i>Vicia sativa</i> L.). <i>J. Exp. Bot.</i> 51: 1423 - 1433 (2000)	39
4.4	Stored cysteine proteinases start globulin mobilization in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (<i>Vicia sativa</i> L.) seed germination. <i>Planta</i> 212: 718 – 727 (2001)	39
4.5	Differential tissue-specific expression of cysteine proteinases forms the basis for the fine-tuned mobilization of storage globulin during and after germination in legume seeds. <i>Planta</i> 212: 228 – 238 (2001)	39
4.6	Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. <i>J. Exp. Bot.</i> 52: 1741 – 1752 (2001)	39
5	Diskussion	41
5.1	Cysteinendopeptidasen und ihre Funktionen beim Start und weiteren Verlauf der Proteinmobilisierung in Embryoachsen und Kotyledonen	41
5.2	Beziehungen zwischen CPR und Globulinmobilisierung	44
5.3	Funktioneller Bezug von CPR und Globulinmobilisierung zur Aminosäureversorgung von keimenden Samen und Keimlingen	46
5.4	Ausblick: CPR-Bildung und -Aktivität kontrollieren das raum-zeitliche Muster der Reserveproteinmobilisierung	50
6	Zusammenfassung	54
7	Literaturverzeichnis	59

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Absorptionskoeffizient bei einer bestimmten Wellenlänge
Abb.	Abbildung
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BIP	Binding Protein
bp	Basenpaare
CCV	Clathrin Coated Vesicle
CPR	Cystein-Proteinasen
dai	days after imbibition, Tage nach Beginn der Samenwässerung
DTT	Dithiotreitol
DV	Dense Vesikel
EC	Klassifizierungsnummer von Enzymen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FG	Frischgewicht
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
hai	hours after imbibition, Stunden nach Beginn der Samenwässerung
HSP	Heat shock protein
kDa	Kilodalton
MG	Molekulargewicht
maf	month after flowering, Monate nach der Blüte
min	Minute, Minuten
MVB	Multivesikular Body, Multivesikulare Bodies
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	Protein Body, Protein Körperchen
PDI	Protein Disulfid-Isomerase
PFP	Pyrophosphat:Fructose-6-Phosphat Phosphotransferase (EC 2.7.1.90)
pI	Isoelektrischer Punkt
Prot. A	Cysteinproteinase A
Prot. B	Cysteinproteinase B
PSV	Protein-Speichervacuole
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
mRNA	messenger Ribonukleinsäure, Boten Ribonukleinsäure

RNA	Ribonukleinsäure
S	Svedberg Einheit (Sedimentationskoeffizient s der sich aus der Sedimentationsgeschwindigkeit unter vorgegebenen geometrischen Bedingungen des Zentrifugalfeldes ergibt)
$s_{20.w}$	Sedimentationskoeffizient des Proteins während der Ultrazentrifugation
s. a.	siehe auch
sec	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulphate - Natriumdodecyl Sulfat
TG	Trockengewicht
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen / Minute
Vol.	Volumen
VPE	Vakuoläres Processing Enzym
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Speicherproteinmobilisierung und Proteinasen in Protein Bodies von Embryoachsen und Kotyledonen bei *Vicia sativa* L. während der Samenkeimung und des frühen Keimlingswachstums

1 EINLEITUNG

Samen haben für höhere Pflanzen eine einzigartige biologische Funktion als Überdauerungs-, Verbreitungs- und Fortpflanzungseinheiten. Daneben haben Samen für den Menschen einen hohen ökonomischen Stellenwert. Nach einer FAO-Studie (1994) hatte die Weltgesamternte aller Pflanzensamen eine Größenordnung von ungefähr $6 - 7 \times 10^9$ Tonnen. Allein die Hauptgetreidearten hatten daran einen Anteil von 2×10^9 Tonnen. Daneben nimmt sich der Gesamtertrag aller Wurzel- und Knollenpflanzen (Kartoffel, Cassava u.a.) mit etwa $0,58 \times 10^9$ Tonnen vergleichsweise gering aus.

Der hohe ökonomische Wert der Samen resultiert sowohl aus ihrer Verwendung als Nahrungsmittel für die Menschen und Futtermittel für Haustiere, als auch als begehrter Rohstoff für die Industrie (SHEWRY und CASEY 1999). Etwa 70 % der menschlichen Ernährung werden direkt oder indirekt, über die Tierfütterung, durch Samen gedeckt, die vor allem von Getreiden und Körnerleguminosen stammen (BEWLEY und BLACK 1994). Dies beruht auf der Fähigkeit der Samen für die Keimung Reservestoffe zu speichern und damit die heterotrophe Versorgung des Keimlings zu Beginn der Keimung und während der ersten Phase des Keimlingswachstums zu sichern. Die Mobilisation dieser hochmolekularen Speicherstoffe liefert dem Keimling während dieser ersten Entwicklungsphase sowohl Energie, vor allem aus Kohlenhydraten und Lipiden, als auch Baustoffe, unter denen die Aminoverbindungen aus Reserveeiweißen eine besondere Rolle spielen.

Samen von Angiospermen bestehen in der Regel aus dem Embryo, dem Endosperm und der Testa oder Samenschale (BEWLEY und BLACK 1994). Zum Embryo gehören normalerweise die Embryoachse (Plumula und Radicula) und die Keimblätter (Kotyledonen). Monokotyledone Pflanzen, zu denen u.a. alle Poáceae gehören, besitzen nur ein Keimblatt, während dikotyledone Pflanzen zwei Keimblätter haben. Die Speicherung von Reservestoffen erfolgt entweder in den Keimblättern, wie bei vielen dikotyledonen Pflanzen, z.B. bei den Körnerleguminosen, oder im Endosperm, wie bei den Gräsern, zu denen unsere Getreide gehören. Bei einigen dikotyledonen Pflanzen werden Kotyledonen und Endosperm zur Reservestoffspeicherung benutzt (z. B. *Ricinus communis* L.).

Reservestoffe werden während der Samenreifung gebildet und gegen vorzeitigen Abbau geschützt in Kotyledonen oder/und Endosperm gespeichert. Dieser Schutz vor einem verfrühten Abbau muss bei Keimungsbeginn überwunden werden, damit eine Mobilisierung der gespeicherten Reserven beginnen kann.

1.1 Speicherproteine

In den Zellen aller Organismen haben Proteine Funktionen als Biokatalysatoren (Enzyme) und Strukturelemente (z.B. Bausteine des Zytoskeletts). Proteine unterliegen einem turnover. Die beim Abbau mobilisierten Aminosäurebausteine werden vor allem für die erneute Biosynthese von Eiweißen benutzt. In diesem Sinne erfüllen beinahe alle Proteine auch die Funktion einer Aminosäurereserve. Daneben haben vor allem Samenpflanzen während der Evolution eine spezielle Klasse von Speicherproteinen herausgebildet. Im besonderen zeichnen sie sich dadurch aus, dass sie gewöhnlich keine Funktionen als Enzym- oder Struktureiweiße haben. Sie besitzen ein vergleichsweise hohes Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnis und enthalten gewöhnlich einen relativ hohen Prozentsatz an sauren Aminosäuren und Amidn. Zudem werden sie nur in besonderen Entwicklungsperioden („Reifung“) von generativen (Samen) und vegetativen (Wurzel- und Sprossknollen) Speicherorganen gebildet. In den betreffenden Organen reichern sie sich an und sind in meist membranumhüllten Proteinspeicherorganellen (Protein Bodies oder Protein Körperchen) der Zellen von Speichergewebe enthalten. Die Polykondensation von Aminosäuren in Speicherproteinen erlaubt es, große Mengen an Aminosäuren in osmotisch inaktiver Form in den Samen anzureichern (MÜNTZ 1994, MÜNTZ *et al.* 1999). Aus diesen Speicherproteinen wird dann die Hauptmenge der Aminosäurebausteine mobilisiert, die während der Keimung und vor allem während der heterotrophen Phase für das Keimlingswachstum benötigt wird.

Eine Pflanzenfamilie mit besonders hohem Anteil an Speicherproteinen in den Samen sind die Fabaceae, wozu ökonomisch wichtige Gattungen der Leguminosae, wie *Glycine*, *Vicia* (wickenartige Leguminosen), *Phaseolus*, *Pisum*, *Vigna*, mit so bedeutenden Arten wie *Glycine max* (L.) Merr. (Sojabohne), *Pisum sativum* L. (Gartenerbse), *Lens culinaris* L. (Linse) gehören. Der Proteingehalt dieser Körnerleguminosen kann zwischen 10 – 50 % der Trockensubstanz ausmachen. Häufig beträgt der Anteil der Speicherproteine etwa 80 - 85 % des Gesamtproteins der Samen, wie z.B. bei *Phaseolus vulgaris* L.. Wegen ihres Reichtums an Speicherproteinen sind Körnerleguminosen nicht nur von besonderem ökonomischen Interesse sondern auch bevorzugte Objekte für Untersuchungen über die Reserveproteinspeicherung und -mobilisierung bei dikotyledonen Pflanzen.

1.1.1 Nomenklatur der Speicherproteine

Bereits vor 200 Jahren begann man die Samenproteine aufgrund unterschiedlicher Löslichkeits- und Extraktionseigenschaften zu klassifizieren, z.B. als Albumine (wie z.B. FOURCROY 1789) oder Legumine (wie z.B. BRACONNOT 1827). Aufbauend auf derartigen Unterschieden in den Eigenschaften der Samenproteine hat T.B. OSBORNE (1924) eine Samenproteinnomenklatur erarbeitet, die 4 Proteingruppen unterscheidet und auch heute noch aus praktischen Gründen am häufigsten verwendet wird. Sie wird deshalb hier eingehender beschrieben. Jedoch sollte man sich klar machen, dass die in letzter Zeit ermittelten Sequenzverwandtschaften dabei nicht berücksichtigt werden (MÜNTZ 1998, s. a. Seite 6).

Extrahiert man Samenmehl zunächst mit gepufferter Neutralsalzlösung und dialysiert anschließend diesen Extrakt gegen destilliertes Wasser, so erhält man in Wasser gelöste

I. Albumine

Sie werden deshalb häufig in unzulässiger Vereinfachung als mit Wasser extrahierbare Proteine bezeichnet, welche unter Hitzeeinwirkung koagulieren. Samen haben meist nur geringe Anteile dieser Proteingruppe. Zu ihnen gehören in der Regel auch die Enzyme.

Bei der Dialyse fallen die in Wasser unlöslichen Proteine aus, die

II. Globuline

Diese werden daher meist in unzulässiger Vereinfachung als in Wasser unlösliche, mit salzhaltigen Puffern extrahierbare Proteine bezeichnet. Diese Proteingruppe ist in vielen Samen zweikeimblättriger Pflanzen die Hauptkomponente der Speicherproteine, aber auch beim Hafer als Vertreter einer einkeimblättrigen Pflanze.

Aus dem Rückstand der vorherigen Albumin- und Globulinextraktion gewinnt man die

III. Prolamine

mit konzentrierten alkoholischen Lösungen (60 - 70 % v/v). Sie sind sowohl in Wasser als auch in Hochsalzpuffer unlöslich. Diese Proteine sind typisch für Getreidekaryopsen und haben einen hohen Anteil an Prolin und Amiden.

Aus dem nach der Prolaminextraktion verbleibenden Rückstand gewinnt man die

IV. Gluteline

Eine Extraktion dieser Proteine ist nur mit verdünnten Alkalien möglich. Proteine dieser Gruppe finden sich ausschließlich in Getreiden.

Tab.1 Klassen der Speicherproteine bei einigen ökonomisch interessanten Ordnungen, Familien und Arten (nach SHEWRY und CASEY 1999). Das Versuchsobjekt der vorliegenden Dissertation gehört in die hervorgehobenen Ordnung der Leguminósae = Fabáles.

	Albumin (2S)	Globulin (7-8S)	Globulin (11-12S)	Prolamine
Haupt-Komponente bei:	Leguminósae Brassicaceae Asteraceae <i>Gossypium herb.</i> <i>Ricinus com.</i> <i>Bertholletia exc.</i>	Leguminósae Palmae <i>Gossypium herb.</i> <i>Theobroma c.</i>	Leguminósae Brassicaceae Asteraceae Cucurbitaceae <i>Avena sativa</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Cannabis sativa</i> <i>Bertholletia exc.</i>	Poáceae
Komponente mit geringem Anteil bei:		Poáceae	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Oryza sativa</i> <i>Avena sativa</i>

Neuere auf Sequenzuntersuchungen basierende Ergebnisse zeigten, dass Prolamine und die meisten Gluteline einen gemeinsamen evolutionären Ursprung (SHEWRY und TATHAM 1990) besitzen und sich nur in ihren Extraktionseigenschaften unterscheiden. Daher werden die Gluteline der meisten Getreide heute zu der Gruppe der Prolamine gerechnet. Beim Reis sind die Gluteline dagegen homolog zu den Globulinen der dikotyledonen Pflanzen. Dies unterstreicht ebenfalls, dass die alte Klasse der Gluteline als eigenständige chemische Substanzklasse nicht aufrecht erhalten werden kann.

Bei den Samen von dikotyledonen Pflanzen sind Globuline die Hauptkomponente der Reserveproteine. Der Anteil der Globuline am Gesamtprotein bzw. Gesamtstickstoff eines Samens kann bis zu 70 % betragen (BEWLEY und BLACK 1994). Albumine haben dagegen einen vergleichsweise geringen Anteil (bis zu 15 %) am Gesamtstickstoff des Samens. Der Rest der Proteine dürfte auf Membran- und Strukturproteine entfallen.

Globuline werden nach ihren Sedimentationskoeffizienten bei der Ultrazentrifugation ($s_{20,w}$), in 2 Gruppen untergliedert (DANIELSSON 1949): Die Viciline oder vicilin-ähnlichen Proteine, mit einem durchschnittlichen $s_{20,w}$ von 7 (7S Globuline) und die Legumine oder legumin-ähnlichen Proteine, mit einem durchschnittlichen $s_{20,w}$ von 11 (11S Globuline). Tabelle 2 zeigt das Vorkommen beider Globulinklassen in den Samen einiger typischer Pflanzenarten.

Tab. 2 Vorkommen und Nomenklatur von Globulinen in Samen einiger typischer dikotyledoner Arten (in Anlehnung an CASEY *et al.* 1986).

Holoprotein	Vorkommen	Referenzen
Legumin-ähnliche Proteine (11S)		
Legumin (11S)	<i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Vicia sativa</i> , <i>Phaseolus vulg.</i> <i>Vigna radiata</i> (Bei den letzten 2 Vertretern steht Glycoprotein I stellvertretend für Legumin)	Ericson und Chrispeels, 1973; Derbyshire <i>et al.</i> , 1976; Croy <i>et al.</i> , 1980a; Wobus <i>et al.</i> , 1986a; Müntz <i>et al.</i> 1986
Glycinin (11S)	<i>Glycine max</i>	Derbyshire und Boulter, 1976
Glutelin (11S)	<i>Oryza sativa</i>	Li <i>et al.</i> , 1993
Vicilin-ähnliche Proteine (7S)		
Vicilin (7S)	<i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Vicia sativa</i>	Ericson und Chrispeels, 1973; Derbyshire und Boulter, 1976; Croy <i>et al.</i> , 1980b
Canavalin (7S)	<i>Canavalia ensiformis</i>	Sammour <i>et al.</i> 1984
Convicilin (7S)	<i>Pisum</i> und <i>Vicia faba</i>	Casey und Sanger, 1980; Croy <i>et al.</i> 1980c
β-Conglycinin und γ-Conglycinin (7S)	<i>Glycine max</i>	Koshiyama und Fukushima, 1976a, b; Thanh und Shibasaki, 1977
Phaseolin (7S)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (wird auch als Glycoprotein II bezeichnet)	Bollini und Chrispeels, 1978; Brown <i>et al.</i> , 1981

Auch unter den Albuminen gibt es einige Speicherproteine, die in der Regel einen Sedimentationskoeffizienten ($s_{20,w}$) von 2 (2S Albumin, Tab. 1) haben. Im Gegensatz zu den schwefelarmen Globulinen zeichnen sich diese Speicheralbumine durch einen vergleichsweise hohen Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren aus (SHEWRY *et al.* 1995, MÜNTZ *et al.* 1999), wie dies beispielhaft für das Napin der Brassicaceae gezeigt wurde. Aus diesem Grund sind, vor allem aus ernährungsphysiologischer Sicht, Samen mit einem höheren Anteil an 2S Albuminen sehr interessant.

1.1.2 Speicherglobuline von Leguminosen und anderen dikotyledonen Pflanzen

Aufgrund der großen Vielfaltigkeit der dikotyledonen Samen sollen in diesem Kapitel vorrangig die Speicherproteine von *Vicia faba* L. und der damit verwandten Leguminosenarten als Beispiele für Globuline behandelt werden.

Legumine sind heterohexamere Holoproteine mit MG von 320 – 400 kDa. Sie zeichnen sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung ernährungsphysiologisch durch geringe Anteile an den essentiellen Aminosäuren Methionin und Tryptophan aus (MÜNTZ *et al.* 1999). Das Holoprotein besteht aus 6 polymorphen, meist nicht glykosylierten Untereinheiten (Ausnahme das glycosilierte Lupinus-Legumin [DURANTI *et al.* 1992]). Das Holoprotein hat die Form eines Rotationsellipsoids und besteht aus 2 übereinander liegenden Trimeren (CASEY *et al.* 1986, MÜNTZ *et al.* 1986, 1999, HORSTMANN *et al.* 1993). Die polymorphen Untereinheiten des Proteins werden von Multigenfamilien kodiert (SLIGHTON *et al.* 1985, WOBUS *et al.* 1986b, HEIM *et al.* 1989, 1994). Bislang konnten bei *Vicia faba* L. 2 Typen von polymorphen Legumin-Untereinheiten beschrieben werden, die sich im Methioningehalt unterscheiden. Während in Typ A Methionin vorkommt, ist Typ B methioninfrei (HORSTMANN 1983, 1984).

Jede Untereinheit hat ein durchschnittliches Molekulargewicht (MG) von 55 kDa (52 - 65 kDa) und wird aus einer hydrophilen ca. 30 - 40 kDa schweren sauren α -Kette ($pI \sim 6.5$) und einer hydrophoben ca. 20 kDa schweren basischen β -Kette ($pI \sim 9$) gebildet (MÜNTZ 1994, 1996). Zwischen der α - und β -Kette gibt es keine deutlich erkennbaren Sequenzhomologien (LAWRENCE 1999). Beide Polypeptidketten sind kovalent über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (SHEWRY und CASEY 1999, MÜNTZ *et al.* 1999). Die Disulfidbrücke wird zwischen Cysteinresten an hoch konservierten Positionen ausgebildet: in Position 87 der α -Kette und in Position 7 der β -Kette (MÜNTZ 1996, 1998), wobei die Positionsnummern denen im Legumin B4 aus *Vicia faba* L. entsprechen (BÄUMLEIN *et al.* 1986, EMBL Datenbank Akzessions-Nr. P05190). Nach HORSTMANN (1984) muss die Disulfidbrücke gebildet werden, noch ehe das Prolegumin in die α - und β -Polypeptidketten gespalten wird, da sich bei der Analyse der Untereinheiten darin nur Polypeptide nachweisen ließen, die vom selben Gen kodiert werden.

Viciline haben ein MG von 150 – 240 kDa. In den trimeren Holoproteinen kommen 2 verschiedene Untereinheiten vor. Die größere davon mit MG von 70 – 80 kDa wird als Convicilin-ähnliches Polypeptid bezeichnet. Das MG der kleineren Untereinheit beträgt ca. 50 kDa (MÜNTZ 1996). Die kleinen Untereinheiten des Vicilins unterscheiden sich im Grad ihrer Glykosylierungen (SHEWRY 1995, SHEWRY und CASEY 1999). Neben glykosylierten kleinen Untereinheiten konnten auch nichtglykosylierte Polypeptide nachgewiesen werden (SLIGHTOM *et al.* 1985, BASSÜNER *et al.* 1987, NEWBIGIN *et al.* 1990). Glykosylierte convicilin-ähnliche Polypeptide sind nicht bekannt (MÜNTZ *et al.* 1999). Da beide Untereinheiten weitgehend frei zu Oligomeren kombinierbar sind, kommen sowohl homo- als auch hetero-oligomere Trimere vor (THANH und SHIBASAKI 1977). Alle bisher gefundenen Vicilin-Sequenzen waren Cystein-frei, woraus sich das Fehlen von Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten von Vicilinen erklärt (BEWLEY und BLACK 1994). Vicilin-Untereinheiten werden, wie die Untereinheiten des Legamins, durch Multigenfamilien codiert (MÜNTZ *et al.* 1999).

Viciline und Legumine haben einen gemeinsamen evolutionären Ursprung (SHUTOV und BÄUMLEIN 1999). Daher ist es nicht überraschend, dass sie auch ähnliche Raumstrukturen aufweisen (LAWRENCE 1999). Das Vicilin-Holoprotein hat ebenfalls die Gestalt eines Rotationsellipsoids, das jedoch weitaus flacher ist als beim Legumin-Holoprotein. Das trimere Vicilin entspricht etwa einem trimeren Halbmolekül des hexameren Legumins.

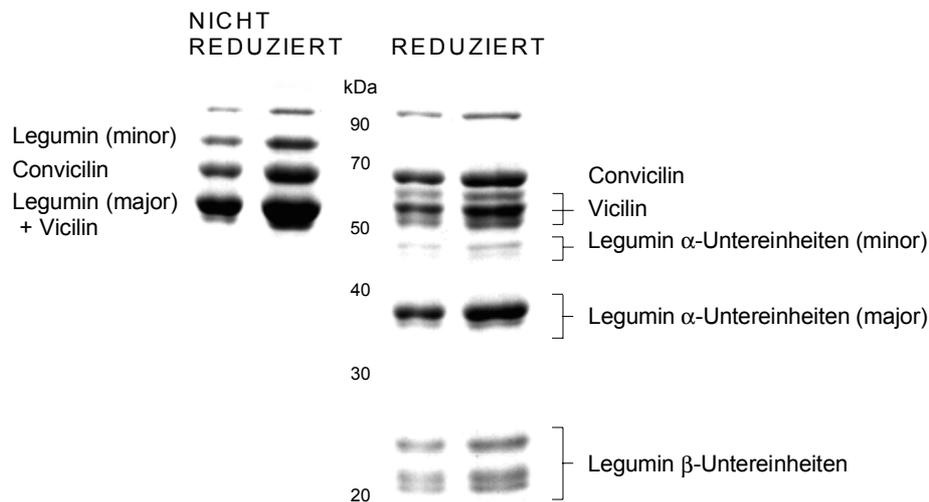


Abb. 1 SDS-Gelelektrophoretische Auftrennung von Vicilin und Legumin aus *Vicia sativa* L. unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen.

Die Untereinheiten der Speicherglobuline lassen sich in der SDS-Gelelektrophorese gut auftrennen und darstellen. Abb. 1 zeigt dies exemplarisch für die Speicherproteine aus *Vicia sativa* L.. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen (ohne Reduktionsmittel wie z.B. β -Mercaptoethanol, DTT) lassen sich die α - und β -Ketten des Legumins nicht auftrennen. Erst nach Reduktion der Disulfidbrücke werden die beiden Ketten im Polypeptidbandenmuster unterscheidbar. Da Vicilin-Untereinheiten keine SS-Brücken besitzen, ist das Erscheinungsbild der Polypeptidketten unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen gleich (Abb. 1).

1.1.3 Synthese und Deponie der Globuline während der Samenreifung

Die Speicherproteine werden während der mittleren bis späten Phase der Samenreifung synthetisiert. Während der Austrocknung der Samen kommt die Reserveproteinbiosynthese zum Erliegen.

Die Speicherproteinuntereinheiten werden als Präkursorpolypeptide (Vorläuferpolypeptide) an membrangebundenen Polysomen (rauhes endoplasmatisches Retikulum, rER) synthetisiert

(Abb. 2). Das N-terminale hydrophobe Signalpeptid der nascenten Präpropolypeptide wird cotranslational durch eine offensichtlich membranständige Serin-Endopeptidase (DALBEY und VON HEIJNE 1992) während des Transfers durch die ER-Membran abgespalten. Das dabei gebildete Proglobulin unterliegt im ER-Lumen weiteren co- bzw. posttranslationalen Modifikationen (MÜNTZ 1994, 1996, GALILI *et al.* 1998, KERMODE und BEWLEY 1999): Ausbildung von Disulfidbrücken bei 11S-Globulin-Präkursoren (MÜNTZ 1998), Glykosylierungen, wie im Falle der Untereinheiten einiger 7S-Globulin-Präkursoren und die Assemblierung von Trimeren, wie im Falle von Vicilin und Prolegumin (CHRISPEELS 1991, VITALE *et al.* 1993, 1995). Neben Chaperonen (z.B. HSP's, BIP, PDI) sind auch Cyclophiline an den posttranslationalen Modifikationen der Speicherproteine beteiligt (COUGHLAN *et al.* 1969, HARTL 1996, GILBERT 1997, GALILI *et al.* 1998, NAPIER 1999, VITALE und DENECKE 1999). CHRISPEELS und Mitarbeiter (1982) folgerten aus kinetischen Studien, dass die Proteine durchschnittlich nur wenige Stunden innerhalb des ER-Lumens verbleiben.

Die Globulintrimere werden dann innerzellulär weiter im Endomembransystem über den Golgi-Apparat und von dort in Transportvesikeln zu den Protein-Speichervakuolen (PSV) bzw. Protein Bodies (PB) der Speicherzellen transportiert (GALILI und HERMAN 1997, NEUHAUS und ROGERS 1998, HERMAN und LARKINS 1999, KERMODE und BEWLEY 1999). Die Protein-Speichervakuole (PSV) wird während der Zeit der Reserveproteinbiosynthese neu gebildet (ROBINSON *et al.* 1995, ROGERS 1998). Aus ihr gehen in den Zellen von Leguminosensamen die Protein Bodies (PB) hervor.

Im Golgi-Apparat werden die verschiedenen Proteine in Transportvesikel mit unterschiedlichen Bestimmungsorten in der Zellwand, im Plasmalemma oder im Vakuolensystem sortiert. Sekretorische Proteine, die zur Zelloberfläche transportiert werden, unterscheiden sich von den vakuolären Proteinen darin, dass sie über keine spezifischen Zielorientierungssequenzen (Targeting-Sequenzen) verfügen. Proteine mit vakuolärem Bestimmungsort besitzen interne (z.B. *Vicia*-Legumin: SAALBACH *et al.* 1991, *Phaseolus*-Phytohämagglutinin: VON SCHAEWEN und CHRISPEELS 1993, MARTY 1999,) bzw. N- oder C-terminale Zielorientierungssequenzen (Sporamin der Süßkartoffel bzw. Gersten-Lectin, 2S Brasilnuss-Albumin und Phaseolin der Gartenbohne: BEEVERS und RAIKHEL 1998, KERMODE und BEWLEY 1999). Während interne Zielorientierungssequenzen im reifen Protein erhalten bleiben, werden terminale gewöhnlich am Bestimmungsort nach Erfüllung der Zielorientierungsfunktion für den innerzellulären Proteintransport abgespalten.

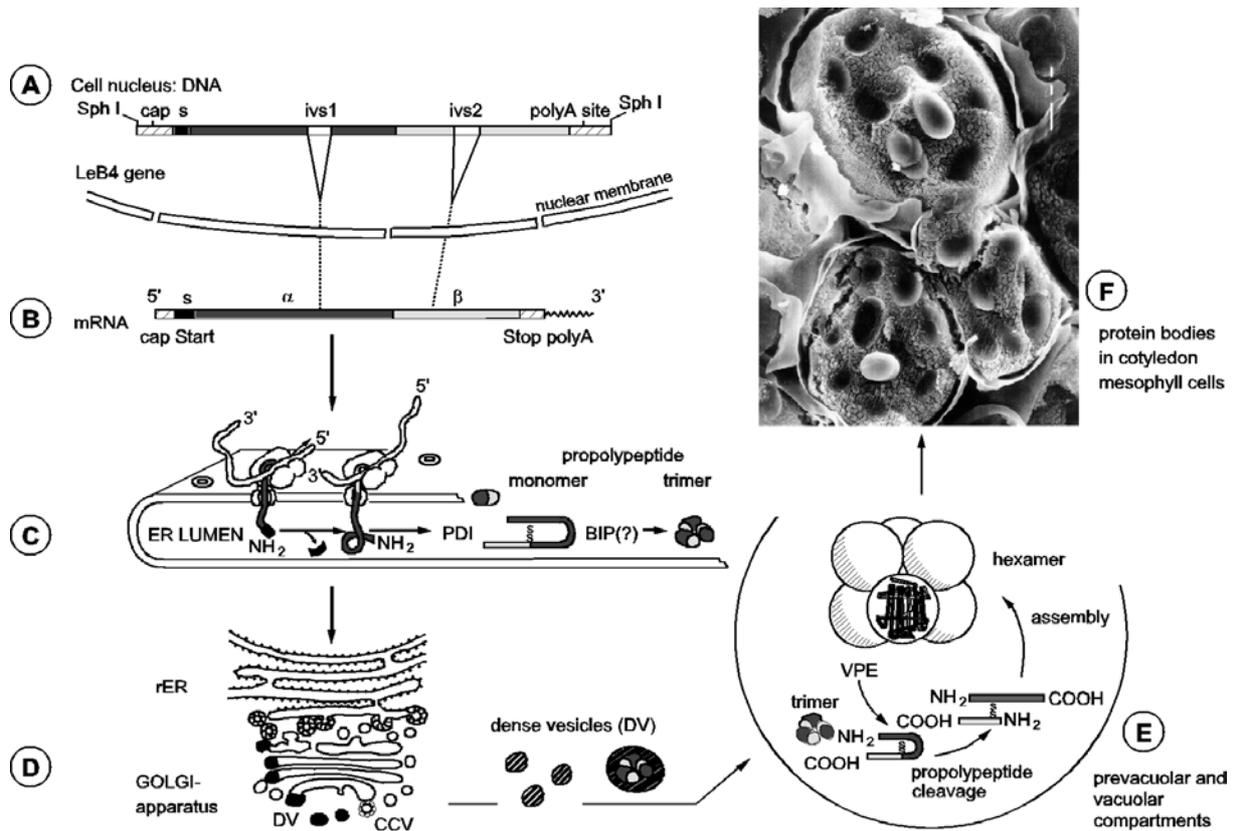


Abb. 2 Proteinbiosynthese, Prozessierung, Transport und Lagerung am Beispiel von Legumin (nach MÜNTZ 1998). A) Transkription der mRNA im Zellkern. B) Reife mRNA mit allen notwendigen Informationen für die Translation eines spezifischen Signalpeptids, sowie der beiden Untereinheiten (α/β). C) Translation der mRNA an membrangebundenen Polysomen (rER). Das entstehende Prä-Prolegumin wird in das ER-Lumen segregiert. Innerhalb des Lumens folgt cotranslational die Abspaltung des Signalpeptids. Nach der Disulfidbrückenbildung (PDI vermittelt) und der transienten BIP Anlagerung folgt die Assemblierung des Prolegumins zum Prolegumintrimer im ER-Lumen. D) Nachfolgend werden die Trimere durch den Golgi-Apparat transportiert und in Dense Vesikel verpackt. Diese transportieren die Prolegumin-Trimere zum einem provakuolären Kompartiment bzw. zur Protein-Speichervacuole (PSV). E) Dort erfolgt die Prozessierung der Prolegumin-Trimere in die α - und β -Ketten durch ein vakuoläres Prozessierungs-Enzym (β VPE). Diese Prozessierung wird von der Umformung der Legumin-Trimere in Legumin-Hexamere begleitet, wodurch das Protein eine vor weiteren proteolytischen Spaltungen geschützte Konformation annimmt. F) Die PSV fragmentiert am Ende der Samenreifung zu den PB, welche innerhalb der Speichermesophyllzellen dicht gepackt liegen.

Während die Globulintrimere für den Transport zur Vakuole am cis- und medianen Golgi-Apparat in Coatprotein-freie dichte (dense) Vesikel (DV) sortiert werden, gelangen andere vakuoläre Proteine, z.B. Enzyme und der Vakuolenprotein-Rezeptor BP-80 in Clathrin-beschichtete (clathrin-coated) Vesikel (CCV). Auf diese Weise werden zwei verschiedene Gruppen von Proteinen in unterschiedlichen Vesikeln zu den Multivesikular Bodies

transportiert (MVB, Abb. 3). Nach Fusion der MVB zu den PSV fragmentieren diese zu den PB (ROBINSON *et al.* 1998a, b, ROBINSON und HINZ 1999).

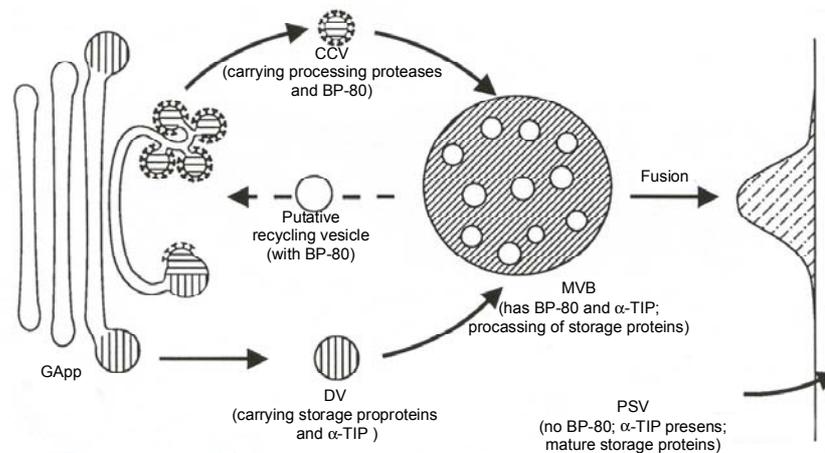


Abb. 3 Modell zur Darstellung der unterschiedlichen Transportvesikel, sowie der Bildung der Multivesikular Bodies (MVB) und der Protein-Speichervakuole (PSV) (nach ROBINSON *et al.* 1998b).

Erst wenn die Trimere des Prolegumins in die Vakuole gelangt sind, geschieht durch eine asparagin-spezifische Prozessierungsproteinase (vacuolar processing enzyme – VPE) seine Spaltung in die α - und β -Ketten (Abb. 2). Dabei ereignet sich eine Konformationsänderung, die durch Assoziation von zwei Trimeren zur Bildung der hexameren Speicherform des Legumins führt (11S-Globulin, NIELSEN *et al.* 1995). Diese deponierungsfähige hexamere Form des Legumins ist so gegen weitere Spaltungen durch VPE resistent (JUNG *et al.* 1998). In den Trimeren aus Prophaseolin wird das C-terminale targeting-Peptid abgespalten (FRIGERIO *et al.* 2001), wodurch reife Phaseolin-Trimere entstehen (7S-Globulin).

1.2 Keimung und Keimlingswachstum

Der Lebenszyklus einer Samenpflanze beginnt mit der Keimung des Samens und endet mit der Reifung und Freisetzung keimungsfähiger Samen. Die Keimung wird mit der Aufnahme von Wasser in den trockenen Samen eingeleitet. Sie endet laut Definition mit dem Hervortreten der Radicula aus der Samenschale. Dann hat der keimende Same etwa das 2 – 3 fache seines Trockengewichtes (TG) an Wasser aufgenommen (BEWLEY und BLACK 1994). Erfolgt die Keimung unter normalen physiologischen Umständen, kann man die Wasseraufnahme in 3 Phasen untergliedern (BEWLEY 1997).

Zu Beginn der Phase I hat der Same ein deutlich negativeres osmotisches Potential als das ihn umgebende Milieu. Als Folge davon wird rasch Wasser in das Samengewebe aufgenommen. Mit den ersten physiologischen Aktivitäten, wie der Instandsetzung der DNA und der Differenzierung von Mitochondrien, dürfte auch die Reparatur trockenungsbedingter Schäden einhergehen. Die Rekonstitution der Zellmembranen stellt in dieser Phase einen grundlegenden Vorgang dar. Erste Proteinbiosynthesen lassen sich jetzt nachweisen. Dabei wird während der Samenreifung gebildete und gespeicherte mRNA (SUZUKI und MINAMIKAWA 1985, LANE 1991) translatiert.

In der sich anschließenden Phase II ist das osmotische Potential nahezu ausgeglichen und spielt nur eine untergeordnete Rolle. Bezeichnend für diese Phase ist neben der deutlich zunehmenden metabolischen Aktivität in der Zelle, der Beginn der Transkription und Translation, sowie die Neubildung von Zellorganellen. Zellelongation und Zellteilung beginnen.

Zu Beginn der Phase III bricht dann die Radicula durch die Testa, womit die Keimung abgeschlossen ist und das Keimlingswachstum beginnt. Damit verbunden ist eine rasche Elongation der Sprossachse. Neben der rasch zunehmenden metabolischen Aktivität, Zellteilungsaktivität, Protein- und Nukleinsäurebiosynthese, ist die vollständige Mobilisierung der Speicherproteine typisch für diese Phase (BEWLEY 1997). Damit ist eine deutlich zunehmende Aktivität proteolytischer Enzyme verbunden (WILSON *et al.* 1986; MÜNTZ 1996). Für *Vicia sativa* L. konnten verschiedene Proteasen nachgewiesen werden, die vermutlich auch bei der Mobilisierung der Speicherglobuline maßgeblich beteiligt sind und im nachfolgenden Abschnitt 1.3 näher beschrieben werden.

1.3 Proteasen aus keimenden Samen und Keimlingen

Reserveproteine unterscheiden sich von den meisten anderen Proteinen auch dadurch, dass ihre Synthese während der Reifung von Speicherorganen zeitlich meist lange vor dem Beginn ihres Abbaus während der Keimung von Samen oder des Austreibens von Knollen geschieht. Reserveproteine unterliegen also keinem unmittelbaren turnover (MADISON *et al.* 1981) und haben eine lange Halbwertszeit.

Der Reserveproteinabbau wird von speziellen Peptidasen (EC 3.4) katalysiert (Synonyme: Proteasen oder proteolytische Enzyme). Hierbei sind sowohl Exopeptidasen (Carboxy- und Aminopeptidasen) als auch Endopeptidasen (Proteinasen) am Reserveproteinabbau beteiligt.

Endopeptidasen lassen sich auf der Basis ihrer Spaltungsspezifität in 4 Gruppen unterteilen.

A) Serin-Peptidasen (EC 3.4.21), zu denen ebenfalls Threonin-Proteinasen gerechnet werden. Das katalytische Zentrum dieser Peptidasen wird meist durch 2 - 3 der nachfolgenden Aminosäuren gebildet: Serin, Histidin, Asparaginsäure, Lysin und Threonin.

B) Cystein-Peptidasen (EC 3.4.22). Das aktive Zentrum dieser Gruppe wird vorrangig durch die Aminosäuren Cystein, Histidin oder Asparagin konstituiert. Vor allem die Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins hat einen bestimmenden Einfluss auf die Aktivität dieser Peptidasen. Daher wurde diese Gruppe früher auch als Sulfhydryl-Proteinase bzw. Sulfhydryl-Endopeptidase bezeichnet (MÜNTZ 1996, HARA-NISHIMURA *et al.* 1998).

C) Aspartat-Peptidasen (EC 3.4.23). Für die katalytische Aktivität dieser Enzyme, hat Asparaginsäure als Ligand im aktiven Zentrum eine elementare Bedeutung.

D) Metallo-Endopeptidasen (EC 3.4.24). Die katalytische Aktivität ist an bivalente Metallionen geknüpft. In der Regel ist dies Zink, aber auch Kobalt und Mangan, welche über 3 Liganden des aktiven Zentrums, häufig Histidin, Glutamin, Asparaginsäure oder Lysin, gebunden werden.

Vertreter aus allen wichtigen Endopeptidaseklassen (BARRETT *et al.* 1988) können am Reserveproteinabbau beteiligt sein. In zahlreichen Untersuchungen an Kotyledonen reifender und keimender Samen ist gezeigt worden, dass Cystein-Proteinase (CPR) in diesen Organen für die limitierte oder vollständige Proteolyse eine besondere Rolle spielen (WILSON 1986, SHUTOV und VAINTRAUB 1987, MÜNTZ 1996). Aufgrund von Sequenzhomologien unterscheidet man zwei wichtige CPR-Familien, die papain- und die legumain-artigen CPR. Daneben ist die Beteiligung von Metalloproteinase (DUNAEVSKY UND BELOZERSKY 1989a, b, ELPIDINA *et al.* 1990, 1991), Serinproteinase (MITSUHASHI *et al.* 1986, WILSON *et al.* 1986, MITSUHASHI und OAKS 1994, Qi *et al.* 1992, MORITA *et al.* 1994) und Aspartat-Proteinase (MARTTILA *et al.* 1995) am Reserveproteinabbau in unterschiedlichen Pflanzensamen nachgewiesen worden.

Der Hauptteil des Reserveproteinabbaus geschieht in den PB. In jedem Falle sind dort Endopeptidasen für den Beginn des Reserveproteinabbaus verantwortlich. Oftmals sind mehrere Vertreter einer Proteinaseklasse oder unterschiedlicher Proteaseklassen am Reserveproteinabbau beteiligt. Exopeptidasen können Reserveproteine reifer Samen gewöhnlich erst nach einer partiellen Hydrolyse durch Endopeptidasen angreifen z.B. in den PB sind Carboxypeptidasen am Reserveproteinabbau beteiligt. Aminopeptidasen wurden im Cytoplasma der Speichergewebszellen gefunden jedoch nicht in den PB. Niedere Peptide oder Peptidfragmente gelangen als Ergebnis des Reserveproteinabbaus aus den PB in das Cytoplasma, wo ihre weitere Zerlegung in Aminosäurebausteine durch Aminopeptidasen katalysiert wird (Abb. 4).

Wegen ihrer besonderen Rolle bei der limitierten und vollständigen Proteolyse von Reserveproteinen wird nachfolgend auf die vakuolären Cystein-Proteinasen detaillierter eingegangen.

1.3.1 Papain-artige Cystein-Endopeptidasen

Die Synthese der Präkursoren von vakuolären Cystein-Proteinasen erfolgt wie bei den Reserveproteinen an membrangebundene Polysomen (rER). Anschließend werden die Proenzyme durch das Endomembransystem gerichtet in die Vakuolen transportiert (s.a. 1.1.3, MÜNTZ 1996, 1998). Bei der co-translationalen Abspaltung des Signalpeptids aus den Präpropolypeptiden entstehen inaktive Proenzyme. N- oder/und C-terminale Prosequenzen bewirken durch intramolekulare Wechselwirkungen im Proenzym seine Inaktivierung. Die Abspaltung der Propeptide geschieht am vakuolären Bestimmungsort und ist mit der Aktivierung des Enzyms verbunden. Vor allem während des Keimlingswachstums hat man eine enge Korrelation zwischen Neusynthese von CPRs und dem Verlauf der Globulinmobilisierung festgestellt (SHUTOV und VAINTRAUB 1987).

Aus Kotyledonen von *Vicia sativa*-Keimlingen sind bislang cDNAs von 4 papain-artigen Cystein-Peptidasen kloniert und sequenziert worden (BECKER *et al.* 1994, 1997, MÜNTZ 1996, FISCHER *et al.* 2000). Im einzelnen sind dies: CPR1, CPR2, CPR4 und Proteinase A. Wie viele andere Proenzyme papain-artiger CPR besitzen auch die aus *Vicia sativa* L. ein N-terminales Propeptid. Für CPR1, CPR2 und Proteinase A wurde nachgewiesen, dass sie *in vitro* Globuline aus reifen *Vicia sativa*-Samen ohne vorherige, durch limitierte Proteolyse bewirkte strukturelle Modifikation spalten können (FISCHER *et al.* 2000). CPR1 und CPR2 kommen in PB von *Vicia sativa*-Samen vor. Während Experimente zur innerzellulären Lokalisierung von CPR4 noch ausstehen, ist für Proteinase A bisher kein Nachweis in PB gelungen.

Proteinase A wird durch eine kleine Multigenfamilie codiert (BECKER *et al.* 1997), während für CPR1 und CPR2 nur jeweils ein Gen gefunden wurde (BECKER *et al.* 1994).

Im Unterschied zu CPR1, CPR2 und CPR4 enthält die aus der cDNA abgeleitete Pro-Proteinase A-Sequenz das als ER-Retentionssignal bekannte C-terminale Tetrapeptid KDEL. Diese KDEL-Sequenz fehlt im reifen Enzym (BECKER *et al.* 1997). Proteinase A-verwandte papain-artige CPR sind auch in Samen von *Phaseolus vulgaris* L. (EP-C1; TANAKA *et al.* 1993) *Vigna mungo* L. (SH-EP; OKAMOTO und MINAMIKAWA 1998) und *Ricinus communis* L. (SCHMID *et al.* 1998) gefunden worden. Für SH-EP wurde gezeigt, dass das Proenzym mittels des KDEL-Signals im ER-Lumen in inaktiver Form zurückgehalten werden kann, um bei Bedarf schnell, durch KDEL-Abspaltung entlassen, zum Bestimmungsort transportiert und dort aktiviert zu werden (OKOMOTO *et al.* 1999, TOYOOKA *et al.* 2000). Dieser Vorgang könnte für

einen kontrollierten massiven Abbau von Speicherproteinen von Bedeutung sein. Bei *Ricinus communis* L. ist die betreffende Proteinase A-ähnliche CPR mit dem kontrollierten Zelltod im Endosperm nach Ende der Reservestoffmobilisierung in Zusammenhang gebracht worden (SCHMID *et al.* 1999).

1.3.2 Legumain-artige Cystein-Endopeptidasen

Neben den papain-artigen gehören legumain-artige CPR zum Proteinasebestand reifender und keimender Samen. Sie bewirken die Prozessierung von Propolypeptiden in Vakuolen durch limitierte Proteolyse (vakuoläre Prozessierungsenzyme – VPE) und sind am Reserveproteinabbau beteiligt. Aufgrund ihrer Entdeckung in Leguminosen wurden sie als Legumaine (EC. 3.4.22.34) bezeichnet (ABE *et al.* 1993, MURAMATSU *et al.* 1993, ISHII 1994, TAKEDA *et al.* 1994). Charakteristisch für diese Gruppe von CPR ist ihre strikte Spezifität für Asparagin und Asparaginsäure in Position P1 der Spaltungsstelle. Wie die samen-spezifischen papain-artigen haben auch die legumain-artigen CPR ein pH-Optimum im saureren Bereich (DICKINSON *et al.* 1989, HARA-NISHIMURA *et al.* 1991, 1995, 1998, JUNG *et al.* 1993, 1998, BECKER *et al.* 1995, MÜNTZ 1996, 1999). Nach HARA-NISHIMURA *et al.* (1998) unterscheidet man vegetative (α - und γ VPE) und samenspezifische VPE (β -VPE). Letztere katalysieren u. a. in PSV die Asn-spezifische Spaltung von Prolegumin in α - und β -Legumin-polypeptide (s.a. 1.1.3, Abb. 2E; JUNG *et al.* 1998). Proteinase B, ein keimungsspezifisches Legumain (SHUTOV *et al.* 1982) gehört zu den vegetativen VPE. Seine Mitwirkung am Abbau von Legumin setzt jedoch voraus, dass dieses bereits infolge limitierter Proteolyse durch eine andere Endopeptidase konformativ modifiziert wurde, ehe Proteinase B den Abbau des modifizierten Legumins katalysieren kann (SHUTOV und VAINTRAUB 1987).

Aus den cDNA-Sequenzen zahlreicher Legumaine, darunter von β VPE (VsPB2) und Proteinase B aus Samen von *Vicia sativa* L. (HARA-NISHIMURA *et al.* 1993, 1995, TAKEDA *et al.* 1994; BECKER *et al.* 1995) sind ihre Aminosäuresequenzen abgeleitet worden. Die Präkursoren der Enzyme verfügen sowohl über ein N-terminales Signalpeptid als auch über N- und C-terminale Propeptide. Sie werden demnach als Präpropolypeptide am rER synthetisiert und gelangen unter Signalpeptidabspaltung cotranslational ins ER-Lumen. Von dort werden die inaktiven Proenzyme wie die Präkursoren von Speicherglobulinen und papain-artigen CPR über das Endomembransystem zu den PSV transportiert. Vermutlich erfolgt der Proenzymtransport zu den PSV der Samenzellen in clathrin-coated vesicle (CCV, ROBINSON *et al.* 1998b, HINZ *et al.* 1999, CHRISPEELS und HERMAN 2000). In den PSV aktivieren sich die Prolegumaine autokatalytisch durch Abspaltung der C- und N-terminalen Propeptide (HIRAIWA *et al.* 1997a, 1999, HARA-MISHIMURA *et al.* 1998). Nach HIRAIWA *et al.* (1997b) sowie JUNG *et al.*

al. (1993) sollen die β VPE auch in der Lage sein, nicht korrekt gefaltete oder oligomerisierte Prolegumine abzubauen. Dies würde bedeuten, dass in den PSV der Samenzellen ein Kontrollmechanismus existiert, durch den fehlerhafte und fehlgeleitete Proteine außerhalb des ER's eliminiert werden könnten.

1.4 Mobilisierung der Speicherproteine und daran beteiligte Proteasen: Die besondere Rolle der Cystein-Endopeptidasen

Die während der Samenreifung angelegten Proteinreserven werden während der Keimung und des anschließenden Keimlingswachstums als Aminosäurelieferanten für die Proteinbiosynthese mobilisiert. Ganz zu Beginn der Keimung kann die Proteinbiosynthese vermutlich aus den Pools freier Aminosäuren mit Aminosäurebausteinen versorgt werden. Diese müssen jedoch rasch durch den Abbau von Speicherproteinen aufgefüllt werden. Dieser Prozess wird von Endo- und Exopeptidasen katalysiert. Proteasen, die am Reserveproteinabbau mitwirken, müssen nach SHUTOV und VAINTRAUB (1987) wenigstens folgende drei Kriterien erfüllen:

- Das Substrat (Speicherglobuline) und die Enzyme (Proteasen) müssen im selben Kompartiment (Protein Bodies) vorliegen.
- Die Proteasen müssen wenigstens *in vitro* in der Lage sein unter Milieubedingungen, die denen in PB entsprechen (saurer pH-Wert, Redoxpotentiale, Ionenkonzentrationen), Globuline oder Globulinfragmente abzubauen.
- Das zeitliche Auftreten und die quantitativen Änderungen der Enzymaktivität müssen mit dem Muster der *in vivo*-Proteinmobilisation übereinstimmen.

Es besteht kein Zweifel daran, dass in PB trockener reifer Samen Endopeptidasen und Carboxypeptidasen vorkommen (WILSON 1986, SHUTOV und VAINTRAUB 1987, BEWLEY und BLACK 1994, MÜNTZ 1996). Allerdings liegen darüber, ob diese den Reserveproteinabbau einleiten können oder nicht, nur wenige und kontroverse Publikationen vor. Dagegen gibt es wohl keinen Zweifel daran, dass in den Kotyledonen während des Keimlingswachstums, also nach der Keimung, Proteinasen, welche die zuvor genannten drei Kriterien erfüllen, neu gebildet und in die PB transportiert werden. Dort haben sie zusammen mit den gespeicherten Carboxypeptidasen eine Hauptfunktion bei der Reserveproteinmobilisierung (Abb. 4). Jedoch lassen sich auch in Geweben der Embryoachse PB mit darin gespeicherten Reserveproteinen nachweisen. Über deren Abbau und den daran beteiligten Proteasen ist dagegen nichts bekannt. Experimente mit isolierten Baumwollembryoachsen haben jedoch gezeigt, dass darin ohne Nährstoffzufuhr von außen, Wachstum sowie Proteinabbau beginnen und die

Proteaseaktivität ansteigt (VIGIL und FANG 1995a, b). Dies stimmt mit der bereits vor mehr als 40 Jahren geäußerten Auffassung überein, dass die Embryoachsen während der Keimung in ihrer Aminosäureversorgung für Proteinbiosynthesen autonom sein könnten und erst mit Beginn des Keimlingswachstums die Versorgung der Embryoachse mit Aminosäuren von den Kotyledonen übernommen wird (LAWRENCE *et al.* 1959, 1963; WALTON 1966, MURRAY 1988).

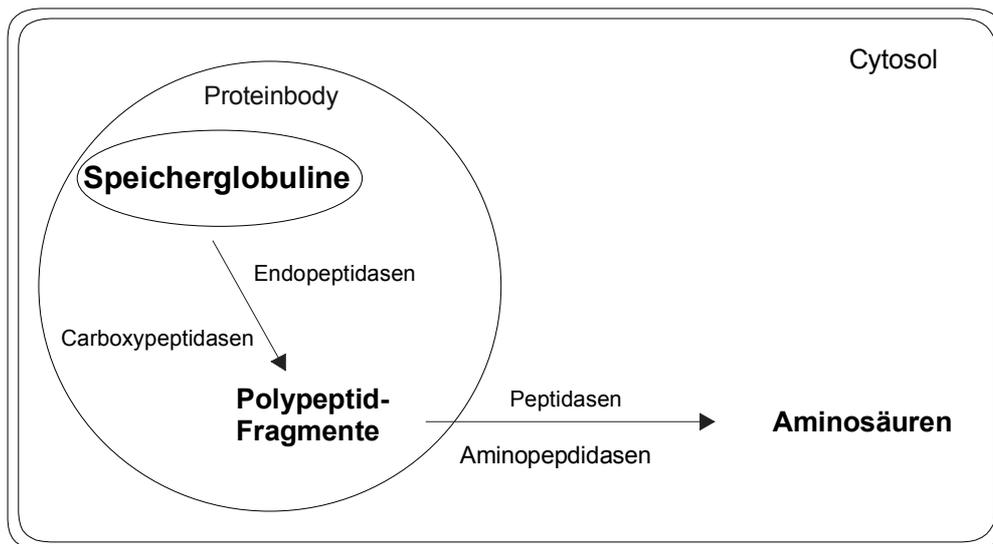


Abb. 4 Generalisierendes Schema zur Mobilisation von Aminosäuren aus Speicherglobulinen

1.4.1 Kontroverse Ergebnisse über Vorkommen und Funktion gespeicherter Proteasen in Protein Bodies von Speichergewebzellen

Proteinasen sind in Kotyledonen trockener Samen von Kürbis (HARA und MATSUBARA 1980a, b, HARA-NISHIMURA *et al.* 1982), Sojabohnen (BOND und BOWLES 1983, QI *et al.* 1992) und Buchweizen (BELOZERSKY *et al.* 1990) nachgewiesen worden. Während es sich bei Kürbis um eine CPR handelt, ist es bei Sojabohnen eine Aspartat- und bei Buchweizen eine Metalloproteinase. Nur im Falle von Kürbis (HARA-NISHIMURA *et al.* 1982) und Buchweizen (ELPIDINA *et al.* 1990, 1991) sind die betreffenden Proteinasen bisher in PB von Kotyledonen nachgewiesen worden. Indizien dafür, dass der Abbau endogener Reserveproteine durch die gespeicherte Proteinase eingeleitet wird, gibt es vor allem beim Buchweizen. In seinen reifen trockenen Samen liegt die Metallo-Endopeptidase mit einem Inhibitor assoziiert vor (VOSKOBOYNIKOVA *et al.* 1990). Die Proteinase wird durch Dissoziation des Inhibitors während der Keimung aktiviert und katalysiert einleitend limitierte Spaltungen des Legumins der Samen. Dies führt zu einer Konformationsänderung, ohne dass das Legumin-Holoprotein dissoziiert

(DUNAEVSKY und BELOZERSKY 1989a). Allerdings werden dadurch die Voraussetzungen dafür geschaffen, dass eine später neu gebildete CPR in Kooperation mit einer Carboxypeptidase den weiteren Abbau bis zu niederen Peptiden vollziehen kann (DUNAEVSKY und BELOZERSKY 1989b). Von den genannten Proteinasen aller drei Pflanzen liegen bisher weder cDNA-abgeleitete noch direkt bestimmte partielle oder vollständige Aminosäuresequenzen vor.

Dagegen haben Versuche von HARRIS und CHRISPEELS (1975) bei *Vigna mungo* L. und von SHUTOV und VAINTRAUB (1987) bei *Vicia sativa* L. gezeigt, dass die gespeicherten Proteinase in den PB von Kotyledonenzellen der betreffenden Pflanzen den Abbau endogener Reserveglobuline nicht starten können. In beiden Fällen gehen die Autoren davon aus, dass die Reserveproteinmobilisierung durch neu gebildete Proteinase eingeleitet wird (s.a. Abschnitt 1.4.2).

Carboxypeptidasen, die in PB aller bisher untersuchten Pflanzen vorhanden sind, können die endogenen Reserveproteine wohl nicht angreifen, ehe nicht wenigstens limitierte Spaltungen durch Endopeptidasen die Struktur der Substratproteine verändert und mit einer erhöhten Anzahl freier C-Termini Angriffspunkte für die Exopeptidase geschaffen haben. Jedenfalls ließ sich *in vitro* kein Abbau von reifen Globulinen durch gespeicherte Carboxypeptidasen aus Kotyledonen von *V. sativa* L. nachweisen (SHUTOV *et al.* 1981). cDNA-abgeleitete Sequenzen von Carboxypeptidase-Präkursoren des Ackerschmalwands (*Arabidopsis thaliana* L.), enthalten ein N-terminales Signalpeptid, ein Propeptid und die Sequenz des reifen Enzyms (BRADLEY *et al.* 1992). Partielle cDNA-abgeleitete bzw. direkt bestimmte Carboxypeptidase-spezifische Aminosäuresequenzen von Erbse (JONES *et al.* 1996) und Mungbohne (WILSON *et al.* 1995) zeigen große Ähnlichkeit zu denen aus *Arabidopsis thaliana* L.. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass auch bei den Leguminosen das inaktive Carboxypeptidase-Proenzym im Endomembransystem zur Vakuole transportiert und dort durch limitierte Proteolyse aktiviert wird.

1.4.2 Neubildung von Proteinase und ihre Funktion beim Abbau von Proteinen in Kotyledonen während des Keimlingswachstums

In den Kotyledonen der meisten genauer untersuchten Pflanzen hat man erst zu Beginn des Keimlingswachstums das Auftreten neuer Proteinase, zumeist CPR, nachgewiesen, denen gemäß den drei zuvor aufgeführten Kriterien (Seite 15) der Start des Reserveproteinabbaus zugeschrieben wird (WILSON *et al.* 1986, SHUTOV und VAINTRAUB 1987, MÜNTZ 1996). Dazu gehört bei den Dikotyledonen die Vicilinpeptidohydrolase aus Kotyledonen von *Vigna radiata* L.. Es ist eine CPR, für die es bisher keine sichere Zuordnung zu den Familien der papain- oder legumain-artigen CPR gibt. Sie wird nach Abschluss der Keimung am rER *de novo*

gebildet und gelangt von dort durch Transfer in Vesikeln zu den PB, in denen sie den Reserveproteinabbau katalysiert (BAUMGARTNER und CHRISPEELS 1979).

In ähnlicher Weise soll nach der Hypothese von SHUTOV und VAINTRAUB (1987) der Reserveglobulinabbau in den Kotyledonen von Wickenkeimlingen (*V. sativa* L.) stattfinden. Vergleichbar der Metalloproteinase von Buchweisen soll eine nach Abschluss der Keimung in den Kotyledonen neu gebildete papain-artige CPR, hier Proteinase A genannt (SHUTOV *et al.* 1984), durch limitierte Spaltungen nach dem „Zipper-Mechanismus“ eine Modifikation der Reserveproteinuntereinheiten bewirken, die zu einer Konformationsänderung im Holoprotein führt, ohne dass dieses dissoziiert. Der aus der Katalysekinetik ablesbare Zipper-Mechanismus bewirkt, dass ähnlich wie beim Öffnen der Zähne eines Reißverschlusses, jedes Reserveproteinmolekül nur an einer oder wenigen Stellen proteolytisch aufgeschlossen wird. Dadurch wird seine Konformation verändert und das Protein für einen Angriff durch eine legumain-artige CPR, hier Proteinase B genannt, geöffnet. Beide CPR bewirken dann kooperativ nach einem „one-by-one-Mechanismus“ zusammen mit einer gespeicherten Carboxypeptidase den Abbau der Globuline bis zu kurzkettigen Peptiden. Im one-by-one-System werden die Reserveglobulinmoleküle „eins nach dem anderen“ vollständig abgebaut. Die dabei entstehenden niederen Peptide werden ins Cytoplasma überführt, wo Amino- und andere Peptidasen ihren Abbau zu Aminosäureresten katalysieren.

In Kotyledonen von Buchweizenkeimlingen wird eine nicht näher klassifizierte CPR neu gebildet, die *in vitro* zusammen mit einer gespeicherten Carboxypeptidase Legumin abbaut. Voraussetzung ist auch hier, dass das Legumin vorher durch limitierte Spaltungen, die von der gespeicherten Metallo-Endopeptidase katalysiert werden, strukturell dem Angriff durch die CPR zugänglich gemacht worden ist (s.o.). Dieser Abbau setzt außerdem voraus, dass die Abbauprodukte kontinuierlich entfernt werden, andernfalls kommt die CPR-Aktivität infolge von Rückkopplungshemmung durch sich anreichernde Aminosäuren und niedere Peptide zum Erliegen (DUNAEVSKY und BELOZERSKY 1989b, Übersicht: MÜNTZ *et al.* 2001).

In Getreidekaryopsen wird die Hauptmenge der Reserveproteine (Prolamine, s. Tabelle 1) im Mehlerendosperm gespeichert, dessen Zellen während der Samenreife durch kontrollierten Zelltod absterben. In diesem Gewebe kann also während und nach der Keimung keine Proteinbiosynthese erfolgen. Die hydrolytischen Enzyme zum Abbau von Reservestoffen des Mehlerendosperms werden in den wenigen äußeren Schichten lebender Zellen des Endosperms, den Aleuronzellen, während der Keimung *de novo* gebildet und von dort in das tote Mehlerendosperm sezerniert. Für den Reserveproteinabbau sind z.B. bei Gerste vor allem zwei papain-artige CPR (EP-1 und EP-2) verantwortlich, die vom Aleuron in das tote Endosperm abgesondert werden. Diese Proteinasen werden von den Aleuronzellen ebenso unter Kontrolle der beiden antagonistisch wirkenden Phytohormone Gibberellin und

Abszissinsäure gebildet und wie andere Hydrolasen für den Stärke- (Amylasen) oder Zellwandabbau (Glukanasen) sezerniert. Die Phytohormone werden von den Zellen der Embryoachse und des Scutellums gebildet und abgegeben, wodurch diese Embryonalorgane die Kontrolle über die Reservestoffmobilisierung ausüben (Übersichten: FINCHER *et al.* 1989, KOEHLER und HO 1990a, b, BEWLEY und BLACK 1994, BETHKE *et al.* 1998).

Bei Sojabohnen ist eine Serinproteinase nachgewiesen worden, die in den Keimblättern nach Abschluss der Keimung neu gebildet wird und den Abbau der großen (dem Convicilin entsprechenden) Untereinheiten des β -Conglycinins katalysiert (WILSON *et al.* 1996, TAN-WILSON *et al.* 1996). In PB von Scutellumzellen trockener Gerstenkaryopsen ist eine Aspartat-Proteinase gefunden worden (TÖRMÄKANGAS *et al.* 1994, MARTTILA *et al.* 1995).

1.4.3 Wichtige offene Fragen

Sowohl in Embryoachsen als auch in Zellen lebender Speichergewebe beginnen die Proteinbiosynthesen bereits während der Keimung bald nach Anfang der Quellung (LANE 1991, BEWLEY 1997). In den Speichergeweben ist der Abbau von Proteinreserven jedoch stets erst nach Abschluss der Keimung festgestellt worden. Welche Aminosäurequellen speisen somit vorher den Bedarf für Proteinbiosynthesen? Mehrfach ist davon ausgegangen worden, dass dazu die betreffenden Zellen und Gewebe über eine genügende Menge gespeicherter freier Aminosäuren verfügen (z.B. SHUTOV und VAINTRAUB 1987). Es ist jedoch unklar, ob bereits vor Abschluss der Keimung und dem Beginn des Abbaus von Proteinreserven in den Speichergeweben der Aminosäurebedarf für Synthesen aus der Proteindegradation gespeist wird oder nicht? Ebenso ist bei dikotyledonen Pflanzen nicht bekannt, in welchem Verhältnis die Mobilisierung von Speicherproteinen in der Embryoachse zum Speicherproteinabbau in den Keimblättern als Aminosäurequelle für die frühe Proteinbiosynthese steht. Allerdings gibt es Hinweise, dass der frühe Aminosäurebedarf der Embryoachse aus dem Abbau endogener Proteinreserven gedeckt werden könnte (z.B. bei Baumwolle: VIGIL und FANG 1995 a, b).

Obwohl die Bedeutung der Neubildung von Proteinasen nach der Keimung für die umfassende Mobilisierung von Proteinreserven unbestritten ist, blieb bisher ungeklärt, welche Rolle gespeicherte oder neu gebildete Proteinasen für die Initiation der Reserveproteinmobilisierung spielen (MÜNTZ *et al.* 2001). Da bisher keine Proteinasen aus Embryoachsen analysiert worden sind, blieb auch unklar, ob dort nicht gespeicherte Proteinasen für den Beginn der Aminosäuremobilisierung aus Proteinen von grundlegender Bedeutung sind.

Vereinzelt gibt es Hinweise darauf, dass mehrere Vertreter einer Proteinaseklasse oder verschiedener Proteinaseklassen am Reserveproteinabbau beteiligt sind. Hierbei könnte sich

ihre Rolle entwicklungsabhängig ändern, wie das bei der Metalloproteinase und der CPR in Kotyledonen von Buchweizen der Fall ist (BELOZERSKY *et al.* 1990, ELPIDINA *et al.* 1990, 1991). Bisher sind stets einzelne oder wenige ausgewählte Proteinase aus Kotyledonen von Keimlingen beschrieben worden, denen gemäß der drei zuvor aufgeführten Kriterien (Seite 15) dann Funktionen bei der Proteinmobilisierung beigemessen wurden. Da keine Übersicht über andere beteiligte Enzyme besteht, kann die Rolle bekannter Proteinase schwer bewertet werden.

Der Abbau von Proteinen geschieht nicht zeitgleich in allen Teilen der Speichergewebe. Er beginnt an bestimmten Stellen und bewegt sich in Mustern durch die Keimblätter oder das Endosperm, die für unterschiedliche taxonomische Gruppen verschieden sind (SMITH 1981). Für Kotyledonen von *Vigna radiata* L. ist gezeigt worden, dass erwartungsgemäß Muster des Verlaufs von Proteinabbau und von proteolytischer Aktivität zusammenfallen (HARRIS und CHRISPEELS 1975). Die damals angewandten Methoden waren jedoch verhältnismäßig unempfindlich und ließen keine Identifizierung spezifischer Proteinase oder abgebauter Proteine im Gewebe zu. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Proteinase eng lokalisiert vorkommen und eine wichtige Rolle bei der differenziellen Proteinmobilisierung spielen, jedoch in Gesamtextrakten von Organen nicht nachgewiesen werden. Dagegen könnten andere Proteinase, die in geringer Menge über das ganze Gewebe verteilt vorkommen und denen keine spezifische Funktion zukommt, leicht erfasst werden. Aufgrund dessen, weil sie nachweis- und analysierbar sind, wird ihnen dann unangemessen viel Bedeutung zugeschrieben.

Die Bedeutung verschiedener Proteinase im raum-zeitlichen Muster des Abbaus verschiedener Proteine sollte deshalb mit biochemischen, molekularbiologischen und Zellfraktionierungs-Methoden untersucht werden, damit die Funktion einzelner Proteinase erkennbar wird. Diese Untersuchungen könnten durch einen Ansatz mit spezifischen immunhisto- und cytochemischen Methoden ergänzt werden.

Schließlich sind auch die Fragen nach den Mechanismen der Kontrolle von Proteinase-Genexpression und -Aktivität im raum-zeitlichen Ablauf der Reserveproteinmobilisierung ungeklärt. Die Klärung dieser Fragen kann jedoch erst erfolgen, wenn klar geworden ist, welche Proteinase Schlüsselfunktionen beim Beginn der Proteinmobilisierung und für deren weiteren Verlauf an verschiedenen Stellen der Speichergewebe haben.

1.5 Ziele der Arbeit

Die Untersuchungen für diese Dissertation waren Teil des Forschungsprogramms der ehemaligen Arbeitsgruppe „Eiweißstoffwechsel der Pflanzen“ (Leiter: Prof. Dr. K. Müntz), Abteilung „Molekulare Zellbiologie“ des IPK, Gatersleben. Deren Interesse an Proteinase aus Leguminosensamen resultierte aus Untersuchungen über die limitierte Proteolyse beim innerzellulären Transport und der molekularen Reifung von Prolegumin (s. Abschnitt 1.1.3). Die daran beteiligte Asparagin-spezifisch spaltende Proteinase (HARA-NISHIMURA *et al.* 1991, SCOTT *et al.* 1992, JUNG *et al.* 1993, 1998) erwies sich ebenso wie die von SHUTOV *et al.* (1982) beschriebene Proteinase B aus *Vicia sativa*-Keimlingen (BECKER *et al.* 1995) als Mitglied der neu definierten Familie der Legumaine (ISHII 1994). Davon ging eine Prüfung der Hypothese von SHUTOV und VAINTRAUB (1987) über den kooperativen Abbau von Legumin durch die Proteinase A und B aus. Dabei wurde klar, dass Proteinase A nicht die papain-artige CPR sein konnte, welche den Globulinabbau in Keimlingen von *Vicia sativa* L. initiiert (BECKER *et al.* 1997). Die Suche nach weiteren CPR aus Samen von *Vicia sativa* L. führte zur Analyse von insgesamt 6 verschiedenen CPR-spezifischen cDNA's (BECKER *et al.* 1994, 1995, 1997, FISCHER *et al.* 2000). Eine biochemische Charakterisierung der zugehörigen Enzyme gelang ebenfalls in den meisten Fällen (BECKER *et al.* 1995, 1997, FISCHER *et al.* 2000). Dadurch standen schließlich nicht nur entsprechende CPR-spezifische DNA-Sonden sondern auch Antikörper zur Verfügung. Zusammen mit den bereits vorhandenen Antikörpern gegen die Reserveproteine Vicilin und Legumin aus *Vicia faba* L. war damit ein umfangreiches Instrumentarium zur experimentellen Klärung einiger der im vorhergehenden Abschnitt aufgeführten offenen Fragen zum Reserveproteinabbau und den daran beteiligten Proteinase bei einer Leguminosen-Spezies erarbeitet worden.

Im Rahmen des SFB 363 „Molekulare Zellbiologie pflanzlicher Systeme“, Teilprojekt B12, wurden dazu die notwendigen Untersuchungen in zwei parallelen Dissertationen ausgeführt. Beide Arbeiten untersuchten die Vorgänge bei der Proteinmobilisierung in Embryoachsen und Kotyledonen sowohl während der Keimung als auch während des anschließenden Keimlingswachstums. Ein besonderes Interesse galt hierbei den Vorgängen in Embryosachse und den frühen Phasen der Keimung, da diese bislang nur unzureichend analysiert wurden. In der hier vorliegenden Dissertation sind dazu Untersuchungen mit den Methoden der Zellfraktionierung, mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden bei Samen der Saatwicke (*Vicia sativa* L.) ausgeführt worden. Neben Analysen, welche die unterschiedlichen Stadien der Keimung und Keimlingsentwicklung berücksichtigten, wurden auch verschiedene Stadien der Samenreifung untersucht. Die 2. Dissertation, war auf die räumliche und zeitliche Analyse von Globulinabbau und Proteinase mittels immunhisto-, und cytochemischer Methoden, mittels *in situ*-Hybridisierung von Antisense-RNA gegen proteinase-spezifische

mRNA, sowie mittels Ultrastrukturuntersuchungen im Elektronenmikroskop am selben Objekt ausgerichtet (TIEDEMANN 2000).

Die vorliegende Dissertation hat folgende Ziele:

- Analyse des Globulinabbauusters in ganzen Organen und daraus isolierten PB mit Hilfe vicilin- und legumin-spezifischer Antikörper.
- Analyse des zeitlichen Musters im Vorhandensein proteinase-spezifischer mRNA und Polypeptide bis zurück in die Periode der Samenreifung.
- Ermittlung solcher Proteinase, die in trockenen Samen gespeichert vorkommen.
- Analyse von Proteinase in PB aus trockenen Samen und Nachweis ihrer Beteiligung am Beginn des Reserveproteinabbaus.
- Analyse der entwicklungsabhängigen Profile freier Aminoverbindungen.
- Ableitung von Beziehungen zwischen Proteinase, Beginn des Reserveproteinabbaus und Mobilisierung von Aminosäuren in beiden Organen während er untersuchten Stadien.
- Beantwortung von Fragen nach der Bedeutung einzelner Proteinase aus den Familien der papain- und legumain-artigen CPR für den Beginn und Verlauf der Proteinmobilisierung sowie nach der Rolle von gespeicherten Proteinase bei diesem Prozess in Embryoachsen und Kotyledonen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden bereits in zwei Originalarbeiten veröffentlicht (SCHLERETH *et al.* 2000, 2001). Außerdem bin ich mit meinen Ergebnissen an zwei weiteren Originalpublikationen zu diesem Thema aus der Arbeitsgruppe beteiligt (FISCHER *et al.* 2000, TIEDEMANN *et al.* 2001). Darüber hinaus konnte ich als Coautor zu zwei zusammenfassenden Veröffentlichungen über Proteinmobilisierung und Proteinase aus keimenden Samen und Keimlingen von *Vicia sativa* L. bzw. dikotyledonen Pflanzen beitragen (MÜNTZ *et al.* 1998, 2001). Alle sechs Veröffentlichungen bilden das Kernstück von Ergebnisdarstellung und Diskussion der Resultate in der vorliegenden kumulativen Dissertation

2 MATERIAL UND METHODEN

Die Materialien und Methoden, die bei den experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation eingesetzt wurden, sind in den Publikationen M2 bis M5 beschrieben worden. Neben einer Übersicht darüber enthält dieses Kapitel erforderliche Ergänzungen, da einige der Beschreibungen sehr knapp gehalten waren.

2.1 Versuchspflanzen

Die Versuche wurden an Samen der Saatwicke (*Vicia sativa* L. convar. caesentini [Guss.] Arcang. [Var. 133]) durchgeführt, die zu unterschiedlichen Stadien der Reifung, Keimung und Keimlingsentwicklung geerntet wurden. Das dazu verwendete Saatgut stammt aus einem im IPK-Gatersleben durchgeführten Vermehrungsanbau.

2.2 Plasmide und Vektoren

Tab. 3: Zur Klonierung verwendete Plasmide und Vektoren

Plasmid	Eigenschaften und Verwendung	Herkunft
pCR [®] 2.1	Amp ^r (Bakterien), Km ^r (Pflanzen) direktes Klonieren von PCR-Fragmenten über T/A-Überhänge, LacZ α für blau-weiß-Selektion; Sequenzierung	Invitrogen, 1992
pET3d	Amp ^r , direktes Klonieren von PCR-Fragmenten	Novagen

2.3 Bakterienstämme

Als Wirtsorganismus für die verwendeten Plasmide diente der Bakterienstamm *Escherichia coli* K12, welcher keine Pathogenitätsfaktoren besitzt. *E. coli* gehört zu den Gram-negativen, peritrich begeißelten, fakultativ anaeroben, stäbchenförmigen Enterobacteriaceae, die keine Sporen bilden.

Tab. 4: Verwendete Unterstämme des *Escherichia coli* K12 Stammes

Stamm	Genotyp	Herkunft
Inv α F'	EndA1, recA1, hsdR17(r-k,m+k), supE44, λ -thi-1, gyrA, relA1, ϕ 80, lacZ α Δ M15 Δ (lacZYA-argF), deoR+, F'	Invitrogen, 1992
HB101	SupE44, hsdS20($r_B^- m_B^-$), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, resL20, xyl-5, mtl-1, F', thi-1, leuB6, rpsL20(str ^r), λ	Boyer & Roulland-Dussoix (1969), Bolivar & Backmann (1979), Sambrook <i>et al.</i> (1989)
HMS174	F ⁻ , recA, hsdR($r_{K12}^- m_{K12}^+$), Rif ^R	Novagen

2.4 Tabellarische Zusammenfassung der angewandten Methoden

In Tabelle 5 sind alle wichtigen benutzten Methoden zusammengefasst. Es kann daraus entnommen werden, in welcher Publikation eine nähere Beschreibung zu finden ist, oder ob eine ergänzende Beschreibung folgt.

Tab. 5: Tabellarische Zusammenfassung der angewandten Methoden. M2 - 4 = Beschreibung der Methode im jeweiligen Manuskript, D = ergänzende Beschreibung in Material und Methoden

Biochemische und Analytische Methoden		
1. Photometrische Bestimmungen		
Konzentrationsbestimmungen	M3, 4	Bestimmung der Proteinkonzentration
	M3	Bestimmung der Gesamtaminosäurekonzentration
Enzymaktivitäten	M4	PFP Aktivität
	M4	α -Mannosidase Aktivität
2. Gelelektrophorese		
SDS-PAGE	M3	Auftrennung von Proteinextrakten
Gelatine SDS-PAGE	M3, 4	Nachweis der proteolytischen Aktivität gegenüber copolymerisierten Substraten
Agarose - Gelelektrophorese	M4	Auftrennung synthetischer Peptide nach einem proteolytischen Verdau

3. Zellfraktionierungen	M3, 4	Differenzielle Extraktion unterschiedlicher Proteinklassen
	M3, 4	Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation von PB
4. Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)	M3, 4	Nachweis unterschiedlicher Proteinase durch die Umsetzung von NBT/BCIP oder mittels Chemilumineszens
	M3, 4	Nachweis unterschiedlicher Speicherproteine
5. Herstellung eines Antiköpers	D	
6. HPLC	M4	Auftrennung von Peptidfragmenten
	M3	Analyse der Aminosäurezusammensetzung
7. Elektronenmikroskopische Analysen	M4	Nachweis und Bestätigung der Isolation von PB
	M4	Ausschluss cytosolischer Verunreinigungen in PB-Extrakten
8. ESI Massenspektrometrie	M4	Massenbestimmung und Sequenzierung von Peptidfragmenten
9. Sonstiges		
Szintilationsmessung	M4	Nachweis radioaktiv markierter Proteine
Biomassenbestimmung	M3	Frischgewicht, Trockengewicht
Molekularbiologische Methoden		
1. Nachweis von mRNA (Northern Blots)	M2, 3	Nachweis der mRNA unterschiedlicher Proteinase
2. PCR	D	Amplifikation unterschiedlicher Fragmente
	M3	Strangspezifische radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden
	D	Amplifikation einer mutagenisierten cDNA
3. Agarose - Gelelektrophorese	M2, 3	Auftrennung von RNA
	D	Auftrennung und Isolation unterschiedlicher PCR- Amplifikate
4. Sequenzierung	D	Sequenzierung der mutagenisierten cDNA
	M3	N-terminale Sequenzierung von Proteinen

2.5 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen

Transformationskompetente *E. coli* Zellen wurden entsprechend der von MANDEL & HIGA (1970) veröffentlichten CaCl₂-Methode hergestellt. Nach ÜN Inkubation bei 37°C wurden die *E. coli* Zellen in frischem LB-Vollmedium inkubiert. Mit Erreichen einer Zelldichte A₆₀₀ von 0.5 – 0.6 wurden die Zellen 10 min auf Eis gestellt. Nach der Zentrifugation bei 2500 Upm, 10 min und 4°C wurden die Zellen mit 100 mM CaCl₂ gewaschen und für 30 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1/10 des Ausgangsvolumens mit CaCl₂ (Endkonzentration 10 mM) vorsichtig resuspendiert. Die so kompetent gemachten Zellen konnten 2 Tage auf Eis gelagert werden.

2.6 PCR-Amplifikation von cDNA

Die Amplifikation der cDNA aus Plasmiden erfolgte durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotid-Primern. Auf diese Weise wurden auch neue Restriktionsschnittstellen und *in vitro*-Mutationen eingefügt. Außerdem wurde die strangspezifische radioaktive Markierung von cDNA-Molekülen für Northern-Blot Analysen mittels PCR durchgeführt. Die PCR erfolgten in einem Temperatur-„cycler“ (Perkin Elmer, Biometra) wie folgt: 1.) Denaturierung bei 95 °C für 10 min, 2.) Denaturierung bei 95°C für 1 min, 3.) Hybridisierung in Abhängigkeit von den T_m-Werten der verwendeten Oligonukleotid-Primern für 30 sec (50 – 56 °C), 4.) Elongationsreaktion bei 72°C für 1min 10 sec. 5.) Abschließende Elongation bei 72 °C für 10 min. Die Schritte 2.) – 4.) wurden 40 mal wiederholt (40 Zyklen). Im Standardreaktionsansatz (50 µl) waren ca. 0.2 – 0.4 µg Matrizen DNA, je 2.5 mM dNTP's (Perkin Elmer), 25 mM MgCl₂ (Boehringer Mannheim), Oligonukleotide (20 pmol), 1.8 U Expand High-Fidelity DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) enthalten.

Für die in Manuskript 5 beschriebene *in situ* Hybridisierung unterschiedlicher Proteinase-mRNA wurden die zur Transkription benötigten cDNA-Fragmente ebenfalls über PCR-Amplifikation (s. 2.5, bzw. M5, Tab 2) gewonnen. Für die nachfolgende Umschreibung der cDNA in RNA waren Matrizen erforderlich, die einen möglichst großen Bereich der codierenden Sequenz umfassen. Die betreffenden Amplifikationsprodukte wurden deshalb unter sterilen Bedingungen in 1,2 % igen präparativen Agarosegelen mit TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat [pH 8.3], 1mM EDTA) aufgetrennt. Danach wurden von jedem Gel 2 schmale Randstreifen abgeschnitten und in Ethidiumbromid-Lösung (0.001%) angefärbt. Die gefärbten Banden in den Seitenstreifen gaben Aufschluss über die Lage der gesuchten ungefärbten Banden im Mittelstück des Gels. Unter sterilen Bedingungen wurden diese, dem Vollängenprodukt entsprechenden Banden, ausgeschnitten und wie unter 2.7.2 sorgfältig

isoliert, gereinigt und für die Umschreibung in Proteinase-spezifische antisense RNA verwendet (TIEDEMANN *et al.* 2001).

2.7 Erzeugung einer durch Aminosäureaustausch mutierten rekombinanten Proteinase B

Ziel war es, die Aminosäure in Position 174 (His zu Gly bzw. Arg) des katalytischen Zentrums der Proteinase B auszutauschen. Diese Mutation führt nach HARA-NISHIMURA *et al.* (1998) und HIRAIWA *et al.* (1999) zur Inaktivierung des Enzyms, wodurch eine autokatalytische Aktivierung des Proteinase B-Präkursors und die Eigenhydrolyse des reifen Enzyms unterbunden wird.

2.7.1 *in vitro*-Mutation

Der Aminosäureaustausch im katalytischen Zentrum wurde über 2 PCR-Reaktionen erreicht. Mit Hilfe der 1. PCR wurde ein 385 bp langes Produkt mit einer Sequenzänderung in Position 375 amplifiziert. Bei der 2. PCR-Reaktion wurde dieses Amplifikat der 1. PCR zusammen mit einem weiteren Oligonukleotid als Primer eingesetzt. Damit konnte ein Produkt amplifiziert werden, welches die vollständige codierende Sequenz einer reifen Proteinase B umfasst, 983 bp lang ist und in Position 174 eine Mutation aufweist. Für die spätere Ligation und Isolation der cDNA wurden 5'-terminal eine NcoI- und 3'-terminal eine BamHI-Restriktionsschnittstelle eingefügt.

2.7.2 Isolation der mutierten Proteinase B-cDNA

Die PCR Amplifikate wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden in einem an der Basis offenen und mit Gehörschutzwatte verstopften Eppendorfgefäß bei - 70 °C durchgefroren, aufgetaut sowie 10 min mit 13 000 Upm bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend mit 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) gewaschen und erneut zentrifugiert.

Der Durchlauf wurde mit einem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform (Phenol: Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1 [v/v/v] TE gesättigt) zweimal ausgeschüttelt und zur Phasentrennung jeweils für 3 min wie zuvor zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde anschließend mit gleichem Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (Chloroform: Isoamylalkohol 24:1 [v/v]) versetzt, um das restliche Phenol zu entfernen. Die wässrige Phase wurde, nach erneuter Zentrifugation, mit 1/10 Vol. 3 M NaAcetat (pH 4.9) und 2.5 Vol. Ethanol

(100%) versetzt um die DNA bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ÜN zu fällen. Nach Zentrifugation wurde das erhaltene DNA Pellet zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen, erneut sedimentiert. Das Pellet wurde nach dem Trocken in 25 μl sterilem Wasser aufgenommen. Die DNA-Konzentration der Lösung konnte durch Absorptionsmessung im Photometer bei A260 bestimmt werden.

2.7.3 Klonierung der mutierten Proteinase B-cDNA

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit dem „TA Cloning® Kit“ (Invitrogen), entsprechend den Herstellerangaben, in die „multiple cloning site“ des pCR[®]2.1 Vektors ligiert. Nach Transformation in Inv α F'-Zellen konnten die Klone mittels X-Gal-Test (BULLOCK *et al.* 1987) selektiert und durch DNA-Minipräparation mit anschließender Sequenzierung überprüft werden. Die Sequenzierung wurde nach der Methode von SANGER *et al.* (1977) im Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben von Frau König durchgeführt.

Positive Klone wurden entsprechend den Herstellerangaben mit dem „pET System“ (Novagen) erneut ligiert. Die aus Inv α F'-Klonen isolierte (s. 2.7.2), rekombinante DNA wurde hierzu in den linearisierten, mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierten (1 μl /20 μl , aus arktischen Shrimps) Vektor pET3d ligiert und in den Bakterienstamm HB101 transformiert. Nach DNA-Minipräparation und Restriktionsverdau wurde die DNA positiver Klone entsprechend 2.7.2 isoliert, mit Hilfe von Restriktionsenzymen herausgeschnitten und erneut mit dem pET-System (Novagen) kloniert. Nach Ligation der DNA in den Vektor pET3d, folgte eine Transformation in den Bakterienstamm HMS174.

2.7.4 Erzeugung und Isolation der mutierten Proteinase B

Eine ÜN-Kultur des Bakterienstamms HMS174 wurde nach der Zentrifugation (20 min, 13000 Upm) vorsichtig in frischem LB-Selektivmedium resuspendiert. Durch Zugabe von IPTG (0.5 mM) erfolgte der Start der 3-stündigen Translation des mutierten Proteins. Als Kontrolle wurde eine ÜN-Kultur ohne Initiation der Translation mitgeführt. Nach Ernte und Resuspendieren der Zellen wurden diese mittels Ultraschall aufgebrochen und erneut sedimentiert.

Das rekombinante Enzym wurde mit einem Lysis-Puffer (100 mM Tris, pH 7.2, mM EDTA) isoliert, der 6 M Harnstoff enthält. Auf die Isolation folgte eine Renaturierung des Proteins durch Zugabe des Gluthation-Redoxsystems (Lysis-Puffer, 200 mM NaCl, 10 mM reduziertes Gluthation, 1 mM oxidiertes Gluthation, 6 M Harnstoff). Die Renaturierung geschah bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter leichtem Rühren über 3 Tage. Danach wurde das Protein stufenweise gegen Wasser dialysiert. Die erhaltene Proteinlösung wurde auf eine Konzentration von 0.7 mg/ml eingestellt. Eine Prüfung des Renaturierungserfolgs war nicht möglich, da das Enzym durch die *in vitro*-

Mutation inaktiviert worden war. Der immunologische Nachweis des Proteins mit der erwarteten Größe bestätigte jedoch die bakterielle Produktion des gewünschten Antigens für die nachfolgende Antikörpererzeugung.

2.8 Herstellung des Proteinase B-spezifischen Antikörpers

Für die Gewinnung des Antikörpers wurden Kaninchen nach einem Standardprotokoll immunisiert. Als Antigen wurde das rekombinant erzeugte *in vitro*-mutierte inaktive Proteinase B-Polypeptid verwendet. Bei der ersten Immunisierung wurde 1 mg Antigen unter Zusatz von Freud'schem Adjuvanz gespritzt. Im Abstand von 4 Wochen folgten 2 weitere Immunisierungen. Sowohl vor Beginn der Immunisierung als auch vor jeder weiteren Immunisierung wurde den Tieren Blut entnommen. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung erfolgte die Endblutung. Der Antikörper ließ sich ohne weitere Reinigung für immunologische Analysen verwenden, da keine kreuzreaktiven Banden nachgewiesen werden konnten.

3 ERGEBNISSE

3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Publikationen M1 bis M5

3.1.1 Keimung und Keimlingswachstum

Die Darstellung von Keimung und Keimlingswachstum in M3 (S. 1425) wird hier durch Abbildungen über den phänotypischen Verlauf der Samenreifung (Abb. 5), der Keimung und des Keimlingswachstums bis 3 dai (Abb. 6) sowie über die Frischmasseänderungen während der ersten 6 dai (Abb. 7) ergänzt.

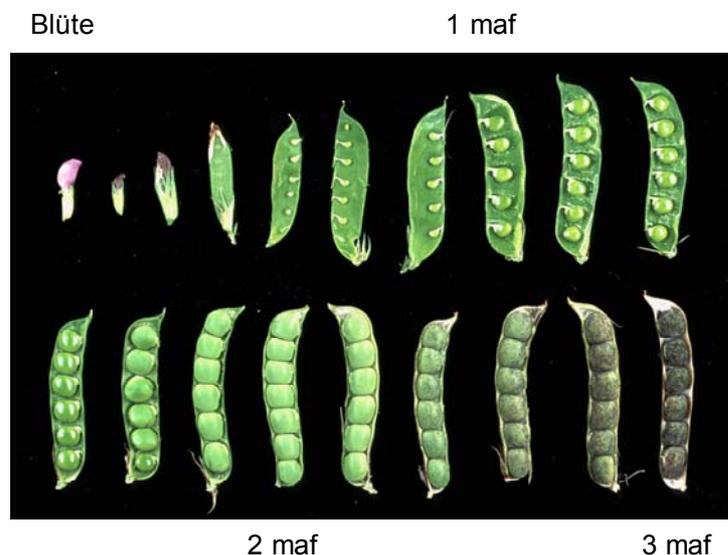


Abb. 5 Phänotypische Erscheinung von *Vicia sativa* L. Samen zu unterschiedlichen Reifestadien. Die Samenreifung ist etwa 3 Monate nach der Blüte abgeschlossen (maf = month after flowering).

Nach anfänglicher starker Zunahme der Frischmasse, bedingt durch rasche Wasseraufnahme während der ersten 12 hai (Phase I) folgt bis zum Ende der Keimung, das nach 24 hai erreicht ist, eine Phase mit geringerer Frischmassezunahme aufgrund der reduzierten Wasseraufnahme (Phase II). Nach Ende der Keimung, d.h. mit Beginn des Keimlingswachstums, ist eine Zunahme der Frischmasse infolge Wasseraufnahme, nahezu nicht mehr erkennbar (Phase III). Diese Phaseneinteilung entspricht dem gewöhnlichen Verlauf der Wasseraufnahme von Samen bei der Keimung (BEWLEY und BLACK 1994). Da weder bei Embryoachsen noch bei Kotyledonen während der Keimung Änderungen in der Trockenmasse feststellbar waren (M3, S. 1425 und Fig. 1), beruhen die Änderungen der Frischmasse während dieser Zeit praktisch ausschließlich auf der Wasseraufnahme. Dies ändert sich nach

Abschluss der Keimung, wenn die Massezunahme der Embryoachse vor allem durch die Zunahme der Trockenmasse und die Abnahme in den Kotyledonen in erster Linie durch die Verringerung der Trockenmasse infolge Reservestoffabbaus erfolgt.



Abb. 6 Darstellung des Keimungsverlaufs und des frühen Keimlingswachstums (hai = hours after imbibition).

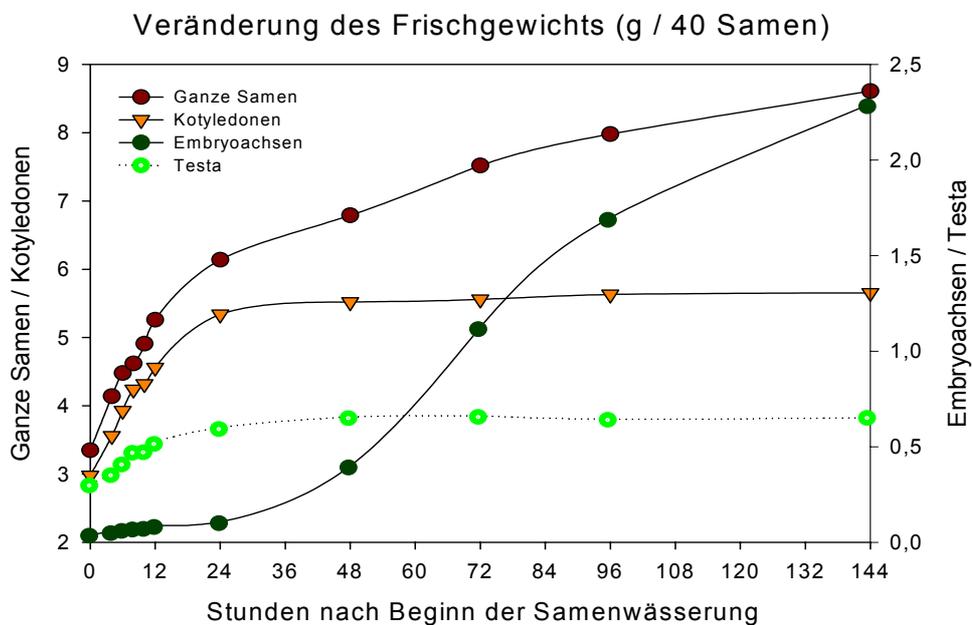


Abb. 7 Frischgewichtsentwicklung bei *Vicia sativa* L. während der ersten 6 Tage nach Beginn der Samenwässerung.

3.1.2 Mengenbilanzen von löslichen Proteinen und Aminosäuren während der Keimung und des frühen Keimlingswachstums

In Übereinstimmung mit den Trockenmasseänderungen zeigen die Proteinmengen in Achse und Kotyledonen (M3, S. 1425 und Fig. 1) während der Keimung keine wesentlichen Änderungen. Erst nach dem Ende der Keimung wird eine rasche Proteinzunahme in der Embryoachse bzw. eine zunehmend stärkere Verminderung der Proteinmenge in den Kotyledonen erkennbar. Allerdings zeigt die Fraktion der löslichen Proteine in den Embryoachsen 3 da eine Abnahme. Diese kann durch Verschiebungen im Verhältnis zwischen löslichen und unlöslichen Proteinen zugunsten der unlöslichen Fraktion erklärt werden.

Erst mit dem Ende der Keimung beginnen sich die Gesamtmengen der freien Aminoverbindungen (M3, 1425 und Fig. 1 C) in Embryoachsen und Kotyledonen deutlich zu verändern. Sie nehmen sowohl in der Achse als auch in den Kotyledonen mit dem Beginn des Keimlingswachstums zu. In den Achsen ist diese Veränderung gegenüber den Kotyledonen um einem Tag verzögert. In beiden Organen sind dabei die quantitativen Veränderungen bei den sauren Aminosäuren und ihren Amidien besonders auffällig (M3, S. 1429 und Fig. 6). Ihre Zunahme läuft, in Übereinstimmung mit den Verhältnissen bei den gesamten freien Aminoverbindungen, in den Kotyledonen derjenigen in den Achsen um wenigstens einen Tag voraus. Die Hauptrolle bei den mengenmäßigen Veränderungen in den Embryoachsen spielt Asparagin.

3.1.3 Abbau spezifischer Proteine in Embryoachsen und Kotyledonen während der Keimung und der ersten Tage des Keimlingswachstums

Neben dem Verschwinden bestimmter Polypeptide aus der Fraktion der Albumine (M3, S. 1426 und Fig. 2) sind die Veränderungen in den Polypeptiden der Globulinfraction besonders auffällig. Sowohl immuncytologische als auch Zellfraktionierungsanalysen zeigten in Übereinstimmung mit der Literatur (SHEWRY und CASEY 1999), dass reife Globuline nur in den PB vorkommen (M2, S. 94 und Fig. 8; M4, S. 721 und Fig. 3b). Daher gleichen sich die entwicklungsabhängigen Veränderungen in den Globulinbanden bei elektrophoretischer- bzw. Immunoblot Analyse unabhängig davon, ob die gesamte Fraktion der neutralsalzlöslichen Proteine aus Embryoachsen bzw. Kotyledonen (M3, S. 1426/27 und Fig. 2, 4) oder die entsprechenden Proteine aus isolierten PB analysiert wurden (M3, S. 1427 und Fig. 3).

Neben den Kotyledonen enthält auch die Embryoachse Vicilin und Legumin, die in den PB lokalisiert sind. Das Vicilin-zu-Legumin-Verhältnis ist in der Embryoachse deutlich größer als in den Kotyledonen. Am Verlauf der Abschwächung und des Verschwindens von Vicilin- und Leguminpolypeptiden ist erkennbar, dass die Reserveglobuline in der Achse während der

Keimung nahezu vollständig abgebaut werden, während in diesem Zeitraum in den Kotyledonen mit den verwendeten Methoden kein Abbau nachweisbar ist (M1, S. 684/85 und Fig. 1; M3, S. 1427 und Fig. 3). Dort beginnen sich die Globulinbanden als Zeichen des Abbaus erst 2 bis 3 dai merklich abzuschwächen, wobei zeitgleich Zwischenprodukte des Abbaus in den Bandenmustern der Polypeptide sichtbar werden. Der Abbau vollzieht sich in den PB (M3, S. 1427 und Abb. 3), was auch durch Inkubation von PB-Lysaten unter geeigneten Bedingungen erkennbar wird (M4, S. 721 und Fig. 4).

3.1.4 Elektrophoretische Analyse von Proteinasen während der Keimung und des Keimlingswachstums

Die Methode, Proteinase in gelatinehaltigen Polyacrylamidgelen durch Gelatineabbau sichtbar zu machen, erwies sich als sehr geeignet, um entwicklungsabhängige Änderungen im Proteinasespektrum sichtbar zu machen (M1 bis M4). Diese Technik ließ sich außerdem gut mit dem Einsatz von spezifischen Inhibitoren zur Identifizierung von Proteinaseklassen kombinieren (M2 und M3). Die damit erzielten Ergebnisse sind in M3, S. 1427/28 und Fig. 4, zusammengefasst.

Proteolytisch aktive Banden wurden in einem Molekularmassenbereich von größer als 60 kDa und zwischen 30 und 60 kDa gefunden. Die „hochmolekularen“ Banden waren bei basischem pH-Wert deutlich stärker ausgeprägt als bei sauren Inkubationsbedingungen. Im Gegensatz zu den Embryoachsen traten sie bei Kotyledonen nur schwach auf und fehlten in Extrakten isolierter PB (M1, Fig. 5; M4, Fig. 5A). E-64, ein spezifischer Inhibitor für papain-artige CPR (M3, Fig. 4C und G), führte zu keiner auffälligen Hemmung dieser Banden.

Dagegen waren die Banden mit Molekularmassen zwischen 30 und 60 kDa bei saurem, nicht aber bei basischem pH-Wert erkennbar (M3, Fig. 4A, B, D, E). Einige davon waren bereits in reifenden und reifen Samen vorhanden und traten vor allem in Embryoachsen während der Keimung unvermindert auf. Die Intensität und Zahl dieser Banden erhöhte sich in den Embryoachsen zu Beginn des Keimlingswachstums. Vergleichbare Proteinasebanden waren in Extrakten von Kotyledonen aus der Reifungs- und Keimungsphase nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt. Neben den quantitativen Unterschieden ließen sich auch Unterschiede im Muster zwischen den beiden Samenorganen erkennen. Erst nach Beginn des Keimlingswachstums, gegen Ende des 2. dai, nahmen die proteolytisch aktiven Banden der Kotyledonenextrakte in diesem Molekularmassenbereich in Stärke und Anzahl zu, d.h. später als in Embryoachsen. Differentielle Inhibitoranalysen erlaubten, die proteinase-aktiven Banden dieses Molekularmassenbereiches den CPR zuzuordnen. Dabei gab es Hinweise darauf, dass darunter sowohl papain- als auch legumain-artige CPR sein mussten.

3.1.5 mRNA- und Immunoblot-Analyse von CPR während der Keimung und der ersten Tage der Keimlingsentwicklung

Aus den unter 3.1.4 dargestellten Resultaten wurde gefolgert, dass vor allem CPR für den Proteinabbau in den PB verantwortlich sind. Deshalb konzentrierten sich die weitere Analysen der Proteinase auf diese Enzymgruppe, für die ein umfangreiches Instrumentarium an CPR-spezifischen Sonden und Antikörpern zur Verfügung stand (s.a. Einleitung). Hierbei handelt es sich um cDNA- und Immunproben von vier papain-artigen (CPR1, CPR2, Proteinase A und CPR4) sowie zwei legumain-artigen CPR (VsPB2 und Proteinase B), deren Sequenzverwandtschaft in M2, Fig. 9 dargestellt ist. Weiterführende Beschreibungen sind in M2 sowie in den Publikationen von BECKER *et al.* 1994 (CPR1 und CPR2), 1995 (Proteinase B) und 1997 (Proteinase A) zu finden.

mRNA- und Immunoblots lassen erkennen (M3, S. 1428/29 und Fig. 5), dass mRNA und Protein der 3 vorwiegend untersuchten papain-artigen Endopeptidasen, CPR1, CPR2 und CPR4, sowie die beiden legumain-artigen CPR, VsPB2 und Proteinase B, sowohl in Embryoachsen als auch Kotyledonen vorkommen. Dabei gleichen sich die entwicklungsabhängigen Muster bei den meisten CPR in beiden Organen. Ausnahmen bilden CPR1-mRNA und -Polypeptid, sowie das CPR2-Polypeptid (M3, Fig. 5). Im Allgemeinen lassen sich die Polypeptide bei neu auftauchenden CPR etwa einen Tag später nachweisen als ihre mRNA.

Embryoachsen: Darin lassen sich bei Keimungsbeginn zwei Gruppen von CPR unterscheiden: a) Solche, deren mRNA und Polypeptide bereits in trockenen reifen Samen vorkommen, wie CPR2, CPR4 und VsPB2. Ihre mRNA ist auch bereits in reifenden Samen nachzuweisen. b) Solche, deren mRNA und Polypeptide erst während (CPR1) oder nach dem Ende (Proteinase B) der Keimung erscheinen. In Übereinstimmung mit den entwicklungsabhängigen mRNA-Mustern (s. auch M1, Fig. 4 sowie M6, Fig. 1) ist das Proteinase B Polypeptid erst 2 dai schwach erkennbar und verstärkt sich danach. Dagegen beginnt gleichzeitig der Polypeptidabbau von CPR1, CPR4 und VsPB2 2 dai, wobei geringfügige Unterschiede zwischen den CPR erkennbar sind. Auch das CPR2-Polypeptid nimmt 2 dai stark ab, obwohl das CPR2-spezifische mRNA Signal deutlich zunimmt.

Kotyledonen: Wie in den Embryoachsen kommen in Kotyledonen von reifen trockenen Samen CPR2, CPR4 sowie VsPB2 und ihre mRNA vor, während CPR1 und Proteinase B fehlen. Erwartungsgemäß lassen sich CPR2-, CPR4- und VsPB2-mRNA auch bereits in Kotyledonen reifender Samen nachweisen. Auch im Verschwinden von CPR4 und VsPB2 nach dem Ende der Keimung, sowie im zeitlichen Muster des Auftauchens von CPR1 und Proteinase B gleichen sich die Verhältnisse in beiden Organen, wenn auch dieser Prozess in den Kotyledonen gegenüber den Embryoachsen um mindestens einen Tag verzögert zu sein

scheint. Bei CPR1 und CPR2 Polypeptiden treten in den entwicklungsabhängigen Mustern zwischen Kotyledonen und Embryoachsen Unterschiede auf. Beide verschwinden in den Embryoachsen 2 dai, während sie in den Kotyledonen zunehmen. Im Gegensatz zu den Achsen sind jedoch in den Kotyledonen die Muster von CPR2-mRNA und -Polypeptid identisch.

3.1.6 Globulinabbau bei gehemmter cytoplasmatischer Proteinbiosynthese

Aus den unter 3.1.5 geschilderten Ergebnissen ließ sich ableiten, dass sowohl Embryoachsen als auch Kotyledonen trockener reifer Samen über Polypeptide und entsprechende mRNA der folgenden 3 CPR verfügen: CPR2, CPR4, und VsPB2. Wenn damit bereits ein Proteinabbau in den PB vor Beginn der Neusynthese von Proteinasen stattfinden kann, dann sollte dieser Abbau trotz Hemmung der cytoplasmatischen Translation möglich sein.

Daher wurden *Vicia sativa*-Samen vergleichend in An- und Abwesenheit des Translationsinhibitors Cycloheximid gekeimt. Globulinabbau sowie Neusynthese von CPR1 und CPR2 in Embryoachsen wurden eingehender analysiert (M4, S. 720 und Fig. 2). Während das Ausbleiben der Neubildung von CPR1 in Gegenwart von Cycloheximid die Hemmung der Proteinbiosynthese belegte, war CPR2 unabhängig von der Präsenz des Inhibitors bei Keimungsbeginn vorhanden und der Globulinabbau fand statt. Allerdings fand infolge der Translationshemmung keine Neubildung von CPR2 statt. Die CPR2 Polypeptide wurden, vergleichbar den Globulinen, im Verlauf der Keimung ebenfalls abgebaut.

3.1.7 Globulinabbau in Lysaten von Protein bodies aus trockenen Samen

Durch Zellfraktionierung wurden PB sowohl aus Embryoachsen als auch aus Kotyledonen trockener reifer Samen gewonnen. Die Reinheit der Fraktion wurde anhand zweier Kriterien überprüft: a) Der Beschränkung des Vorkommens von PB-Markern, wie α -Mannosidase und Vicilin auf die PB-Fraktion, und b) des Fehlens von Verunreinigungen durch andere Zellfraktionen. Nach diesen Kriterien wurde eine hochreine PB-Fraktion gewonnen (M4, S. 721 und Fig. 3).

Der Beginn des Globulinabbaus durch Proteinasen, die bereits in trockenen Samen gespeichert vorliegen, müsste auch dann erfolgen, wenn Lysate von Protein bodies, die aus trockenen Samen isoliert wurden, unter entsprechenden Bedingungen inkubiert werden. In M4 (S. 721 und Fig. 4A) ist gezeigt, dass dies tatsächlich geschieht, aber nur bei einem sauren pH-Wert, wie er für die Aktivität solcher CPR erforderlich ist, die in trockenen Samen nach-

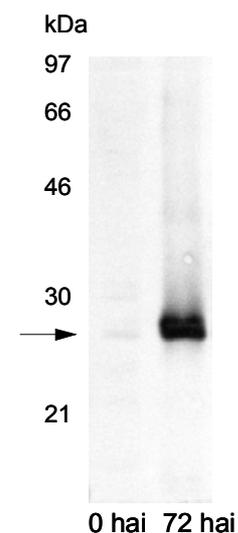
gewiesen worden waren (z. B. CPR2, s. M2). Dieser Abbau lässt sich durch CPR-spezifische Proteinaseinhibitoren unterbinden (M4, S. 721/23 und Fig. 4B). In PB-Lysaten aus Embryoachsen ist der Abbau rascher und deutlicher erkennbar als in solchen aus Kotyledonen.

3.1.8 Proteinase in Protein bodies aus trockenen Samen

Das Vorkommen bestimmter Proteinase in PB, die aus den verschiedenen Organen (Embryoachse, Kotyledonen) trockener reifer Samen isoliert worden waren, wurde mit zwei unterschiedlichen methodischen Ansätzen analysiert. a) Die Proteinaseaktivität der Albumin- und Globulinfraktionen aus den PB ungekeimter Achsen wurde über Elektrophorese in gelatinehaltigen Gelen in Kombination mit der Anwendung von CPR-spezifischen Inhibitoren nachgewiesen. Zugleich wurde eine Immunoblotanalyse der verschiedenen Fraktionen durchgeführt (M4, S. 721/23 und Fig. 5). b) Die Albuminfraktion der PB beider Organe wurde bei saurem pH-Wert mit verschiedenen Oligopeptidsubstraten inkubiert. Nachfolgend wurden die Spaltprodukte zweier spezieller Oligopeptide sequenziert (M4, S. 721/23 und Fig. 6 und 7). Über beide Ansätze konnten sowohl papain- als auch legumain-artige CPR in den PB ungekeimter Samen nachgewiesen werden. Die Immunoblotanalyse ergab CPR2 und VsPB2 in der Albumin- und CPR4 in der Globulinfraktion.

In Ergänzung zu den publizierten Daten zeigten Immunoblotanalysen (Abb. 8), dass auch sehr geringe Mengen von CPR1 bereits in PB trockener Embryoachsen enthalten sind.

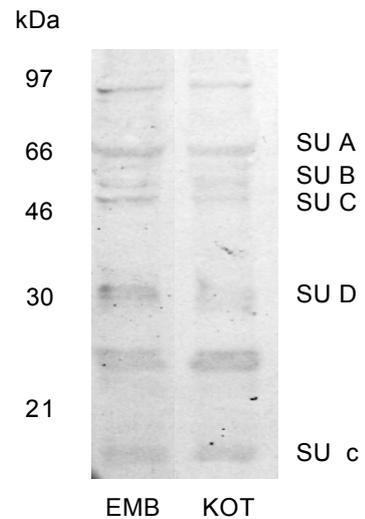
Abb. 8 Immunologischer Nachweis von CPR1-Polypeptiden in PB-Extrakten von Embryoachsen (hai =hours after imbibition)



3.2 Vorkommen von Protonenpumpen in Protein body-Membranen

Das saure pH-Optimum der analysierten CPR erfordert die Aufrechterhaltung dieses Milieus in den PB, wofür V-ATPasen und V-Pyrophosphatasen verantwortlich gemacht werden (FORGAC 1999, BETHKE *et al.* 1998, LÜTTGE und RATAJCZAK 1997). Wie Abb. 9 zeigt, ließ sich die V-ATPase mittels heterologer Immunproben auch in den isolierten PB trockener und gekeimter Embryoachsen nachweisen. Daher kann angenommen werden, dass diese auch zu Beginn der Keimung ein, die Proteinase begünstigendes Milieu aufrechterhalten können.

Abb. 9 Immunologischer Nachweis der V-ATPase in PB-Extrakten ungekeimter Embryoachsen und Kotyledonen (SU = Untereinheit, EMB = Embryoachsen, Kot = Kotyledonen)



3.3 Arbeitsanteil an den verschiedenen Manuskripten

- M1 Protein degradation and nitrogen supply during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 152: 683 – 691 (1998)
- Anzucht des Pflanzenmaterials
 - Extraktion und Konzentrationsbestimmung der Proteine
 - Isolation von PB
 - Gelatine SDS-PAGE zum Nachweis proteolytischer Aktivität
 - Western Blot Analysen
- M2 The families of papain- and legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental patterns, intracellular localization and functions in globulin proteolysis. *Plant Mol. Biol.* 43: 83 -101 (2000)
- Anzucht des Pflanzenmaterials
 - Northern Blot Analyse
- M3 Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 51: 1423 - 1433 (2000)
- Planung und Durchführung der experimentellen Arbeiten, mit Ausnahme des Nachweises der unterschiedlichen Aminosäuren aus den Gesamtaminosäureextrakten (Dr. C. Horstmann).
 - Im Hinblick auf den immunologischen Nachweis der Proteinase B wurde ein durch Aminosäureaustausch mutierter Anti Proteinase B Antikörper erzeugt.
- M4 Stored cysteine proteinases start globulin mobilization in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (*Vicia sativa* L.) seed germination. *Planta* 212: 718 – 727 (2001)
- Planung und Durchführung der experimentellen Arbeiten.
 - Die elektronenmikroskopischen Aufarbeitung isolierter PB geschah durch Frau Panitz.
 - Die Massenbestimmung und Sequenzierung unterschiedlicher Peptidfragmente nach einem proteolytischen Verdau wurde von Frau Standhardt durchgeführt.
- M5 Differential tissue-specific expression of cysteine proteinases forms the basis for the fine-tuned mobilization of storage globulin during and after germination in legume seeds. *Planta* 212: 728 – 738 (2001)
- Amplifikation, Isolation und Reinigung der zur Umschreibung in Proteinase spezifische antisense cRNA notwendigen cDNA Fragmente für die *in situ* Hybridisierung.
- M6 Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J. Exp. Bot.* 52: 1741 – 1752 (2001)
- Sammelreferat in welches alle Ergebnisse eingeflossen sind.

4 DIE DER DISSERTATION ZUGRUNDELIEGENDEN VERÖFFENTLICHTEN ORIGINALARBEITEN ¹⁾

- 4.1 Protein degradation and nitrogen supply during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.).

MÜNTZ K., BECKER C., PANCKE J., SCHLERETH A., FISCHER J., HORSTMANN C., KIRKIN V., NEUBOHN B., SENYUK V., SHUTOV A.

Journal of Plant Physiology 152: 683 – 691 (1998)

- 4.2 The families of papain- and legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental patterns, intracellular localization and functions in globulin proteolysis.

FISCHER J., BECKER C., HILLMER S., HORSTMANN C., NEUBOHN B., SCHLERETH A., SENYUK V., SHUTOV A., MÜNTZ K.

Plant Molecular Biology 43: 83 -101 (2000)

- 4.3 Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.).

SCHLERETH A., BECKER C., HORSTMAN C., TIEDEMANN J., MÜNTZ K.

Journal of Experimental Botany 51: 1423 - 1433 (2000)

- 4.4 Stored cysteine proteinases start globulin mobilization in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (*Vicia sativa* L.) seed germination.

SCHLERETH A., STANDTHARDT D., MOCK H.P., MÜNTZ K.

Planta 212: 718 – 727 (2001)

- 4.5 Differential tissue-specific expression of cysteine proteinases forms the basis for the fine-tuned mobilization of storage globulin during and after germination in legume seeds.

TIEDEMANN J., SCHLERETH A., MÜNTZ K.

Planta 212: 228 – 238 (2001)

4.6 Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth.

MÜNTZ K., BELOZERSKY M.A., DUNAEVSKY Y.E., SCHLERETH A., TIEDEMANN J.

Journal of Experimental Botany 52: 1741 – 1752 (2001)

¹⁾ Aus urheberrechtlichen Gründen sind die der Dissertation zugrundeliegenden Manuskripte in der veröffentlichten Dissertationsschrift nicht enthalten.

5 DISKUSSION

Die eingebundenen Originalpublikationen M2 bis M5 verfügen jeweils über eingehende Diskussionen der darin dargestellten und der im Ergebnisteil zusammengefassten Resultate. Darüber hinaus sind diese Ergebnisse auf unterschiedlichen Entwicklungsstadien der experimentellen Arbeiten in den Übersichtspublikationen M1 und M6 ausführlich diskutiert worden. Ebenso sind die meisten Bezüge zu anderen Publikationen und die Verallgemeinerungen von den Ergebnissen am speziellen Objekt auf andere Pflanzen in den Diskussionen dieser Publikationen vorhanden. Deshalb sollen nachfolgend nur die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unter Berücksichtigung der Resultate aus der Dissertation von TIEDEMANN (Halle, 2000) zusammenfassend diskutiert werden. Diese liefert auf der Grundlage von immunhisto- und cytochemischen sowie *in situ*-Hybridisierungsstudien das komplementäre Bild über den raum-zeitlichen Verlauf von Globulinmobilisierung und CPR in den verschiedenen Geweben von Embryoachsen und Kotyledonen von *V. sativa*-Samen während der Keimung und des nachfolgenden Keimlingswachstums.

5.1 Cysteinendopeptidasen und ihre Funktionen beim Start und weiteren Verlauf der Proteinmobilisierung in Embryoachsen und Kotyledonen

Alle Ergebnisse aus der Analyse von Proteinextrakten ganzer Organe oder isolierter PB von Embryoachsen und Kotyledonen weisen darauf hin, dass CPR die Hauptfunktion bei der Globulinmobilisierung in Samen *Vicia sativa* L. haben. Dies stimmt mit vorangegangenen Untersuchungen am selben Objekt (SHUTOV und VAINTRAUB 1987), sowie anderen Objekten unter Mono- und Dikotyledonen überein (Übersichten: WILSON 1986, SHUTOV und VAINTRAUB 1987, MÜNTZ 1996), bei denen vor allem CPR für den Abbau der Hauptmasse der Speicherproteine in den Kotyledonen während des Keimlingswachstums verantwortlich gemacht worden sind. In einigen Pflanzen konnte eine Beteiligung von Vertretern anderer Proteinaseklassen nachgewiesen werden: z. B. Metalloproteinasen bei Buchweizen und Soja (BELOZERSKY *et al.* 1990, ELPIDINA *et al.* 1990, 1991, QI *et al.* 1992), Serinproteinasen bei Soja und Mungbohne (WILSON *et al.* 1996, OKAMOTO und MINAMIKAWA 1998) und Aspartat-Proteinase bei Gerste (TÖRMÄKANGAS *et al.* 1994, MARTTILA *et al.* 1995). Außerdem wird immer deutlicher, dass mehrere Vertreter einer Proteinaseklasse oder aus unterschiedlichen Proteinaseklassen mit entwicklungsabhängig wechselnden Funktionen zur Proteinmobilisierung beitragen. Bislang wurden jedoch meist nur einzelne Proteinasen in ihrer Beziehung zum Reserveproteinabbau analysiert. Deshalb konnte ihre Funktion im Verbund der beteiligten Proteinasen nicht richtig beurteilt werden (s.a. Einleitung).

Wie in der Einleitung dargestellt, wurden die Verhältnisse in der Embryoachse bisher nur unzureichend bis gar nicht untersucht. Ferner gab es für den Zeitabschnitt der Keimung keine eindeutigen Resultate hinsichtlich der Funktion und des funktionalen Zusammenhangs von Proteinase beim Abbau der Speicherproteine für die Kotyledonen. Experimente über die Rolle von Endopeptidasen, die in den PB trockener Samen immer wieder nachgewiesen werden konnten, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen.

Alle methodischen Ansätze, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, schließen nicht restlos aus, dass noch weitere Vertreter der Klasse der CPR oder auch anderer Klassen von Endopeptidasen bei der Mobilisierung von Reserveproteinen in Samen von *V. sativa* L. einen Betrag leisten. Hierbei ist auch zu erwähnen, dass über die Elektrophorese in gelatinehaltigen Polyacrylamidgelen nur solche Endopeptidasen nachzuweisen sind, die Gelatine abbauen können. Während E64 papain-artige CPR spezifisch hemmt, ist dieser Inhibitor gegenüber legumain-artigen CPR weitgehend inaktiv. Der für legumain-artige CPR eingesetzte Inhibitor, Jodessigsäure, hingegen kann auch SH-Gruppen von Vertretern anderer Proteinaseklassen beeinträchtigen, weshalb indirekte Effekte auf deren Aktivität nicht völlig ausgeschlossen werden können. Es kann ebenfalls angenommen werden, dass trotz der vergleichsweise großen Anzahl von Sonden für verschiedene CPR, weitere CPR vorhanden sind, die nicht erfasst wurden. Trotz dieser Einschränkungen in der Aussagefähigkeit der verschiedenen Methoden belegen die erzielten Ergebnisse folgende wichtige Funktionen von CPR bei der Mobilisierung von Proteinreserven in PB während der Keimung und des nachfolgenden Keimlingswachstums von *Vicia sativa* L..

- a) Die PB von Embryoachsen und Kotyledonen trockener reifer Samen enthalten VsPB2 als legumain-artige und CPR2 sowie CPR4 als papain-artige CPR, sowie geringe Mengen von CPR1.
- b) Der Abbau von Reserveglobulinen in den PB trockener Embryoachsen und Kotyledonen kann mit gespeicherten Endopeptidasen und ohne Neusynthese von Proteinase beginnen. Dies ist mit verschiedenen Methoden gezeigt worden, wie z.B. über die Hemmung der cytoplasmatischen Translation während der Keimung und ersten Tage der Keimlingsentwicklung. Diese Methode lässt den in M4 diskutierten Einwand zu, dass Nebeneffekte der Translationshemmung die Kompartimentierung beeinträchtigen könnten. Deshalb ist als Sekundäreffekt ein Zutritt von Proteinase aus dem Cytoplasma in die PB nicht völlig auszuschließen. Jedoch kann angenommen werden, dass dieser Effekt vor allem zu Beginn der Keimung aufgrund der Intaktheit des Samengewebes keinen Einfluss auf die Mobilisierung hat. Zudem beweisen die Versuche mit PB-Lysaten und der Nachweis aktiver papain- und legumain-artigen CPR in PB trockener Samen den Beginn des Globulinabbaus mit gespeicherten Proteinase.

- c) Da sich dieser Abbau mit CPR-spezifischen Inhibitoren unterbinden lässt, müssen CPR für diesen Beginn des Reserveproteinabbaus in PB verantwortlich sein.
- d) Demzufolge sind CPR1, CPR2, VsPB2 und vermutlich CPR4 als die CPR anzusehen, die als gespeicherte Endopeptidasen den Reserveproteinabbau in PB einleiten, auch wenn die Beteiligung anderer Proteinase nicht völlig ausgeschlossen werden kann.
- e) Das Mengenverhältnis von gespeicherten CPR zu anderen Proteinen, vor allem den Globulinen, ist in den PB-Extrakten der Embryoachsen eindeutig größer als in Kotyledonen. Dies lässt sich aus der größeren Bandenstärke von gleichen CPR auf Immunoblots von Achsenextrakten im Vergleich zu Kotyledonenextrakten schließen, wenn gleiche Proteinmengen zur Elektrophorese eingesetzt wurden. Damit erklärt sich, warum in Kotyledonen während der Keimung kaum ein Abbau von Globulinbanden auf den Elektrophoresegelel erkennbar ist, ehe nicht nach Ende der Keimung neugebildete Proteinase hinzukommen. Dagegen verschwinden die Globulinbanden von Embryoachsenextrakten schon weitgehend während der Keimung. Dazu müssen während der ersten 12 h der Keimung vor allem gespeicherte CPR beitragen, deren Aktivität in den anschließenden 12 h durch neugebildete CPR verstärkt und ergänzt wird. Die Bedeutung gespeicherter CPR muss somit für die anfängliche Mobilisierung der Speicher-globuline in den Embryoachsen weitaus größer sein als in den Kotyledonen, um eine ausreichende Versorgung der Embryoachse zu Beginn der Keimung sicherzustellen.
- f) Die Rolle der CPR1 und CPR2 für die anfängliche Globulinmobilisierung wird durch die immunhistochemischen und *in situ*-Hybridisierungsanalysen in der Dissertation von TIEDEMANN (2000, und M5) unterstrichen. Diese CPR treten zuerst und in Übereinstimmung mit dem Histomuster ihrer mRNA in den Embryoachsen während der Keimung auf und erst später, nach Ende der Keimung in den Kotyledonen.
- g) Ein Vergleich von Resultaten aus den immunhisto- und biochemischen Analysen führt zugleich zur Klärung von Diskrepanzen die in den Ergebnissen beider Untersuchungen bei oberflächlicher Betrachtung vorzuliegen scheinen. Während die biochemische Untersuchung trockener Samen keine Schwierigkeit bot, erlaubten sie aus technischen Gründen keine immunhistochemische Analyse (TIEDEMANN 2000). Diese war erst während der Keimung 3 h möglich. Zu diesem Zeitpunkt gibt es lokal in der Wurzelspitze ein kräftiges Signal für CPR1, während in anderen Achsengewebe noch keine CPR1 nachweisbar ist. Dagegen ist das CPR2-Signal schwach aber nahezu im gesamten Achsengewebe ausgeprägt. Die biochemische Analyse von Achsenextrakten gibt ein Durchschnittsbild über alle Gewebe, weshalb anfangs während der Keimung CPR1 nicht oder nur sehr schwach durch Immunoblot nachweisbar ist, dagegen CPR2 schon ein deutliches Signal gibt. VsPB2 konnte in Achsen- und Kotyledonengewebe während der

Keimung immunhistochemisch nicht gefunden werden, obwohl sie biochemisch in den Extrakten nachzuweisen ist. VsPB2 muss als Prolegumin-prozessierende legumain-artige CPR seit der Samenreifung in den meisten PB enthalten sein. Ihre Konzentration dürfte jedoch unter der immunhistochemischen Nachweisgrenze liegen, hingegen für einen immunologischen Nachweis in Extrakten ausreichend sein.

- h) Sowohl biochemische als auch immunhistochemische Analysen machten deutlich, dass die Proteinasepolypeptide stets etwa 24 h später als die zugehörigen mRNA nachweisbar sind. Dies kann als Hinweis angesehen werden, dass zeitlicher Verlauf und räumliches Muster der Proteinase über die Verfügbarkeit entsprechender mRNA für die Translation kontrolliert werden. Da jedoch sowohl mRNA als auch Polypeptide einem turnover unterliegen, kann ein Beitrag des jeweiligen Abbaus zur Kontrolle der Proteinaseverfügbarkeit nicht ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass bei gehemmter cytoplasmatischer Translation CPR2 verschwindet, macht nicht nur den Beitrag der Neusynthese von Proteinase für das Andauern und die Verstärkung der Proteinmobilisierung deutlich, sondern zeigt auch, dass die Proteinase einem Abbau unterliegen.
- i) Das Vorhandensein von gespeicherter CPR2-, CPR4- und VsPB2-mRNA neben den entsprechenden Enzymolypeptiden in trockenen reifen Samen und zumindest während der frühen Keimung dürfte nach hinreichender Quellung der Gewebe die Translation und Neubildung dieser Enzyme zu Folge haben.

5.2 Beziehungen zwischen CPR und Globulinmobilisierung

Gemessen an den drei Kriterien, die in der Einleitung für die Beteiligung einer Proteinase an der Proteinmobilisierung genannt wurden (s. S. 15), müssen CPR1, CPR2, VsPB2 und vermutlich CPR4 in Embryoachsen und Kotyledonen am Globulinabbau beteiligt sein. Das lässt sich nicht gleichermaßen für Proteinase A und B in diesen beiden Organen erkennen. Proteinase B erscheint in der Achse erst, wenn der Globulinabbau nahezu beendet ist. In den Kotyledonen tritt sie ebenfalls nach 2 dai auf. Zu diesem Zeitpunkt beginnt dort erst eine massive Mobilisierung der Globuline, wozu sie beitragen dürfte. Proteinase A und ihre mRNA konnten in Embryoachsen nie nachgewiesen werden. In den Kotyledonen tritt ihre mRNA etwa parallel zur mRNA von Proteinase B nach 2 dai auf (BECKER *et al.* 1995, 1997). Während das reife Polypeptid von Proteinase B nur mit kurzer zeitlicher Verzögerung zur mRNA erscheint, dauert dies bei Proteinase A etwa 3 Tage. Zu diesem Zeitpunkt ist die massenhafte Globulinmobilisierung in den Kotyledonen bereits stark fortgeschritten (BECKER *et al.* 1997). Daher hat Proteinase A keine Funktion zu Beginn des Globulinabbaus in den Kotyledonen wie ursprünglich angenommen (SHUTOV und VAINTRAUB 1987). Ferner gelang der erforderliche

Nachweis für das Vorkommen von Proteinase A in PB bisher nicht (BECKER *et al.* 1997), weshalb ihre Rolle bei der Globulinmobilisierung ungeklärt bleibt.

Die immunhistochemischen Analysen von TIEDEMANN *et al.* (2000, und M5) ließen erkennen, dass die CPR-Signale in den Embryoachsen während der Keimung zuerst immer dort auftreten, wo der Abbau von Globulinen lokal begrenzt beginnt. In diesen Gewebeabschnitten ist vor allem Vicilin als Speicherglobulin vorherrschend. Zudem beginnt das Wachstum vorwiegend in diesen Gewebebereichen. Dies trifft vor allem auf die Wurzelspitze, die Prokambiumstränge und die Epidermiszellen zu. Das Vicilin-zu-Legumin-Verhältnis ist in der Embryoachse, wo die Proteinmobilisierung beginnt, auch deutlich größer als in den Kotyledonen, in denen eine Mobilisierung der Speicherproteine erst nach der Keimung sichtbar wird. Aber auch in den Kotyledonen lässt sich Vicilin vorwiegend dort nachweisen, wo der Proteinabbau anfängt, in der Epidermis und den Prokambiumsträngen. Die in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Ergebnisse biochemischer Analysen stimmen mit der Schlussfolgerung aus den immunhistochemischen Untersuchungen überein, wonach Vicilin eine Aminosäurereserve ist, die stets dort gespeichert vorkommt, wo der Proteinabbau zusammen mit Wachstum (Wurzelspitze, Epidermis) und Differenzierung (Leitbündel) während der Keimung und am Anfang des Keimlingswachstums beginnt.

Während die biochemischen Untersuchungen zwar den Nachweis dafür erbrachten, dass gespeicherte CPR in den PB die Mobilisierung der Globuline einleiten, noch ehe eine Neusynthese von Proteinasen begonnen hat, haben die immunhistochemischen Analysen (TIEDEMANN 2000; TIEDEMANN *et al.* 2001, M5) den Zusammenhang zwischen den raumzeitlichen Mustern des Auftretens von CPR und dem Globulinabbau deutlich gemacht. In Embryoachsen und Kotyledonen fallen Histomuster von CPR1 und CPR2, die sich in spezifischer Weise entwicklungsabhängig durch die Gewebe fortpflanzen, mit den Mustern des Globulinabbaus zusammen. In den Kotyledonen trifft das zusätzlich auch auf Proteinase B zu. Diese Koinzidenz kann als Beweis dafür angesehen werden, dass wenigstens die drei genannten CPR für den Globulinabbau verantwortlich sind. In der vorliegenden Dissertation wird zudem gezeigt, dass Zahl und Art der beteiligten CPR sich in Embryoachsen und Kotyledonen vor allem nach dem Ende der Keimung ändern. Die sich verstärkende Globulinmobilisierung in den Kotyledonen während des Keimlingswachstums ist offensichtlich vor allem auf eine Zunahme der Polypeptidkonzentration von CPR1, CPR2 und Proteinase B zurückzuführen, welche durch die Aktivität der Proteinase A ergänzt wird.

Besonders auffällig ist, dass sowohl in den Embryoachsen als auch in den Kotyledonen stets gleichzeitig papain- und legumain-artige CPR zu finden sind, was mit der von SHUTOV und VAINTRAUB (1987) vorgeschlagenen Hypothese über das Zusammenwirken von Vertretern dieser beiden CPR-Familien beim Globulinabbau in Einklang steht (s.a. Einleitung Abschnitt

1.4.2). Demnach bewirkt zuerst eine papain-artige CPR durch ortsspezifische limitierte Proteolyse eine Konformationsmodifikation an den Globulinholoproteinen. Dadurch kann nachfolgend die legumain-artige CPR am endo-proteolytischen Abbau der Globuline mitwirken. Ursprünglich war diese Funktion der „triggernden“ papain-artigen CPR der Proteinase A zugewiesen worden, während Proteinase B als legumain-artige CPR mitwirken sollte. Das zeitliche Muster im Vorkommen von Proteinase A schließt jedoch aus, dass sie den Globulinabbau einleitet. Dafür kommen in Embryoachsen und Kotyledonen die inzwischen nachgewiesenen papain-artigen CPR1, CPR2 sowie eventuell CPR4 in Betracht. Daneben ist während der Keimung die legumain-artige VsPB2 in beiden Organen vorhanden, welche nach Ende der Keimung durch Proteinase B ersetzt wird. Für Viciline konnte gezeigt werden (SENYUK *et al.* 1998, FISCHER *et al.* 2000; M2), dass sie *in vitro* auch direkt von Legumainen abgebaut werden können. Allerdings bleibt offen, ob das dafür erforderliche relativ hohe Enzym-zu-Substrat-Verhältnis *in vivo* überhaupt vorliegt. Wenigstens für die Keimungszeit mit einem relativ geringen Enzym-zu-Substrat-Verhältnis in den Geweben von Embryoachse und Kotyledonen scheint dies eher unwahrscheinlich zu sein. Zumindest für die Legumine ist klar, dass reife hexamere Holoproteine mit intakter Struktur *in vitro* nicht von Legumainen proteolytisch angegriffen werden können (JUNG *et al.* 1998). Daher muss ihre Konformation während der Keimung zunächst derart verändert werden, dass Legumaine Zugriff bekommen. Legumin, das nach dem Ende der Keimung aus Kotyledonen isoliert wurde, wird z.B. *in vitro* von Proteinase B abgebaut (SHUTOV *et al.* 1982). Darüber hinaus kann angenommen werden, dass Legumaine auch während der Keimung und des Keimlingswachstums als Asn-spezifische vakuoläre Prozessierungsenzyme wirken. Jedenfalls gibt es Anhaltspunkte dafür, dass eine legumain-artige CPR in Keimlingen von Mungbohnen (*Vigna mungo* L.) an der Aktivierung der papain-artigen SH-EP durch eine stufenweise Propolypeptidprozessierung beteiligt ist (OKAMOTO und MINAMIKAWA 1999). Da SH-EP aus *V. mungo* L. zur Proteinase A aus *V. sativa* L. homolog ist, liegt zumindest in diesem Falle ein indirekter Bezug von legumain-artiger CPR zur Reserveproteinmobilisierung vor.

5.3 Funktioneller Bezug von CPR und Globulinmobilisierung zur Aminosäureversorgung von keimenden Samen und Keimlingen

Die weitgehende Konstanz von Trockenmasse, Protein- und Aminosäuremengen pro Organ während der Keimung setzt voraus, dass entweder kein Im- und Export von Stoffen erfolgt, oder dass sich beide Prozesse in der Bilanz sowohl in Embryoachsen als auch in Kotyledonen ausgleichen. Trockenmasse- und Proteinzunahmen in den Embryoachsen und gleichzeitige Abnahmen in den Kotyledonen kennzeichnen die Periode nach dem Ende der Keimung, wenn

bekanntermaßen der Stofftransfer aus den Kotyledonen in die Achsen erfolgt. Gegen den Transfer größerer Stoffmengen aus den Kotyledonen in die Embryoachsen während der Keimung spricht das Fehlen funktionsfähiger Leitbündel. Wie von TIEDEMANN (2000, TIEDEMANN *et al.* 2000) gezeigt, differenzieren sich die Prokambiumstränge zu funktionsfähigen Leitbündeln in beiden Organen am Ende der Keimung und vor allem mit dem Beginn des nachfolgenden Keimlingswachstums. Damit fehlt während der Keimung die Voraussetzung für den massenhaften Stofftransfer aus den Kotyledonen in die Embryoachse. Ein Stoffaustausch durch Diffusion kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Der fehlende Stofftransfer zwischen Achse und Kotyledonen während der Keimung hingegen setzt voraus, dass die bereits laufenden Synthesen, z.B. die Proteinbiosynthese, mit Substraten aus endogenen Reserven der jeweiligen Organe versorgt werden.

Im Falle der Proteinbiosynthesen kann eine Versorgung aus gespeicherten freien proteino-genen Aminosäuren oder aus dem Abbau von Proteinreserven angenommen werden. Wenn in den Embryoachsen keimender Wicken die Reserveglobuline bereits während der Keimung weitgehend abgebaut werden, ohne dass ein erkennbarer Anstieg der Menge an freien Amino-verbindungen oder eine Abnahme der Trockenmasse zu verzeichnen sind, müssen die durch Abbau freigesetzten Aminosäuren direkt in Proteinbiosynthesen verbraucht werden. In der Bilanz findet damit eine Umsetzung der Aminosäuren aus Reserveglobulinen in andere Proteine statt. Eine Verwendung gespeicherter freier Aminosäuren für die beginnende Proteinbiosynthese während der frühen Phase der Keimung kann nicht ausgeschlossen werden. Jedoch beträgt die Menge freier Aminoverbindungen in reifen trockenen Samen von *V. sativa* L. nur etwa 1 % der Menge an proteingebundenen Aminosäuren. In den trockenen Kotyledonen sind um ein Vielfaches größere Mengen an Globulinen gespeichert als in den Embryoachsen. Obwohl auch in den Kotyledonen ein Globulinabbau während der Keimung erfolgt, ist dieser anteilig offensichtlich so gering, dass er mit den verwendeten elektro-phoretischen Methoden nicht erfassbar war. Erst nach massiver Verstärkung des Abbaus während des Keimlingswachstums lässt er sich am verändernden elektrophoretischen Bandenmuster erkennen.

Mit einer Selbstversorgung der Embryoachse durch Aminosäuren aus dem Abbau endogener Globulinreserven stimmen die von TIEDEMANN *et al.* (2000) analysierten histologischen Verhältnisse gut überein. Lokales Auftreten von CPR und Globulinabbau an denselben Stellen sichern die Aminosäureversorgung während der Keimung an Orten beginnenden Wachstums und anfangender Differenzierung. Deshalb sollte zu dieser Zeit kein Ferntransport von Amino-säuren erforderlich sein, zumal das Fehlen ausdifferenzierter Leitbündel diesen erst nach der Keimung ermöglichen. Die sich differenzierenden Prokambiumstränge gehören zu den Gewebsabschnitten, an denen zuerst ein lokal begrenzter Proteinabbau sichtbar wird. Erst mit Beginn des massiven Speicherglobulinabbaus in den Kotyledonen während des Keimlings-

wachstums wird ein Aminosäuretransport aus den Kotyledonen zugunsten der Embryoachse möglich und erkennbar. Dieser Zusammenhang spiegelt sich offenbar in den freien Aminoverbindungen wieder. Nach dem Ende der Keimung nimmt ihre Menge zunächst in den Kotyledonen stark zu, was als Ergebnis des einsetzenden massiven Globulinabbaus gedeutet wird. Einen Tag später erhöht sich die Menge der freien Aminoverbindungen auch in den Embryoachsen deutlich, worin sich der einsetzende Transfer freier Aminosäuren aus den Kotyledonen in die Achsen widerspiegelt. Dabei erhöht sich in den Achsen vor allem die Menge des Asparagins auffallend. Für Asparagin ist bekannt, dass es eine Hauptkomponente im Komplex stickstoffhaltiger Verbindungen für den Ferntransport in Körnerleguminosen der Familie der *Fabáceae* ist, zu der auch *V. sativa* L. gehört. Dies kann zugleich als Bestätigung für die Annahme des einsetzenden Aminosäure-Ferntransportes aus den Keimblättern in die Embryoachsen gewertet werden.

Zusammenfassend ergibt sich damit folgendes Bild:

- Proteinbiochemische Untersuchungen konnten zeigen, dass neben den Kotyledonen auch die Embryoachsen über eigene in PB gespeicherte Proteinreserven verfügen. Während die Kotyledonen nahezu ausgeglichene Mengen beider Speicherproteine aufweisen, ist dieses in der Embryoachse zugunsten von Vicilin verschoben.
- Sowohl in Embryoachsen als auch in Kotyledonen beginnt nach Erreichen eines hinreichenden Quellungszustandes bereits sehr früh während der Keimung ein Abbau von Reserveglobulinen. Er wird von CPR (z.B. CPR1, CPR2, CPR4 und VsPB2) katalysiert, die zuvor während der Samenreife synthetisiert wurden. Sie sind in den PB reifer trockener Samen gespeichert und werden bei Keimungsbeginn aktiv. Die mRNA dieser Proteinasen haben die Samenreife überdauert und wurden ebenfalls in den Samen gespeichert. Sie dürften die Grundlage für eine schnelle Synthese neuer Polypeptide dieser CPR bilden.
- Während der Keimung gibt es zwischen Embryoachse und Kotyledonen noch keine ausdifferenzierten, funktionsfähigen Leitbündelverbindungen. Die Prokambiumstränge gehören zu jenen Geweben, in denen ebenso wie in Radikula und Epidermis zuerst lokal begrenzt immunhistochemisch CPR und Proteinabbau nachzuweisen sind. Die Proteinbiosynthesen für Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Achse werden örtlich über die Aminosäuren aus dem Abbau endogener Proteinreserven gespeist, ohne dass bereits ein Ferntransport von Aminosäure existiert. In gleicher Weise werden während der

Keimungsphase die Proteinbiosynthesen in den Kotyledonen aus dem Abbau endogener Proteinreserven gespeist.

- In den Samen von den *Vicia sativa* L. wird vor allem dort während der Reifung bevorzugt Vicilin gespeichert, wo während der Keimung Wachstum und Differenzierung in Koinzidenz mit dem Proteinabbau beginnen.
- Die Hauptmasse der Proteinreserven der Samen ist in den Kotyledonen gespeichert. In diesen Organen beginnt der massive Abbau der Speicherglobuline erst nach dem Ende der Keimung, und der Differenzierung funktionaler Leitbündelverbindungen zwischen Kotyledonen und Embryoachsen. Zu diesem Zeitpunkt ist der Abbau endogener Globulinreserven der Embryoachse bereits weitgehend beendet, und die Versorgung der wachsenden Achse mit Aminosäurebausteinen wird von den Kotyledonen übernommen.
- Während des Globulinabbaus in der Achse wird vor allem die Menge jener CPR vermehrt, die bereits in reifen Samen gespeichert vorlagen. Das CPR-Spektrum wird aber auch durch die Bildung weiterer Mitglieder der Familie der papain-artigen CPR erweitert, z.B. CPR1. Mit Beendigung der Mobilisierung endogener Globuline in der Embryoachse nach dem Ende der Keimung werden dort ebenfalls die für die Mobilisierung verantwortlichen CPR abgebaut. Parallel dazu verschwinden auch einige der gespeicherten CPR in den Kotyledonen. Zugleich findet dort eine verstärkte Neusynthese anderer CPR (CPR1, CPR2) statt, die durch weitere legumain- (Proteinase B) und papain-artige CPR (Proteinase A) ergänzt werden. Dies geschieht zeitgleich mit der einsetzenden Deckung des wachsenden Aminosäurebedarfes der sich entwickelnden Embryoachse aus dem Globulinabbau in den Keimblättern. Die Umstellung von anfänglicher Proteinmobilisierung mittels gespeicherter CPR während der Keimung in den Kotyledonen auf den massiven Reserveproteinabbau mittels steigender Mengen neu gebildeter CPR nach der Keimung ist von einer teilweisen Umstellung im Spektrum der beteiligten CPR begleitet. Die jeweilige Menge der einzelnen CPR ergibt sich aus dem Gleichgewicht von Synthese und Abbau, deren Verhältnis sich entwicklungsabhängig verändert.

5.4 Ausblick: CPR-Bildung und -Aktivität kontrollieren das raum-zeitliche Muster der Reserveproteinmobilisierung

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Dissertation und dem daraus abgeleiteten Bild über den Start der Proteinmobilisierung durch gespeicherte CPR in den PB, über das Zusammenwirken von Embryoachse und Keimblättern sowie über die Rolle verschiedener Mitglieder der CPR-Familien ergeben sich Fragestellungen für weitergehende Forschungsansätze. Sie betreffen vor allem drei Problemgruppen:

1. Welche Mechanismen verhindern, dass die in den PB gespeicherten Proteine nicht vorzeitig während der Samenreifung von den gleichzeitig gebildeten und gespeicherten CPR abgebaut werden? Wie werden diese Mechanismen bei Keimungsbeginn ausgeschaltet, damit eine Proteinmobilisierung möglich wird?

Folgende Mechanismen lassen sich zur Beantwortung dieser Frage denken: a) Ablagerung von Reserveproteinen und CPR in unterschiedlichen vakuolären Kompartimenten während der Samenreifung und Fusion dieser Kompartimente bei Keimungsbeginn; b) Speicherung inaktiver CPR-Proenzyme zusammen mit den Proteinreserven und Aktivierung der Proenzyme durch limitierte proteolytische Prozessierung bei Keimungsbeginn; c) Inaktivierung der zusammen mit den Proteinreserven in den PB gespeicherten CPR durch deren Assoziation mit Inhibitoren und CPR-Aktivierung durch Inhibitor dissoziation bei Keimungsbeginn; d) Endprodukthemmung der CPR, die durch Abfließen oder Verbrauch der betreffenden Verbindungen bei Keimungsbeginn aufgehoben wird; e) Hemmung der CPR durch inadäquate Milieubedingungen während der Samenreifung und Aktivierung bei Keimungsbeginn durch Rekonstitution der für die Proteinmobilisierung erforderlichen Milieubedingungen.

Weder immunhisto- und cytochemischen Analysen (TIEDEMANN 2000, TIEDEMANN *et al.* 2000, 2001) noch die Versuche mit isolierten PB in der vorliegenden Dissertation geben Anlass dazu, eine Speicherung von CPR und Globulinen in unterschiedlichen Kompartimenten anzunehmen. Hinsichtlich der Versuche mit isolierten PB könnte eingewandt werden, dass eventuell eine Trennung der beiden verschiedenen vakuolären Kompartimente nicht gelungen oder sichtbar geworden sei. Jedoch belegen die elektronenoptischen Bilder mit Immunogold-Doppelmarkierung eine Colokalisierung von Vicilin und CPR in denselben PB (M2, Fig.8).

Alle proteinbiochemischen Analysen mit PB-Extrakten ließen keine Unterschiede in den Molekularmassen der CPR-Banden zu reifen Enzymen erkennen, wie dies beim Vorkommen von Proenzymen zu erwarten gewesen wären. Außerdem sind die CPR, die in PB trockener Samen nachgewiesen wurden; sofort aktiv, z. B. im PepTag-Assay (M4).

Die Inaktivierung einer gespeicherten Endopeptidase durch einen Polypeptidinhistor ist für Buchweizenkotyledonen beschrieben worden (M6, ELPIDINA *et al.* 1991). Mit den Cystatinen gibt es in Pflanzen (ABE *et al.* 1992, HILDMANN *et al.* 1992, FERNANDES *et al.* 1993, YAMADA *et al.* 2000), darunter auch in Pflanzensamen (KONDO *et al.* 1990, ABE *et al.* 1991), CPR-Inhibitoren. Sollten derartige Komplexe nicht sofort bei Extraktion der CPR dissoziieren, müssten im Immunoblot höhermolekulare Banden nachzuweisen sein, die mit den CPR-Antikörpern reagieren. Obwohl dafür keine Anhaltspunkte gefunden wurden, kann dieser Mechanismus nicht ausgeschlossen werden. Daher bietet dieser Mechanismus genug Ansatzpunkte für weitere biochemische Untersuchungen.

Weiterhin kann eine Endprodukthemmung der Peptidasen nicht ausgeschlossen werden. Für eine CPR aus Buchweizenkotyledonen konnte gezeigt werden, dass ihre Aktivität *in vitro* einer Endprodukthemmung durch Proteinabbauprodukte unterliegt, und dieser Mechanismus offensichtlich auch *in vivo* wirkt (DUNAEVSKY und BELOZERSKY 1989b). Die CPR aus trockenen reifen Wickensamen sind in dieser Hinsicht bisher nicht untersucht worden. Allerdings konnte weder eine auffällige Anreicherung von freien Aminoverbindungen in reifen Samen noch eine entsprechende Abnahme bei Keimungsbeginn beobachtet werden (M3). Jedoch wurden bei den bisherigen Betrachtungen die speziellen Verhältnisse in den PB aber außer Betracht gelassen, da diese unbekannt sind. Die Wirkung des Rückkopplungsmechanismus bei der Kontrolle des Wechsels in der CPR-Aktivität bei Keimungsbeginn kann also nicht ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Analysen.

Für PB von Zellen der Aleuronschicht in Gerstenkaryopsen ist die Beteiligung einer Ansäuerung an der Kontrolle über die steigende Proteinaseaktivität nach Keimungsende nachgewiesen worden (BETHKE *et al.* 1997,1998). Es besteht ebenfalls kein Zweifel daran, dass in den PB der *Vicia sativa*-Samen für den CPR-katalysierten Globulinabbau ein saurer pH-Wert erforderlich ist. Auch während der Samenreifung benötigen die legumain-artigen Prozessierungs-CPR ein derartiges saures pH-Milieu. Dennoch ist es eher unwahrscheinlich, dass zum Ende der Samenreifung eine pH-Verschiebung in den PB zu erheblich höheren Werten stattfindet, womit eine Inaktivierung der CPR verbunden ist, und bei Keimungsbeginn dann rasch eine gegenläufige pH-Verschiebung erfolgt. Der Nachweis entsprechender Protonenpumpen zeigt, dass die PB von Wickensamen über Voraussetzungen verfügen, das saure Milieu aufrecht zu erhalten (Abb.9). Dennoch sollte versucht werden, diesen Mechanismus mit cytochemischen Methoden zu untersuchen.

2. Wie werden die räumlichen und zeitlichen Muster der CPR in Embryoachsen und Kotyledonen qualitativ und quantitativ kontrolliert, und was reguliert die jeweilige Aktivität der vorhandenen CPR?

Zur Beantwortung der Frage ergibt sich aus der vorliegenden Dissertation, dass sowohl Proteinasebiosynthese als auch -abbau an der Kontrolle der unterschiedlichen CPR Konzentrationen auf verschiedenen Entwicklungsstadien und in unterschiedlichen Geweben beteiligt sind. Das Maß des Beitrages, den der CPR-Abbau zur Einstellung der jeweiligen CPR-Menge leistet, lässt sich bislang jedoch nicht abschätzen. Die besonders wichtige Rolle der differentiellen Genexpression, die zur Neubildung von CPR führt, wird an folgenden Beispielen deutlich: Neue CPR-Polypeptide (wie z.B. CPR1, Proteinase A und Proteinase B) lassen sich erst dann immunologisch nachweisen, wenn zuvor die entsprechende mRNA nachweisbar ist. Die Verzögerung im Sichtbarwerden der zugehörigen Polypeptide beruht darauf, dass im Ergebnis der mRNA-Translation erst eine genügende Menge des jeweiligen Polypeptids gebildet werden muss, um die immunologische Nachweisgrenze zu überschreiten. Außerdem wurde bei den immunohistochemischen und *in situ*-Hybridisierungsuntersuchungen von TIEDEMANN (2000, und M5) deutlich, dass die CPR nur in dem Gewebe nachgewiesen werden konnte, wo zuvor auch das Transkript der betreffenden mRNA nachzuweisen war. Die Mechanismen, mit denen die zeitlich und räumlich fein abgestimmte differentielle Expression der verschiedenen CPR-Gene kontrolliert wird, stellen sicherlich einen weiteren Untersuchungsschwerpunkt in der Zukunft dar. Ein besonders interessanter Fall liegt bei CPR2 vor, deren Genexpression in Kotyledonen sowohl während der Samenreifung als auch nach der Samenruhe während der Samenkeimung angeschaltet wird. Ein spezielles Interesse sollte auch die Kontrolle der CPR2 Genexpression in den Embryoachsen finden. Das Ausbleiben der immunologischen Nachweisbarkeit von CPR2-Polypeptid signalisiert dort das Ende der CPR2-mRNA-Translation zu einem Zeitpunkt nach Ende der Keimung, zu dem die eindeutige Zunahme der mRNA-Menge auf dem Northern-Blot erkennbar wird.

3. Wie wird die Mobilisierung von Proteinen in Embryoachse und Kotyledonen aufeinander abgestimmt und auf den Bedarf für das Wachstum der Achsenorgane ausgerichtet?

In der Literatur werden widersprüchliche Resultate von Versuchen zur Beantwortung von Frage 3 mitgeteilt (Zusammenfassung bei BEWLEY und BLACK 1994). Einerseits existieren Hinweise darauf, dass - wie bei den Getreiden - von der Embryoachse eine hormonelle Kontrolle über die Proteinasegenexpression in den Speichergeweben von Kotyledonen oder Endosperm ausgeübt wird. Andererseits meinen andere Autoren, Beweise für eine Kontrolle zu liefern, die über Katabolitgradienten funktioniert. Hormone wie Katabolite könnten die Expression von Proteinasegenen kontrollieren. Im Gegensatz zur hormonellen Regulation, gibt es bislang keine Belege für eine Beteiligung der Katabolite an der direkten Regulation der Genexpression. Vielmehr kann eine indirekt regulierende Funktion über eine Inhibition oder Stimulierung der Hormonsynthese angenommen werden. Zusätzlich können Katabolite aber

über Rückkopplungsmechanismen die Enzymaktivität in Kotyledonen regulieren, worauf bei Beantwortung der vorhergehenden Frage bereits eingegangen wurde. Offensichtlich werden die zeitlichen und räumlichen Muster der Expression derselben Gene in Embryoachsen und Kotyledonen unterschiedlich kontrolliert. Allerdings ist über die zugrunde liegenden Mechanismen bislang nur sehr wenig bekannt, und bedürfen einer Aufklärung.

Schließlich bedarf es noch genauer experimenteller Beweise für das postulierte Einsetzen des Ferntransportes von Kataboliten aus den Kotyledonen in die Embryoachse nach Ende der Keimung und die Herausbildung des entsprechenden Transportsystems. Hierbei sollte auch die Bildung und Beteiligung entsprechender Aminosäuretransporter berücksichtigt werden.

Das in der vorliegenden Dissertation benutzte experimentelle System und die damit erzielten neuen Erkenntnisse dürften einen erfolgversprechenden Ausgangspunkt für Forschungen zur Beantwortung der oben genannten Fragen bilden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

1. Während der Samenreifung akkumulieren Pflanzensamen in Gestalt von Speicherproteinen eine Aminosäurereserve für die heterotrophe Entwicklungsphase während der Keimung und des anfänglichen Keimlingswachstums. Die Speicherproteine werden in speziellen membranumhüllten Organellen, den Protein Bodies deponiert, die zum vakuolären Kompartiment gehören. In diesem extracytoplasmatischen Zellkompartiment unterliegen sie keinem Abbau während der Samenreifung. Erst mit der Keimung und dem frühen Keimlingswachstum wird der Schutz gegen vorzeitigen unkontrollierten Abbau überwunden und die Mobilisierung von Aminosäuren durch Abbau von Speicherproteinen kann beginnen.
2. Speicherproteinreiche Leguminosensamen sind bevorzugte Objekte zur Erforschung der Mechanismen bei der Mobilisierung der Proteinreserven. Sie enthalten zwei Hauptspeicherproteine: 7S Globuline (Viciline) und 11S Globuline (Legumine). Ihre Mobilisierung geschieht in den Speichergeweben der Kotyledonen nach dem Ende der Keimung, das mit dem Radikuladurchbruch durch die Samenschale definiert ist. Das gängige Bild der Mobilisierungsprozesse geht davon aus, dass die Proteinasen, welche den Speicherproteinabbau einleiten, während der Keimung neu gebildet und in die Protein Bodies transportiert werden. Dort katalysieren Endo- und Carboxypeptidasen den Abbau bis zu niederen Peptiden, die ins Cytoplasma transportiert und dort in ihre Aminosäurebausteine zerlegt werden.
3. In den Protein Bodies von Kotyledonen sind neben den Speicherproteinen auch gespeicherte Endopeptidasen gefunden worden, für die eine Mitwirkung am Speicherproteinabbau allerdings nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Außer in den Kotyledonen werden auch in Radicula, Achse und Keimspross des Embryos, hier unter dem Begriff „Embryoachse“ zusammengefasst, Proteinreserven in Protein Bodies angelegt. Es gibt Hinweise darauf, dass diese Reserven schon während der Keimung mobilisiert werden. Die daran beteiligten Proteinasen sind unbekannt. Wie bei den Kotyledonen ist unklar, ob gespeicherte Proteinasen an der Mobilisierung dieser Proteinreserven beteiligt sind und diese eventuell sogar einleiten.
4. Durch Untersuchungen an Leguminosensamen ist in der vorliegenden Dissertation versucht worden Antworten auf folgende Hauptfragen zu finden:
 - Welche Speicherproteine sind in den Protein Bodies der Embryoachse deponiert und wie verhält sich ihre Mobilisierung im Vergleich zur Mobilisierung der Proteinreserven in den Kotyledonen?

- Welche Proteinasen sind im Vergleich zu den Kotyledonen an der Mobilisierung von Proteinreserven in der Embryoachse beteiligt?
 - Enthalten die Protein Bodies der Embryoachsen und Kotyledonen Endopeptidasen? Wenn ja welche?
 - Lassen sich Beweise dafür finden, dass gespeicherte Proteinasen am Abbau der Proteinreserven beteiligt sind und diese eventuell sogar einleiten?
 - Welche Rolle können gespeicherte und neu gebildete Proteinasen für die Mobilisierung der Aminosäurereserven aus Speicherproteinen spielen, und in welchem Verhältnis stehen Embryoachse und Kotyledonen zueinander bei der Bereitstellung von Aminosäurebausteinen für die Proteinbiosynthesen im Keimling?
5. Die Saatwicke (*Vicia sativa* L.) wurde als Leguminose zum Untersuchungsobjekt gewählt, weil dafür aus Vorarbeiten in der Gruppe sowohl cDNA-Sonden als auch Antikörper für 4 papain- und 2 legumain-artige Cysteinproteinasen zur Verfügung standen, von denen eine Beteiligung an der Speicherproteinmobilisierung angenommen werden konnte.
6. Die Untersuchungen wurden mit folgenden biochemischen, molekularbiologischen und Zellfraktionierungs-Methoden durchgeführt: Elektrophoretische Auftrennung von Speicherproteinen und Proteinasen; Proteinase-aktivitäts-Gelelektrophorese; differenzielle Proteinaseanalyse mit Inhibitoren; Immunoblotting zum Nachweis von Speicherproteinen und Proteinasen; mRNA-blotting zum Nachweis proteinase-spezifischer mRNA; Zellfraktionierung zur Reindarstellung von Protein Bodies; Tests mit spezifischen Oligopeptidsubstraten und massenspektrometrische Analyse von Spaltprodukten; Analyse von Proteinasen und Proteinabbau unter Translationshemmung in keimenden Samen; HPLC-Analyse der löslichen Aminosäuren. Mit diesen Methoden wurden Embryoachsen und Kotyledonen von trockenen reifen Samen und von Samen aus verschiedenen Stadien während und nach der Keimung analysiert. In einigen Fällen wurden auch Stadien der Samenreife untersucht.
7. Die Untersuchungen haben folgende Ergebnisse gebracht:
- Embryoachsen reifer Samen der Saatwicke enthalten in ihren Protein Bodies wie die Kotyledonen sowohl Vicilin als auch Legumin als Speicherglobuline, wobei in den Embryoachsen Vicilin bei weitem vorherrscht, während beide Globuline in den Kotyledonen in etwa gleichen Mengen enthalten sind.
 - Während der Abbau der Globuline in den Embryoachsen vor allem während der Keimung und am ersten Tag nach der Keimung erfolgt, beginnt in den Kotyledonen ein merklicher Abbau erst nach dem Ende der Keimung.

- Die Gehalte an freien Aminosäuren und Proteinen ändern sich in Embryoachsen und Kotyledonen erst nach Ende der Keimung merklich. Dann beginnt die deutliche Zunahme des Proteingehaltes in den Achsen und parallel dazu eine Abnahme in den Kotyledonen.
- Erst mit dem Abbau der Speicherglobuline in den Kotyledonen steigt dort der Gehalt an freien Aminosäuren massiv an, wobei besonders der Anstieg an Asparagin bemerkenswert ist. Mit einem Tag Verzögerung steigt dann auch der Gehalt an freien Aminosäuren, darunter besonders der Gehalt an Asparagin, in der Embryoachse an.
- Cysteinproteinasen (CPR) sind in Embryoachsen und Kotyledonen für den Abbau der Speicherproteine verantwortlich.
- Sowohl in den Embryoachsen als auch in den Kotyledonen kommen während der untersuchten Periode drei papain- (CPR1, CPR2, CPR4) und zwei legumain-artige (VsPB2 und Proteinase B) CPR vor.
- Protein Bodies von Embryoachsen und Kotyledonen trockener reifer Samen enthalten die papain-artigen Proteinasen CPR1, CPR2 und CPR4 sowie die legumain-artige VsPB2. Papain- und legumain-artige CPR aus diesen Protein Bodies sind proteolytisch aktiv.
- In Lysaten von Protein Bodies, die aus trockenen reifen Embryoachsen bzw. Kotyledonen isoliert worden waren, werden die Speicherproteine bei saurem pH-Wert, wie er für CPR erforderlich ist, abgebaut. Der Abbau wird von CPR-spezifischen Inhibitoren unterbunden.
- Die Embryoachsen und Kotyledonen dieser Samen enthalten auch die entsprechenden CPR2-, CPR4-, und VsPB2-spezifischen mRNAs, die sich bereits in reifenden Samen nachweisen lassen. Die gespeicherten CPR werden demnach bereits während der Samenreifung gebildet.
- In den Embryoachsen ist das Mengenverhältnis von gespeicherten Proteinasen zu Speicherglobulinen weitaus größer als in den Kotyledonen.
- Bei gehemmter Proteinbiosynthese findet während der Keimung dennoch der Speicherglobulinabbau statt, obwohl eine Neubildung von CPR unterbleibt.
- Im Verlauf der Keimung und des nachfolgenden Keimlingswachstums werden neue papain- und legumain-artige CPR in Embryoachsen und Kotyledonen gebildet. In den Embryoachsen verschwinden gespeicherte und neu gebildete CPR in den ersten Tagen nach Ende der Keimung, wenn die Mobilisierung ihrer endogenen Speicherglobulinreserven beendet ist. Mit Ausnahme der CPR2 verschwinden dann die gespeicherten CPR auch in den Kotyledonen. Die neu bzw. verstärkt synthetisierten papain-artigen

CPR1 und CPR2 sowie die neu gebildete legumain-artige Proteinase B herrschen während des massiven Globulinabbaus der Kotyledonen vor.

- Verstärkte oder *de novo* Synthese von CPR lassen sich stets etwa einen Tag nach dem Auftreten der betreffenden mRNA nachweisen.

8. Im Ergebnis der Dissertation lassen sich hinsichtlich der eingangs gestellten Fragen folgende Schlussfolgerungen ableiten:

- Embryoachsen enthalten eigene Reserven an Speicherglobulinen, die bereits während der Keimung mobilisiert werden. Dies macht sie für diese Zeit von einer Aminosäureversorgung aus den Kotyledonen unabhängig. Diese setzt erst nach Ende der Keimung ein, wenn die endogenen Reserven der Achse aufgebraucht sind.
- Sowohl in den Protein Bodies von Embryoachsen als auch von Kotyledonen reifer Wickensamen sind gespeicherte papain- und legumain-artige CPR enthalten. Eine Neusynthese von CPR ist für den Beginn des Speicherglobulinabbaus nicht erforderlich. Dieser muss also von den gespeicherten CPR katalysiert werden. Dies dürfte vor allem für den raschen Mobilisierungsbeginn in der Embryoachse, sowie für die anfängliche endogene Aminosäureversorgung der Embryoachse von großer Bedeutung sein. Angesichts der hohen Speicherglobulinkonzentration in Kotyledonen ist dort die anfängliche Mobilisierung von Eiweißreserven schwer erkennbar, ließ sich jedoch deutlich nachweisen.
- Obwohl bereits während der Keimung vor allem in Embryoachsen aber auch in Kotyledonen Speicherproteinmobilisierung nachweisbar ist, ändern sich dort weder die Gehalte an Protein noch an freien Aminosäuren merklich. Dies kann damit erklärt werden, dass in beiden Organen ohne Netto-Änderung in den Gehalten an freien Aminosäuren. d.h. auch ohne Netto-Transfer von Aminosäuren zwischen beiden Organen, ein Umsatz von Aminosäuren aus Speicherglobulinen in andere Proteine erfolgt. Demnach sind beide Organe während der Keimung „Selbstversorger“. Erst wenn die endogenen Reserven der Embryoachse verbraucht sind, wird die Aminosäureversorgung der Achse von den Kotyledonen übernommen, wo inzwischen der massive Abbau von Speicherglobulinen eingesetzt hat. Das spiegelt sich in den Änderungen der Mengen an freien Aminosäuren (speziell der Asparagingehalte) beider Organe wieder. Diese Interpretation wurde in einer komplementären histologischen Arbeit bestätigt. Sie zeigte, dass während der Keimung noch keine funktionstüchtigen Leitbündel zwischen Achse und Kotyledonen existieren, sondern erst nach der Keimung. Erst dann kann mit einem Aminosäurefertransport zwischen beiden Organen gerechnet werden.

-
- Während der anfängliche Abbau von Speicherglobulinen von gespeicherten CPR bewirkt werden kann, wird die massive Mobilisierung der Eiweißreserven von einer zunehmenden Bildung bereits vorhandener bzw. *de novo* Synthese neuer CPR begleitet. Dabei ändert sich das Muster der am Abbau beteiligten papain-artigen CPR, und die legumainartige VsPB2 wird durch Proteinase B ersetzt. Die wichtige Rolle, welche CPR1, CPR2 und Proteinase B für die Mobilisierung der Speicherglobuline spielen, wird durch Ergebnisse aus der o.g. komplementären histochemischen Arbeit bestätigt (TIEDEMANN 2000). Diese CPR und ihre mRNA kommen immer in jenen Gewebeszonen vor, in denen der Speicherglobulinabbau nachweisbar ist.
 - Zu allen untersuchten Zeitpunkten der Keimung und des Keimlingswachstums sind mehrere Vertreter aus zwei verschiedenen Cysteinproteinasefamilien an der Speicherproteinmobilisierung beteiligt. Ihre Beteiligung unterliegt einem entwicklungs- und gewebeabhängigen Wechsel, der vor allem darauf beruht, dass gespeicherte Cysteinproteinasen verschwinden und andere neu gebildet werden. Die Kontrolle über die wechselnde Genexpression und das CPR-Muster erfolgt vorrangig über die Verfügbarkeit entsprechender mRNA für die Translation. Eine Beteiligung des CPR-Abbaus kann in diesem Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden.

7 LITERATUR

- ABE M., KONDO K., WATANABE H., EMORI Y.** (1991) Oryzacystatins as the first well-defined cystatins of plant origin and their target proteinases in rice seeds. *Biomed. Biochim. Acta* 50, 637 - 641
- ABE M., ABE K., KURODA M., ARAI S.** (1992) Corn kernel cysteine protease inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. *Eur. J. Biochem.* 209: 933 - 937
- ABE Y., SHIRANE K., YOKOSAWA H., MATSUSHITA H., MITTA M., KATO I., ISHII S.** (1993) Asparaginyl endopeptidase of jack bean seeds: Purification, characterization and high utility in protein sequence analysis. *J. Biol. Chem.* 268: 3525 - 3259
- BARRET A.J., RAWLINGS N.D., WOESSNER F.F.** (1998) Handbook of proteolytic enzymes. Barret, Rawlings, Woessner (eds.) Academic Press, London, United Kingdom
- BASSÜNER R., NONG V.H., JUNG R., SAALBACH G., MÜNTZ K.** (1987) The primary structure of the predominant vicilin storage protein subunit from field bean seeds (*Vicia faba* L. var. *minor* cv. Fribo). *Nucl. Acids Res.* 15: 9609
- BÄUMLEIN H., WOBUS U., PUSTELL J., KAFATOS F.C.** (1986) The legumin gene family: Structure of a B type gene of *Vicia faba* and the possible legumin gene specific regulatory element. *Nucl. Acids Res.* 6: 2707 - 2720
- BAUMGARTNER B., CHRISPEELS M.J.** (1979) Control of protease formation and reserve protein metabolism in the cotyledons of mung bean seedlings. *Abh. Akad. Wiss. DDR, Abt. Math. Naturwiss. Technik Akademie-Verlag, Berlin* N4: 115 - 124
- BECKER C., FISCHER J., NONG V.H., MÜNTZ K.** (1994) PCR cloning and expression analysis of cDNAs encoding cysteine proteinases from germinating seeds of *Vicia sativa* L.. *Plant Mol. Biol.* 26: 1207 - 1212
- BECKER C., SHUTOV A.D., NONG V.H., SENYUK V.I., JUNG R., HORSTMANN C., FISCHER J., NIELSEN N.C., MÜNTZ K.** (1995) Purification, cDNA cloning and characterization of proteinase B, an asparagine-specific endopeptidase from germinating vetch (*Vicia sativa* L.) seeds. *Eur. J. Biochem.* 228: 456 - 462
- BECKER C., SENYUK V.I., SHUTOV A.D., NONG V.H., FISCHER J., HORSTMANN C., MÜNTZ K.** (1997) Proteinase A, a storage globulin-degrading endopeptidase of vetch (*Vicia sativa* L.) seeds, is not involved in early steps of storage globulin mobilization. *Eur. J Biochem.* 248: 304 - 312
- BEEVERS L., RAIKHEL N.V.** (1998) Transport to the vacuole: Receptors and trans elements. *J. Exp. Bot.* 49 (325): 1271 - 1279
- BELOZERSKY M.A., DUNAEVSKY Y.E., VOSKOBOYNIKOVA E.** (1990) Isolation and properties of a metalloproteinase from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seeds. *Biochem. J.* 272: 677 - 682
- BELOZERSKY M.A., DUNAEVSKY Y.E., MUSOLYAMOV A.X., EGOROV T.A.** (1995) Complete amino acid sequence of the protease inhibitor from buckwheat seeds. *FEBS Letters* 371: 264 - 266

- BETHKE P.C., SCHURINK R., JONES R.L.** (1997) Hormonal signalling in cereal aleurone. *J. Exp. Bot.* 48 (312): 1337 – 1356
- BETHKE P.C., SWANSON S.J., HILLMER S., JONES R.L.** (1998) From storage compartment to lytic organelle: The metamorphosis of the aleurone protein storage vacuole. *Annales of Botany.* 82: 399 - 412
- BEWLEY JD.** (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.
- BEWLEY JD, BLACK M.** (1994) Seeds. Physiology of Development and Germination. 2nd edition. Plenum Press, New York und London
- BOLIVAR F., BACKMAN K.** (1979) Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* 63: 1123 - 1132
- BOLLINI R., CHRISPEELS M.J.** (1978) Characterization and subcellular localisation of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L.. *Planta* 142: 291 – 298
- BOND H.M., BOWLES D.** (1983) Characterization of soybean endopeptidase activity using exogenous and endogenous substrates. *Plant Physiol.* 72: 345 - 350
- BOYER H.W., ROULLAND-DUSSOIX D.** (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459 – 472
- BRACONNOT H.** (1827) Mémoire sur un principe particulier aux graines de la famille des légumineuses, et analyse des pois et des haricots. *Annales de chimie et de physique* (2) 34: 68 - 85
- BRADLEY D.** (1992) Isolation and characterization of a gene encoding a carboxypeptidase Y-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 98: 1526 - 1528
- BROWN J.W.S., MA Y., BLISS F.A., HALL T.C.** (1981) Genetic variation in the subunits of globulin-1 storage protein of french bean. *Theor. Appl. Genet.* 59: 83 - 88
- BULLOCK W.O., FERNANDEZ J.M., SHORT, J.M.** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376 – 379
- CASEY R., SANGER E.** (1980) Purification and some properties of a 7S seed storage protein from *Pisum* (pea). *Biochem. Soc. Trans.* 8: 658
- CASEY R., DOMONEY C., ELLIS N.** (1986) Legume storage proteins and their genes. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.* 3: 1 – 95
- CHRISPEELS M.J.** (1991) Sorting of proteins in the secretory system. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 42: 21 - 55
- CHRISPEELS M.J. HERMAN E.M.** (2000) Endoplasmatic reticulum-derived compartments function in storage and as mediators of vacuolar remodeling via a new type of organelle, precursor protease vesicles. *Plant Physiol.* 123: 1227 - 1233

- CHRISPEELS M.J., HIGGINS T.J.V., CRAIG S., SPENCER D.** (1982) Role of the endoplasmatic reticulum in the synthesis of reserve proteins and the kinetics of their transport to protein bodies in developing pea cotyledons. *J. Cell Biol.* 93: 5 - 14
- COUGHLAN S.J., HASTINGS C., WINFREY R.J.** (1969) Molecular characterisation of plant endoplasmic reticulum: Identification of protein disulfide-isomerase as the major reticuloplasmic. *Eur. J. Biochem.* 235: 215 - 224
- CROY R.R.D., GATEHOUSE J.A., EVANS I.M., BOULTER D.** (1980a) Characterization of the storage protein subunits synthesised *in vitro* by polyribosomes and RNA from developing pea (*Pisum sativum* L.) I. Legumin. *Planta* 148: 49 – 56
- CROY R.R.D., GATEHOUSE J.A., EVANS I.M., BOULTER D.** (1980b) The purification and characterization of a third storage protein (convicilin) from the seeds of pea (*Pisum sativum* L.) *Biochem. J.* 191: 509 - 516
- DALBEY R.E., VON HEIJNE G.** (1992) Signal peptidase in prokaryotes and eukaryotes – a new protease family *Trends Biochem. Sci.* 17: 474 - 478
- DANIELSSON C.E.** (1949) Seed globulins of the gramineae and leguminosae. *Biochem. J.* 44: 387 - 400
- DERBYSHIRE E., BOULTER D.** (1976) Isolation of legumain-like protein *Phaseolus aureus* and *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 15: 411 – 414
- DERBYSHIRE E., WRIGHT D.J., BOULTER D.** (1976) Legumin and vicilin storage protein of seeds. *J. Food Sci.* 41: 475 - 482
- DIAZ P., WILSON K.A., TAN-WILSON A.L.** (1993) Immunocytochemical analysis of proteolysis in germinating soybean. *Phytochemistry* 33: 961 - 968
- DICKINSON C.D., HUSSEIN E.H.A., NIELSEN N.C.** (1989) Role of post-translational cleavage in glycinin assembly. *Plant Cell* 1: 459 - 469
- DIETRICH R.A., MASLYAR D.J., HEUPEL R.C., HARADA J.J.** (1989) Spatial patterns of gene expression in *Brassica napus* seedlings: Identification of a cortex specific gene and localization of mRNAs encoding isocitrate lyase and a polypeptide homologous to proteinases. *Plant Cell* 1: 73 - 90
- DUNAEVSKY Y.E., BELOZERSKY M.A.** (1989a) Proteolysis of the main storage protein of buckwheat seeds at the early stage of germination. *Physiol. Plantarum* 75: 424 - 428
- DUNAEVSKY Y.E., BELOZERSKY M.A.** (1989b) The role of cysteine proteinase and carboxypeptidase in the breakdown of storage proteins in buckwheat seeds. *Planta* 179: 316 - 322
- DURANTI M., GUERRIERI N., CERLETTI P., VECCHIO G.** (1992) The legumin precursor from white lupin seed. Identity of the subunits, assembly and proteolysis. *Eur. J Biochem.* 206: 941 - 947
- ELPIDINA E.N., DUNAEVSKY Y.E., BELOZERSKY M.A.** (1990) Protein bodies from buckwheat seed cotyledons: Isolation and characteristics. *J. Exp. Bot.* 41: 969 - 977

- ELPIDINA E.N., VOSKOBOYNIKOVA N.E., BELOZERSKY M.A., DUNAEVSKY Y.E.** (1991) Localisation of a metalloproteinase and its inhibitor in the protein bodies of buckwheat seeds. *Planta* 185: 46 - 52
- ERICSON M.V., CHRISPEELS M.J.** (1973) Isolation and characterization of glucosamine-containing storage glycoproteins from the cotyledons of *Phaseolus aureus*. *Plant Physiol.* 3: 763 - 769
- FERNANDES K.V.S., CAMPOS F.A.P., DO VAL R.R., XAVIER-FILHO J., SHEWRY P.R.** (1993) The expression of papain inhibitors during development of cowpea seeds. *Plant Science* 74: 179 - 184
- FINCHER G.B.** (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 305 - 346
- FISCHER J., BECKER C., HILLMER S., HORSTMANN C., NEUBOHN B., SCHLERETH A., SENYUK V., SHUTOV A., MÜNTZ K.** (2000) The families of papain- and legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental patterns, intracellular localization and functions in globulin proteolysis. *Plant Mol. Biol.* 43: 83 - 101
- FORGAC M.** (1999) Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J. Biol. Chem.* 274 (19): 12951 - 12954
- FOURCROY A.F.** (1789) Sur l'existence de la matière albumineuse dans le végétal. *Annales de chimie* (l) 3: 252 - 262
- FRIGERIO L., FORESTI O., FELIPE D.H., NEUHAUS J.M., VITALE A.** (2001) The C-terminal tetrapeptide of phaseolin is sufficient to target green fluorescent protein to the vacuole. *J. Plant Physiol.* 158: 499 - 503
- GALILI G., HERMAN E.M.** (1997) Protein bodies: Storage vacuoles in seeds. *Advances Bot. Res.* 25: 113 - 140
- GALILI G., SENGUPATA-GOPALAN C., CERIOTTI A.** (1998) The endoplasmatic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies. *Plant Mol. Biol.* 38: 1 - 29
- GILBERT H.F.** (1997) Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* 272 (47): 29399 - 29402
- HARA I., MATSUBARA H.** (1980a) Pumpkin (*Curcubita* sp.) seed globulin V. Proteolytic activities involved in globulin degradation in ungerminated seeds. *Plant Cell Physiol.* 21(2): 219 - 232
- HARA I., MATSUBARA H.** (1980b) Pumpkin (*Curcubita* sp.) seed globulin VI. Proteolytic activities appearing in germinating cotyledons. *Plant Cell Physiol.* 21(2): 233 - 245
- HARA-NISHIMURA I., NISHIMURA M., MATSUBARA, H., AKAZAWA T.** (1982) Suborganellar localization of proteinase catalyzing the limited hydrolysis of pumpkin globulin. *Plant Physiol.* 70: 699 - 703
- HARA-NISHIMURA I., INOUE K., NISHIMURA M.** (1991) A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into the mature form. *FEBS Letters* 294: 89 - 93

- HARA-NISHIMURA I., TAKEUCHI Y., NISHIMURA M.** (1993) Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. *Plant Cell* 5: 1651 - 1659
- HARA-NISHIMURA I., SHIMADA T., HIRAIWA N., NISHIMURA M.** (1995) Vacuolar processing enzyme responsible for maturation of seed proteins. *J. Plant Physiol.* 145: 632 - 640
- HARA-NISHIMURA I., KINOSHITA T., HIRAIWA N., NISHIMURA M.** (1998) Vacuolar processing enzyme in protein-storage vacuole and lytic vacuoles. *J. Plant Physiol.* 152: 668 - 674
- HARRIS N., CHRISPEELS M.J.** (1975) Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germinating mung beans. *Plant Physiol.* 56: 292 - 299
- HARTL F.U.** (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571 – 580
- HEIM U., SCHUBERT R., BÄUMLEIN H., WOBUS U.** (1989) The legumin gene family: structure and evolutionary implication of *Vicia faba* B-type genes and pseudogenes. *Plant Mol. Biol.* 13: 653 – 663
- HEIM U., BÄUMLEIN H., WOBUS U.** (1994) The legumin gene family: a reconstructed *Vicia faba* legumin gene encoding a high-molecular weight subunit is related to type B genes. *Plant Mol. Biol.* 25: 131 – 135
- HERMAN E.M., LARKINS B.A.** (1999) Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* 7: 601 - 613
- HILDMANN T., EBNETH M., PENA-CORTÉS H., SÁNCHEZ-SERRANO J.J., WILLMITZER L., PRAT S.** (1992) General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4: 1157 - 1170
- HINZ G. HILLMER S., BÄUMER M., HOHL I.** (1999) Vacuolar storage proteins and the putative vacuolar sorting receptor BP-80 exit the golgi apparatus of developing pea cotyledons in different transport vesicles. *Plant Cell* 11: 1509 - 1524
- HIRAIWA N., NISHIMURA M., HARA-NISHIMURA I.** (1997a) Expression and activation of the vacuolar processing enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J.* 12: 819 – 829
- HIRAIWA N., KONDO M., NISHIMURA M., HARA-NISHIMURA I.** (1997b) An aspartic proteinase is involved in the breakdown of propeptides of storage proteins in protein storage vacuoles. *Eur. J. Biochem.* 246: 133 - 141
- HIRAIWA N., NISHIMURA M., HARA-NISHIMURA I.** (1999) Vacuolar processing enzyme is self-catalytically activated by removal of the C-terminal and N-terminal propeptides. *FEBS Letters* 447: 213 - 216
- HORSTMANN C.** (1983) Specific subunits pairs of legumin from *Vicia faba*. *Phytochemistry* 22: 1861 - 1866
- HORSTMANN C.** (1984) New aspects of the subunit structure of *Vicia faba* legumin. *Die Kulturpflanze* 32:109 - 116

- HORSTMAN C., SCHLESIER B., OTTO A., KOSTKA S., MÜNTZ K.** (1993) Polymorphism of legumin subunits from field bean (*Vicia faba* L. var. *minor*) and its relation to the corresponding multigene family. *Theor. Appl. Gen.* 86: 867 - 864
- JONES C.G., LYCETT G.W., TRUCKER G.A.** (1996) Protease inhibitor studies and cloning of a serine carboxypeptidase cDNA from germinating seeds of pea (*Pisum sativum* L.). *Eur. J. Biochem.* 235: 574 - 578
- ISHII S.I.** (1994) Legumain: Asparaginyl endopeptidase. *Methods in Enzymology* 224: 604 - 615
- JUNG R., SAALBACH I., NIELSEN N.C., MÜNTZ K.** (1993) Site-specific limited proteolysis of legumin proteolysis of legumin chloramphenicol acetyl transferase fusions *in vitro* and in transgenic tobacco seeds. *J. Exp. Bot.* 44 (Suppl.): 343 - 349
- JUNG R., SCOTT M.P., NAM Y.M., BEAMAN T.W., BASSÜNER R., SAALBACH I., MÜNTZ K., NIELSEN N.C.** (1998) Processing and assembly of 11S seed storage globulin *in vitro* and in transgenic tobacco seeds: Specificity of limited proteolyses and its role in 11S globulin assembly. *Plant Cell* 10: 343 - 357
- KERMODE A.R., BEWLEY J.D.** (1999) Synthesis, processing and deposition of seed proteins: The pathway of protein synthesis and deposition in the cell. In: *Seed proteins*: 807 - 841, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Niederlande
- KOEHLER S.M., HO T.H.D.** (1990a) A major gibberellic acid-induced barley aleuron cysteine proteinase which digests hordein. *Plant Physiol.* 94: 251 - 258
- KOEHLER S.M., HO T.H.D.** (1990b) Hormonal regulation, processing and secretion of cysteine proteinases in barley aleurone layers. *Plant Cell* 2: 769 - 783
- KONDO H., ABE K., NISHIMURA I., WATANABE H., EMORI Y., ARAI S.** (1990) Two distinct cysteine species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. *J. Biol. Chem.* 265: 15832 - 15837
- KOSHIYAMA I., FUKUSHIMA D.** (1976a) Identification of a 7S globulin with β -conglycinin in soybean seeds. *Phytochemistry* 15: 157 - 159
- KOSHIYAMA I., FUKUSHIMA D.** (1976b) Purification and some properties of γ -conglycinin in soybean seeds. *Phytochemistry* 15: 161 - 164
- LANE B.G.** (1991) Cellular desiccation and hydration: Developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. *FASEB J.* 8: 2893 - 2901
- LAWRENCE J.M., DAY K.M., STEPHENSON J.E.** (1959) Nitrogen mobilisation in pea seedlings. *Plant Physiol.* 34: 668 - 677
- LAWRENCE J.M., GRANT D.R.** (1963) Nitrogen mobilisation in pea seedlings. II Free amino acids. *Plant Physiol.* 38: 561 - 566
- LAWRENCE M.C.** (1999) Structural relationships of 7S and 11S globulins. In: *Seed proteins*: 517 - 541, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Niederlande

- LI X., FRANCESCHI V., OKITA T.W. (1993) Segregation of storage protein mRNAs on the rough endoplasmatic reticulum membranes of rice endosperm cells. *Cells* 72: 869 - 879
- LÜTTGE U., RATAJCZAK R. (1997) The physiology, biochemistry and molecular biology of the plant vacuolar ATPase. In: *Advances in Botanical Research* Vol. 25. The Plant Vacuole: 253 – 296; R.A. Leigh, D. Sanders (eds.) Oxford, Academic Press
- MADISON J.T., THOMPSON J.F., MUENSTER A.E. (1981) Turnover of storage protein in soybean and pea. *Annales of Botany* 47: 65 - 73
- MANDEL M., HIGA A. (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 240: 154 - 162
- MARTTILA S., JONES B.L., MIKKONEN A. (1995) Differential localisation of two acid proteinases in germinating barley (*Hordeum vulgare*) seed. *Physiol. Plantarum* 93: 317 - 327
- MARTY F. (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell* 11: 587 - 599
- MITSUHASHI W., KOSHIBA T., MINAMIKAWA T. (1986) Separation and characterization of two endopeptidases from cotyledons of germinating *Vigna mungo* seeds. *Plant Physiol.* 80: 628 - 634
- MITSUHASHI W., OAKS A. (1994) Development of endopeptidase activity in maize (*Zea mays* L.) endosperms. *Plant Physiol.* 104: 401 - 407
- MORITA S., FUKASE M., HOSHINO K., FUKUDA Y., YAMAGUCHI M., MORITA Y. (1994) A serine protease in soybean seeds that acts specifically on the native α -subunit of β -conglycinin. *Plant Cell Physiol.* 35 (7): 1049 - 1056
- MÜNTZ K. (1994) Storage and reactivation of high molecular weight nitrogen compounds in plants. *Nova Acta Leopoldina* NF 70, Nr. 288: 183 – 200
- MÜNTZ K. (1996) Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. *J. Exp. Bot.* 47(298): 605 - 622
- MÜNTZ K. (1998) Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.* 38: 77 - 99
- MÜNTZ K., HORSTMANN C., SCHLESIER B. (1986) Seed proteins and their genetics in *Vicia faba* L. *Biol. Zentralblatt* 105: 107 - 120
- MÜNTZ K., BECKER C., PANCKE J., SCHLERETH A., FISCHER J., HORSTMANN C., KIRKIN V., NEUBOHN B., SENYUK V., SHUTOV A. (1998) Protein degradation and nitrogen supply during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 152: 683 - 691
- MÜNTZ K., HORSTMANN C., SCHLESIER B. (1999) *Vicia* globulins. In: *Seed Proteins*: 259 – 284, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Niederlande
- MÜNTZ K., BELOZERSKY M.A., DUNAEVSKY Y.E., SCHLERETH A., TIEDEMANN J. (2001) Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J. Exp. Bot.* 52: 1741 - 1752

- MURMATSU M., FUKAZAWA C.** (1993) A high-order structure of plant storage proprotein allows its second conversion by an asparagine-specific cysteine protease, a novel proteolytic enzyme. *Eur. J. Biochem.* 215: 123 - 132
- MURRAY D.R.** (1988) Nutrition of the angiosperm embryo. John Wiley & Sons, New York, Toronto, Singapore
- NAPIER J.A.** (1999) The synthesis and deposition of storage proteins: Possible role of molecular chaperones and the unfolded protein response. In: *Seed Proteins*: 843 - 858, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Niederlande
- NEUHAUS J.M., ROGERS J.C.** (1998) Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol. Biol.* 38: 127 - 144
- NEWBIGIN E.J., DE LUMEN B.O., CHANDLER P.M., GOULD A., BLAGROVE R.J., MARCH J.F., KORTT A.A. HIGGINS T.J.V.** (1990) Pea convicilin: structure and primary sequence of the protein and expression of a gene in the seeds of transgenic tobacco. *Planta* 180: 461 - 470
- NIELSEN N.C., JUNG R., NAM Y.W., BEAMAN T.W., OLIVEIRA L.O., BASSÜNER R.** (1995) Synthesis and assembly of 11S globulins. *J. Plant Physiol.* 143: 641 - 647
- OKAMOTO T MINAMIKAWA T.** (1998) A vacuolar cysteine endopeptidase (SH-EP) that digests seed storage globulin: Characterization, regulation of gene expression and posttranslational processing. *J. Plant Physiol.* 152: 675 - 682
- OKAMOTO T., MINAMIKAWA T.** (1999) Molecular cloning and characterization of *Vigna mungo* processing enzyme 1 (VmPE-1), an asparaginyl endopeptidase involved in post-translational processing of a vacuolar endopeptidase (SH-EP). *Plant Mol. Biol.* 39: 63 - 73
- OKOMOTO T., MINAMIKAWA T., EDWARDS G., VAKHARIA V., HERMAN E.** (1999) Posttranslational removal of the carboxyterminal KDEL of the cysteine protease SH-EP occurs prior to maturation of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 274 (16): 11390 - 11398
- OSBORNE T.B.** (1924) The vegetable proteins. 2 nd edition. Longmans, Green and Co., London
- QI X., WILSON K.A., TAN-WILSON A.L.** (1992) Characterisation of the major protease involved in the soybean β -conglycinin storage protein mobilisation. *Plant Physiol.* 99: 725 - 733
- ROBINSON D.G., HOH B., HINZ G., JEONG B. K.** (1995) One vacuole or two vacuoles: do protein storage vacuoles arise *de novo* during pea cotyledon development? *J. Plant Physiol.* 145: 654 - 664
- ROBINSON D.G., BÄUMER M., HINZ G., HOHL I.** (1998a) Vesicle transfer of storage proteins to the vacuole: The role of the golgi apparatus and multivesicular bodies. *J. Plant Physiol.* 152: 659 - 667
- ROBINSON D.G., HINZ G., HOLSTEIN S.E.H.** (1998b) The molecular characterization of Transport vesicles. *Plant Mol. Biol.* 38: 49 - 76
- ROBINSON D.G., HINZ G.** (1999) Golgi-mediated transport of storage proteins. *Seed Sci. Res.* 9: 267 - 283

- ROGERS J.C.** (1998) Compartmentation of cell proteins in separate lytic and protein storage vacuoles. *J. Plant Physiol.* 152: 653 - 658
- SAALBACH G., JUNG R., KUNZE G., SAALBACH I., ADLER K., MÜNTZ K.** (1991) Different legumin protein domains act as vacuolar targeting signals. *Plant Cell* 3: 695 - 708
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T.** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Nolan, C., Ferguson M. eds., Cold Spring Harbor laboratory press; New York, NY
- SAMMOUR R.D., GATEHOUSE J.A., GILROY J., BOULTER D.** (1984) The homology of the major storage protein of jack bean (*Canavalia ensiformis*) to pea vicilin and its separation from mannosidase. *Planta* 162: 61 - 70
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON A.R.** (1977) DNA sequencing with cain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463 – 5467
- SCHLERETH A., BECKER C., HORSTMAN C., TIEDEMANN J., MÜNTZ K.** (2000) Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 51: 1423 -1433
- SCHLERETH A., STANDTHARDT D., MOCK H.P., MÜNTZ K.** (2001) Stored cysteine proteinases start mobilisation in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (*Vicia sativa* L.) seed germination. *Planta* 212: 718 - 727
- SCHMID M., SIMPSON F., KALOUSEK F., GIETL C.** (1998) A cysteine endopeptidase with a c-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta* 206: 466 - 475
- SCHMID M., SIMPSON F., GIETL C.** (1999) Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(24) 14159 - 14164
- SCOTT M.P., JUNG R., MÜNTZ K., NIELSEN N.C.** (1992) A protease responsible for post-translational cleavage of a conserved Asn-Gly linkage in glycinin, the major seed storage protein of soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 658 - 662
- SENYUK V., ROTARI V., BECKER C., ZAKHAROV A., HORSTMANN C., MÜNTZ K., VAINTRAUB I.** (1998) Does an asparaginyl-specific cysteine endopeptidase trigger phaseolin degradation in cotyledons of kidney bean seedlings. *Eur. J. Biochem.* 258: 546 - 558
- SHEWRY P.R.** (1995) Plant storage proteins *Biol. Rev.* 70: 375 - 426
- SHEWRY P.R., TATHAM A.S.** (1990) The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem. J.* 267: 1 - 12
- SHEWRY P.R., NAPIER J.A., TATHAM A.S.** (1995) Seed storage proteins: Structures and Biosynthesis. *Plant Cell* 7: 945 - 956
- SHEWRY P.R., CASEY R.** (1999) Seed proteins. In: *Seed Proteins*: 1 - 10, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Niederlande

- SHUTOV A.D., BULMAGA V.P., BOLDT E.K., VAINTRAUB I.A.** (1981) A study of modification of vetch seed reserve proteins during germination and limited proteolysis. *Biochimija* (russ) 46: 841 - 850
- SHUTOV A.D., LANH D.N., VAINTRAUB I.A.** (1982) Purification and partial characterization of proteinase B from germinating vetch seeds.. *Biochimija* (russ) 47: 814 - 821
- SHUTOV A.D., BULMAGA V.P., VAINTRAUB I.A.** (1984) Proteinase A from germinating vetch seeds. Purification by affinity chromatography and substrate specificity studies. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 179: 191 - 196
- SHUTOV A.D., VAINTRAUB I.A.** (1987) Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry* 26: 1557-1566
- SHUTOV A.D., BÄUMLEIN H.** (1999) Origin and evolution of seed storage globulin. In: *Seed Proteins*: 543 - 561, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Niederlande
- SLIGHTON J.L., BULMAGA V.P., KLASSEY R.C., HOFFMAN L.M.** (1985) Nucleotide sequence from phaseolin cDNA clones: The major of storage proteins from *Phaseolus vulgaris* are encoded by two unique gene families. *Nucl. Acids Res.* 18: 6483 - 6498
- SMITH D.L.** (1981) Cotyledons of leguminosae. In: Polhill R.M., Raven P.H. (eds.), *Advances in legume systematics*. Royal Botanical Garden , London , 927 - 940
- SUZUKI Y., MINAMIKAWA T.** (1985) On the role of stored mRNA in protein synthesis in embryonic axes of germinating *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol.* 79: 327 – 331
- TAKEDA O., MIURA Y., MITTA., MATSUSHITA H., KATO I., ABE Y., YOKOSAWA H., ISHII S.** (1994) Isolation and analysis of cDNA encoding a precursor of *Canavalia ensiformis* asparaginyl endopeptidase (legumain). *J. Biochem.* 116: 541 - 546
- TANAKA T., MINAMIKAWA T., YAMAUCHI D., OGUSHI Y.** (1993) Expression of an endopeptidase (EP-C1) in *Phaseolus vulgaris* plants. *Plant Physiol.* 101: 421 - 428
- TAN-WILSON A., LIU X., CHEN R., QI X., WILSON K.A.** (1996) An acidic amino acid-specific protease from soybeans. *Phytochemistry* 42 (2): 313 - 319
- THANH V.H., SHIBASAKI K.** (1977) Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physico-chemical properties of the monomeric forms. *Biochem. Biophys. Acta* 490: 370 - 384
- TIEDEMANN J.** (2000) Histochemische Analyse von Cysteinproteinasen und ihren mRNAs in Beziehung zur Reserveproteinmobilisierung während der Keimung und des Keimlingswachstums bei Leguminosen. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- TIEDEMANN J., NEUBOHN B., MÜNTZ K.** (2000) Different functions of vicilin and legumin are reflected in the histopattern of globulin mobilization during germination of vetch (*Vicia sativa* L.) *Planta* 211:1 - 12

- TIEDEMANN J., SCHLERETH A., MÜNTZ K.** (2001) Differential tissue-specific expression of cysteine proteinases forms the basis for the fine tuned mobilization of storage globulin during and after germination in legume seeds. *Planta* 212: 728 - 738
- TÖRMÄKANGAS K., KERVINEN J., ÖSTMAN A., TEERI T.** (1994) Tissue specific localisation of aspartic proteinase in developing and germinating barley grains. *Planta* 195: 116 - 125
- TOYOOKA K., OKAMOTO T., MINAMIKAWA T.** (2000) Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J. Cell Biol.* 148: 453 - 463
- VON SCHAEWEN A., CHRISPEELS M.J.** (1993) Identification of vacuolar sorting information in phytohemagglutinin, an unprocessed vacuolar protein. *J. Exp. Bot.* 44: 339 - 342
- VIGIL E.L., FANG T.K.** (1995a) Comparative biochemical and morphological changes in imbibed cotton seed hypocotyls and radicles *in situ* and *in vivo* – Protein breakdown and elongation growth. *Seed Sci. Res.* 5: 41-51
- VIGIL E.L., FANG T.K.** (1995b) Protease activities and elongation growth of excised cotton seeds axes during the first 24 hours of imbibition. *Seed Sci. Res.* 5: 201 - 207
- VITALE A., CERIOTTI A., DENECKE J.** (1993) The role of the endoplasmic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport. *J. Exp. Bot.* 44: 1477 - 1444
- VITALE A., BIELLI A., CERIOTTI A.** (1995) The binding protein associates with monomeric phaseolin. *Plant Physiol.* 107: 1411 - 1418
- VITALE A., DENECKE J.** (1999) The endoplasmic reticulum – Gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* 11: 615 – 628
- VOSKOBOYNIKOVA N.E., DUNAEVSKY Y.E., BELOZERSKY M.A.** (1990) Inhibitor of the metalloproteinase from buckwheat seeds. *Biokhimija* (Russ.) 55: 839 –847.
- WALTON D.C.** (1966) Germination of *Phaseolus vulgaris*. I. Resumption of axis growth. *Plant Physiol.* 41: 298 - 302
- WILSON K.A.** (1986) Role of proteolytic enzymes in the mobilisation of protein reserves in the germinating dicot seed. In: Dalling M.J. (ed.) *Plant Proteolytic Enzymes* Vol. II: 19 – 47, Boca Raton, Florida, CRC Press Inc.
- WILSON K.A., RIGHTMIRE B.R., CHEN J.C., TAN-WILSON A.** (1986) Differential proteolysis of glycinin and β -conglycinin polypeptides during soybean germination and seedlings growth. *Plant Physiol.* 82: 71 – 76
- WILSON K.A., RUSSELL M., QUACKENBUSH J.F., TAN-WILSON A.L.** (1995) Characterization of carboxypeptidase I of mung bean seeds. *Seed Sci. Res.* 5: 209 - 218
- WOBUS U., BÄUMLEIN H., BASSÜNER R., GRAFE R., JUNG R., MÜNTZ K., SAALBACH G.** (1986a) Cloning and characterizing *Vicia faba* seed storage protein genes. *Biol. Zentralblatt* 105: 121 - 128

-
- WOBUS U., BÄUMLEIN H., BASSÜNER R., HEIM U., JUNG R., MÜNTZ K., SAALBACH G.; WESCHKE W.**
(1986b) Characteristics of two types of legumin genes in the field bean (*Vicia faba* L. var. *minor*) genome as revealed by cDNA analysis. *FEBS Letters* 201: 74 – 80
- Yamada T., Ohta H., Shinomara A., Iwamatsu A., Shimada H., Tsuchiya T., Masuda T., Takamiya K.I.** (2000) A cysteine protease from maize isolated in complex with cystatin. *Plant Cell Physiol.* 41: 185 – 191

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Quedlinburg, im Juni 2001

Armin Schlereth

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit konnte am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben gefertigt werden. Daher möchte ich dem Institut danken, welches mir den großzügig ausgestatteten Arbeitsplatz und die Infrastruktur zur Verfügung gestellt hat.

Einen besonderen Dank möchte ich gegenüber Prof. Dr. Klaus Müntz für die fruchtbaren Anregungen zu diesem interessanten Thema, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, die Möglichkeit zur eigenständigen Arbeit und die finanzielle Unterstützung aussprechen.

Bei Prof. Dr. Uwe. Sonnewald möchte ich mich aufrichtig für die Anregungen, seine offene und direkte Art, sowie die finanzielle Unterstützung bedanken, wodurch mir ermöglicht wurde die vorliegende Arbeit zu beenden.

Für sein Entgegenkommen und die aufgebrauchte Geduld möchte ich Dr. Ivo Feussner danken.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Frau Monika Wiesner für die technische Unterweisung, die Hilfestellung, sowie die aufmunternde und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Insbesondere danke ich Frau Dr. Birgit Neubohn für die wissenschaftliche und moralische Unterstützung, sowie für Ihrer Hilfsbereitschaft welche zur Realisierung der Fixierung von Protein Bodies für die elektronenmikroskopische Darstellung führte. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Frau Waltraud Panitz für die Fixierung der Protein Bodies und deren elektronenmikroskopische Auswertung bedanken.

Frau Doris Standhardt und Dr. Hans-Peter Mock gilt mein Dank für die Möglichkeit der massenspektrometrischen Analyse verschiedener Peptide und der akribischen Auswertung der erhaltenen Daten durch Frau Doris Standhardt.

Bei Herrn Dr. Christian Horstmann möchte ich mich für die N-terminalen Proteinsequenzierungen, sowie die zahlreichen Aminosäureanalysen bedanken.

Herrn Dr. Mohammad Hajirezaei danke ich für die Unterweisung in die Messung der Pyrophosphat:Fructose-6-Phosphat Phosphotransferase und der Möglichkeit diese in seinem Labor am Sigma-Photometer zu messen.

Für die DNA-Sequenzierungen danke ich Frau Susanne König.

Herrn Dr. Rafael Ratajczak (Technische Hochschule Darmstadt) und Frau Dr. Christiane Gietl (Technische Universität München) möchte ich für die unbürokratische Bereitstellung der Anti-ATPase- bzw. Anti-Proteinase A-Antikörper danken.

Für die schnelle und geduldige Ausarbeitung der Grafiken, Tabellen und Abbildungen möchte ich mich bei Frau Anett Killian und Frau Ursula Tiemann bedanken. Frau Birgit Schäfer und Frau Heike Ernst danke ich für die Anfertigung der Photoarbeiten.

Des weiteren sollten die vielen hilfreichen Hände der GärtnerInnen, TechnikerInnen, BibliothekarInnen, RaumpflegerInnen und PförtnerInnen, sowie die erlebnisreichen Momente und Kooperation mit Gleichgesinnten nicht vergessen werden.

Ein ganz besondere Dank gebührt meiner Familie, die oft über lange Phasen mit geduldiger Ruhe, liebevoller Fürsorge und aufopfernder Hilfsbereitschaft mir die Zeit, die Kraft und die Aufmunterung zur Fertigstellung dieser Arbeit gaben. Gleichzeitig möchte ich mich bei meiner Familie und vor allem bei meinen beiden Kindern für die vielen Unzulänglichkeiten, die allzu häufige Abwesenheit und meine vielen Versäumnisse entschuldigen.

PUBLIKATIONSLISTE

- SCHLERETH A. (1994) Metabolitgehalte und Enzymaktivitäten des Kohlenhydratstoffwechsels in Fichtennadeln (*Picea abies* [L.] Karst.) verschiedenen Alters vom Ende der Frostperiode bis zum Abschluss der Austriebsphase. Diplomarbeit
- WINGLER A., EINIG W., SCHAEFFER C., WALLEENDA T., EGGER B., SCHLERETH A., HAMPP R., WALLANDER H., NYLUND J.E. (1994) Einfluss von unterschiedlichen Nährstoffbedingungen auf die Regulation des Kohlenstoff-Metabolismus in Fichtenkeimlingen. Kernforschungszentrum Karlsruhe, *KfK-PEF* 117: 155 - 165
- EGGER B., EINIG W., SCHLERETH A., WALLEENDA T., MAGEL E., LOEWE A., HAMPP R. (1996) Carbohydrate metabolism in 1- and 2-year-old spruce needles, and stem carbohydrates from three months before until three months after bud break. *Physiol. Plantarum* 96: 91 - 100
- BECKER C., SCHLERETH A., MÜNTZ K. (1996) Do stored proteinases manage early storage protein degradation in germinating vetch seeds? *Plant Biol. Biochem. Special Issue*: 32 - 33
- SCHLERETH A., BECKER C., NEUBOHN B., MÜNTZ K. (1997) Cysteine endopeptidase and the initiation of protein breakdown in the vacuolar compartment of cells from germinating *vicia* seeds. *Eur. J. Cell Biol.* 344: 115
- MÜNTZ K., BECKER C., PANKE J., SCHLERETH A., FISCHER J., HORSTMANN C., KIRKIN V., NEUBOHN B., SENYUK V., SHUTOV A. (1998) Protein degradation and nitrogen supply during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.) *J. Plant Physiol.* 152: 683-691
- FISCHER J., BECKER C., Hillmer S., HORSTMANN C., NEUBOHN B., SCHLERETH A., SENYUK V., SHUTOV A., MÜNTZ K. (2000) The families of papain- and legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental patterns, intracellular localization and functions in globulin proteolysis. *Plant Mol. Biol.* 43: 83 – 101
- SCHLERETH A., BECKER C., HORSTMANN C., MÜNTZ K. (2000) Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 51: 1423 -1433
- SCHLERETH A., STANDTHARDT D., MOCK H.P., MÜNTZ K. (2001) Stored cysteine proteinases start mobilisation in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (*Vicia sativa* L.) seed germination. *Planta* 212: 718 - 727
- TIEDEMANN J., SCHLERETH A., MÜNTZ K. (2001) Differential tissue-specific expression of cysteine proteinases forms the basis for the fine tuned mobilization of storage globulin during and after germination in legume seeds. *Planta* 212: 728 - 738
- MÜNTZ K., BELOZERSKY M.A., DUNAEVSKY Y.E., SCHLERETH A., TIEDEMANN J. (2001) Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J. Exp. Bot.* 52:1741 - 1752

LEBENS LAUF

Persönliche

Geburtsdatum : 28.07.57
Geburtsort : Heilbronn
Staatsangehörigkeit : deutsch
Familienstand : verheiratet, 2 Kinder
Eltern : Rudolf Schlereth (1963 verstorben)
Irene Schlereth, geb. Frank, Näherin

Ausbildung

1964-1972 Grund- und Hauptschule in Heilbronn
1972-1975 Lehre als Koch in Heilbronn in Verbindung mit der Berufsfachschule für Köche in Bad Überkingen
Abschluss: Lehrabschlussprüfung zum Koch
1975-1976 Berufsaufbauschule in Crailsheim
Abschluss: Mittlere Reife
1977-1979 Fachschule für Sozialpädagogik / Heilbronn
Abschluss: Staatsexamen zum Erzieher
1983-1986 Kolping Kolleg Heilbronn, zum Erlangen der allg. Hochschulreife
Abschluss: Hochschulreifeprüfung
1986-1989 Studium der Biologie an der Universität Würzburg mit der Diplomvorprüfung im Studienfach Biologie
1989-1994 Studium der Biologie an der Universität Tübingen
Abschluss: Diplomhauptprüfung im Studienfach Biologie
1993-1994 Diplomarbeit bei Prof. Dr. R. Hampp. Botanisches Institut der Universität Tübingen
Lehrstuhl Ökophysiologie der Pflanzen. Thema: „Metabolitgehalte und Enzymaktivitäten des Kohlenhydratstoffwechsels in Fichtennadeln (*Picea abies* [L.] Karst.) verschiedenen Alters vom Ende der Frostperiode bis zum Abschluss der Austriebsphase“

Beruflicher Werdegang

1976-1977 Vorpraktikum im Sonderschulkindergarten Heilbronn
1979-1980 Anerkennungsjahr zum Erzieher in Verbindung mit dem Zivildienst / Psychiatrisches Landeskrankenhaus Weinsberg
1981-1983 Erzieher im Psychiatrisches Landeskrankenhaus Weinsberg
1994-1994 Wissenschaftlicher Angestellter bei Prof. Dr. R. Hampp
1995-2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben, in der Arbeitsgruppe Eiweißstoffwechsel unter der Leitung von Prof. Dr. K. Müntz. Seit 1999, durch Übergang dieser Gruppe in die Arbeitsgruppe Molekulare Pflanzenphysiologie, unter der Leitung von Prof. Dr. U.

seit 2000

Sonnewald. Diese Anstellung wurde zur Vorbereitung der Promotion mit dem Thema „Molekulare Zellbiologie der proteolytischen Spaltung von Reserveproteinen in Samen von *Vicia sativa* L.“ genutzt.

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Arbeitsgruppe Lipidstoffwechsel, unter der Leitung von PD Dr. habil. I. Feussner.

GEHEIMNISVOLL AM LICHTEN TAG,
LÄSST SICH NATUR DES SCHLEIERS NICHT BERAUBEN,
UND WAS SIE DEINEM GEIST NICHT OFFENBAREN MAG,
DAS ZWINGST DU NICHT MIT HEBELN UND MIT SCHRAUBEN.

Faust I
Johann Wolfgang von Goethe