

PURIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA PARȚIALĂ A PROTEINAZEI A DIN SEMINȚELE GERMINATE DE FASOLE

Vitalie I. ROTARI

LCȘ „Biochimia Plantelor”

Proteinase A, that possibly participate in the degradation of phaseolin, the main 7S storage protein of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.), was isolated as a 35-kDa polypeptide from germinating kidney bean seeds and partially characterised. According to its properties it belong to a group of homologous cysteine proteinases of the papain family that participate in storage protein mobilisation during seeds geminating of many plants. The proteinases of this group hydrolyze storage proteins to short peptides. Dispite close similarity to proteinase A from vetch, proteinase A from kidney bean hydrolyse phaseolin by non-co-operative mechanism. This action is limited to the cleavage of subunits into two approximately equal parts and to splitting off a number of short peptides which result in the modification of quaternary structure of phaseolin molecule. It is similar to the action on phaseolin of other proteases, both endogenous and exogenous, and provide another example of the importance of phaseolin structure in the explanation of its resistance to proteolysis.

La germinarea semințelor proteinele de rezervă (PR) sunt hidrolizate până la aminoacizi, care servesc drept precursori pentru biosinteza noilor proteine, precum și a altor compuși ce conțin nitrogen, ale plantulei. Proteinazele cisteinice sunt principalele proteinaze implicate în acest proces [6,10,18]. Într-o schemă ipotetică propusă pentru explicarea scindării PR în decursul germinării semințelor plantelor leguminoase rolul principal în mobilizarea PR a fost atribuit proteinazelor A și B, sintetizate *de novo* la germinare [18]. A fost presupus că proteinaza A inițiază degradarea PR prin modificarea lor limitată (proteoliza limitată), făcându-le astfel susceptibile atacului altor proteinaze. Odată modificate, PR sunt scindate co-operativ atât de proteinaza A, cât și de proteinaza B, de alte endo- și exopeptidaze. S-a presupus că proteinaza B, care este de tip legumainic, nu acționează asupra PR native (nemodificate), așa ca vicilina și legumina. În conformitate cu această ipoteză, proteinazei A îi revine rolul central în controlul inițierii degradării PR.

Investigarea proteinazelor din semințele de fasole și a rolului lor în degradarea fazeolinei, globulinei vicilinice 7S, care este proteină de rezervă majoră din această plantă, a arătat că în fasole această schemă nu se reproduce. Numai hidroliza limitată are loc la acțiunea atât a proteinazei CPPH [14], cât și a legumainei [17].

Fazeolina, spre deosebire de alte PR, este stabilă la acțiunea proteinazelor endogene [3,14] și exogene [7,12]. Hidroliza ei se termină după scindarea unei cantități neînsemnate de peptide. Elucidarea cauzelor acestui comportament neobișnuit al fazeolinei prezintă un deosebit interes teoretic și practic.

Între timp, au fost detectate alte proteinaze cisteinice de tip papinic în semințele încolțite de mazărice [5,11] ale căror relații cu alte proteinaze și rolul lor la germinarea semințelor nu sunt clare. Rezultate asemănătoare au fost obținute și pentru alte plante [6]. Informația despre aceste proteinaze este fragmentară și nu există nici o plantă pentru care să fie caracterizate toate proteinazele.

În această ordine de idei, cercetarea (purificarea și caracterizarea) proteinazei A din fasole, precum și a altor proteinaze ce participă la mobilizarea PR, prezintă un interes deosebit în vederea clarificării funcțiilor ei (lor) în acest proces.

Material și metode

Material. Fazeolina a fost izolată din semințele de fasole după metoda lui Schlesier și al. [16]. Vicilina din mazărice a fost izolată după cum a fost descris anterior în [14].

Proteinaza CPPH din fasole și proteinaza A din mazărice au fost purificate după cum a fost descris anterior de Rotari și al. [14] și de Becker și al. [2].

DEAE-sefaroza și CM-sefaroza, pentru cromatografia pe schimbători de ioni, au fost procurate de la Pharmacia (Uppsala, Suedia).

Determinarea activității proteolitice s-a efectuat după metoda TNBS (acidul 2,4,6-trinitrobenzosulfonic), după cum a fost descris anterior în [14].

Proteoliza fazeolinei. Fazeolina (2%) în soluție-tampon 120 mM fosfat-citrat, care conținea 180 mM NaCl, pH 4,6, a fost amestecată cu un volum egal de protează A (100 mU ml⁻¹) în soluție-tampon 200 mM fosfat

de sodium, pH 6,5. Ambele soluții-tampon conțineau 2 mM DTT, 500 μ M EDTA și 0,02% NaN_3 . Reacția a fost incubată timp de 42 ore la 30°C, luându-se probe la anumite intervale de timp.

Electroforeza în gel de poliacrilamidă (GPAA). Electroforeza în prezența dodecil-sulfatului de sodium (SDS) (SDS-electroforeză) a fost efectuată în GPAA de 12,5% conform metodei Laemmli [8]. Fosforilaza b (94 kDa), albumina serului bovin (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anhidraza carbonică (30 kDa), inhibitorul Kunitz al tripsinei din soia (20,1 kDa) și α -lactoglobulina (14,4 kDa) au fost folosite ca standarde pentru determinarea masei moleculare (M_r). Gelurile au fost colorate cu Coomassie brilliant blue G-250 conform procedurii standard.

Electroforeza în condiții native în gradientul GPAA a fost efectuată într-un gradient vertical (4-30%) al GPAA folosind sistema de soluție-tampon 90 mM Tris-borat, pH 8,4. Electroforeza a durat 4500 Vh. Feritina (440 kDa), catalaza (232 kDa) și albumina serului bovin (67 kDa) au fost folosite ca standarde pentru determinarea M_r . Procentul proteinei reziduale a fost calculat din descreșterea M_r . Gelurile au fost colorate cu Coomassie brilliant blue R-250 conform procedurii standard.

Analiza western blotting. Benzile proteice au fost transferate din GPAA pe membrane PVDF prin metoda electroblot. Analiza western blotting a fost efectuată după metoda standard [15].

Anticorpii împotriva proteinazei A din mazărice au fost preparați în felul următor. Aproximativ 1 mg de proteinază A [2] a fost purificată prin SDS-electroforeză. După care gelurile au fost colorate puțin, banda proteinazei A tăiată și proteina eluată din gel prin electroeluare. Antisera a fost obținută în iepuri prin injectarea intradermală a proteinazei A emulsificate cu un volum egal de adjuvant complet al lui Freund, după cum e descris de Sambrook și al. [15].

Secvenarea amino-terminală. Proteinaza A din fasole, precum și fragmentele formate în urma proteolizei fazeolinei, au fost separate prin SDS-electroforeză, transferate pe membrane PVDF și secvenate cu ajutorul secvenatorului LF3400 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA) [17].

Purificarea proteinazei A din semințele germinate de fasole. Semințele de fasole au fost muiate în apă distilată timp de 2 ore și germinate la întuneric pe hârtie umedă la 25°C. Cotiledoanele au fost detașate la a șasea zi de germinare și liofilizate. Cotiledoanele liofilizate (30 g) au fost măcinate și extrase cu 300 ml H_2O care conținea 4 mM DTT. pH-ul extractului a fost adus la 4,0 și precipitatul înlăturat. Supernatantul primit a fost introdus într-o coloană de CM-sefaroză (14,0x2,6 cm) echilibrată cu soluție-tampon 10 mM acetat de sodium, pH 4,0. Enzima a fost eluată în aceeași soluție-tampon, numai că avea un pH 4,9. Frațiile active, eluate la pH 4,75, au fost unite, pH-ul a fost adus la 6,5 și introduse într-o coloană de DEAE-sefaroză (4,5x0,8 cm), echilibrată cu soluție-tampon 50 mM fosfat de sodium, pH 6,5 care conținea 40 mM NaCl. Coloana a fost eluată cu un gradient de NaCl (40-340 mM) în aceeași soluție-tampon. Procedura de purificare a fost efectuată la 4°C și toate soluțiile conțineau 2 mM DTT, 500 μ M EDTA și 0,02% NaN_3 . Proteina a fost determinată prin metoda Bradford [4] la toate etapele purificării.

Rezultate și discuții

Cercetarea proteinazei CPPH din fasole [14] a demonstrat că ea se deosebește considerabil de proteinaza A din mazărice. De aceea, la investigarea proteinazei, care să efectueze hidroliza profundă a fazeolinei, am reieșit din presupunerea despre existența în semințele germinate de fasole a proteinazei care să se asemene mai mult cu proteinaza A din mazărice [13]. Analiza western blotting cu anticorpi față de proteinaza A din mazărice a demonstrat că în extractele cotiledoanelor de fasole este prezentă o bandă proteică cu M_r apropiată de 35 kDa (nu este arătat). Pe baza acestor experiențe prelabile, pentru purificarea acestei proteinaze am încercat o schemă din trei etape (Tab.I), care includea:

1. Purificarea preliminară prin precipitarea izoelectrică a extractului la pH 4,0.
2. Cromatografia izocratică pe CM-sefaroză.
3. Cromatografia cu gradient de concentrație NaCl pe DEAE-sefaroză.

Spre deosebire de proteinaza A din mazărice, proteinaza A din fasole nu se coprecipită cu proteinele la pH 4,0. La cromatografia pe CM-sefaroză, enzima adsorbită era eluată de mărirea pH-ului de la 4,0 la 4,9, care, probabil, aduce la reîncărcarea proteinazei A din fasole și, ca rezultat, la desorbția ei de pe schimbătorul de ioni la pH 4,75. Este posibil de asemenea că se pierde afinitatea enzimei către proteinele de balast. La cromatografia pe DEAE-sefaroză proteinaza A din fasole se elua în diapazonul de tărie ionică 0,35-0,45, separându-se de impurități. Schema dată fiind compusă din două tipuri complet diferite de schimbători de ioni permite înlăturarea eficientă a proteinelor de balast, ceea ce simplifică cu mult procedura de purificare, care necesită doar două etape cromatografice.

Tabel

Schema purificării proteinazei A

	V, ml	Proteina		Purificarea, de n ori	Activitatea		
		mg	%		mU	%	mU/mg
Extract	270	841,00	100,00	1	-	-	-
Supernatant, pH 4,0	330	154,00	18,30	5	-	-	-
CM-sepharoza	29	1,40	0,16	600	457	100	326
DEAE-sepharoza	5	0,13	0,02	6469	96	21	738

Enzima a fost purificată de 6469 ori cu un randament de 21%. Aceste valori sunt relative, deoarece activitatea proteinazei A în extract, care conține și alte proteinaze, nu putea fi determinată. De aceea, am determinat purificarea după scăderea concentrației proteinei, iar activității enzimatice detectate i-am atribuit valoarea de 100% doar la etapa a treia de purificare. Preparatul obținut al enzimei pare a fi pe deplin omogen după datele SDS electroforezei (Fig.1). Banda proteică ocupă poziția ce corespunde M_r 35 kDa (Fig.1) și arată o reacție intensă cu anticorpii față de proteinaza A din mazărice (Fig.2). Spre deosebire de proteinaza A din mazărice, care la separarea electroforetică reprezintă două benzi [2], proteinaza A din fasole reprezintă numai o singură bandă. De asemenea, se deosebesc și M_r , care sunt de 29 kDa la mazărice [2] și de 35 kDa la fasole.

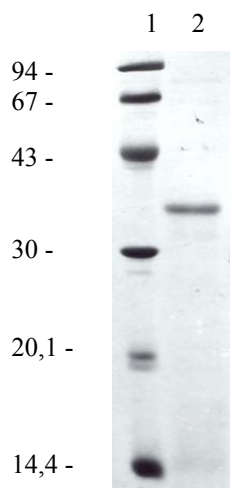


Fig.1. Electroforeza proteinazei A din fasole:

1 – proteinele standard; 2 – proteinaza A
(M_r ale proteinelor standard (în kDa) sunt arătate la stânga).

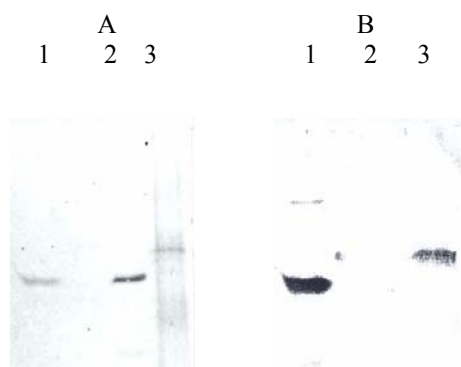


Fig.2. Analiza western blotting a proteinazei A din fasole.

SDS-electroforeza (A) și analiza western blotting (B):

1 – proteinaza A din mazărice;
2 – proteinaza CPPH din fasole;
3 – proteinaza A din fasole.

Secvenarea proteinazei A a determinat următoarea secvență amino-terminală: VPPSVDWR. La compararea secvenței amino-terminale a proteinazei purificate cu secvențele amino-terminale ale altor proteinaze din semințe s-a stabilit că ea se aseamănă cu endopeptidazele cisteinice: proteinaza A din mazărice [2] și EP-C1 din păstăile de fasole [20] au o secvență amino-terminală identică cu aceasta din urmă. Proteinaza EP-C1, care este proteinaza principală a păstăilor de fasole, avea, după datele SDS-electroforezei, M_r egală cu 34 kDa, ceea ce coincide practic cu rezultatele noastre. Evident, aceste proteinaze sunt foarte apropiate una de alta. Astfel, analiza secvențelor amino-terminale demonstrează că proteinaza A din semințele de fasole aparține familiei papainice a proteinazelor cisteinice.

Spre deosebire de semințele germinate de mazărice, unde proteinaza A are cea mai mare activitate proteolitică, proteinaza A din semințele de fasole nu este cea mai activă, având o activitate relativ mică atât în comparație cu CPPH [14], cât și cu legumaina [17].

La acțiunea proteinazei A asupra fazeolinei s-a observat (după rezultatele SDS-electroforezei) dispariția benzilor ce corespund catenelor polipeptidice ale fazeolinei native și apariția a trei fragmente principale cu M_r de aproximativ jumate de subunitate (Fig.3). După 30 min. de hidroliză se formează o bandă; după 2 ore –

o bandă (și încă una foarte slabă); după 24 ore – 3 benzi, care au fost notate F1-F3 conform descreșterii M_r . Fragmentele F1 și F3 apar doar după 24 ore de hidroliză, atunci când subunitățile fazeolinei sunt scindate practic complet. La acțiunea ulterioară a proteinazei (în decurs de 42 ore) nu se produc schimbări în cantitatea proteinei hidrolizate și nici în componența fragmentelor formate (Fig.3).

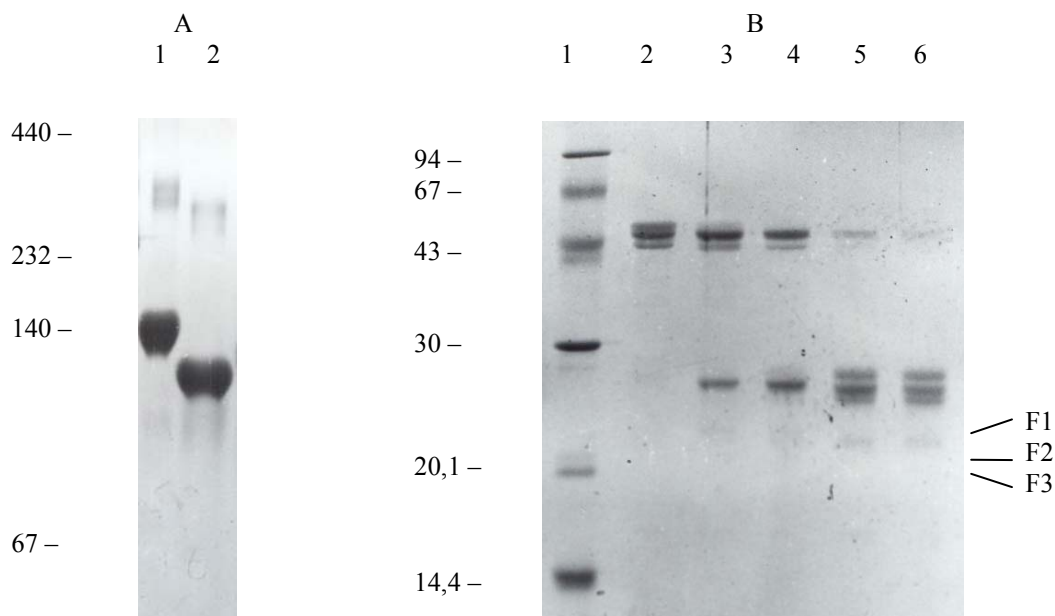


Fig.3. Spectrul electroforetic al fazeolinei pe parcursul desfășurării hidrolizei ei la acțiunea proteinazei A din fasole.

- A. Electroforeza în gradient al GPAA: 1 – 0 ore; 2 – 42 ore (M_r ale proteinelor standard (în kDa) sunt arătate la stânga);
 B. SDS-electroforeza: 1 – proteinele standard (M_r (în kDa) sunt arătate la stânga); 2-6 – 0, 0,5, 2, 24 și 42 ore.

Rezultatele secvenării terminațiilor aminice ale fragmentelor fazeolinei denotă că aceste fragmente au următoarele secvențe aminoacidice: F1 (27,7 kDa) – KQDNTIG, F2 (26,6 kDa) – nu a fost determinat, F3 (24,8 kDa) – TSLREEEE. Aceste rezultate atestă că este clivată legătura peptidică S216-K217 (aici și mai departe numerotarea se efectuează după subunitatea β a fazeolinei) din linkerul dintre domene [9]. Un fragment aparține domeniului C, altul, cu M_r mai mică – domeniului N al subunității fazeolinei. Al treilea fragment nu a fost identificat, dar colorarea pentru glicozilare arată că ambele benzi inițiale sunt glicozilate, pe când numai două din trei fragmente formate sunt colorate (nu este arătat). Luând în considerare locul legăturii peptidice scindate, aceasta arată că el aparține capătului carboxi-terminal și poate fi explicat prin deosebirile în gradul de glicozilare a subunităților fazeolinei [19].

Electroforeza în gradient al GPAA arată că M_r a fazeolinei modificate *in vitro* de proteinaza A constituia 133 kDa (Fig.3), sau 95% din masa fazeolinei native. Deci, numai 5% din masa moleculei a fost pierdută la hidroliza fazeolinei de către proteinaza A, ceea ce explică schimbarea M_r a fazeolinei.

Astfel, proteinaza A hidrolizează fazeolina nativă *in vitro* catalizând doar proteoliza limitată a acestui substrat. Metoda folosită nu permite detectarea schimbărilor la capătul carboxi-terminal al subunităților fazeolinei. Însă, este posibil ca câteva legături peptidice să fi fost scindate în segmentele carboxi-terminale dezordonate.

Acțiunea proteinazei A asupra fazeolinei se aseamănă cu acțiunea proteinazei CPPh [14], numai că în cazul proteinazei A se formează doar trei fragmente, comparativ cu patru în cazul proteinazei CPPh, iar M_r a oligomerului fazeolinei se micșorează doar cu 5%, comparativ cu 8,6% în cazul proteinazei CPPh [14].

Pe de altă parte, toate proteinazele A izolate sunt capabile să scindeze PR până la peptide scurte [2,18]. Aceste rezultate demonstrează că fasolele și mazăricea diferă în interacția dintre proteinele lor 7S de rezervă și proteinazele A în decursul germinării. Rezistența înaltă bine cunoscută a fazeolinei la proteoliză [7,14,17,22] trebuie să fie relatată la particularitățile structurale ale fazeolinei.

Oprirea hidrolizei fazeolinei doar după scindarea unei părți neînsemnate de proteină demonstrează că, spre deosebire de celelalte PR, la a căror degradare se observă decurgerea paralelă a proteolizei după mecanismul consecutiv și unul-câte-unul [21], la acțiunea proteinazei A asupra fazeolinei proteoliza are loc doar după mecanismul consecutiv. Toată scindarea proteinei este determinată de îndepărtarea peptidelor scurte prin proteoliza limitată.

Astfel, aceste rezultate arată că stabilitatea fazeolinei la hidroliza enzimatică este determinată de proteina însăși. Prin urmare, cauza deosebirilor manifestate trebuie căutată în particularitățile structurii fazeolinei.

Structura fazeolinei este determinată cu un grad înalt de rezoluție [9]. Pe baza acestor date și a alinierii a 15 structuri primare cunoscute a proteinelor de rezervă 7S, a fost propus modelul canonic al structurii terțiare [9].

Molecula fazeolinei este alcătuită din trei subunități. Fiecare subunitate include două domene structurale foarte asemănătoare (amino- și carboxi-terminale), unite printr-un linker interdomenic. Fiecare domen este reprezentat de un β -barrel (β -butoiș, compus din 8 β -structuri principale și 5 suplimentare) și α -structură (3 α -helixuri aranjate consecutiv). Două α -helixuri ale fiecărui domen ies pe părțile opuse ale fiecărei subunități în formă de cârlig și joacă un rol important la stabilizarea oligomerului fazeolinei.

Mărimea fragmentelor formate la hidroliza fazeolinei de proteinaza A constituie aproximativ jumătate din subunitate. Mărimea fragmentelor, precum și lipsa produșilor intermediari ai scindării subunităților, arată că atacului proteolitic pot fi supuse numai sectoarele relativ scurte terminale și cel central. Secvenarea amino-terminală a fragmentelor și compararea lor cu structura primară a subunităților fazeolinei a demonstrat că Ser216 reprezintă aminoacidul din poziția P1 a situsului scindării. Legătura peptidică scindată S217-K218 este situată în linkerul interdomenic.

Scăderea M_r a fazeolinei la acțiunea proteinazei A (Fig.3) arată că suma maselor moleculare ale peptidelor îndepărtate trebuie să constituie aproximativ 2,3 kDa la fiecare subunitate, ceea ce este mai puțin decât în cazul proteinazei CPPH [14]. Este evident că scindarea peptidelor trebuie să aibă loc la capătul carboxilic, deoarece diminuarea M_r a oligomerului nu poate avea loc la schindarea doar a legăturii peptidice identificate.

Structura cuaternară a PR poate avea o importanță deosebită pentru prevenirea proteolizei premature la maturizarea semințelor. Totodată, ea nu trebuie să împiedice mobilizarea PR la germinarea semințelor, care este un proces tot așa de regulat ca și depunerea rezervelor de proteine. Astfel, putem admite că particularitățile proteolizei fazeolinei la acțiunea proteinazei A, ca și la acțiunea altor proteinaze endogene [3,14] și exogene [7,12], sunt determinate de deosebirea structurală a fazeolinei de alte proteine 7S.

Trei proteinaze cisteinice, notate proteinaza A, CPPH [14] și legumaina [17], au fost purificate din semințele germinate de fasole și parțial caracterizate. Proteinaza A și CPPH din fasole sunt asemănătoare proteinazei A [2] și CPR1 [1] din mazărice și, respectiv, aparțin endopeptidazelor cisteinice de tip papainic. Legumaina aparține endopeptidazelor cisteinice legumainice și este apropiată de proteinaza B din mazărice [17]. Deci, aceste endopeptidaze cisteinice, conform datelor structurilor primare, sunt asemănătoare celor din semințele germinate de mazărice; dar, spre deosebire de ele, acțiunea lor asupra fazeolinei se deosebește considerabil. Dacă proteinaza A din mazărice este capabilă de scindare completă a vicilinei, proteinei 7S de rezervă din mazărice, atunci proteinaza A din fasole are o acțiune limitată asupra fazeolinei.

Un alt moment interesant îl reprezintă faptul că proteinaza A din fasole aparent participă la două procese fiziologice diferite, precum ar fi scindarea PR la germinarea plantelor și mobilizarea nitrogenului din păștile de fasole la maturizarea semințelor [20]. Aceasta prezintă un interes deosebit, deoarece participarea unei și aceleași enzime la diferite etape ontologice de dezvoltare este un fenomen rar. În această ordine de idei, cercetarea importanței proteinazei A pentru diferite procese fiziologice în diferite organe ale plantei prezintă un interes deosebit.

Fragmentele fazeolinei modificate proteolitic în decursul germinării semințelor de fasole au secvențe amino-terminale identice cu cele obținute la incubarea fazeolinei native cu legumaina [17]. Nu au fost detectate fragmente care corespund acțiunii proteinazei A sau CPPH. Prin aceasta fasolele se deosebesc de schema propusă de Shutov și Vaintraub [18], ceea ce demonstrează că la diferite plante proteinaze asemănătoare pot avea funcții diferite și aceste funcții încă urmează a fi determinate.

Referințe:

1. Becker C., Fischer J., Nong V.H. and Müntz K. PCR cloning and expression analysis of cDNAs encoding cysteine proteinases from germinating seeds of *Vicia sativa* L. // Plant Mol. Biol. - 1994. - Vol.26. - P.1207-1212.

2. Becker C., Senyuk V.I., Shutov A.D., Nong V.H., Fischer J., Horstmann C. and Müntz K. Proteinase A, a storage globulin degrading endopeptidase of vetch (*Vicia sativa* L.) seeds, is not involved in early steps of storage protein mobilization // Eur. J. Biochem. - 1997. - Vol.248. - P.304-312.
3. Boyland M.T. and Sussex I.M. Purification of an endopeptidase involved with storage protein degradation in *Phaseolus vulgaris* L. cotyledons // Planta. - 1987. - Vol.170. - P.343-352.
4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analyt. Biochem. - 1976. - Vol.72. - P.248-254.
5. Fischer J., Becker C., Hillmer S., Horstmann C., Neubohn B., Schlereth A., Senyuk V., Shutov A. and Müntz K. 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. - 2000. - Vol.43. - P.83-101.
6. Granell A., Cercos M., Carbonell J. Plant cysteine proteinases in germination and senescence - In: Handbook of Proteolytic Enzymes, Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F., eds. Academic Pr Inc., 1999.
7. Jivotovskaya A., Senyuk V., Rotari V., Horstmann C. and Vaintraub I. Proteolysis of phaseolin in relation to its structure // J. Agr. Food Chem. - 1996. - Vol.44. - P.3768-3772.
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. - 1970. - Vol.227. - P.680-685.
9. Lawrence M.C., Izard T., Beuchat M., Blagrove R.J. and Colman P.M. Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution. Implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins // J. Mol. Biol. - 1994. - Vol.238. - P.748-776.
10. Müntz K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds // J. Exp. Bot. - 1996. - Vol.47. - P.605-622.
11. Müntz K., Becker C., Pancke J., Schlereth A., Fischer J., Horstmann C., Kirkin V., Neubohn B., Senyuk V., Shutov. A Protein degradation and nitrogen supply during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.) // J. Plant Physiol. - 1998. - Vol.152. - P.683-691.
12. Nielsen S.S., Deshpande S.S., Hermodson M.A., Scott M.P. Comparative digestibility of legume storage proteins // J. Agr. Food Chem. - 1988. - Vol.36. - P.896-902.
13. Rotari V. Proteinaza cisteinică din semințele germinate de fasole și acțiunea ei asupra proteinelor 7S din fasole și mazărice: Teza de doctor în biologie. - Chișinău, 1996.
14. Rotari V., Senyuk V., Jivotovskaja A., Horstmann C. and Vaintraub I. Proteinase A-like enzyme from germinated kidney bean seeds. Its action on phaseolin and vicilin // Physiologia Plantarum. - 1997. - Vol.100. - P.171-177.
15. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. - New-York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
16. Schlesier B., Manteuffel R., Armin R., Jüttner G. A simple method for preparation of phaseolin // Biochem. Physiol. Pflanz. - 1984. - Vol.179. - P.665-678.
17. Senyuk V., Rotari V., Becker C., Zakharov A., Horstmann C., Müntz K., Vaintraub I. Cysteine proteinases from kidney bean seedlings // Analele Științifice ale Universității de Stat din Moldova. - 1998. - P.143-147.
18. Shutov A.D. and Vaintraub I.A. Degradation of storage proteins in germinated seeds // Phytochemistry. - 1987. - Vol.26. - P.1557-1566.
19. Sturm A., Van Kuikll J.A., Vliegenthartll J.F.G., and Chrispeels M.J. Structure, position, and biosynthesis of the high mannose and the complex oligosaccharide side chains of the bean storage protein phaseolin // J. Biol. Chem. - 1987. - Vol.262. - P.13392-13403.
20. Tanaka T., Yamauchi D. and Minamikawa T. Nucleotide sequence for endopeptidase (EP-C1) from pods of maturing *Phaseolus vulgaris* fruits // Plant Mol. Biol. - 1991. - Vol.16. - P.1083-1084.
21. Vaintraub I.A. Kinetics of co-operative proteolysis // Nahrung. - 1998. - Vol.42. - P.59-60.
22. Zakharov A., Carchilan M., Stepurina T., Rotari V., Wilson K., and Vaintraub I. A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins // J. Exp. Bot. - 2004. - Vol.55. - P.2241-2249.

Prezentat la 20.06.2007