

## PROLINDEHYDROGENASE AUS KEIMENDEN FARNSPOREN\*

ARMIN R. GEMMRICH†

Botanischers Institut der Justus Liebig-Universität Gießen, Deutschland

(Eingegangen 29 Mai 1974)

**Key Word Index**—*Anemia phyllitidis*; Schizaeaceae; fern; proline dehydrogenase; proline; germination.

**Abstract**—A soluble enzyme which converts proline to glutamic acid using NAD as coenzyme was isolated from young prothallia and spores of the fern *Anemia phyllitidis*. The purification was about 36-fold. The pH optimum is between 10.2 and 10.7; the  $K_m$  for proline is  $4.6 \times 10^{-4}$  M and for NAD  $3.4 \times 10^{-4}$  M. There are no multiple forms of this enzyme, as proved by gel electrophoresis.

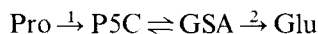
**Zusammenfassung**—Ein Enzym, das Prolin mit NAD als Coenzym in Glutaminsäure umwandelt, wurde aus jungen Farnprothallien und Sporen isoliert und 36-fach angereichert. Das Enzym wurde in der löslichen Fraktion gefunden. Das pH-Optimum liegt zwischen pH 10,2 und 10,7; die  $K_m$ -Werte sind für Prolin  $4,6 \times 10^{-4}$  M und für NAD  $3,4 \times 10^{-4}$  M. Gelelektrophoretische Trennung ergibt keinen Hinweis auf multiple Formen.

### EINLEITUNG‡

Ein hoher Gehalt an freiem Prolin ist charakteristisch für die Sporen von Mikroorganismen [1] und Farnen [2,3] ebenso wie für die Pollen der höheren Pflanzen [4]. Bei den Sporen des Farnes *Anemia phyllitidis* nimmt der Gehalt an freiem Prolin, der hier 55% der freien Aminosäuren ausmacht, während der ersten drei Tage der Sporenkeimung signifikant ab [3]. Der parallele Anstieg der Glutaminsäurekonzentration legt eine metabolische Beziehung auch bei Farnpflanzen nahe.

Untersuchungen des enzymatischen Prolinabbaues an Mikroorganismen [5–8] und tierischen Geweben [9–14] ergeben infolge unterschiedlicher Präparations- und Testmethoden ein etwas verwirrendes Bild. Während die früheren Arbeiten mit Enzymkomplexen, dem Cyclophorasesystem aus Nierengewebe [9] oder dem Prolin-Oxydase-Komplex aus Rattenleber [10,11] einen vollständigen Abbau von Prolin via Glutaminsäure zu  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  beschreiben, werden in den

neueren Arbeiten [12–14] zwei Enzymschritte im Prolinabbau zu Glutaminsäure unterschieden.



1. Pyrroline-5-carboxylate reductase (L-Prolin: NAD (P) 5-oxidoreductase) E.C. 1.5.1.2.

2. Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (Pyrroline-5-carboxylate: NAD (P) oxidoreductase) E.C. 1.2.1a. Im Gegensatz hierzu wird in höheren Pflanzen der Prolinabbau von nur einem Enzym der NAD-abhängigen Prolin-Dehydrogenase [15,16] (PDH) katalysiert.

Der intensive Prolin-Stoffwechsel in keimenden Farnsporen bietet sich für eine vergleichende Enzymanalyse an. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Eigenschaften des Enzyms, das in jungen Farnprothallien die NAD-abhängige Oxidation von Prolin katalysiert.

### ERGEBNISSE

#### Extraktion und Reinigung

Ein Enzym, das NAD in der Anwesenheit von Prolin reduziert, kann sowohl aus trockenen Sporen als auch aus jungen Prothallien von *Anemia phyllitidis* isoliert werden. Dabei ist zur Absorption der bei Farnen in hoher Konzentration vorliegenden Phenole und Polyphenole PVP (0,2 g

\* Die vorliegende Arbeit ist Teil einer Dissertation, die unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Schraudolf im Fachbereich Biologie der Justus Liebig-Universität Gießen angefertigt wurde.

† Anschrift des Verfassers: Universität Ulm, Abteilung Biologie II, D-7900 ULM (DONAU), Oberer Eselsberg.

‡ Abkürzungen: PDH = Prolindehydrogenase; P5C = Pyrrolin-5-carbonsäure; GSA = Glutaminsäure-semialdehyd; GDH = Glutamatdehydrogenase.

Tabelle 1. Zusammenstellung der Enzymreinigung

	Volumen (ml)	Protein (mg)	Gesamtaktivität (U)	Spez. Akt. (U/mg)	Reinigung
Rohenzym	164	147	1708	11.6	1
Überstand der Protaminsulfatfällung 30–60%	172	105	—	—	—
Ammoniumsulfatfällung DEAE-Cel	10	12	1570	131	11
Trennung Eluat	6.4	0.8	335	420	36

Reinigungsschritte und Enzymsatz sind in Material und Methoden beschrieben.

pro g Frischgewicht) erforderlich. Zum Schutze der SH-Gruppen erweist sich die Anwesenheit von  $10^{-2}$  M 2-Mercaptoäthanol im Extraktionspuffer als wirksam. Mit den Standardbedingungen wird das Enzym aus der löslichen Fraktion der Zelle extrahiert. Der Bestimmung der Aktivität im Rohenzym muß eine kurze Dialyse zur Entfernung evtl. vorhandenen Substrates vorangehen. Die Ergebnisse einer typischen Reinigung des Enzyms sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die folgenden Ergebnisse wurden mit Enzym nach der Ammoniumsulfatfällung erhalten.

#### Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden verschiedene Puffersysteme gleicher Molarität getestet. Gleiche Wirksamkeit wurde mit CAPS-Puffer und Glycinpuffer erzielt. Ein breites pH-Optimum wurde pufferunabhängig zwischen pH 10.2 bis 10.7 gefunden. Jedoch konnte auch noch bei pH 8.0 in Tris-Puffer geringe Aktivität gemessen werden. Das pH-Optimum ist von der Reinigungsstufe unabhängig. Die Enzymaktivität steht in linearer Korrelation mit der Enzymmenge und mit der Zeit während der ersten 5 bis 10 Min. Die Umsetzung kann mit den Gesetzen von Michaelis und Menten beschrieben werden. Die  $K_m$ -Werte wurden für Prolin und NAD bei pH 10.3 für Prolin mit  $4.6 \times 10^{-4}$  M bei Sättigung mit NAD (2 mM) und für NAD mit  $3.4 \times 10^{-4}$  M bei Sättigung mit Prolin (3 mM) graphisch bestimmt.

#### Substratspezifität

Das Enzym weist eine weitgehende Substratspezifität für L-Prolin auf. Weder das stereoisomere D-Prolin noch die analoge Verbindung Acetidin-2-carbonsäure werden umgesetzt. Weitere Amino-

säuren wie Alanin, Arginin, Glutamin und Hydroxyprolin sind im Standardansatz vollkommen inaktiv. Der Ersatz von NAD durch NADP hat einen vollständigen Aktivitätsverlust zur Folge. Die bei keimenden Erdnüssen beschriebene Hemmwirkung von niederen NADP-Konzentrationen [15] konnte bei der PDH aus *Anemia* nicht beobachtet werden. Glutaminsäure wird bei pH 10.3 vom Rohenzym etwas, vom gereinigten Enzym der Ammoniumsulfatfällung jedoch nicht mehr umgesetzt. Bei pH 8.2 im Tris-Puffer kann auch mit dem gereinigten Enzym noch eine geringe Aktivität gemessen werden. Diese Umsetzung ist der Glutamatdehydrogenase zuzuschreiben, die auch bei *Anemia* nachgewiesen werden konnte.

#### Hemmung der PDH mit SH-Antagonisten und Substratanaloga

Bei Anwesenheit von 2-Mercaptoäthanol im Ansatz sind SH-Gruppen-schützende Verbindungen wie Glutathion (1 mM) oder Dithioerythrit (1 mM) ohne Einfluß auf die PDH-Aktivität. Die Wirkung von spezifischen SH-Gruppenbindenden Hemmstoffen auf die PDH-Aktivität ist in Tabelle 2 zusammengestellt. Die mercaptitbildende Verbindung CMBA bewirkt bei einer Konzentration von  $4 \times 10^{-3}$  M eine 100%ige Hemmung. Diese Wirkung ist teilweise reversibel; durch Glutathion oder Cystein kann das Enzym reaktiviert werden. Die alkylierende Substanz JAA bewirkt nach 20 min Vorinkubation eine 81%ige, nicht mehr reversierbare Hemmung. Diese Ergebnisse, sie wurden mit Enzym nach Ammoniumsulfatfällung gewonnen, geben einen starken Hinweis auf die Anwesenheit von SH-Gruppen im aktiven Zentrum der PDH. Untersuchungen mit möglichen kompetitiven Substraten wie NADP (3

Tabelle 2. Wirkung von *p*-Chlormercuribenzoessäure (CMBA) und Jodacetamid (JAA) auf die PDH-Aktivität

	Hemmung (%)	Reaktivierung
$4 \times 10^{-4}$ M CMBA	100	73% mit $4 \times 10^{-3}$ M Glutathion
$4 \times 10^{-4}$ M CMBA	100	58% mit $4 \times 10^{-3}$ M Cystein
$4 \times 10^{-5}$ M CMBA	0	—
$4 \times 10^{-2}$ M JAA	81	—
$4 \times 10^{-3}$ M JAA	50	—

mM, 0,3 mM) D-Prolin (3 mM) Acetidin-2-carbonsäure (3 mM) und Glutaminsäure (3 mM) ergeben keine Hemmung und Förderung der Enzymaktivität durch diese Substanzen.

#### Stabilität der Prolindehydrogenase

Nicht dialysiertes Rohenzym und nicht dialysiertes Enzym der Ammoniumsulfatfraktion ist mehrere Tage im Kühlschrank ohne größeren Aktivitätsverlust haltbar. Eine Dialyse (12 Stunden bei 2° gegen den Extraktionspuffer) hat immer einen geringen Aktivitätsverlust zur Folge, dagegen ergibt eine Kurzdialyse bis 5 Stunden bei Raumtemperatur ein vollaktives Enzym.

#### Umsetzungsprodukt

Der Ansatz zur Bestimmung des Reaktionsproduktes enthielt folgende Zusammensetzung: 10  $\mu$ l Prolin [ $U\text{-}^{14}C$ ] (0,5  $\mu$ Ci = 5 nM Prolin), 10  $\mu$ l NAD (0,4 nM), 30  $\mu$ l Enzym der Ammoniumsulfatfraktion und 20  $\mu$ l CAPS-Puffer pH 10,3. Die Kontrolle enthielt kein NAD. Inkubiert wurde bei Raumtemperatur 30 Minuten, danach mit Methanol (1:1) die Reaktion gestoppt und 5  $\mu$ l punktförmig auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Die Trennung erfolgte in verschiedenen Laufmittelsystemen. Eine Umsetzung konnte nur in dem Ansatz mit NAD beobachtet werden. Der, infolge der geringen spezifischen Aktivität des radioaktiven Prolins kleine Umsetzungsspeak konnte nur in einem Laufmittelsystem (*n*-PrOH-NH<sub>3</sub>, 33:18) eindeutig durch Vergleich mit dem  $R_f$ -Wert der Referenzsubstanz als Glutaminsäure identifiziert werden.

#### Elektrophorese an Polyacrylamidgelen

Substratfärbungen mit Prolin ergeben eine Bande und mit Glutaminsäure drei bis vier Banden. Die Kontrolle ohne Substrat und der

Ansatz mit Glutamin oder Hydroxyprolin als Substrat zeigen keine Färbung. Dagegen ergeben sich mit Glutaminsäure als Substrat drei bis vier Banden unterschiedlicher Intensität. Die Möglichkeit, daß die mit Prolin aufgetretene Bande auf einer unspezifischen Reaktion einer Form der Glutamatdehydrogenase beruht, konnte durch Trennung bei verschiedenen Gelkonzentrationen und anschließender Substratfärbung mit Prolin oder Glutaminsäure ausgeschlossen werden.

Daraus, daß bei keiner Gelkonzentration Banden mit demselben *R<sub>m</sub>*-Wert auftreten (Tabelle 3) ergibt sich, daß in *Anemia* die PDH und die GDH zwei verschiedene Enzyme mit enger Substratspezifität sind.

#### DISKUSSION

Der hier an Farnprothallien und Sporen beschriebene Weg des Prolinabbaues steht im Einklang mit den Ergebnissen die mit Enzym aus Kotyledonen gekeimter Erdnüsse [15], mit Enzym aus Weizenkeimen [16] und auch mit löslichem Enzym aus Hefe [8] gewonnen wurden. Da wir dieselbe Reaktion, eine prolinabhängige Reduktion von NAD auch mit dialysiertem Rohenzymextrakt von *Pisum* und *Fomes annosus* gemessen haben, darf angenommen werden, daß die direkte NAD-abhängige Oxidation von Prolin, d.h., die nicht von der Prolinoxidase katalysierte Reaktion im Pflanzenreich weit verbreitet ist. Als Name für dieses neue pflanzliche Enzym wurde L-Prolindehydrogenase vorgeschlagen [15]. Obwohl Mazelis das Endprodukt nicht identifizieren konnte und auch unsere Bemühungen zu keinem gesicherten Ergebnis führten, kann aber auf Grund unserer Ergebnisse *in vivo* und den an Hefe gewonnenen Daten [8] mit Sicherheit angenommen werden, daß Glutaminsäure das Reaktionsprodukt der

Tabelle 3. *R<sub>m</sub>*-Werte der PDH und GDH nach elektrophoretischer Auftrennung an Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Konzentration

Gelkonzentration	7,5%		5%		3%	
	PDH	GDH	PDH	GDH	PDH	GDH
	0,09	0,12	0,17	0,19	1,24	0,25
		0,16		0,25		0,34

Trennung des Enzymrohextraktes aus gekeimten Sporen von *Anemia phyllitidis* an Polyacrylamidgelen.

Formazanfärbung mit Pro oder Glu als Substrat.

PDH ist. Ein weiterer Hinweis für das Vorkommen der PDH in höheren Pflanzen ergibt sich aus den Versuchen mit einem Enzym—der P5C-Reduktase—aus Kotyledonen angekeimter Samen von *Cucurbita* [21]. Als Produkt der Rückreaktion dieses Enzyms mit Prolin und NAD bei pH 10,3 wurde P5C durch Auffangen mit *o*-Aminobenzaldehyd erhalten. Ob die Reaktion ohne Einsatz von Aminobenzaldehyd bis zur Glutaminsäure gelaufen wäre, bleibt allerdings offen.

Im Gegensatz zur tierischen Prolinoxidase, die partikelgebunden vorliegt [9-11,13,14,22] findet sich die pflanzliche PDH in der löslichen Fraktion. In Hefen scheinen beide Enzyme vorzukommen. Während Ling und Hedrick [7] die Prolinoxidase aus der Mitochondrienfraktion bestimmen—die P5C-Dehydrogenase ist nicht partikelgebunden—konnten Lundgren und Ogur [8] ebenfalls in Hefeextrakten die direkte Oxidation von Prolin mit NAD als Wasserstoffakzeptor in der löslichen Fraktion messen. Hier stellt sich die Frage nach der Substratspezifität der P5C-Dehydrogenase. Die Möglichkeit, daß die vermeintliche PDH-Aktivität in Wirklichkeit auf einer unspezifischen Umsetzung der P5C-Dehydrogenase mit Prolin als Substrat beruht, kann nicht ausgeschlossen werden und muß in weiteren Versuchen mit hochreinem Enzym geklärt werden.

Vergleichende Betrachtung der Eigenschaften der *Anemia*-PDH und der PDH aus Erdnußkotyledonen ergeben ein sehr ähnliches Bild. Beide Enzyme sind nicht partikelgebunden. Ihr Wirkungsoptimum liegt bei pH 10,3. Die Substratspezifität ist eng auf L-Prolin beschränkt. Weder D-Prolin noch L-Acetidincarbonsäure oder Hydroxyprolin werden als Substrat angenommen oder wirken hemmend. Das *Anemia*-enzym hat einen  $K_m$ -Wert von  $4,6 \times 10^{-4}$  M für Prolin, das Erdnußenzym von  $3,0 \times 10^{-4}$  M.

Die Tatsache, daß bei der gelelektrophoretischen Untersuchung bei der PDH im Gegensatz zur GDH nur eine, durch Formazan angefärbte Bande erscheint, ermöglicht den Schluß, daß in *Anemia* keine durch Ladung oder Molekülgröße unterscheidbaren Isoenzyme vorliegen.

Da *in vivo* neben dem Einbau von Prolin ins Protein eine Umwandlung vornehmlich in Glutaminsäure nachgewiesen wurde [3], und *in vitro* eine enzymatische Oxidation von Prolin gemessen werden konnte, darf angenommen werden, daß der

Abbau von Prolin in der keimenden Spore von diesem Enzym katalysiert wird. Daraus, daß in Extrakten der trockenen, noch ruhenden Spore eine vergleichbar ähnliche Enzymaktivität gemessen wurde wie in Extrakten aus gekeimten Sporen oder Prothallien, ergibt sich eine Erklärung für die allmähliche Abnahme des Prolingehaltes in der nicht induzierten Dunkelspore. Allein durch die Veränderung der Hydratur in der Spore—*in vitro* geschieht dies durch die Lösung des Enzyms in Puffer—wird das Enzym aktiviert. Für den rapiden Prolinabbau in den induzierten Sporen am dritten Tag der Keimung sind jedoch andere Regulationsmechanismen zu fordern.

## EXPERIMENTELLES

*Anzucht der Prothallien.* Das Sporenmaterial stammt aus den Gewächshäusern des Botanischen Instituts der Justus Liebig-Universität Gießen. Die Kultur erfolgte bei  $23 \pm 1^\circ$  im kontinuierlichen Weißlicht (Leuchtstoffröhren Phillips TL 67 W/32 Warmton de Luxe,  $3 \times 10^4$  erg cm $^{-2}$  sec $^{-1}$ ). Es wurden etwa 1500 mg Sporen in Plastikschaalen (53  $\times$  43 cm) flottierend auf 1 Liter Nährlösung angezogen. Die Nährlösung—nach (17)—enthält pro Liter 0,25 g MgSO $_4$ , 1,0 g Ca(NO $_3$ ) $_2$ , 0,12 g KNO $_3$ , 0,25 g KH $_2$ PO $_4$  und eine Spur Eisenkomplex.

*Extraktion des Enzyms.* Der Extraktionspuffer hatte folgende Zusammensetzung:  $10^{-2}$  M Tris, pH 7,5;  $10^{-3}$  M EDTA;  $10^{-2}$  M 2-Mercaptoethanol. Vor der Extraktion wurden im vorgekühlten Porzellanmörser Polyvinylpyrrolidon (PVP) mit Extraktionspuffer (0,2 g PVP pro g Frischgewicht) vorgequollen. Die Prothallien wurden mit dieser Mischung, wenig Quarzsand und zusätzlichem Extraktionspuffer (ca 1 ml/g Frischgewicht) zerkleinert. Das Homogenat wurde durch Mullgaze gepreßt und 20 Min mit 30000 g bei 2 $^\circ$  zentrifugiert. Der Überstand stellt das Rohenzym dar. Alle Arbeiten wurden bei etwa 2 $^\circ$  durchgeführt.

*Enzymansatz.* Der Standardansatz zur Messung der Enzymaktivität enthielt folgende Komponenten: Puffer: 88 mM Cyclohexylaminopropansulfonsäure (CAPS) pH 10,3; 3 mM Prolin; 2 mM NAD und Enzym. Die Reaktion wurde in Glasküvetten (10 mm Schichtdicke) mit einem Endvolumen von 2,5 ml durchgeführt, wobei die Extinktionsänderung bei 340 nm mit einem registrierenden Spektralphotometer verfolgt wurde. Die Referenzküvette enthielt alle Komponenten außer NAD. In der Reaktionsküvette herrschte eine Temperatur von 33 $^\circ$ . Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats gestartet. Als Einheit der Enzymaktivität (U) ist diejenige Menge an Enzym definiert, die bei 340 nm eine Extinktionsänderung von 0,001 pro Minute bewirkt.

*Fraktionierung und Reinigung.* Das Rohenzym wurde mit einer 1%igen Protaminsulfatlösung (15 ml/100 ml Rohenzym) versetzt und nach 20 Min der Niederschlag abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde mit festem (NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$  fraktioniert. Das Protein, das zwischen 30 und 50% Sättigung ausfiel, wurde in geringem Volumen Extraktionspuffer gelöst und auf eine DEAE-Cellulose Säule (0,9  $\times$  10 cm) gegeben. Die Elution erfolgte mit einem linearen Puffergradienten von 0,01 M Tris pH 7,5 bis 0,7 M Tris. Die Extinktion des Eluats wurde im Durchfluß bei 280 nm aufgezeichnet.

*Disk-elektrophoretische Trennung an Polyacrylamidgelen.* Die elektrophoretische Trennung der verschiedenen Enzymfraktionen wurde in der Regel an 4% Gelen (7,5 cm; 6 mm  $\phi$ ) durchgeführt ([18], System Nr. 6). Die Proben (0,1 ml) wurden in 40%iger Saccharose aufgetragen und bei 3mA pro Gel aufgetrennt. Unmittelbar nach Beendigung der Trennung erfolgte die Formazanfärbung in einer Lösung mit folgender Zusammensetzung: Färbepuffer (1) 0,1 M Tris, pH 8,2. Bei höherem pH-Wert, der für die PDH optimaler gewesen wäre, tritt eine unspezifische Hintergrundfärbung auf. Substratlösung (2) 0,1 M Prolin bzw. 0,1 M Glu, Gln, Pro-OH im Färbepuffer gelöst. Färbelösung: 100 ml enthielten: 100 mg NAD, 35 mg MTT (3) [4,5-Dimethylthiazolyl(-2-) 2,5-diphenyltetrazoliumbromid] 4 mg PMS (Phenazinmethosulfat), 25 ml Färbepuffer (1), 25 ml Aqua bidest und 25 ml Substratlösung (2). Die Substratlösung wurde erst kurz vor Färbung zugemischt. Bei Raumtemperatur entwickelten sich die Formazanbanden in 1 bis 2 Stunden. Die Absorptionsspektren der jeweiligen Zymogramme wurden mit einem Gilford Spectrometer bei 600 nm aufgenommen.

*Proteinbestimmung.* Proteinkonzentrationen wurden mit der Biuretmethode [19] oder mit der Folinmethode [20] bestimmt.

#### LITERATUR

- Ramirez, C. und Miller, J. J. (1963) *Nature* **197**, 722.
- Courbet, H. und Metche, M. (1971) *C.R. Acad. Sci. Ser. D.* **272**, 1904.
- Schraudolf, H. und Gemmrich, A. R. (1974) in Vorbereitung.
- Britikov, E. A., Musatova, N. A., Vladimirtseva, S. V. und Protsenko, M. A. (1964) *Pollenphysiology and Fertilization* (Linskens, H. F., ed.), pp. 77–85. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Frank, L. und Ranhand, B. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* **107**, 325.
- De Hauwer, G., Lavalle, R. und Wiame, J. M. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 257.
- Ling, C.-M. und Hedrick, L. R. (1964) *J. Bact.* **87**, 1462.
- Lundgren, D. W. und Ogur, M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **297**, 246.
- Taggart, J. V. und Krakauer, R. B. (1949) *J. Biol. Chem.* **177**, 641.
- Lang, K. und Schmid, G. (1951) *Biochem. Z.* **322**, 1.
- Lang, K. und Lang, H. (1958) *Biochem. Z.* **329**, 577.
- Strecker, H. J. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 3218.
- Johnson, A. B. und Strecker, H. J. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 1876.
- Brosemer, R. W. und Veerabhadrapa, P. S. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* **110**, 102.
- Mazelis, M. und Fowden, L. (1971) *J. Exp. Bot.* **22**, 137.
- Mazelis, M. und Creveling, R. K. (1974) *Phytochemistry* **13**, 559.
- Mohr, H. (1956) *Planta* **47**, 127.
- Maurer, H. R. (1971) *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. de Gruyter, Berlin, New York.
- Schopfer, P. (1970) *Experimente zur Pflanzenphysiologie*, 153–155. Rombach, Freiburg.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
- Splittstoesser, S. A. und Splittstoesser, W. E. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1565.
- De Kort, C. A. D., Bartelink, A. K. M. und Schuurmans, R. R. (1973) *Insect. Biochem.* **3**, 11.