Tome 73, fascicule 2 (Hommage à Jakob Seiler), nº 10. — Mai 1966

Phosphatester der Aminosäuren Serin und Tyrosin sowie des Äthanolamins in *Drosophila melanogaster*

von

P. S. CHEN, F. HANIMANN und C. ROEDER-GUANELLA

Zoologisch-vergl. anatomisches Institut der Universität Zürich [1]

Mit 4 Textabbildungen.

Herrn Professor Dr. J. Seiler zum 80. Geburtstag gewidmet.

In unseren früheren Untersuchungen über den Stoffwechsel der Aminosäuren in *Drosophila melanogaster* fanden wir verschiedene Ninhydrin-positive Substanzen, deren Rf-Werte auf dem 2-dimensionalen Papierchromatogramm von denjenigen der bisher bekannten Aminosäuren abweichen (siehe z.B. Hadorn und Stumm-Zollinger 1953; Stumm-Zollinger 1954; Chen und Hadorn 1954, 1955). Da alle diese Substanzen nach der Hydrolyse verschwanden, und zahlreiche Aminosäuren in den Hydrolysaten festgestellt werden konnten, wurden sie als Peptide bezeichnet. Eine spätere Untersuchung von Mitchell, Chen und Hadorn (1960) bewies jedoch, dass zwei der als Peptide bezeichneten Flecke (P_1 und P_2) zur Hauptsache das Tyrosin-O-phosphat enthalten. Neuerdings, mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromato-

[1] Ausgeführt mit Unterstützungen durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und die Georges und Antoine Claraz-Schenkung.

graphie, stellten wir weitere Phosphatester der Aminosäure Serin und des Äthanolamins fest, die auf dem Chromatogramm mit den Peptiden häufig gemeinsame Flecke bilden (Chen und Hanimann 1965). Unsere Erfahrungen zeigen, dass das Ninhydrin-positive Muster von *Drosophila* viel komplizierter ist, als man bisher angenommen hat. Im folgenden berichten wir über einige neuere Ergebnisse der Identifizierung und des chromatographischen Verhaltens dieser Phosphatverbindungen sowie ihrer komplexen Beziehungen zu Peptiden.

Das Aufziehen des Wildtypes (Sevelen) von *Drosophila melanogaster* und die Herstellung des zu untersuchenden Extrakts wurden bereits in einer früheren Arbeit eingehend beschrieben (siehe Chen und Hanimann 1965). Die Fraktionierung der im Extrakt enthaltenen Ninhydrin-positiven Komponenten geschah durch den automatischen Aminosäure-Analysator nach einem von Spackman, Stein und Moore (1958) beschriebenen Verfahren. Mittels eines „Stream-Dividers" wurden einzelne Fraktionen unmittelbar nach der Eluierung aus der Säule gesammelt. Diese dienten als Ausgangsmaterial für die weiteren papierchromatographischen Untersuchungen. Eine zweite Untersuchungsmethode war die Auftrennung der Proben in einer Dowex-50-Kolonne mittels des Gradient-Puffersystems (siehe Chen 1962, 1963). Sowohl für die Fraktionierung wie für die papierchromatographische Analyse wurde das Verhalten der zu identifizierenden Stoffe mit demjenigen der reinen Substanzen verglichen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der Ionenaustausch-Chromatographie fanden wir stets zahlreiche Ninhydrin-positive Komponenten, die vor der Asparaginsäure (ASP) aus der Harzsäule eluiert werden. Abbildung 1 zeigt die Reihenfolge im Austreten und die Verteilung der Konzentration dieser Substanzen im Extrakt der 1-tägigen Adultmännchen (Methode von Spackman, Stein und Moore 1958). Fünf von diesen wurden als Phosphoserin (PSER), Tyrosin-O-phosphat (TYRP), Glycerophosphoäthanolamin (GPEA), Phosphoäthanolamin (PEA) und Taurin (TAU) identifiziert. Nach der Hydrolyse (6 N HCL bei 110°C) stellten wir im Hydrolysat entweder

die Aminosäuren Serin oder Tyrosin, oder das Äthanolamin fest. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist, sind neben diesen Phosphatestern noch verschiedene Ninhydrin-positive Fraktionen (P) vor-

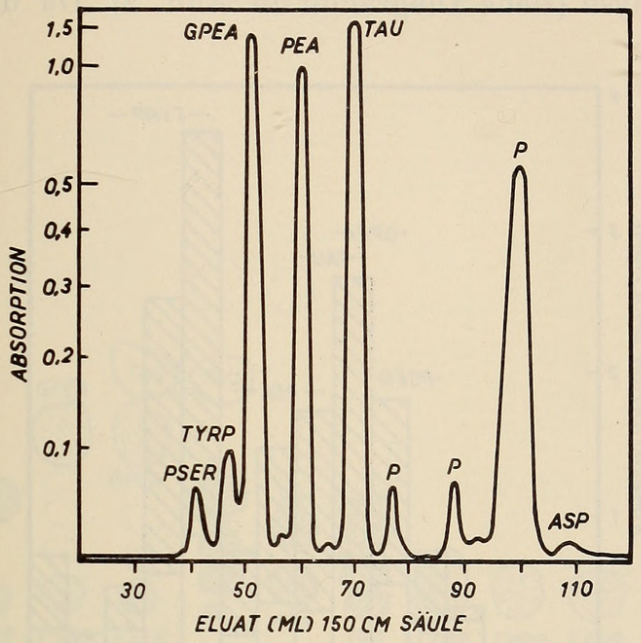

Abb. 1.

Fraktionierung der Phosphatester und sauren Peptide im Extrakt (0,4 g Frischgewicht/2 ml) 1-tägiger Adultmännchen von *Drosophila* mittels des automatischen Aminosäure-Analysators. (Für Abkürzungen, siehe Text.)

handen, deren Konzentration sehr unterschiedlich ist. Sie lassen sich bei der vorliegenden Methode nur schwer voneinander trennen. Wie unten noch beschrieben wird, besteht kein Zweifel, dass die meisten aus einfachen Aminosäuren zusammengesetzte Peptide (P) sind. Die Untersuchung verschiedener Entwicklungsstadien ergab, dass in den verpuppungsreifen Larven das Tyrosin-O-phosphat besonders konzentriert ist, während der Gehalt an Phosphoäthanolamin auffallend gering erscheint. Junge Larven zeichnen sich durch ihren hohen Gehalt an Peptiden aus (siehe Abb. 2 in Chen und Hanimann 1965).

Wurde der gleiche Extrakt in einer Dowex-50-Säule mittels des Ammoniumformiat-Puffers (0,05 M, pH 2,5) fraktioniert, so zeigten die Phosphatverbindungen ein ganz anderes Verhalten: Phosphoäthanolamin tritt nach dem Taurin aus, während Tyrosin-O-

phosphat als letzte Fraktion eluiert wird (Abb. 2). Von besonderem Interesse sind die Peptide, die bei 1-dimensionaler Chromatographie der so erhaltenen Fraktionen nachgewiesen wurden (Abb. 3). Dafür spricht auch die starke Zunahme der Ninhydrin-Reaktion nach der sauren Hydrolyse (siehe Diagramm in Abb. 2). Da die Reindar-

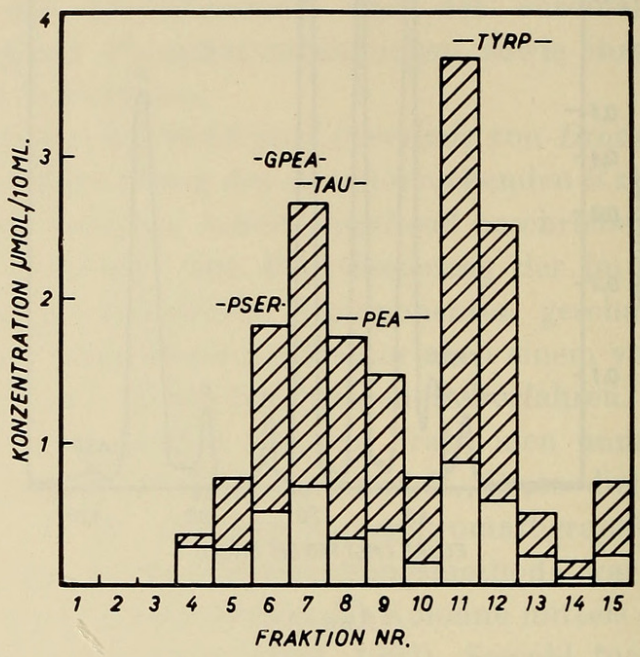

Abb. 2.

Auftrennung der Phosphatester und sauren Peptide im Extrakt (2 g Frischgewicht/ml) von 4-tägigen Drosophilalarven mittels des Gradient-Puffersystems (Ammoniumformiat). Der schraffierte Teil jeder Kolonne bedeutet die Zunahme der Ninhydrin-Reaktion nach der Hydrolyse. (Für Abkürzungen, siehe Text.)

stellung dieser Peptide besonders schwierig ist, konnten wir bis jetzt noch keine genaue Analyse über die Zusammensetzung der einzelnen Peptide durchführen. Immerhin deuten unsere vorläufigen Ergebnisse der Totalhydrolyse darauf hin, dass die meisten aus gewöhnlichen Aminosäuren wie Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Serin und Cysteinsäure bestehen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Befunden von Mitchell und Simmons (1962).

Tabelle 1 stellt einen Vergleich des chromatographischen Verhaltens zwischen den hier identifizierten Fraktionen und den reinen Substanzen dar. Es besteht eine weitgehende Überein-

stimmung sowohl in den Rf-Werten wie in der Reihenfolge der Eluierung aus der Harzsäule.

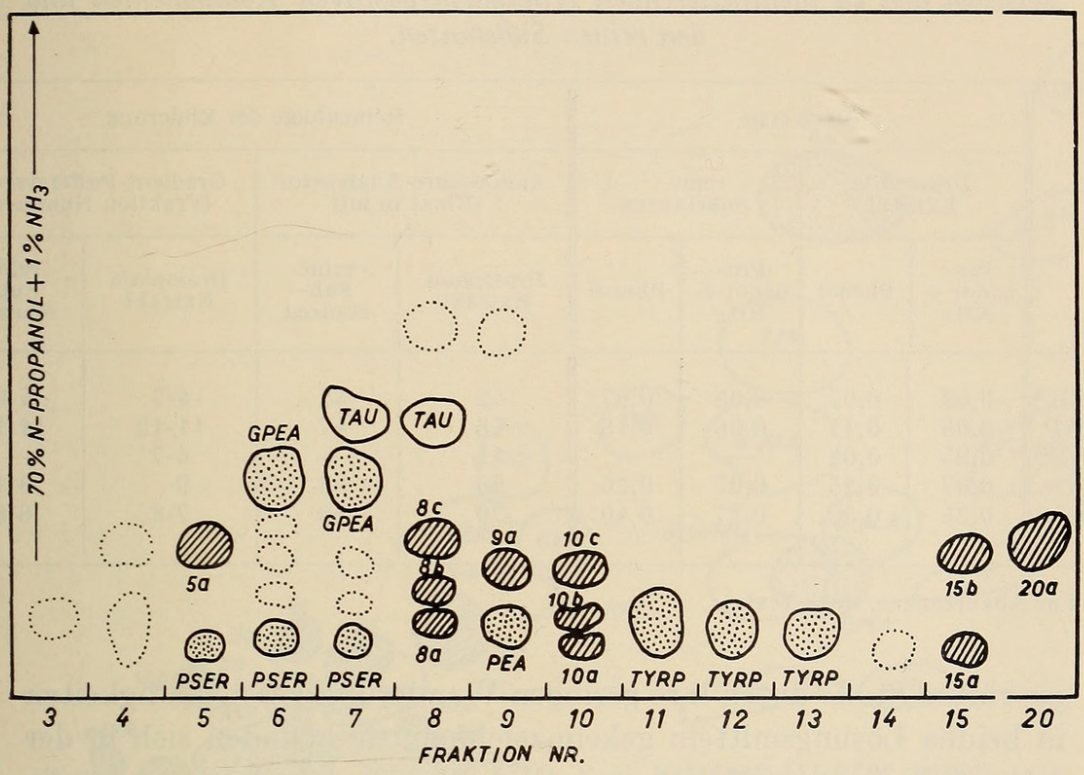

Abb. 3.

Weitere papierchromatographische Auftrennung der Phosphatester und sauren Peptide in den einzelnen Proben nach Fraktionierung durch den Ammoniumformiat-Puffer. Die Reihenfolge der Eluierung aus der Harzsäule ist auf der Abszisse aufgetragen. Punktierte Flecke = Phosphatester; schraffierte Flecke = Peptide. Die nicht ausgezogenen Kreise bedeuten diejenigen Stoffe, die in den betreffenden Fraktionen sehr schwach konzentriert sind, und deren Lage auf dem 2-dimensionalen Chromatogramm nicht weiter bestimmt wurde.

Da die Phosphatverbindungen und gewisse Peptide in den Extrakten in recht hoher Konzentration vorkommen, wäre es von Interesse, ihre genaue Lokalisation auf dem 2-dimensionalen Chromatogramm festzustellen. Wir haben die aus den säulenchromatographischen Fraktionen isolierten Stoffe einzeln dem normalen Extrakt zugegeben, und den Extrakt 2-dimensional chromatographiert (1. Dimension: 70% n-Propanol + 1% NH_3, aufsteigend; 2. Dimension: wassergesättigtes Phenol, absteigend). Wie das rekonstruierte Chromatogramm in Abbildung 4 zeigt, sind alle

TABELLE 1.

Vergleich der Rf-Werte und Reihenfolge bei Eluierung aus der Harzsäule zwischen den zu identifizierenden Ninhydrin-positiven Komponenten und den reinen Substanzen.

	Rf-Werte				Reihenfolge der Eluierung			
	Drosophila Extrakt		reine Substanzen		Aminosäure-Analysator (Eluat in ml)		Gradient-Puffersystem (Fraktion Nummer)	
	Propanol + NH_3	Phenol	Propanol + NH_3	Phenol	*Drosophila* Extrakt	reine Substanzen	*Drosophila* Extrakt	reine Substanzen
PSER*	0,03	0,07	0,05	0,07	42	42	4-7	4-6
TYRP	0,06	0,17	0,06	0,18	48	47	11-13	11-14
GPEA	0,25	0,64	—	—	51	—	6-7	—
PEA	0,07	0,25	0,07	0,26	60	58	9	8-10
TAU	0,34	0,39	0,27	0,40	70	69	7-8	6-8

* Für Abkürzungen, siehe Text.

geprüften Stoffe durch ihre geringen Wanderungsgeschwindigkeiten in beiden Lösungsmitteln gekennzeichnet; sie befinden sich in der Nähe von Asparaginsäure und Glutaminsäure und zeigen häufig Überlappungen. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass in Hydrolysaten der von uns in den früheren Arbeiten als „Peptide" bezeichneten Stoffe zahlreiche Aminosäuren festgestellt wurden. Nach den vorliegenden Befunden müssen aber solche Aminosäuren wie Tyrosin und Serin sowie das Äthanolamin als Abspaltungsprodukte der Phosphatester aufgefasst werden. Auch wird das Glycerophosphoäthanolamin teils durch Glutamin, teils durch β-Alanin überdeckt. Jedenfalls beweisen die vorliegenden Untersuchungsergebnisse, dass die sogenannten „Peptid-Flecke" auf dem 2-dimensionalen Papierchromatogramm komplexer Natur sind.

Ausser in *Drosophila* wurden Phosphoserin, Phosphothreonin, Phosphoäthanolamin und Glycerophosphoäthanolamin in den Schmeissfliegen *Phormia regina* gefunden (LEVENBOOK *et al* 1965). SHAW (1955) berichtete über das Vorkommen von Phosphoäthanolamin in Eiern der Heuschrecke *Chortophaga viridifasciata*. Über die physiologisch-biochemische Bedeutung dieser Phosphatester in Insekten ist nichts genaues bekannt. Da das Tyrosin-O-phosphat in

den verpuppungreifen Larven besonders konzentriert ist, fragt man sich, ob es, wie das Tyrosin selbst, in direkter Beziehung zur Bildung des Puparíums steht. Es ist auch möglich, dass dieser

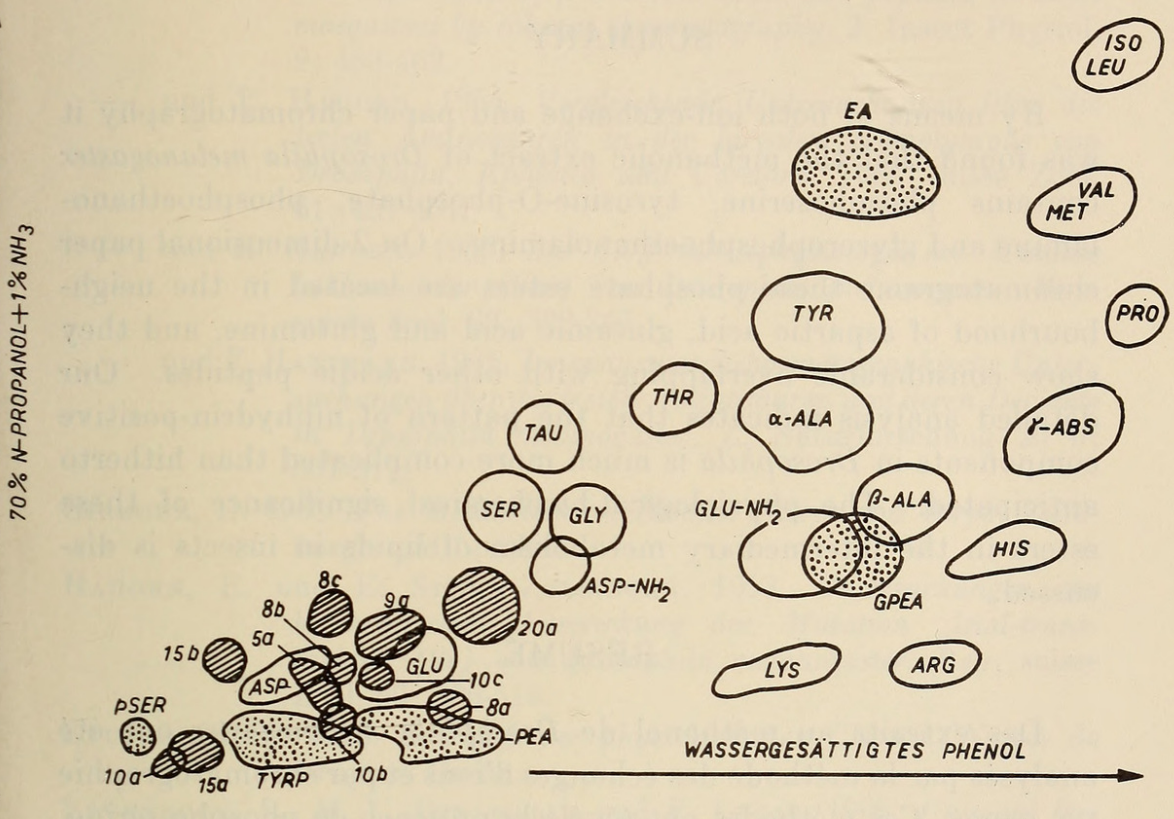

Abb. 4.

Ein nach den Ergebnissen der eingehenden Papier-und Ionenaustausch-Chromatographie rekonstruiertes 2-dimensionales Chromatogramm. Leere Flecke = Aminosäuren; punktierte Flecke = Phosphatester und Äthanolamin (EA); schraffierte Flecke = Peptide. Die Aminosäuren sind durch die Abkürzungen der ersten 3 Buchstaben angegeben. Die Numerierung der Peptide bezieht sich auf die in Abb. 3 angegebene Reihenfolge der Eluierung aus der Harzsäule. Für Abkürzungen der Phosphatester, siehe Text.

Stoff eine gewisse Rolle im Energieumsatz spielt. Bei Wirbeltieren wurde nachgewiesen, dass sowohl Phosphoäthanolamin wie Phosphoserin sich im intermediären Stoffwechsel der Phosphatide beteiligen (Leuthardt 1963). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Stoffe in Insekten die gleiche Funktion besitzen. Nach Wren und Mitchell (1955) enthalten die Phosphatide von *Drosophila* u.a. Cholin, Äthanolamin und Serin. Bieber *et al* (1961) sowie Taylor und Hodgson (1965) stellten fest, dass das Äthanolamin

die basische Gruppe der vorwiegenden Phosphatide in *Phormia* darstellt. Für eine allgemeine Diskussion über den Lipidstoffwechsel in Insecten verweisen wir auf die neu erschienene Monographie von Gilmour (1965).

SUMMARY

By means of both ion-exchange and paper chromatography it was found that the methanolic extract of *Drosophila melanogaster* contains phosphoserine, tyrosine-O-phosphate, phosphoethanolamine and glycerophosphoethanolamine. On 2-dimensional paper chromatograms these phosphate esters are located in the neighbourhood of aspartic acid, glutamic acid and glutamine, and they show considerable overlapping with other acidic peptides. Our detailed analysis indicates that the pattern of ninhydrin-positive components in *Drosophila* is much more complicated than hitherto anticipated. The physiological-biochemical significance of these esters in the intermediary metabolism of lipids in insects is discussed.

RÉSUMÉ

Des extraits au méthanol de *Drosophila melanogaster* ont été analysés par la méthode des échanges d'ions et par chromatographie sur papier. Ces méthodes ont révélé la présence de phospho-sérine, tyrosine-O-phosphate, phosphoéthanolamine, et glycerophosphoéthanolamine. Comme l'ont démontré les chromatogrammes, ces esters phosphatiques qui sont localisés dans le voisinage de l'acide aspartique, de l'acide glutamique ainsi que de la glutamine, coïncident avec d'autres peptides acidiques. Notre analyse détaillée indique que chez *Drosophila* la composition des fractions ninhydrine-positives est bien plus compliquée qu'on ne l'avait pensé auparavant. L'importance physiologique et biochimique de ces esters pour le métabolisme intermédiaire des lipides chez les insectes fait objet d'une discussion.

LITERATURVERZEICHNIS

Bieber, L. L., E. Hodgson, V. H. Chaldelin, V. J. Brooks and R. W. Newburgh. 1961. *Phospholipid patterns in the blowfly, Phormia regina (Meigen)*. J. biol. Chem. 236: 2590-2595.

Chen, P. S. 1962. *Trennung der freien Aminosäuren und Peptide von Seeigeleiern mittels Ionenaustauschchromatographie.* Rev. suisse Zool. 69: 288-296.

— 1963. *Studies on the protein metabolism of Culex pipiens L. — IV. Separation of free amino acids and peptides in adult mosquitoes by column chromatography.* J. Insect Physiol. 9: 453-462.

— und E. Hadorn. 1954. *Vergleichende Untersuchungen über die freien Aminosäuren in der larvalen Hämolymphe von Drosophila, Ephestia und Corethra.* Rev. suisse Zool. 61: 437-451.

— und E. Hadorn. 1955. *Zur Stoffwechselphysiologie der Mutante letal-meander (lme) von Drosophila melanogaster.* Rev. suisse Zool. 62: 338-347.

— und F. Hanimann. 1965. *Ionenaustauschchromatographische Untersuchungen über die freien Aminosäuren und deren Derivate in Drosophila melanogaster.* Z. Naturforschung 20 b: 307-312.

Gilmour, D. 1965. *The Metabolism of Insects.* Oliver and Boyd, Edinburgh and London.

Hadorn, E. und E. Stumm-Zollinger. 1953. *Untersuchungen zur biochemischen Auswirkung der Mutation „letal-translucida" (ltr) von Drosophila melanogaster.* Rev. suisse Zool. 60: 506-516.

Leuthardt, F. 1963. *Lehrbuch der physiologischen Chemie.* Walter de Gruyter, Berlin.

Levenbook, L., M. L. Dinamarca and F. Lucas. 1965. *Unusual free amino acids and determination of ninhydrin-positive substances during morphogenesis of the blowfly Phormia regina.* Fed. Proc. 24: 471.

Mitchell, H. K. and J. R. Simmons. 1962. *Amino acids and derivatives in Drosophila.* In "*Amino Acid Pools*" (J. T. Holden, ed.), pp. 136-146. Elsevier, Amsterdam.

— P. S. Chen and E. Hadorn. 1960. *Tyrosin phosphate on paper chromatograms of Drosophila melanogaster.* Experientia 46: 410.

Shaw, E. I. 1955. *Amino compounds and ethanolamine phosphoric acid of the grasshopper egg.* Exp. Cell Res. 9: 489-501.

Spackman, D. H., W. H. Stein and S. Moore. 1958. *Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids.* Analyt. Chem. 30: 1190-1206.

Stumm-Zollinger, E. 1954. *Vergleichende Analyse der Aminosäuren und Peptide in der Hämolymphe des Wildtypus und der Mutante letal-translucida (ltr) von Drosophila melanogaster.* Z. Vererbungslehre 86: 126-133.

Taylor, J. F. and E. Hodgson. 1965. *The origin of phospholipid ethanolamine in the blowfly, Phormia regina (Meigen).* J. Insect Physiol. II: 281-285.

Wren, J. J. and H. K. Mitchell. 1959. *Extraction methods and an investigation of Drosophila lipids.* J. biol. Chem. 234: 2823-2828.

Chen, P. S., Hanimann, F, and Roeder-Guanella, C. 1966. "Phosphatester der Aminosäuren Serin und Tyrosin sowie des Äthanolamins in Drosophila melanogaster." *Revue suisse de zoologie* 73, 219–228. https://doi.org/10.5962/bhl.part.75815.

View This Item Online: https://www.biodiversitylibrary.org/item/126811
DOI: https://doi.org/10.5962/bhl.part.75815
Permalink: https://www.biodiversitylibrary.org/partpdf/75815

Holding Institution
Smithsonian Libraries and Archives

Sponsored by
Biodiversity Heritage Library

Copyright & Reuse
Copyright Status: In Copyright. Digitized with the permission of the rights holder.
Rights Holder: Muséum d'histoire naturelle - Ville de Genève
License: http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/
Rights: https://www.biodiversitylibrary.org/permissions/

This document was created from content at the **Biodiversity Heritage Library**, the world's largest open access digital library for biodiversity literature and archives. Visit BHL at https://www.biodiversitylibrary.org.

This file was generated 22 September 2023 at 20:23 UTC