

Unterschiede in der Carbohydrasenausrüstung der Entwicklungsstadien von *Melolontha melolontha* L.¹

Im Problemkreis der Insektenmetamorphose wurden die Unterschiede in der Carbohydrasenausrüstung der Larvalstadien und der Imago von *Melolontha melolontha* L. untersucht. Für die enzymatischen Spaltungen wurde die Mikromethode nach LINDERSTRÖM-LANG und HOLTER mit anschließender papierchromatographischer und photometrischer Auswertung (Dinitrosalicylsäuremethode) der Spaltansätze verwendet²⁻⁴; die Hydrolyse polymerer Substrate wurde auch viskosimetrisch untersucht.

Die vergleichende Aktivitätsprüfung von Darminhalt, Darmwandhomogenaten und Lysaten der durch fraktioniertes Zentrifugieren isolierten Darm-Mikroflora⁵ ergab folgenden gemeinsamen Carbohydrasenbestand von Larve und Imago: *Tiereigene Carbohydrasen*: Maltase, Saccharase, Trehalase (α -Glukosidasen); Melibiase (α -Galaktosidase); Cellobiase (β -Glukosidase); Laktase (β -Galaktosidase); β -Mannosidase, Freisetzung von Galaktose aus ϵ -Galaktan der Lärche (vermutlich eine α -Galaktosidase-Wirkung). – α -Amylase, Dextranase, Lichenase, β -Mannanase. *Mikrobenbedingte Carbohydrasen*: β -h-Fruktosidase. – β -Amylase, Dextranase, Carboxymethylcellulase⁶⁻⁸, Inulinase.

Im Darmkanal der Larve lassen sich zusätzlich noch folgende Carbohydrasenaktivitäten nachweisen: *Tiereigene Carbohydrasen*: β -Xylosidase; Freisetzung von Galaktose und Arabinose aus Hemicellulosen vom Typ der Flachshemicellulose und Espartoxytan und von Arabinose aus ϵ -Galaktan (vermutlich larvale β - bzw. α -Galaktosidase mit spezifischer Substratspezifität). – β -Xylanase, Inulinase. *Mikrobenbedingte Carbohydrasen*: β -Xylosidase; β -Xylanase; Polygalakturonase; Spaltung von Pektin-Galaktan und -Araban (spezielle bakterielle, noch nicht charakterisierte Polygalaktosidase- oder Galaktosidaseaktivität).

Die Aktivitätsprüfung der Wände der einzelnen Darmabschnitte ergab, dass die tier eigenen Carbohydrasen von Larve und Imago im wesentlichen vom Mitteldarmepithel sezerniert werden. Das larvale Mitteldarmsekret enthält demnach einen Carbohydrasensatz zur Hydrolyse der wichtigsten pflanzlichen Oligosaccharide, einschliesslich von Xylo- und Mannooligosacchariden, ferner zum hydrolytischen Abbau von pflanzlichen Reservekohlenhydraten wie Stärke, Inulin und Galaktomannanen. Von den pflanzlichen Zellwandbestandteilen vermag die Larve tier eigenen nur Hemicellulosen des Xylantyps (Figur 1) und Mannane hydrolytisch anzugreifen. In der Gärkammer der Larve scheiden die hier lokalisierten Mikroorganismen – ähnlich wie Pansenmikroorganismen – sehr starke Carbohydrasenaktivitäten zur Hydrolyse von Zellwandbestandteilen ab (Xylanase; Carboxymethylcellulase, aber keine echte Cellulase; Spaltung von Pektin-Galaktan und -Araban). Ferner geben die Gärkammermikroorganismen zum Abbau von Reservekohlenhydraten hochaktive Carbohydrasen ab, die zum Teil auch im larvalen Mitteldarmsekret enthalten sind (Inulinase, β -Mannosidase, Mannanase), ferner eine β -Amylase. Während im Mitteldarmsekret die Aktivitäten der Oligasen die der Polyasen erheblich übertreffen, überwiegen in der Gärkammer die Polyasenaktivitäten.

Das Mitteldarmepithel der Imago sezerniert einen Carbohydrasensatz zum hydrolytischen Abbau der wichtigsten pflanzlichen Oligosaccharide einschliesslich der Mannooligosaccharide. Im Gegensatz zur Larve werden von der Imago die Xylooligosaccharide, ferner die Xylan-

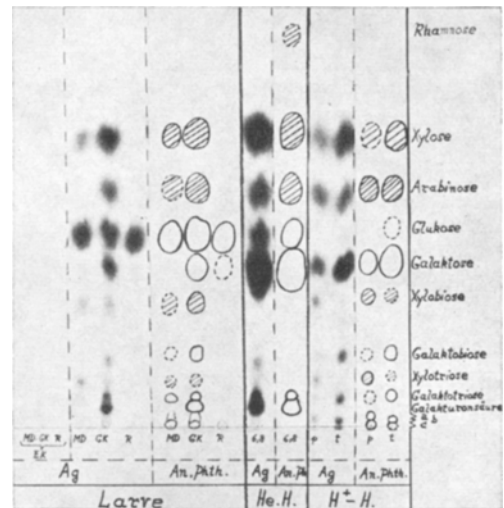


Fig. 1

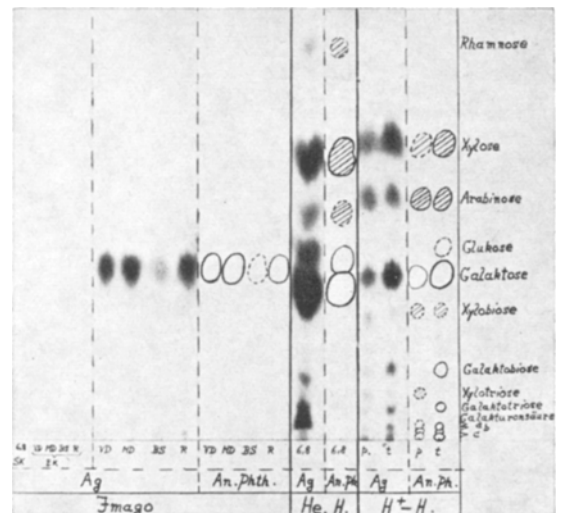


Fig. 2

Bohnenhülsen-Hemicellulosen, Fraktion B: Papierchromatographische Analyse der Spaltung durch Darminhalt der Larve (Figur 1) und der Imago (Figur 2), im Vergleich zur partiellen und scharfen Säurehydrolyse (H^+ -H, p und t) und zur Spaltung durch Helix-Kropfsaft (He-H). (Ag = $AgNO_3$, An. Phth. = Anilinphthalat-Reagens. VD = Vorder-, MD = Mitteldarm; GK = Gärkammer; BS = Bakteriensegment; R = Rektum; EK bzw. SK = Enzym- bzw. Substratkontrolle; a, b, c: nicht identifizierte Spots.)

¹ Ein Teil der Arbeit wurde am Institut für Obstbau der Biologischen Bundesanstalt Heidelberg ausgeführt.

² F. DUSPIVA, Mitt. biol. Reichsanst. Ld- u. Forstw. 75, 82 (1953).

³ F. DUSPIVA, Mitt. biol. Reichsanst. Ld- u. Forstw. 80, 155 (1954).

⁴ K. ALLMANN, Dissertation Heidelberg (1958).

⁵ B. H. HOWARD, Biochem. J. 60, i (1955).

⁶ M. A. JERMYN, Science 125, 12 (1957).

⁷ G. L. MILLER und R. BIRZGALIS, Archs Biochem. Biophys. 95, 19 (1961).

⁸ G. HALLIWELL, Methoden der enzymatischen Analyse (Verlag Chemie, Weinheim 1962), p. 64.

komponenten und Pektinsubstanzen pflanzlicher Zellwände, weder durch eigene noch durch mikrobielle Carbohydrasen enzymatisch hydrolysiert (Figur 2), obwohl speziell die Gruppe der Pektinsubstanzen einen Hauptteil des Nahrungsmaterials der Imago ausmacht.

Summary. The activities of β -xylosidase, β -xylanase and inulinase were demonstrated only in the tissues of the larval intestinal canal which also split galactose and arabinose from certain hemicelluloses and ϵ -galactan. Several other carbohydases originating from micro-

organisms were also detected only in the content of the larval alimentary tract.

K. ALLMANN⁹ und F. DUSPIVA

Zoologisches Institut der Universität, Heidelberg
(Deutschland), 12. Oktober 1965.

⁹ Gegenwärtige Anschrift: Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Philipps-Universität, Marburg/L. (Deutschland).

S $\rightarrow$ N Acetyl Migration in Yeast Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

In a previous paper we reported that during the hydrolysis of PNPA¹ catalysed by mammalian GAPD a lysine residue is acetylated² in addition to the acetylation of cysteine demonstrated by HARRIS et al.³. Furthermore we showed^{2,4} that N-acetyl enzyme formation is a result of acetyl migration from the intermediary S-acetyl group to the ϵ -amino group of the lysine residue. The S $\rightarrow$ N acetyl migration takes place at the active centre and can be prevented by NAD or AMP⁴.

Since it could be inferred⁵ on the basis of NAD binding and the reactivity of the SH group that the active centre of yeast GAPD is different from that of the muscle enzyme, we examined whether the S $\rightarrow$ N acetyl migration occurs in the yeast protein, and if so, how this process is affected by the coenzyme and AMP.

S $\rightarrow$ N acetyl migration was tested by determining the conversion of S-acetyl yeast GAPD, prepared at pH 7.0, into the N-acetyl derivative upon raising the pH to 8.8, as described for the mammalian enzyme⁴.

The data show that S-acetyl enzyme is broken down due to the elevation of pH from 7.0 to 8.8: some of the acetyl groups bound originally to the cysteine residue are hydrolysed, while the rest migrate to a neighbouring amino group. ϵ -N-acetyl lysine could be identified by paper chromatography as described previously². The transformation of S-acetyl GAPD into an N-acetyl derivative is more complete with the yeast than with the muscle enzyme.

In order to study the effect of NAD and AMP on acetyl migration, Tris buffers of pH 8.8 containing the appropriate nucleotide were employed to make the S-acetyl enzyme solutions alkaline. It can be seen in the Table that a considerable amount of N-acetyl enzyme is formed in the presence of the nucleotides. Under the same conditions no N-acetyl GAPD formation was observed with the mammalian enzyme⁴.

The S $\rightarrow$ N acetyl migration exhibited by both muscle and yeast GAPD indicates that the lysine residue is in the environment of the reactive cysteine residue of both enzymes. Another common part of this environment may be the amino acid residues promoting the hydrolysis of the intermediary thiol ester of both enzymes. The hydrolysis of S-acetyl GAPD proceeds at a lower rate with the yeast than with the muscle enzyme and, possibly due to this, the yield in N-acetyl GAPD formation is higher in the former enzyme.

The inhibition of acetyl migration by the nucleotides in the case of muscle GAPD may be interpreted in terms

of a simple steric effect or of alterations in the structure of the protein⁴. In the case of the yeast GAPD, however, neither NAD nor AMP prevents the S $\rightarrow$ N acetyl migration and marked structural changes fail to appear, although under these conditions the enzyme is saturated with coenzyme⁶. We have found that these nucleotides affect only slightly proteolytic digestibility and optical rotation of the yeast protein. NAD-free yeast GAPD exhibits much higher stability than the mammalian enzyme depleted of the bound coenzyme. The yeast protein, however, cannot be protected by the coenzyme or AMP

No. of acetyl groups bound per mole of enzyme at pH 7.0		Nucleotide added at the increase of pH	No. of acetyl groups bound per mole of enzyme at pH 8.8	
S-acetyl	N-acetyl		S-acetyl	N-acetyl
1.42	0.15	—	0.12	0.60
		NAD	0.10	0.47
		AMP	0.15	0.46

56 mg of GAPD was incubated with 2 mg of (acetyl-1-¹⁴C) PNPA in 5 ml of 0.05 M Tris buffer, pH 7.0, at 5°C for 2 min. The protein was then freed from excess substrate and reaction products by gel filtering at 5°C on a Sephadex G-50 column washed with 0.05 M Tris buffer, pH 7.0. One fourth of the protein fraction was precipitated with TCA. The remainder was divided into 3 portions and each of them was gel filtered at 5°C in 15 min through Sephadex G-50 columns washed with 0.05 M Tris buffer (pH 8.8), 0.05 M Tris buffer (pH 8.8) containing 1.0 mg/ml NAD, and 0.05 M Tris buffer (pH 8.8) containing 1.0 mg/ml AMP. The enzyme solutions of pH 8.8 were incubated at room temperature for 30 min, then after precipitating the protein with TCA and washing, the number of total and N-acetyl groups bound to GAPD was determined on the basis of radioactivity of the labelled protein. In order to measure the amount of the N-acetyl groups, the S-acetyl groups had to be removed from the protein. For this purpose the acetyl enzyme was incubated with hydroxylamine solution for 10 min at room temperature. The number of S-acetyl groups was calculated as the difference between the number of total and N-acetyl groups.

¹ Abbreviations: PNPA, *p*-nitrophenyl acetate; GAPD, d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

² L. POLGÁR, *Acta physiol. hung.* 25, 1 (1964).

³ J. I. HARRIS, B. P. MERIWETHER, and J. H. PARK, *Nature* 198, 154 (1963).

⁴ L. POLGÁR, *Biochim. biophys. Acta*, in press.

⁵ R. N. PERHAM and J. I. HARRIS, *J. molec. Biol.* 7, 316 (1963).

⁶ A. STOCKELL, *J. biol. Chem.* 234, 286 (1959).