
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ROBERTA VANNI, DILETTA PERETTI, UMBERTO BIANCHI

**Esame elettroforetico delle tirosinasi di Musca
domestica L.**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 58 (1975), n.6, p. 961–968.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1975_8_58_6_961_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)*

SIMAI & UMI

<http://www.bdim.eu/>

Biologia. — *Esame elettroforetico delle tirosinasi di Musca domestica L.* Nota di ROBERTA VANNI, DILETTA PERETTI e UMBERTO BIANCHI (*), presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Crude extracts of *Musca domestica* L. pupae (48 hrs) of the WHO/IN/M. domestica/1 strain, have been subjected to electrophoresis on different supports and stained for tyrosinase (*o*-diphenol O_2 oxidoreductase) activity. The zymograms we obtained have been described and discussed. In particular it has been observed that when electrophoretic runs were performed on polyacrylamide gels, the zymogram patterns of *Musca* were very similar to those earlier shown in *Drosophila* by Mitchell and Weber (1965) and by Peeples and others (1969 a, 1969 b).

Patterns showing more isozyme fractions have been obtained when electrophoresis were performed on starch gels. In fact many individuals possessed 7 catalytically active bands ($A_1, A_2, A_2'', A_2''', A_3, A_3'', A_3'''$) anodically migrating and 3 other bands (A_c, A_c'', A_c''') moving toward the cathode in an electrophoretic support the pH range of which was 8.65. Electrophoretic heterogeneity principally present in A_2 but sporadically affecting the A_3 and A_c zones, has been detected by screening a total of 164 single pupae homogenates. On the basis of our experiments it has not been possible to understand if this heterogeneity was due to the presence of gene-enzyme polymorphism or to the occurrence, *in vitro*, of heteromultimeric and homomultimeric equilibria among different A subunits. The presence in the screened population of specimens, apparently possessing a normal amount of well pigmented and hardened cuticulae, but showing completely "null" or "silent" zymograms, could suggest that these enzymes are not the only ones interested in melanin formation and in cuticular hardening and tanning. However this hypothesis does not take into consideration the possibility that the "silent" zymograms might be due to the sampling of specimens having the same chronological but not the same biological age (occurrence of *in vivo* asynchronies in the processes of cuticular hardening and tanning).

Con le denominazioni generiche di tirosinasi, monofenolossidasi, difenolossidasi, catecolasi e con quella sistematica di «*o*-difenoil : O_2 -ossidoreduttasi», vengono indicati gli isoenzimi appartenenti a quel sistema catalitico che, utilizzando *in vivo* ed *in vitro* la tirosina e la dopa (*p*-idrossifenil-alanina e 3,4-diidrossifenil-alanina), porta alla formazione delle melanine. Questo sistema enzimatico è particolarmente importante nel metabolismo degli insetti nei quali la formazione delle melanine è fortemente correlata ai processi di indurimento e tannazione delle cuticole. Da analisi qualitative compiute da Mitchell e Weber (1965) e da Mitchell, Weber e Schaar (1967) risulta che in *Drosophila melanogaster* il sistema è formato da più componenti: A_1, A_2, A_3, P ed S. L'attivazione delle prime tre sarebbe in stretta correlazione con la presenza della componente P.

Peeples *et al.* (1968; 1969 a; 1969 b), cercando un approccio genetico con questo sistema enzimatico, hanno studiato gli zimogrammi di diversi

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Genetica dell'Università di Cagliari.

(**) Nella seduta dell'11 giugno 1975.

mutanti Lz di *Drosophila melanogaster* riscontrando, fra l'altro, che le attività fenolossidasiche di A₁ e A₂ erano rispettivamente assenti e ridotte nei mutanti Lz^g e Lz. Inoltre più recentemente Warner *et al.* (1974) hanno esaminato i quadri elettroforetici di mutanti Lz, Lz^g ed Lz^{fs} allo scopo di individuare loci soppressibili in *Drosophila*.

Tenendo conto anche di questi dati bibliografici noi abbiamo esaminato gli zimogrammi di questo sistema enzimatico in individui allo stadio pupale del ceppo WHO di *Musca domestica* L. Questo tipo di indagine potrebbe infatti rivelarsi utile nel permettere confronti qualitativi fra zimogrammi ottenuti dai diversi ceppi mutanti di *Musca* disponibili. Scopo di questa Nota inoltre è quello di illustrare la maggiore complessità qualitativa delle tirosinasi di *Musca* rispetto a quella finora descritta in *Drosophila*.

MATERIALI E METODI

Gli esperimenti sono stati compiuti su pupe di 48 ore del ceppo WHO/IN/*Musca domestica*/1 (ceppo standard di riferimento), campionate a caso e provenienti dagli allevamenti dell'Istituto di Zoologia dell'Università di Pavia.

Le corse elettroforetiche sono state eseguite sia su gel di poliacrilamide che su gel di amido. La procedura usata per l'elettroforesi su gel di poliacrilamide è stata quella di Mitchell e Weber, modificata da Peebles *et al.* (1968). Per l'elettroforesi su gel d'amido al 12 % è stato usato il sistema discontinuo di tamponi di Poulik (1957).

Per la preparazione della frazione P contenente il cosiddetto « activator » dell'enzima, ci si è riferiti alla metodica di Peebles *et al.* (1968) modificata da quella di Mitchell e Weber (1965) e ulteriormente modificata da noi in quanto la precipitazione mediante salting-out è stata effettuata ad una concentrazione di ammonio solfato del 40 %.

Gli estratti crudi delle pupe WHO da analizzare su supporto di poliacrilamide sono stati ottenuti omogenando ciascun individuo in circa 90 λ di tampone fosfato 0,1 M, pH 6,3, contenente l'1 % di Na₂EDTA, in mortaio preraffreddato e posto su ghiaccio.

Gli omogenati così ottenuti, prelevati con capillari di vetro (60 λ) e chiusi alla fiamma, sono stati quindi centrifugati a 4 °C per 5' in una centrifuga da ematocrito. Il supernatante dell'omogenato centrifugato (circa 40 λ) è stato utilizzato come fonte di enzima da sottoporre ad elettroforesi. Le migrazioni sono state eseguite fornendo per quattro ore una tensione di 300 Volts a cui corrispondeva, nelle nostre condizioni sperimentali, un assorbimento di circa 120 mA.

Gli estratti crudi da analizzare su gel d'amido sono stati invece ottenuti omogenando ciascun individuo in tampone tris-citrato, pH 8,65, derivato da Poulik (1957), contenente l'1 % di Na₂EDTA. Il supernatante dell'omogenato centrifugato è stato utilizzato come fonte di enzima. La corsa elettro-

foretica è stata eseguita a 5 °C per 18 ore. È stata fornita una tensione costante di 300 Volts a cui corrispondeva un assorbimento di 24 mA. Dopo le corse elettroforetiche i gel sono stati preincubati per 3-5 ore con la frazione P a temperatura ambiente. I gel sono stati quindi ripetutamente lavati in tampone fosfato 0,1 M, pH 6,3, e successivamente incubati in una soluzione dello stesso tampone contenente tirosina (0,4 mg/ml). Dopo quattro ore di incubazione i gel sono stati nuovamente lavati e quindi incubati in soluzione tampone fosfata contenente L-dopa (0,4 mg/ml).

In alcuni casi i gel d'amido non sono stati incubati con la frazione P, che veniva invece sostituita da una soluzione di etanolo/tampone fosfato 0,1 M, pH 6,3 (v/v).

RISULTATI E DISCUSSIONE

In totale sono stati analizzati gli zimogrammi ottenuti da 164 omogenati singoli. Le elettroforesi eseguite su gel di poliacrilamide hanno posto in evidenza zimogrammi formati da due frazioni, simili a quelli descritti in *Drosophila*, nelle stesse condizioni sperimentali, da Peeples *et al.* (1968; 1969 a; 1969 b). Sulla base di questo fatto abbiamo perciò deciso di attenerci, in queste condizioni sperimentali, alla nomenclatura già proposta da Mitchell e Weber (1965) alla quale hanno fatto in seguito ampio riferimento anche altri Autori. Perciò la frazione in possesso di più veloce mobilità anodica e dotata di attività catalitica più specifica sulla L-tirosina, è stata da noi denominata A_1 , mentre la frazione più lenta, attiva sulla L-dopa, è stata individuata come A_2 .

La risoluzione della banda A_1 appariva di norma ben definita e costante mentre la frazione A_2 si presentava come una zona ad elevata attività melanizzante ma con una morfologia che poteva far sospettare l'esistenza di una certa eterogeneità di subcomponenti elettroforetiche, non sempre tendenti a sovrapporsi (fig. 1).

Elettroforesi eseguite su gel d'amido, in sistema discontinuo di tamponi, hanno avvalorato la suddetta osservazione. Infatti sul nuovo supporto la zona A_2 si risolveva ulteriormente in due zone fondamentali, ciascuna delle quali sembrava essere costituita da tre componenti isoenzimatiche tutte attive sulla L-dopa. Le sei bande fenolossidasiche suddette sono state da noi considerate come subcomponenti delle frazioni A_2 e A_3 , già descritte in letteratura, e perciò denominate: A_2' , A_2'' , A_2''' , A_3' , A_3'' , A_3''' rispettivamente (figg. 2 e 4).

Inoltre l'uso del gel d'amido è stato determinante nel darci la possibilità di mettere in evidenza un'altra zona elettroforetica in possesso di mobilità catodica, benché la migrazione avvenisse in un supporto caratterizzato da un pH alquanto basico (8,65).

Questa zona, da noi denominata A_0 , non ha mai posto in evidenza un'elevata attività catalitica fenolossidatica, poiché in essa la quantità di melanina formata, anche dopo prolungata incubazione in soluzione di L-dopa, è sempre

risultata scarsa. D'altra parte, incubazioni di trenta ore in soluzioni di L-tirosina, non hanno mai posto in evidenza precipitazione di pigmento nella zona A_c .

In alcuni casi è stato possibile osservare che, anche in questa zona, erano distinguibili tre bande elettroforetiche che abbiamo denominato: A'_c , A''_c , A'''_c in rapporto alla loro crescente velocità catodica.

Sulla base di quanto è stato sin qui esposto, è possibile dunque concludere che molti individui del ceppo WHO di *Musca* hanno fornito zimogrammi costituiti da ben dieci componenti isoenzimatiche, una delle quali (A_1) si è

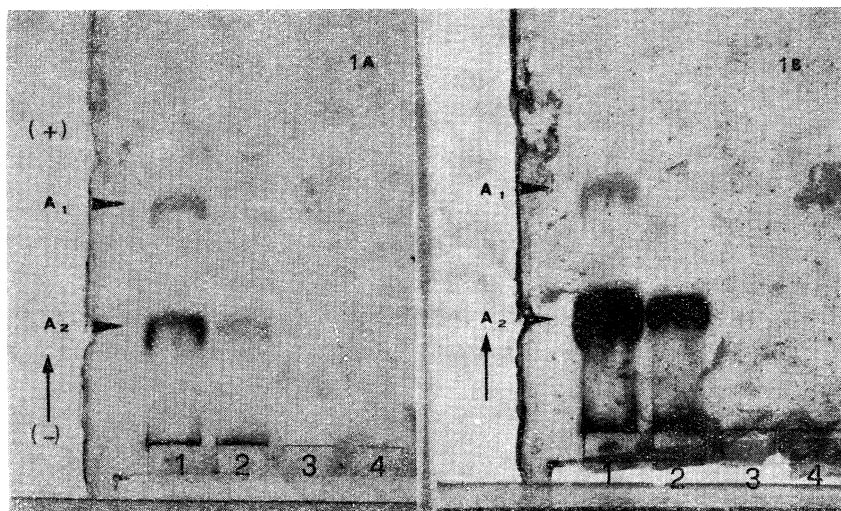


Fig. 1. - Zimogrammi ottenuti su gel di poliacrilamide da estratti crudi singoli di *Musca domestica* (medio stadio pupale). Le zone elettroforetiche in possesso di attività catalitica mono e difenol-ossidasi sono state denominate rispettivamente A_1 e A_2 in accordo con la nomenclatura proposta da Mitchell e Weber (1965) e da Peeples *et al.* (1969 a, b). Le immagini 1A e 1B illustrano il medesimo gel preincubato con la preparazione P e quindi incubato con tirosina (1A) ed in seguito con dopa (1B). Dall'esame comparativo delle due immagini si può notare: a) la mancanza di attività A_1 anche in seguito ad incubazione prolungata con dopa (zimogramma n. 2); b) la marcata attività esplicata sulla dopa dagli isoenzimi della zona A_2 , in contrapposizione con la scarsa attività esplicata sul medesimo substrato da parte di A_1 ; c) la presenza di zimogrammi « silenti » forniti da individui apparentemente in possesso di quantità normali di cuticole melanizzate.

dimostrata specifica per la L-tirosina, mentre le rimanenti nove hanno mostrato maggiore specificità di substrato per la L-dopa. A nostra conoscenza nessun reperto ha posto in evidenza sino ad ora l'esistenza di un così elevato numero di componenti isoenzimatiche del sistema fenolossidasi.

Mitchell, Weber e Schaar (1967), hanno eseguito ricerche sulla struttura macromolecolare e sui meccanismi di attivazione alla catalisi delle fenolossidasi che hanno luogo *in vitro* in estratti di *Drosophila melanogaster*. Questi Autori, basando il loro studio sulle velocità e gli equilibri di sedimentazione in gradiente di saccarosio, hanno concluso che i meccanismi di attivazione producono *in vitro* almeno sette componenti enzimatiche caratterizzate da

relativamente bassi valori di densità ma anche da elevati valori di massa molecolare. Secondo i suddetti Autori le fenolossidasi di *Drosophila* andrebbero considerate come complessi proteici altamente asimmetrici in grado di funzionare cataliticamente come O_2 -ossidoreduttasi. Questi enzimi inoltre sarebbero in grado di servire anche come proteine strutturali. Essi infatti verrebbero inattivati e precipitati come componenti insolubili dalla loro stessa azione catalitica. Gli Autori hanno infatti avanzato l'ipotesi secondo la quale questi enzimi sarebbero costituiti da lunghe catene o fibre che verrebbero ulteriormente complessate in seguito alla ossidazione dei substrati e grazie allo stabilirsi di legami-ponte chinonici. La funzione di queste strutture,

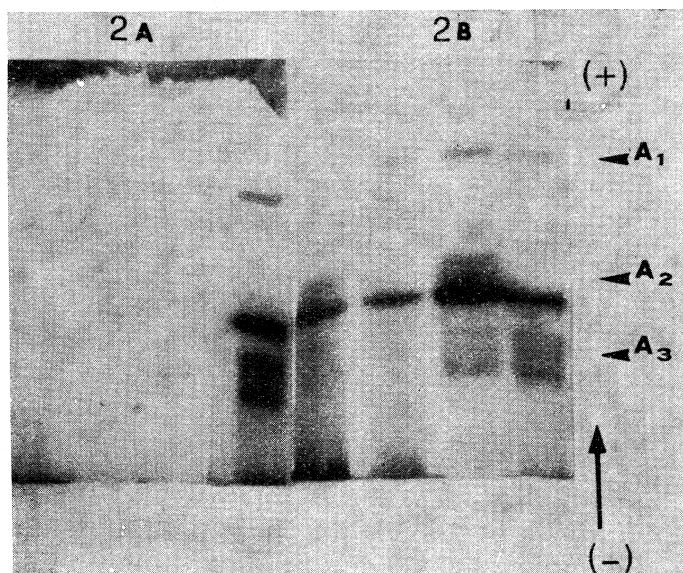


Fig. 2. — Zimogrammi ottenuti su gel d'amido (sistema discontinuo di tamponi secondo Poulik (1957)). È possibile notare la presenza di eterogeneità elettroforetica. In particolare nel gel 2A sono presenti zimogrammi «silenti», mentre in quello 2B sono osservabili zimogrammi ponenti in evidenza, con intensità variabile, sia la banda A_1 che le sei bande appartenenti rispettivamente alle zone A_2 ed A_3 .

per alcune delle quali è stata postulata una costituzione lipoproteica, sembra essere implicata negli insetti sia nei processi di melanizzazione che in quelli relativi alla formazione delle cuticole. Questi enzimi potrebbero in tal modo giocare un duplice ruolo: quello appunto della funzione catalitica ossidativa e quello, conseguente, della autotrasformazione in impalcature macromolecolari fisse ed insolubili. La suddetta autotrasformazione avverrebbe in seguito e per mezzo della catalisi ossidativa. Le suddette osservazioni sperimentali si adattano bene ai nostri risultati, almeno per ciò che concerne la dimostrata molteplicità delle componenti del sistema. Ricordiamo infatti che il sistema fenolossidasico da noi studiato risulta composto da almeno undici componenti (dieci componenti A e la componente P).

Noi non siamo riusciti ad ottenere dai nostri esperimenti chiare indicazioni utili all'individuazione di eventuali polimorfismi gene-enzima per nessuna delle dieci componenti A osservate, nonostante l'elevato grado di eterogeneità elettroforetica riscontrato. Sono tuttavia possibili alcune considerazioni speculative. Innanzitutto sulla struttura quaternaria di alcune componenti isoenzimatiche A: noi pensiamo infatti che l'eterogeneità elettroforetica riscontrata principalmente nella zona A_2 (A_2' , A_2'' , A_2''') ma presente anche nelle zone A_3 (A_3' , A_3'' , A_3''') ed A_c (A_c' , A_c'' , A_c''') possa essere almeno parzialmente spiegata postulando l'esistenza di equilibri monomero-multimero (si osservi l'eterogeneità presente nelle componenti delle zone A_2 ed A_3 figg. 2, 3 e 4). Il reperimento di zimogrammi privi di zone A_2 , A_3 ed A_c , ma in pos-

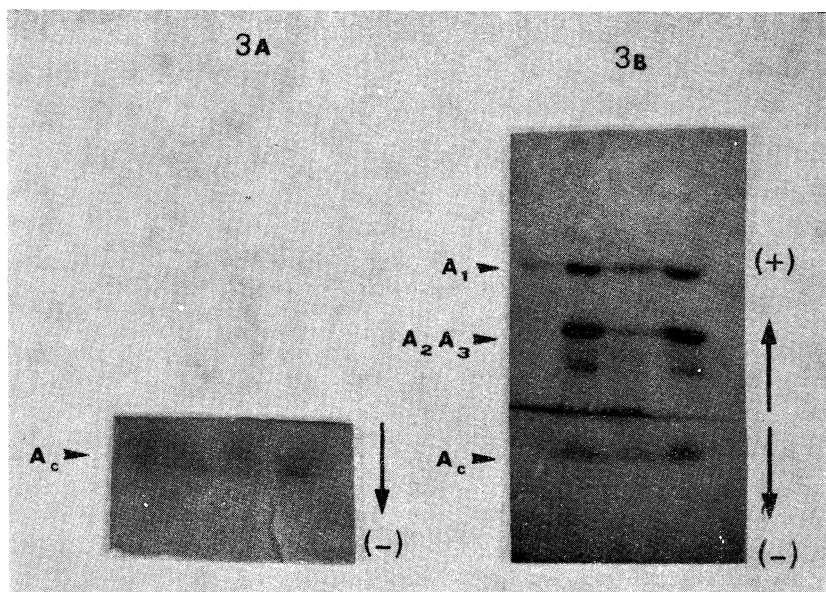


Fig. 3. - Il gel d'amido 3B pone in evidenza un'incompleta separazione delle componenti A_2 ed A_3 nonché la presenza di componenti A_c dotate di mobilità catodica (pH 8,65). Il frammento di gel 3A pone in rilievo la presenza di 2-3 componenti della zona A_c .

sesto della componente A_1 , può suggerire l'ipotesi che prende in considerazione l'esistenza di sistemi genici strutturali e/o di regolazione, indipendenti.

Inoltre la presenza di zimogrammi completamente « silenti » o « nulli » può far pensare che questi sistemi enzimatici non siano gli unici implicati nei processi di melanizzazione e di indurimento delle cuticole. Quest'ultima affermazione trova sostegno nel fatto che tutti gli individui allo stadio pupale i cui omogenati hanno fornito zimogrammi « silenti », sembravano essere fenotipicamente normali in rapporto alle loro caratteristiche di pigmentazione e di cuticularizzazione. Inoltre dati non ancora pubblicati di Peretti, Vanni, Grigolo, Malacrida, Gasperi, Cima e Bianchi, hanno posto in evidenza che gli zimogrammi tirosinasi ottenuti da individui dei ceppi WHO e bwb

(brown body, un ceppo mutante autosomico recessivo per la pigmentazione del corpo) non differiscono né qualitativamente né quantitativamente, ma che anzi sono in pratica sovrapponibili, con alcune eccezioni interessanti le bande della zona A_c .

Tuttavia la suddetta ipotesi non prende in considerazione la possibilità che l'origine degli zimogrammi « silenti », sia dovuta ad errori di campiona-

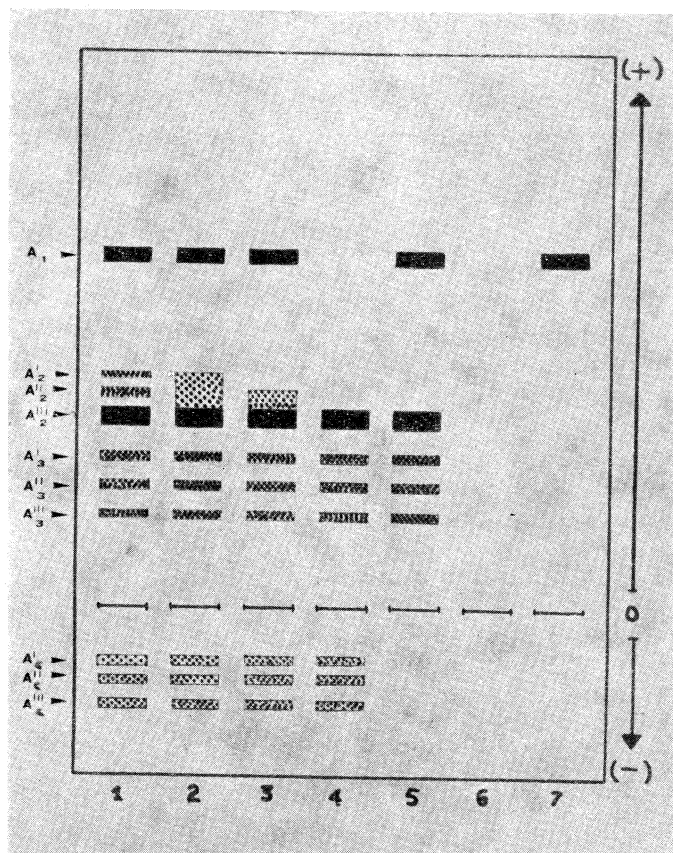


Fig. 4. - Rappresentazione schematica riassuntiva dell'eterogeneità elettroforetica incontrata durante la sperimentazione. Si passa gradualmente da zimogrammi composti da dieci frazioni isoenzimatiche ad altri parzialmente o totalmente « silenti » (per la discussione si veda il testo).

mento. Infatti se accettiamo l'ipotesi sopraesposta di Mitchell, Weber e Schaar (1967), dobbiamo ammettere che individui simili per età cronologica ma dissimili per età biologica (presenza di asincronie nei processi di formazione delle cuticole, non rilevabili fenotipicamente) possano presentare zimogrammi fortemente dissimili anche da un punto di vista quantitativo.

Un altro argomento interessante è inoltre rappresentato dalla dimostrata azione attivatrice esercitata sulle componenti A da soluzioni di etanolo/tampone. Anche nelle nostre condizioni sperimentali, infatti, zimogrammi asso-

lutamente identici sono stati ottenuti preincubando le due sezioni orizzontali di un unico gel rispettivamente con la frazione P, secondo Mitchell e Weber (1965) e con etanolo/tampone (in rapporto di 1 : 1) pH 6,3 (McKechnie, 1974).

Il suddetto risultato ci ha posto automaticamente alcune domande sui meccanismi di attivazione espliciti sia dalla frazione P che dalla soluzione etanolo/tampone.

L'ipotesi speculativa che per il momento ci pare più probabile è quella postulante che l'attivazione delle componenti A consista in modificazioni parziali interessanti la struttura molecolare delle componenti A medesime. Le suddette modificazioni potrebbero essere determinate enzimaticamente dalla frazione P e chimicamente dall'etanolo, ad esempio mediante solubilizzazione parziale di componenti lipidiche o lipoproteiche presenti nelle zone A. La presenza di dati sostenenti la suddetta ipotesi è, a nostra conoscenza, limitata alla già citata ricerca di Mitchell, Weber e Schaar (1967). Secondo i suddetti Autori infatti almeno due componenti (A_2 ed S) sarebbero lipoproteine. Inoltre va pure ricordata la segnalazione di Lewis e Lewis (1963) indicante una « partecipazione » lipidica nei processi di attivazione dei sistemi fenolossidasi.

BIBLIOGRAFIA

- LEWIS H. W. e LEWIS H. S. (1963) – « Ann. N. Y. Acad. Sci. », 100, 827–839.
MCKECHNIE S. W. (1974) – « Biochem. Genet. », 11, 337–346.
MITCHELL H. K. e WEBER U. M. (1965) – « Science », 148, 964–965.
MITCHELL H. K., WEBER U. M. e SCHAAR G. (1967) – « Genetics », 57, 357–368.
PEEPLES E. E., BARNETT D. R. e OLIVER C. P. (1968) – « Science », 159, 548–552.
PEEPLES E. E., GEISLER A., WHITCRAFT C. J. e OLIVER C. P. (1969) – « Biochem. Genet. », 3, 563–569.
PEEPLES E. E., GEISLER A., WHITCRAFT C. J. e OLIVER C. P. (1969) – « Genetics », 62, 161–170.
POULIK M. D. (1957) – « Nature », 180, 1477.
WARNER C. K., GRELL E. H. e JACOBSON K. B. (1974) – « Biochem. Genet. », 11, 359–365.