
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

PAOLO MARIA BISOL, BRUNO BATTAGLIA, GIUSEPPE BOVO

**Polimorfismi enzimatici in *Gammarus insensibilis*. II.
Controllo genetico e caratterizzazione delle esterasi**

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 62 (1977), n.2, p. 261–266.
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1977_8_62_2_261_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/>

Genetica. — *Polimorfismi enzimatici in Gammarus insensibilis*.

II. *Controllo genetico e caratterizzazione delle esterasi* (*). Nota di PAOLO MARIA BISOL, BRUNO BATTAGLIA e GIUSEPPE BOVO, presentata (**) dal Corrisp. B. BATTAGLIA.

SUMMARY. — The difficulty of understanding the esterase patterns in the Amphipod *Gammarus insensibilis*, due to the differential activities for various bands, has been overcome by employing several inhibitors and substrates. Thus five *loci* coding for arylesterase, acetylerase, cholinesterase, carboxylesterase have been identified.

The results of some crossing also show that the arylesterase *locus* is represented by three codominant alleles and that the enzyme has a dimeric subunit structure.

Le esterasi comprendono un gruppo eterogeneo di enzimi distinguibili sulla base delle diverse affinità per il substrato e sensibilità all'azione degli inibitori. Si possono in tal modo riconoscere carbossilesterasi, arilesterasi, acetilesterasi e colinesterasi (Krisch, 1971) [7].

Gli esteri che di solito vengono utilizzati come substrato per identificare questi enzimi dopo l'analisi elettroforetica, hanno poco in comune con il substrato biologico dell'enzima, per cui il metodo è altamente aspecifico, con conseguente reazione positiva da parte di tutte, o quasi, le classi. Ne deriva che, mentre, da un lato, diviene relativamente facile dimostrare negli zimogrammi delle esterasi l'esistenza di numerosi loci, dall'altro il corrispondente elevato numero di bande che si evidenziano introduce qualche complicazione ai fini di una corretta interpretazione del loro determinismo genetico. Tali difficoltà possono essere in parte superate qualora si riesca a verificare mediante incroci l'effettivo controllo genetico delle frazioni o, quanto meno, stabilire a quali classi di esterasi esse appartengano: l'uso di inibitori dovrebbe portare ad una diminuzione del numero di bande ovvero ad una semplificazione del quadro elettroforetico.

Un approccio di questo tipo è stato da noi effettuato per lo studio delle esterasi di *Gammarus insensibilis*, al fine di verificare alcune ipotesi formulate sulla base dei dati ottenuti da precedenti ricerche (Battaglia e Bisol, 1975) [2]. In particolare, la diversa attività di frazioni con eguale mobilità ci aveva portato a supporre l'esistenza di un polimorfismo attribuibile alla alternativa « allele attivo - allele silente ».

Gli esemplari di *Gammarus insensibilis* utilizzati per questa indagine sono stati raccolti nella laguna di Venezia (Chioggia), nella zona antistante

(*) Lavoro eseguito negli Istituti di Biologia Animale dell'Università di Padova e di Biologia del Mare, CNR, Venezia.

(**) Nella seduta del 12 febbraio 1977.

l'isola di San Felice, su un fondale a *Ulva lactuca*. Le modalità di allevamento e di elettroforesi sono quelle descritte da Battaglia e Bisol (1973) [1]. Per la caratterizzazione delle diverse classi di esterasi si sono impiegati i seguenti inibitori: Eserina solfato, Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), Diisopropilfosfofluoruro (DPF), CuSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, Tiocetamide, P (cloromercuri) benzoato di Sodio (PCMB) (Gooch e Schopf, 1970 [5]; Stephen e Cheldelin, 1970 [11]). La piastra di gel di acrilamide dopo la corsa elettroforetica veniva messa in una soluzione di tampone fosfato 0,1 M pH 6,5, contenente inibitore alla concentrazione di 1×10^{-4} M; dopo trenta minuti questa soluzione veniva sostituita con la miscela colorante. Le prove di specificità per il substrato sono state condotte colorando con soluzioni contenenti sia α che β naftilacetato. A seconda dell'isomero idrolizzato si hanno colorazioni diverse: nera per α , rossa per β , marrone in caso di reazioni aspecifiche.

Le esterasi di *Gammarus insensibilis* presentano un numero massimo di 9 bande (fig. 1).



Fig. 1. - Ferogramma schematico delle esterasi in *Gammarus insensibilis*.

Sulla base delle diverse risposte agli inibitori (Tabella I) è possibile classificare come acetilesterasi le frazioni 1-3-4; carbossilesterasi la frazione 2; acetilcolinesterasi la frazione 5; colinesterasi la 6. Le rimanenti frazioni possono essere considerate delle arilesterasi anche se la prova con ioni di metalli pesanti non ha provocato nessuna inibizione (Holmes e Whitt, 1970 [6]; Master e Holmes, 1975 [9]; Metcalf *et al.*, 1971 [10]).

Considerando anche i risultati delle prove di affinità per il substrato risulta che le frazioni 1 e 2 sono controllate da due loci distinti, come pure le frazioni 5 e 6. Purtroppo l'eccessiva attività a livello di queste bande, complicata dalla presenza di bande a minore attività (satelliti) non consente di valutarne correttamente il polimorfismo. D'altra parte, dato che queste bande sono sensibili allo stesso tipo di inibitori (eserina e organofosfati), non è possibile semplificare il quadro elettroforetico. Per le frazioni 3 e 4 i dati sono ancora insufficienti per confermare l'ipotesi di polimorfismo presenza-assenza (Battaglia e Bisol, 1975) [2].

I risultati di alcuni incroci hanno invece permesso di stabilire il tipo di controllo genetico delle tre frazioni più lente [7, 8, 9] per le quali l'elevato numero di fenotipi ad attività differenziata, riscontrato in varî campiona-

menti, - che non rientrava in alcuno schema interpretativo - ci aveva indotto a formulare l'ipotesi di loci distinti con un polimorfismo dello stesso tipo che per le frazioni 3 e 4 (fig. 2).

TABELLA I
Esterasi di Gammarus insensibilis

	NUMERO DELLE BANDE								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>a) inibitore:</i>									
eserina	-	-	-	-	++	++	-	-	-
PCMB	-	-	-	-	-	-	++	++	++
PMSF	-	+	-	-	++	+	-	-	-
DPF	-	++	+	+	++	+	-	-	-
CuSO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pb(NO ₃) ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tioacetamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>b) substrato:</i>									
α -naftilacetato	-	++	++	++	++	++	+	+	+
β -naftilacetato	++	-	-	-	-	-	+	+	+

a) effetto degli inibitori;

b) affinità per il substrato;

(i segni + indicano o il grado di inibizione o quello di affinità).

I rapporti di segregazione ottenuti (Tabella II) e le prove di inibizione e di affinità per il substrato indicano che le frazioni più lente [7, 8, 9] delle esterasi sono controllate da un unico locus a tre alleli. Occorre segnalare che l'esistenza del terzo allele, quello più veloce, è stato dimostrato con certezza mediante incroci (incrocio numero 6) e che nei precedenti lavori non se n'era tenuto conto. Ciò era dovuto al fatto che l'impiego come substrato del solo isomero α naftilacetato non consentiva di evidenziare le diverse affinità per il substrato (Tabella I) per cui bande più veloci erano erroneamente attribuite al locus successivo (fig. 1).

Gli elettromorfi della F₁ dei primi 6 incroci permettono anche di interpretare la struttura della proteina: gli eterozigoti a 3 bande, con banda centrale di ibridazione, indicano che si tratta di un dimerico (Brewer, 1970) [3]. L'analisi

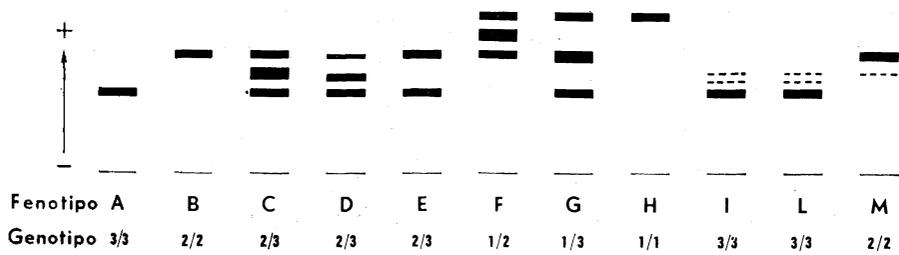


Fig. 2. - Elettromorfi schematici del locus più lento delle esterasi in *Gammarus insensibilis*.

delle discendenze degli altri incroci riportati in tabella consente inoltre di ricondurre tutti i fenotipi ai sei genotipi previsti dalle combinazioni di tre alleli. In particolare i fenotipi I, L, M, sono da considerarsi omozigoti rispettivamente per gli alleli 3 e 2; eterozigoti per questi due alleli di fenotipo D ed E. Significativo è l'incrocio n. 8 tra un maschio con fenotipo A (unica banda) e una femmina con fenotipo D (tre bande, di cui le prime due più attive della terza). Nella discendenza sono comparsi oltre ai fenotipi parentali i fenotipi E (due bande) e C (tre bande con disposizione tipica del dimero).

Questi risultati, in contrasto con quanto si potrebbe dedurre dai fenotipi degli eterozigoti derivanti dall'incrocio n. 7, non consentono di ipotizzare

TABELLA II

Rapporti di segregazione

(si riportano solo i fenotipi)

Tipo di incrocio $\text{♀} \times \text{♂}$	Fenotipi discendenza						χ^2	p
	A	B	C	D	E	F		
1) A×A	19							
2) A×B			15					
3) C×A	9		11				0,889	0,3
4) B×C		10	14				0,666	0,4
5) C×C	2	4	9				0,733	0,6
6) B×F		12				13	0,040	0,8
7) D×D	5	5		11			0,047	0,8
8) A×D	16		2	4	11		0,030	0,8 (*)

(*) Calcolato cumulando le classi fenotipiche CDE (vedere testo).

l'esistenza di alleli che si differenziano dagli altri, per la capacità di dare o non dare ibridazione, cioè per la struttura. Se così fosse infatti avremmo dovuto verificare uno dei seguenti rapporti di segregazione: due classi in rapporto 1 : 1 se il maschio era omozigote; 3 classi in rapporto di 2 omozigoti, 1 eterozigote, 1 eterozigote (di tipo diverso dal precedente) se il maschio era eterozigote, assumendo che questa condizione è fenotipicamente indistinguibile da quella omozigote qualora siano implicati alleli a pari mobilità. Il fatto di avere invece trovato 4 classi fenotipiche, con eterozigoti a 3 bande disposte secondo lo schema classico degli ibridi, e di veder rispettato il rapporto di segregazione 1 : 1 cumulando le tre classi a più bande (si ottengono così 16 omozigoti e 17 eterozigoti), indica che non ci sono altre varianti alleliche.

Con tutta probabilità le diverse espressioni fenotipiche dipendono da artefatti metodologici. Casi analoghi sono stati descritti da Markert e Whitt (1968) [8] per diversi enzimi e sono spiegabili in termini di modificazioni della struttura terziaria o quaternaria della proteina. Diversi fattori possono essere responsabili di questa alterazione: ad esempio, interferenza delle condizioni di elettroforesi, presenza di particolari sostanze nei tamponi, o infine la concentrazione stessa dell'enzima. In ultima analisi i diversi elettromorfi dipendono dalla dissociazione e successive ricombinazioni differenziali delle catene polipeptidiche.

Nel caso di *Gammarus insensibilis* riteniamo che responsabile dei fenotipi « anormali » sia il sale etilendinitrotetraacetato di sodio (EDTA). A sostegno di questa ipotesi c'è la dimostrazione sperimentale di un fenomeno analogo per un locus dell'alcool deidrogenasi in *Zea mais* (Fischer e Schwart, 1973) [4]. In presenza di ioni zinco o di EDTA si ottenevano negli eterozigoti degli elettromorfi del tutto identici a quelli da noi osservati.

BIBLIOGRAFIA

- [1] B. BATTAGLIA e P. M. BISOL (1973) - *Polimorfismi enzimatici in Gammarus insensibilis della Laguna Veneta*. « Atti Ist. Ven. SS. LL. AA. », 103, 441-448.
- [2] B. BATTAGLIA e P. M. BISOL (1975) - *Biochemical polymorphisms in marine crustaceans in relation to their ecology*. « Proc. 9th Europ. mar. biol. Symp. », H. Barnes, Editor, Aberdeen Univ. Press, 573-585.
- [3] G. J. BREWER (1970) - *Introduction to isozyme techniques*. Academic Press, New York, 188.
- [4] M. FISCHER e D. SCHARWITZ (1973) - *Dissociation and reassociation of maize alcoholdehydrogenase: allelic differences in requirement for zinc*. « Mol. Gen. Genetics », 127, 33-38.
- [5] J. L. GOOCH e T. J. M. SCHOPF (1970) - *Population genetics of marine species of the phylum Ectoprocta*. « Biol. Bull. », 138, 138-156.
- [6] R. S. HOLMES e G. S. WHITT (1970) - *Developmental genetics of Esterase isozymes of Fundulus heteroclitus*. « Biochem. Genetics », 4, 471-480.
- [7] K. KRISCH (1971) - *Carboxylic ester hydrolase*, The Enzyme, Boyer Editor, Academic Press, New York, 5, 44-69.

- [8] C. L. MARKERT e G. S. WHITT (1968) - *Molecular varieties of isozymes*. « *Experientia* », 24, 997-1088.
- [9] C. J. MASTER e R. S. HOLMES (1975) - *Haemoglobin, isoenzymes and tissue differentiation*, « North-Holland Research Monographs Frontiers of Biology », 42, 308.
- [10] R. A. METCALF, G. S. WHITT, W. F. CHILDERS e R. L. METCALF (1972) - *A comparative analysis of the tissue esterases of the white crappie (Pomoxis annularis Rafinesque) and black crappie (Pomoxis nigromaculatus Lesueur) by electrophoresis and selective inhibitors*. « *Comp. Biochem. Physiol.* », 41, 27-38.
- [11] W. P. STEPHEN e I. H. CHELDELIN (1970) - *Characterization of soluble esterases from the thoracic muscle of the American cockroach, Periplaneta americana*. « *Biochim. Biophys. Acta* », 201, 109-119.