

35 S. CARTA, Nora FRONTALI e G. VIVALDI. — Il contenuto in aminoacidi liberi e altri composti nel tessuto nervoso di *Apis mellifica* L.

Riassunto. — Estratti di cervello di ape vengono sottoposti a un procedimento combinato di analisi su carta, che comprende elettroforesi a due diversi valori di pH, cromatografia bidimensionale e sviluppo con diversi reattivi. Questo procedimento ha permesso di identificare 18 aminoacidi, un peptide (glutathione), un idrossiacido (acido isetionico), e di accertare la presenza di altri composti, che non sono stati ancora identificati: alcuni aminoacidi (di cui uno solforato), alcuni peptidi, un composto guanidinico, uno o più composti basici positivi alla ninidrina, una o più basi organiche.

Una analisi mediante cromatografia su colonna di resina scambiatrice di ioni ha confermato sostanzialmente i risultati ottenuti su carta, e ha fornito i dati quantitativi per i singoli aminoacidi prima e dopo idrolisi acida dell'estratto. Si tratta dei primi dati relativi a tessuto nervoso di insetti, ed essi vengono discussi a confronto con i dati disponibili dalla letteratura sul contenuto in aminoacidi del tessuto nervoso di mammiferi e di invertebrati.

Summary. — Honeybee brain extracts were subjected to a procedure of analysis on paper involving electrophoresis at two pH values, bidimensional chromatography and development with various reagents. This led to the identification of 18 aminoacids, a peptide (glutathione), a hydroxyacid (isethionic acid) and showed the presence of other as yet unidentified compounds: some aminoacids (one of which contained sulphur), some peptides, a guanidinic compound, one or more basic compounds reacting with ninhydrin, and one or more organic bases.

An ion exchange chromatographic analysis substantially confirmed the results obtained on paper, and gave quantitative data on the individual aminoacids before and after hydrolysis. These results are discussed in relation to the data available from the literature on the aminoacid content of mammalian and invertebrate nervous tissue.

Nel corso di una serie di ricerche sulla presenza nel tessuto nervoso di insetti di alcuni enzimi del metabolismo degli aminoacidi, che sono caratteristici del tessuto nervoso dei vertebrati (la glutammico-decarbossilasi e la transaminasi dell'acido γ -amino-butyrico), si è avvertita la

necessità di conoscere quale fosse il contenuto in aminoacidi liberi del materiale in esame, nella fattispecie cervello di ape.

Sono disponibili molti dati sul contenuto in aminoacidi della emolinfa di insetti, contenuto particolarmente elevato dato che i valori possono oscillare fra 40 e 385 mg per 100 ml ⁽¹⁾ (6 mg è il valore medio per 100 ml di sangue umano intero). Scarse notizie si hanno invece sul contenuto in aminoacidi dei tessuti di insetti, e nessuna in particolare sul tessuto nervoso, mentre il contenuto in aminoacidi e in altri composti del tessuto nervoso di altri invertebrati (molluschi e crostacei) è stato oggetto di indagini approfondite ^(2, 3, 4, 5). Questa ricerca ci è sembrata quindi presentare anche un interesse per gli studi di biochimica comparata, data la possibilità di un confronto con le ricerche suddette.

METODI E MATERIALI

PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO. — Operaie di *Apis mellifica* L. venivano anestetizzate con anidride carbonica e mantenute nel medesimo stato mediante bassa temperatura, in un provettone circondato da ghiaccio. Il cervello, comprensivo dei lobi ottici, veniva prelevato a occhio nudo, e trasferito immediatamente in un omogenizzatore di Elvehjem-Potter circondato da polvere di ghiaccio secco. Il tessuto veniva omogenizzato e deproteinizzato con 10-20 volumi di etanolo al 90% contenente lo 0,01% di acido picrico, lasciato 1 ora a 4° e centrifugato per 10 minuti a $6000 \times g$. Il precipitato veniva di nuovo estratto con etanolo all'80% e i due supernatanti uniti venivano portati a secco sotto pressione ridotta a temperatura ambiente. Si ridiscioglieva in piccolo volume di acqua distillata e si centrifugava di nuovo ($20.000 \times g$). Questo estratto veniva impiegato per l'elettroforesi e la cromatografia su carta. Per la cromatografia su colonna l'acido picrico veniva allontanato mediante ripetute estrazioni con etere dopo acidificazione con HCl a pH 1-1,5. Il pH veniva quindi aggiustato a 2-2,5 con NaOH.

CROMATOGRAFIA SU COLONNE DI RESINE SCAMBIATRICI DI IONI. — Veniva impiegato il metodo di MOORE e STEIN ⁽⁶⁾; la determinazione colorimetrica veniva eseguita con il reattivo descritto successivamente dagli stessi Autori ⁽⁷⁾. Il calcolo delle quantità dei singoli aminoacidi avveniva in base ai rispettivi standard; per la prolina e l'acido glutammico sono state adottate le formule proposte da ROSSI-FANELLI, CAVALLINI e DE MARCO ⁽⁸⁾.

ELETTROFORESI SU CARTA AD ALTO VOLTAGGIO. — Veniva impiegato l'apparecchio descritto da MARKHAM e SMITH (⁹), a cui era aggiunta una serpentina per il raffreddamento del tetracloruro di carbonio con acqua corrente. La carta era Whatman 1, o Whatman 3MM nei casi in cui il materiale da separare era molto abbondante (i sottoindicati voltaggi si riferiscono alla carta Whatman 1, e venivano ridotti di circa 1/3 per la carta 3MM, aumentando i tempi in proporzione). Venivano eseguiti tre tipi di separazione degli aminoacidi, con tre diversi tamponi: 1) acido formico 2% e acido acetico 4%, pH 1,9. A questo pH quasi tutti gli aminoacidi migrano, con diverse velocità, verso il catodo. Buone separazioni si ottenevano con 50 V/cm in 40 minuti, linea di partenza a 10 centimetri dal centro sul lato anodico; 2) piridina 5% e acido acetico 0,5%, pH 6. A questo pH gli aminoacidi neutri restano sulla linea di partenza, e si separano così dai basici e dagli acidi, che migrano rispettivamente verso il catodo e verso l'anodo. Venivano generalmente applicati 50 V/cm per 30 minuti, con linea di partenza al centro; 3) borato di sodio 0,025 M, pH 9,2. Questo tampone è stato usato soltanto allo scopo di separare fra loro gli aminoacidi basici (50 V/cm, 40 minuti).

CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONALE SU CARTA. — E' stata usata la tecnica descritta da UNDERWOOD e ROCKLAND (¹⁰), che comporta l'uso di foglietti di carta di cm 12 x 12. Questa tecnica è molto più rapida di quella usuale su fogli grandi, e permette di ottenere macchie visibili anche con piccolissime quantità di materiale. I solventi erano 1° alcool butilico terziario-acido formico-acqua (69,5/1/29,5) e 2° fenolo-ammoniaca concentrata-acqua (77,5/1/21,5).

TECNICHE DI SVILUPPO DEI CROMATOGRAMMI. — Oltre alla ninidrina sono state impiegate le seguenti reazioni per mettere in evidenza particolari aminoacidi oppure altri composti (salvo poche eccezioni i reattivi non venivano spruzzati sulla carta, ma impiegati per immersione):

1) reazione di SAKAGUCHI (¹¹), dà macchie arancioni con i composti guanidinici e si può applicare anche dopo la ninidrina;

2) reazione dell' α -naftolo-diacetile (¹²), dà macchie blu-viola su fondo bruno con i composti guanidinici, particolarmente con i bisostituiti;

3) reazione dello iodoplatinato (¹³), dà macchie bianche su fondo rosa con i composti solforati, eccetto quelli completamente ossidati; si può applicare anche prima della ninidrina;

4) reazione del KI + HCl (¹⁴), dà macchie brune con i composti solforati parzialmente ossidati;

5) reazione dell'isatina (¹⁵), dà una macchia blu con la prolina;

6) diazoreazione di Pauly modificata (¹⁶), dà una macchia bruna con l'istidina;

7) indicatore (blu di bromofenolo) (¹⁷), dà macchie gialle con i composti acidi e macchie blu con i composti basici, su fondo verde-blu;

8) reazione di Dragendorff (¹⁸) dà macchie rosse su fondo arancio con le basi organiche;

9) reattivo alla dipicrilamina (¹⁹), lo stesso;

10) reazione per i composti del fosforo (²⁰), dà macchie blu su fondo bianco.

Idrolisi acida. — Veniva compiuta con HCl 6 N per 6 ore a 100° in fiala chiusa. L'acido veniva poi eliminato evaporando più volte il campione sotto vuoto su NaOH.

Eluzione dei composti dalla carta. — Essa era preceduta dalla concentrazione del materiale in piccolo spazio mediante un artificio molto semplice. La carta comprendente la zona da eluire veniva tagliata in forma rettangolare sormontata da un triangolo su uno dei lati corti, e introdotta in un piccolo beaker con la punta in alto. Aggiungendo a più riprese poche gocce di acqua distillata sul fondo del recipiente, si otteneva in 6-12 ore la migrazione alla punta di tutto il materiale idrosolubile. La punta tagliata poteva facilmente venir poi eluita con pochi microlitri di acqua o di tampone, immergendola direttamente nel liquido.

RISULTATI

Campioni di estratto di cervelli di ape corrispondenti a circa 70 mg di tessuto venivano sottoposti ad elettroforesi su bande larghe 10 cm di carta Whatman 1, a confronto con un miscuglio di aminoacidi noti deposto a lato. La carta veniva quindi tagliata per il lungo in striscie della larghezza di 1 cm e ogni striscia veniva sviluppata con un diverso reattivo. I risultati, con i due tamponi, sono indicati nelle fig. 1 e 2. Questo esperimento preliminare ha dato una prima, grossolana, informazione sugli aminoacidi e su altri composti presenti nell'estratto, e ha permesso

di impostare il successivo esperimento, destinato ad analizzare una maggior quantità di materiale. A questo scopo ci è sembrato che si potessero utilmente combinare tre diversi procedimenti di separazione, facendo seguire nel tempo: elettroforesi a pH 6, elettroforesi a pH 1,9 degli aminoacidi neutri, e cromatografia bidimensionale su carta di tutte le bande ottenute.

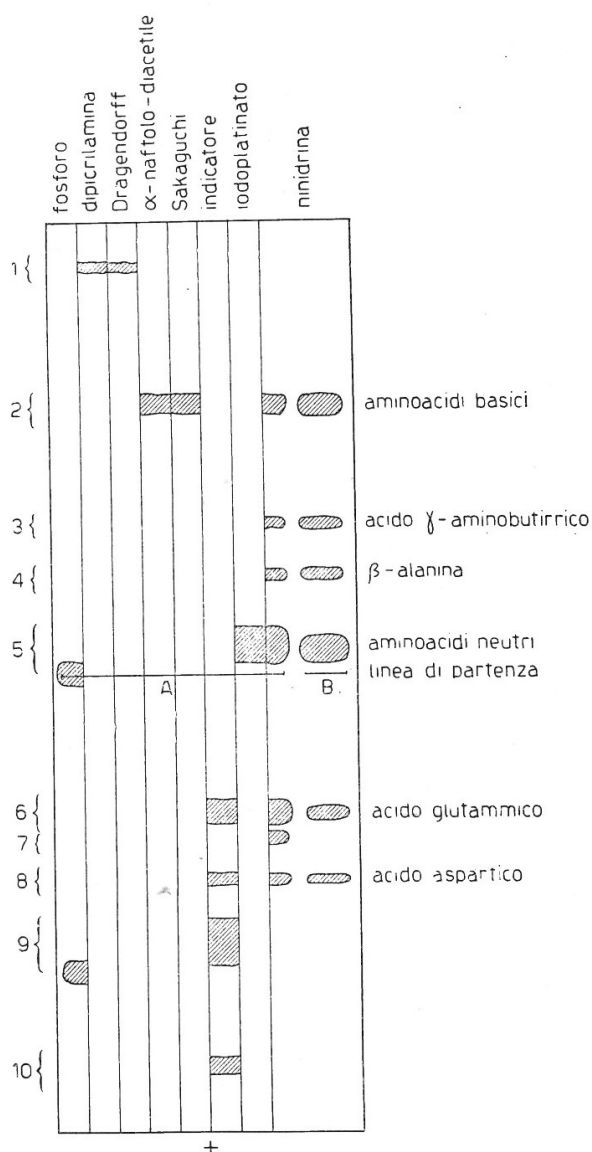


Fig. 1. - Elettroferogramma su carta di un estratto di cervello di ape (A) a confronto con un miscuglio di aminoacidi noti (B); tampone pH 6,0, 50 V/cm, 30 minuti. Sviluppo con diversi reattivi.

Un estratto di cervelli di ape corrispondente a circa 150 mg di tessuto veniva sottoposto ad elettroforesi a pH 6 su una banda larga 12 cm di carta Whatman 3MM. Una sottile striscia dell'elettroferogramma veniva ritagliata e sviluppata con ninidrina. Si otteneva una serie di bande simili a quelle indicate in fig. 1. Le zone corrispondenti a quelle che nella figura sono numerate dall'1 al 9 venivano ritagliate, concentrate come sopra descritto ed eluite con poche decine di microlitri di acqua.

Nella banda n. 1, negativa alla ninidrina, ma positiva ai reattivi per le basi organiche, si suppone sia presente colina, ma il materiale era troppo scarso per permettere una ulteriore analisi.

L'eluato della banda n. 2, corrispondente come mobilità agli aminoacidi basici, veniva sottoposto a cromatografia bidimensionale su carta

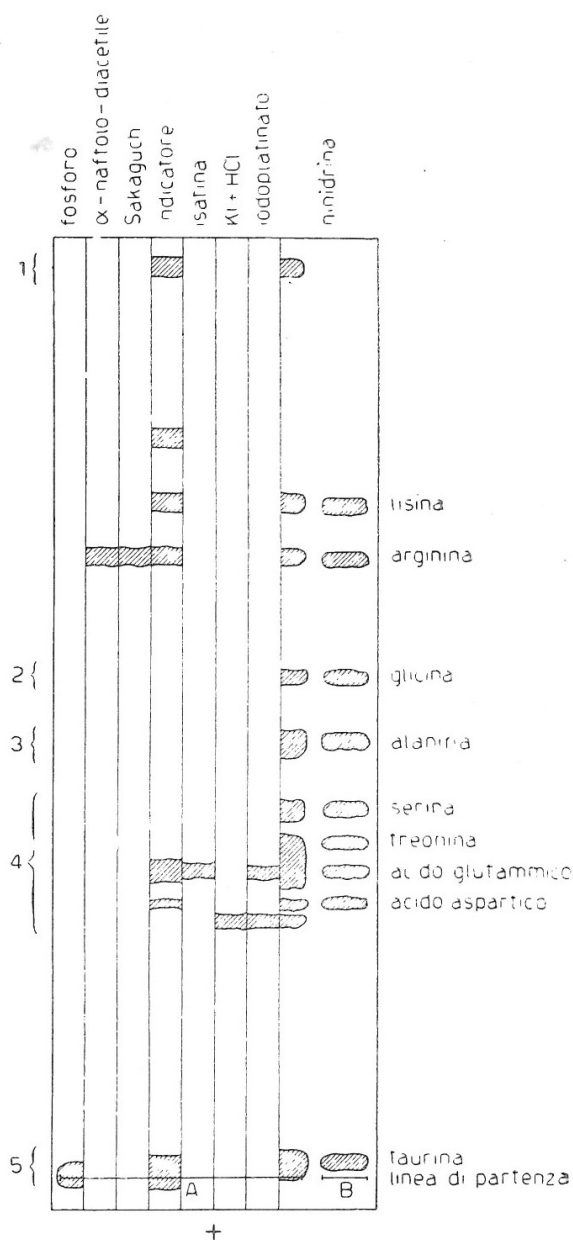


Fig. 2. - Elettroferogramma su carta di un estratto di cervello di ape (A) a confronto con un miscuglio di aminoacidi noti (B); tampone pH 4,9, 50 V/cm, 40 minuti. Sviluppo con diversi reattivi.

e a sviluppo con diversi reattivi. Erano nettamente riconoscibili sul cromatogramma la lisina e l'arginina, positiva quest'ultima ai reattivi di Sakaguchi e α-naftolo-diacetile, oltre che alla ninidrina. La presenza o meno dell'istidina rimaneva invece in dubbio a causa del suo R_f molto simile a quello della lisina. La diazoreazione era debolmente positiva. Il reattivo di Sakaguchi rivelava invece una nuova macchia sconosciuta, negativa alla ninidrina, con R_f 0,66 nel 1° solvente e 0,90 nel 2°, do-

vuta evidentemente a un composto guanidinico. Si è potuto escludere che si tratti dell'acido γ -guanidino-butyrico che da IRREVERRE e al. è stato trovato in insetti (²¹). Quanto all'istidina, la sua presenza è stata confermata in altro modo, ricorrendo alla elettroforesi su carta a pH 9,2, che dà una buona separazione degli aminoacidi basici fra loro.

Gli eluati delle zone successive, eccetto la zona n. 5, venivano sottoposti anch'essi a cromatografia bidimensionale su carta, con i risultati seguenti (ove non sia diversamente specificato, si intende parlare di macchie positive alla ninidrina):

zona n. 3: una sola macchia, con gli R_f (nei due solventi) caratteristici dell'acido γ -aminobutyrico;

zona n. 4: una sola macchia, con gli R_f e il colore caratteristico della β -alanina;

zona n. 6: una sola macchia, con gli R_f caratteristici dell'acido glutammico;

zona n. 7: numerose, piccole macchie sparse in diverse zone del foglio, di cui la più grande, positiva anche al reattivo dello iodoplatinato, veniva identificata come glutatione ossidato. Ritagliata, eluita e sottoposta a idrolisi e di nuovo a cromatografia, essa dava luogo alla comparsa di cistina, acido glutammico e glicina. Un campione puro di glutatione ossidato aveva inoltre la stessa mobilità a pH 6 della zona n. 7, e la stessa posizione cromatografica della macchia in questione. Quanto alle altre macchie, si suppone trattarsi di altri peptidi;

zona n. 8: una sola macchia, con gli R e il colore caratteristici dell'acido aspartico.

L'eluato della zona n. 5 veniva impiegato per la separazione elettroforetica a pH 4,9, su una banda larga 12 cm di carta Whatman 3MM. Una sottile striscia dell'elettroferogramma veniva anche in questo caso sviluppata con ninidrina, ottenendosi una serie di bande simili a quelle indicate in fig. 2, salvo ovviamente la mancanza degli aminoacidi acidi e basici e della zona n. 1. Le zone corrispondenti a quelle che nella figura sono numerate dal 2 al 5, venivano ritagliate ed eluite, e gli eluati venivano sottoposti a cromatografia bidimensionale su carta, con i risultati seguenti:

zona n. 2: una sola macchia, con gli R_f e il colore caratteristici della glicina;

zona n. 3: una sola macchia, con gli R_f caratteristici della alanina;

zona n. 4: numerose macchie, che sono riprodotte nella fig. 3. Sono chiaramente riconoscibili in base ai loro R_f , e in alcuni casi al loro colore, gli aminoacidi: asparagina, glutamina, serina, treonina, metionina solfossido, metionina, prolina, tirosina, fenilalanina, isoleucina e leucina. Le macchie numerate dall'1 al 6 rimangono per ora non identificate; alcune di esse scomparivano in seguito a idrolisi acida. Lo stesso cromatogramma,

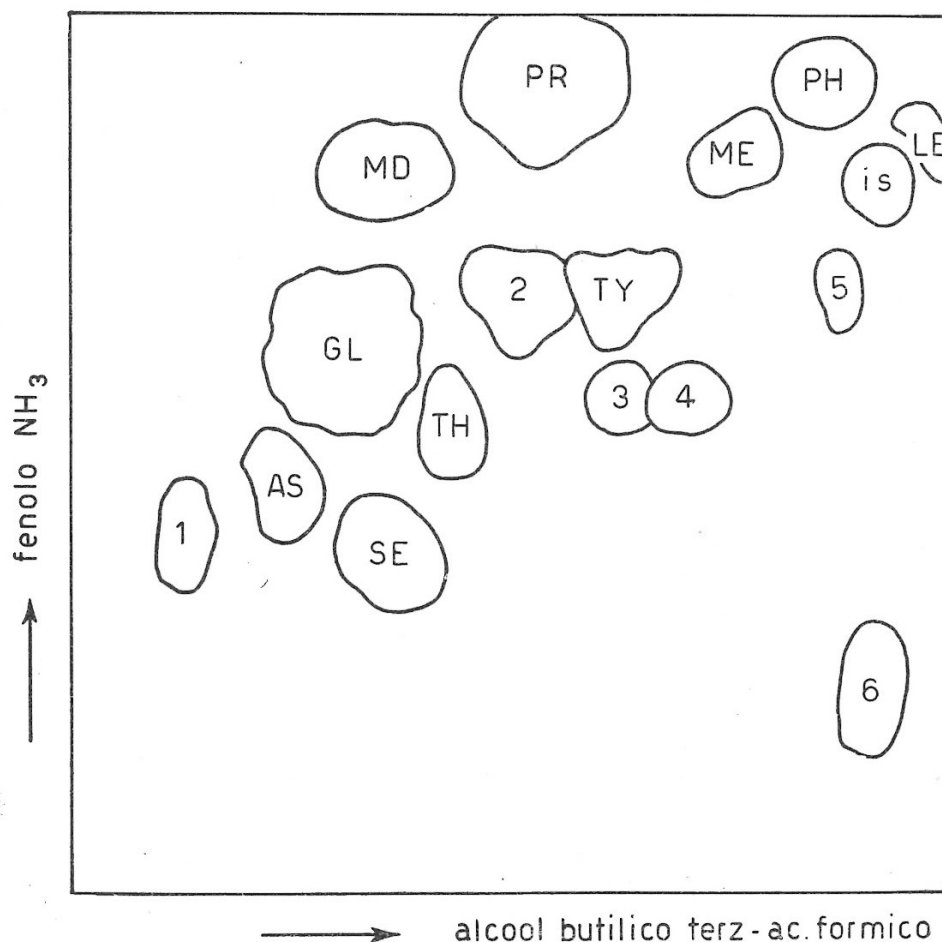


Fig. 3. - Cromatogramma ottenuto dalla banda n. 4 in fig. 2. Si riconoscono gli aminoacidi: serina (SE), asparagina (AS), treonina (TH), glutamina (GL), metionina solfossido (MD), prolina (PR), tirosina (TY), metionina (ME), fenilalanina (PH), isoleucina (IS) e leucina (LE). Le macchie numerate dall'1 al 6 non sono state ancora identificate.

togramma, prima che con la ninidrina era stato sviluppato con il reattivo dello iodoplatinato, ciò che aveva contribuito alla identificazione della metionina solfossido e della metionina; in più anche la macchia n. 1 risultava positiva a questo reattivo, indicando così la presenza di un altro aminoacido solforato, non ancora identificato;

zona n. 5: una macchia molto intensa, con gli R_f caratteristici della taurina; accanto ad essa, con R_f leggermente inferiore nel 1° solvente

si poteva distinguere una seconda macchia di scarsa intensità. Si è pensato che potesse trattarsi del nuovo composto messo in evidenza da DEFFNER e HAFTER (5) in tessuto nervoso di seppia, l'amide dell'acido cisteico, il cui comportamento elettroforetico a pH 3,9 e 2,4 è identico a quello della taurina. Parte dell'eluato della zona n. 5 è stata quindi sottoposta a idrolisi acida, e di nuovo a elettroforesi a pH 1,9. Sono comparse, oltre alla taurina, numerose macchie di aminoacidi (probabilmente lisina, glicina, alanina, serina, treonina, acido glutammico, acido aspartico), ma nessuna traccia di acido cisteico, che sarebbe invece dovuto comparire in seguito all'idrolisi, ove fosse stata presente la sua amide. La macchia che accompagna la taurina sembra così essere costituita soltanto da peptidi.

Si è voluta inoltre saggiare la presenza o meno nel nostro estratto di un altro composto solforato che è stato messo in evidenza (in grande quantità) nel tessuto nervoso di seppia: l'acido isetionico (2). Nella fig. 1 sono nettamente visibili due bande, negative alla ninidrina ma positive all'indicatore, che migrano verso l'anodo con maggior mobilità degli aminoacidi acidi. Una di queste poteva esser dovuta all'acido isetionico. Un campione puro di acido isetionico è stato sottoposto a elettroforesi a pH 6 a confronto con l'estratto, e una piccola parte della striscia è stata sviluppata con indicatore. La mobilità dell'acido isetionico corrispondeva a quella della banda contrassegnata in fig. 1 con il n. 10. La zona n. 10 è stata quindi ritagliata dalla parte di striscia non sviluppata, eluita e sottoposta a cromatografia bidimensionale su carta a confronto con un campione di acido isetionico puro. I due foglietti sono stati sviluppati con indicatore, ed effettivamente la banda n. 10 dava luogo alla comparsa di una macchia gialla molto netta, con la stessa posizione dell'acido isetionico.

L'elettroforesi e cromatografia su carta hanno quindi permesso di identificare in un estratto di cervello di ape i seguenti aminoacidi: acido aspartico, acido glutammico, asparagina, glutamina, prolina, serina, treonina, glicina, alanina, metionina solfossido, metionina, tirosina, fenilalanina, isoleucina, leucina, arginina, lisina, istidina, e di accertare la presenza di un certo numero di altre sostanze positive alla ninidrina o ad altri reagenti quali: 1) una o più basi organiche (zona 1 in fig. 1), 2) uno o più composti basici positivi alla ninidrina (zona 1 in fig. 2), un composto guanidinico, 4) un aminoacido neutro solforato, 5) alcuni peptidi neutri e acidi di cui uno identificato come glutathione ossidato, 6) alcuni composti neutri (probabilmente aminoacidi) non ancora identificati, 7) un composto acido identificato come acido isetionico.

Per avere una conferma, un chiarimento ulteriore e una valutazione quantitativa di questi risultati, si è sottoposto un estratto di cervelli di ape a cromatografia su colonne di resine scambiatrici di ioni. E' stato preparato un estratto corrispondente a 800 mg di tessuto; metà veniva sottoposto ad idrolisi acida, e aliquote (corrispondenti a 200 mg di tessuto) di estratto idrolizzato e non idrolizzato, venivano impiegate per la cromatografia su ognuna delle due colonne (lunga e corta). I grafici re-

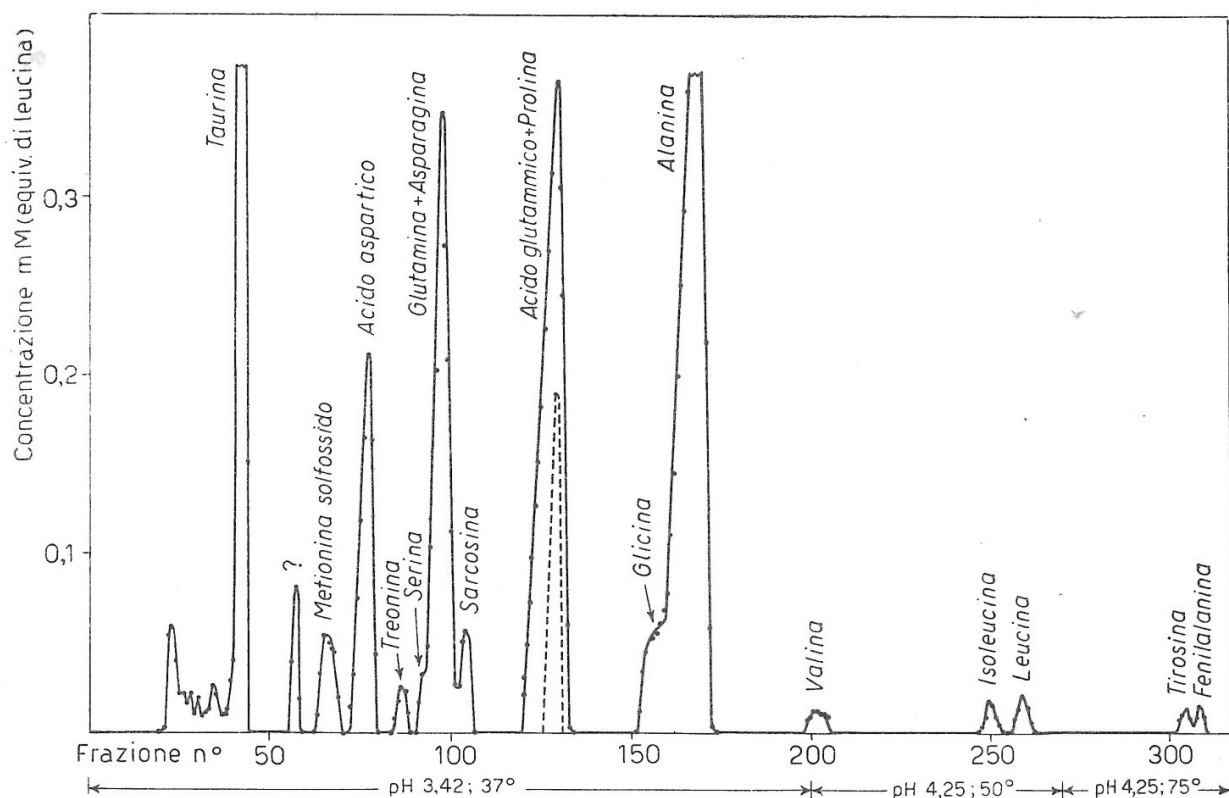


Fig. 4. - Curva di eluzione ottenuta sottoponendo un estratto di cervello di ape a cromatografia su una colonna di Dovex 50 di cm 0,9 x 100; sono indicati i cambiamenti di tampone (citrato) e di temperatura.

lativi all'estratto non idrolizzato sono riportati nelle figg. 4 e 5. I picchi sono stati riconosciuti in base alla loro posizione, e in base a ciò che era già noto dai precedenti risultati della elettroforesi e cromatografia su carta. Sono rimasti non identificati: 1) i piccoli picchi che precedono la taurina, dovuti probabilmente in parte ai peptidi acidi già messi in evidenza su carta, in parte a piccole quantità di fosfoserina, fosfoetanolamina e glicerofosfoetanolamina, e 2) un picco di forma particolarmente acuta, contrassegnato sul grafico con un punto interrogativo, che non sembra si possa attribuire all'urea. Manca d'altra parte il glutatione che era stato messo in evidenza su carta, mentre sono comparse in più la valina e la sarcosina. Quest'ultima è stata identificata sottoponendo a

cromatografia bidimensionale su carta, preceduta da desalificazione ⁽²²⁾ e concentrazione, parte del rispettivo eluato della colonna, con e senza l'aggiunta di alcuni μg di sarcosina pura.

I grafici ottenuti dall'estratto idrolizzato mostravano essenzialmente lo stesso quadro, eccetto naturalmente la scomparsa del picco della glutamina + asparagina, e il corrispondente aumento dei picchi dell'acido glutammico e aspartico. Inoltre si è notato: 1) la scomparsa dei piccoli picchi che precedono la taurina, 2) la scomparsa del picco della metionina solfossido, 3) la comparsa del picco della metionina, 4) la comparsa

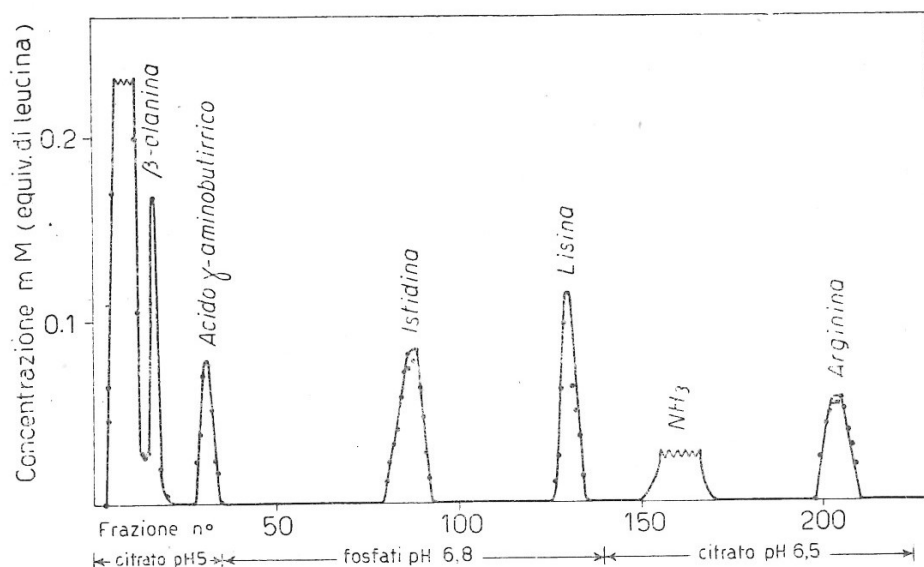


Fig. 5. - Curva di eluzione ottenuta sottoponendo un estratto di cervello di ape a cromatografia su una colonna di Dovex 50 di cm 0,9 x 45; sono indicati i cambiamenti di tampone.

di un picco sconosciuto, la cui sede è subito dopo la taurina. Per renderci ragione delle osservazioni 2) e 3), un campione puro di metionina solfossido è stato sottoposto ad idrolisi acida e quindi a cromatografia bidimensionale su carta: la macchia della metionina solfossido è risultata nettamente indebolita rispetto al controllo non idrolizzato mentre è comparsa la macchia della metionina.

I risultati dell'analisi quantitativa sono esposti nella Tabella I. Confrontando per ogni aminoacido i valori della prima con quelli della seconda colonna (estratto idrolizzato), si osserva che in molti casi essi sono simili fra loro, in altri casi vi è un aumento nella seconda colonna, dovuto probabilmente all'idrolisi di quei peptidi di cui è stata dimostrata la presenza in piccole quantità: è il caso della treonina, serina, glicina, alanina, istidina, arginina. L'idrolisi delle due amidi glutamina e aspara-

Composizione in aminoacidi di estratti di cervello in $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ di tessuto fresco (confronto fra i dati del presente lavoro e dati presi dalla letteratura).

	Ape		Gatto (24)	
		dopo idrolisi		dopo idrolisi
taurina	288,0	350,0	24,0	22,9
metionina solfossido . . .	43,7	—	—	—
acido aspartico	110,0	152,0	29,7	114,0
treonina	10,3	23,0	2,6	*
serina	17,2	36,2	7,6	7,0
glutamina + asparagina . .	215,0	—	>50,0	—
sarcosina	27,0	23,4	—	2,7
acido glutammico	317,0	925,0	128,0	186,0
prolina	98,0	80,0	< 1,6	*
glicina	26,3	77,0	10,1	24,1
alanina	308,0	320,0	8,4	8,4
valina	10,5	7,7	2,7	1,7
metionina	—	10,7	1,5	—
isoleucina	8,4	7,1	1,2	1,3
leucina	12,2	11,8	1,8	1,9
tirosina	7,7	5,1	1,2	0,8
fenilalanina	6,0	10,0	1,1	1,0
β -alanina	19,2	21,3	0,6	< 0,2
acido γ -amino-butyrico . .	31,7	35,5	23,4	24,2
istidina	99,0	142,0	0,9	1,5
lisina	69,5	*	2,0	3,0
arginina	88,0	153,0	1,4	1,6

* campione perduto.

gina determina naturalmente un aumento dei rispettivi aminoacidi, ma l'aumento che si nota per l'acido glutammico è del tutto proporzionato alla quantità di glutamina presente. Per spiegare questo fenomeno si è avanzata l'ipotesi, fondata sulle osservazioni di FOREMAN ²³), che durante la preparazione dell'estratto parte dell'acido glutammico si trasformi nel suo isomero ciclico acido pirrolidoncarbossilico, che non dà la reazione della ninidrina, mentre in seguito all'idrolisi ha luogo la trasformazione inversa. Per saggiare quest'ipotesi si è sottoposto ad elettroforesi su banda larga di carta Whatman 4 un campione di estratto a confronto con un campione puro di acido pirrolidoncarbossilico. Parte della striscia è stata sviluppata con indicatore: l'acido pirrolidoncarbossilico è risultato avere una mobilità identica a quella della banda (gialla all'indicatore) che in Fig. 4 è contrassegnata col n. 9. La zona n. 9 è stata quindi ritagliata da quella parte di striscia che non era stata sviluppata, eluita e sottoposta ad idrolisi acida. L'idrolisato, sottoposto a cromatografia bidimensionale su carta, ha dato una grossa macchia positiva alla ninidrina, con gli stessi R_f dell'acido glutammico. La nostra ipotesi ha così ricevuto una conferma.

Nella Tabella I abbiamo riportato per confronto anche i dati ottenuti da TALLAN, MOORE e STEIN (²⁴) con un estratto di cervello di gatto. La Tabella di questi autori comprendeva anche piccole quantità di composti da noi non ritrovati, e cioè: acido β -amino-n-butirrico, cistina, felinina, triptofano, citrullina, ornitina, 1-metil-istidina, 3-metil-istidina, oltre a quantità notevoli di urea, etanolamina e fosfoetanolamina. Si può osservare che per ogni aminoacido la quantità presente nell'estratto di cervello di ape è superiore, sulla base del peso fresco, a quella presente nell'estratto di cervello di gatto; ma mentre per la maggior parte di essi (estratto non idrolizzato) il fattore oscilla fra 2,3 e 7, per alcuni il fattore è molto più alto, e cioè per la β -alanina, la lisina, l'alanina, l'arginina, la prolina e la istidina (in ordine crescente fra 30 e 100). Per la taurina il fattore è intermedio (12), mentre per l'acido γ -aminobutirrico è eccezionalmente basso (1,35).

DISCUSSIONE

Nel presente lavoro è stato determinato per la prima volta il contenuto in aminoacidi del tessuto nervoso di insetti. La conoscenza della composizione chimica e dei processi metabolici di questo tessuto appare particolarmente importante se si tiene conto che l'azione tossica degli insetticidi si svolge con ogni probabilità sul sistema nervoso, e che la

natura di questa azione tossica, fatta eccezione per gli esteri fosforici, è ancora in gran parte sconosciuta.

Questa indagine aveva inoltre per noi uno scopo particolare, cioè quello di chiarire quale fosse la composizione in aminoacidi del mezzo in cui avvenivano alcune reazioni enzimatiche relative al metabolismo dell'acido glutammico e γ -aminobutirrico (GABA), che erano oggetto di uno studio parallelo ⁽²⁵⁾. Fra l'altro, poiché, in base alle osservazioni di molti Autori ⁽²⁶⁾ è stata formulata l'ipotesi che il GABA agisca come la

TABELLA II

Contenuto in aminoacidi di estratti di tessuto nervoso di invertebrati, in $\mu\text{M/g}$ di peso fresco (confronto fra dati del presente lavoro e dati presi dalla letteratura).

Tessuto	Cervello	Fibre nervose			
Specie	<i>Apis mellifica</i>	<i>Loligo pelaii</i> (2)	<i>Sepia officinalis</i> (3)	<i>Carcinus maenas</i> (3)	<i>Homarus vulgaris</i> (3)
acido aspartico . .	8,3	62,5	82	138	112
taurina	23,0	77,0	103	65	12
acido glutammico .	50,0	13,5	39	35	25
alanina	34,6	9,0	21	33	33
glicina	3,5	14,0	< 5	< 5	35

sostanza mediatrice degli effetti dei neuroni inibitori, e poiché neuroni inibitori non sono mai stati messi in evidenza negli insetti ⁽²⁷⁾, era interessante sapere se il GABA, e l'enzima capace di formarlo, erano presenti nel tessuto nervoso degli insetti. Ora a queste due domande abbiamo potuto dare una risposta positiva, e la quantità di GABA presente nel cervello di ape è risultata dello stesso ordine di grandezza di quella presente nel cervello di gatto. Rispetto agli altri aminoacidi però esso non ha quella posizione preminente che è stata notata da diversi autori nel cervello di mammiferi ^(28, 29).

L'alto contenuto in aminoacidi del tessuto nervoso di ape trova riscontro nelle osservazioni fatte da diversi autori su tessuto nervoso di altri invertebrati. La Tabella II riporta alcuni dei nostri dati a confronto con quelli ottenuti da KOEHLIN ⁽²⁾ su assoplasmi di fibre nervose di *Loligo pelaii* mediante cromatografia su colonna di resina a scambio ionico, e quelli ottenuti da LEWIS ⁽³⁾, mediante cromatografia su carta, su

fibre nervose di un altro mollusco e di due crostacei. In tutti e quattro i casi si tratta di invertebrati marini. Una loro caratteristica comune è l'altissimo contenuto in acido aspartico; nel nostro caso la più alta concentrazione è raggiunta invece dall'acido glutammico. Occorre notare che nella Tabella II abbiamo adottato, come misura più attendibile dell'acido glutammico libero, il dato ottenuto in seguito a idrolisi, a cui è stato sottratto il valore della glutamina. Si tiene conto così anche dell'acido pirrolidoncarbossilico, che è molto probabilmente un artefatto (i peptidi d'altra parte sono presenti in quantità minime).

La taurina è anch'essa contenuta in altissima quantità nei quattro invertebrati marini sopra citati. Nel nostro caso essa è presente in quantità notevolmente minore, ma pur sempre prevalente rispetto agli altri aminoacidi eccetto l'alanina (e a parte naturalmente l'acido glutammico). Anche nel cervello di ape, come abbiamo visto, essa è accompagnata dall'idrossiacido analogo, l'acido isetionico, di cui non abbiamo però ancora determinato la quantità. Secondo KOECHLIN ⁽²⁾ questi due composti sono probabilmente importanti nel metabolismo intermedio del solfo. A particolari caratteristiche nel metabolismo degli aminoacidi solforati fa inoltre pensare la presenza in quantità notevoli nel cervello di ape della metionina solfossido e di un altro aminoacido solforato non ancora identificato.

Come si è visto, la presente ricerca ha messo in luce anche la presenza in piccole quantità di numerosi altri composti positivi alla ninidrina, alla cui identificazione si sta attualmente lavorando.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Parassitologia e Laboratori di Biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) PRATT J. J. Jr. - *Ann. entomol. Soc. Amer.*, 43: 573 (1950).
- (²) KOECHLIN B. A. - *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1: 511 (1953).
- (³) LEWIS P. R. - *Biochem. J.*, 52: 330 (1952).
- (⁴) DEFFNER G. G. J. e HAFTER R. E. - *Biochim. biophys. Acta*, 32: 362 (1959).
- (⁵) DEFFNER G. G. J. e HAFTER R. E. - *Biochim. biophys. Acta*, 35: 334 (1959).
- (⁶) MOORE S. e STEIN W. H. - *J. biol. Chem.*, 192: 663 (1951).
- (⁷) MOORE S. e STEIN W. H. - *J. biol. Chem.*, 211: 907 (1954).
- (⁸) ROSSI FANELLI A., CAVALLINI D., DE MARCO C. - *Biochim. biophys. Acta*, 17: 377 (1953).
- (⁹) MARKHAM R. e SMITH J. D. - *Biochem. J.*, 52: 552 (1952).
- (¹⁰) UNDERWOOD J. C. e ROCKLAND L. B. - *Anal. Chem.*, 26: 1557 (1954).
- (¹¹) JEPSON J. B. e SMITH I. - *Nature (London)*, 172: 1100 (1953).
- (¹²) ROCHE J., THOAI N. V. e HATT J. L. - *Biochim. biophys. Acta*, 14: 71 (1954).
- (¹³) TOENNIES G. e KOLB J. J. - *Anal. Chem.*, 23: 823 (1951).
- (¹⁴) CAVALLINI D., DE MARCO C. e MONDOVI B. - *J. biol. Chem.*, 234: 834 (1959).

- (15) SMITH I. - Nature (London), 171: 43 (1953).
 - (16) SANGER F. e TUPPY H. - Biochem. J., 49: 463 (1954).
 - (17) MICHL H. - Chromatogr. Rev., 1: 11 (1959).
 - (18) NOVELLI A. e GUERRERO I. - An. Dir. nac. Quim. B. Aires, 4: 14 (1953).
 - (19) MALYOTH G. e STEIN H. W. - Biochem. Z., 322: 163 (1951).
 - (20) HANES G. S. e ISHERWOOD F. A. - Nature (London), 164: 1107 (1949).
 - (21) IRREVERRE F., EVANS R. L., HAYDEN A. R. e SILBER R. - Nature (London), 180: 704 (1957).
 - (22) STEIN W. H. - J. biol. Chem., 201: 45 (1953).
 - (23) FOREMAN F. W. - Biochem. J., 13: 481 (1914).
 - (24) TALLAN H. H., MOORE S. e STEIN W. H. - J. biol. Chem., 211: 927 (1954).
 - (25) FRONTALI N. - In corso di stampa.
 - (26) ELLIOT K. A. C. e JASPER H. H. - Physiol. Rev., 39: 383 (1959).
 - (27) WELSH J. H. e SHALLEK W. - Physiol. Rev., 26: 447 (1946).
 - (28) AWAPARA J., LANDUA A. J., FUERST R. e SEALE B. - J. biol. Chem., 187: 35 (1950).
 - (29) ROBERTS E., LOWE I. P., GUTH L. e JELINEK B. - J. exp. Zool., 138: 313 (1958).
-