

43. G. TOSCHI e S. BETTINI. — Le proteine dei muscoli di Insetti. - Studio elettroforetico.

Riassunto. — Sono state studiate mediante elettroforesi su carta le proteine sarcoplasmatiche (estraibili a debole forza ionica) e quelle fibrillari (estraibili a forza ionica elevata) dei muscoli pigmentati del volo e dei muscoli bianchi degli arti, in cinque specie di Insetti molto diverse per caratteristiche zoologiche e fisiologiche. In tutte le specie studiate si è constatata una differenza costante e univoca nei costituenti solubili a debole forza ionica tra i muscoli pigmentati del volo e quelli bianchi degli arti. Questa differenza è stata considerata in relazione con le diverse proprietà metaboliche e funzionali dei due tipi di muscoli. Non si sono osservate differenze significative per le proteine fibrillari.

Résumé. — Les protéines du sarcoplasme (extractible à faible force ionique) et les protéines fibrillaires (extractibles à force ionique élevée) des muscles pigmentés du vol et des muscles blancs des pattes ont été étudiés, par électrophorèse sur papier, chez cinq espèces d'Insectes, très différents sous l'aspect zoologique et physiologique. Chez toutes les espèces considérées on a remarqué une différence constante et univoque dans la composition des extraits de faible force ionique entre les muscles du vol et des pattes. Cette différence a été considérée par rapport aux différentes propriétés métaboliques et fonctionnelles des deux types de muscles. On n'a pas observé des différences significatives en ce qui concerne les protéines fibrillaires entre les deux types de muscles ou entre les espèces.

Summary. — The protein composition of muscles was studied by paper electrophoresis on five species of Insects, widely different in their zoological and physiological characteristics. Both the sarcoplasmic proteins (soluble at low ionic strength) and the fibrillar proteins (soluble at high ionic strength) were examined from the leg muscles (white) and from the flight muscles (pigmented). In all the species studied a constant and similar difference was found between leg and flight muscles in protein composition of the extracts at low ionic strength. This difference has been related to the different metabolic and physiological properties of the two types of muscles. No significant differences in the fibrillar proteins were observed between the different muscles and the different species.

Zusammenfassung. — Die sarkoplasmatischen Proteine (bei niedriger jonischer Kraft extrahierbar) und die fibrillaren Proteine (bei hoher jonischer Kraft extrahierbar) der pigmentierten Flügelmuskeln und der weissen Gliedermuskeln von fünf vom zoologischen und physiologischen Standpunkt grundverschiedenen Insektenarten wurden mit Hilfe der Papierelektrophorese studiert. In allen untersuchten Arten konnte ein klarer und beständiger Unterschied zwischen den bei hoher und den bei niedriger jonischer Kraft löslichen Bestandteilen der pigmentierten Flügelmuskeln und den weissen Gliedermuskeln beobachtet werden. Dieser Unterschied wurde im Zusammenhang mit den verschiedenen metabolischen und funktionellen Eigenschaften dieser Muskeln in Betracht genommen. Für die fibrillaren Proteine wurden keine bedeutsamen Unterschiede beobachtet.

Per uno studio delle relazioni che intercorrono fra le caratteristiche strutturali, biochimiche e fisiologiche della fibra muscolare, un materiale di grande interesse è dato dai muscoli degli Insetti, che presentano aspetti molto diversi con spiccate peculiarità di struttura e di funzione (^{1, 2, 3, 4, 5}).

Oltre all'attività metabolica e ai sistemi enzimatici di tali muscoli, sono state anche studiate da alcuni AA. le caratteristiche chimico-fisiche ed enzimatiche dei costituenti proteici delle strutture fibrillari contrattili (^{6, 7}).

Numerose ricerche sono state eseguite da Dubuisson e da altri su diversi Vertebrati mediante il frazionamento elettroforetico di estratti proteici totali ottenuti con soluzioni di diversa forza ionica (^{8, 9, 10, 11}). Questi studi hanno consentito di stabilire interessanti rapporti fra la composizione proteica dei muscoli studiati e le loro caratteristiche strutturali e fisiologiche.

Nella presente ricerca abbiamo esaminato la composizione proteica di muscoli molto diversi per struttura e funzione, in Insetti molto diversi sotto l'aspetto zoologico. Sono stati esaminati mediante analisi elettroforetica gli estratti proteici totali ottenuti da muscoli di Insetti, distinguendo le proteine estraibili con soluzioni di debole forza ionica ($I=0,10$), proteine che comprendono, per quanto ci è noto, la frazione « solubile », non particolare, del sarcoplasma, dalle proteine estraibili a forza ionica elevata ($I > 0,20$) o « miosine », costituenti le strutture fibrillari contrattili.

La possibilità sperimentale di tale indagine ci era data da un metodo di microelettroforesi su carta delle proteine muscolari, messo a punto e già sperimentato nello studio dei muscoli di Coniglio (¹²).

PARTE SPERIMENTALE

Sono stati scelti Insetti appartenenti a specie molto diverse e adatti per queste ricerche sia per la possibilità di allevamento che per la mole e per i tipi di muscoli in essi rappresentati: due Ortotteri, *Schistocerca gregaria* e *Periplaneta americana* (il primo è una cavalletta con spiccata attività di salto e di volo; il secondo è una blatta con attività prevalente di cammino e scarsa di volo); due Coleotteri acquatici, *Hydrophilus piceus* e *Cybister lateralimarginalis* (il primo cammina sul fondo, il secondo nuota; ambedue volano brevemente); un Dittero, *Musca domestica*, che presenta i muscoli del volo più altamente specializzati. Tranne i Coleotteri, catturati in natura e mantenuti in acquario, gli altri Insetti provengono da allevamenti di laboratorio.

Di ogni Insetto (con l'eccezione di *Musca*) si sono prelevati due gruppi di muscoli aventi funzione diversa: a) muscoli degli arti, che comprendono muscoli del 3° paio di zampe (metatoracico), di colore bianco o biancastro, attivi nel cammino, nel nuoto o nel salto; b) muscoli del torace, con inserzione dorso-ventrale, di colore rosso-bruno più o meno intenso (muscoli « indiretti » del volo). In particolare, nella zampa di *Periplaneta* si sono preparati separatamente i muscoli elevatori, perfettamente bianchi, e i muscoli estensori, fortemente pigmentati (*). In *Musca*, infine, si è preparato il torace isolato *in toto*, del quale, secondo la valutazione di BALDWIN e NEEDHAM (¹³), i muscoli costituiscono più del 90 p. 100 in peso fresco; sono per la massima parte muscoli del volo, fortemente pigmentati, e in minima parte muscoli bianchi delle zampe.

I muscoli, prelevati dall'Insetto anestetizzato con CO₂, venivano lavati accuratamente in liquido di LÉVY (¹⁴) per rimuovere l'emolinfa, quindi posti in frigorifero a —30° e ivi mantenuti fino alla preparazione degli estratti. Si sono anche preparati estratti da muscoli appena prelevati e non congelati, senza riscontrare apprezzabili differenze. Per ogni esperimento si sono usati di regola i muscoli di 3-6 individui; per *Musca*, i toraci di 150-200 individui.

PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI.

a) Estrazione a debole forza ionica. I muscoli, finemente tagliuzzati e poi omogenizzati in mortaio con poca polvere di quarzo, ovvero in omogenizzatore di Potter, con tampone fosfati di pH 7,4 e forza ionica

(*) Per la nomenclatura esatta dei muscoli della zampa di *Periplaneta americana* vedi BETTINI e BOCCACCI (¹⁵).

0,10 nella misura di 3 ml/g; sono estratti sotto agitazione per 1 h. Si centrifuga per 30 min. a 20.000 g. Tutte le operazioni sono eseguite tra 0° e +2°. Si ottiene un supernatante limpido, più o meno colorato in rosa; la concentrazione proteica, determinata col metodo del biureto secondo GORNALL *et al.* ⁽¹⁶⁾, varia alquanto tra le diverse specie (1-2%). Per ottenere una concentrazione adatta all'elettroforesi su carta gli estratti sono concentrati 2-3 volte dializzandoli per 6-12 h contro una soluzione di polivinilpirrolidone al 25 p. 100 in tampone fosfati;

b) estrazione ad alta forza ionica. Si estrae con liquido di Weber-Edsall, di pH 8,6 e forza ionica 0,67, ovvero con soluzioni diverse specificate in seguito, nella misura di 10 ml/g, per 20 min. Si ottiene una concentrazione proteica idonea all'elettroforesi;

c) in prove particolari, per verificare l'eventuale passaggio in soluzione di proteine dei mitocondri, si è impiegata la soluzione proposta da WATANABE e WILLIAMS ⁽¹⁷⁾, per preservare l'integrità di tali strutture: siero-albumina umana al 2,5 p. 100 in tampone di fosfati di potassio 0,16 M, di pH 7.

ELETTROFORESI SU CARTA.

I metodi seguiti sono quelli descritti in modo particolareggiato nel precedente lavoro ⁽¹²⁾. Ci limitiamo qui ad indicare i dati essenziali e le varianti introdotte.

a) Debole forza ionica. L'elettroforesi si svolge in camera fredda tra 0° e +4°, in tampone veronal-acetato di pH 8,6 e forza ionica 0,10; le strisce di carta Whatman n. 1 larghe cm 4 ovvero 8,5 sono sostenute da un ponte con un tratto orizzontale di cm 20; l'estratto è deposto a 15 mm dalla estremità catodica del tratto orizzontale; la durata è di 13-14 h con 6-7 V/cm.

Per stabilire una correlazione fra la mobilità dei componenti elettroforetici dei diversi estratti e quella dei componenti del siero di sangue umano, si è eseguita, in alcune prove, l'elettroforesi in parallelo, cioè deponendo un campione di siero a lato dell'estratto in esame, sulla stessa striscia di carta.

I tracciati elettroforetici (elettroferogrammi, EFG) si ottengono per lettura densitometrica diretta delle strisce diafanizzate in anisolo, dopo colorazione delle proteine con Amidoshwarz 10B. La valutazione quantitativa dei vari componenti si ottiene per planimetria delle aree relative sull'EFG.

b) Alta forza ionica. L'elettroforesi si svolge in camera fredda, su striscie di carta di cm 6×15 , serrate fra due lastre di vetro dalla superficie trattata con silicone. L'estratto è deposto a banda nel punto di mezzo della striscia. Si usa un tampone di veronal — HCl di pH 8,6 e forza ionica 0,30 o, in casi particolari, tampone di fosfati della stessa forza ionica e di pH inferiore. La durata dell'elettroforesi è di circa 17 ore con circa 8 V/cm.

RISULTATI

A) Estratti di debole forza ionica.

Nelle figg. 1 e 2 sono riportati i tracciati elettroforetici caratteristici dei diversi tipi di muscoli esaminati nelle diverse specie. Ciascuno di essi è il risultato tipico di una serie di molte prove, nelle quali si è riscontrata una grande costanza nella composizione dell'EFG. La mobilità dei diversi componenti dell'EFG è indicata dalla loro posizione rispetto alle coordinate verticali corrispondenti alla posizione dei componenti dell'EFG del siero umano (A, α_1 , α_2 , β , γ).

TABELLA I.

Costituenti proteici estraibili a debole forza ionica ($I = 0,10$) da muscoli del volo e degli arti di Insetti diversi.

Specie animale	Muscoli esaminati	Percentuali dei due gruppi di componenti dell'elettroferogr.	
		I' Gruppo (1)	II' Gruppo (2)
<i>Musca domestica</i> . . .	M. del volo	32	68
<i>Schistocerca gregaria</i> . .	{ M. del volo	25	75
	{ M. degli arti	39	61
<i>Cybister lateralimarginalis</i>	{ M. del volo	19	81
	{ M. degli arti	50	50
<i>Hydrophilus piceus</i> . . .	{ M. del volo	16	84
	{ M. degli arti	46	54
<i>Periplaneta americana</i> .	{ M. del volo	41	59
	{ M. degli arti (bianchi)	72	28
	M. degli arti (rossi)	37	63

(1) Costituito dai componenti compresi tra le coordinate di α_1 e β .

(2) Costituito dai componenti compresi tra le coordinate di β e γ .

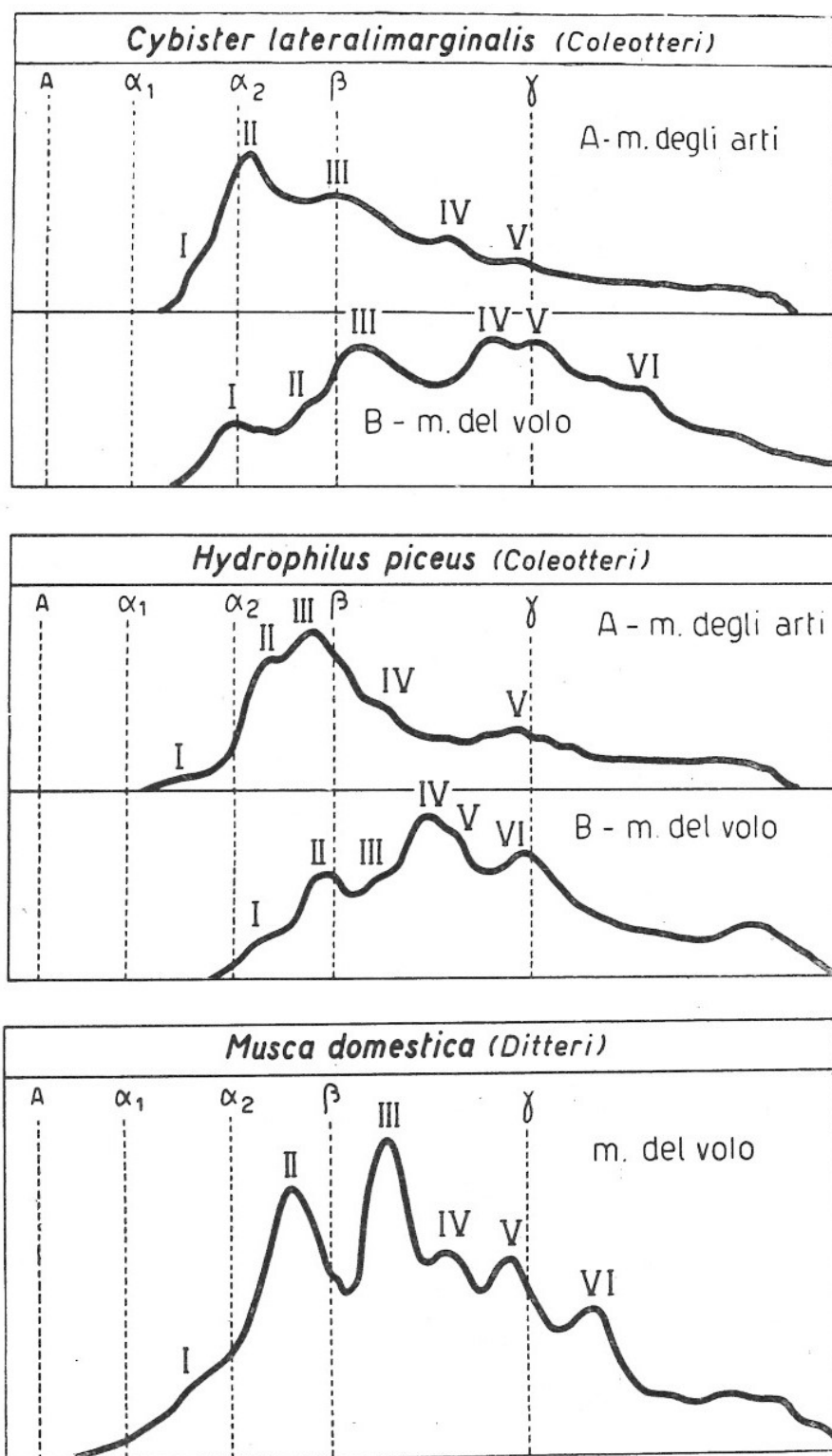


Fig. 1

Elettroforesi su carta di estratti a debole forza ionica dei muscoli degli arti e del volo di Insetti. I tracciati sono ottenuti per densitometria diretta delle striscie e i diversi componenti di ogni tracciato sono indicati in ordine di mobilità con numeri romani.

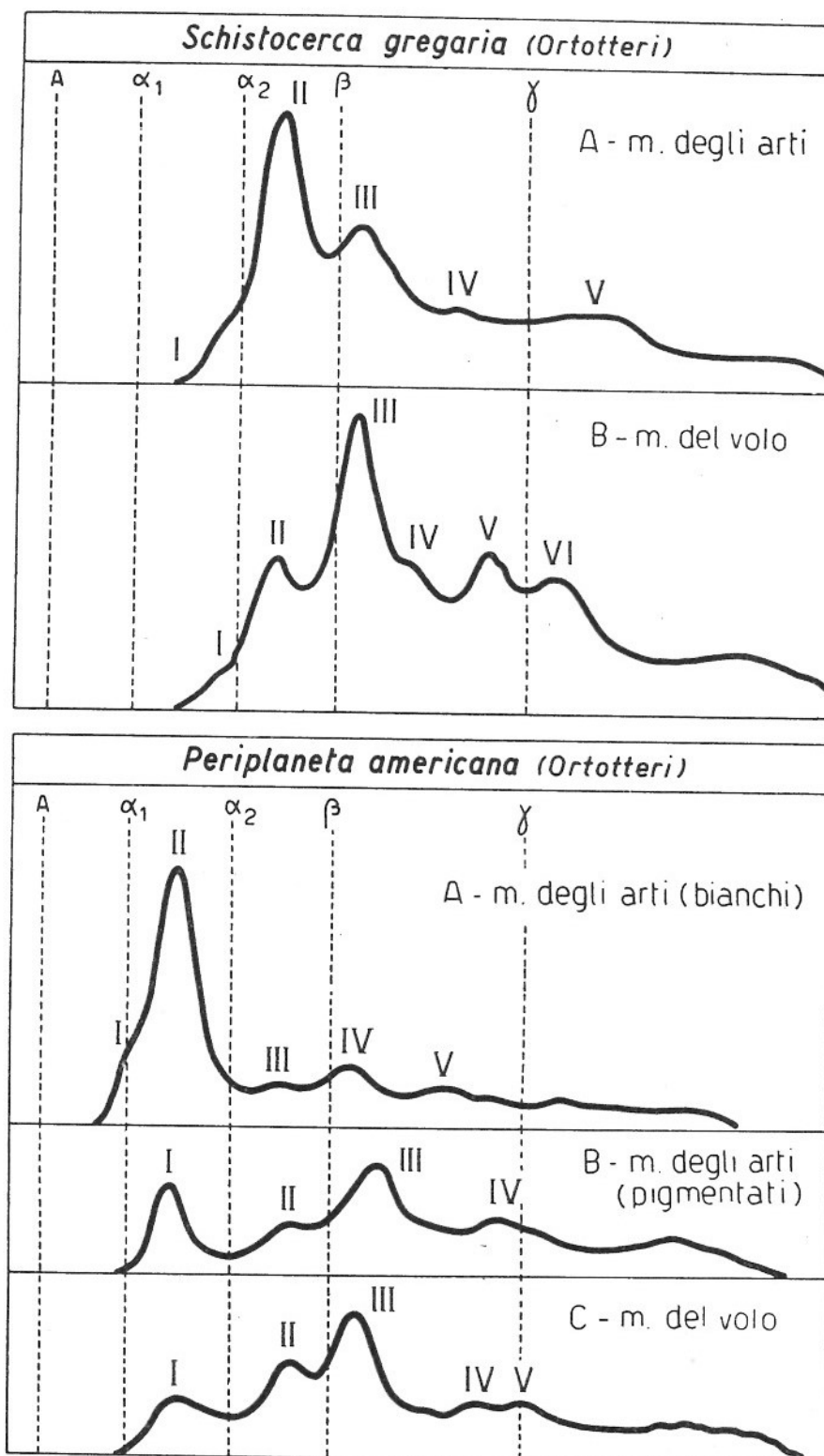


Fig. 2

Le coordinate verticali in tratteggiato indicano la posizione dei componenti proteici di un campione di siero umano, sottoposto ad elettroforesi in parallelo sulla stessa striscia, a lato del campione in esame. Elettroforesi in tampone di veronal-acetato sodico di pH 8,6 e forza ionica 0,10, per 13-14 h con 6-7 V/cm.

In tutti gli EFG si ritrova una serie di componenti che migrano in un'ampia zona compresa tra le posizioni dei componenti sierici α_1 e γ ; il numero, la mobilità e la quantità percentuale dei componenti dell'EFG presentano evidenti differenze fra le diverse specie di Insetti e fra i muscoli degli arti e quelli del torace (m. indiretti del volo) delle singole specie. Il confronto di questi dati porta a constatare un fatto caratteristico e costante: un gruppo di componenti dotati di maggiore mobilità, (compresi nella zona da α_1 a β) è presente in misura nettamente più elevata nell'EFG dei muscoli degli arti che in quello dei muscoli del volo; viceversa un secondo gruppo di componenti dotati di mobilità inferiore (compresi nella zona da β a γ) è presente nei muscoli del volo in misura maggiore che nei muscoli degli arti. Questa differenza tra gli EFG dei due tipi di muscoli si ritrova, più o meno accentuata, ma sempre netta e evidente, in tutte le specie esaminate. Essa è illustrata nella Tabella I, dove è riportata la quantità percentuale, dei due gruppi di componenti valutata planimetricamente sugli EFG riportati nelle figg. 1 e 2.

Sono inoltre da rilevare due aspetti particolari.

L'EFG dei muscoli pigmentati degli arti di *Periplaneta* mostra una composizione analoga a quella dei muscoli del volo della stessa specie.

Per quanto concerne *Musca*, in cui non è stato possibile confrontare la composizione dei muscoli del volo con quella dei muscoli delle zampe, è da notarsi che nell'EFG dei muscoli del volo i due gruppi di componenti sono in un rapporto quantitativo analogo a quello riscontrato nei muscoli del volo delle altre specie; inoltre la misura di questo rapporto è probabilmente modificata dalla presenza di una minima aliquota di muscoli degli arti nel torace preparato *in toto*.

B) Estratti di alta forza ionica.

I risultati ottenuti in *Periplaneta* sono illustrati in fig. 3.

L'EFG è costituito per la massima parte da un componente immobile sulla linea di partenza; si rilevano inoltre gli stessi componenti degli estratti di debole forza ionica, presenti qui in misura assai ridotta per la notevole diluizione di questi estratti.

Alcune prove viscosimetriche hanno mostrato che l'alta viscosità degli estratti cade nettamente per aggiunta di adenosintrifosfato sodico (ATP), mentre l'esame a luce polarizzata nella cella di GERENDAS (¹⁸) ha messo in evidenza una forte birifrangenza di flusso (*). Questo insieme

(*) Osservazioni gentilmente eseguite dal Prof. A. ASCENZI, che qui sentitamente ringraziamo.

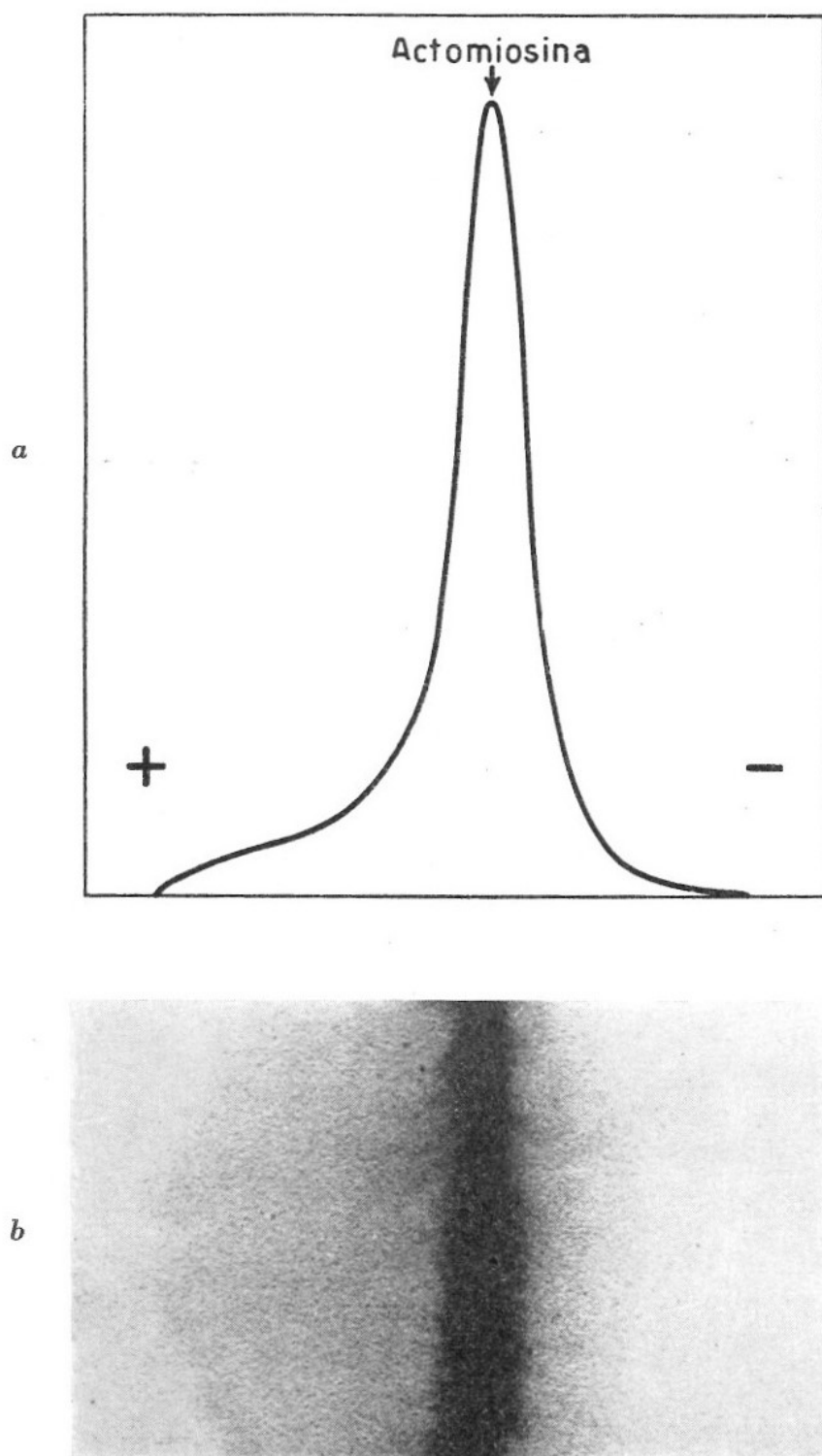


Fig. 3. - Elettroforesi su carta dell'estratto di alta forza ionica ($\mu = 0,67$) dei muscoli degli arti di *Periplaneta americana*. - a) elettroferogramma ottenuto per lettura densitometrica della striscia in b). Elettroforesi in tampone di veronal - HCl, di pH 8,6 e forza ionica 0,30, per 17 h con 8 V/cm.

di caratteristiche indica la presenza di un componente proteico che si comporta analogamente all'acto-miosina degli estratti muscolari di Coniglio, esaminati nelle stesse condizioni sperimentali. Non si rileva invece un componente mobile che possa corrispondere a quello formato dalla miosina nell'EFG dei muscoli di Coniglio, neppure in estratti preparati in condizioni particolari, dimostratesi atte ad estrarre miosina libera da quei muscoli in cui la formazione di actomiosina è particolarmente rapida. A questo scopo abbiamo impiegato soluzioni di basso pH (5,5 - 6) ovvero contenenti ioduro di potassio o pirofosfato di sodio o ATP, estraendo per 5 min. Si è anche eseguita l'elettroforesi a diversi pH; in nessun caso si è osservata la comparsa di un nuovo componente dell'EFG.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza notevoli differenze di composizione proteica fra gli estratti di debole forza ionica e, viceversa, una grande uniformità negli estratti di forza ionica elevata.

Questi due gruppi di risultati saranno ora considerati successivamente nell'ordine indicato.

Il frazionamento delle proteine sarcoplasmatiche, estratte con soluzioni di debole forza ionica, ha indicato in tutte le specie esaminate una netta differenza nel contenuto dei diversi costituenti proteici fra i muscoli bianchi degli arti e quelli pigmentati del volo, per il prevalere di due diversi gruppi di costituenti proteici rispettivamente nell'uno e nell'altro tipo di muscoli.

Il significato di questa differenza è suggerito dal confronto delle caratteristiche strutturali, funzionali e metaboliche di questi due diversi tipi di muscoli [WIGGLESWORTH ⁽¹⁾; PROSSER ⁽²⁾; CHADWICK ⁽³⁾; EDWARDS et al. ⁽⁵⁾].

Nei muscoli degli arti di Insetti la struttura microscopica e sub-microscopica è molto simile a quella dei muscoli scheletrici dei Vertebrati. Altrettanto si può dire per le loro proprietà fisiologiche: per velocità e frequenza di contrazione i muscoli rapidi di *Locusta* e di *Dytiscus* sono paragonabili a quelli bianchi dei Vertebrati, mentre quelli lenti di *Hydrophilus* corrispondono piuttosto ai muscoli rossi dei Vertebrati ⁽¹⁾. La contrazione tetanica si ottiene con frequenze di stimolazione pari a 20-50 impulsi al secondo e l'accorciamento è dell'8-15%. Questi muscoli non sono caratterizzati da un'attività particolarmente intensa e prolun-

gata. La loro attività respiratoria *in vitro* è molto bassa e scarsissimo è il contenuto di pigmenti respiratori, come indica il loro colore.

I muscoli del volo a loro volta si distinguono in primo luogo per l'aspetto morfologico; vi è un tipo non molto diverso dai muscoli degli arti, presente negli Insetti più primitivi (Ortotteri), ed un tipo molto differenziato, con fibrille grosse, scarse e separate da un gran numero di grossi mitocondri e di trachee, che si ritrova negli Insetti più evoluti come i Ditteri (⁴). L'abbondanza di mitocondri è una caratteristica comune a tutti i muscoli del volo, alla quale corrispondono l'alta concentrazione di pigmenti respiratori (da cui il colore intenso) e la elevata attività respiratoria, molto superiore a quella dei muscoli bianchi degli arti [da 3 a 6 volte, in *Hydrophilus*, in *Xylotrupes* e in *Periplaneta* (¹⁵); (¹⁹); (²⁰)]. In questi muscoli inoltre la contrazione tetanica si verifica solo per una frequenza di circa 100 stimoli al secondo e in alcuni casi anche per frequenze di quest'ordine il tetano è probabilmente incompleto. L'accorciamento è scarso, mentre il tempo di contrazione è molto piccolo (10 msec e anche meno) e molto alta è la frequenza di contrazione (100 e più contrazioni al secondo nei muscoli più differenziati, come in *Drosophila*). Questa alta frequenza di contrazioni può essere sostenuta per periodi considerevoli, corrispondenti a voli di lunga durata: tale capacità di svolgere una così grande quantità di lavoro per lunghi periodi è la caratteristica funzionale di maggior rilievo per il presente studio, che distingue, unitamente alla elevata attività respiratoria, i muscoli del volo dai muscoli degli arti. L'energia necessaria è fornita dai processi respiratori, i quali si svolgono ad un livello che è proporzionale all'attività funzionale e aumenta durante il volo in una misura che non trova confronti nell'attività muscolare dei Vertebrati: l'aumento della respirazione è di 30-50 volte rispetto allo stato di riposo in *Lucilia*, e di circa 50 volte in *Schistocerca*, mentre nell'Uccello-mosca è solo di 5 volte (³). Un tale dispendio di energia può essere sostenuto per molte ore di volo, come nel caso di *Schistocerca* e *Drosophila*, dipendendo solo dalla disponibilità di substrati ossidabili (*).

Con questa particolare capacità di prestazioni funzionali e metaboliche riteniamo che siano correlate le uniformi caratteristiche di composizione proteica del sarcoplasma da noi rilevate nei muscoli pigmentati del volo di tutte le specie studiate. Appare probabile che i diversi sistemi enzimatici del sarcoplasma siano presenti nei muscoli del volo

(*) Anche nei Vertebrati quei muscoli che svolgono un'attività particolarmente intensa e prolungata, come i pettorali di alcuni Uccelli o il miocardio, presentano un contenuto particolarmente alto di pigmenti respiratori (citocromi, mioglobina) e una elevata attività respiratoria *in vitro* (³), (²¹), (²²).

e in quelli degli arti in misura diversa e proporzionata alla diversa attività metabolica, contribuendo a formare rispettivamente l'uno o l'altro gruppo di componenti proteici dell'EFG. Accanto ad evidenti differenze quantitative nel contenuto degli stessi componenti, differenze qualitative sono indicate dal fatto che nello stesso Insetto i muscoli del volo e quelli degli arti differiscono non solo per il rapporto quantitativo tra i due gruppi di componenti dell'EFG, ma anche per il numero e la mobilità dei singoli componenti, valutata in base alla loro posizione rispetto a quella dei componenti del siero umano. Peraltro è da tener presente che la mobilità dei diversi componenti dipende anche dai reciproci rapporti quantitativi.

E' da considerare ora la possibilità che quei componenti proteici che prevalgono nei muscoli del volo provengano dai mitocondri. L'integrità di queste strutture, secondo le osservazioni di WATANABE e WILLIAMS (¹⁷), è perfettamente preservata in una soluzione di siero-albumina al 2,5 p. 100 in tampone di fosfati di potassio 0,15 M; noi abbiamo constatato che estraendo i muscoli di *Musca* e di *Periplaneta* con tale soluzione si ottenevano EFG non diversi da quelli degli estratti usuali.

Si potrebbe supporre inoltre che costituenti del « reticolo endoplasmico », ossia dei « microsomi », passino in soluzione negli estratti da noi preparati. Queste strutture sono abbondanti nei muscoli degli arti e anche nei muscoli del volo meno differenziati (*Periplaneta*), mentre in quelli più differenziati (Ditteri) sono scarsissime (⁵). Non si vede quindi una relazione tra il contenuto di reticolo endoplasmico e le differenze di composizione proteica da noi osservate fra tutti i muscoli del volo da un lato, e quelli degli arti dall'altro. Riteniamo pertanto che queste differenze siano piuttosto da riferire alla frazione « solubile », non particolata del sarcoplasma. Secondo gli studi di SACKTOR (²⁴), tutta l'attività glicolitica si ritrova in questa frazione, la cui presenza è necessaria perchè substrati come il glicogeno, il glucosio e i composti fosforilati intermedi della glicolisi possano essere utilizzati dai mitocondri per la respirazione. La differenziazione quantitativa e qualitativa delle proteine sarcoplasmatiche tra i muscoli del volo e quelli degli arti dovrebbe verosimilmente riguardare i sistemi glicolitici. Un esempio interessante a questo proposito è dato dalle osservazioni di ZEBE e Mc SHAN (²⁵), i quali hanno riscontrato, in 42 diverse specie di Insetti, che nei muscoli del volo l'attività della lattico-deidrogenasi è minima, mentre quella della glicerofosfatodeidrogenasi è altissima, da 10 a 100 volte superiore; il confronto con i muscoli degli arti, fatto in due specie, ha mostrato che in questi muscoli l'attività dei due enzimi è dello stesso ordine in *Melanoplus*, mentre in *Belostoma* la lattico-deidrogenasi è circa 10 volte più attiva.

Considerando infine le differenze di composizione proteica del sarcoplasma che si sono riscontrate fra i muscoli del volo di specie diverse, possiamo riferirle alle profonde differenze nella utilizzazione di diversi substrati durante il volo, che sono state osservate, p.e., fra *Drosophila* e *Schistocerca* ⁽³⁾.

Venendo ora a considerare i risultati del frazionamento di estratti di forza ionica elevata, da muscoli di tipo diverso e di diversa specie, si constata innanzitutto che praticamente tutta la miosina estratta è sempre associata sotto forma di acto-miosina. Peraltro si potrebbe pensare che in questi estratti, analogamente a quanto si osserva nel muscolo di Rana ⁽²⁵⁾, si formino aggregati di miosina dotati di particolare viscosità che ne impedisce la migrazione sulla carta. Che si tratti di acto-miosina è indicato dalla evidente birifrangenza di flusso e dalla diminuzione della viscosità per aggiunta di ATP. Anche GILMOUR e CALABY ⁽⁶⁾ e MARUYAMA ⁽⁷⁾, che hanno investigato estesamente le proprietà fisiche ed enzimatiche delle proteine fibrillari dei muscoli di diversi Insetti, hanno concluso per una formazione istantanea e massiva di acto-miosina. GILMOUR e CALABY hanno potuto mettere in evidenza una minima quantità di miosina libera solo operando con particolari accorgimenti: estraendo per tempi brevissimi e aggiungendo quindi actina agli estratti così ottenuti si è vista aumentare leggermente sia la viscosità che la caduta di viscosità per aggiunta di ATP. Se negli estratti da noi frazionati vi era anche una quota di miosina libera, si deve pensare che essa era presente in misura non rilevabile nell'EFG, o aveva insolite caratteristiche elettrocinetiche sfavorevoli alla sua separazione, o presentava infine una viscosità particolarmente elevata che ne impediva la migrazione.

CONCLUSIONI

In tutte le specie studiate si è verificata una spiccata e univoca differenza nella composizione proteica degli estratti a debole forza ionica, fra i muscoli bianchi degli arti e i muscoli pigmentati del volo.

Verosimilmente i costituenti proteici di tali estratti provengono dalla frazione « solubile » del sarcoplasma, anzichè da strutture quali i mitocondri o i microsomi, poichè l'integrità dei primi era probabilmente rispettata nelle presenti condizioni di estrazione, mentre la distribuzione dei microsomi nei diversi muscoli non appare correlata con le rispettive caratteristiche di composizione.

Poichè i sistemi enzimatici della glicolisi sono i principali costituenti della frazione « solubile » del sarcoplasma, le differenze rilevate

nella composizione proteica di questa frazione sono verosimilmente la espressione di una diversità nella composizione di tali sistemi enzimatici.

Queste differenze di composizione appaiono significativamente correlate con le corrispondenti differenze nella attività metabolica e funzionale che distinguono i muscoli del volo dai muscoli degli arti.

Il frazionamento elettroforetico degli estratti di alta forza ionica non ha invece rivelato differenze nelle proteine fibrillari fra muscoli di tipo diverso né fra specie diverse. Si è riscontrata in tutti i casi la presenza di un componente con comportamento simile a quello della actomiosina di Coniglio. Appare molto probabile che in questi muscoli abbia luogo una rapidissima formazione di actomiosina, che non risente apprezzabilmente di quelle condizioni di estrazione dimostrate atte ad impedirla nei muscoli di diversi Vertebrati.

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

BIBLIOGRAFIA

- (1) WIGGLESWORTH V. B. - *The Principles of Insect Physiology*, London Methuen (1954).
- (2) PROSSER C. L. - In *Comparative Animal Physiology*, Edited by C. L. Prosser, Philadelphia, Saunders (1950), pag. 576.
- (3) CHADWICK L. E. - In *Insect Physiology*, Edited by K. D. Roeder, New York, Wiley (1953), pag. 637.
- (4) TIEGS O. W. - *Phil. Tr. Roy. Soc., London, B*, 238: 221 (1955).
- (5) EDWARDS G. A., RUSKA H., SOUZA SANTOS P. a., VALLEJO-FREIRE A. - *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 2: 143 (1956).
- (6) GILMOUR D. a. CALABY J. H. - *Enzymologia*, 16: 23 (1953).
- (7) MARUYAMA K. - *Journal of the Faculty of Science, University of Tokio, Section IV*, 7: 231 (1954).
- (8) DUBUISSON M. - *Exposés annuels de Biochimie Médicale, 9ème Série Paris*, (1948), Pag. 1.
- (9) CREPAX P. - *Biochim. Biophys. Acta*, 9: 385 (1952).
- (10) RENARD S. - *Bull. Soc. Roy. Sciences, Liège, 5ème Série*, 38: 1195 (1952).
- (11) CONNELL J. J. - *Biochem J.*, 55: 378 (1953).
- (12) TOSCHI G. e MARIANI A. - *Rendic. Istituto Sup. Sanità*, 17: 780 (1954).
- (13) BALDWIN E. a. NEEDHAM D. M. - *J. Physiol.*, 80: 221 (1934).
- (14) LEVY R. - *Comp. Rend. Soc. Biol.*, 99: 1482 (1928).
- (15) BETTINI S. e BOCCACCI M. - *Rend. Istituto Sup. Sanità*, 18: 188 (1954).
- (16) GORNALL A. G., BARDAWILL C. I. a. DAVID M. M. - *J. Biol. Chem.*, 177: 751 (1949).
- (17) WATANABE M. I. a. WILLIAMS C. M. - *J. Gen. Physiol.*, 37: 71 (1953).
- (18) GERENDAS M. - *Enzymologia*, 9: 123 (1940).
- (19) BROOKS M. A. - *Ann. Ent. Soc. America*, 50: 122 (1957).
- (20) FUKAMI J. - *Oyo-Kontyu (Japan)*, 12: 8 (1956).
- (21) KEILIN D. - *Proc. Roy. Soc. B*, 98: 312 (1925).
- (22) PAUL M. H. a. SPERLING E. - *Proc. Soc. ex. Biol. Med.*, 79: 352 (1952).
- (23) CLELAND K. W. a. SLATER E. C. - *Quart. J. micr. Sci.*, 94: 329 (1953).
- (24) SACKTOR B. - *J. Biophys. and Biochem. Cytol.*, 1: 29 (1955).
- (25) ZEBE E. C. a. McSHAN W. H. - *J. Gen. Physiol.*, 40: 779 (1957).