

Estudios comparativos sobre quince genotipos de *Drosophila melanogaster* Mg.: formas electroforéticas de algunas deshidrogenasas *

J. A. Cabezas y M.^a Concepción Labrador

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad y C.S.I.C.
Salamanca (España)

(Recibido el 10 de enero de 1975)

J. A. CABEZAS and M.^a CONCEPCION LABRADOR. *Comparative studies on 15 genotypes of Drosophila melanogaster Mg.: Electrophoretic Forms of Some Dehydrogenases.* Rev. esp. Fisiol., 31, 201-206. 1975.

This paper deals with the separation of the electrophoretic forms of some dehydrogenases (alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase, β -hydroxyacid dehydrogenase, malate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase) by disc electrophoresis, using samples from 15 genotypes of *Drosophila melanogaster* Mg.: «silvestre» (Madrid), «brown», «cinnabar», «purple», «sepia», «scarlet», «white», «white apricot», «black», «ebony», «yellow», «yellow²», «dumpy», «vestigial» and «Curly».

The electrophoretic bands belonging to alcohol and lactate dehydrogenase showed large differences in mobility, number and intensity. These differences were smaller for β -hydroxyacid and malate dehydrogenase, and almost undetectable for isocitrate dehydrogenase.

En un estudio anterior (11) se comparó la composición química (proteínas, lípidos y glúcidos) de quince genotipos de *Drosophila melanogaster* Mg., que difieren notablemente entre sí por las características exteriores de sus individuos (longitud, color de cuerpo y de ojo, forma y tamaño de alas, peso, etc.). Para los distintos genotipos analizados, se han encontrado diferencias en cuanto a los valores

de proteínas totales, de albúminas y globulinas, así como en el número y masas moleculares de las fracciones electroforéticas procedentes de los individuos pertenecientes a aquellos genotipos; también se hallaron diferencias en las respectivas cifras de lípidos totales, de colesterol y fosfolípidos, y de osas y osaminas. Sin embargo, de la cuantía de esos resultados se dedujo que no era fácil establecer una agrupación de dichos genotipos siguiendo únicamente un criterio químico.

Tomando en consideración las reconocidas ventajas que presenta en los estudios de Bioquímica comparada el empleo de la

* Trabajo realizado mediante «Ayuda para el Fomento de la Investigación en la Universidad» concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia a este Departamento.

sensible técnica de la electroforesis en gel de poliacrilamida, hemos determinado la movilidad, número e intensidad con que aparecen resueltas las formas electroforéticas de algunas enzimas deshidrogenantes (alcohol-deshidrogenasa, lactato-deshidrogenasa, β -hidroxiácido-deshidrogenasa, malato-deshidrogenasa e isocitrato-deshidrogenasa) en muestras de *D. melanogaster* pertenecientes a aquellos mismos genotipos.

Material y métodos

Las muestras empleadas en estos análisis consistieron en imagos de quince distintas castas de *Drosophila melanogaster* Meigen. Una de estas castas, «silvestre» (Madrid), es homocigótica para todos los principales fenotipos *silvestres* (= normales) de coloración de los ojos, de coloración del tegumento, de configuración anatómica externa macroscópica de la cabeza, tórax, abdomen, antenas, alas, patas, quetas. Otras trece castas son homocigóticas respectivamente para trece fenotipos recesivos [*brown* (símbolo bw), *cinnabar* (cn), *purple* (pr), *sepia* (se), *scarlet* (st), *white* (w), *white apricot* (w^a), *black* (b), *ebony* (e), *yellow* (y), *yellow²* (y²), *dumpy* (dp), *vestigial* vg)] y también homocigóticas para todos los demás principales fenotipos *silvestres* (= normales). En fin, una última casta es, a la vez de los fenotipos *Curly* (símbolo Cy), *Bristled* (Br), *Lobe* (L) y *speck* (sp), y de fenotipo silvestre (= normal) respecto a todos los demás principales fenotipos de color de ojos y de configuración anatómica externa ma-

croscópica; esta última casta es constantemente * heterocigótica para Cy, Br y L, y homocigótica para *speck* y para los demás fenotipos silvestres (= normales) aludidos.

Partiendo de un extracto acuoso de moscas, la separación de bandas se ha realizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% (modalidad de disco), usando una solución amortiguadora de tris 0,05 M (o 0,01 M), a pH 8,3 (u 8,5), con una corriente de 2,5 a 3 mA por columna; para el revelado de todas ellas (excepto las de la isocitrato-deshidrogenasa) se han incubado los geles a 37°, durante 1-2 horas, en una solución que contiene NAD, nitroazul de tetrazolio, metasulfato de fenacina y el respectivo sustrato (isopropanol, ácido DL láctico, ácido β -hidroxibutírico o ácido málico); sólo en el caso de la isocitrato-deshidrogenasa se usaron NADP, Cl₂Mn y ácido DL isocítrico, además de nitroazul de tetrazolio y metasulfato de fenacina, efectuándose la incubación 3 1/2-4 horas. Se han seguido esencialmente los siguientes procedimientos electroforéticos: para la alcohol-deshidrogenasa, el de GRELL *et al.* (4); para la lactato-deshidrogenasa y la malato-deshidrogenasa, el de GOLDBERG (3); para la β -hidroxiácido-deshidrogenasa, el de BORACK y SOFER (2), y para la isocitrato-deshidrogenasa, el de BARRERA y JURTSCHUCK (1).

Resultados

La movilidad, el número y la intensidad de las bandas correspondientes a la alcohol-deshidrogenasa de los distintos genotipos de *D. melanogaster* estudiados son bastante diferentes entre sí (fig. 1). Se da la circunstancia de que generalmente en aquellos genotipos cuyos fenotipos correspondientes están caracterizados por el color de los ojos, estas bandas aparecen muy próximas entre sí; en cambio, en los

* Porque tanto el genotipo homocigótico para Cy como el homocigótico para Br son letales, porque en esta casta el doble heterocigótico para Cy y para Br está en la forma de repulsión (o trans), y porque también en esta misma casta hay, heterocigóticas, dos inversiones en el cromosoma, o en los cromosomas supresores del *crossing-over*.

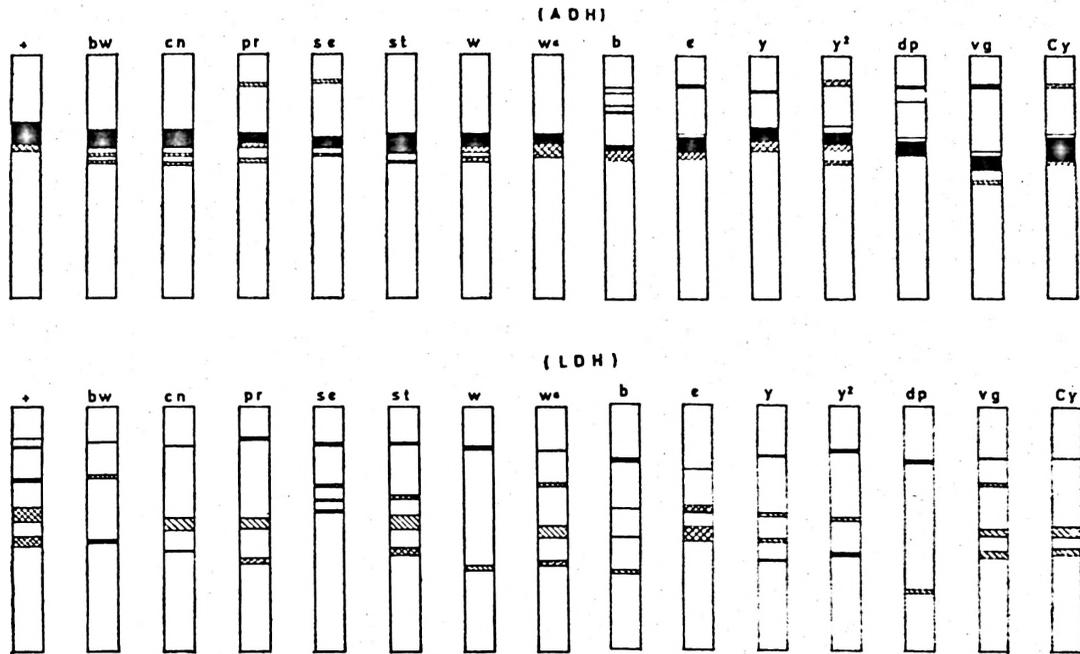


Fig. 1. Isoenzimas separadas mediante electroforesis de disco en gel de poliacrilamida correspondientes a los fenotipos que se expresan de *Drosophila melanogaster* Mg. Parte superior: Isoenzimas de la alcohol-deshidrogenasa (ADH). Parte inferior: Isoenzimas de la lactato-deshidrogenasa (LDH).

restantes genotipos, cuyos fenotipos están a su vez caracterizados por el color del cuerpo y la forma de las alas, se distinguen además otras bandas intensas, pero de menor avance.

Para la lactato-deshidrogenasa se acusan entre sí aún mayores diferencias. En cambio, para la β -hidroxiácido-deshidrogenasa aparece un cierto paralelismo, a lo menos en algunos casos («pr» respecto a «se», «e» respecto a «y») (fig. 2).

Las formas electroforéticas de la malato-deshidrogenasa no siempre han sido fáciles de comparar entre sí, por mostrar el gel una amplia zona teñida, en la que destacan dos o tres bandas de mayor intensidad. Diferencias entre sí aún menores se han podido apreciar en el caso de la isocitrato-deshidrogenasa, excepto en lo referente a los genotipos de «yellow²», «ebony» y «Curly» (fig. 3).

Discusión

Probablemente la alcohol-deshidrogenasa ha sido la primera enzima de *D. melanogaster* en la que se observó la existencia de formas múltiples separables por electroforesis (4, 9, 12). Se admite que estas formas son controladas genéticamente por un locus sencillo (6). JACOBSON (5) ha investigado si estas isoenzimas derivarían de una sola forma a la que se añadiría un ligando, o si resultarían como consecuencia de cambios conformacionales, o por ambos mecanismos; de sus trabajos con *D. melanogaster* (Samarkands) deduce que un cambio conformacional en la estructura de la forma ADH₅ tiene lugar al unirse con el NAD (5). También JACOBSON *et al.* (6) han demostrado que las formas más rápidas del enzima se con-

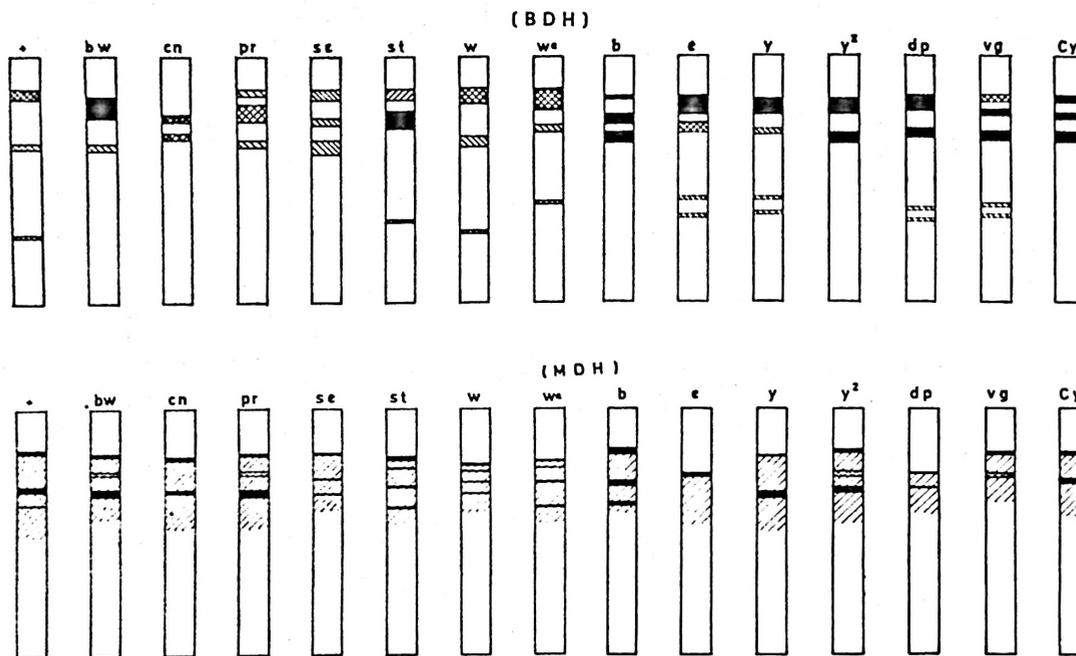


Fig. 2. Isoenzimas separadas mediante electroforesis de disco en gel de poliacrilamida correspondientes a los fenotipos que se expresan de *Drosophila melanogaster* Mg. Parte superior: Isoenzimas de la β -hidroxibutirato-deshidrogenasa (BDH). Parte inferior: Isoenzimas de la malato-deshidrogenasa (MDH).

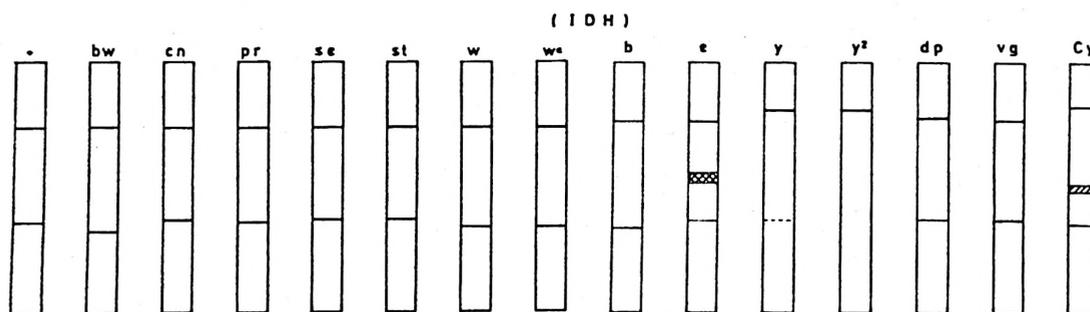


Fig. 3. Isoenzimas de la isocitrato-deshidrogenasa (IDH) separadas mediante la electroforesis de disco en gel de poliacrilamida correspondientes a los fenotipos que se expresan de *Drosophila melanogaster* Mg.

vierten en la forma más lenta, ADH_{β} , durante el proceso de adsorción sobre DEAE-celulosa, pudiendo incluso separarse una forma $ADH_{\beta A}$ de otra $ADH_{\beta B}$, no distinguibles por electroforesis (6). Asimismo, JACOBSON y PFUDERER (7) han

señalado que las cinco o más formas electroforéticas de este enzima que aparecen en el material por ellos estudiado no representan dímeros o agregados, ya que poseen todas ellas los mismos coeficientes de sedimentación. Más tarde, JACOBSON

et al. (8) han concluido que la alcohol-deshidrogenasa de *D. melanogaster* puede existir en configuraciones que difieren por sus cargas electrostáticas y termoestabilidad, representando estas diferencias cambios en la conformación de las proteínas, pudiendo controlarse esta interconversión. Dichos cambios conformacionales se manifiestan ocasionando modificaciones en los espectros de fluorescencia (10).

De nuestros trabajos — enfocados preferentemente con un criterio de Bioquímica comparada — puede deducirse que existen diferencias considerables en lo que respecta a las formas electroforéticas de la alcohol-deshidrogenasa existente en las *Drosophilas* de los genotipos estudiados.

También se han apreciado diferencias en lo que respecta a las bandas de la lactato-deshidrogenasa, β -hidroxiácido-deshidrogenasa y malato-deshidrogenasa; en cambio, fueron menos marcadas las diferencias concernientes a la isocitrato-deshidrogenasa.

Un problema que se plantea en relación con estos resultados es el de si cada una de las bandas electroforéticas corresponde realmente a una isoenzima o no; o, lo que es equivalente, si cada forma electroforética así separada es la expresión de una forma isoenzimática. En los trabajos de JACOBSON *et al.* (5, 6, 7) aparece en el título la palabra *isoenzymes*, refiriéndose a la alcohol-deshidrogenasa de *Drosophila melanogaster*; pero en sus publicaciones posteriores (8, 10) ya el título dice: *Multiple Forms of Drosophila Alcohol Dehydrogenase*. Es decir, dichos autores prefieren últimamente prescindir del término «isoenzima». Del empleo de técnicas como las electroforéticas, que separan mediante soporte de geles bandas proteínicas capaces de reducir posteriormente las sales de tetrazolio a formazán, se deduce sólo que tales bandas corresponden a compuestos proteínicos con poder oxidoreductor, que pueden o no ser isoenzimas. Únicamente la aplicación adicional

de otros criterios bioquímicos o genéticos podrá decidir esta cuestión.

Igualmente, se viene señalando también desde 1963 la existencia de «isoenzimas» en las esterasas, fosfato-deshidrogenasa, aminopeptidasa y fosfatasas alcalinas de *D. melanogaster* (12). Podría sugerirse ahora que quizá conviniera una confirmación de tal carácter.

Finalmente, uniendo los resultados aquí descritos con los antes publicados (11) referentes a los mismos quince genotipos de *D. melanogaster*, se deduce que las diferencias macroscópicamente observables (forma de alas, color de ojos, etc.) entre los individuos respectivamente pertenecientes a estos genotipos pueden hacerse corresponder con diferencias relativas a la composición química de sus principios inmediatos, en algunos casos, y también con otras diferencias, lógicamente más acusadas, que afectan a la mayor parte de las formas electroforéticas de tipo deshidrogenante estudiadas.

Agradecimientos

Agradecemos al Prof. GALÁN la cesión desinteresada de estas muestras, procedentes de la colección de su Cátedra de Biología (Facultad de Ciencias, Salamanca) y a la Srta. María Sánchez Gil por el cuidado en el mantenimiento de las mismas. Además, expresamos nuestro reconocimiento a dicho profesor por sus valiosas indicaciones y asesoramiento acerca de las facetas genéticas de este tema.

Resumen

Se determina en muestras de individuos correspondientes a quince genotipos de *Drosophila melanogaster* Mg. la presencia de formas electroforéticas de algunas enzimas deshidrogenantes (alcohol-deshidrogenasa, lactato-deshidrogenasa, β -hidroxiácido-deshidrogenasa), mediante electroforesis en disco de poliacrilamida. Los genotipos analizados son los homocigóticos respectivamente correspondientes a los fenotipos siguientes: «silvestre» (Madrid), «brown», «cinnabar», «purple», «sepia», «scarlet», «white», «white apricot», «black», «ebo-

ny», «yellow», «yellow²», «dumpy», «vestigial», y, además, el heterocigótico de fenotipo «Curly».

Las diferencias de movilidad, número e intensidad de las bandas electroforéticas pertenecientes a la alcohol-deshidrogenasa son considerables entre unos y otros genotipos; lo mismo sucede con las bandas de la lactato-deshidrogenasa. En cambio, estas diferencias se acusan menos en el caso de las de β -hidroxiácido-deshidrogenasa y de la malato-deshidrogenasa. Por último, las bandas de la isocitrato-deshidrogenasa muestran diferencias entre sí en sólo tres de esos genotipos, siendo apenas apreciables en los restantes.

Bibliografía

1. BARRERA, C. R. y JURTSCHUK, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **220**, 416, 1970.
2. BORACK, L. I. y SOFER, W.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 5345, 1971.
3. GOLDBERG, E.: *Science*, **139**, 602, 1963.
4. GRELL, E. H., JACOBSON, K. B. y MURPHY, J. B.: *Science*, **149**, 80, 1965.
5. JACOBSON, K. B.: *Science*, **159**, 324, 1968.
6. JACOBSON, K. B., MURPHY, J. B. y HAPTMAN, F. C.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 1075, 1970.
7. JACOBSON, K. B. y PFUDERER, P.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 3938, 1970.
8. JACOBSON, K. B., MURPHY, J. B., KNOPP, J. A. y ORTIZ, J. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **149**, 22, 1972.
9. JOHNSON, F. M. y DENNISTON, C.: *Nature*, **204**, 906, 1964.
10. KNOPP, J. A. y JACOBSON, K. B.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **194**, 36, 1972.
11. LABRADOR, C. y CABEZAS, J. A.: *Rev. esp. Fisiol.*, **30**, 289, 1974.
12. URSPRUNG, H. y LEONE, J.: *J. Exp. Zool.*, **160**, 147, 1965.