
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

VITTORIO PARISI, GIUSEPPINA AMBROSOLI MOGNONI,
EDVIGE SOZZI

**Studio preliminare delle emocianine estratte da
embrioni di *Sepia officinalis* L. e *Austropotamobius*
pallipes (Lereboullet)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 37 (1964), n.6, p. 491–495.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_37_6_491_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. — *Studio preliminare delle emocianine estratte da embrioni di Sepia officinalis L. e Austropotamobius pallipes (Lereboullet)*^(*). Nota di VITTORIO PARISI, GIUSEPPINA AMBROSOLI MOGNONI ed EDVIGE SOZZI, presentata^(**) dal Corrisp. S. RANZI.

Il problema della apparizione della emocianina durante lo sviluppo embrionale di Molluschi e Crostacei non è stato oggetto di molte ricerche; a parte i lavori di Ranzi [8, 9] e di Spirito [11], non ci risulta vi siano altri dati.

In un precedente lavoro [7] si è potuto dimostrare come le emocianine siano specie specifiche dal punto di vista immunologico; nella presente Nota si è voluto studiare a quale stadio dello sviluppo embrionale esse appaiano in quantità rilevabili immunologicamente e se si differenzino da quelle presenti nell'adulto.

Come materiale di studio si è scelto un cefalopode, *Sepia officinalis* L. ed un crostaceo, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet); della prima si è utilizzata emocianina purificata (gentilmente fornita dal prof. F. Ghiretti) del secondo si è usata l'emolinfa (dopo centrifugazione a + 4 °C per eliminare le cellule) in quanto precedenti osservazioni ci avevano mostrato che le emocianine di crostacei si danneggiano talvolta durante la purificazione.

Le proprietà immunologiche sono state studiate mediante l'immunodiffusione con antisieri di coniglio; per la caratterizzazione della emocianina si è ricorso alla colorazione con alizarina S e acido rubeanico.

I preparati di emolinfa e di estratti embrionali sono stati esaminati con l'ultracentrifuga analitica Spinco modello E. La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di Lowry [5].

Gli embrioni di seppia sono stati omogeneizzati in ragione di un embrione ogni 0,2 ml di NaCl 0,9 %; a partire dallo stadio 12 di Naef (e cioè appena tecnicamente possibile) sono stati fatti esperimenti con e senza sacco del tuorlo.

Nella Tabella I sono riassunti i dati raccolti, da essa emerge come l'emocianina appaia in quantità rilevabile allo stadio 7 (blastoderma nel quale sono appena visibili gli abbozzi dei tentacoli) mentre è assente allo stadio 0 (uova appena deposte) e 3 (blastoderma).

In base al comportamento immunologico l'emocianina estratta dagli embrioni non differisce da quella dell'adulto come è indicato dalla assenza di « spur » e dal formare essa un unico arco di precipitato.

(*) Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R. presso l'Istituto di Zoologia dell'Università statale di Milano.

(**) Nella seduta del 12 dicembre 1964.

Si può inoltre osservare che l'emocianina estratta da embrioni agli stadi 13 (embrione sollevato sul vitello con base di impianto dei tentacoli visibile dorsalmente), 17,20 (embrione prossimo alla schiusa) reagisce con antisieri anti-*Octopus* e anti-*Eledone* in modo simile a quella dell'adulto.

L'emocianina estratta dagli embrioni agli stadi 11 e 12 e precipitata con l'antisiero anti-emocianina di adulto dà la colorazione del rame.

TABELLA I.

Stadi di Sepia officinalis L.

	0	3	7	12	14	15	18
Risposta immuno- nologica	—	—	+	+	+	+	+

In base a questi dati si può affermare che l'emocianina estraibile dagli embrioni è innanzitutto neoformata in quanto allo stadio 0 non la si può mettere in evidenza con metodo immunologico, nemmeno se si ricerca in provetta, cioè nelle condizioni di maggiore sensibilità.

Essa non si differenzia da quella dell'adulto nel suo comportamento immunologico ed inoltre il rame è presente nella molecola. Anche la mobilità elettroforetica, apprezzata mediante l'immunolettroforesi, è simile a quella della emocianina dell'adulto.

Nell'astaco lo studio della emocianina è complicato dal fatto che essa si trova in diversi stadi di polimerizzazione. Ci sono infatti tre componenti rilevabili all'ultracentrifuga: G con s_{20} pari a 23,4 (secondo la nomenclatura di Eriksson-Quensel e Svedberg [3]), H con 16,3 e K con 5,3 (Tav. I, fig. 1).

Poiché sono scarsi i dati sulla emocianina di astaco [2] si è preferito esaminare con diverse tecniche l'emocianina dell'adulto prima di studiare quella estraibile dagli embrioni.

Immunologicamente nell'emolinfa dell'adulto sono evidenziabili tre archi: *a*, *b*, *c*, secondo una serie di decrescente concentrazione; tutti e tre danno netta la colorazione del rame e pertanto sono emocianina (Tav. I, fig. 3).

Sembra probabile una corrispondenza tra *a* e G, *b* e H, *c* e K ma ci manca finora la prova formale di ciò in quanto non è stato ancora possibile ottenere separati i tre componenti.

Non vi sono differenze apprezzabili tra i vari individui finora esaminati, esemplari di sesso diverso e di differente provenienza (Bergamo, Como, Viterbo) danno emolinfa che forma tre archi evidenti.

Osservando all'ultracentrifuga l'emolinfa trattata con urea ovvero con tamponi a pH alto si osserva un incremento dei componenti H e K (Tabella III), il che fa ritenere fondata l'ipotesi che si tratti di prodotti a diverso

grado di polimerizzazione. Accettando il modello proposto da van Bruggen [1] per l'emocianina di omaro è probabile che K sia il monomero, H corrisponda al polimero di otto subunità e G al polimero di sedici.

Tuttavia H e K preesistenti nell'emolinfa non sono semplicemente parti di G ed infatti hanno determinanti propri che non corrispondono a quelli evidenziabili in G dopo dissociazione. Ciò è dimostrato dal fatto che l'arco α , dopo dissociazione, si scompone in più archi, ma questi non si uniscono con β e γ . Inoltre mentre i prodotti di dissociazione a pH 9,1 possono essere riassociati abbassando il pH, ciò non accade per K e H dell'emolinfa nativa.

TABELLA II.

Componenti	Nativa	pH 9,1	pH 10,2	urea 1 h	urea 20 h
G	81,3	34,5	—	35,2	—
H	18,7	19,4	—	36,6	58,3
K	non det.	46,0	100	28,7	41,7

Dei componenti vengono date le concentrazioni in percentuale.

Nell'emolinfa nativa. Dopo soggiorno in tampone a pH 9,1 ovvero 10,2 per 20 h. Dopo trattamento con urea 30 % per 1 e 20 ore e successiva dialisi contro acqua distillata per 20 h. Tutte le operazioni compiute a + 4° C.

Nelle uova appena emesse dalle femmine (le uova sono state prelevate da femmine tenute in allevamento dalla primavera di quest'anno; come è noto l'emissione delle uova avviene in autunno e l'incubazione dura tutto l'inverno) sono rilevabili all'ultracentrifuga tre componenti con i seguenti s_{20} : 10,9 (il più concentrato), 15,4 e 22,9 gli ultimi due a concentrazione simile e di molto inferiore a quella del componente lento (Tav. I, fig. 2).

Le prove di assorbimento hanno chiaramente mostrato che il componente lento non è emocianina; infatti esaminando all'ultracentrifuga l'estratto dopo assorbimento con l'antisiero, si nota la presenza del componente in questione.

L'immunolettroforesi dà un'ulteriore dimostrazione di ciò, inoltre manca completamente l'arco corrispondente a β , l'arco che corrisponde ad α per contro è sdoppiato in due archi estremamente ravvicinati e pertanto non può essere escluso che il componente a s_{20} 15,4 sia emocianina.

L'immunodiffusione bidimensionale in micropiastre permette infine di mostrare la completa fusione dell'arco α con l'arco formato dall'estratto di uova.

La mancanza del componente β (o H) è dimostrata anche dagli esperimenti di assorbimento (Tabella III).

In conclusione si può affermare che nell'astaco, contrariamente a quanto si ha in seppia, vi è un cospicuo passaggio di emocianina (essenzialmente come componente G) dalla madre alle uova.

Non è stato possibile esaminare finora tutti gli stadi di sviluppo embrionale dell'astaco; i dati dei quali disponiamo sono relativi ai seguenti stadi: J (secondo la nomenclatura di Reichenbach [9]), (embrione con pleopodi), K, (embrione con occhi ben pigmentati), L (embrione sgusciante).

TABELLA III.

	Siero anti-emolinfa di adulto ♂	
	assorbito con	assorbito con
	uova fecondate	emolinfa di ♀
Antigene		
Uova fecondate	—	—
Emolinfa ♀	<i>b</i>	—

Allo stadio J e K è presente *a* e forse *c*, mentre manca *b* (Tav. I, figg. 3 e 4); all'ultracentrifuga è rilevabile una situazione del tutto simile a quella dello stadio di uovo fecondato. L'arco *a* dà la colorazione del rame.

Allo stadio L, o K tardivo, appare *b*; si nota tuttavia che *b*, è notevolmente meno concentrato che nell'adulto ed infatti la serie è ora $a > c > b$.

Nel giovane astaco che ha abbandonato la madre è presente sia G che H e nei rapporti di concentrazione dell'adulto ($H/G = 0,245$ nell'adulto, $0,227$ nel giovane astaco); immunologicamente sono presenti gli archi *a* e *b* mentre non è stato possibile mettere in evidenza *c*. Si deve tuttavia notare che l'arco corrispondente ad *a* si presenta sdoppiato in due, il significato di ciò deve essere ancora chiarito.

TABELLA IV.

	Stadi di <i>Austropotamobius pallipes</i> (Lereboullet)					
	uova fecondate	J	K	L	giovane astaco	adulto
Archi presenti	<i>a</i>	<i>a, c</i>	<i>a, c, b</i>	<i>a, c, b</i>	<i>a, b, (c)</i>	<i>a, b, c</i>

Quindi nello sviluppo embrionale dell'astaco esistono emocianine di diversa provenienza: una cospicua parte deriva dalla madre, si trova nella forma G e possiede i determinati che corrispondono all'arco *a* dell'adulto; vi è poi l'emocianina neosintetizzata a partire dallo stadio K e che possiede i determinanti corrispondenti all'arco *b*. La presenza di emocianina di origine materna maschera in parte l'emocianina neosintetizzata e pertanto non è possi-

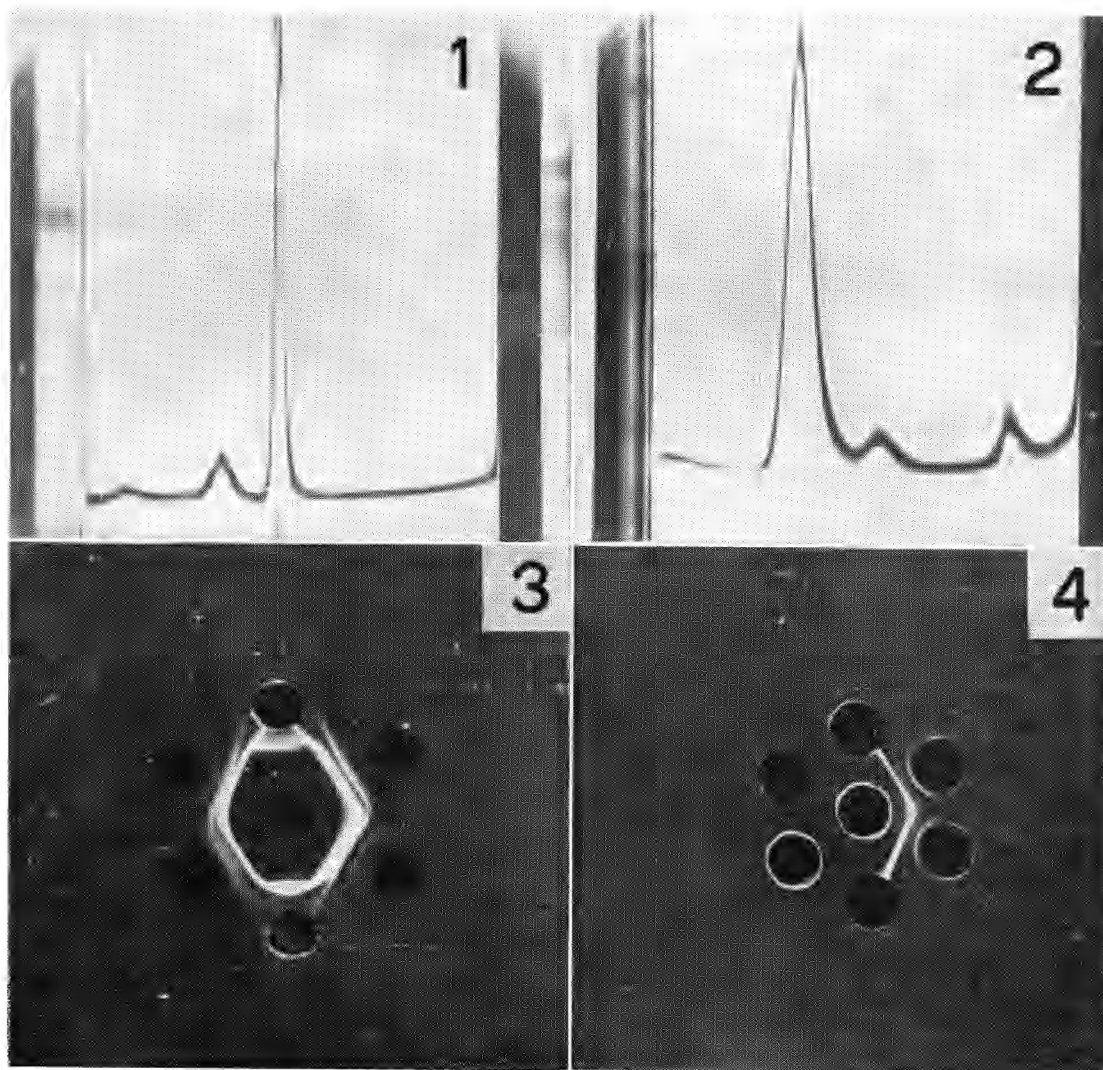


Fig. 1. – Diagramma di sedimentazione di emolinfa di astaco.

Fig. 2. – Diagramma di sedimentazione di estratto di uova fecondate di astaco.

Fig. 3. – Archi di precipitato ottenuti con antisiero anti-emolinfa di astaco adulto ♂. Al centro l'antisiero; dall'alto ed in senso orario: embrione stadio L, adulto ♀, adulto ♂, embrione stadio K, adulto ♀, adulto ♂.

Fig. 4. – Esperimento di assorbimento. Al centro antisiero per emolinfa di astaco non assorbito; dall'alto ed in senso orario: antisiero assorbito con embrioni alla stadio K, emolinfa di adulto ♂, idem, siero assorbito con embrioni allo stadio K, controlli.

bile dire quando si formano i determinanti *a*. I determinanti corrispondenti all'arco *c* sono già presenti allo stadio J; allo stadio K essi sono molto più concentrati di *b*.

Nella Tabella IV sono riassunti i dati; da essa emerge come il complesso delle emocianine dell'embrione differisca da quelle dell'adulto per la mancanza di alcuni determinanti; non è possibile peraltro precisare il significato di ciò, è tuttavia singolare che i determinanti corrispondenti all'arco *b* appaiano quando l'embrione è ormai alla fine del suo sviluppo embrionale.

Confrontando i dati relativi alle due specie studiate si notano profonde differenze. Lo sviluppo embrionale della seppia si accompagna con una graduale sintesi di emocianina; non si sono messe in evidenza differenze tra l'emocianina dell'embrione e quella dell'adulto. Nell'uovo di astaco invece vi è emocianina di origine materna, la cui funzione durante lo sviluppo embrionale è da determinare; durante lo sviluppo embrionale dell'astaco, solo in stadi molto avanzati, si osserva la presenza di tutti i determinanti dell'emocianina dell'adulto.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] VAN BRUGGEN E. F. J., SCHUITEN V., WIEBENGA E. H., GRUBER M., *Structure and Properties of Hemocyanins*. - III. *Electron Micrographs of Hemocyanins from different Gastropoda and Crustacea*, « J. Mol. Biol. », 7, 249-253 (1963).
- [2] DENUCE J.M., KÜHN E., *Comparative serology of North Sea Crustacea*, « Protides of the biological fluids », 10, 205-207 (1964).
- [3] ERIKSSON-QUENSEL J.B., SVEDBERG T., *The molecular weight and pH-stability regions of the hemocyanins*, « Biol. Bull. », 71, 498-574 (1936).
- [4] GHIRETTI F., *Hemocyanins and Hemerythrins*, in HAYAISHI O., *The Oxigenases*, Academic Press, 517-553 (1962).
- [5] LOWRY O. H., ROSEBROUGH N.J., FAIR A. L., RANDALL R. J., *Protein measurement with Folin phenol reagent*, « J. Biol. Chemistry », 193, 265-275 (1951).
- [6] NAEF A., *Die Cephalopoden*, « FAUNA u. Flora Neapel », 35 (1928).
- [7] PARISI V., NARDI G., GHIRETTI F., GHIRETTI-MAGALDI A., *Ricerche sulle emocianine*. III. *Proprietà immunologiche*, « Boll. Soc. it. biol. sper. », 38, 1848-1851 (1962).
- [8] RANZI S., *Quando si forma l'emocianina nell'embrione di Sepia?*, « Ricerca Scientifica », 9, 631-633 (1938).
- [9] RANZI S., *Il ricambio minerale dell'uovo durante lo sviluppo della Sepia officinalis*, « Arch. f. exper. Zellforsch. », 22, 557-566 (1939).
- [10] REICHENBACH H., *Studien zur Entwicklungsgeschichte des Flusskrebses*, « Abh. Senckenb. naturf. Ges. », 14, 1-137 (1886).
- [11] SPIRITO A., *Studi sul comportamento delle perossidasi nello sviluppo embrionale di Vertebrati e di Invertebrati*, « Ricerca Scientifica », 9, 297-300 (1938).