
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

VITTORIO PARISI

Analisi immunologica delle emocianine di alcuni Cefalopodi

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.2, p. 269–273.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_2_269_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. — *Analisi immunologica delle emocianine di alcuni Cefalopodi* (*). Nota di VITTORIO PARISI, presentata (**) dal Corrisp. S. RANZI.

Nel corso di precedenti ricerche (1) mi accorsi che l'emocianina di *Sepia* differisce da quella di altre specie della stessa Classe; ho creduto quindi importante determinare il più esattamente possibile tali differenze prima di approfondire lo studio embriologico.

Nella presente Nota verranno esposti i dati relativi alle emocianine di *Octopus vulgaris* Lam., *Octopus macropus* Risso, *Eledone moschata* Lam., *Sepia officinalis* L. fornitemi purificate (per dialisi e ultracentrifugazione) dal prof. F. Ghiretti.

Sono stati preparati antisieri in conigli maschi con una media di cinque iniezioni endovenose per animale, iniettando in totale da 60 a 140 mg di proteina. Come controllo dello stato di conservazione dei preparati si è ricorso alla immunoelettroforesi secondo le tecniche convenzionali (2).

L'analisi immunologica è stata condotta utilizzando il noto fenomeno dello « spur »: se si hanno due proteine A e B ed in una micropiastrea di agar 1% si pongono soluzioni

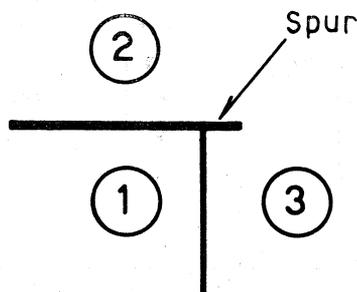


Fig. 1. — Schema illustrante lo « spur ».

1 = antisiero anti-emocianina di *Octopus vulgaris*; 2 = emocianina di *Octopus vulgaris*; 3 = emocianina di *Octopus macropus* (m nella Tabella I).

di A e B in due pozzetti vicini (fig. 1), si possono avere tre casi rispetto ad un antisiero anti-A: 1° B non reagisce; 2° B reagisce e l'arco corrispondente si fonde completamente

(*) Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R. per lo studio del differenziamento presso l'Istituto di Zoologia dell'Università statale di Milano. Ringrazio vivamente il dott. Pietro Dohrn, direttore della Stazione Zoologica di Napoli, per l'accoglienza riservatami.

(**) Nella seduta del 13 febbraio 1965.

(1) V. PARISI, G. AMBROSOLI MOGNONI, E. SOZZI, *Studio preliminare delle emocianine estratte da embrioni di Sepia officinalis L. e Austropotamobius pallipes (Lereboullet)*. « Rend. Acad. Naz. Lincei (Sc. Fis.) » (1964).

(2) V. PARISI, G. NARDI, F. GHIRETTI, A. GHIRETTI-MAGALDI, *Ricerche sulle emocianine. III. Proprietà immunologiche*, « Boll. Soc. it. biol. sper. », 38, 1848-1851 (1962).

con l'arco A; 3° B reagisce ma l'arco corrispondente ad A si spinge nell'area di diffusione di B. Il primo caso corrisponde ad una completa dissomiglianza, il secondo ad una identità, il terzo ad una parziale somiglianza.

Se si hanno tre proteine A, B, C ed i rispettivi antisieri è possibile condurre una analisi dei determinanti in comune e differenziali in base alla seguente osservazione: se B presenta con C il fenomeno dello « spur » nei confronti di un antisiero anti-A, allora B e A hanno in comune dei determinanti che sono assenti in C. Procedendo nell'analisi è quindi possibile evidenziare, se vi sono, i determinanti comuni (a tutte e tre le proteine oppure alle tre coppie possibili) e quelli specifici delle tre proteine.

Dall'esame delle Tabelle I e II (nelle quali mancano i dati relativi allo antisiero anti-*Sepia* in quanto le tre specie di Ottopodi danno archi non molto netti con esso) si può rilevare la completa congruenza tra il numero di determinanti in comune ad ogni coppia di specie e la loro affinità sistematica determinata in base ad altri caratteri.

TABELLA I.

Tabella riassuntiva dei confronti

(sono indicati con S i casi nei quali si osserva lo « spur »).

Antigeni confrontati con	ANTISIERI									
	<i>O. vulgaris</i>			<i>O. macropus</i>			<i>E. moschata</i>			
	v	m	e s	v	m	e s	v	m	e s	
<i>O. vulgaris</i>										S
<i>O. macropus</i>				S	S	S				S
<i>E. moschata</i>			S			S	S	S	S	

v = *O. vulgaris*; m = *O. macropus*; e = *E. moschata*; s = *S. officinalis*.

Risulta inoltre evidente che nel caso qui presentato l'emocianina è specifica come è dimostrato dalla presenza di determinanti limitati alle specie *O. vulgaris* e *O. macropus*.

Esistono anche determinanti specifici dei Cefalopodi (o meglio dei Dibranchiati) in quanto, come ha mostrato Leone ⁽³⁾ le emocianine di *Octopus* e di *Sepia* presentano una bassa reattività, determinata con la più sensibile nefelometria, con antisieri anti-Gasteropodi. Implicitamente questo dato dimostra che vi sono determinanti in comune alle specie delle due Classi.

(3) C.A. LEONE, C. W. PRYOR, *Serological comparisons among four Classes of Mollusca*, « Biol. Bull. », 107, 411-419 (1954).

TABELLA II.
Distribuzione dei determinanti.

SPECIE	DETERMINANTI			
<i>O. vulgaris</i>	v	O	Oc	D
<i>O. macropus</i>	m	O	Oc	D
<i>E. moschata</i>		E	Oc	D

Per *E. moschata* mancano i gruppi specie-specifici in quanto non è stato possibile esaminare un'altra specie del genere

È opportuno ora esaminare l'insieme dei dati noti sulle emocianine anche in relazione alla loro distribuzione.

Le emocianine sono presenti in Artropodi (Aracnidi e Crostacei, forse nei Chilopodi) e Molluschi (Anfineuri, Gasteropodi e Cefalopodi).

In tutti e due i Tipi la loro assenza è una condizione secondaria. Negli Aracnidi infatti l'emocianina è presente nel limulo, negli scorpioni ed in alcuni Araneidi; nei Crostacei per contro posseggono queste ossidasi i gruppi riuniti sotto la denominazione di Malacostraci e più precisamente sono stati studiati a questo proposito gli Stomatopodi, i Decapodi e gli Isopodi (*Ligia*⁽⁴⁾), mentre tutti gli « Entomostraci » studiati mancano di emocianina. Tuttavia la grande somiglianza tra le emocianine dei Decapodi e degli Aracnidi depone in favore all'ipotesi che si tratti di strutture omologhe.

Nei Molluschi l'ipotesi prima fatta è completamente verificata (fig. 2) ed infatti l'emocianina è presente negli Anfineuri ed in tutti i Prosobranchi studiati.

La scomparsa della emocianina, che può essere seguita ma non necessariamente dalla apparizione di una emoglobina, non è facilmente spiegabile in quanto non sembra collegata in modo netto con un cambiamento nella ecologia delle specie deficitarie: Polmonati, sia dulcacquicoli che terrestri hanno queste ossidasi.

Tra gli Stilommatofori inoltre vi sono specie, come *Planorbarius corneus* (L.), che non hanno emocianina. In questo gruppo si potrà studiare un problema tuttora insoluto e cioè le tappe della perdita di questa proteina ed in particolare se il primo evento è la perdita della capacità di legare il rame.

Il fatto che in tutti e due i Tipi la condizione primitiva sia la presenza di emocianina esocellulare nell'emolinfa pone un secondo problema di difficile soluzione: le emocianine di Artropodi e Molluschi sono strutture sorte indi-

(4) C. MANWELL, C.M.A. BAKER, *Starch gel electrophoresis of sera from some marine arthropods: studies of the heterogeneity of hemocyanin and on a « ceruloplasmin-like » protein*, « Comp. Biochem. Physiol. », 8, 193-208 (1963).

pendentemente ovvero sono molecole connesse da precisi rapporti filogenetici? Quando sarà ben nota la struttura del luogo attivo (cioè quello implicato nel legame con il rame) nonché la biosintesi delle emocianine sia nell'adulto che durante lo sviluppo embrionale, allora sarà forse possibile rispondere a tale quesito.

Per quanto riguarda i Molluschi si è detto che alcuni gruppi hanno conservato l'emocianina; risulta quindi interessante confrontare le emocianine delle

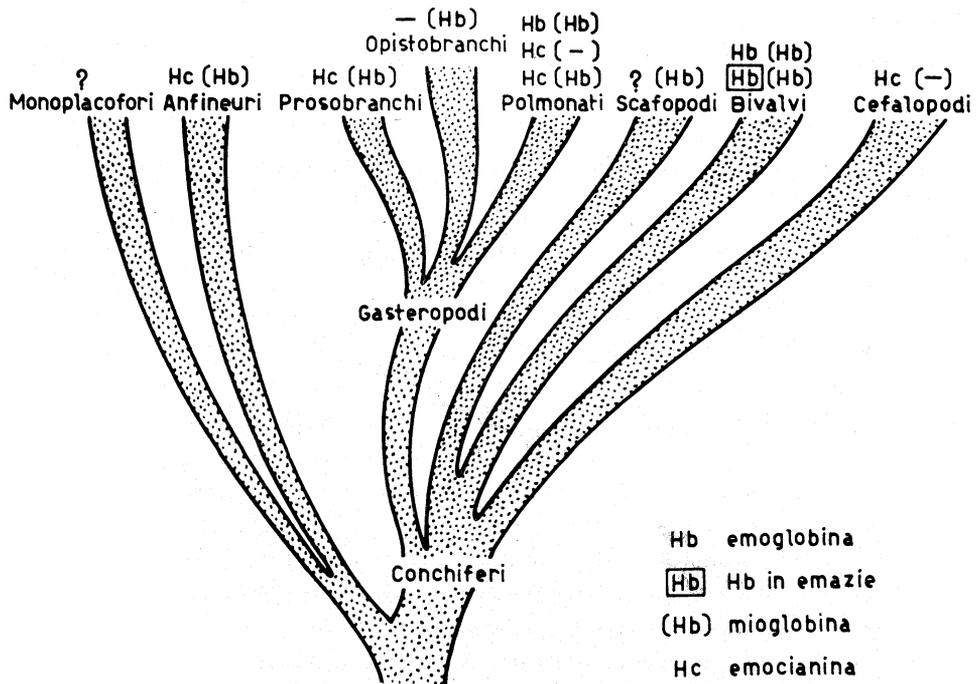


Fig. 2. - Distribuzione delle emocianine, emoglobine, mioglobine nei Molluschi.

La presenza di emocianina negli Anfineuri e nei Prosobranchi dimostra che l'assenza di questa ossidasi è una condizione secondaria, che può essere seguita, ma non necessariamente, dalla comparsa di una emoglobina. Vi possono essere caratteristiche specializzazioni come i Bivalvi nei quali l'emoglobina è generalmente contenuta in emazie. L'emocianina è invece sempre esocellulare. L'assenza di emocianina non è necessariamente correlata con un cambiamento di habitat, come è indicato dalla sua presenza in Gasteropodi d'acqua dolce e terrestri.

specie che hanno seguito tale via ed in particolare esaminare le emocianine dei Cefalopodi in confronto con quelle dei Polmonati.

Nella Tabella III sono riassunti i confronti utilizzando come termine di paragone un crostaceo: le percentuali di somiglianza sono state calcolate utilizzando dati relativi ai vari livelli della organizzazione della molecola in parte desunti da Ghiretti ⁽⁵⁾. Per gli aminoacidi ⁽⁶⁾ i calcoli sono stati limitati a leu-

(5) F. GHIRETTI, *Hemocyanins and Hemerythrins*, in O. HAYAISHI *The Oxygenases*, Academic Press, 517-553 (1962).

(6) G. NARDI, A. GHIRETTI-MAGALDI A., G. CASERTA, R. ZITO, F. GHIRETTI, *Ricerche sulle emocianine. II. Composizione in aminoacidi e peptidi*, « Boll. Soc. it. biol. sper. », 38, 1845-1848 (1962).

cina, prolina, arginina, istidina, acido glutamico, tirosina. Per le subunità sono stati utilizzati i dati relativi alla dissociazione delle emocianine a differenti pH⁽⁷⁾.

Benché le percentuali non dipendano soltanto dalle distanze sistematiche ma anche dalle caratteristiche proprie dei vari livelli della organizzazione della molecola (possibilità di coincidenza ecc.) si può notare come proprio al livello dei determinanti immunologici si è avuta la massima differenziazione tra le emocianine.

TABELLA III.

Percentuali di somiglianza tra l'emocianina di Octopus vulgaris e quella di altre specie calcolate ai vari livelli della organizzazione della molecola.

	Composizione elementare	Composizione in aminoacidi	Determinanti immunologici	Subunità	Peso molecolare
	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)
<i>Octopus macropus</i> . . .	100 (*)	96,5	60	100 (*)	100 (*)
<i>Eledone moschata</i> . . .	96,9	94,9	40	100	100
<i>Cryptomphalus aspersus</i>	90,8	90,2	0	33,3	25,6
<i>Homarus vulgaris</i> . . .	89,9	82,8	0	0	2,7

(*) Teorico. (1) Cf. Ghiretti (1962). (2) Cfr. Nardi (1962). (3) Ricerche qui presentate. (4) Cfr. Eriksson-Quensel (1936).

Il microscopio elettronico ha inoltre dimostrato^(8,9) che la disposizione spaziale delle subunità è praticamente identica nelle emocianine di Gasteropodi e Cefalopodi. I dati finora noti sulla natura del luogo attivo fanno ritenere che esso sia notevolmente simile in Gasteropodi e Cefalopodi. Nel caso delle emocianine vi sono quindi dei caratteri che si trasformano velocemente nel corso della evoluzione del gruppo mentre le parti della molecola che sono implicati nei fenomeni di associazione e nel legame con il rame mostrano una certa inerzia a variare.

(7) J. B. ERIKSSON-QUENSEL, T. SVEDBERG, *The molecular weight and pH-stability regions of the hemocyanins*, « Biol. Bull. », 71, 498-574 (1936).

(8) E.F.J. VAN BRUGGEN, E.H. WIEBENGA, M. GRUBEN, *Structure and Properties of Hemocyanins*. - I. *Electron Micrographs of Hemocyanin and Apohemocyanin from Helix pomatia at different pH values*, « J. Mol. Biol. », 4, 1-7 (1962).

(9) E.F.J. VAN BRUGGEN, E.H. WIEBENGA, M. GRUBEN, *Structure and Properties of Hemocyanins*. - II. *Electron Micrographs of the Hemocyanins of Sepia officinalis, Octopus vulgaris and Cancer pagurus*, « J. Mol. Biol. », 4, 8-9 (1962).