

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

FRANCA GUIDALI MAZZALAI, SILVIA LONGONI, GIANNI  
A. AMIRANTE

**Studi sulle caratteristiche di emoagglutinine in  
Periplaneta americana L**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 71 (1981), n.6, p. 203–206.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1981\\_8\\_71\\_6\\_203\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1981_8_71_6_203_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/>



## SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

**Zoologia.** — *Studi sulle caratteristiche di emoagglutinine in Periplaneta americana L.* Nota di FRANCA GUIDALI MAZZALAI (\*), SILVIA LONGONI (\*) e GIANNI A. AMIRANTE (\*\*), presentata (\*\*\*) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — In this work the haemagglutinins of *Periplaneta americana* L. hemolymph have been characterized from the point of view of functionality, biochemistry, and localization.

Three proteins, which are able to agglutinate rabbit erythrocytes, have been isolated and purified. They show different molecular weights (respectively 72000, 24000 and 22000 Daltons); one of them is certainly a lectin. Both cytoplasmic and membrane-bound localization of the three haemagglutinins has been pointed out by differential immunofluorescence in the hemocytes. Only the haemocytes, which show membrane-bound haemagglutinins, are responsible for cellular reactions (i.c.a.). The possible phylogenetical origin of the two groups of haemagglutinins is discussed.

La complessità e la funzionalità delle risposte difensive sono ovviamente proporzionali all'evoluzione delle specie viventi.

Dai risultati ottenuti da alcuni Autori su varie specie di Invertebrati (Crostei [1, 2, 3, 4], Insetti [5], Molluschi [1,6,7,8]) si può parlare di una similitudine immunologica tra questi e i Vertebrati.

Lo studio condotto su *Tinca tinca* L. [9] mostrando la presenza in tale vertebrato di emoagglutinine e di immunoglobuline, avvalorava l'esistenza di questa similitudine.

È ormai noto che gli Insetti Blattoidei *Leucophaea maderae* Fabr. [10, 11, 12] e *Nauphoeta cinerea* Oliv. [12], hanno nella loro emolinfa delle componenti proteiche con proprietà agglutinanti verso i globuli rossi. Tali sostanze prodotte dagli emociti giocano un ruolo importante nelle reazioni di difesa contro sostanze eterologhe.

Con tecniche di immunofluorescenza si è potuto dimostrare che queste emoagglutinine sono localizzate sia nel citoplasma che sulla membrana, mostrandosi quindi responsabili di reazioni immunologiche immediate e ritardate.

Con il presente lavoro si sono volute caratterizzare le emoagglutinine presenti nell'emolinfa di *Periplaneta americana* L. da un punto di vista funzionale, biochimico e di localizzazione.

*Isolamento ed estrazione delle emoagglutinine.* Eseguita l'elettroforesi dell'emolinfa di adulti ♂♂ e ♀♀ di *Periplaneta americana* L. in SDS-PAGE e indi-

(\*) Labor.Zool.—Università Statale di Milano

(\*\*) Labor. Zool. e Anat. Comp. — Università di Trieste.

(\*\*\*) Nella seduta del 12 dicembre 1981.

viduate tramite colorazione in blue Coomassie le diverse componenti proteiche, si procede alla loro separazione. Si radunano tra loro i dischi di gel corrispondenti ad ogni banda e si fanno eluire in PBS 0,1 M a pH 7,2. Raccolto l'eluato contenente la proteina in soluzione si esegue una prova di agglutinazione per ogni proteina estratta. Sono state così isolate tre emoagglutinine con peso molecolare di 72000, 24000, 22000 Dalton.

*Produzione di siero antiemoagglutinina.* Si iniettano in conigli per via endovena 0,5 cc. di emoagglutinina isolata. Dopo tre iniezioni si verifica la produzione di anticorpi mediante Ring test e immunodiffusione. Successivamente si preleva il sangue e si estrae il siero che viene conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Marcaggio delle colture con antisieri TRITC e FITC.* Gli emociti coltivati in terreno NCTC 199 (Difco) a pH 7,2 dopo essere stati fissati con metanolo e lavati più volte con PBS furono fatti reagire dapprima con uno dei tre sieri antiemoagglutinine, poi con siero anti  $\gamma$ -globuline fluoresceinato e infine con un altro dei tre sieri antiemoagglutinine rodaminato. Dopo tale trattamento furono osservati al microscopio a fluorescenza.

Gli emociti dell'emolinfa di adulti di *Periplaneta americana* L. estratta in condizioni di sterilità dal vaso dorsale, coltivati in tubi leighton in terreno sintetico NCTC 199 (Difco) e mantenuti a  $26,5^{\circ}\text{C}$ . furono colorati secondo Pappenheim e osservati al microscopio ottico. Furono così notati tre tipi di emociti che furono poi classificati secondo Gupta [13] in *granulociti*, *plasmacociti* e *coagulociti*. La loro percentuale è risultata essere rispettivamente del 40%, 10%, 50% circa.

Come già osservato in *Leucophaea maderae* Fabr. [11] e in *Nauphoeta cinerea* Oliv. [12] mediante inibizione con cicloeximide, queste cellule sono risultate responsabili della sintesi delle emoagglutinine.

Mediante elettroforesi su lastre in SDS-PAGE furono isolate e purificate tre proteine con potere agglutinante verso i globuli rossi di coniglio. Il peso molecolare di queste proteine estrapolato dalla mobilità elettroforetica di un pool di proteine a peso molecolare noto è risultato essere di 72000, 24000 e di 22000 Dalton. Queste tre proteine saranno in seguito chiamate 72, 24, 22.

Facendo uso della immunofluorescenza differenziata (TRITC e FITC) è stato possibile stabilire la loro localizzazione individuale. Trattando alcune colture di emociti con siero anti 72 rodaminato- siero anti 24 fluoresceinato e altre con siero anti 24 rodaminato- siero anti 22 fluoresceinato si è osservato che le tre emoagglutinine erano localizzate sia sulla membrana che nel citoplasma con una prevalenza citoplasmatica per la 72 e di membrana per la 24 (figg. 1 e 2).

Trattando l'emolinfa con  $\beta$ -mercaptoetanolo si è constatato che alcune sue componenti proteiche, tra cui sicuramente la 72, sono costituite da subunità. Due di queste subunità hanno peso molecolare di 27000 e 14000 Dalton circa. Per verificare se le emoagglutinine di membrana fossero responsabili delle reazioni cellulari di tipo ritardato si sono fatti reagire globuli rossi di coniglio con emociti e si sono osservate reazioni di immunocitoaderenza (rosette). Mediante

immunofluorescenza si è visto che tutti gli emociti responsabili di tali reazioni presentano solo anticorpi di membrana (figg. 3 e 4).

Mediante inibizione con N-acetil-galattosammina si è potuto constatare che solo una delle tre emoagglutinine presenti in *Periplaneta americana* L. (72) è una lectina.

#### DISCUSSIONE

Le emoagglutinine presenti nell'emolinfa di adulti di *Periplaneta americana* L. (72, 24, 22) appartengono a due tipi di proteine: lectine e proteine che reagiscono con determinanti di membrana non caratterizzati da zuccheri. Tale risultato ci fa ipotizzare una stretta relazione tra queste due categorie di proteine. Inoltre data la notevole analogia tra i meccanismi immunitari (cellulari e umorali) dei Vertebrati e quelli qui studiati è possibile pensare che ambedue derivino da un meccanismo ancestrale che ha sicuramente dato origine alle cellule deputate alla formazione delle lectine. Una mutazione del gene responsabile della formazione del sito attivo sarebbe stata quindi alla base di tale evoluzione.

Se si osserva la localizzazione sia citoplasmatica che di membrana, si può supporre la presenza di due meccanismi immunitari differenti: umorale di tipo immediato e cellulare di tipo ritardato come si riscontra nei Vertebrati. Una conferma di tale ipotesi è data dalla fluorescenza di membrana rivelata nelle reazioni cellulari tra emociti e globuli rossi di coniglio, che si manifesta con i caratteristici fenomeni del capping e degli spots. Tale analogia tra i meccanismi di difesa dei Vertebrati e degli altri animali studiati e alcune ricerche di Carton [14] su Echinodermi e di Amirante [9] su *Tinca tinca* L. avvalorano l'ipotesi di una parentela filogenetica dei meccanismi immunitari in tutti i Metazoi studiati.

#### LAVORI CITATI

- [1] R. T. ACTON, P. F. WEINHEMER and W. NIEBERMEIR (1973) - *The carbohydrate composition of invertebrate hemagglutinin subunits isolated from the lobster Palinurus argus and the oyster Crassostrea virginica*, « Comp. Biochem. Physiol. », 44, 185.
- [2] J. E. STEWART and B. M. ZWICKAR (1972) - *Natural and induced bacterial activities in the hemolymph of lobster Homarus americanus product of hemocyte-plasma interaction*, « Can. J. Microbiol. », 18, 1499.
- [3] C. J. TYSON and C. R. JENKIN (1972) - *Phagocytosis of bacteria in vitro by hemocytes from the crayfish Parachanna bicarinatus*, « The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science », 52.
- [4] J. J. MARCHALONIS, G. M. EDELMAN (1968) - *Isolation and characterization of a hemagglutinin from Limulus polyphemus*, « J. Mal. Biol. ».
- [5] G. R. SEAMAN and N. L. ROBERT (1968) - *Immunological responses of male cockroaches to injection of Tetraymena pyriformis*, « Science ».
- [6] S. HAMMARSTROM and E. A. KABAT (1969) - *Purification and characterization of a blood-group A reactive hemagglutinin study of its combining site*, « Biochemistry », 8, 2696.
- [7] R. T. ACTON and E. E. EVANS (1968) - *Bacteriophage clearance in the oyster Crassostrea virginica*, « J. Bact. », 95, 1260.

- [8] G. B. PAULEY, G. A. GRANGER and S. M. KRASSNER (1971) - *Characterization of a natura agglutinin present in the hemolymph of the California sea hare: Aplysia californica*, « J. Invert. Pathol. », 18, 267.
- [9] G. A. AMIRANTE e S. FERRARIO (1976) - *Studi sulle caratteristiche immunologiche del teleosteo Tinca tinca L. Separazione e purificazione dell'eteroagglutinina a mobilità albuminica*, « Acc. Naz. Lincei », 9, 4, 505.
- [10] G. A. AMIRANTE (1976) - *Production of heteroagglutinins in hemocytes of Leucophaea maderae Fabr.*, « Experientia », 32, 526.
- [11] G. A. AMIRANTE and F. GUIDALI MAZZALAI (1978) - *Synthesis and localization of hemaagglutinins in hemocytes of the cockroach Leucophaea maderae Fabr.*, « Develop. Comp. Imm. », 2, 4, 735.
- [12] F. GUIDALI MAZZALAI, P. BERGAMO e G. A. AMIRANTE (1978) - *Studi sulla sintesi di emoagglutinine da parte di colture di emociti di Insetti Blattoidei (Nauphoeta cinerea Oliv. e Leucophaea maderae Fabr.)*, « Acc. Naz. Lincei », 65, 5, 338.
- [13] A. P. GUPTA (1979) - *Arthropod hemocytes and phylogeny*, « Arthropod Phylogeny - Van Nostrand Reinhold - New York », 669.
- [14] Y. CARTON (1974) - *Parentés entre les hémagglutinines naturelles d'échinodermes et les chaînes des immunoglobulines de vertébrés*, « Ann. Immunol. », 125, 731.

### SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Emocita granulare marcato con siero antiemoagglutinina (24) fluoresceinato. Si osserva la fluorescenza citoplasmatica e di membrana. (330×).
- Fig. 2. - Emocita granulare marcato con siero antiemoagglutinina (72) rodaminato. Si osserva la fluorescenza citoplasmatica e di membrana. (330×).
- Fig. 3-4. - Reazione di immunocitoaderenza (i.c.a.). In 3 si nota la tipica formazione di rosette tra un emocita e globuli rossi di coniglio; in 4 lo stesso emocita marcato con antiemoagglutinina fluoresceinata osservato al microscopio a fluorescenza. (75×).

