
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

BRUNO BERTOLINI

Meccanismi di connessione tra cellule nel midollo spinale della Rana

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 34 (1963), n.6, p. 717-722.

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_34_6_717_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. — *Meccanismi di connessione tra cellule nel midollo spinale della Rana* (*). Nota di BRUNO BERTOLINI, presentata (**) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

La coesione delle cellule in un tessuto è assicurata da strutture di diverso tipo, alcune delle quali già descritte e studiate dalla citologia classica. Una di queste strutture, il desmosoma, era stata correttamente interpretata da Bizzozzero (1870 [1]), come un differenziamento della superficie cellulare che permetteva l'adesione di due cellule contigue, senza che a livello di esso vi fosse una continuità citoplasmatica. Questo concetto fu pienamente confermato dalla microscopia elettronica (Porter 1954 [2]).

Un secondo tipo di meccanismo di adesione è rappresentato da una vera e propria fusione delle membrane plasmatiche di due cellule adiacenti; lo strato denso superficiale della membrana cellulare si fonde con lo strato denso corrispondente della membrana della cellula vicina, e così si osserva una struttura unica, formata da cinque strati, di uno spessore complessivo di 150 Å, invece di due membrane a triplice struttura, separate da uno spazio intercellulare di 100–200 Å.

Questa fusione di membrane di cellule adiacenti fu descritta per la prima volta da Robertson (1959 [3]) (*external compound membrane*) per le cellule di Schwann, poi da Karrer (1960 [4, 5]) (*quintuple layered cell interconnection*) nella tonaca muscolare dei vasi sanguigni e più di recente da Farquhar e Palade (1961) [6] (*tight intercellular junction*) e da diversi altri Autori.

La presenza di desmosomi e di fusioni di membrane è stata osservata anche nel sistema nervoso centrale (Schultz, Berkowitz e Pease 1956 [7]; Maturana 1960 [8]; Gray 1961 [9, 10]; Rosenbluth e Palay 1961 [11]).

Lo scopo della presente ricerca è stato quello di esaminare, sulla base di quanto era già noto dai lavori precedenti, alcuni tipi di relazione tra le membrane plasmatiche adiacenti delle cellule di glia e dei neuroni, nel sistema nervoso centrale.

MATERIALE E METODO.

Brevi tratti del midollo spinale di rana (*Rana esculenta* L.) sono stati fissati per 1.30 h a 0°C in OsO₄ 2%, in tampone fosfato (Millonig 1962 [12]) a cui era stato aggiunto il 2,5% di saccarosio, ed inclusi in metacrilato. Le sezioni sono state eseguite con l'Ultrotome LKB, colorate con piombo secondo il metodo A di Karnovsky (1961 [13]) e fotografate con il microscopio elet-

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia comparata «G. B. Grassi» dell'Università di Roma e nel Centro di Neuroembriologia del C.N.R.

(**) Nella seduta del 13 giugno 1963.

tronico Hitachi HU 11, a 75 kV di accelerazione, con un diaframma dell'obiettivo di 50 μ . Le fotografie sono state prese ad ingrandimenti diretti compresi tra le 10.000 e le 30.000 volte. L'ingrandimento del microscopio è stato controllato sulla replica di un reticolo di diffrazione di dimensioni note. Le dimensioni delle strutture sono state misurate su 15 fotografie in cui la risoluzione era sufficiente; in genere si sono confrontate le misure prese sulla stessa fotografia, in modo da eliminare gli eventuali errori di ingrandimento.

RISULTATI.

Le cellule nervose e gliali del midollo spinale sono separate dal consueto spazio extracellulare di 80-100 Å. Tra i prolungamenti delle cellule di neuroglia ci sono dei punti di attacco specializzati, o desmosomi, caratterizzati da una struttura particolare. A livello del desmosoma le membrane plasmatiche delle due cellule a contatto si allontanano, fino a 250-300 Å, ma lo strato denso superficiale si allontana dallo strato denso profondo, fino ad una distanza di circa 70 Å, ed i due strati superficiali si accostano e restano paralleli ad una distanza di circa 20 Å, per tutta la lunghezza del desmosoma. Alla superficie citoplasmatica della membrana cellulare è addossato un materiale denso, nel quale convergono le fibrille di cui è ricco il citoplasma dei gliociti; lo strato profondo della membrana plasmatica è però molto opaco agli elettroni, e può essere seguito per tutta la lunghezza del desmosoma (Tav. I, figg. 1 e 2).

I desmosomi sono presenti soltanto fra prolungamenti di cellule gliali; non ne sono stati osservati in cellule identificabili come neuroni.

Il secondo meccanismo di adesione che è stato osservato è la fusione della membrana plasmatica di cellule adiacenti. Lo spazio extracellulare, largo circa 80-100 Å, scompare e la zona di fusione appare formata da cinque strati, due densi laterali, due chiari intermedi ed uno denso centrale. Ogni strato ha uno spessore di circa 30 Å, e lo spessore totale della struttura quintupla è di circa 150 Å (Tav. I, fig. 3).

Questo tipo di contatto è stato osservato prevalentemente tra cellule di glia e molto meno di frequente tra la membrana plasmatica di un neurone e quella di una cellula di glia. Le gliofibrille non mostrano nessun rapporto con questi contatti a tre strati densi, mentre convergono invece verso i desmosomi, su cui sembra che si vadano ad inserire.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI.

La presenza di desmosomi nel sistema nervoso è stata notata da diversi Autori, non solo come differenziazioni della superficie di cellule di glia (Hama 1959 [14]; Maturana 1960 [8]; Rosenbluth e Palay 1961 [11]), ma anche tra elementi nervosi, come punti di adesione differenti, per struttura e funzione, dalle sinapsi (Schultz, Berkowitz e Pease 1956 [7]; Gray 1961 [10]). I desmo-

somi che sono presenti tra le cellule di glia del midollo spinale della rana mostrano però alcune particolarità di struttura che li rendono differenti dai desmosomi di altre regioni del sistema nervoso della rana o di altri animali, o di altri tessuti.

I desmosomi finora descritti possono essere divisi, molto schematicamente, in tre gruppi: desmosomi in cui lo spazio extracellulare non presenta una chiara organizzazione strutturale, osservabile al microscopio elettronico; desmosomi in cui la sostanza intercellulare ha una struttura ben definita; desmosomi con strutture trasversali che sembrano connettere le membrane plasmatiche delle due cellule.

I desmosomi del primo gruppo sono stati descritti nel midollo spinale della lampreda, tra cellule endoteliali e nevrogliche ed anche tra elementi nervosi (Schultz, Berkowitz e Pease 1956 [7]), nella tonaca muscolare dei vasi sanguigni (Karrer 1960 [5]), tra cellule gliali nel nervo ottico degli Anuri (Maturana 1960 [8]), nel pancreas esocrino (Sjöstrand e Elfvin 1962 [15]). In questi desmosomi le membrane plasmatiche delle cellule adiacenti sono separate da uno spazio di 100–180 Å, e la sostanza intercellulare non mostra alcuna strutturazione, o, in qualche caso, soltanto un aumento della opacità agli elettroni.

I desmosomi del secondo gruppo hanno una struttura più complessa: lo spazio extracellulare mostra degli strati densi, paralleli alle due membrane plasmatiche. Questi strati densi sembra che non abbiano nessuna continuità con le membrane cellulari. Desmosomi in cui è presente questa organizzazione della sostanza intercellulare sono stati descritti in una gran varietà di tessuti, da parte di molti Autori (Horstmann e Knoop 1958 [16]; Odland 1958 [17]; Hibbs e Clark 1959 [18]; Hama 1960 [19]; Karrer 1960 [4]; Fawcett 1961 [20]; Jakus 1961 [21]; Munger 1961 [22]; Munger e Brusilow 1961 [23]; Ellis e Montagna 1961 [24]; Smith 1961 [25]; Overton 1962 [26]; Choi 1963 [27]; Munger e Siroth 1963 [28]; Tapp 1963 [29]); nel sistema nervoso, in particolare, Rosenbluth e Palay (1961 [11]) li hanno descritti nelle guaine di mielina non compatta del ganglio dell'ottavo nel carassio.

Il terzo gruppo di desmosomi, cioè quelli che presentano delle connessioni trasversali tra le membrane plasmatiche delle cellule adiacenti, è rappresentato da pochi esempi: desmosomi della guaina delle fibre giganti di un lombrico (Hama 1959 [14]), zone di attacco tra cellule epiteliali nell'idra (Wood 1959 [30]) e forse anche i desmosomi dell'otocisti dell'embrione di pollo (Friedmann 1961 [31]).

I desmosomi del midollo spinale della rana hanno una struttura differente; in essi lo spazio extracellulare, che di solito è di 80–100 Å, è pressoché abolito: gli strati densi superficiali delle due membrane plasmatiche si accostano fino ad una distanza di circa 20 Å, valore che è paragonabile a quello dell'intervallo tra i due strati densi di una singola membrana plasmatica. Questo ultimo intervallo, invece, nel desmosoma aumenta fino a circa 70 Å.

Lo spazio compreso tra le membrane plasmatiche di cellule a contatto è formato da uno strato organizzato di molecole (Sjöstrand 1960 [32]; 1962 [33]), che può mostrare, in alcuni desmosomi, una strutturazione osservabile al mi-

croscopio elettronico. Questo strato molecolare è responsabile dell'adesione cellulare; nel caso dei desmosomi ora descritti esso è però soppresso (del tutto o in gran parte), dato che la distanza tra le membrane plasmatiche aderenti è di soli 20 Å, e quindi l'adesione è presumibilmente dovuta ad una diretta interazione tra le membrane.

Lo spazio tra i due strati densi della membrana plasmatica ha delle dimensioni molto costanti; esso può variare in differenti tipi cellulari, e in parti della superficie di una stessa cellula che siano differenti dal punto di vista funzionale (Finean 1961 [34]; Sjöstrand ed Elfvin 1962 [15]), ma in ognuno di questi casi ha delle dimensioni definite, che non sono mai molto lontane dai 25 Å, e che non sembrano modificate da trattamenti sperimentali (Elfvin 1962 [35]). La costanza dello spazio tra i due strati densi sembra dovuta ai legami che si stabiliscono tra i componenti molecolari della membrana. Nei desmosomi del midollo spinale della rana questo spazio aumenta fino a circa 70 Å, e questo fa presumere che ci sia un notevole rimaneggiamento dell'architettura molecolare di questo tratto della membrana plasmatica.

Il secondo meccanismo di adesione osservato, cioè la fusione delle membrane plasmatiche di cellule vicine, in modo da formare una zona di unione a cinque strati, è stato descritto da vari Autori in molti tessuti (Karrer 1960 [4, 5]; Farquhar e Palade 1961 [6]; Muir e Peters 1962 [36]; Sjöstrand ed Elfvin 1962 [15]; Choi 1963 [27]). La fusione di membrane può avvenire anche nel sistema nervoso, ed è proprio qui che fu descritta per la prima volta (Robertson 1959, [3]) nella formazione della mielina da parte delle cellule di Schwann. Fusioni di membrane sono state descritte anche nel nervo ottico (Maturana 1960 [8]), nel ganglio dell'ottavo nervo cranico del carassio (Rosenbluth e Palay 1961 [11]), e tra cellule di glia della corteccia cerebrale (Gray 1961 [9]).

CONCLUSIONI.

Alle strutture di adesione intercellulare che sono state descritte può essere attribuita la funzione di mantenere la coesione delle cellule, qualora esse vengano sottoposte a sollecitazioni meccaniche (Maturana 1960 [8]). I desmosomi sono stati osservati in parti del sistema nervoso che sono soggette a deformazioni, come nel nervo ottico degli Anuri (Maturana 1960 [8]), nel midollo spinale della lampreda (Schultz, Bekowitz e Pease 1956 [7]) ed in quello della rana; sono stati però osservati anche tra le fibre muscolari della corteccia cerebellare (Gray 1961 [10]), cioè in una zona del tutto immobile, e quindi possono forse avere altre funzioni, oltre a quella di assicurare la coesione meccanica; lo stesso può dirsi per le fusioni di membrane adiacenti.

Una seconda funzione può essere quella di interrompere a tratti gli spazi extracellulari, in modo da impedire la diffusione passiva di sostanze attraverso di essi.

Per quanto lo spazio extracellulare del sistema nervoso sia estremamente ridotto, e sia formato da una organizzazione molecolare piuttosto rigida

(Horstmann 1959 [37]; Sjöstrand 1960 [32], 1962 [33]; Elfvin 1962 [35]; Villegas e Villegas 1963 [38]), attraverso di esso possono effettivamente diffondere sostanze che restano strettamente extracellulari (Lasansky e Wald 1962 [39]). Le fusioni di membrane, ed in minor grado i desmosomi, che sono meno estesi, rappresentano una barriera per la diffusione passiva e coadiuvano quindi la funzione di trasporto attivo, di regolazione degli scambi e di eventuale elaborazione delle sostanze trasportate, che viene esplicata dalle cellule di glia nei loro rapporti fisiologici con i neuroni.

Da quanto è stato descritto queste zone differenziate della membrana plasmatica mostrano un notevole rimaneggiamento della loro struttura molecolare fondamentale, per venire incontro alle necessità funzionali dell'insieme del tessuto.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] G. BIZZOZZERO, « Rend. r. Ist. Lomb. », 3, 675, (1870).
- [2] K. PORTER, « Anat. Rec. », 118, 433 (1954).
- [3] J. D. ROBERTSON, « Biochemical Society Symposia », 16, 3, Cambridge University Press (1959).
- [4] H. E. KARRER, « J. biophys. biochem. Cytol. », 7, 181 (1960).
- [5] H. E. KARRER, « J. biophys. biochem. Cytol. », 8, 135 (1960).
- [6] M. G. FARQUHAR e G. E. PALADE, *First Annual Meeting of the American Society for Cell Biology*, 57, Chicago (1961).
- [7] R. SCHULTZ, E. C. BERKOWITZ e D. C. PEASE, « J. Morphol. », 98, 251 (1956).
- [8] H. R. MATURANA, « J. biophys. biochem. Cytol. », 7, 107 (1960).
- [9] E. G. GRAY, in *Electron Microscopy in Anatomy*, 54, Edward Arnold Ltd. London (1961).
- [10] E. G. GRAY, « J. Anat. », 95, 345 (1961).
- [11] J. ROSENBLUTH e S. L. PALAY, « J. biophys. biochem. Cytol. », 9, 853, (1961).
- [12] G. MILLONIG, *Electron Microscopy*, 5th International Congress for Electron Microscopy, Ed. S. S. Breese, Academic Press, New York-London (1962).
- [13] M. J. KARNOVSKY, « J. biophys. biochem. Cytol. », 11, 729 (1961).
- [14] K. HAMA, « J. biophys. biochem. Cytol. », 6, 61 (1959).
- [15] F. S. SJÖSTRAND e L.-G. ELFVIN, « J. Ultrastructure Res. », 7, 504 (1962).
- [16] E. HORTSMANN e A. KNOOP, « Z. Zellforsch. », 47, 348 (1958).
- [17] G. ODLAND, « J. biophys. biochem. Cytol. », 4, 529 (1958).
- [18] R. G. HIBBS e W. H. CLARK, « J. biophys. biochem. Cytol. », 6, 71 (1959).
- [19] K. HAMA, « J. biophys. biochem. Cytol. », 7, 575 (1960).
- [20] D. W. FAWCETT, « Exp. Cell. Res. », Suppl. 8, 174 (1961).
- [21] M. A. JAKUS, in *The structure of the eye*, G. Smelser Ed., 343, Academic Press, New York (1961).
- [22] B. L. MUNGER, « J. biophys. biochem. Cytol. », 11, 385 (1961).
- [23] B. L. MUNGER e S. W. BRUSLOW, « J. biophys. biochem. Cytol. », 11, 403 (1961).
- [24] R. A. ELLIS e W. MONTAGNA, « J. biophys. biochem. Cytol. », 9, 238 (1961).
- [25] D. S. SMITH, « J. biophys. biochem. Cytol. », Suppl. 10, 123 (1961).
- [26] J. OVERTON, « Developmental Biology », 4, 532 (1962).
- [27] J. K. CHOI, « J. Cell Biol. », 16, 53 (1963).
- [28] B. L. MUNGER e S. I. ROTH, « J. Cell. Biol. », 16, 379 (1963).
- [29] R. L. TAPP, « J. Roy. Micr. Soc. », 81, 223 (1963).
- [30] R. L. WOOD, « J. biophys. biochem. Cytol. », 6, 343 (1959).
- [31] I. FRIEDMANN, « J. Ultrastructure Res. », 5, 44 (1961).

- [32] F. S. SJÖSTRAND, in *Modern Scientific Aspects of Neurology*, J. N. Cumings Ed., 188, Edward Arnold Ltd., London (1960).
- [33] F. S. SJÖSTRAND in: *The Interpretation of Ultrastructure*, Symposia of the International Society for Cell Biology, R. J. C. Harris Ed., 47, Academic Press, New York-London (1962).
- [34] J. B. FINEAN, *Chemical Ultrastructure in Living Tissues*, C. Thomas, Springfield, Ill. (1961).
- [35] L.-G. ELFVIN, « J. Ultrastructure Res. », 7, 1 (1962).
- [36] A. R. MUIR e A. PETERS, « J. Cell. Biol. », 12, 443 (1962).
- [37] E. HORSTMANN, « Anat. Anz. », Erg.-Heft zu Bd. 105, 100 (1959).
- [38] G. M. VILLEGAS e R. VILLEGAS, « J. Ultrastructure Res. », 8, 89 (1963).
- [39] A. LASANSKY e F. WALD, « J. Cell Biol. », 15, 463 (1962).

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Desmosoma tra due cellule di glia; la superficie citoplasmatica delle membrane cellulari è coperta da un materiale opaco, verso il quale convergono le gliofibrille. La freccia indica una zona di contatto a cinque strati ($\times 90.000$).
- Fig. 2. - Desmosoma; i due strati densi della membrana plasmatica si separano a livello del desmosoma e gli strati superficiali si portano a contatto ($\times 130.000$).
- Fig. 3. - Zona di fusione a cinque strati, tra le membrane plasmatiche di due cellule gliali vicine ($\times 130.000$).

