

La struttura microscopica del nucleo durante il riposo

Di CLAUDIO BARIGOZZI¹, Milano

Il nucleo cellulare in riposo, fissato e colorato, appare costituito – secondo la descrizione classica – da cromatina, nucleolo (in numero di uno o più) e succo nucleare, il tutto avvolto da una membrana. Lo scopo di questo articolo è di illustrare i principali problemi di struttura microscopica della cromatina e del nucleolo nella fase di riposo.

Il nome di cromatina viene attribuito a tutto ciò che – nell'interno del nucleo – si colora con sostanze basiche (come l'ematossilina, la safranina, ecc.) e col reattivo di Schiff per l'acido timonucleico, assumendo aspetto di filamento o di massa compatta. In questa sostanza si trovano molti componenti, oltre ai due acidi nucleici: la composizione chimica della cromatina però non sarà presa qui in considerazione.

Le vecchie tecniche, usando differenti fissativi (come l'acido osmico, l'acido picrico, ecc.), l'inclusione in paraffina e le sezioni microtomiche, forniscono una immagine del nucleo che generalmente viene definita «reticolo» di cromatina con filamenti e nodi, masse irregolari connesse a filamenti, oppure addirittura con una struttura alveolare: reticolo e alveoli possono anche coesistere (FLEMMING, 1879)².

Le prime ricerche sul nucleo in riposo, trovarono che – oltre la cromatina – compaiono dei filamenti associati ad essa, che si colorano solo con coloranti acidi. Questi filamenti furono primitivamente chiamati «acromatina», ma ricevettero pure il nome di linina ed altre denominazioni; secondo WILSON (1924) il termine di «plastina» sarebbe pure sinonimo dei primi due.

Linina e cromatina, osservate attentamente, dimostrarono ambedue una ulteriore struttura granulare. Il termine di acromatina fu poi abbandonato, e HEIDENHAIN introdusse una nuova denominazione (1890–1907): cromatina e plastina furono considerate varietà della stessa sostanza, differenziata in due forme una basofila (cromatina) ed una acidofila (plastina). La prima fu chiamata anche *basicromatina*, e la seconda *ossicromatina*. HEIDENHAIN credeva poi che esistesse ancora un altro elemento strutturale (acromatina) costituente un «enchilema», più o meno corrispondente al succo nucleare.

Accanto alla cromatina si riscontra una massa di sostanza acidofila, chiamata nucleolo o plasmosoma. Vi possono essere anche più di una di queste formazioni,

denominate altresì «veri nucleoli», per distinguerle dalle masse di cromatina compatta (WILSON¹), moderatamente chiamate «cromocentri».

Usando queste vecchie tecniche, lo stesso aspetto appariva con grande uniformità nei tessuti somatici e germinali delle più diverse specie, tanto che, fino a quando la tecnica non fu rinnovata, la sola eccezione degna di nota era rappresentata dai nuclei delle ghiandole salivari dei Ditteri, coi loro grossi filamenti a bande trasversali (BALBIANI, 1889).

Quando, nel 1924, fu introdotta la colorazione di Feulgen per la dimostrazione dell'acido timonucleico, fu possibile distinguere la cromatina dal nucleolo, e il nucleolo dai cromocentri: i nucleoli, infatti, sono privi di acido timonucleico e Feulgen-negativi, a differenza della cromatina che si colora intensamente. La distinzione fra basicromatina e ossicromatina non trovò più, invece, alcun nuovo sostegno.

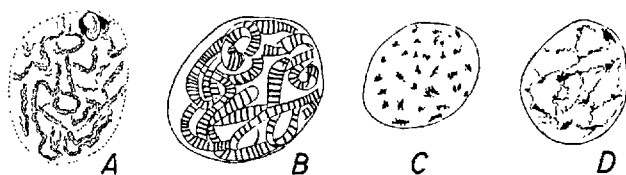


Fig. 1.^a – Differenti strutture di nuclei in riposo, trattati con lo schiacciamento: A nucleo filamentosso con due cromocentri associati al nucleolo; B nucleo salivare di Dittero; C nucleo con cromosomi contratti di Rincote; D nucleo con filamenti e zolle, come nel parenchima epatico di Anfibia.

Questo corpo di nozioni rimase pressochè invariato finchè fu introdotta la tecnica dello schiacciamento (*squash e smearing*, degli autori anglosassoni). Questo modo di preparare i nuclei elimina, come è noto, inclusione e affettatura, e permette di appiattire meccanicamente i nuclei stessi, liberati dal citoplasma mediante l'azione dell'acido acetico. È persino possibile rompere la membrana nucleare, e isolare i filamenti cromatici che vi sono raggomitolati. Mediante l'uso di vari coloranti, quali il carminio, l'orceina, la fucsina ridotta, ecc. (DARLINGTON e LA COUR²), con questa tecnica si sono realizzati grandi progressi nello studio della cromatina, che viene certo conservata in condizioni vicine a quelle del vivente. I principali risultati raggiunti in questo modo possono essere riassunti nei punti seguenti (vedi fig. 1):

¹ Istituto di Genetica, Università di Milano.

² Per una informazione generale sulla struttura del nucleo prima dell'uso dello schiacciamento, vedi E. B. WILSON, *The cell in development and heredity* (Macmillan Co., New York 1925).

¹ E. B. WILSON, *The cell in development and heredity* (Macmillan Co., New York 1925).

² C. D. DARLINGTON e L. F. LA COUR, *The handling of chromosomes* (Allen & Unwin, London 1947).

1° *I filamenti a bande trasversali dei nuclei salivari dei Ditteri sono veri cromosomi, in sinapsi permanente* (HEITZ e BAUER¹). Le dimensioni eccezionalmente cospicue di questi cromosomi, hanno permesso di conoscere la struttura, almeno nelle sue linee generali. La loro caratteristica più appariscente, le bande trasversali, risulta come l'effetto di molti granuli (cromomeri) alla stessa altezza, inquantochè appartenenti a un gran numero di filamenti elementari di uguale lunghezza e struttura, allineati e riuniti in fascio parallelo (BAUER, BAUER e CASPERSSON²). Per questo, tali nuclei – effettivamente poliploidi – sono chiamati «politénici». In alcuni Ditteri (per esempio nel genere *Drosophila*) la struttura a bande è limitata a una parte, detta *eucromatina*, e corrisponde agli allineamenti dei geni principali; il restante – che in *Drosophila melanogaster* corrisponde al cromosoma Y, a una larga parte dell'X e ai punti di attacco al fuso degli autosomi – è formato da cromomeri non allineati, che tendono ad attrarsi per formare un cromocentro o massa comune ai diversi cromosomi (*eterocromatina*). Fra le numerose osservazioni fatte su questi cromosomi, emergono quelle sugli anelli, occhielli, ecc. da mutazioni cromosomiche eterozigoti, che offrono le più valide prove per la localizzazione dei geni.

2° *La maggioranza dei nuclei capaci di dividersi presenta una cromatina filamentosa e un numero fisso (1-2 o poco più) di cromocentri avvicinati ciascuno a un nucleolo*. Questa osservazione ha mostrato che le strutture reticolari e alveolari sono frequentemente legate alla tecnica dell'inclusione. In nuclei poliploidi il numero dei cromocentri e dei nucleoli è più elevato, in relazione alla molteplicità degli assetti cromosomici presenti.

Una forma peculiare di cromosomi interfascici a filamento è il cosiddetto «lamp-brush chromosome», caratteristico degli ovociti di Anfibi e Pesci. Questo tipo di cromosoma si distingue per avere una serie numerosa di barbe sporgenti lateralmente da un sottile filamento assiale: questa struttura è tuttora di incerta interpretazione.

3° *Esistono nuclei con cromosomi in stato di contrazione permanente*. Questi cromosomi interfascici non si differenziano gran che dai cromosomi metafasici, e si riscontrano in cellule somatiche, spesso poliploidi e incapaci di dividersi, dei Rincoti (GEITLER³), dei Lepidotteri, dei Tricotteri e dei Crostacei (BARIGOZZI⁴).

4° *In tessuti che non si dividono mai, si trovano nuclei con struttura reticolare o a poche grosse masse*. Ciò prova che questo modo di presentarsi della cromatina non è solo e sempre dovuto al trattamento. Nuclei reticolati si osservano nelle cellule del parenchima epatico di Axolotl.

Un altro caso – ma ancora troppo poco noto – è quello dei macronuclei dei Ciliati, che appaiono compatti e formati da gran numero di cromomeri accostati (BARIGOZZI¹).

I nuclei in riposo sono stati anche studiati *in vivo*.

I nuclei salivari dei Ditteri mostrano la propria struttura con incostanza, anche se BAUER (1935 *op. cit.*) poté descrivere in ghiandole appena estratte di *Chironomus thummi* i più minuti particolari; in altri casi i nuclei appaiono omogenei (BARIGOZZI²). È possibile che la causa di questo comportamento sia da cercarsi in un differente grado di imbibizione d'acqua. La stessa causa è invocata da SINKE³ e da KUWADA⁴ per spiegare le trasformazioni strutturali osservabili in nuclei vivi di Pianta, che passano reversibilmente da uno stadio omogeneo (più idratato) ad uno eterogeneo (meno idratato), in cui si distingue un gomito di filamenti. RIS e MIRSKY⁵ hanno provato che, in cellule animali, il passaggio irreversibile da nucleo omogeneo a nucleo eterogeneo con cromosomi distaccati e visibili, può essere prodotto anche da azioni meccaniche.

Da tutti questi dati parrebbe di dover concludere che il nucleo vivo non lascia scorgere le parti che lo compongono, se non spesso nei nuclei salivari dei Ditteri, e si differenzia solo dopo essere stato sottoposto a variazioni del tenore d'acqua e ad azioni meccaniche. A queste vedute si oppongono le osservazioni di FELL e HUGHES⁶ su culture di tessuti di topo, osservate al contrasto di fase. Questi autori, infatti, vedono un numero vario ma elevato di cromocentri oltre a filamenti scarsamente colorabili nei preparati trattati colla reazione di Feulgen. È difficile conciliare queste osservazioni antitetiche. Forse si tratta di fatti entrambi accettabili, ma non generalizzabili.

Un nuovo passo importante nella conoscenza della struttura del nucleo è stato realizzato da MIRSKY e POLLISTER⁷, e da CLAUDE e POTTER⁸, colla preparazione dei «cromosomi isolati».

Le tecniche usate consistono nel dissolvere il citoplasma di cellule in riposo (elementi rossi del sangue, linfociti, cellule del fegato, ecc.), nell'isolare dapprima, centrifugando, i nuclei nudi, nel romperne con mezzi meccanici la membrana, e nel separarne infine la cromatina, sempre mediante la centrifugazione. Il centrifugato appare costituito da filamenti isolati Feulgen-positivi, talvolta uniti a un nucleolo. Questi filamenti presentano i caratteri seguenti:

a) forma di bastoncino, più o meno lungo, spaccato

¹ C. BARIGOZZI, Boll. Soc. it. Biol. sperim. 25, 753 (1950).

² C. BARIGOZZI, Verh. V. int. Zellforscherkongr., Zurich, 190 (1938).

³ N. SINKE, Mem. Coll. Science, Kyoto Imp. Univ. B, 15, 1 (1939).

⁴ Y. KUWADA, Cytologia, Fujii Jub. Vol., 389 (1939).

⁵ H. RIS e A. E. MIRSKY, J. Gen. Physiology 32, 489 (1949).

⁶ H. B. FELL e A. F. HUGHES, Quart. J. Micr. Sci. 90, 355 (1949).

⁷ A. E. MIRSKY e A. W. POLLISTER, Proc. Nat. Acad. Sci. 28, 344 (1942).

⁸ A. CLAUDE e J. S. POTTER, J. exp. Med. 77, 345 (1943).

¹ E. HEITZ e H. BAUER, Z. Zellforsch. 17, 67 (1933).

² H. BAUER, Z. Zellforsch. 23, 280 (1935). – H. BAUER e T. CASPERSSON, Proc. VIIIth Int. Congr. Genetics, 533 (1949).

³ L. GEITLER, Chromosoma 1, 1 (1939).

⁴ C. BARIGOZZI, Arch. it. Anat. Embr. 52, 83 (1947); Pubbl. Staz. Zool. Napoli, Suppl. 21, 228 (1949).

longitudinalmente in due cromatidi, e spesso con una strozzatura (RIS e MIRSKY¹, POLLI², fig. 2);

b) reazione di Feulgen positiva (PFEIFFER³, POLLI, *op. cit.*) per tutto l'asse del filamento, che talvolta si differenzia in porzioni più o meno colorabili. Questi filamenti prendono anche le comuni sostanze coloranti e sono nettamente visibili a fresco col microscopio a contrasto di fase (POLLI, *op. cit.*);

c) i due cromatidi, visti col microscopio elettronico, appaiono ciascuno avvolto a spirale (YASUZUMI⁴, YASUZUMI *et al.*⁵).

Due autori hanno criticato queste asserzioni: LAMB⁶, che tentò di dimostrare che i cosiddetti «cromosomi isolati» sono frammenti e detriti di strutture cromatiniche rotte, e YASUZUMI⁴ che nega una vera Feulgen-positività per questi cromosomi, che egli chiama «metabolici». Però, questi con alcuni collaboratori, corresse ulteriormente il proprio punto di vista⁵, e affermò che la reazione di Feulgen è in realtà sempre positiva.

La critica di LAMB è stata controbattuta efficacemente da RIS e MIRSKY (*op. cit.*) e da POLLI (*op. cit.*). I primi portano nuovi elementi in favore della natura cromosomica dei filamenti isolati (vedi sopra). POLLI, invece, dimostra la somiglianza fra i cromosomi isolati e i cromosomi metafasici della stessa specie zoologica, e le differenze – invece – fra cromosomi isolati di specie che differiscono per i cromosomi metafasici (pollo, piccione, tartaruga, lucertola, carpa, trota).

Si può concludere in generale che i cromosomi isolati sono veri cromosomi, non alterati significativamente dal procedimento usato per isolarli.

È vero che fra di essi si osservano degli artefatti,

come ammassamenti di cromosomi e stiramento per il lungo di nuclei interi: queste forme si possono – però – distinguere facilmente dai primi.

Con queste premesse è possibile comparare i filamenti interfascici dei nuclei schiacciati e i cromosomi isolati. I primi sono generalmente sottili e sinuosi, con alcune eccezioni, come i cromosomi salivari dei Ditteri e quelli compatti dei Rincoti; i secondi sono rigidi, dritti, lisci, di spessore non molto inferiore a quello dei cromosomi metafasici.

Si tratta, allora, di scegliere quale aspetto ha maggior probabilità di corrispondere alla condizione del vivente. Bisogna accettare come fedeli alle condizioni viventi i cromosomi contratti dei Rincoti, ecc. e quelli giganti dei Ditteri, per i quali ultimi non solo il controllo *in vivo* è particolarmente chiarificatore, ma anche l'osservazione delle mutazioni cromosomiche eterozigoti.

Per i nuclei filamentosi e a zolle è difficile oggi, invece, dare una risposta, perchè bisogna riconoscere che, se la tecnica dello schiacciamento è assai drastica, non lo è meno quella dell'isolamento. Argomenti di indubbia validità, atti a far ritenere più attendibile la struttura dei cromosomi isolati sono desumibili dalle ricerche di RIS e MIRSKY (*op. cit.*) e di POLLI (*op. cit.*). I primi due autori affermano che siccome il nucleo in riposo vivente non mostra strutture filiformi, gli elementi strutturali più adatti a realizzare questa condizione sono i cromosomi isolati, spessi, e in grado di riempire senza lacune l'intera cavità nucleare; è però difficile affermare che le lacune riempite dal succo nucleare siano in ogni caso degli artefatti. POLLI, avendo lavorato su cromosomi particolarmente grandi, ha riscontrato – come si è detto – notevoli somiglianze coi cromosomi metafasici della stessa specie zoologica dalla quale i cromosomi erano stati isolati. Perciò, in complesso, i filamenti sottili (cromonemi) sembrano essere immagini equivalenti a una condizione che, *in*

- ¹ H. RIS e A. E. MIRSKY, *Experim. Cell Research* 2, 263 (1951).
² E. POLLI, *The isolated chromosomes from erythrocytes of various species of Vertebrates*, *Chromosoma* (in stampa).
³ H. H. PFEIFFER, *Exper.* 9, 334 (1950).
⁴ G. YASUZUMI, *Chromosoma* 4, 222 (1951).
⁵ G. YASUZUMI *et al.*, *Chromosoma* 4, 359 (1951).
⁶ W. G. P. LAMB, *Exp. Cell Research* 1, 571 (1950).

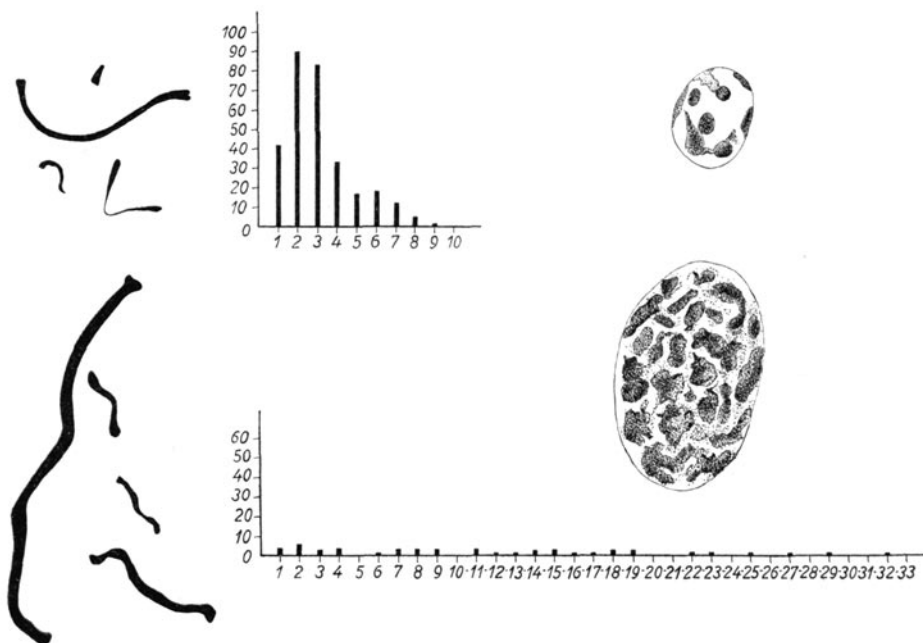


Fig. 2.A. -- Cromosomi isolati e struttura del nucleo di eritrociti nel pollo (in alto) e nell'Axolotl (in basso). -- A sinistra: alcuni elementi tipici fra i cromosomi isolati dagli eritrociti. Al centro: distribuzione delle lunghezze in μ di un campione di cromosomi isolati (si noti la maggiore dispersione nell'Axolotl). -- A destra: struttura del nucleo intero di eritrocita schiacciato e colorato al carminio acetico. Si noti che nell'Axolotl la cromatina riempie quasi del tutto il nucleo, mentre nel pollo essa appare ammassata in poche grandi zolle (da POLLI, *op. cit.*).

vivo, si avvicina probabilmente di più a quella dei cromosomi isolati: questo stato di cose, però, vale per le specie i cui cromosomi sono stati isolati. Restano moltissimi organismi tuttora inesplorati sotto questo punto di vista, ai quali non si sa se le stesse vedute siano generalizzabili. Un punto importante, ad esempio, che non si chiarisce, riducendo tutto il contenuto del nucleo ai soli cromosomi isolati, concerne i cromocentri. Nel genere *Drosophila* questi hanno un aspetto insieme citologicamente e geneticamente tipico (cioè rappresentano ammassi di cromatina compatta, quasi priva di geni principali, e vengono detti eterocromatici); in altri casi sussiste il criterio citologico, anche se con maggiori incertezze nell'attribuirvi il significato genetico ora ricordato. In alcuni esempi, però (anche fuori delle drosofile), sembra impossibile poter negare che il cromocentro o i cromocentri esistano anche *in vivo*, e non si contrappongano strutturalmente e morfologicamente ai cromosomi isolati. La relazione tra questi ultimi e i cromocentri, come pure una più esatta analisi dei caratteri differenziali fra cromosomi interfascici e mitotici, rappresentano i due più importanti obbiettivi della ricerca microscopica sulla cromatina; e quest'ultimo non solo per chiarire fino a che punto sia valido il concetto di despiralizzazione nell'interfase e spiralizzazione

nella mitosi, ma anche per stabilire la lunghezza effettiva dei cromosomi interfascici, cioè dei cromosomi durante la fase di attività genica. Molti aspetti della evoluzione degli assetti cromosomici potranno, infatti, essere chiariti da confronti fra la lunghezza dei cromosomi interfascici isolati di specie affini.

Summary

The author describes the consecutive steps in the investigation of the resting nucleus, and distinguishes a first approach using embedding and microtome technique, a second stage based on the preparation of smearings or squashes, and, thirdly, the isolation of chromatic threads (isolated chromosomes). The squash or smearing method reveals a number of different structures in different cell types and systematic species.

The question of the reliability of these structures is discussed with the following conclusions: no general model of the resting nucleus is available at the present time. In the material studied up to now with the technique of the chromosome isolation, the smeared nuclei seem to show structures which are useful for many purposes but not identical with the living structures, which are probably more closely related to the isolated chromosomes.

The isolated chromosomes, as compared with the mitotic ones, can provide new information on the spiraling cycle, and on the length of the threads during the stage of genic activity.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Les théorèmes de Laplace sur les perturbations séculaires dans les éléments vectoriels des orbites planétaires

En utilisant les deux vecteurs

$$\begin{aligned}\mathfrak{C} &= [\mathbf{r} \mathbf{v}], & \mu &= f(M+m), \\ \mathfrak{D} &= [\mathbf{v} \mathfrak{C}] - \frac{\mu}{r} \mathbf{r} & |\mathfrak{C}| &= C; |\mathfrak{D}| = D; |\mathbf{r}| = r\end{aligned}\quad (1)$$

définissant dans le problème des deux corps un vecteur des aires \mathfrak{C} et un autre \mathfrak{D} situé dans le grand axe a avec le module $D = \mu e$, M. MILANKOVITCH¹ a traduit les équations de la mécanique céleste dans le langage du calcul vectoriel. Pour éviter les moyens de la théorie des perturbations, W. LENZ² avait déjà introduit ailleurs le «vecteur de l'axe» \mathfrak{D} dans le calcul des perturbations de l'électron d'hydrogène selon la théorie des quanta de BOHR.

En remplaçant par les deux vecteurs \mathfrak{C} , \mathfrak{D} les variables canoniques de la mécanique céleste

$$h = e \sin \pi, \quad l = e \cos \pi; \quad p = \operatorname{tg} i \sin \Omega, \quad q = \operatorname{tg} i \cos \Omega,$$

on peut obtenir des valeurs aussi simples pour les expressions

$$\langle C_i C_j \rangle = \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial C_i} \cdot \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial C_j} - \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial C_j} \cdot \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial C_i} \quad (D_1 = C_4, D_2 = C_5, D_3 = C_6)$$

indépendantes du temps, nommées «les crochets de Lagrange» des éléments canoniques, quoique les vecteurs fondamentaux eux-mêmes compliqués dépendent des nouveaux «vecteurs canoniques» \mathfrak{C} , \mathfrak{D} , c'est-à-dire

$$\begin{aligned}\mathbf{r} &= \frac{C^2}{\mu^2 - D^2} \cdot \frac{\mu \cos u - D}{D} \mathfrak{D} + \frac{C \sin u}{D \sqrt{\mu^2 - D^2}} [\mathfrak{C} \mathfrak{D}], \\ \mathbf{v} &= - \frac{\mu \sqrt{\mu^2 - D^2}}{C D} \cdot \frac{\sin u}{\mu - D \cos u} \mathfrak{D} \\ &\quad + \frac{\mu^2 - D^2}{C^2 D} \cdot \frac{\cos u}{\mu - D \cos u} [\mathfrak{C} \mathfrak{D}].\end{aligned}$$

Les 2 · 3 composantes des vecteurs \mathfrak{C} , \mathfrak{D} correspondent

¹ M. MILANKOVITCH, Bull. Acad. Sci. math. nat., Belgrade (1939).

² W. LENZ, Z. Physik 24, 197 (1924).