

56. Nora FRONTALI e G. TOSCHI. — Frazioni subcellulari del tessuto elettrico di *Torpedo*. Aspetto morfologico e distribuzione della colinesterasi. (*)

Riassunto. — Omogenati di tessuto elettrico di *Torpedo ocellata* in saccarosio 0,25 M sono stati frazionati mediante centrifugazione differenziale. Le frazioni sono state esaminate al microscopio elettronico e confrontate col tessuto intatto. Quest'ultimo mostra un sistema continuo di tubuli e vescicole, formato da sottili membrane citoplasmatiche, sotto la membrana cellulare esterna, lungo la faccia dorsale della elettroplacca. Larghi frammenti di questo sistema di membrane, sotto forma di ammassi di vescicole rotondeggianti, sono il principale costituente di una frazione (A), che sedimenta a $800 \times g$ e contiene anche i nuclei. I mitocondri, insieme con una notevole quantità di vescicole, si raccolgono in una frazione (B), che sedimenta fra 800 e $3000 \times g$. La frazione C, che sedimenta fra 3000 e $105.000 \times g$, contiene un gran numero di vescicole libere, accompagnate da piccole particelle dense. Nelle singole frazioni si è determinato il contenuto in proteine e l'attività della colinesterasi. La maggior parte dell'attività colinesterasica si raccoglie nella frazione A, che dimostra anche la più elevata attività specifica. In ordine decrescente seguono la frazione « microsomiale » C, la frazione « mitocondriale » B e il supernatante finale.

Résumé. — Des homogénats de tissu électrique de *Torpedo ocellata* en saccharose 0,25 M ont été fractionnés avec centrifugation différentielle.

Les fractions ont été examinées au microscope électronique et comparées avec le tissu intact. Celui-ci présente un système continué de tubules et de vésicules, qui est formé de minces membranes cytoplasmiques, sous la membrane cellulaire externe, près de la surface dorsale de la plaque électrique. De larges fragments de ce système de membranes, sous la forme d'un amas de vésicules presque rondes, sont les principaux constituants d'une fraction (A), qui forme un sédiment à $800 \times g$ et qui contient aussi les noyaux. Les mytochondries, avec une grande quantité de vésicules, se réunissent dans une fraction (B), qui forme un sédiment entre 800 et $3.000 \times g$; la fraction C, qui forme un sédiment entre 3.000 et $105.000 \times g$, contient un grand nombre de vésicules libres, qui s'accompagnent avec de petites parcelles denses.

(*) Desideriamo ringraziare sentitamente la Prof.ssa D. BOCCIARELLI e i suoi Collaboratori per le osservazioni al microscopio elettronico, eseguite nel Lab. di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità.

On a déterminé le contenu en protéines et l'activité de la cholinestérase dans chacune des fractions. La plus grande partie de l'activité cholinestérasique se réunit dans la fraction A, qui a aussi l'activité spécifique la plus élevée. En ordre décroissant, on a la fraction « microsomiale » C, la fraction « mitochondriale » B et le supernatant final.

Summary. — Homogenates of electric tissue of *Torpedo ocellata* were prepared in 0.25 M sucrose and fractionated by differential centrifugation. The subcellular fractions were examined by electron microscopy and compared with the intact tissue. The latter showed a continuous system of vesicles and tubules, formed by thin cytoplasmic membranes, beneath the outer cell membrane, mainly at the dorsal face of the electroplates. Large fragments of the membrane system, forming clumps of rounded vesicles, were the main component of a fraction (A), sedimenting at $800 \times g$ and containing also nuclei. Mitochondria, together with a considerable amount of vesicles, were recovered in a fraction (B) sedimenting between 800 and $3.000 \times g$. Small free vesicles together with some small particles were recovered in a fraction (C) sedimenting between 3.000 and $150.000 \times g$. Protein and cholinesterase content were determined in the different fractions. Both the highest recovery of cholinesterase and the highest specific activity on protein basis were found in fraction A. In decreasing order for specific activity followed the « microsomal » fraction C, the « mitochondrial » fraction B, and the final supernatant.

Zusammenfassung. — Homogenate von elektrischem Gewebe von *Torpedo ocellata* in 0,25 M Saccharoselösung wurden durch differentielle Zentrifugierung fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen wurden am Elektronenmikroskop untersucht und mit unzerstörtem Gewebe verglichen. Dieses weist unter der äusseren Zellmembrane längs der dorsalen Seiten der Elektroplatte ein kontinuierliches, aus dünnen zytoplasmatischen Membranen gebildetes, Röhren und Bläschensystem. Grosse Bruchstücke dieses Membranensystems in Form von rundlichen Bläschenansammlungen sind der Hauptbestandteil der Fraktion (A) die bei $800 g$ sedimentiert; diese enthält auch die Kerne. Die Fraktion (B) 800 bis $3000 g$ enthält die Mitochondrien und eine grosse Anzahl von Bläschen. Die Fraktion (C) 3000 bis $105.000 g$ enthält zahlreiche von kleinen dichten Partikeln begleitete freie Bläschen. Der Proteingehalt und die Cholinesteraseaktivität der einzelnen Fraktionen wurde ermittelt. Die höchste

Aktivität wurde in der Fraktion A die auch die höchste spezifische Wirksamkeit aufwies festgestellt. Es folgen der Grösse nach die « mikroskopische » Fraktion C, die « mitochondrische » Fraktion B und endlich die restliche klare Lösung.

In una precedente ricerca sulle proteine del tessuto elettrico di *Torpedo*, esaminate con metodi elettroforetici ⁽¹⁾ abbiamo messo in evidenza l'associazione di un componente di grande interesse fisiologico, la colinesterasi, con determinati costituenti proteici e lipoproteici del tessuto. I risultati di questo studio ci hanno condotto ad investigare l'associazione dell'enzima con gli elementi strutturali del tessuto elettrico, frazionando questi ultimi con mezzi appropriati, ed esaminandoli sia sotto l'aspetto morfologico, sia sotto l'aspetto enzimatico.

La localizzazione citologica della colinesterasi è un elemento importante per comprendere il meccanismo dell'attività fisiologica di questo enzima nel tessuto nervoso, elettrico e muscolare. Il tessuto elettrico di *Torpedo* è particolarmente adatto per tale studio: esso presenta infatti una struttura istologica omogenea, altamente specializzata per l'elettrogenesi, ed un elevatissimo contenuto in colinesterasi. Uno studio istochimico eseguito da COUCEIRO e coll. ⁽²⁾ sull'organo elettrico di *Electrophorus electricus*, ha mostrato che l'enzima è concentrato sulla faccia caudale dell'elettroplacca, dove si osserva anche la presenza delle terminazioni nervose e dei fenomeni di elettrogenesi. Per i limiti inerenti alla metodica istochimica, questo studio ha lasciata aperta la questione della presenza di colinesterasi in altre parti della elettroplacca, e soprattutto della sua localizzazione su strutture cellulari ben definite. Tale localizzazione è resa possibile dall'impiego di procedimenti di centrifugazione differenziale per la separazione delle diverse strutture cellulari. Seguendo un tale indirizzo sperimentale, uno di noi ha potuto esaminare la localizzazione citologica della colinesterasi del tessuto nervoso ^(3, 4).

Nel presente lavoro si sono preparate diverse frazioni subcellulari da omogenati di tessuto elettrico di *Torpedo* mediante un opportuno procedimento di centrifugazione differenziale. Tali frazioni sono state esaminate mediante il microscopio ottico ed elettronico, e se ne è valutata l'attività colinesterasica. Le strutture cellulari che si separano nelle diverse frazioni possono essere identificate in base all'aspetto microscopico e submicroscopico con le corrispondenti strutture del tessuto intatto.

METODI E MATERIALI

Esemplari vivi di *Torpedo ocellata* venivano rapidamente periusi con soluzione salina per Selaci ⁽⁵⁾ fredda, onde rimuovere il sangue dagli organi elettrici, che venivano immediatamente prelevati. Tutte le operazioni seguenti venivano eseguite in camera fredda (da 0 a +4°).

Il tessuto elettrico veniva finemente triturato con un « Latapie mincer », e una quantità pesata veniva quindi omogenizzata con 10 parti (peso/volume) di saccarosio 0,25 M (ovvero 0,88 M) freddo, in un omogenizzatore tipo Elvehjem-Potter in vetro liscio con pistone in « Teflon ».

L'omogenato veniva centrifugato a 0°, alle velocità più sotto indicate, mediante la centrifuga refrigerata International (Mod. P-R₂) e la centrifuga preparativa « Spinco » (Mod. L, rotore n. 40). I sedimenti ottenuti venivano risospesi in un volume noto di saccarosio e queste sospensioni venivano usate sia per lo studio morfologico, sia per la determinazione del contenuto in proteine e dell'attività colinesterasica.

STUDIO MORFOLOGICO.

Campioni di tessuto intatto si ottenevano infiltrando direttamente l'organo, nell'animale vivo, con OsO₄ 1% in soluzione salina, fredda, e prelevando immediatamente un sottile frammento dalla zona annerita, che si lasciava 1-2 ore nello stesso fissativo, a 0°.

Per le diverse frazioni si prelevava un piccolo volume della rispettiva sospensione, che veniva centrifugato a 105.000 x g. Il sedimento ottenuto si ricopriva di OsO₄ 1% in saccarosio e si tagliava in pezzi sottili che si lasciavano nel fissativo 1-2 ore a 0°. Dopo la fissazione e il lavaggio i pezzi venivano inclusi parte in paraffina, e parte in metacrilato di butile, che veniva polimerizzato a 70° ⁽⁶⁾. Le sezioni ottenute dai pezzi inclusi in paraffina, colorate con ematossilina-eosina o con il metodo di Mallory per le fibre connettivali e con il metodo di Altmann per i mitocondri, venivano quindi esaminate al microscopio ottico. Sezioni « ultrasottili » (circa 20 mμ di spessore), ottenute con un microtomo Porter-Blum dai pezzi inclusi in metacrilato, erano esaminate al microscopio elettronico (modello dell'Istituto Superiore di Sanità) ⁽⁷⁾. Le microfotografie elettroniche sono state prese ad un ingrandimento diretto di 4000 x ovvero di 9000 x (lineare), da cui si sono ottenuti gli ingrandimenti fotografici rispettivamente di 8000 x e di 18.000 x, indicati nelle illustrazioni.

ATTIVITÀ COLINESTERASICA.

Si è determinata manometricamente al Warburg, secondo il metodo di AMMON ⁽⁸⁾, a 35°, in un mezzo contenente NaCl 0,115 M, MgCl₂ 0,001 M, NaHCO₃ 0,033 M, acetilcolina ioduro 0,02 M. Volume finale ml 2.2.

PROTEINE.

Si sono determinate secondo il metodo di Lowry e coll. ⁽⁹⁾, usando una curva di riferimento preparata con sieroalbumina.

RISULTATI

SEPARAZIONE DELLE FRAZIONI SUBCELLULARI. ESAME MORFOLOGICO E CONFRONTO COL TESSUTO INTATTO.

La Fig. 1 mostra l'aspetto al microscopio ottico del tessuto elettrico di torpedine da noi esaminato. I singoli elementi cellulari disposti in serie (« elettroplacche ») contengono nuclei e mitocondri. E' possibile inoltre riconoscere lo strato di fini bastoncelli, al limite della visibilità, allineati sotto l'« elettrolemma », lungo la faccia dorsale dell'elettroplacca, come descritto da BALLOWITZ ⁽¹⁰⁾ e da LUFT ⁽¹¹⁾. L'esame al microscopio elettronico (Figg. 4 e 5) permette di riconoscere nuclei e mitocondri (questi ultimi notevolmente rigonfiati) e inoltre un sistema di tubuli e di vescicole, formati da sottili membrane, che è disposto prevalentemente lungo la faccia dorsale dell'elettroplacca e si estende in profondità nel citoplasma. Sulla faccia ventrale della elettroplacca si osservano invece delle ampie e singole invaginazioni dell'elettrolemma.

Per mettere a punto un procedimento di centrifugazione differenziale idoneo a separare gli elementi subcellulari della elettroplacca, si è eseguita una serie di esperimenti preliminari, variando le condizioni di centrifugazione (tempo e velocità) e la concentrazione del saccarosio nel mezzo, fino a ottenere delle frazioni il più possibile omogenee dal punto di vista morfologico. A conclusione di questi esperimenti si sono adottate le modalità di centrifugazione sotto indicate, in un mezzo contenente saccarosio 0,25 M.

L'omogenato si centrifuga per 15 min a 800 x g, il sedimento ottenuto si risospende e si ricentrifuga nello stesso modo. Si ottiene così un sedimento, la frazione A, il cui aspetto al microscopio ottico è illustrato in fig. 2. Si riconoscono alcuni nuclei e numerose membrane di notevole

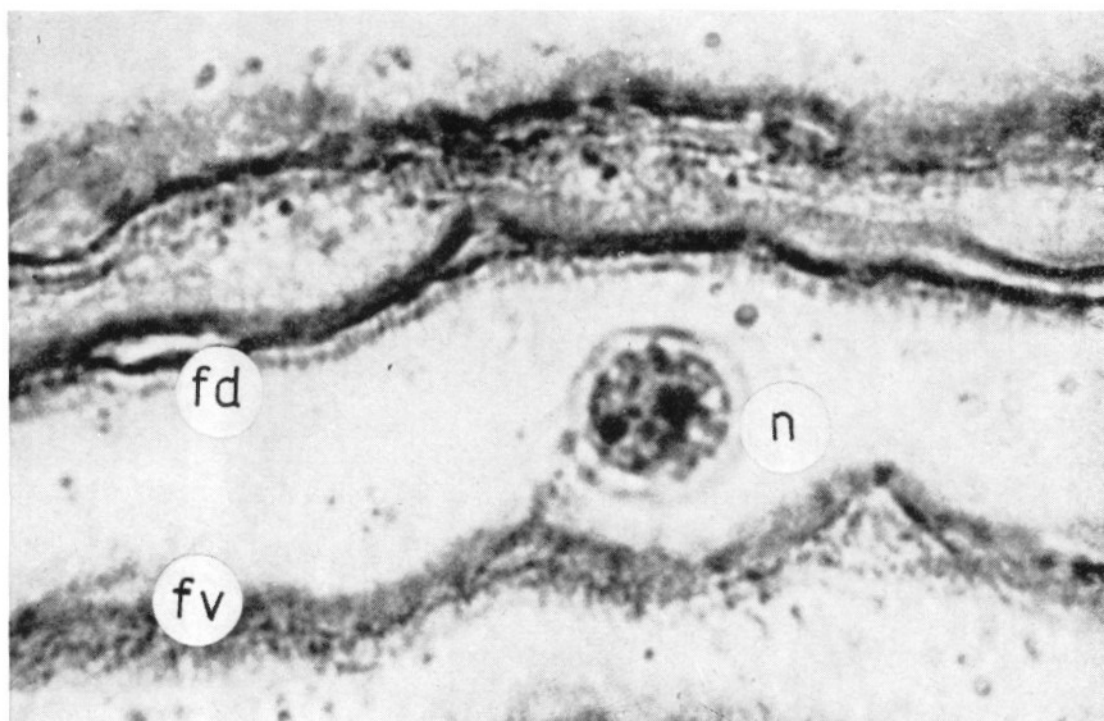


Fig. 1 - Sezione di tessuto elettrico di *Torpedo ocellata*. Fissazione in acido osmico e inclusione in paraffina. Colorazione con metodo di Altmann per i mitocondri. Nella elettroplacca al centro del campo sono visibili: un nucleo (n); diversi mitocondri; uno strato di fini bastoncelli al limite della visibilità, allineati sotto l'elettrolemma lungo la faccia dorsale dell'elettroplacca (fd).

Ingrandimento: 1.700 x.

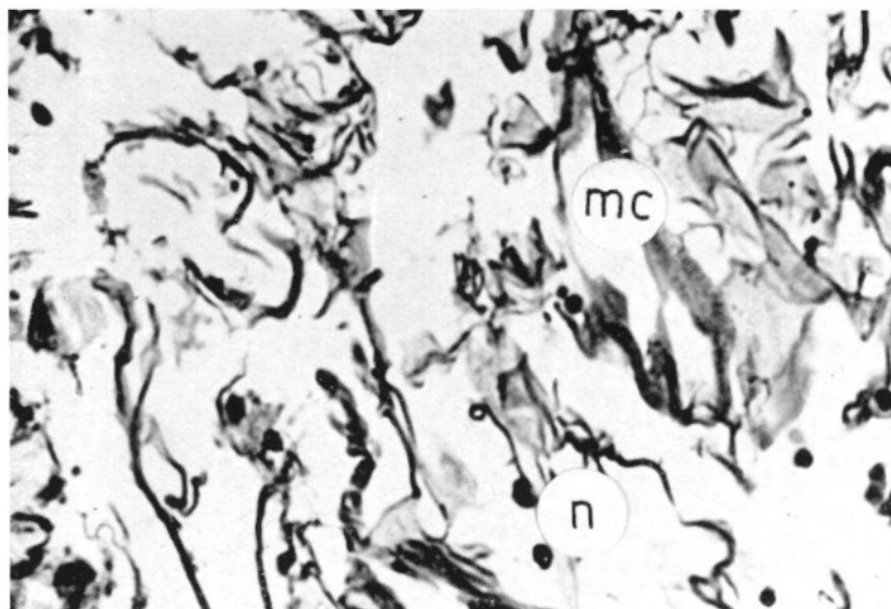


Fig. 2 - Frazione A (sedimento ottenuto da un omogenato di tessuto elettrico in saccarosio 0,25 M, centrifugando a $800 \times g$ per 15 min.). Fissazione, inclusione e sezione come in Fig. 1. Colorazione con ematossilina-eosina. Sono visibili alcuni nuclei (n) e numerose membrane di notevole densità e spessore, sezionate parte normalmente e parte tangenzialmente: si tratta verosimilmente di larghi frammenti dell'elettrolemma e del sistema di membrane citoplasmiche.

Ingrandimento: $450 \times$.

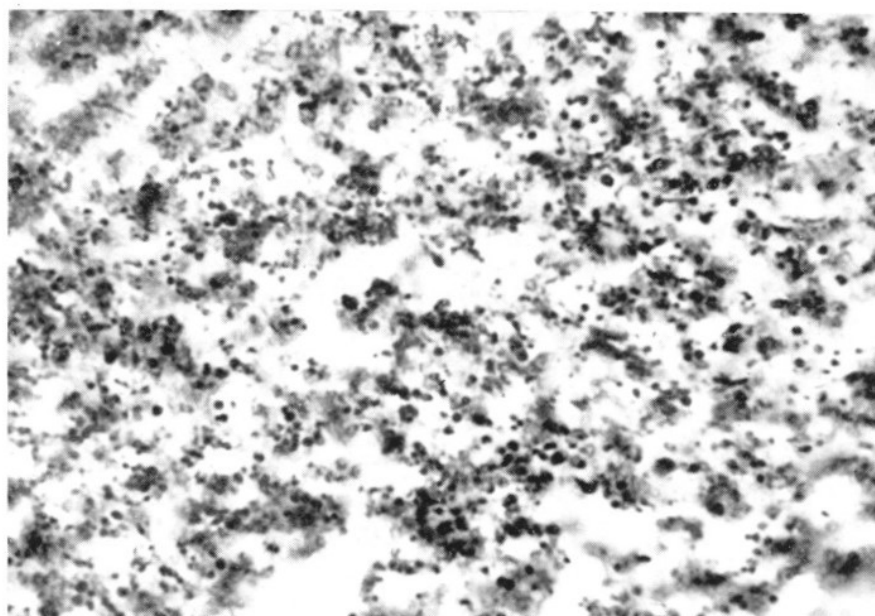


Fig. 3 - Frazione B (sedimento ottenuto centrifugando a $3.000 \times g$ per 15 min. il supernatante della frazione A). Fissazione, inclusione, sezione e colorazione come in Fig. 1. Il campo è tutto occupato da mitocondri, colorati in rosso brillante di Altmann. Ingrandimento: $850 \times$.

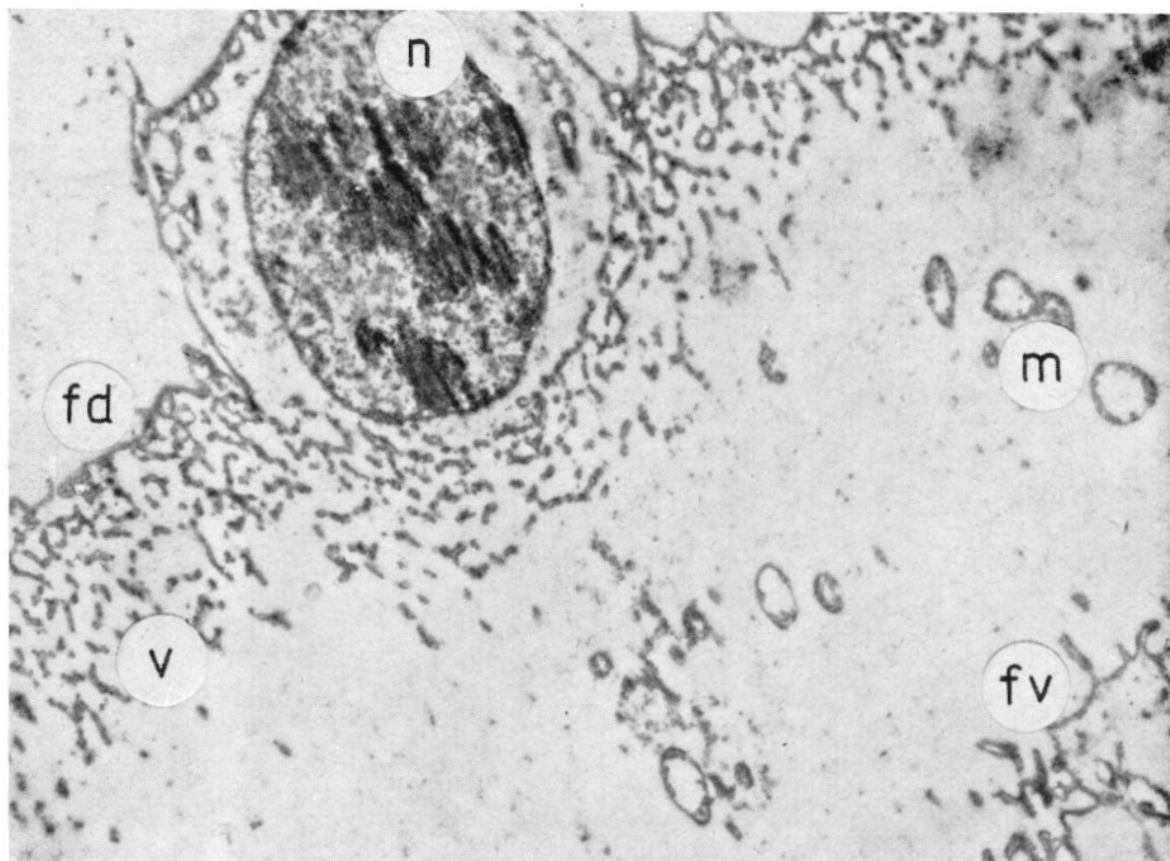


Fig. 4

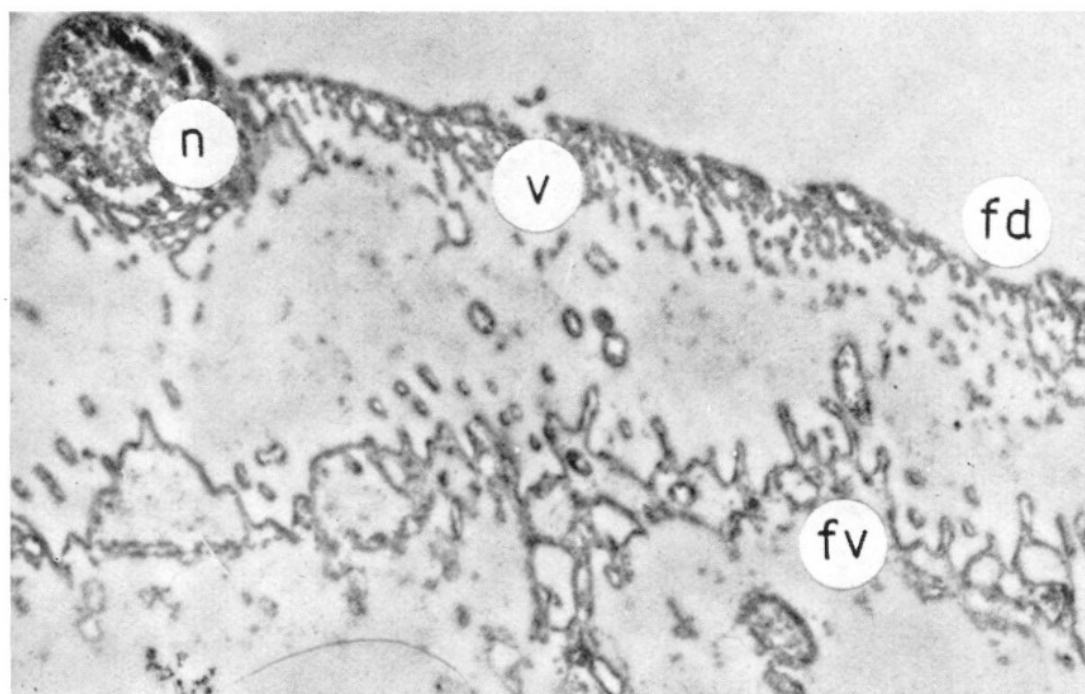


Fig. 5

Fig. 4 e 5 - Sezione « ultrasottile » di tessuto elettrico di *Torpedo ocellata*. Fissazione in acido osmico e inclusione in butil-metacrilato. Microfotografia elettronica. E' visibile l'intero spessore di una elettroplacca, con un nucleo (n), alcuni mitocondri notevolmente rigonfiati (m) e un sistema di tubuli e vescicole (v) formato da sottili membrane e disposto lungo la faccia dorsale della elettroplacca (fd). Sull'altra faccia (fv) si osservano ampie invaginazioni della membrana cellulare esterna. Ingrandimento: 8.000 $\times$.

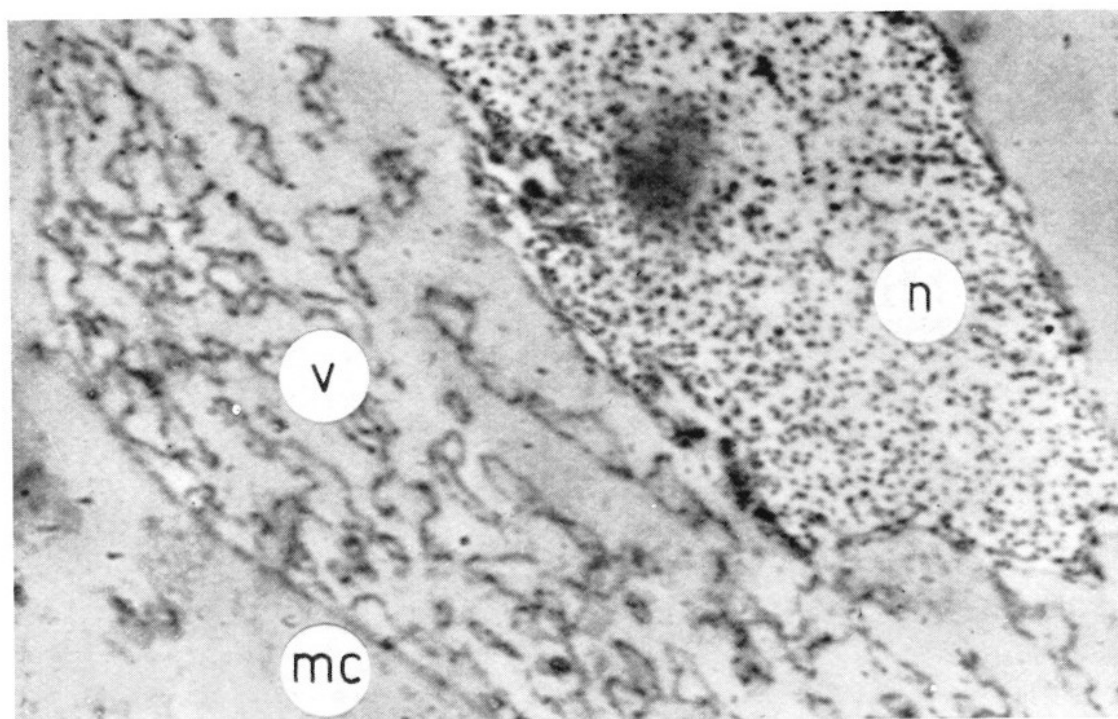


Fig. 6 - Frazione A. Fissazione, inclusione e sezione come in Fig. 4 Microfotografia elettronica. Si riconoscono: un nucleo (n) e un largo frammento del sistema di tubuli e vescicole (v), apparentemente attaccato a un tratto di membrana cellulare esterna (mc). Ingrandimento: 18.000 $\times$.

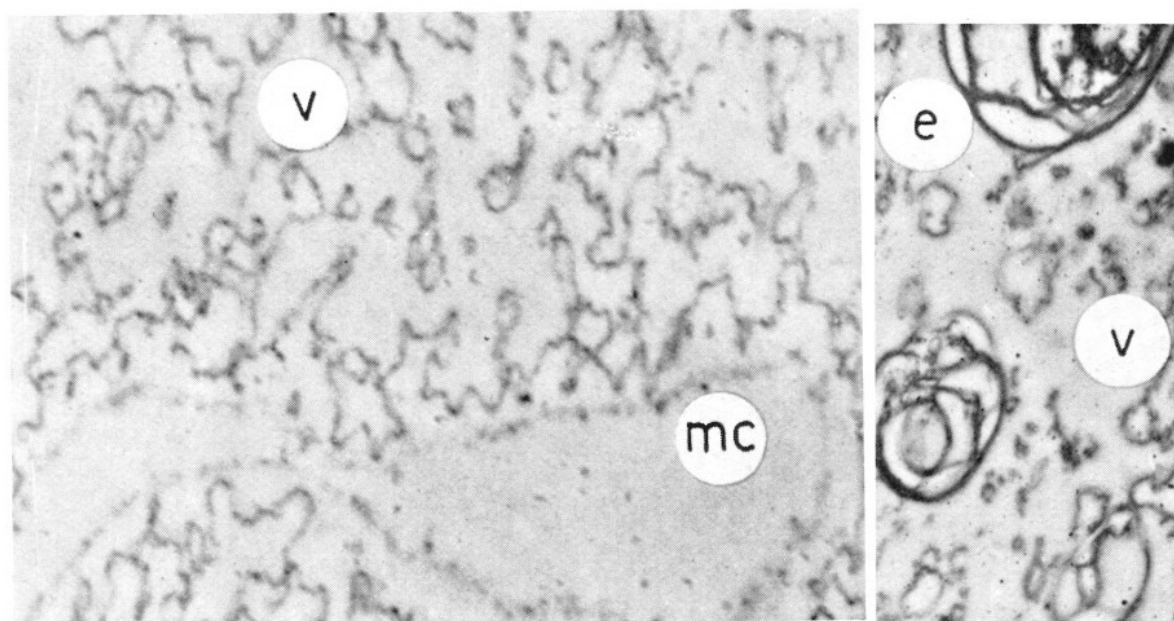


Fig. 7 - Vedi Fig. 6. Altra sezione. Sono visibili le sottili membrane che formano il sistema di tubuli e vescicole (v), ancora associate con un trattamento di membrana cellulare esterna (mc). Ingrandimento: 18.000 $\times$.

Fig. 8 - Vedi Fig. 6. Altra sezione. Oltre alle sottili membrane (v) sono visibili membrane più spesse e dense, in grossi frammenti accartocciati, verosimilmente formati dalla membrana basale dell'elettrolemma (e). Ingrandimento: 18.000 $\times$.

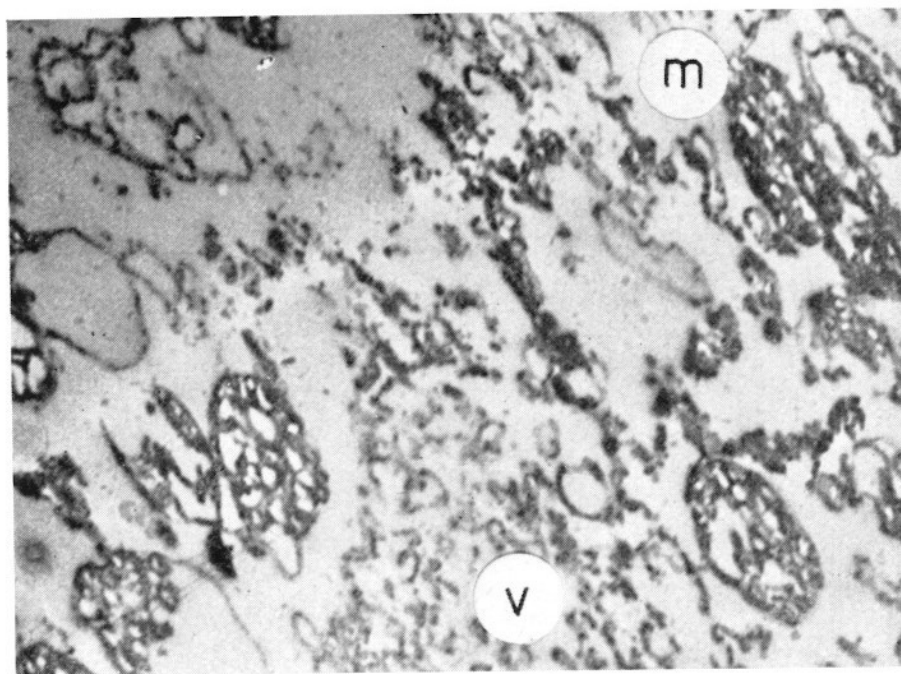


Fig. 9 - Frazione B. Procedimento come in Fig. 6. Si riconoscono alcuni mitocondri (m), che appaiono notevolmente rigonfiati, e alcune vescicole (v).
Ingrandimento: 18.000 $\times$.

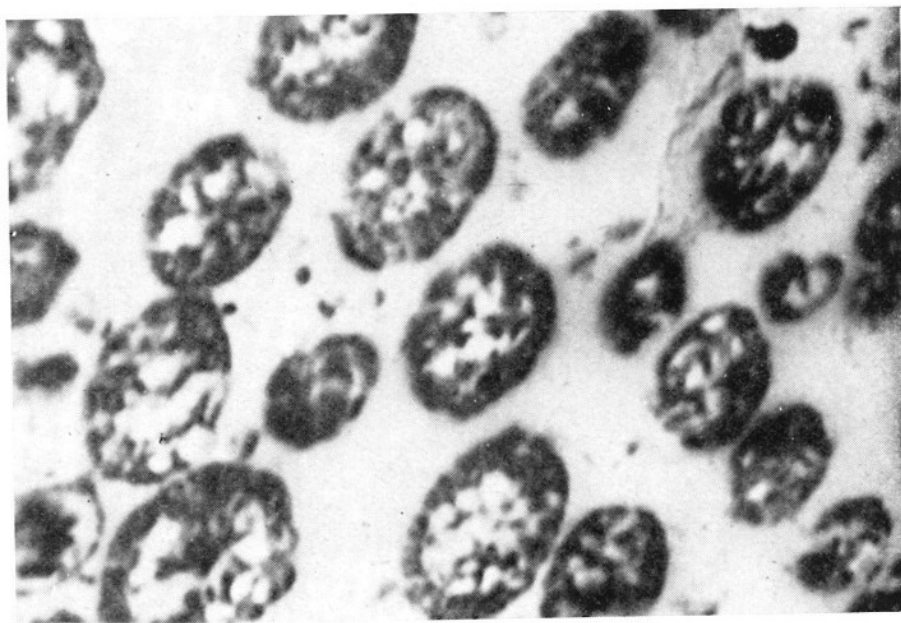


Fig. 10 - Frazione B, ma ottenuta da un omogenato in saccarosio 0,88 M. Procedimento come in Fig. 6. La struttura dei mitocondri appare assai meglio preservata che in Fig. 9. Ingrandimento: 18.000 $\times$.

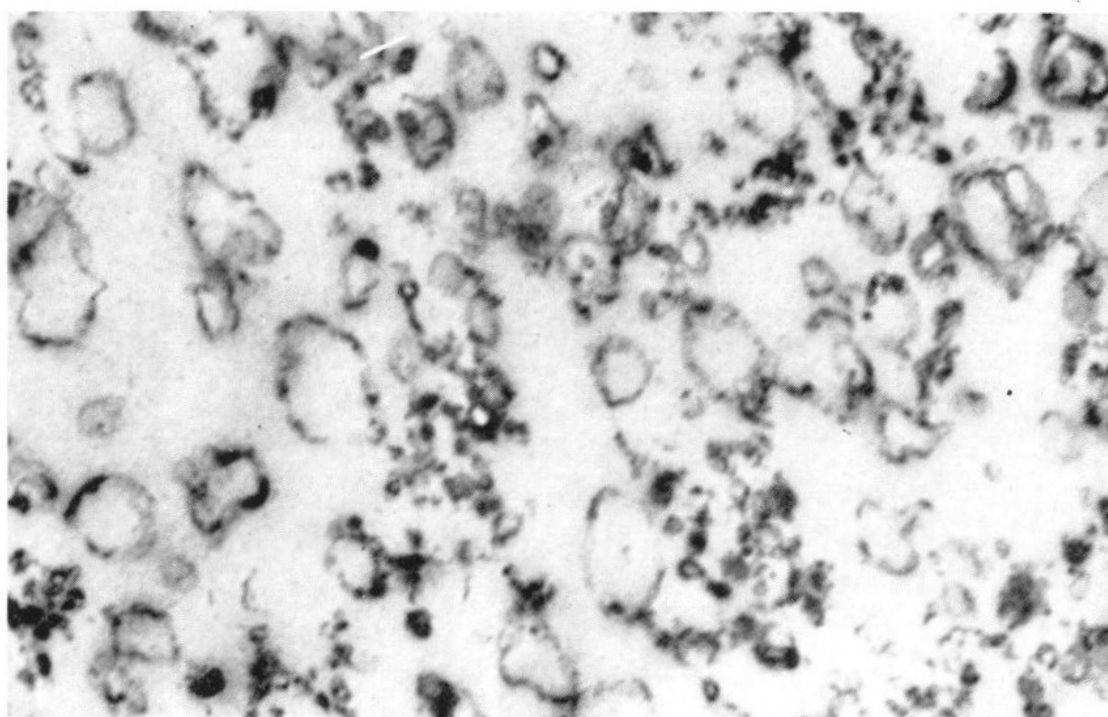


Fig. 11 - Frazione C (sedimento ottenuto centrifugando a $105.000 \times g$ per 1 h il supernatante della Frazione B). E' visibile un gran numero di vescicole di diverse dimensioni e non aggregate. Sono presenti anche numerose particelle di piccole dimensioni e di struttura non ben definita. Ingrandimento: $18.000 \times$.

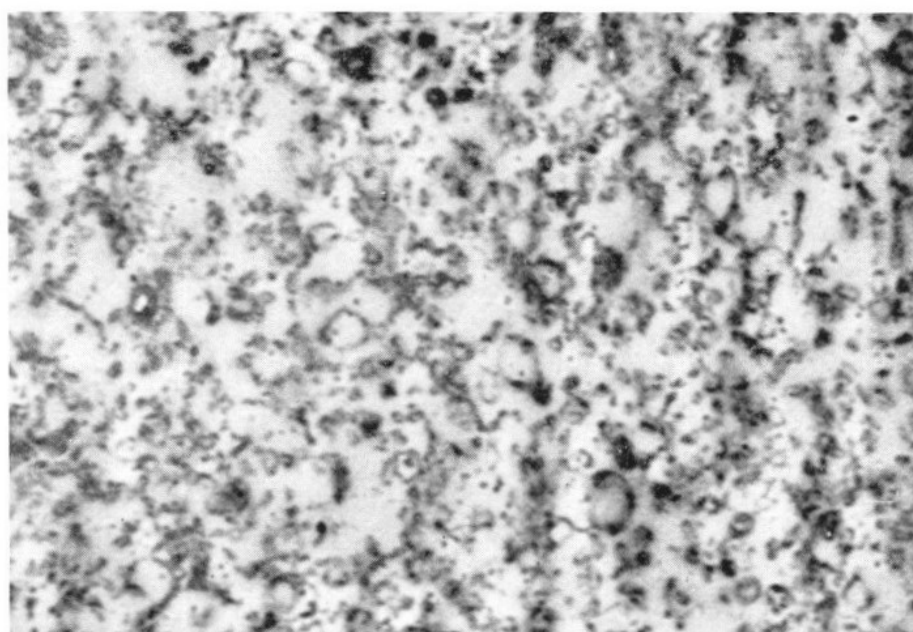


Fig. 12 - Frazione C.¹ (sedimento ottenuto centrifugando a $105.000 \times g$ per 1 h il supernatante di un omogenato centrifugato a $10.000 \times g$ per 15 min.). Sono visibili numerose vescicole di piccole dimensioni, accompagnate da piccole particelle dense.

densità e spessore, che appaiono come frammenti dell'elettrolemma. L'esame al microscopio elettronico (Figg. 6, 7, 8) mostra che il componente principale di questa frazione è dato da un gran numero di vescicole rotondeggianti, di dimensioni variabili (diametro circa 100-400 m μ), raccolte in grandi ammassi. Le vescicole sono formate da una sottile membrana, di aspetto simile a quello delle membrane che formano il sistema di tubuli disposto sotto la membrana cellulare esterna della elettroplacca. Secondo tutte le apparenze gli ammassi di vescicole corrispondono a larghi frammenti di tale sistema di tubuli. In alcuni casi è possibile osservare che questi frammenti sono ancora attaccati a un lungo tratto della membrana cellulare esterna (Figg. 6 e 7). Si osservano anche diversi nuclei e alcuni grossi frammenti di membrane particolarmente spesse e dense, accartocciate, che apparentemente provengono dalla membrana basale dell'elettrolemma (Fig. 8).

Vescicole simili a quelle ora descritte, ma raccolte in aggregati più piccoli o del tutto libere, si ritrovano anche nelle frazioni successive, descritte qui di seguito.

I supernatanti riuniti delle precedenti centrifugazioni (da cui si è ottenuta la frazione A) si centrifugano per 15 min a $3.000 \times g$. Si ottiene così una seconda frazione, B, caratterizzata dalla presenza di un gran numero di mitocondri, ben riconoscibili sia al microscopio ottico (Fig. 3) che all'elettronico (Fig. 9), per quanto notevolmente rigonfiati. Sono inoltre presenti in grande quantità le vescicole sopra descritte. Con lo stesso procedimento di centrifugazione, ma impiegando una più elevata concentrazione di saccarosio (0,88 M), si è ottenuta una migliore separazione dei mitocondri, la cui struttura appare in questo caso assai meglio conservata (Fig. 10). Incubando questa frazione mitocondriale in un mezzo adatto, nell'apparecchio di Warburg, si è osservata una evidente attività respiratoria.

Centrifugando per 1 ora a $105.000 \times g$ il supernatante della precedente centrifugazione, si ottiene una terza frazione, C, che al microscopio elettronico appare costituita in gran parte dalle vescicole già descritte, accompagnate da numerose particelle di minori dimensioni, la cui struttura non è ben definita a questo ingradimento (Figg. 11 e 12).

ESAME DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA DELLE FRAZIONI.

Le frazioni sopra descritte e il supernatante finale sono stati esaminati per quanto riguarda l'attività della colinesterasi. Questa è stata valutata sia in riferimento all'attività totale dell'omogenato iniziale (come percentuale di questa), sia in riferimento al contenuto in proteine del-

le frazioni stesse (cioè come attività specifica). Si sono eseguiti numerosi esperimenti. I risultati di un esperimento tipico sono riportati nella Tabella I. Questa mostra chiaramente come la massima parte dell'attività colinesterasica dell'omogenato si ritrovi nella frazione A. Questa frazione nello stesso tempo mostra anche la più alta attività specifica. Seguono nell'ordine, (sia per quanto riguarda il recupero percentuale della attività totale dell'omogenato, sia per l'attività specifica) la frazione « microsomiale » C, la frazione « mitocondriale » B, e il supernatante finale.

TABELLA I.

Attività colinesterasica di frazioni subcellulari di tessuto elettrico.

Frazioni	Colinesterasi		Proteine mg g	Attività specific (ml CO ₂ /ora/mg proteine).
	ml CO ₂ g /ora	% della somma		
A (800 × g / 15 min) . .	224,00	60,00	5,60	40,00
B (3.000 × g / 15 min) .	24,80	6,65	1,35	18,40
C (105.000 × g / ora) . .	87,00	23,35	3,39	25,15
D (supernatante finale) . .	37,20	9,90	7,00	4,60
Somma	373,00		17,34	
Omogenato totale	405,00		18,10	22,40

La tabella II illustra i risultati di un esperimento in cui, tralasciando il recupero dell'attività totale dell'omogenato, si è cercato piuttosto di ottenere delle frazioni che fossero il più possibile purificate dal punto di vista morfologico. Questo si otteneva con il seguente procedimento.

TABELLA II.

Attività specifica (ml CO₂/ora/mg proteine) della colinesterasi di frazioni subcellulari « purificate » di tessuto elettrico.

Frazione	Attività specifica
A ¹ (0-600 × g)	42,50
B ¹ (800-3.000 × g)	7,72
C ¹ (15.000-105.000 × g)	39,00
D ¹ (supernatante finale)	3,86

L'omogenato era centrifugato per 15 min a $600 \times g$. Il sedimento ottenuto veniva risospeso nello stesso volume di saccarosio e ricentrifugato come sopra: il sedimento così ottenuto costituiva la frazione A^1 . I supernatanti venivano riuniti e filtrati attraverso un dischetto di panno, su Buchner, rimuovendo così alcuni frammenti cellulari che tendono a galleggiare sul supernatante. Il filtrato veniva quindi centrifugato per 15 min a $3.000 \times g$ e il sedimento così ottenuto veniva risospeso e ricentrifugato nello stesso modo; questo sedimento costituiva la frazione B^1 .

Il supernatante della precedente preparazione si centrifugava per 15 min a $15.000 \times g$ e il sedimento così ottenuto si scartava, poiché esso rappresenta una frazione intermedia, contenente sia mitocondri che vescicole. Il supernatante si centrifugava per 90 min a $105.000 \times g$ e il sedimento ottenuto costituiva la frazione C^1 , mentre il supernatante costituiva il « supernatante finale ».

Con tale metodo di separazione si sono messe in evidenza differenze ancora più spiccate nell'attività specifica fra le diverse frazioni: la frazione « mitocondriale » B^1 si è mostrata ancor più povera di colinesterasi, mentre l'attività specifica della frazione « microsomiale » C^1 è risultata ancor più elevata, così da corrispondere all'incirca a quella della frazione A^1 .

DISCUSSIONE

L'aspetto del tessuto elettrico da noi osservato al microscopio elettronico è sostanzialmente simile a quello brevemente descritto da LUFT in *Torpedo occidentalis* (¹²). L'elemento citologico più caratteristico è un esteso sistema di membrane citoplasmatiche, sotto forma di una rete tridimensionale di tubuli sotto la superficie dorsale dell'elettroplacca. Appare verosimile che questo sistema di membrane sia formato da invaginazioni della membrana cellulare esterna (« plasma membrane »), come è stato suggerito da Luft. Le presenti osservazioni non ci consentono di decidere positivamente su questo aspetto, che richiede un esame particolare. Preferiamo quindi indicare questo sistema di membrane come « membrane citoplasmatiche ».

Il significato funzionale di tale disposizione delle membrane citoplasmatiche lungo la superficie dell'elettroplacca è suggerito dall'intenso trasporto di elettroliti che si verifica in relazione con l'elettrogenesi: in questo modo infatti potrebbe essere enormemente accresciuta la superficie totale di membrane cellulari attive nei fenomeni di trasporto. E'

da notarsi l'analogia di tale disposizione strutturale con quella osservata nelle cellule di altri tessuti in cui si svolge un intenso trasporto di elettroliti, come nell'epitelio renale, nel corpo ciliare e nei plessi corioidei (¹³, ¹⁴, ¹⁵). RUSKA e coll. (¹⁶) hanno inoltre sostenuto la partecipazione delle membrane citoplasmatiche al trasporto di ioni durante i processi di eccitazione e di conduzione nelle fibre muscolari, miocardiche e nervose.

Le diverse strutture della elettroplacca erano variamente distribuite nelle frazioni subcellulari da noi ottenute per centrifugazione differenziale degli omogenati di tessuto elettrico. I frammenti di membrane costituivano una gran parte di tutte le strutture raccolte, mentre solo una piccola quota era formata dai nuclei (presenti nella frazione A), dai mitocondri (nella frazione B) e da piccole particelle dense (nella frazione C). I frammenti di membrane, in forma di vescicole aggregate in ammassi di dimensioni molto variabili, si originano molto verosimilmente dalla frammentazione della « membrana cellulare esterna » e delle « membrane citoplasmatiche », ma soprattutto da queste ultime, se si considera la rispettiva estensione di queste strutture. I diversi Autori (¹⁷, ¹⁸, ¹⁹) concordano nell'attribuire questa origine alle vescicole che si ritrovano nella frazione microsomiale degli omogenati di tessuti diversi.

Le strutture che formano le terminazioni nervose (numerose sulla faccia innervata della elettroplacca) non erano riconoscibili come tali nelle frazioni da noi esaminate. E' probabile che esse si ritrovino in parte ancora attaccate a larghi frammenti della membrana cellulare esterna dell'elettroplacca (nella frazione A) in parte nelle altre frazioni. In particolare le « vescicole sinaptiche », descritte da diversi Autori (²⁰, ²¹), date le loro dimensioni di 20-60 μ , dovrebbero ritrovarsi fra le particelle più piccole sedimentate nella frazione C.

E' da sottolineare infine, in relazione con le rispettive caratteristiche enzimatiche, la sostanziale analogia di composizione delle due frazioni A e C: esse consistono per la massima parte di frammenti di membrane in forma di vescicole (aggregate in grandi ammassi in A, libere in C), accompagnate da una piccola quota di strutture diverse (nuclei in A, piccole particelle in C). La frazione B mostra invece un contenuto molto elevato di mitocondri, accanto a una aliquota pur sempre notevole di vescicole.

La distribuzione della colinesterasi nelle diverse frazioni subcellulari ha dato una indicazione convincente della situazione di questo enzima nella elettroplacca. Innanzitutto risulta chiaramente che la colinesterasi è per la massima parte associata alle strutture cellulari. Solo una minima parte è presente nella frazione solubile del citoplasma, e

per di più in concentrazione ridottissima rispetto al contenuto in proteine. Questo fatto merita di essere sottolineato per diverse ragioni. Dobbiamo infatti considerare su questa base i risultati del frazionamento di estratti proteici del tessuto elettrico di *Torpedo*, che venne da noi eseguito mediante elettroforesi su carta ⁽¹⁾. In questo caso la colinesterasi era presente per la minor parte in una frazione proteica solubile ed elettroforeticamente definita, mentre la maggior parte si ritrovava in una frazione proteica immobile sulla linea di partenza e caratterizzata dalla presenza di mucopolisaccaridi e di lipidi. Dato che gli estratti in questione erano preparati centrifugando a $18.000 \times g$, verosimilmente essi contenevano ancora una notevole quantità dei più piccoli frammenti di membrane (quelli che sedimentano tra 18. e $105.000 \times g$) i quali erano quindi trattenuti dalla carta sul punto di partenza. Trattandosi di strutture lipoproteiche, si spiega così la presenza di lipidi, mentre i mucopolisaccaridi messi in evidenza nella stessa zona indicavano la presenza di un altro componente del tessuto elettrico, la « mucina ». Questa è una mucoproteina solubile, ma dotata di alta viscosità, e pertanto viene trattenuta anch'essa sulla linea di partenza. Questa associazione di due componenti molto diversi (mucoproteina e particelle lipoproteiche) può verificarsi anche nel frazionamento per precipitazione con solfato d'ammonio. A questo è probabilmente dovuta la formazione di quel complesso di proteina, fosfolipidi e mucopolisaccaridi, ottenuto da BAILEY nel suo studio sulle proteine del tessuto elettrico, e da lui considerato come una muco-lipo-proteina caratteristica di tale tessuto ⁽²²⁾.

Questo aspetto va considerato anche ai fini della purificazione della colinesterasi del tessuto elettrico. Infatti dalle precedenti osservazioni risulta che è possibile raccogliere l'enzima insieme al materiale particolato con una sola operazione di centrifugazione, separandolo così dal principale costituente proteico del tessuto, la mucina. Questa costituisce il maggiore ostacolo ai frazionamenti successivi nei procedimenti finora seguiti ^(23, 24).

Il frazionamento per centrifugazione differenziale di omogenati di tessuto elettrico di *Electrophorus electricus* è stato eseguito da HARGREAVES ⁽²⁵⁾, il quale ritrovava la massima parte della colinesterasi nel supernatante finale. Tale differenza dai nostri risultati si può attribuire a diversi motivi. Infatti, oltre alle notevoli differenze istologiche fra il tessuto elettrico di *Electrophorus* e di *Torpedo*, vi erano profonde differenze nel metodo seguito per la preparazione degli omogenati e la loro centrifugazione. Hargreaves omogenizzava il tessuto in « Blendor », il che produce una frammentazione particolarmente comminuta e non con-

sente di rispettare l'integrità delle strutture cellulari. Inoltre il supernatante finale era ottenuto centrifugando a $25.000 \times g$: in queste condizioni la maggior parte della frazione microsomiale si ritrova ancora nel supernatante, tenuto conto anche della viscosità del mezzo, particolarmente alta, a causa della mucina. La colinesterasi presente in tale supernatante era probabilmente associata con strutture lipoproteiche, poiché un drastico trattamento con solventi organici era necessario per ottenerne la solubilizzazione effettiva e la successiva separazione.

Considerando l'associazione della colinesterasi con i frammenti di membrane della elettroplacca, e prevalentemente di membrane citoplasmatiche, è da rilevare l'analogia con quanto si è osservato nel tessuto nervoso, dove la colinesterasi è del pari associata alle strutture cellulari, e in particolare ai frammenti di membrane citoplasmatiche che si ritrovano nella frazione microsomiale (³, ⁴).

Quanto alla più particolare localizzazione della colinesterasi sulle diverse membrane della elettroplacca, si deve considerare che nelle frazioni da noi esaminate prevalevano quantitativamente le membrane citoplasmatiche (soprattutto nella frazione microsomiale C), ma era certamente presente anche una quota notevole della membrana cellulare esterna (soprattutto nella frazione A). Come si è visto, ambedue queste frazioni presentano una attività specifica della colinesterasi molto simile e particolarmente elevata. Appare quindi probabile che la colinesterasi, pur trovandosi particolarmente concentrata in corrispondenza delle terminazioni nervose (come indicano le osservazioni istochimiche), sia distribuita su tutte le membrane della elettroplacca implicate nel trasporto di elettroliti e nei fenomeni di elettrogenesi. La sua partecipazione a questi fenomeni è stata sostenuta da diversi Autori (²⁶, ²⁷), e le presenti osservazioni portano elementi in favore di queste vedute.

CONCLUSIONI

1) Le diverse strutture della elettroplacca di *Torpedo ocellata* si possono raccogliere separatamente nelle frazioni subcellulari ottenute per centrifugazione differenziale.

2) La colinesterasi non è solubile, ma è associata con le strutture cellulari. L'enzima risulta distribuito su tutte le membrane della elettroplacca, sia sulla membrana cellulare esterna (dove si trovano le terminazioni nervose), sia sulle membrane citoplasmatiche.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) TOSCHI G. e MARINI-BETTÒLO G. B. - *Biochim. Biophys. Acta*, 21: 534 (1956).
 - (²) COUCEIRO A., ALMEIDA D. F. e FREIRE R. C. - *Anais acad. brasil. cienc.*, 25: 205 (1953).
 - (³) HANZON V. e TOSCHI G. - *Exptl. Cell. Research*, (in corso di stampa).
 - (⁴) TOSCHI G. - *Exptl. Cell Research*, (in corso di stampa).
 - (⁵) PROSSER C. L. - *Comparative Animal Physiology* (ed. by C. L. Prosser), New York, (1950).
 - (⁶) NEWMAN S. B., BORYSKO E. e SWERDLOW M. - *J. Research Natl. Bur. Standard*, 43: 483 (1949).
 - (⁷) BOCCIARELLI D. e TRABACCHI G. C. - *Rend. Istituto Sup. Sanità*, 9: 4 (1946).
 - (⁸) AMMON R. - *Pflügers Archiv*, 234: 269 (1933).
 - (⁹) LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. e RANDALL R. G. - *J. Biol. Chem.*, 193: 263 (1951).
 - (¹⁰) BALLOWITZ E. - *Hdbch. d. vergl. Anatomie*, 5: 637 (1938).
 - (¹¹) LUFT J. H. - *J. Morphol.*, 100: 443 (1937).
 - (¹²) LUFT J. H. - *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2: *Suppl.*, 229 (1956).
 - (¹³) SJÖSTRAND F. S. e RHODIN J. - *Exptl. Cell Research*, 4: 426 (1953).
 - (¹⁴) PEASE D. C. - *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2: *Suppl.*, (1956).
 - (¹⁵) SAMPAIO M. M., BRUNNER A. e OLIVEIRA FILHO B. - *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4: 335 (1958).
 - (¹⁶) RUSKA H., EDWARDS G. A. e CAESAR R. - *Experientia*, 15: 447 (1958).
 - (¹⁷) PALADE G. E. e SIEKEVITZ P. - *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2: 474 (1956).
 - (¹⁸) PALADE G. E. e SIEKEVITZ P. - *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2: 674 (1956).
 - (¹⁹) SJÖSTRAND F. S. - *Methods in Enzymology*, 4: 394 (1957).
 - (²⁰) PALADE G. e PALAY S. - *Anat. Rec.*, 148: 335 (1954).
 - (²¹) DE ROBERTIS E. e BENNET H. - *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1: 47 (1955).
 - (²²) BAILEY K. - *Biochem. J.*, 33: 255 (1939).
 - (²³) ROTHENBERG M. A. e NACHMANSOHN D. - *J. Biol. Chem.*, 186: 223 (1957).
 - (²⁴) HARGREAVES A. B. e LOBO L. C. G. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 46: 484 (1953).
 - (²⁵) HARGREAVES A. B.: « Contribuição ao estudo biofísico da acetilcolinesterase do *E. electricus* ». - Instituto de Biofísica, Univ. do Brasil, Rio (1954).
 - (²⁶) NACHMANSOHN D. - *The Harvey Lectures*, Ser. 49: 57 (1955).
 - (²⁷) VAN DER KLOOT W. G. - *J. Gen. Physiol.*, 41: 879 (1958).
-