

Ultrastruttura di cellule linfoblastoidi umane in coltura: uno studio con la tecnica del freeze-etching

SIMONETTA REBESSI (*)

Laboratori di Fisica

Riassunto. — Una linea cellulare linfoblastoide umana è stata studiata al microscopio elettronico applicando la tecnica del freeze-etching. L'osservazione ha confermato le caratteristiche ultrastrutturali proprie dei linfociti già messe in evidenza con le tecniche di microscopia elettronica usuali. È stato inoltre possibile studiare le superfici delle membrane nucleare e plasmatica, ed in quest'ultima sono stati osservati caratteristici granuli proteici intramembranosi. È stata infine ottenuta una serie di dati quantitativi relativi alle strutture evidenziate.

Summary (*Ultrastructure of a human lymphoblastoid cell line: a freeze-etching study*). — A human lymphoblastoid cell line was studied at the electron microscope by the freeze-etching technique. The peculiar ultrastructure of the lymphocytes was confirmed by these observations. Particularly, we could observe the nuclear and cytoplasmic membrane and evidenciate some peculiar intramembraneous granules; moreover some quantitative data about the lymphocyte ultrastructure were obtained.

INTRODUZIONE

La morfologia dei linfociti è già stata studiata con diverse tecniche di microscopia elettronica (BESSIS, 1973; ZUCKER-FRANKLIN, 1969; POLLIAK *et al.*, 1973). Tuttavia molte di queste tecniche richiedono un pretrattamento che può introdurre variazioni strutturali dell'oggetto in osservazione. I procedimenti preparatori per ottenere sezioni ultrasottili, per esempio, includono le fasi della fissazione chimica, disidratazione ed inclusione durante le quali possono sopraggiungere decomposizione, riordinamento, contrazione ed eliminazione di materiale. La descrizione di un determinato oggetto microscopico richiede perciò comparazione tra varie tecniche di preparazione

(*) Borsista dei Laboratori di Fisica

affinché eventuali artefatti possano essere evidenziati e possibilmente eliminati, così da poter stabilire la vera struttura del campione studiato.

Fino ad ora la sola alternativa realmente produttiva alle comuni tecniche di fissazione ed inclusione è il freeze-etching (MOOR & MUHLETHALER, 1963; MOOR, 1966).

Questo metodo consiste di quattro fasi:

- 1) fissazione mediante congelamento ultrarapido a bassa temperatura (-150°C);
- 2) frattura del materiale congelato;
- 3) esposizione dei dettagli strutturali mediante sublimazione sotto vuoto del ghiaccio;
- 4) preparazione di una replica ombrata delle strutture esposte mediante evaporazione di Pt-C e C.

I maggiori vantaggi di questa tecnica consistono nel fatto che non ci sono trattamenti chimici del campione, escluso quello di incubazione in glicerina al 25-30 %, durante tutte le fasi di preparazione e che tramite la fissazione con il rapido congelamento il materiale stesso è conservato in uno stato strutturalmente simile a quello vivente.

L'utilizzazione di questa « ideale » fissazione, in congiunzione con la progredita tecnica del freeze-etching, ha reso possibile ottenere nuove immagini sulla ultrastruttura dei linfociti.

MATERIALI E METODI

Il materiale impiegato è costituito da cellule linfoblastoidi umane HR-1 coltivate in sospensione e mantenute in medium RPMI-1640 (GIBCO, cat. n. H-18) arricchito con il 20 % di siero bovino fetale.

Per la tecnica del freeze-etching la sospensione cellulare viene incubata per 1h a 4°C in glicerina al 25-30 % in tampone sodio fosfato 0,1 M (ph 7,2). Dopo una centrifugazione di 10' a 500 rpm, il supernatante viene scartato e una gocciolina di pellet viene deposta mediante un capillare al centro di un porta preparato di platino-iridio; questo viene rapidamente congelato mediante un'immersione di 10'' in Freon 22 liquido (-150°C).

Il campione viene mantenuto congelato in N_2 liquido (-196°C) fino al momento di essere posto in un apparecchio Bälzers 360 M equipaggiato con cannoncino elettronico per l'evaporazione del Pt-C e scarica ad arco per il C.

La temperatura dell'oggetto durante tutte le procedure (frattura, sublimazione ed evaporazione) viene mantenuta a -100°C .

La replica ombrata viene liberata dal preparato distruggendo quest'ultimo con una soluzione al 10 % di ipoclorito di sodio, lavata con passaggi

successivi in acqua distillata e sistemata su di una griglia di rame ricoperta con formvar. L'osservazione è stata eseguita con il microscopio elettronico AEI EM6B, ad ingrandimenti strumentali variabili tra i 5000 e i 400000

RISULTATI E DISCUSSIONE

La membrana plasmatica.

Le sezioni osservate hanno mostrato in generale linfociti di forma rotondeggiante, il cui diametro effettivo è variabile tra i 15 e i 25 μm (Fig. 1, 2).

La superficie dei linfociti di regola non si presenta liscia (Fig. 3); è possibile notare una gran quantità di microvilli, la cui presenza suggerisce l'idea di una intensa attività micropinocitosica, evidenziata ed accertata anche mediante altre tecniche (HAN & JOHNSON, 1966; ZUCKER-FRANKLIN *et al.*, 1966; KOSZEWSKI *et al.*, 1957). La presenza dei microvilli è stata particolarmente chiarificata per mezzo del microscopio a scansione (POLLIACK *et al.*, 1973; BESSIS & BOISFLEURY, 1971).

Nei preparati osservati con la tecnica del freeze-etching si osservano microvilli la cui lunghezza si può valutare fino ad 1/10 delle dimensioni della cellula, ed il cui diametro varia da valori di 0,1 a 0,4 μm (Fig. 2, 5).

A forte ingrandimento è possibile notare sulla membrana plasmatica la presenza di ben determinati corpuscoli granulari. Secondo le ipotesi fatte da vari autori (BRANTON, 1971; MANDEL, 1972) relative alle modalità di frattura delle membrane, che avverrebbe lungo il piano idrofobico intramembranoso, le immagini riportate dovrebbero riferirsi, nella maggior parte dei casi, alle facce interne della membrana stessa. I granuli osservati, le cui dimensioni possono valutarsi approssimativamente intorno ai 20-30Å, sarebbero perciò localizzati nella parte interna dove appaiono distribuiti isolati ed in modo casuale sull'intera superficie osservata (Fig. 6). Molto si è discusso sulla loro natura (MANDEL, 1972) e sebbene ancora non ne sia stata stabilita con certezza la qualità e lo specifico ruolo nell'ambito della attività del linfocita, l'ipotesi più accreditata afferma la loro origine proteica (BRANTON, 1971; TILLACK *et al.*, 1970).

Il citoplasma.

Nel citoplasma si possono osservare gli abituali organelli. L'apparato del Golgi, relativamente poco sviluppato, è costituito dalle tipiche lamelle parallele leggermente concentriche e, nelle parti terminali, da piccoli vacuoli e vescicole, in alcuni punti ancora in continuità con le lamelle stesse (Fig. 7, 8).

Il reticolo endoplasmatico rugoso è pressoché assente, in accordo, questo, con le osservazioni riportate da altri autori (BESSIS, 1973; ZUCKER-FRANKLIN, 1963).

La presenza dei numerosi vacuoli osservati in alcune sezioni cellulari (Fig. 9, 10), al contrario dello scarso numero degli stessi nei preparati di linfociti circolanti ottenuti direttamente dal sangue periferico, è una conseguenza delle trasformazioni che subisce questo particolare tipo di cellule, allorché vengono allestite delle colture *in vitro*. All'aumento del numero dei vacuoli si deve aggiungere il rigonfiamento di tutti gli organelli citoplasmatici con conseguente dilatazione del diametro cellulare ed altre alterazioni a livello citochimico (CHAPMAN *et al.*, 1967; INMAN & COOPER, 1963). I vacuoli sono di forma e misure diverse, tuttavia la maggior parte di essi è rotondeggiante e con un diametro massimo di 2 μ m. Si può osservare, a seconda del piano di frattura, sia la loro superficie convessa esterna, sia la superficie concava interna (Fig. 10). Bisogna inoltre segnalare che, su entrambe le superfici, è stata evidenziata una rada granulazione, simile a quella notata sulla membrana plasmatica, e sul cui significato nulla si è potuto stabilire.

I mitocondri non sono facilmente distinguibili dai vacuoli a meno che non vengano sezionati in modo da evidenziare la struttura interna costituita dalle tipiche creste. Sono abbastanza numerosi e di forma quasi sempre rotondeggiante (Fig. 7).

Relativamente scarsi sono i « corpi lamellari », di forma sferica, simili nella struttura a dei bulbi di cipolla.

Quando sono sezionati, le lamelle che li costituiscono, addossate le une alle altre, sembrano rompersi come a scaglie (Fig. 7). La natura di questi sferosomi sarebbe lipidica (BRANTON, 1966; MOOR & MÜHLETHALER, 1963), ipotesi che pare confermata da alcuni esperimenti in base ai quali si è potuto osservare che il numero dei corpi lamellari aumenta in proporzione alla quantità di grasso contenuto nel mezzo nutritivo (BEREHI & MALKANI, 1970).

Nella malattia di Niemann-Pick, una caratteristica lipidosi, lo studio ultrastrutturale dei linfociti (LAZARUS *et al.*, 1967) ha messo in evidenza la presenza di numerosi citosomi lipidici di struttura simile a questi sferosomi o corpi lamellari, la qual cosa confermerebbe ancora una volta la natura di tali organelli. Accanto ai citosomi si sono inoltre osservate altre strutture più definite, costituite da membrane concentriche di tipo mielinico (Fig. 9, 10). Per tali strutture, esaminate anche al microscopio elettronico dopo fissazione in glutaraldeide (NASU *et al.*, 1969), è stata avanzata l'ipotesi che si tratti di stadi di sviluppo successivi dei corpi lamellari.

Il nucleo.

Nelle micrografie osservate, il nucleo si presenta, la maggior parte delle volte, sotto forma di una massa rotondeggiante che occupa gran parte della cellula (Fig. 2). Tuttavia, in alcuni casi, si è osservata una invaginazione ci-

toplasmatica, più o meno pronunciata, nelle vicinanze del centro cellulare (Fig. 11). Questa invaginazione fa sì che il nucleo acquisti il caratteristico aspetto reniforme, spesso osservato al microscopio ottico sia nei preparati colorati, sia a contrasto di fase (BESSIS, 1973).

Il nucleo è delimitato da una membrana costituita da due foglietti, racchiudenti uno spazio interno di 150-300 Å circa; i foglietti sono molto ben evidenziati in alcune micrografie, in cui si può vedere quello esterno in parte distaccato (Fig. 12).

La membrana è disseminata di particolari strutture note in letteratura come « pori nucleari »; il diametro di questi misura circa 1100 Å ed è caratteristica, sui preparati osservati, la notevole uniformità di dimensioni con cui si presentano. Si può inoltre osservare come lo spazio interno compreso tra i due foglietti si obliteri in corrispondenza dei pori e le due membrane si fondono formando strutture specializzate tali da favorire i ben noti scambi nucleo-citoplasmatici (ZUCKER-FRANKLIN, 1969).

Le immagini ottenute quando il piano di frattura passa attraverso il nucleo-plasma, e la membrana nucleare appare sezionata, sembrano confermare tale nozione di pori diaframmati (Fig. 13, 14); in queste micrografie inoltre il nucleo appare costituito da una massa indifferenziata in cui non è possibile distinguere né nucleoli né ammassi cromatinici.

Il metodo del freeze-etching, oltre a permettere l'osservazione dei vari componenti cellulari già studiati con altre tecniche di microscopia elettronica, ha reso possibile mettere in evidenza dettagli della struttura, altrimenti difficilmente o niente affatto osservabili. Mentre infatti le usuali tecniche di inclusione e taglio possono fornire soltanto informazioni strutturali relative alla sezione di una membrana, il metodo del freeze-etching rivela, all'osservazione della replica ombrata, estese strutture che rappresentano immagini della superficie della membrana stessa. Diviene in tal modo possibile studiare più approfonditamente particolari quali i pori nucleari, che in queste condizioni di preparazione appaiono sotto una prospettiva del tutto nuova; ed in più si rendono visibili dettagli strutturali come i granelli intramembranosi, che nessuna tecnica di colorazione è mai riuscita ad evidenziare.

Infine va tenuto presente che la migliore conservazione del preparato con questo metodo permette di ricavare dati quantitativi più attendibili di quelli ottenuti con altre tecniche di microscopia elettronica.

L'autrice ringrazia vivamente la Prof. D. Steve Bocciarelli per la revisione critica del manoscritto. Ringrazia inoltre il Prof. G. Rocchi per aver gentilmente fornito la linea cellulare oggetto dello studio. Ringrazia il Sig. G. Monteleone per la valida assistenza fotografica.

Ricevuto il 15 ottobre 1974.

Accettato il 17 dicembre 1974.

BIBLIOGRAFIA

- BEREHRI, A. & K. MALKANI, 1970. *J. Ultrastruct. Res.*, **32**, 23.
- BESSIS, M. & A. DE BOISFLEURY, 1971. *Nour. Rev. Fr. Hematol.* **11**, 377.
- BESSIS, M., 1973. *Living blood cells and their ultrastructure*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- BRANTON, D., 1966. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 1040.
- BRANTON, D., 1971. *Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B.*, **261**, 133.
- CHAPMAN, J. A., M. W. ELVES & J. GOUGH, 1967. *J. Cell Sci.*, **2**, 359.
- HAN, S. S. & A. G. JOHNSON, 1966. *Science*, **153**, 176.
- INMAN, D. R. & E. H. COOPER, 1963. *J. Cell Biol.*, **19**, 441.
- KOSZEWSKI, B. J., C. W. EMERICK & D. R. DICUS, 1957. *Blood*, **12**, 559.
- LAZARUS, S. S., V. G. VETHAMANY, L. SCHNECK & B. W. VOLK, 1967. *Lab. Invest.*, **17**, 155.
- MANDEL, T. E., 1972. *Nature*, **239**, 112.
- MOOR, H., 1966. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **5**, 179.
- MOOR, H. & K. MÜHLETHALER, 1963. *J. Cell Biol.*, **17**, 609.
- NASU, T., T. KITANI, T. IMANAKA, T. YONEZAWA & T. ENOMOTO, 1969. *Acta Haematol. Japon.*, **32**, 443.
- POLLIAK, A., N. LAMPEN, B. D. CLARKSON & E. DE HARVEN, 1973. *J. Exp. Med.*, **138**, 607.
- TILLACK, T. W., R. E. SCOTT & T. V. MARCHESI, 1970. *J. Cell Biol.*, **47**, 213a.
- ZUCKER-FRANKLIN, D., 1963. *J. Ultrastruct. Res.*, **9**, 325.
- ZUCKER-FRANKLIN, D., 1969. *Semin. Hematol.*, **6**, 4.
- ZUCKER-FRANKLIN, D., M. DAVIDSON & L. THOMAS, 1966. *J. Exp. Med.*, **124**, 533.

Fig. 1. — Linfocita in sezione. Il piano di frattura passa attraverso il nucleo (x5500).

Fig. 2. — Linfocita in sezione. Il piano di frattura passa sulla membrana nucleare. Si notano il foglietto esterno, il foglietto interno e i pori nucleari. Si possono osservare i villi della membrana plasmatica sezionati longitudinalmente (x11000).

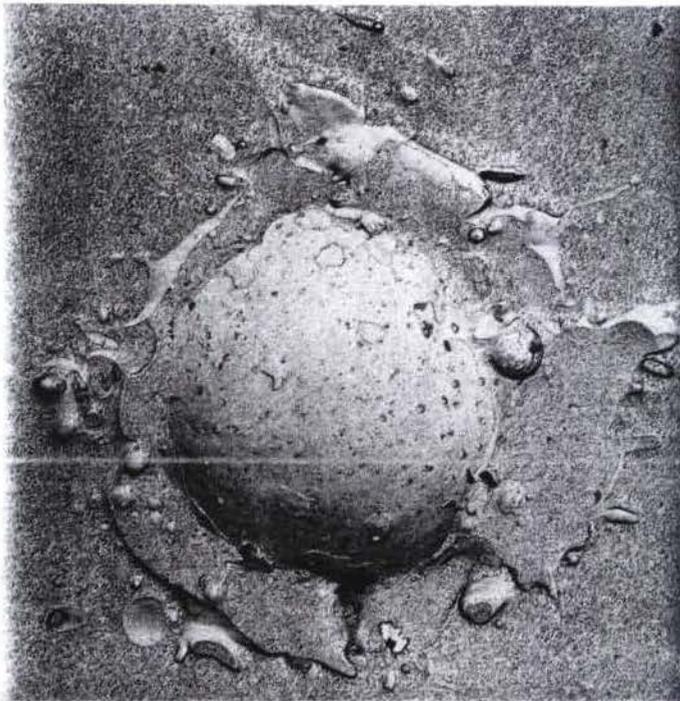
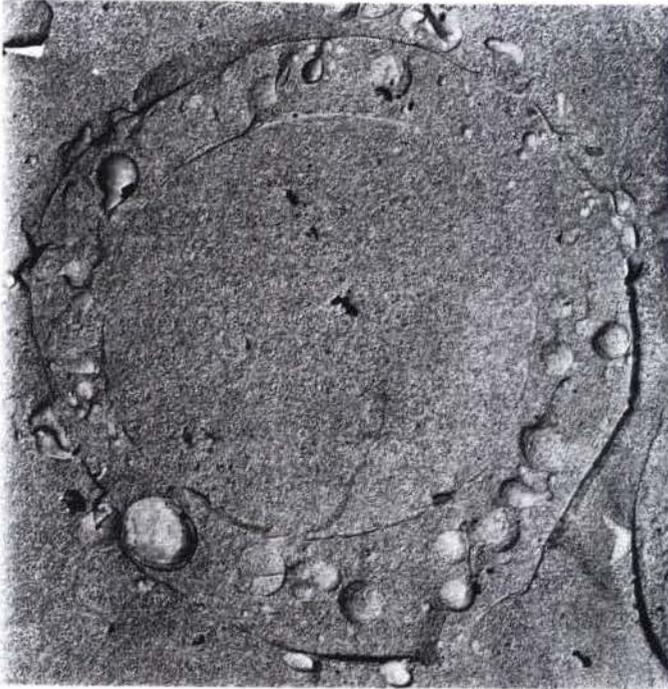


Fig. 3-4. — Superficie di un linfocita. Si osservano numerosi microvilli sezionati longitudinalmente e trasversalmente. Sulla membrana plasmatica si nota una distribuzione uniforme di corpuscoli granulari (x11000).

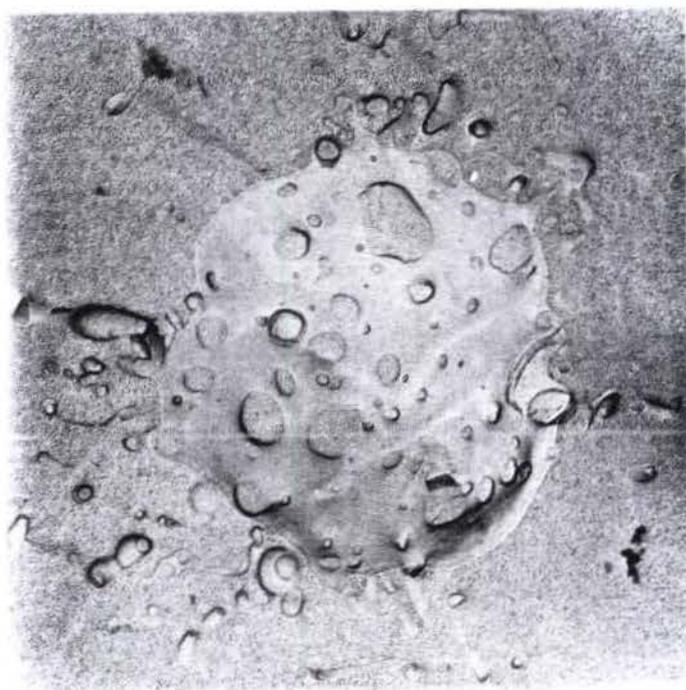


Fig. 5. — Il piano di frattura passa per il citoplasma. Esternamente al linfocita si osservano microvilli (Mv) sezionati; nel citoplasma sono osservabili mitocondri (M), vacuoli e la superficie nucleare (x8000).

Fig. 6. — Il piano di frattura passa attraverso la regione interna idrofobica della membrana plasmatica. Corpuscoli granulari appaiono distribuiti isolati ed in modo casuale (x45000).

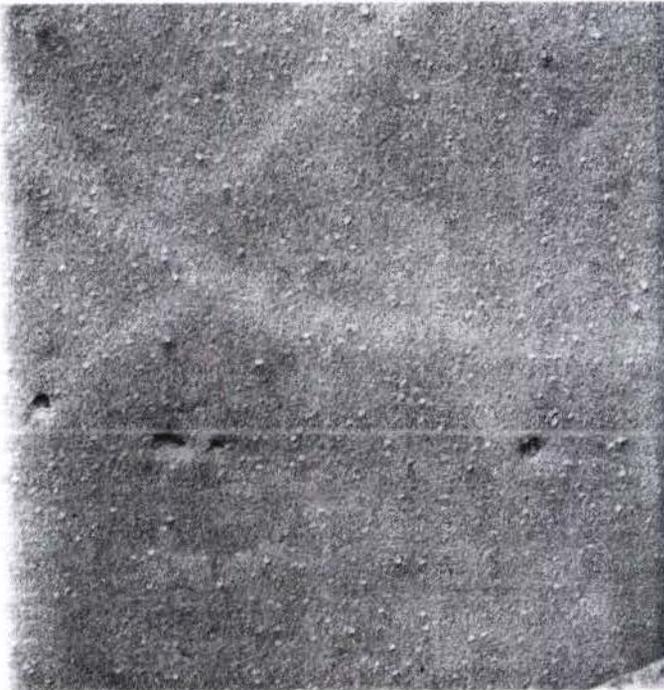


Fig. 7. — Citoplasma e nucleo di un linfocita. Nel citoplasma si osservano l'apparato del Golgi (G), i mitocondri (M), un corpo lamellare (L) ed i vacuoli (V) (x11000).

Fig. 8. — Apparato del Golgi costituito dalle caratteristiche lamelle e vescicole (x22000).

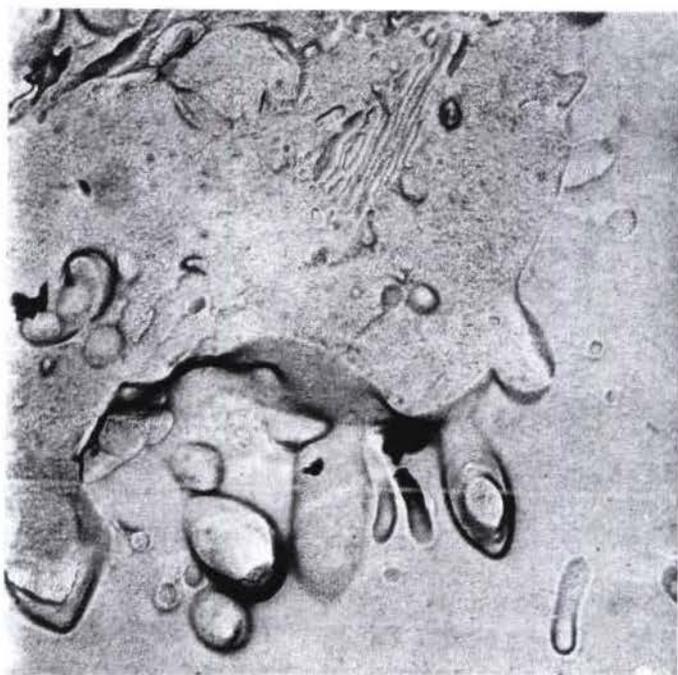


Fig. 9. — Linfocita in sezione. Si osservano vacuoli abbondanti (V), una struttura di tipo mielino (Me), il reticolo endoplasmatico (R) ed esternamente i microvilli sezionati (Mv) (x11000).

Fig. 10. — Porzione di citoplasma. Si notano mitocondri (M), abbondanti vacuoli (V), sulla cui superficie è evidente una rada granulazione, ed una caratteristica struttura a lamelle concentriche (Me) (x15000).





Fig. 11. — Vista parziale di un linfocita. Si nota il nucleo di aspetto reniforme e la presenza dei pori sulla membrana nucleare (x11000).

Fig. 12. — Il piano di frattura passa sulla superficie del nucleo; sono molto ben evidenti i due foglietti, esterno (Fe) ed interno (Fi), che costituiscono la membrana nucleare (x11000).



Fig. 13. — Porzione di linfocita. Si notano il nucleo-plasma e la membrana nucleare sezionati; particolarmente evidente è lo spazio tra i due foglietti che si oblitera in corrispondenza dei pori (x11000).

Fig. 14. — Membrana e pori nucleari in sezione (x37000).

