

**Zeitschrift:** Bollettino della Società ticinese di scienze naturali  
**Band:** 71 (1983)

**Artikel:** Organizzazione biochimica ed ultrastrutturale delle membrane di cellule leucemiche umane coltivate in vitro  
**Autor:** Conti, Ario / Losa, Gabriele  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-1003430>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 19.11.2024

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# ORGANIZZAZIONE BIOCHIMICA ED ULTRASTRUTTURALE DELLE MEMBRANE DI CELLULE LEUCEMICHE UMANE COLTIVATE IN VITRO

ARIO CONTI E GABRIELE LOSA

LABORATORIO DI PATOLOGIA CELLULARE

ISTITUTO CANTONALE DI PATOLOGIA

CH - 6604 LOCARNO

---

Summary: *Enzymatic and ultrastructural properties of plasma membrane were studied on human lymphoid leukemia cell lines. Subcellular fractions obtained from REH-6, Nalm-1 and Raji cell lines by centrifugation were assayed for the markers enzymes:  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase, 5'Nucleotidase, (Na-K) Mg-Adenosine triphosphatase, Alkaline phosphatase, Alkaline phosphodiesterase, Glucose-6-phosphatase and  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase. The ultrastructural topography was investigated on freeze-fracture preparations of intact cell by recording particles density on the protoplasmic and the external face of both plasma and nuclear membranes. In conclusion, enzymatic data seem to correlate with the stage of differentiation, as supported by the enrichment of the enzymatic equipment of the plasma membrane and the trend toward homogeneous distribution profiles of the markers enzymes. However the ultrastructural topography does not correlate: indeed, no characteristic particle density for the different cell lines was found.*

## INTRODUZIONE

Con il presente studio si è voluto indagare se la membrana plasmatica o pericellulare, sede di numerosi eventi fisiologici, subisce modificazioni qualitative e quantitative dei suoi costituenti durante le varie fasi differenziative che portano la cellula linfocitaria indifferenziata alla plasmacellula commissionata per la sintesi di immunoglobuline. Il comportamento di alcuni enzimi considerati marcatori ed attendibili rivelatori dello stato fisiologico della membrana plasmatica, come precedentemente dimostrato (Losa G. 1982), sono stati studiati su cellule leucemiche umane coltivate in vitro ed appartenenti alla stirpe B o umorale come evidenziato con metodi immunologici. Contemporaneamente sono state esaminate le proprietà ultrastrutturali delle membrane con tecniche di microscopia elettronica, (Losa G. 1982, Holborow E.J. et al. 1983, Minowada J. 1978, Preud'Homme J. 1978, Nilsson K. 1978, Foon K.A. et al. 1982, Morell A. et al. 1983). Gli enzimi associati alla membrana plasmatica presi in esame in questo studio sono considerati ectoglicoproteine, poiché espongono il loro sito catalitico verso l'esterno della cellula. La  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasi (EC: 2.3.2.1) è descritta come un'enzima implicato nel trasferi-

mento di gruppi  $\gamma$ -glutammici da composti peptidici su aminoacidi e nella loro traslocazione. La 5'Nucleotidasi (EC: 3.1.3.5) regola la concentrazione di adenosina nei linfociti con la trasformazione del nucleotide adenosina-5'-monofosfato (5'AMP) in una forma trasportabile: tale processo sembra avere una notevole importanza nel metabolismo delle purine. L'adenosina trifosfatasi totale (Na-K)Mg-ATPasi (EC:3.6.1.3) catalizza il trasporto di ioni sodio (Na) e potassio (K), con impiego di energia, attraverso la membrana plasmatica e pare costituire uno dei fondamentali meccanismi nella produzione di lavoro fisiologico. La fosfomonoesterasi alcalina (PNPasi) (EC:3.1.3.2) è considerata un'enzima che coopera con le altre idrolasi o trasferasi nella regolazione della dimensione della membrana plasmatica. La 5'Nucleotide fosfodiesterasi alcalina (PDAase) (EC:3.1.3.4) idrolizza i dinucleotidi purinici e pirimidinici in nucleotidi 5'monofosfati. La Glucosio-6-fosfatasi (G-6-Pasi) (EC:3.1.3.9), enzima associato al reticolo endoplasmatico, e la  $\beta$ -N-Acetilglucosaminidasi (NAGasi) (EC:3.2.1.30), associata ai lisosomi, sono stati misurati con lo scopo di poter individuare detti organelli nelle frazioni ad alta densità e di valutare l'entità della loro presenza nelle frazioni arricchite con plasmalemma. Uno studio di tipo morfometrico per la quantificazione delle particelle intramembranarie associate alla membrana plasmatica e nucleare è stato condotto su cellule intatte preparate con la tecnica del criodecapaggio (Losa G. et al. 1974, Pfenninger K.H. 1980, Losa G. et al. 1978, Meli D. 1981).

## MATERIALI E METODI

### Colture cellulari

Per questa prima parte dello studio sono state coltivate tre linee leucemiche umane appartenenti alla stirpe dei linfociti B (offerte dall'Istituto Ludwig di Losanna per il tramite del Dr. Carrel S.). La linea REH-6, derivata da una leucemia linfoide acuta, è costituita da cellule immunologicamente caratterizzate dall'assenza di recettori per gli eritrociti di pecora e di immunoglobuline di superficie (linea non B-non T) (Rosenfeld C. et al. 1977): presenta tuttavia gli antigeni di superficie Ia-like (HLA-Dr) e CALLA (antigene comune associato alla leucemia acuta). La linea Nalm-1 viene considerata una pre-B in quanto, secondo Carrel (comunicazione personale), presenta immunoglobuline Ig M citoplasmatiche, mentre da altri autori (Minowada J. et al. 1977) viene considerata una non B non T. Essa presenta gli antigeni Ia-like e CALLA e deriva dal sangue periferico di un paziente in crisi blastica.

La linea Raji viene considerata una linea B immatura poiché presenta, in piccola percentuale, immunoglobuline di superficie del tipo Ig M, mentre le altre classi di immunoglobuline di superficie sono ancora assenti: secondo altri autori è considerata molto simile alle pre-B (Preud'Homme J. 1978, Epstein M.A. et al. 1966). Le linee suddette sono coltivate in brodo di coltura RPMI 1640 addizionato con 10% di siero fetale di vitello deplementato, glutamina, antibiotici (pencillina o gentamicina) ed incubate a 37°C in presenza di 5% di CO<sub>2</sub>.

### Analisi enzimatiche

Le proteine sono state saggiate secondo il metodo di Lowry (Lowry O. et al. 1951) mentre le analisi enzimatiche sono state eseguite sulla scorta di metodi colorimetrici messi a punto precedentemente (Losa G. et al. 1982).

### Isolazione delle membrane plasmatiche

Circa un miliardo di cellule ( $10^9$ ) sono state raccolte e centrifugate con una centrifuga Beckmann TJ, a 300 g, per 10 minuti ed a temperatura ambiente. Le cellule sedimentate sono state risospese in tampone TKM (Tris-potassio-magnesio) contenente saccarosio 0,25M e conteggiate in presenza di blu di tripano diluito 10 volte onde saggiarne la vitalità. La sospensione è stata in seguito ricentrifugata (Beckmann J-6B) a 300 g, a 40°C e durante 15 minuti. Il sedimento recuperato con tampone TKM contenente 60% di saccarosio (peso/volume) veniva omogeneizzato in un recipiente adeguatamente raffreddato (Potter Elvehjem, clearance 0,27 mm). L'omogenato ottenuto, è stato portato alla densità adeguata con saccarosio 40% diluito in tampone TKM: su aliquote dello stesso sono stati determinati il tasso di proteine e le diverse attività enzimatiche. Il rimanente omogenato era stratificato su un gradiente discontinuo di saccarosio le cui frazioni, al momento del recupero quantitativo\*, presentavano le seguenti densità stabilite per lettura dell'indice di rifrazione: 1.05-1.10/1.10-1.15/1.15-1.20/1.20-1.25/1.25-1.30 (Monneron A. et al. 1978). La centrifugazione veniva effettuata con un'ultracentrifuga Beckmann L5-50B, usando il rotore SW27 ed alle condizioni seguenti: 100000 g, 12 ore, temperatura 40°C. Le cinque frazioni recuperate sono state dapprima pesate, quindi lavate in TKM contenente saccarosio 0,25 M ultracentrifugandole a 100000 g, 30 minuti, 40°C, ed in seguito risospese in tampone TKM contenente saccarosio 0,25 M, divise in aliquote e conservate in azoto liquido fino alla esecuzione delle analisi enzimatiche.

\* Per recupero quantitativo s'intende che la somma del tasso di proteine e la somma delle attività enzimatiche presenti nelle varie frazioni deve uguagliare la quantità di proteine rispettivamente l'attività enzimatica totale misurata nell'omogenato iniziale.

## Studio ultrastrutturale delle membrane cellulari

### - Criodecapaggio (Freeze-etching)

Le cellule intatte sono state sottomesse alla tecnica del criodecapaggio per studiare la distribuzione delle particelle intramembranarie presenti sulla faccia protoplasmatica ed esterna sia della membrana plasmatica sia della membrana nucleare (Losa G. et al. 1978, Meli D. 1981, Losa G. et al. 1983).

Le cellule (500000/ml) sono state centrifugate a 300 g durante 10 minuti, risospese e fissate con glutaraldeide 3%, cacodilato di Na 0,1 M durante 15 minuti a freddo.

Dopo un'ulteriore centrifugazione sono state risospese in glicerolo 30% e cacodilato di Na 0,1 M e finalmente depositate su appositi portaoggetti in oro (Balzers BB 113 142 - 2) (Pfenniger K.H.). Dopo congelazione rapida dapprima con Freon 22 (-150°C) e poi con azoto liquido i preparati sono stati sottoposti a frattura a freddo (-110°C) mediante un apparecchio BAF 400 D (Balzers). Le repliche ottenute mediante deposizione di platino e carbone sono state ricuperate in acqua distillata e esaminate al microscopio elettronico (Philips 400 ET).

### - Analisi morfometrica

Il conteggio delle particelle intramembranarie è stato effettuato su film di 35 mm dopo ingrandimento finale delle microfotografie (140'000X) con un apparecchio Durst 1200. Un sistema circolare del diametro di 9 mm veniva sistematicamente deposto sulle superfici cellulari mentre le particelle incluse venivano convenientemente registrate. La densità superficiale in particelle ( $\alpha = N_p / \mu m^2$ ) è stata valutata sul foglietto protoplasmico ed esterno della membrana plasmatica e nucleare (Losa G. et al. 1978).

## RISULTATI

Le attività enzimatiche sono riportate graficamente con le frequenze relative in funzione delle densità normalizzate. Un'analisi attenta dei profili enzimatici permette di constatare quanto segue: la linea REH-6 (Fig.1) presenta dei profili d'attività dissimili da un'enzima all'altro. La 5'Nucleotidasi, l'Adenosina trifosfatasi (ATPasi totale e dipendente dalla ouabaina) presentano maggiore attività nelle frazioni a densità intermedia (1.15/1.20/1.25) mentre la Fosfatasi alcalina, la Glucosio-6-fosfatasi, e la  $\beta$ -N-Acetilglucosaminidasi hanno una maggiore attività nelle frazioni più pesanti (1.20/1.25).

In particolare, occorre rilevare l'assenza di due enzimi quali la  $\gamma$ -Glutamiltranspeptidasi e la Fosfodiesterasi alcalina. La linea Nalm-1 (Fig.2) presenta un'attività della  $\gamma$ -Glutamiltranspeptidasi nelle frazioni a densità minore (1.10/1.15/1.20) mentre la 5'-

Nucleotidasi e la Fosfatasi alcalina aumentano la loro attività nelle frazioni a densità compresa fra 1.25/1.30. La Glucosio-6-fosfatasi e la  $\beta$ -N-Acetilglucosamminidiasi presentano un'attività più accentuata nelle frazioni pesanti mentre l'Adenosina trifosfatasi si trova praticamente solo nella frazione a densità 1.20/1.25. Assente è sempre la Fosfodiesterasi alcalina. La linea Raji (Fig.3) presenta un corredo enzimatico più completo: in effetti tutti gli enzimi esaminati mostrano un'attività ed i profili di distribuzione rivelano una certa similitudine. I picchi di attività massima sono riscontrabili nelle frazioni con densità fra 1.15 e 1.20 ad eccezione della 5'-Nucleotidasi con un massimo nelle frazioni aventi densità fra 1.20 e 1.25.

L'analisi ultrastrutturale rivela che le densità particellari medie, come pure le distribuzioni delle densità particellari, registrate sul foglietto protoplasmico (PF) ed esterno (EF) della membrana sia plasmatica che nucleare delle tre linee cellulari esaminate, non differiscono in modo significativo (Fig.4).

## DISCUSSIONE

L'analisi biochimica ed ultrastrutturale delle membrane plasmatiche di cellule leucemiche umane appartenenti alla stirpe umorale durante i processi differenziativi ha definito lo scopo del presente lavoro. Le tre linee leucemiche esaminate mostrano una composizione enzimatica eterogenea della membrana plasmatica, ciò che conferma i risultati ottenuti con cellule mononucleari isolate dal sangue periferico di pazienti affetti da leucemia acuta (Losa G. 1982). L'esame dei profili enzimatici permette di constatare l'arricchimento progressivo del corredo enzimatico nel corso della differenziazione cellulare. La linea REH-6, immunologicamente caratterizzata dall'assenza di marcatori di tipo B e T, e dunque considerata indifferenziata, manca di certi enzimi quali la  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasi e la Fosfodiesterasi alcalina. La linea Nalm-1, più differenziata per la presenza di immunoglobuline Ig M citoplasmatiche, mostra la  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasi, mentre è sempre sprovvista di Fosfodiesterasi alcalina. La linea Raji, linea B sempre immatura, ma tuttavia più differenziata delle precedenti (presenza di immunoglobuline di superficie) mostra un'attività per tutti gli enzimi misurati. Nelle REH-6 e Nalm-1 le attività enzimatiche sono assegnate selettivamente a determinate frazioni, mentre nelle Raji è evidente una distribuzione più normale. I nostri dati sono in accordo con precedenti lavori (Morell A. et al. 1983) nei quali è stato evidenziato che la  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasi e la Fosfodiesterasi alcalina sono particolarmente deboli in casi di leucemie linfoblastiche comuni (c-ALL), indifferenziate (AUL) e timiche (T-ALL). I risultati delle attività enzimatiche permettono di supporre che le loro variazioni come pure la tendenza ad una distribuzione uniforme dei vari enzimi associati alla membrana plasmatica sia piuttosto da mettere in relazione con la progressione dei processi differenziativi che non di quelli patologici. I dati ultrastrutturali tuttavia indicano una distribuzione normale delle particelle intramembranarie

ed una densità particellare non caratteristica per le tre linee cellulari esaminate; di conseguenza tali dati sembrano apparentemente non correlabili con i dati enzimatici e di riflesso con i processi differenziativi. Una spiegazione, tuttavia ipotetica di detta discrepanza, potrebbe essere individuata nella sintesi progressiva, durante la differenziazione, delle glicoproteine (enzimi) associate con il foglietto esterno della membrana plasmatica ma non di quelle integrali e strutturali.

#### RINGRAZIAMENTI

Il presente studio è stato realizzato grazie al supporto finanziario della Lega Ticinese contro il Cancro.

## LEGGENDE FIGURE

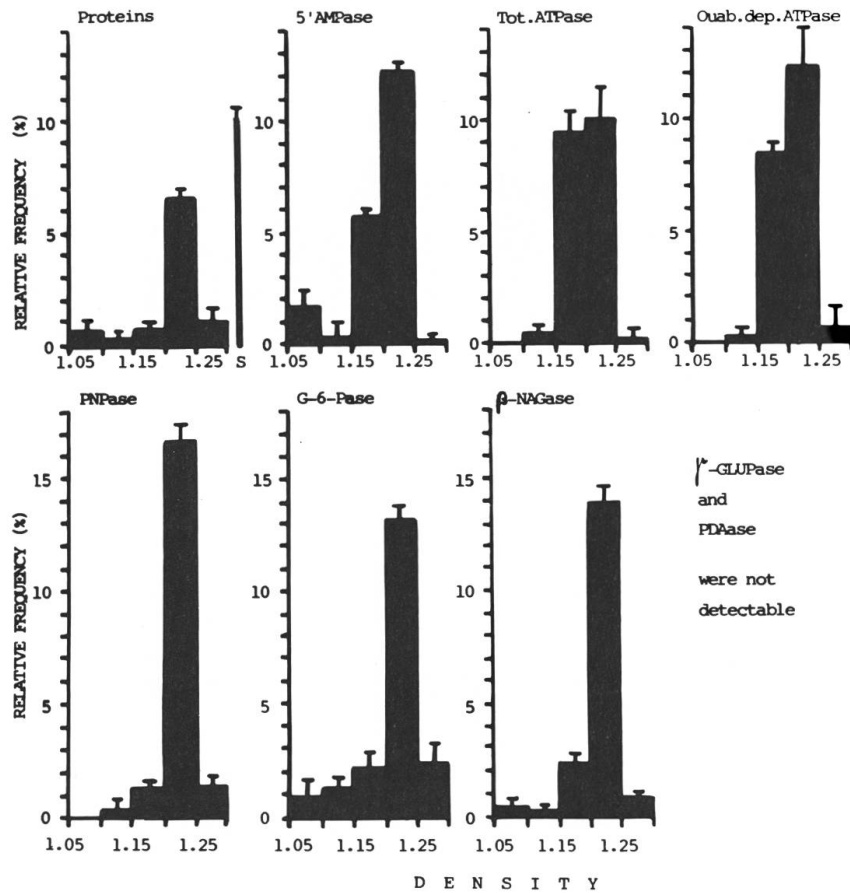


Figura 1 - Profili di distribuzione delle attività enzimatiche ottenute con la linea REH-6.

La rappresentazione grafica dei profili enzimatici è ottenuta riportando le frequenze relative delle attività enzimatiche espresse da ogni frazione in funzione della densità.

La frequenza relativa è data dal rapporto fra l'attività misurata nella frazione e l'attività misurata nell'omogenato.

Le frazioni sono state normalizzate suddividendo l'intervallo di densità compreso fra 1.05 e 1.30 in incrementi di 0.05.



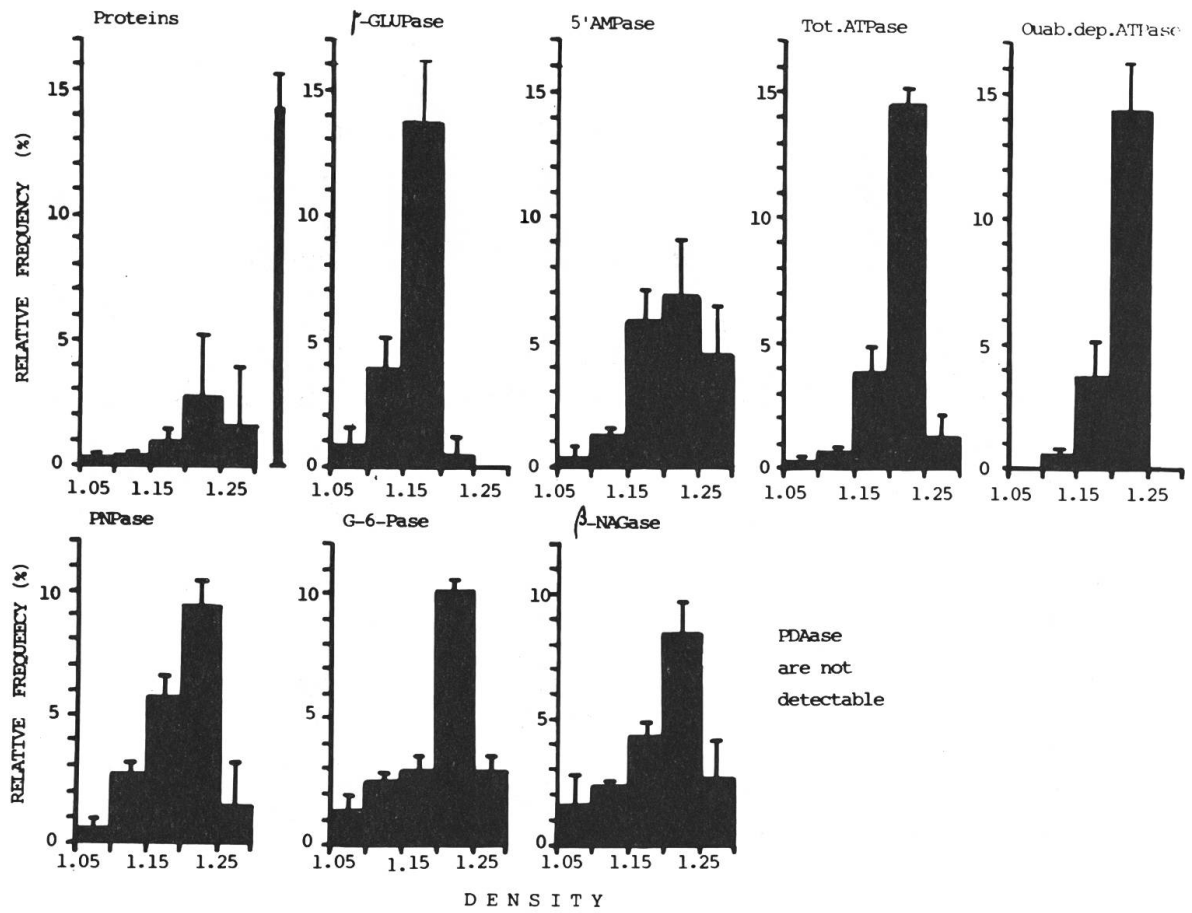


Figura 2 - Profili di distribuzione delle attività enzimatiche ottenute con la linea NALM-1.  
Vedasi spiegazione sotto Fig. 1.

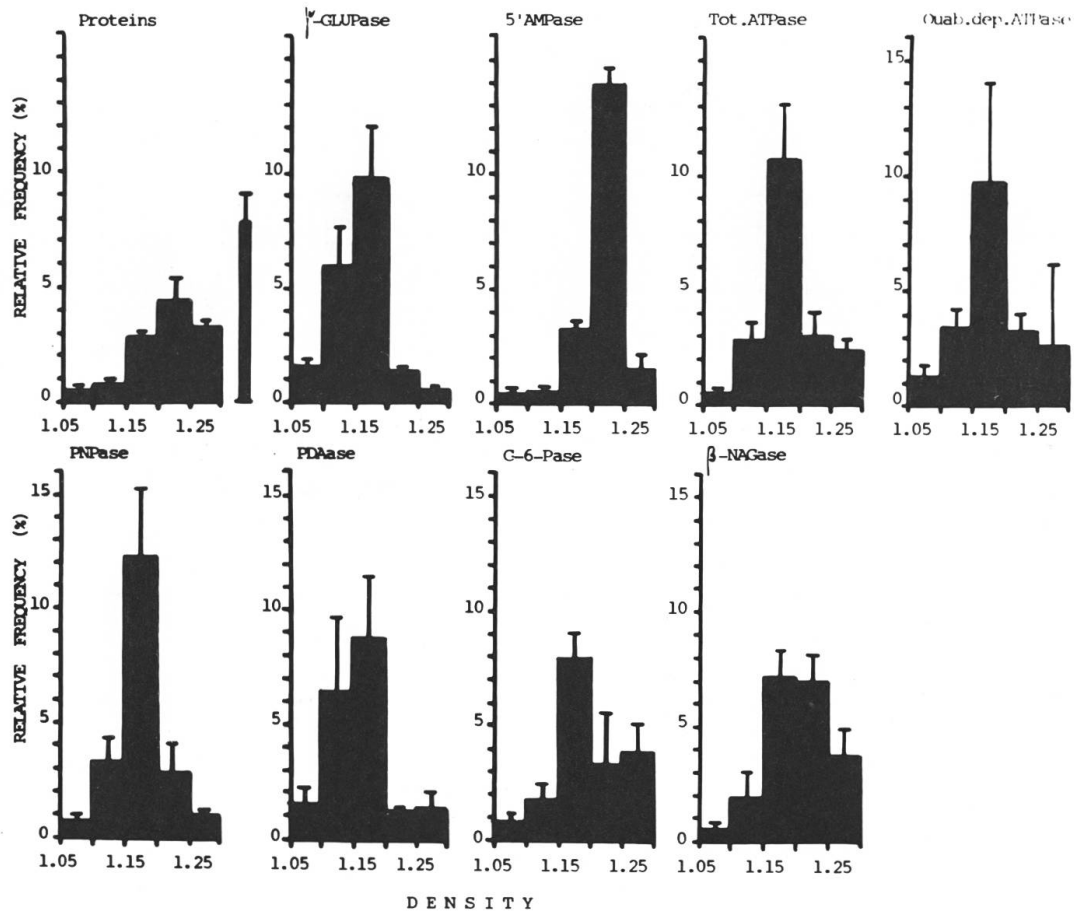


Figura 3 - Profili di distribuzione delle attività enzimatiche ottenute con la linea RAJI.  
Vedasi spiegazione sotto Fig. 1.

Cell line	Particles density ( $N_p / \mu m^2$ )			
	Plasma membrane PF		Plasma membrane EF	
REH 6	904.62	$\pm$ 516.92	255.38	$\pm$ 347.69
NaIm 1	1754.64	$\pm$ 752.64	337.53	$\pm$ 428.80
Raji	971.14	$\pm$ 498.12	340.12	$\pm$ 402.65
	Nuclear membrane PF		Nuclear membrane EF	
REH 6	836.92	$\pm$ 498.46	156.92	$\pm$ 236.92
NaIm 1	1763.08	$\pm$ 516.92	350.77	$\pm$ 375.98
Raji	1373.00	$\pm$ 638.50	280.00	$\pm$ 338.46

Figura 4 - Valori delle densità particellari medie registrate nella membrana plasmatica e nucleare.

Bibliografia

- EPSTEIN M.A. et al., 1966. Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblast (strain Raji). *J.Natl.Canc.Inst.*, 37, 547-559.
- FOON K.A., SCHROFF W. and GALE R.P., 1982. Surface markers on leukemia and lymphoma cells: recent advances. *Blood*, 60, 1,1-19.
- HOLBOROW E.J. and PAPAMICHAEL M., 1983. The lymphoid system and lymphocyte subpopulations, in *Immunol.in Med.*, 2nd Ed.Eds. : E.J.Holborow and W.G.Reeves, Academic Press London-New York, 17-34.
- LOSA G., 1982. Marcatori biochimici ed enzimatici di membrana nelle leucemie umane. *Riv.Med.della Svizzera Italiana*, 47,655-661.
- LOSA G., 1982. Enzymatic properties in pericellular membrane of leukemic cells, in *Terminal transferase in immunobiology and leukemia*. Eds.: U.Bertazzoni and F.J.Bollum, Plenum Publishing Corporation, New York, 377-383.
- LOSA G. et al., 1974. Quantitative Charakterisierung von Mikrosomen mittels Gefrierätzung. *Sonderbände der Praktischen Metallographie*. Dr.Riederer-Verlag GmbH, Stuttgart, 5,82-90.
- LOSA G. et al., 1978. Integrated stereological and biochemical studies on hepatocytic membranes. III. Relative surface of Endoplasmic reticulum membranes in microsomal fractions estimated on freeze-fracture preparations. *J.Cell.Biology*, 78,289-308.
- LOSA G. et al., 1982. Correlations between enzymatic and immunological properties of human peripheral blood mononuclear cells. I. Ectoenzymes of normal and immunodeficient peripheral blood mononuclear cells. *Am.J.Pathol.*, 107,191-201.
- LOSA G., WEIBEL E., 1983. Freeze-fracture and enzymatic analysis of membranes vesicles in subcellular fractions of rat liver. *Cell.Mol.Biology*, 29,129-137.
- LOWRY O. et al., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, 265-275.
- MELI D., 1981. Density and size distributions of the intramembraneous particles in the cytoplasmic membranes of human peripheral blood lymphocytes. *Eur.J. of Cell Biology*, 25,272-277.

- MINOWADA J., 1978. Markers of human leukemia-lymphoma cell lines reflect haematopoietic cell differentiation, in *Human Lymphocyte Differentiation: its Applications to Cancer. INSERM Symposium no.8, Eds.:B.Serrou and C. Rosenfeld,337-344.*
- MINOWADA J. et al., 1977. A non-B non-T human leukemia cell line (Nalm-1): establishment of the cell line and presence of leukemia associated antigens.*J.Natl.Canc.Inst. 59,1,83-87.*
- MONNERON A. and D'ALAYER J., 1978. Isolation of plasma and nuclear membranes of thymocytes.1.Enzymatic compostion and ultrastructure.*J.Cell.Biology,77,211-231.*
- MORELL A., CARREL S., VON FLIEDNER V., HEUMANN D., HIRT A. und LOSA G., 1983. Bestimmung von immunologischen Markern und Ectoenzym-Aktivitäten auf Leukämiezellen.*Verh. Dtsch.Ges.Path.,67,1-5.*
- NILSSON K., 1978. Established human lymphoid cell lines as models for B-lymphocytes, in *Human Lymphocyte Differentiation: its Applications to Cancer. INSERM Symposium no.8, Eds.:B.Serrou and C.Rosenfeld,307-317.*
- PFENNINGER K.H., 1980. Freeze-fracture of thin layer of cells or cellular processes. *Balzers-High Vacuum Report - Freeze Etch Technique, BB 800 005 DE.*
- PREUD'HOMME J., 1978. Human lymphoid cell lines with pre-B cell Characteristic, in *Human Lymphocyte Differentiation: its Applications to Cancer. INSERM Symposium no. 8, Eds.:B.Serrou and C.Rosenfeld,345-351.*
- ROSENFELD C. et al., 1977. An effective human leukemic cell line: REH. *Eur.J.Cancer,13,337-379.*