

A PLAZMAMEMBRÁN ELEKTRONMIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATA MELLÉKVESE VELŐ MIKROSZÓMA FRAKCIÓJÁN

BENEDECZKY ISTVÁN*, SMITH A. D. és DUBOIS FRANCOISE

Oxfordi Egyetem, Orvosi Kar Gyógyszertani Intézete

A sejthártya kémiai összetételére — ultrastrukturális és molekuláris organizációjára vonatkozó vizsgálatok száma az utóbbi évtizedben ugrás-szerűen megnőtt. Ez a fokozott érdeklődés nem egyszerű „tudományos divat” eredményeként fogható fel. Ismeretessé vált ugyanis, hogy a különböző sejtféleségek plazmamembránja alapvetően fontos szerepet tölt be az abszorpció — a szekréció — a folyadék és iontranszportban, a sejtdifferenciálódás — és malignus sejtttranszformáció folyamatában egyaránt.

A kromaffin sejtek plazma membránja különös érdeklődésre tarthat számot, mivel a normál sejtfunkciók mellett a hormonszekréció specifikus funkciójának ellátására is szolgál s mint ilyen, szabályozza Ca^{++} ionok sejtbe, illetve sejtől történő diffúzióját, színtere az acetilkolin hatásának és itt zajlik le a szekrécióval kapcsolatos exocitózis és endocitózis számos mozzanata is (1, 2, 4, 6, 13).

Az említett sejtfunkciók egyike-másika — főként a katekolamin liberációval kapcsolatos ultrastrukturális sejthártya változások elég jól ismertek a kromaffin sejtekben (2, 4, 13). Sokkal kevesebbet tudunk arról, mi a pontos kémiai összetétele a kromaffin sejtek sejthártyájának, továbbá miként változnak a kémiai összetevők a kromaffin sejtek differenciálódása — szekréciója — és daganatos transzformációja kapcsán. Ezekre a kérdésekre, csak az izolált plazma membránok kémiai analízise adhat választ, éppen ezért vizsgálataink célkitűzése az volt, hogy a sejtfractionálásos eljárások segítségével viszonylag „tisztá” sejtmembránt állítsunk elő, és ennek kémiai és morfológiai analízise alapján új ismeretek birtokába juthassunk. Vizsgálatainkban szarvasmarha mellékvese velőállományát használtuk fel, mivel ez könnyen beszerezhető volt és viszonylag nagymennyiségű kromaffin szövetet szolgáltatott számunkra.

Módszer és anyag

A kísérleteinkben használt marha mellékvesét a Witney (Anglia) vágóhídról szereztük be. Az állatok leölése után 15—20 perc múlva kaptuk kézhez a mirigyeket, és jégen tartva szállítottuk az Oxfordi Intézetbe. A mellékvesékből

* B. I. Wellcome ösztöndíjas 1970—1971.

viszonylag könnyen és kéregmentesen kipreparáltuk a velőállományt, éles késsel vékony szeletekre vágtuk, majd 0,3 M-os szaharózban Potter-Elvehjem homogenizálóban homogenizáltuk (clearance 0,08 mm). A homogenátumot ezt követően 900 g-vel centrifugáltuk a sejtmagok és sejttörmelékek eltávolítása céljából. Az ún. „nagy granulumos” frakció elkülönítése érdekében 16.000 g-vel 15'-ig centrifugáltunk Spinco L ultracentrifugában A40-es rotorral 2 °C — hőmérsékleten. Az így nyert szedimentben vizsgáltuk az izolált szekréciós granulomok, mitokondriumok — és lizozómok biokémiai sajátosságait (11, 12).

A nagy granulum frakció kiülepítése után nyert „felülúszót” 110 000 g-vel további 60 percig centrifugáltuk s így nyertük az ún. *mikroszóma* frakciót, melyet a biokémiai és elektronmikroszkópos analízis céljára szaharózsűrűségi centrifugálásnak vetettünk alá.

A szaharóz sűrűségi grádienszt az alábbiak szerint állítottuk össze. A centrifuga cső legaljára 0,3 ml 2,5M-os szaharózt tettünk erre minden esetben 0,4 ml 1.7, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8, s végül 0.7 M-os szaharózt rétegeztünk. A mikroszóma frakció 0.5 ml-ét (0.3M-os szaharózban) a szaharóz gradiens csúcsára helyeztük és 24 óráig 4 °C-on állni hagytuk. Ezt követően a gradiens csövet SW 50L-es rotorban (Spinco L ultracentrifuga) 16 óráig 220 000 g-vel centrifugáltuk. A centrifugálás után a műanyag centrifugacsövet alul túvel kifúrtuk és gradiens 12 frakcióra választottuk szét. Minden egyes frakcióból biokémiai meghatározást végeztünk, illetve a 12 frakció közül sorrendben a 10-es, 9-es, 8-as, 7-es, 5-ös, 3-as és 2-es frakciókból elektronmikroszkópos célra is mintákat vettünk. Az egyes elektronmikroszkópos célra vett frakciók 1 ml-éhez 1 ml fixálót adtunk. A fixáló 2,5% glutáraldehidet, 4% formalint tartalmazott pH 7,4-re állított foszfát pufferben. 1 órai 4 °C-on történő fixálás után az egyes frakciókat 2 óráig centrifugáltuk 22 000 fordulatszámmal. Az így nyert üledéket 2%-os OsO₄-ben (foszfát puffer pH 7,4) további 1 óráig fixáltuk. Az OsO₄ oldathoz annyszaharózt, adtunk, hogy annak végső cc.-ja 1M-os legyen. A fixálás után, a jól kezelhető üledéket cc. 1 mm³-es darabkákra vágtuk szét, felszálló alkoholsoron víztelenítettük és Durcupán ACM-be ágyztuk be. Az ultravékony metszeteket kettős kontrasztzás után (uranilacetát 30 perc, ólomcitrát 2 perc) elektronmikroszkópban vizsgáltuk.

Eredmények

A 10-es és 9-es frakció az elektronmikroszkópos kép alapján igen „tiszta” szekréciós granulum frakciónak bizonyult. (1. ábra). A szekréciós szemcsék többsége szabályos gömbalakú, nagyobb nagyítású felvételen (1.a ábra) jól látható a határoló elemi membrán. A szemcsék kisebb hányada elnyúlt hengerded alakú. Gyakran látható, hogy a gömbszerű szemcsék elektrondenz állományból egy világos lumenű nyúlvány ágazik ki, s ez pecsétgyűrűre emlékeztet.

tező granulumformák létrejöttét eredményezi. A szemcsék általában igen elektronrendz belső állománnyal rendelkeznek, néha azonban kis elektronáteresztő vakuolák figyelhetők meg bennük. A szemcsék átmérője 1500—2000 Å között változik. A szekréción szemcséket „in situ” a kromaffin sejtek citoplazmájában láthatjuk (2. ábra). Ugyanitt a Ca^{++} aktiválható ATP-áz jelenlétét is bemutatjuk elektronmikroszkópos citokémiai reakció alapján.

A 8-as frakcióban (3-as ábra) elektronmikroszkóp segítségével csak elvétve láttunk szekréción granulumokat. Legnagyobb mennyiségben a durva felszínű endoplazmás retikulum ciszternáit észleltük ebben a frakcióban. A ciszternák többsége átmetszeti képen szabályos kerekded alakú, a határoló membránokon jól látszanak a riboszómák.

A 7-es frakcióban (4-es ábra) még nagy mennyiségű durva felszínű endoplazmás retikulum volt jelen, de már jelentős számban észleltünk elektronrendz anyaggal kitöltött Golgi szakkulusokat is. Egy-egy szekréción granulum elvétve még itt is látható volt.

Az 5-ös frakcióban (5. ábra) gyakorlatilag csak Golgi elemeket találtunk. Legnagyobb számban elnyúlt szakkulusok voltak itt jelen, melyekben közepesen vagy erősen elektronrendz anyag foglalt helyet. Több-kevesebb Golgi vezikulának látszó komponensét is megfigyeltünk ebben a frakcióban, azonban ezek egy része a Golgi szakkulusok haránt átmetszéséből is származhat. Nagyobb nagytással (5.a. ábra) a Golgi szakkulus elemi határoló hátyáját is azonosítani tudtuk.

A 3-as frakcióban (6. ábra) elvétve még Golgi szakkulusok is megfigyelhetők voltak, de a képet már uralta a sejthátyából származó membrántörédek átmetszett képe. Ezek az átmetszeti képek gyakran kerekdedek, néha oválisak.

A 2-es frakcióban (7. ábra) Golgi elemeket már nem találtunk. A szabályos kerekded és ovális átmetszetű membrántörédek mellett néha igen szabálytalan formákkal is találkoztunk. Elvétve mielin figurák, és szinaptoszómák átmetszeti képe is látható volt a membránrészecskék között. A sejthátya képződmények közül a „coated vesiculumok” is azonosíthatók voltak az 1-es membránfrakcióban.

Az eredmények megbeszélése

A különböző sejtfrakciók differenciál centrifugával történő elválasztása és kémiai analízise, hosszú ideig tisztán „biokémiai” munka volt, az utóbbi évtizedben azonban egyre gyakoribbá vált az egyes frakciók egyidejű morfológiai — azaz elektronmikroszkópos szintű vizsgálata is. Az elektronmikroszkópos elemzés a biokémiailag homogénnek vélt frakcióról nem egy esetben bebizonyította, az valójában igen heterogén, s további tisztításra szorul. Az elektron-

mikroszkópia ily módon tehát közvetlenül is hozzájárult az igényesebb sejtelválasztási módszerek kifejlesztéséhez és tökéletesítéséhez. A sejtfractionálási eljárások hosszú ideig a jól megformált sejt-komponensek; sejt-mag, mitokondriumok, lizoszomák, szekréción szemcsék, stb. tisztán történő előállítására irányultak, s csak jóval később történtek erőfeszítések a nehezebben elválasztható sejt-organellumok — mint a nucleolus, Golgi-apparátus, a durva- és sima felszínű endoplazmás retikulum — izolálására. A „sejthártyát” erősen fragmentált formában először a „mikroszóma” frakcióban fedezték fel (10).

A mellékvese velőállományára vonatkozó sejtfractionálási vizsgálatok jól tükrözik a fractionálási technika fejlődését. Először a katekolamin-tartalmú szekréción szemcséket (8) és azok membránját izolálták (14), majd sor került a lizoszomák (11) és a mikroszóma frakciók vizsgálatára is (22). Ezek a vizsgálatok jelentősen elősegítették ismereteink kibővülését a katekolamin szekréción szubcelluláris mechanizmusát illetően.

A mellékvese kromaffin sejtjeinek plazmamembránját elsőként DUBOIS és mtsai (5) vizsgálták biokémiai módszerekkel, szarvasmarha mellékvese mikroszóma frakcióján. Szerzők erőteljes homogenizálással, alacsony kétértékű kation-koncentráció és magas pH biztosításával kis plazmamembrán-töredékek előállítására törekedtek. Az ily módon preparált mikroszóma frakcióból ugyanis a plazmamembrán-frakción további szaharóz-sűrűségű gradiens-centrifugálással aránylag „tisztán” előállítható. Összevetve a szóbanforgó mikroszóma frakciónra vonatkozó biokémiai és elektronmikroszkópos adatokat — legelőször is az állapítható meg, hogy a centrifuga-cső alján levő 10, 9-es frakción egyértelműen szekréción-granulumokból állt. A morfológiai kép egy jól tisztított granulum-frakción mutat be, a biokémiai vizsgálatok (5) itt mutatták ki a legmagasabb katekolamin, ATP — és dopamin- β -hidroxiláz-tartalmat. Minthogy e három anyag a szekréción-granulumok legfőbb összetevője, a frakción azonosítását illetően nem merül fel probléma.

A 8-as és 7-es frakción elektronmikroszkópos képén a durva felszínű endoplazmás retikulum-ciszternái voltak túlsúlyban. A biokémiai adatok szerint (5) itt magas volt a glukóz-6-foszfátáz-aktivitása, ami közismerten a durva felszínű endoplazmás retikulum-marker-enzime. Morfológiailag egyik legtisztább frakciónak az 5-ös frakción bizonyult; a Golgi-szakkulusok és vezikulák mellett alig láttunk egyéb sejt-részecskéket. A biokémiai vizsgálatok (5) során itt sikerült észlelni a legmagasabb tiaminopirofoszfátáz-aktivitást — ami specifikus marker-enzime a Golgi-apparátusnak.

Érdekes, hogy ugyanebben a frakción szerzők erőteljes Ca^{++} -függő ATP-áz-aktivitást észleltek. A párhuzamos elektronmikroszkópos-citokémiai vizsgálat (3) során *in situ* is sikerült lokalizálni a szóbanforgó enzimet a kromaffin-sejtek Golgi-régiójában, s ez egyértelműen amellest szól, hogy a Golgi-apparátusban egy eddig nem észlelt enzim-jelenlétével és funkciójával is számolni kell.

Elgondolkoztató, hogy a plazma membrán specifikus marker enzimét az 5'-nukleotidázt nemcsak a 2-es és 3-as frakcióban, hanem még a 4 és 5-ös (tehát Golgi) frakcióban is észlelni tudtuk a biokémiai vizsgálatok (5) során. Ez valószínű azt jelenti, hogy a plazmamembrán e homogenátumban nemcsak nagyobb „lemezek” formájában fordul elő (ahogy ezt a 2-es frakció elektronmikroszkópos képe alapján láttuk), hanem kisebb átmérőjű, de „nehezebb” részecskék formájában is, amely a Golgi szakkulusokkal, ill. vezikulákkal együtt ülepszik.

A párhuzamosan végzett biokémiai és elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján megállapítható:

1. A szarvasmarha mellékvese velőállományából nyert mikroszóma frakció 2-es, 3-as, 4-es és 5-ös szubfrakciója sima felszínű membránokból áll.
2. A 7-es, 8-as frakciót a durva felszínű endoplazmás retikulum alkotja,
3. a 9—10-es frakció szekrécións granulumból áll.
4. A 2-es, 3-as, 4-es és 5-ös szubfrakció közül elektronmikroszkóposan legtisztább membrán frakciónak a 2-es bizonyult, ugyanakkor a specifikus marker enzim az 5' nucleotidáz még az ötös frakcióban is jelentékeny mennyiségben fordult elő.

A mikroszóma frakcióból történő plazma membrán előállítás ma már kissé idejétmúltnak tekinthető. Az utóbbi években új eljárások egész sorát dolgozták ki (7, 9), s ezek segítségével nagy mennyiségű — „tisztá” plazma membránt állítanak elő. Ezekben az izolált membránmintákon nagyszámú biokémiai mérést lehet elvégezni, a morfológiai vizsgálat céljára vett mintákon pedig a konvencionális elektronmikroszkópos feldolgozás mellett negatív festést és számos citokémiai reakciót lehet elvégezni. Ezen lehetőségek hirtokában reményünk lehet arra, hogy a sejthártya sokrétű funkcióját egyre jobban megértjük mind a normális, mind a daganatos sejtek esetében.

IRODALOM

1. BANKS, P.: Involvement of calcium in the secretion of catecholamines. In: A Symposium on Calcium and Cellular Function, pp. 148—162. Ed. Cuthbert, A. W. London: MacMillan Ltd. (1970).
2. BENEDECZKY, I., SMITH, A. D.: Ultrastructural studies on the adrenal medulla of golden hamster: origin and fate of secretory granules. *Z. Zellforsch.* **129**, 367—386 (1972).
3. BENEDECZKY, I., A. D. SMITH, F. DUBOIS: A cytochemical study of the calcium-activated adenosinetriphosphatase in hamster adrenal medulla: its occurrence in the Golgi region of cromaffin cells. *Histochemie* **29**, 16—27 (1972).
4. DINER, O.: L'expulsion des granules de la médullasurrénale chez le hamster. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **265**, 616—619 (1967).
5. DUBOIS, F., BENEDECZKY, I., SMITH, A. D.: Membrane-bound enzymes in adrenal medulla: an adenosinetriphosphatase characteristic of the Golgi apparatus. *Biochem. J.* **122**, 46—47 (1971).

6. DOUGLAS, W. W., RUBIN, R. P.: The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol. (Lond.)* **159**, 40—57 (1961).
7. FORTE, J. G., T. M. FORTE, E. HEINZ.: Isolation of plasma membrane from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Biophys. Acta* **298**, 827—841 (1973).
8. HILLARP, N. A.: Isolation and some biochemical properties of the catecholamine granules in the cow adrenal medulla. *Acta Physiol. Scand* **43**, 82—96 (1958).
9. PERDUE, J. F., D. WARNER, K. MILLER: The isolation and characterisation of plasma membrane from cultured cells. *Biochem et Biophys. Acta* **298**, 817—826 (1973).
10. ROTSCILD, J.: The isolation of microsomal membranes. In: *The structure and function of the membranes and surfaces of the cells. Biochem. Symp.*, 22 : 4. Cambridge Univ. Press (1963).
11. SMITH, A. D., H. WINKLER: The localization of lysosomal enzymes in chromaffin tissue. *J. Physiol.* **183**, 179—188 (1966).
12. SMITH, A. D., H. WINKLER: Lysosomal phospholipases A₁ and A₂ of bovine adrenal medulla. *Biochem J.* **108**, 867—874 (1968).
13. SMITH, A. D. and WINKLER, H.: Fundamental mechanisms in the release of catecholamines. In *Catecholamines* Eds H. Blaschko and E. Muscholl, *Handbook of Experimental Pharmacology*, Berlin: Springer Verlag **33**, 538—617 (1972).
14. WINKLER, H., H. HÖRTNAGEL, H. HÖRTNAGEL: Membranes of the adrenal medulla. *Biochem J.* **118**, 303—310 (1970).