

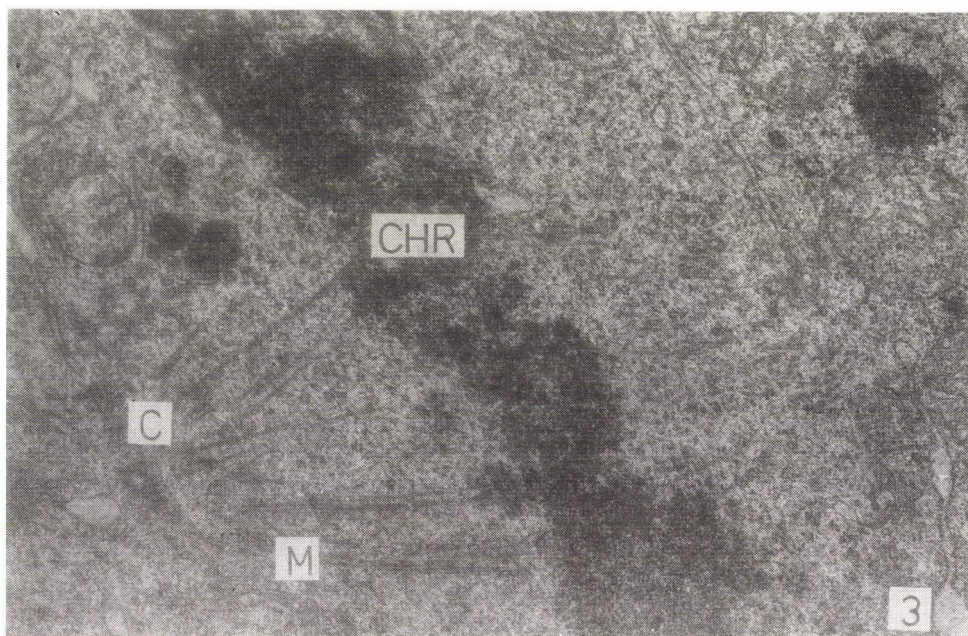
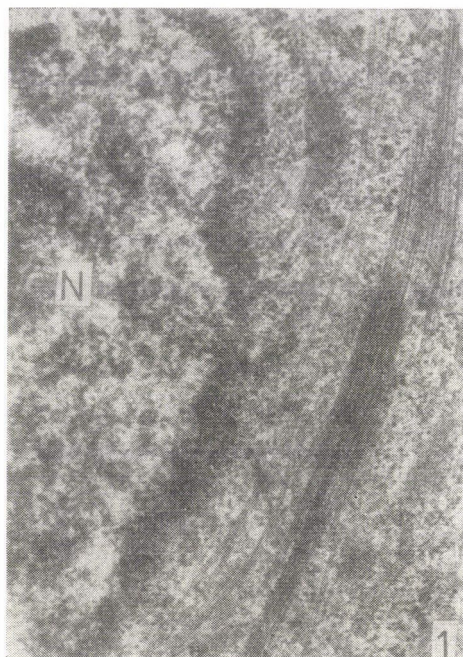
RHIZOPLAST-JELLEGŰ STRUKTÚRÁK MEGJELENÉSE KÍSÉRLETES ÉS HUMAN MÁJTUMOROKBAN

BENCSÁTH MÁRTA, STRAUSZ JÁNOS,
SCHAFF ZSUZSA az orvostudományok kandidátusa
és LAPIS KÁROLY az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1978. XI. 13.

Az eukaryota sejtekben — mai tudásunk szerint — 3 citoplazmatikus filament-típus különböztethető meg: a kb. 20–25 nm átmérőjű mikrotubulusok, az ennél kisebb, ún. intermedier filamentumok (8–12 nm) és a mikrofílamentumok (5–7 nm) (Goldman 1971; Gordon és mtsai 1978; Nicolson 1976; Starger és Goldman 1977). A mikrotubulusok és a mikrofílamentumok részt vesznek a sejtes forma kialakításában-megtartásában („cytoskeleton”), a citokinesisben, morphogenesisben, az anyagok citoplazmatikus áramlásában, anyagfelvételben-leadásban, valamint a sejtfelszíni receptorok laterális mozgásával kapcsolatos transzmembrán folyamatokban (DeRobertis és mtsai 1975; Ghadially 1975; Gratzl és Schwab 1976; Nicolson 1976; Phillips és mtsai 1975). Mennyiségi-minőségi eltérésük a transzformált sejtekben, valamint egyes pathológiás folyamatokban (intrahepaticus cholestasis) is ismert (Brinkley és mtsai 1975; Ghadially 1975; Gratzl és Schwab 1976; Osborn és Weber 1977; Phillips és mtsai 1975; Pollack és mtsai 1975; Tucker és mtsai 1978). Az intermedier filamentumok szerepe még nem teljesen tisztázott (Gordon és mtsai 1978; Starger és Goldman 1977), bár a legújabb biokémiai és immunológiai adatok szerint prekeratin tartalmú képletek, amelyek felhalmozódása esetleg a cytopathológiai elváltozások morfológiai jegye (Franke és mtsai 1978; Franke és mtsai 1978).

A citoplazmatikus filamentumok között a legjobban jellemzett struktúra a mikrotubulus. A mikrotubulusok interfázisos sejtben mutatott hálózatos elrendeződése, valamint átrendeződésük a mitotikus oszlási orsó képzésekor jól ismert jelenségek. Felvetődik a kérdés: van-e közös kiindulási pont e két megjelenési forma szerveződésében, azaz hol történik a mikrotubuláris alegységek szintézise, összerendezése? — Bouck és mtsa az egysejtű Ochromonasban, a centriolum szomszédságában megfigyelt rhizoplast struktúráról feltételezi, hogy e szerkezet a mikrotubulus-hálózat felépülésében, térbeli orientációjában irányító szerepet tölt be (Bouck és Brown 1973; Brown és Bouck 1973). Munkánkban hasonló citoplazmatikus képletről számolunk be az MC29 víruseredetű transzplantálható csirke hepatomában és egy human benignus májtumorban.



Anyag — Módszer

1. Kísérletes anyagunk az MC29 vírus-indukált primaer májrákból kialakított transzplantálható csirke hepatoma vonal volt (Langlois és mtsai 1974; Lapis és mtsai 1975). A tumorproliferáció 5—13. napja között vett mintákat 2,5% glutáraldehiddel (0,1 M Na-kakodilát, pH = 7,3) és 2% OsO₄-dal (0,1 M veronál, pH = 7,3) fixáltuk, alkoholsorral víztelenítettük, majd propilénoxid után beágyaztuk elektronmikroszkópos célra (Durcupan, Fluka-ACM). Az ultravékony metszeteket kontrasztzás után (Reynolds 1963) Jeol Jem 100B elektronmikroszkóppal tanulmányoztuk.

2. A 42 éves nőbetegtől vett májbiopsia kórszövettani diagnózisa hosszan tartó anticoncipiens kezelés kapcsán észlelt adenoma benignum hepatitis volt. A mintát 2% OsO₄-ban fixáltuk, majd ezt követően az 1. pontban leírtak szerint jártunk el.

Eredmények

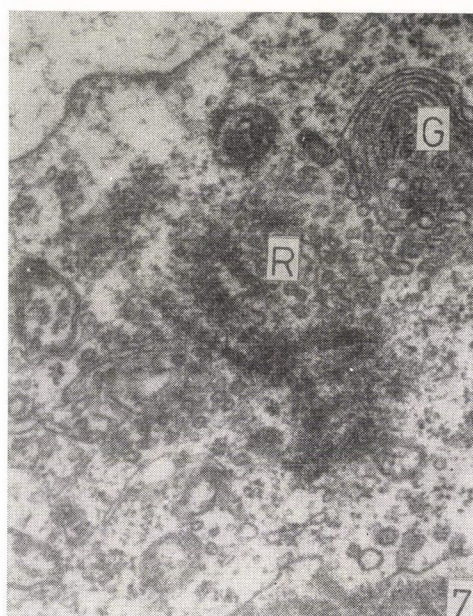
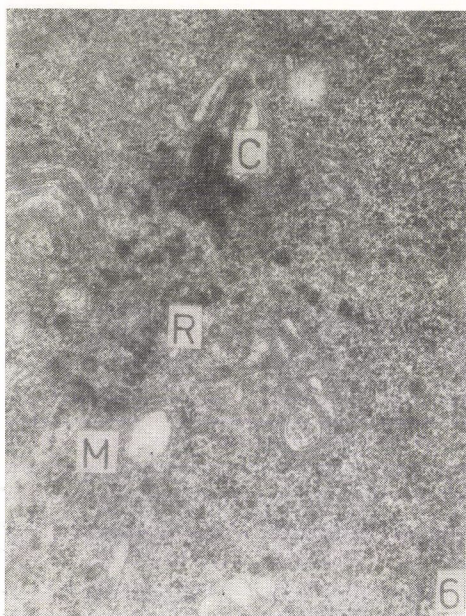
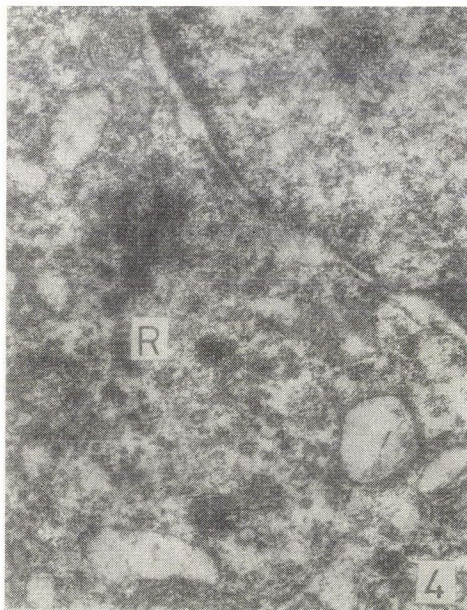
Az MC29 víruseredetű transzplantálható csirke hepatoma (továbbiakban MC29 hepatoma) gyorsan növekedő, vírust-termelő tumor, amely átlag 14 nap alatt pusztítja el a gazdaállatot. A gyors proliferációnak megfelelően elektronmikroszkóposan számos mitotikus forma is megfigyelhető a tumorsejtek között. Vizsgálati anyagunkban jól látható, hogy a mikrotubulusok a vegetatív (intermitotikus) szakaszban a sejtmag (1. kép), valamint a sejtnyúlványok mentén (2. kép) helyezkednek el. A mikrotubulusok mitózisban észlelhető, a centriolumok felé orientált átrendeződése jól ismert (DeRobertis 1975; Ghadially 1975) (3. kép). A sejtváz kontraktilis apparátusának részét képező mikrotubulusok mitotikus összerendeződésének ultrastrukturális vizsgálatakor szembetűnő, hogy egyik sem mutat közvetlen kapcsolatot a centriolumokkal (3. kép). Az MC29 hepatoma sejteiben interfázisban és mitózisban egyaránt megfigyeljük a centriolumok szomszédságában elhelyezkedő rhizoplast-jellegű struktúrát (4, 5. kép). E citoplazmatikus képlet harántesíkolata, amely szerkezetét a harántesíktól izmokéhoz teszi hasonlónak, megfelelő metszési síkban mindkét

1. ábra. Sejtrészlet az MC29 transzplantálható csirke hepatomából az átoltást követő 13. napon. Jól megfigyelhető a sejtmag (N) mentén húzódó mikrotubulus-köteg a riboszomákban gazdag háttérben. Nagyítás: 36 000 ×

2. ábra. A mikrotubulusok perifériás, citoplazma-nyúlványokba húzódó kötegét bemutató felvétel ugyanabban az időpontban, mint az 1. kép. A felvételen megkülönböztethető a mikrotubulus-köteg a finom hálózatot képező mikrofilamentumoktól (F). A tumor vírus produkciójára utalnak az extracellulárisan megfigyelhető, érett C típusú vírus-partikulák (V). Nagyítás: 36 000 ×

3. ábra. A mikrotubulusok mitotikus átrendeződését ábrázoló felvétel MC29 hepatoma sejtből az átoltás utáni 13. napon. A centriolumok és a mikrotubulusok közvetlen kapcsolata nem látható

M = mikrotubulus CHR = kromatin C = centriolum
Nagyítás: 16 500 ×



esetben jól azonosítható. A rhizoplast és a centriolum morfológiai kapcsolatát a 6. kép érzékelteti. Hasonló citoplazmatikus szerkezetet észleltünk human benignus májadenoma endothel sejtekben is (7. kép); ez utóbbi változatos, kanyarultós lefutása feltehetően a metszési sík következménye. Mindkét vizsgálati mintánkban a rhizoplast lefutására merőleges harántcsíkolatot kb. 50–53 nm periodicitásban figyeltük meg. Az egysejtű *Ochromonas*-ban leírtakhoz hasonlóan megkülönböztethető a rhizoplast parabasalis (Golgi-apparátus felé eső) és alsó (mikrotubulusokkal kapcsolatos) pólusa (6, 7. kép); ez utóbbi és a mikrotubulusok kapcsolata (6. kép) nem mindig figyelhető meg (7. kép). A rhizoplast bipolaritása az MC29 hepatoma sejtekben a tumor áttörését követő különböző periódusokban egyaránt megfigyelhető volt (8, 9, 10. kép). E citoplazmatikus képlet filamentózus alapállománya vizsgálatainkban mikrofilamentum-kötegeknek tűnt.

Megbeszélés

A filamentózus felépítésű, harántcsíkolt szerkezetű rhizoplastot egysejtűekben figyelték meg mint a kinetosomát (DeRobertis és mtsai 1975) és a magmembránt összekötő, bár azokkal szervesen nem kapcsolódó organellumot (Bouck és Brown 1973). Colchicinnel és a hidrostáticus nyomás emelésével tapasztalt mikrotubulus „depolymerizáció” az *Ochromonas danica* esetében arra utalt, hogy a rhizoplast a mikrotubuláris hálózat szerveződésében, a mikrotubulus-felépülés beindításában szerepet játszik (Bouck és Brown 1973; Brown és Bouck 1973). Mindkét megfigyelés a rhizoplast és a kinetosoma, valamint a mikrotubulusok kapcsolatára hívja fel a figyelmet.

A korábbiakban a tubulin-polimerizációban, annak megindításában egyértelműen a kromoszómák kinetochor régiójának tulajdonítottak szerepet (Stubblefield 1973). Ezt az álláspontot alapvetően meggingatták a későbbi

4. ábra. Rhizoplast lokalizációja 9 napos interfázisos tumorsejtben a centriolum szomszédságában (R). A citoplazmatikus képlet nagysága a metszési sík függvénye

Nagyítás: 24 000 ×

5. ábra. Interfázisos tumorsejttel összehasonlítva a mitotikus rhizoplast (R) harántcsíkolata ugyancsak felismerhető, a centriolumok felé nyúló oszlási orsófonalak között. MC29 hepatoma sejt, áttörés után a 7. nap

Nagyítás: 49 500 ×

6. ábra. Rhizoplast megjelenése 9 napos tumorsejtben (R). Jól látható a kb. 50–53 nm periodicitású harántcsíkolat, valamint a képlet centriolumok és a mikrotubulusok felé tekintő két pólusa

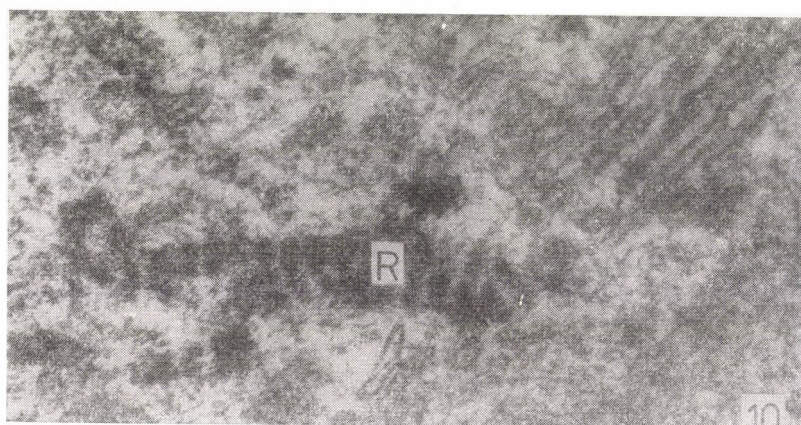
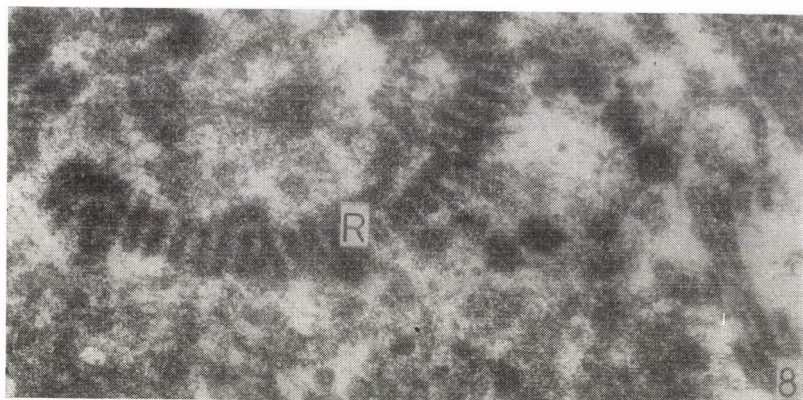
C = centriolum M = mikrotubulus

Nagyítás: 28 000 ×

7. ábra. Hosszan tartó anticoncipiens kezelés nyomán kialakult adenoma benignum hepatis biopsiás anyagának elektronmikroszkópos részlete. A degeneratív elváltozásokat mutató endothel sejtekben a Golgi-apparátus felé orientált (G) rhizoplast (R) jól látható. Szembetűnő, hogy a citoplazmatikus képlet alsó pólusán nem látható a mikrotubulusok csatlakozása.

A harántcsíkolat ezen a mintán is megfigyelhető

Nagyítás: 25 000 ×



8., 9., 10. ábra: Az MC29 transzplantálható hepatomában az átoltást követő 5, 9, 13. napon megfigyelhető rhizoplast (R) nagyobb felbontású képe. Mindegyik felvétel a rhizoplast filamentózus szerkezetét és periodikus harántcsíkolatát mutatja be. Szembetűnő mindegyik esetben a képlet bipolaritása

Nagyítás: 35 200 ×; 90 000 ×; 66 000 ×

morfológiai (Kubai 1975), biokémiai és immunhistokémiai vizsgálatok (Connolly és mtsai 1977; Lockwood 1978). Az osztódó sejtek elektronmikroszkópos tanulmányozásakor tapasztalták, hogy az oszlási orsót alkotó mikrotubulusok metafázisban vagy az anafázisban nem a kinetosomán, hanem az azzal kapcsolatos ún. „mitotikus rhizoplaston” konvergálnak (Bouck és Brown 1973). Az MC29 hepatoma vizsgálatakor mi sem tapasztaltunk közvetlen morfológiai kapcsolatot a centriolumok és az oszlási orsó között. E két utóbbi képlet között megfigyelt „mitotikus rhizoplast” — bár nem volt olyan kifejezett, mint interfázisos sejtekben — a vegetatív formákhoz hasonlóan harántcsíkolatot mutatott. Ez a megfigyelésünk eltér az irodalmi adattól, amelyben a mitotikus alak nem mutatott harántcsíkolatot (Bouck és Brown 1973).

A mikrotubulusok felépítésében szereplő elongációs faktor („tau protein”) kimutatásával (Connolly és mtsai 1977; Lockwood 1978) a mikrotubulusok szerveződésének kezdeti (iniciációs) és elongációs lépése elkülöníthetővé vált. Mindez több, morfológiailag még nem tisztázott struktúra szerepére utal a mikrotubuláris hálózat szerveződésének regulációjában. Ismeretes, hogy a mikrotubulusok interfázisos és mitotikus átrendeződésének alapja a meglevő mikrotubuláris hálózat és a tubulin monomerek közötti dinamikus egyensúly (Margolis és Wilson 1978). Azt, hogy ez az egyensúly milyen irányban tér ki, olyan reguláló tényezők befolyásolják, mint egyes kétértékű ionok, hőmérséklet, pH (DeRobertis és mtsai 1975; Nicolson 1976), vagy járulékos fehérjék (Connolly és mtsai 1977; Lockwood 1978). A különböző mikrotubuláris mérgek (colchicine, vinblastin) hatásának eredményeként a mikrotubuláris hálózat fellazul, a sejtek mitózisban megrekednek (Lapis 1968), és a különböző sejt-felszíni determinánsok, így pl. a lektin-kötő receptorok laterális elmozdulása gátolt (Csuka és Sugár 1976; Nicolson 1976). In vitro és in vivo vizsgálatok rámutattak, hogy a mikrotubuláris szerveződést gátló colchicine ún. colchicine-tubulin komplexben kapcsolódik a mikrotubulus szabad végére (Margolis és Wilson 1978; Margolis és Wilson 1977), mégpedig ellentétes póluson, mint ahol a tubulin lánc felépítése történik. Hasonló jelenséget tapasztaltak más mikrotubulus mérgeknél, mint a vinca-alkaloidáknál, podophyllotoxinnál. Valamennyinél közös megfigyelés volt, hogy hatásukat jóval a sztöhiometrikusnak megfelelő koncentráció alatt fejtették ki (Margolis és Wilson 1978). — Mindezek az adatok arra utalnak, hogy léteznie kell egy (több?) katalitikus egységnek (iniciátornak), amely regulatív összeköttetésben áll a mikrotubulus elongációjában szereplő exogén (ion, hőmérséklet, pH) és endogén (elongációs fehérjék) tényezőkkel, és a különböző anyagszeremérgeknek egyúttal közvetett céltáblája. Ezt hangsúlyozza az a megfigyelés is, miszerint az in vitro transzformált fibroblast kultúrákban a suboptimalis cAMP-szint a mikrotubuláris hálózat megkevesbedésével összefonódik (Brinkley és mtsai 1975).

Ilyen összerendező funkciót feltételeznek az egysejtűekben megfigyelt rhizoplast struktúráról (Bouck és Brown 1973; Brown és Bouck 1973), amely-

hez hasonló morfológiájú képletet találtunk kísérletes és human anyagunkban. A rhizoplast feltételezett funkcióját alátámasztja, hogy interfázisos és mitotikus sejtekben egyaránt megfigyelhető, és minden esetben a centriolum és a mikrotubulusok között lokalizálható. Bár e szerkezet felépítéséről, szerveződéséről igen keveset tudunk, úgy tűnik, filamentózus alapállományát mikrofílamentek alkotják. Ilyen értelemben feltételezhető, hogy a rhizoplast alapállománya aktin-tartalmú (Pollack és mtsai 1975; Rubenstein és Spudich 1977; Tucker és mtsai 1978). A denz harántcsíkoltat — amelyről feltételezik, hogy a mikrotubulusok tapadási pontja (Bouck és Brown 1973) — összetétele ugyan csak ismeretlen.

Burridge és Bray munkájából ismert, hogy különböző — nem izom — szövetekből preparált myosin isotoniás pufferben jellegzetes, bipoláris aggregátumokat képez, amelyeknek hossza kb. 350 nm. További dialízis során komplexebb, paracrystalloid szerkezetű képletet kaptak, amelynek harántcsíkolata 14 nm periodicitást mutatott (Burridge és Bray 1975). Ez utóbbi képlet morfológiájához hasonló az egysejtűekben és az általunk többsejtűekben megfigyelt rhizoplast struktúrája. Mindezek alapján elképzelhető — bár a mi vizsgálatainkban 53 nm periodicitás volt tapasztalható —, hogy a rhizoplast denz harántcsíkoltatát myosin adja. Amennyiben a rhizoplast szerkezetével kapcsolatos feltételezéseink bizonyítást nyernének, e citoplazmatikus képlet szemléletes példáját adná a mikrotubulusok és a mikrofílamentek szerkezeti funkcionális együttműködésének.

Tekintve, hogy az egysejtűek és a munkánkban bemutatott kísérletes és human májtumorok emelkedett proliferációs aktivitással rendelkeznek, feltételezhető, hogy a rhizoplast a kinetosomával és a mikrotubulusokkal kapcsolatosan közvetetten részt vesz az osztódás folyamatában. Ilyen értelemben valószínű a fentiek fordítottja is, miszerint a rhizoplast jelenléte a fokozott proliferációs aktivitás indikátora lehet. Mindezek mellett nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy az általunk magasabb rendűekben, mégpedig tumorszövetben megfigyelt rhizoplast a szöveti differenciálódási zavar egyik jele.

Összefoglalás

A szerzők az egysejtűekben megfigyelt citoplazmatikus rhizoplast struktúrát az MC29 transzplantálható csirke hepatomában és egy human benignus májtumorban ismertetik. Megfigyeléseik szerint a filamentózus szerkezetű harántcsíkolt képlet a centriolumok és a mikrotubulusok között lokalizálható, interfázisos és osztódó sejtekben egyaránt. A rhizoplast elhelyezkedésével kapcsolatos bipolaritása az egysejtűekben megfigyeltékhez hasonló. Figyelembe véve, hogy a rhizoplastot emelkedett proliferációs rátájú rendszerekben azonosították, a szerzők az irodalmi adatok áttekintésével e citoplazmatikus képlet funkciójára és összetételére igyekeznek következtetni.

IRODALOM

- Bouck, G. B. és Brown, D. L.: J. Cell Biol. **56**, 340 (1973).
 Brinkley, B. R., Fuller, G. M. és Highfield, D. P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 4981 (1975).
 Brown, D. L. és Bouck, G. B.: J. Cell Biol. **56**, 360 (1973).
 Burrige, K. és Bray, D.: J. Mol. Biol. **99**, 1 (1975).
 Connolly, J. A., Kalnins, V. I., Cleveland, D. W. és Kirschner, M. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 2437 (1977).
 Csuka, O. és Sugár, J.: Acta morphologica Acad. Sci. Hung. **24**, 297 (1976).
 DeRobertis, E. D. P., Saez, F. A. és DeRobertis, E. M. F.: Cell Biology — Sixth Edition; W. B. Saunders Company; Philadelphia, London, Toronto (1975).
 Franke, W. W., Grund, C., Osborn, M. és Weber, K.: Cytobiologie **17**, 365 (1978).
 Franke, W. W., Schmid, E., Osborn, M. és Weber, K.: Cytobiologie **17**, 392 (1978).
 Ghadially, F. N.: Ultrastructural Pathology of the Cell — Butterworths London and Boston p. 433 (1975).
 Goldman, R. D.: J. Cell Biol. **51**, 752 (1971).
 Gordon, W. E., Bushnell, A. és Burrige, K.: Cell **13**, 249 (1978).
 Gratzl, M. és Schwab, D.: Cytobiologie **13**, 199 (1976).
 Kubai, D. F.: Int. Rev. Cytol. **43**, 167 (1975).
 Langlois, A. J., Lapis, K., Ishizaki, R., Beard, J. W. és Bolognesi, D. P.: Res. **34**, 1457 (1974).
 Lapis, K.: Acta morphologica Acad. Sci. Hung. **16**, 65 (1968).
 Lapis, K., Beard, J. W.: Cancer Res. **35**, 132 (1975).
 Lockwood, A. H.: Cell **13**, 613 (1978).
 Margolis, R. L. és Wilson, L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 3466 (1977).
 Margolis, R. L. és Wilson, L.: Cell **13**, 1 (1978).
 Nicolson, G. L.: Biochim. Biophys. Acta **457**, 57 (1976).
 Osborn, M. és Weber, K.: Cell **12**, 561 (1977).
 Phillips, M. J., Oda, M., Mak, E., Fisher, M. M. és Jeejeebhoy, K. N.: Gastroenterology **69**, 48 (1975).
 Pollack, R., Osborn, M. és Weber, K.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 994 (1975).
 Reynolds, E. S.: J. Cell Biol. **17**, 208 (1963).
 Rubenstein, P. A. és Spudich, J. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 120 (1977).
 Starger, J. M. és Goldman, R. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 2422 (1977).
 Stubblefield, E.: Int. Rev. Cytol. **35**, 1 (1973).
 Tucker, R. W., Sanford, K. K. és Frankel, F. R.: Cell **13**, 629 (1978).