

UNDULÁLÓ MEMBRANÓZUS SZERKEZETEK CITOKÉMIAI VIZSGÁLATA

BENCSÁTH MÁRTA, SCHAFF ZSUZSA és LAPIS KÁROLY az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1976. IX. 30.

Napjainkban a daganat-kutatás területén a vírusetiológia lehetőségének felvetésével a vírus-indukált tumorok komplex vizsgálata előtérbe került (Lapis és Schaff 1974.). Ismeretessé vált, hogy az RNS tumor-vírusok szaporodási ciklusa során a fertőzött sejtekben különböző átíróadási termékek jelennek meg, amelyek többféle módszerrel kimutathatók (Temin, 1966). Egyidejűleg morfológiailag is észleltek különböző vírus-szerű, vagy vírus-alkotórészre emlékeztető részecskéket a daganatsejtekben (Lapis és Schaff, közl. elfog.), és felvetődött, hogy ezen „zárványok” kapcsolatban állnak a vírus szaporodási ciklusával, illetve magát a fertőző részecskét reprezentálják.

Az MC 29 RNS tumor-vírus-indukált transzplantálható hepatóma (Langlois és mtsai, 1974. Lapis és mtsai, 1975.) sejtjeinek elektronmikroszkópos vizsgálatakor sajátos zárvány, az ún. unduláló membranózus szerkezetek (UMS) megjelenését észlelték (Schaff és mtsai, 1975.). Az 1–2 μ átmérőjű inkluziót a durva felszínű endoplazmatikus retikulummal összefüggő, annak mintegy folytatását képező, változatos lefutású membrán-szerkezetek alkotják.

Az UMS morfológiailag elkülöníthető az endoplazmatikus retikulummal ugyancsak kapcsolatos, annak ciszternáiba betüremkedő, citokémiailag már jellemzett tubuloretikuláris struktúráktól (TRS; Schaff és mtsai, 1973. Schaff és mtsai, 1975.). Mindkét zárvány-típust kimutatták néhány normál szövetben (Bassot, 1966. Schaff és mtsai, 1975. Van Lennep, Lanzing, 1967.), de leginkább kóros elváltozások során, elsősorban virális fertőzések és daganatok kapcsán (Bloodworth, Shelp, 1970. Chandra, 1968. Pincus és mtsai, 1970. Smith, Deinhart, 1968. Uzman és mtsai, 1971.) jelenik meg.

Jelen vizsgálataink célja, hogy citokémiailag jellemezzük a vírus-indukált transzplantálható hepatómában előforduló UMS-t és összehasonlítsuk a citokémiailag ismert TRS-sel.

Anyag és módszerek

1. Kísérleteinkben az MC 29 RNS vírussal indukált primaer májtumorból kialakított transzplantálható csirke hepatómát alkalmaztuk (Langlois és mtsai, 1974. Lapis és mtsai, 1975.).

2. Elektronmikroszkópos eljárások

Vizsgálati anyagunkat OsO_4 2%-os veronál-acetát pufferrel készített oldatában rögzítettük ($\text{pH} = 7,4$), esetenként alkalmaztuk a 2,5%-os glutáraldehid előfixálást is ($\text{pH} = 7,4$). A preparátum egy részét káliumpermanganát 0,6%-os vizes oldatával készítettük elő a beágyazáshoz (Luft, 1956.). A növekvő koncentrációjú alkohol-soros víztelenítést propilénoxid és Durcupan-ACM (Fluka) beágyazó gyanta követte. Az ultravékony metszeteket LKB III. és Reichert ultramikrotómmal készítettük. A kontrasztozást Reynolds szerint végeztük (1963). Az elektronmikroszkópos felvételek JEOL JEM 100B és Tesla BS613 elektronmikroszkóppal készültek, 60 kV gyorsítófeszültségnél.

3. Citokémiai módszerek

a. Szénhidrát-tartalom kimutatása

Az ultravékony metszeteket Marinozzi gyűrűre vettük (1964.) a reakciók elvégzéséhez. A szénhidrát (poliszaharid)-tartalom kimutatásában Thiery módszerét (1967.) követtük, azaz 1%-os perjódsavas oxidáció után a tiokarbohidraziddal adott reakciót ezüsthidráttal tettük láthatóvá.

b. Enzimatisus vizsgálatok

Az enzim-emésztéses eljárások Monneron és Bernhard szerint (1966.) történtek, a fentiekben említett Marinozzi gyűrű segítségével. Pronase (Calbiochem; Grad B) 0,5%-os bidesztillált vizes és pepsin (Sigma; 2x krist., liof.) 0,5%-os 0,1 N sósavas oldatában inkubáltuk a vizsgálandó anyagot 37 C° -on, 10%-os perjódsavas oxidáció után. Mindkét enzim hatását a 0,5—1—1,5—2—4—6—18—24 órás időintervallumokban figyeltük meg. A kontroll preparátumoknál ugyanolyan körülményeket teremtettünk, csak az enzimeket hagytuk el az inkubálás során.

Eredmények

Az MC 29 vírus-indukált transzplantálható csirke hepatóma tumoros sejtjeinek 6—8%-a tartalmazta a jellegzetes, denz gyűrűkből, membrán-hurkokból felépülő UMS-t. Megfigyelhető a membrán-szerkezetek és az endoplazmatikus retikulum kapcsolata is (1. kép).

A káliumpermanganáttal rögzített anyagban az UMS igen erős kontrasztot ad, hasonlóan a többi citomembránhoz (2. kép). Igen szembe-tűnő a membránok unduláló lefutása.

A Thiery-féle ezüstproteinátos metodikával az UMS a Golgi készülék és az endoplazmatikus retikulum membránjaihoz hasonlóan denz (3. kép), de a szénhidrátokra (glikogénre) jellemző erősen kontrasztos reakciót nem adja.

Ugyanakkor feltűnő a citomembránokkal ellentétben a széles membránrajzolat. Itt is megfigyelhető az UMS és az endoplazmatikus retikulum membrán-képleteinek összefüggése.

Az enzimatiskus emésztések eredményeit az idő függvényében a következő csoportokba oszthatjuk: (I. táblázat)

I. táblázat

Az UMS enzimatiskus érzékenysége pepsin és pronase hatására

Idő (óra)	Pepsin	Pronase	Kép
	hatás		
0,5—1	enyhe denzitás csökkenés		5. és 8.
1—2	denzitás csökkenés		6. és 9.
2—6	további denzitás csökkenés	denzitás és méret csökkenés	11. és 13.
6—18	csekély változás a 2—6 órához viszonyítva	erős denzitás csökkenés	14. és 15.
18—24	nem értékelhető		

A különböző időpontokban jó ultraszerkezeti megtartottság tapasztalható, és az enzimek UMS-specifikus emésztő aktivitása a 18 órai inkubációs időtartamig észlelhető. A kontrollokhoz hasonlóan (4, 7, 10, 12. képek) az emésztések során az UMS-t kivéve az összes egyéb sejt-komponens megtartotta integritását, és legfeljebb denzitásukban tértek el (5, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 15. képek).

Az I. táblázatból kitűnik, hogy rövid idejű inkubáció során nincs különbség a két enzim hatásában (0,5—1 óra: 5. és 8. kép). Egy órával később a pronase már hatásosabbnak tűnik (6., 9. kép). Az enzim-aktivitások a 2—6 órás intervallumban megközelítőleg kiegyenlítődnek (11., 13. kép). Ezt tapasztaltuk a 18 órás emésztésnél is (14., 15. kép). Ezen időpontban az UMS nehezen felismerhető szerkezetű szubsztanciát mutat (14., 15. kép), melyben helyenként a membrán-vonulatok még azonosíthatók. A 18—24 órás időintervallum értékelhetetlen az aspecifikus enzim-hatások miatt.

Megbeszélés

Citokémiai vizsgálataink arra utalnak, hogy az UMS a TRS-hez (Schaff és mtsai, 1973.) és az egyéb membranózus szerkezetekhez hasonlóan magas lipoproteid-tartalmú struktúra. Bizonyítja a káliumpermanganátos fixálás utáni kontrasztos megjelenése, valamint a Thiery-reakció utáni denzitása. Ez utóbbi hívja fel a figyelmet az UMS és egyéb citomembránok közötti különbségre is.

Ugyanis, amint azt az eredményekben elemeztük, az UMS membrán-vonulatai kontrasztosabb, vastagabb formát adnak. A TRS esetén ezt a jelenséget a káliumpermanganáttal végzett fixálásnál tapasztaltuk (Schaff és mtsai, 1973.). Ezen adatok szerint citokémiai eltérés észlelhető a TRS, UMS, valamint a citomembránok között.

Enzim-emésztéses vizsgálataink bizonyítják az UMS fehérje tartalmát. A zárvány pepsinre és pronasera egyaránt érzékeny, de egyik enzim sem ért el a másikkal szemben kiemelkedően jellegzetes hatást. Mindezekből közelebbi következtetések nem lehetségesek az UMS-t felépítő fehérjék természetét illetően.

Az UMS citokémiai vizsgálatait a funkció közelebbi megismerése érdekében végeztük. Megállapítottuk, hogy az inklúzió lipoproteid-tartalmú szerkezet, amely összefüggésben van az endoplazmatikus retikulum membránjaival, azok folytatásában helyezkedik el. Az UMS nukleinsav tartalmáról még nincsenek adataink, de a káliumpermanganátos vizsgálatokból úgy tűnik, negatív eredményt remélhetünk ebben a kérdésben, mivel e reagens extrahálja a nukleinsavakat a sejtekből; az UMS azonban pozitív reakciót adott (Wetzel, 1961.).

Több szerző ismertette az UMS fiziológiai szerepét bizonyos állatfajoknál, így a tengeri macskahalak dendritikus szerveinek sejtkomponenseként, vagy az alacsonyabb rendű fajok esetében a víz- és ionháztartásban betöltött resorpciós funkciót (Schaff és mtsai, 1975. Van Lennep, Lanzing, 1967.). Figyelemre méltó azonban, hogy az UMS — hasonlóan a TRS-hez (Schaff és mtsai, 1975.) —, jóval gyakrabban fordul elő a kóros elváltozásoknál. Mivel funkciója még tisztázatlan, csak elképzelések állnak rendelkezésünkre.

Ha a normál sejtben betöltött funkciót tekintjük, feltételezhető, hogy az UMS a durva felszínű endoplazmatikus retikulum-termelte, egyfajta sima felszínű endoplazmatikus retikulum módosulat. Ez az elképzelés összeegyeztethető Baringer TRS-re alkotott megfontolásával, miszerint a membrán-képletek adott külső stimulus (pl. vírus-fertőzés) hatására a gazdasejt produktumai (Baringer, Swoveland, 1972.).

Tekintve, hogy a transzformált sejtek morfológiai és funkcionális változásáért az onkogén vírus genomja felelős, e vírusok a produktív infekció mellett olyan malignus elváltozásokat hozhatnak létre, amelyek során új vírus-specifikus antigének — tumor antigének — jelennek meg. Ezek az antigén-tulajdonságok nem azonosíthatók a normál sejt antigénjeivel, sem a vírus antigénekkal. Így lehetséges, mint az a TRS-nél sem kizárható, hogy az UMS a sejttranszformációval fellépő jellegzetes antigén tulajdonság, vagy virális komponens (Chou, 1967. Grimley és mtsai, 1973.). Ez utóbbinak azonban ellentmond egyes onkogén vírusok TRS-től (és a permanganátos vizsgálatok alapján feltehetően UMS-től is) eltérő nukleáz-érzékenysége (Schaff és mtsai, 1973.). A virális eredetet azonban nem cáfolja az 5-bróm-desoxiuridinnel humán lymphoid sejtekben indukált TRS-mintázatú szerkezetek megjelenése (Grimley és mtsai, 1973.).

Ez utóbbi vizsgálat alapján lehetséges, hogy az UMS, csakúgy, mint a TRS, a sejt anyagcsere-változásaival kapcsolatban álló aktív produktum, amelyről feltételezhető, hogy elsősorban a vírus-fertőzésekkel kapcsolatos sejtes anyagcserezavarok markere.

Összefoglalás

A szerzők citokémiai módszerekkel vizsgálták az MC 29 RNS vírus-indukált transzplantálható csirke-hepatóma sejtjeiben leírt sajátos citoplazmatikus zárványokat, amelyek a durva-felszínű endoplazmatikus retikulummal kapcsolatos unduláló membránózus szerkezeteknek bizonyultak (UMS). Az UMS a permanganátos és enzim-emésztéses vizsgálatok szerint a korábbiakban leírt tubuloretikuláris struktúrákhoz (TRS) hasonlóan lipoproteid tartalmú inklúzióknak bizonyult. Az UMS a szénhidrát-kimutatásnál a TRS-től eltérő reakciót adott. Az UMS ugyanúgy, mint a TRS, leginkább neoplasztikus kórképeknél, valamint vírus-fertőzésekénél tapasztalható. A morfológiai és citokémiai jellemzések kibővítése az eddig még ismeretlen funkció megközelítését szolgálja.

IRODALOM

- Baringer, J. R., Swoveland, P.: J. Ultrastruct. Res. 41, 270. (1972).
 Bassot, J. M.: J. Cell Biol. 31, 135. (1966).
 Bloodworth, J. M. B. és Shelp, W. D.: Arch. Pathol. 90, 252. (1970).
 Chandra, S.: Lab. Invest. 18, 422. (1968).
 Chou, S. M.: Science 158, 1453. (1967).
 Grimley, P. M., Barry, D. W. és Schaff, Zs.: Fed. Proc. (Abs) 32, 964. (1973).
 Langlois, A. J., Lapis, K., Ishizaki, R., Beard, J. W., és Bolognesi, D. P.: Cancer Res. 34, 1457. (1974).
 Lapis, K., Beard, D. és Beard, J. W.: Cancer Res. 35, 132. (1975).
 Lapis, K. és Schaff, Zs.: Orvosi Hetilap 115, 1083. (1974).
 Lapis, K. és Schaff, Zs.: Medicina, Budapest. Könyvfejezet (közl. elfog.)
 Luft, J. H.: Biophys. Biochem. Cytol. 2, 1799. (1956).
 Marinozzi, V.: J. Ultrastruct. Res. 10, 433. (1964).
 Monneron, A. és Bernhard, D. W.: J. Microsc. 5, 697. (1966).
 Pincus, T., Blacklow, N. R. és Grimley, P. M.: Lancet 2, 1058. (1970).
 Reynolds, E. S.: J. Cell Biol. 17, 208. (1963).
 Schaff, Zs., Barry, D. W. és Grimley, P. M.: Lab. Invest. 29, 577. (1973).
 Schaff, Zs., Lapis, K. és Grimley, L. M.: Morph. és Ig. Orv. Szemle 15, 166. (1975).
 Smüth, R. D., Deinhardt, F.: J. Cell Biol. 37, 819. (1968).
 Tenin, H. M.: Cancer Res. 26, 212. (1966).
 Thiery, J. P.: J. Microsc. 6, 987. (1967).
 Uzman, B. G., Saito, H. és Kasac, M.: Lab. Invest. 24, 492. (1971).
 Van Lennep, E. W. és Lanzing, W. J. R.: J. Ultrastruct. Res. 18, 333. (1967).
 Wetzel, B. K.: J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 711. (1961).