

AZ EHRLICH-ASCITESCARCINOMA SEJTEK A-VIRUSOKHOZ

HASONLÓ RÉSZECSKÉINEK JELLEMZÉSE

Egyetemi doktori értekezés

Bus Veronika



S Z E G E D

1 9 8 2.

B 5089



E 2.170

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton köszönöm meg Molnár János intézetvezető professzornak, hogy biztosította a feltételeket munkám elvégzésére a SZOTE, Orvosi-Biológiai Intézetében.

Köszönöm O.P. Szamarinának munkám elméleti és gyakorlati részéhez nyújtott útmutatását, valamint Dr. Szabó Gábornak a kísérleti munkák során nyújtott önzetlen segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Komáromy Lászlónak az elektronmikroszkópos felvételek elkészítéséért.

Szeretném megköszönni Révész Andrásnénak a kísérletek technikai részének gondos elvégzését.

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
1. BEVEZETÉS	1.
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	5.
2.1. A virusszerű A-részecskék izolálása	5.
2.2. A részecskék RNS tartalmának kivonása	6.
2.3. A részecskékből kivont RNS vizsgálata agaróz gélelektroforézissel	7.
2.4. A részecskék fehérjéinek elektrofore- tikus vizsgálata	8.
2.5. A részecskékhez kötött RNS-függő DNS polimeráz aktivitás mérése	9.
2.6. A részecskék elektronmikroszkópos vizsgálata	9.
3. EREDMÉNYEK	11.
3.1. Az A-partikulumok <u>in situ</u> kimutatása és morfológiai jellemzése Ehrlich as- cites sejtekből	11.
3.2. Az Ehrlich-sejtek A-virusszerű részecs- kéinek részleges tisztítása és biokémi- ai jellemzése	16.
3.3. Az Ehrlich ascites carcinoma sejtek A-partikulumainak ribonukleinsavai	20.
3.4. A részecske fehérjéi	22.
3.5. A részecskékhez kötött RNS-függő DNS polimeráz	24.
4. KÖVETKEZTETÉSEK	27.
5. IRODALOMJEGYZÉK	28.

1. BEVEZETÉS

Elsőként Bernhard /1960/ számolt be intracellulárisan előforduló vírus-szerű partikulumokról, amelyeket elsősorban tumoros sejtek citoplazmájában figyelt meg és A-partikulumoknak nevezte el őket. Ezek a partikulumok kb. 70 nm átmérőjűek és két koncentrikus membránburokból, valamint egy középen elhelyezkedő, elég nagy, elektrondenz "mag"-részből állnak. Sejten belüli elhelyezkedésük alapján két típusát lehetett elkülöníteni. Az egyik típus az intraciszternális térben helyezkedett el, míg a másik a ciszternákon kívül, a citoplazma-matrixba ágyazva, intracitoplazmatikusan. Az intracitoplazmatikus A-partikulumokat Bernhard a B-típusu, onkogén emlő-tumorvirus prekurzor alakjának tartja, hasonlóan Kuff és mtsai véleményéhez /1968/, akik MOPC 104E plazmasejt tumort vizsgáltak, és nem tartják kizártnak ők sem ezt a lehetőséget

Az intraciszternális A-partikulumok esetében kimutatható szoros összefüggést az onkogén B- és C-típusu partikulumokkal eddig még nem sikerült bizonyítani. Ugyanakkor Calarco és Szollosi /1973/ beszámolt arról is, hogy intraciszternális A-partikulumokat nemcsak tumorsejtekből tudnak kimutatni, hanem egér embrionális sejtekben /egészen korai, már 2-3 sejtes stádiumban/, sőt normál sejtekben is /Wivel és Smith, 1971/. Nagyobb mennyiségben azonban főleg neoplasztikus sejtekben fordulnak elő és különböző tumoros sejtvonalakból számos szerző izolálta /MOPC 460 - Robertson és mtsai., 1975; MOPC 104E - Kuff és

mtsai., 1968; N18 neuroblastoma - Wong-Staal és mtsai., 1975; FLOPC-1 - Krueger, 1976/.

Az izolált A-partikulumok biokémiai tulajdonságai, függetlenül attól, hogy milyen tumorsejtből izolálták, eléggé megegyeznek. Nem túl nagy mennyiségben, de mindegyikben megtalálhatók a nagy molekulásulyu 60-70 S, illetve 32-35 S RNS /Krueger, 1976; Wong-Staal, 1975/, de zömmel inkább kisebb molekulásulyúnak /5-15 S, Robertson, 1975/. A nagy molekulásulyu RNS-ek poly A⁺ véget tartalmaznak /3'/, ezek hossza 180-220 nukleotidnyi. A partikulum RNS-e RNase érzékeny, luggal degradálható, pronázra rezisztens /Krueger, 1976/. Ugyancsak kimutatható a partikulumban reverz transzkriptáz aktivitás /RNS-függő, DNS polimeráz mind endogén, mind exogén templát jelenlétében /Krueger, 1976; Robertson, 1975; Wong-Staal, 1975/.

A keletkező DNS produktum nem túl nagy, 4-10 S, és ha hibridizálják A-partikulum RNS-sel, mintegy 90% a homológ szekvencia bennük. Viszont, ha ugyanezt a DNS-t C-típusu oncornavirus 70 S RNS-sel /egér szarkóma, leukémia/ hibridizálják, akkor a fenti hibridizációnak csak mintegy a felét kapják /Krueger, 1976; Robertson, 1975/.

A partikulumokból izolálható fehérjék néhány fő komponens és több minor fehérjét tartalmaznak. A fő struktur-fehérjéje 70-73 ezer dalton molekulásulyu /Marciani és Kuff, 1973; Kuff és mtsai., 1972; Lueders és Kuff, 1975/, amely a belső membrán fő komponense. A külső membrán fő fehérjekomponense 80 000 dalton molekulásulyu. A minor proteinek zömmel 100 000, 46 000 és 30 000 daltonosak

/Lueders és Kuff, 1975/.

A fehérjék antigenitási vizsgálatával az A-partikulumok és a C-típusu partikulumok között kapcsolatot nem találtak /Lueders és Kuff, 1975/.

Mind morfológiai, mind biokémiai jellemzőik alapján az intraciszternális A-partikulumok és a C-típusu onkogén RNS vírusok számos közös tulajdonsággal rendelkeznek, ugyanakkor különbségek is vannak, amelyek közül igen lényeges, hogy az intraciszternális A-partikulum transzformáló hatással nem rendelkezik. Terjedése tehát csak vertikális lehet.

Yang és Wivel /1973/ feltételezik, hogy a tumorsejtekben kísérőként szinte mindig megjelenő A-partikulumok vagy valamilyen rendellenes sejtalkotó vagy egy biológiailag defektív vírus. Ez utóbbit több kísérleti adat is alátámasztja. Így például a reverz transzkriptáz jelenléte, hiszen ez tipikus RNS-vírus sajátosság. Ugyanakkor az irodalomból ismert, hogy létezik olyan RSV₀ /Hanafusa, 1971/ C-típusu RNS-vírus mutáns, amelynek reverz transzkriptáz deficienciája van.

Az A-partikulum 70 S RNS-ét cDNS-be átírva és vizsgálva annak reasszociációs kinetikáját normál sejtvonal genom DNS-sel, azt az eredményt kapták, hogy a 70 S RNS-t kódoló szekvencia jelen van és igen magas ismétlődést mutat a normál genomban /Masao Ono és mtsai., 1980/. Hasonló eredményekről számol be Lueders és Kuff /1977/.

Ez magyarázattal szolgálhat arra, hogy bár az izolált intraciszternális A-partikulumokkal transzformációt eddig

még nem sikerült elérni, mégis, a tumoros sejtvonalakban szinte kivétel nélkül, az embrionális fejlődés során különböző mértékben, de szintén megtalálhatók, és - nem túl gyakran ugyan -, de normál sejtekben is előfordulnak. Ennek alapján feltételezik, hogy az A-partikulum genetika információja egy nagyon régi vírusfertőzés során integrálódott a genomba.

Az eddig összegyűlt kísérleti adatok alapján - a számos közös sajátság a C-tipusu onkogén RNS vírus és az A-partikulum között - ha nem is bizonyított, de nem zárható ki az A-partikulum és a tumor keletkezés közti kapcsolat. Hogy ezen feltételezést kísérletesen bizonyítsuk, szükség van ezen A-tipusu partikulumok tulajdonságainak pontosabb, részletesebb megismerésére, és az ehhez megfelelő izolálási módszerek kidolgozására.

Ezért a jelen doktori értekezés célja megfelelő módszer kidolgozása az A-partikulum izolálására, Ehrlich ascites carcinoma sejtekből, és az izolált partikulum jellemzése. Ami lehetővé teszi a továbbiakban az A-partikulumok és a tumor-keletkezés közti kapcsolat vizsgálatát.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. A virusszerű A-részecskék izolálása

Mindkét nembéli, 30-40 g súlyu BALB/C egereket kb. 10^8 számu, friss ascitesfolyadékból származó Ehrlich carcinosomasejttel oltottunk intraperitoneálisan. Az állatokban kb.: egy hét alatt 5-6 ml ascites alakult ki, s hasüri bevérzés csak ritkán volt tapasztalható. Véres ascitest nem használtunk fel. Kisérletenként 4-6 állatból származó ascitesfolyadékot dolgoztunk fel. Az ascitest sterilen bocsájtottuk le, az állat hasüregét kétszer átmostuk 10 mM TRIS-HCl /pH 7,4/ buffert tartalmazó fiziológias sóoldattal. A sejteket 4°C -on 5 percig $550 \times g$ -vel centrifugáltuk, a felüluszt elöntöttük. A sejteket óvatos keveréssel a fenti sóoldatban szuszpendáltuk, majd a centrifugálást megismételtük. Egy további, hasonló mosás után a sejteket lizáló buffer ötszörös térfogatnyi mennyiségében kevertük el /0,25 M szaharóz, 0,05 M NaCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM ditiotreitol, 20 mM TRIS-HCl, pH 7,4/, majd lassan Triton X-100-at adtunk hozzá, 0,5% végső koncentrációig /Kuff és mtsai., 1968; Wong-Staal és mtsai., 1975/.

Az anyagot Dounce-homogenizátorban homogenizáltuk, míg fáziskontraszt mikroszkópban ép sejtek többé nem voltak megfigyelhetők /15-20 huzás/. A homogenátumot ezután 2,5-szeresen hígítottuk lizáló bufferrel és EDTA-val, 0,2% Triton X-100 és 10 mM EDTA koncentrációig. A szuszpenzióból 30 perces $2\,500 \times g$ -vel történő centrifu-

gálással a sejtmagokat leülepitjük. A felülszót 10 ml-es 40% /1,17 g/cm³ sűrűségű/ szaharóz "párnára" rétegeztük, s Beckman SW 28 rotorban 16 óráig, 110 000 x g-vel centrifugáltuk 4°C-on.

A kapott üledéket szaharóz bufferben oldottuk /10 mM TRIS-HCl, pH 7,4, 10 mM EDTA, 1 mM ditiotritol/, majd a benne lévő kromatin degradációja céljából ötször átpréseltük vékony, 23-as injekciós tűn. A mechanikus feltárás során virusszerű részecskék leválnak a membrántörmelékről /Krueger, 1976/.

A kapott anyagot 33-68%-os / s/tf / szaharóz grádiens-re rétegeztük, s Beckman SW 28.1 rotorban 16 óráig centrifugáltuk, 4°C-on, 25 000 ford/perc sebességgel /Yang és Wivel, 1973/. A csövek tartalmából kb.: 24 frakciót gyűjtöttünk, s mértük a frakciók abszorbanciáját 260 nm-en, s törésmutatóját, a sűrűség meghatározása céljából.

A részecskék a szaharózgrádiens 1,20 - 1,24 g/cm³ sűrűségi zónájában helyezkedtek el. A további feldolgozásra kerülő részecskéket az összegyűjtött frakciók anyagából 100 000 x g, 1 órás centrifugálással ülepitettük ki, miután szaharóz-bufferrel 2-3-szorosára hígítottuk azokat. A kapott üledéket további felhasználásig folyékony nitrogénben tároltuk.

2.2. A részecskék RNS tartalmának kivonása

A szaharóz grádiensen tisztított részecskékből az RNS-t SDS-fenol extrakcióval vontuk ki. A részecskékből álló üledéket NET-bufferben /0,1 M NaCl, 0,01 M TRIS-HCl



pH 7,4, 1 mM EDTA/ oldottuk, s SDS-t adtunk hozzá 1% végső koncentrációig. Az oldathoz azonos térfogatu, NET-bufferrel telített, pH 8,0-as fenolt adtunk, 10 percig ráztuk, s a fázisokat centrifugálással választottuk szét. Az extrakciót megismételtük, ezután 1:1 arányu fenol-kloroform eleggyel, majd kloroformmal újabb extrakciókat végeztünk. Az utolsó extrakció után a vizes fázishoz 0,1 tf 2,0 M Na-acetátot /pH 5,0/ adtunk, s az RNS-t 2,5 tf jéghideg abszolút etanol hozzáadásával csaptuk ki. Az elegyet éjszakán át -20°C-on tartottuk, majd SE 28 rotorban 25 000 ford/perc sebességgel 45 percig centrifugáltuk. Az üledéket ismét NET-ben oldottuk, s a kicsapást megismételtük. További feldolgozás előtt az RNS-üledéket feloldás nélkül ismételten alkohollal mostuk és centrifugáltuk.

2.3. A részecskékből kivont RNS vizsgálata agaróz gél elektroforézissel

A 2.2. pontban leírtak szerint preparált RNS-t agaróz gél elektroforézissel vizsgáltuk /Rosen és mtsai., 1975; Lehrach és mtsai., 1977/.

170 x 150 x 3 mm-es, 6 M ureát tartalmazó, 1,5%-os agaróz /Agarose, Sigma Type V/ lemezen végeztük a futtatást. Horizontális rendszerben, 10 V/cm lépcsőfeszültséggel, 4,5 - 5 órát futtattunk szobahőmérsékleten. Az elektródpuffer 25 mM-os citrát-puffer volt /pH 3,5/, de urea nélkül. Az RNS-t 50°C-os 6 M urea, 50% formamid

oldatban oldottuk fel. A minta alapos denaturációja céljából 10 percig 50°C-on tartottuk, majd a renaturáció elkerülésére hirtelen hűtöttük le, jeges vízben. A felvitel előtt még jelzőfestékként brómfenolkéket adtunk a mintákhoz /6 M urea, 50% formamid oldatban oldva/. Markerként patkánymájából izolált citoplazmatikus RNS keveréket használtunk /28 S, 18 S, 5,8 S, 5 S, 4 S/.

A futtatás után a gélt 0,1 M ammónium-acetátban mostuk 2 x 5 percig, majd 10 µg/ml etidium-bromid oldatban festettük 20 percig. Festés után a színezék feleslegét desztillált vízzel kimostuk és a géleket ultraibolya /254 nm/ fénnel megvilágítva fényképeztük. Az elektroferogramok további értékelése a fénykép alapján történt.

2.4. A részecskék fehérjéinek elektroforetikus vizsgálata

A virusszerű részecskéket tartalmazó, szaharóz gradiensből nyert frakciót 10% triklórecetsavval kicsaptuk. Az ebből kapott csapadékot alacsony fordulattal lecentrifugáltuk, mostuk hidegen 70, majd 96%-os etanollal, vákuum-exszikkátorban kiszáritottuk. A száritott fehérjeport feloldottuk és a Laemmli és Favre /1973/ által leírt módszerrel SDS-poliakrilamid géllemezen elektroforetizáltuk. A gél 9% akrilamidot, 0,2% metilén-bisz-akrilamidot tartalmazott. Futtatás után 25% izo-propanol, 10% ecetsav, 0,05% Coomassie Brilliant Blue R 250 keverékben festettünk éjszakán át, 10% izo-propanol, 10% ecetsav oldatban differenciáltunk. A géleket nedves állapotban sárga szűrővel fényképeztük.

2.5. A részecskékhez kötött RNS-függő DNS polimeráz aktivitás mérése

Az endogén reverz transzkriptáz aktivitás mérésére használt reakcióelegy az egér myeloma sejtek A-részecskéire leírt módszernek felelt meg /Robertson és mtsai., 1975/. Az in vitro DNS szintetizáló rendszer 50 μ l végtérfogatban 50 mM TRIS-HCl pH 8,3, 12 mM Mg-acetát, 200 mM KCl, 6 mM 2-merkaptotanol, 350 μ g/ml marhaszérum albumin, 0,2% Triton X-100, 19 tf% glicerin, 0,3 mM ^3H dTTP /500 cpm $\cdot$ perc $^{-1}\cdot$ pmol $^{-1}$ /, 0,5 mM - 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP tartalmu volt, amelyhez 20 μ l-nyit adtunk a grádiens egyes frakcióiból.

A dezoxitrifoszfátokat nem tartalmazó, kétszeresen koncentrált reakcióelegyet a frakciókhoz adtuk, Vortexen alaposan összekeverve, jégben 10 percig előinkubáltuk a kötött revertáz felszabadítása céljából. Ezt követően a hideg, végül a jelzett nukleozid-trifoszfátot hozzáadva a reakciót elindítottuk. 37°C-on 90 perces inkubáció után aliquotokat szárítottunk Whatman GF/C boroszilikát szűrőkorongokra, mostuk őket 5%-os hideg triklórecet-savval és 96%-os alkohollal. A száraz filterekhez kötött radioaktivitást toluol-alapu szcintillációs keverékben LKB szcintillációs számlálóban mértük.

2.6. A részecskék elektronmikroszkópos vizsgálata

A szaharóz grádiensben tisztított A-partikulumokat a felhigitott frakciókból lecentrifugáltuk /100 000 x g, 45 perc, 4°C/, s az üledéket in situ rögzítettük 100 mM-

os kakodiláttal /pH 7,2/ pufferolt 2,5%-os glutáraldehiddel. Az utánfixálás 2%-os OsO_4 -dal, a beágyazás Epon-Araldit keverékbe történt. A metszést LKB ultramikrotommal végeztük. A metszetek kontrasztosítása uranilacetáttal és ólomcitráttal történt. A metszete-
ket JEOL 100-C típusu elektronmikroszkóppal 80 kV gyorsító feszültségnél vizsgáltuk.

Az ascites-sejtek előkészítése a leirtakhoz hasonlóan történt, kiméletesen centrifugált ascites-sejt üledékből.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Az A-partikulumok in situ kimutatása és morfológiai jellemzése Ehrlich ascites sejtekből

A_részecskék_lokalizációja.

Irodalmi adatok szerint az A-partikulumok megjelenése tumor-sejtek citoplazmájában számos, különböző egér sejtvonalban is megfigyelhető.

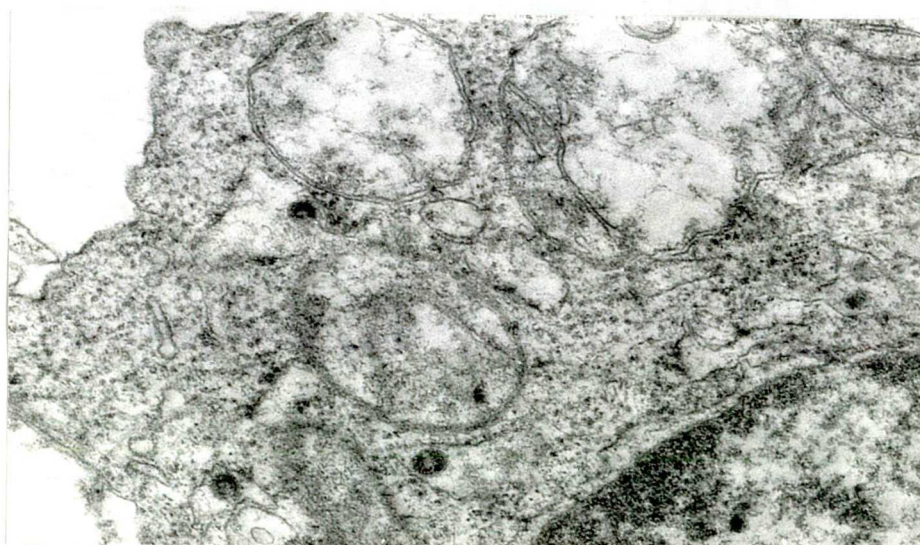
Ehrlich ascites carcinoma sejtekben A-típusu vírus-szerű részecskéknek megfelelő képződmények szintén a sejtek citoplazmájában figyelhetők meg. Többnyire az endoplazmatikus hálózat kiszélesedett ciszternáiban helyezkednek el.

Az 1/a elektronmikroszkópos felvételen a képletek láthatók. Nagyobb nagyításban /80 000 x/ jól megfigyelhető a nagy elektronszórású mag és az azt körülvevő kettős membránt tartalmazó, 70 - 100 nm átmérőjű partikulum /1/b ábra/. Más, A-vírusrészecskét tartalmazó sejtekhez /MOPC, neuroblastoma; Kuff és mtsai., 1968; Calarco és Szollosi, 1973/ képest jóval kevesebb vírus-szerű részecske figyelhető meg Ehrlich sejtekben.

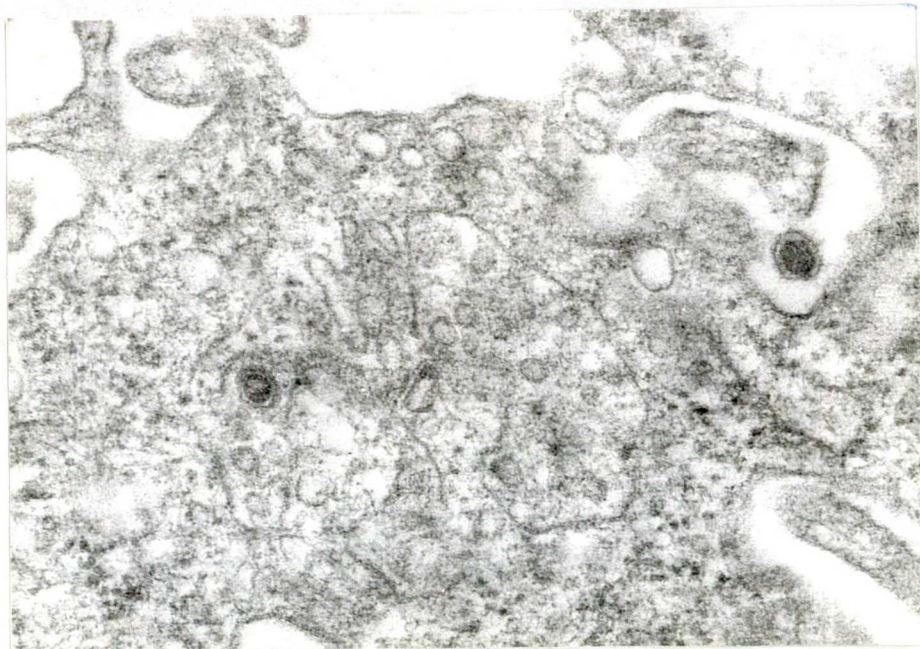
A felvételeken az intraciszternális A-partikulumok többnyire egyesével helyezkednek el /1/a; 1/b ábra/, csoportok előfordulás ritkábban figyelhető meg /1/c ábra/.

1. ábra

Ehrlich ascites carcinomasejtekben található virus-
szerű partikulumok in situ elektronmikroszkópos képe



1/a : Intraciszternális A-partikulumok
39 000-szeres nagyítás

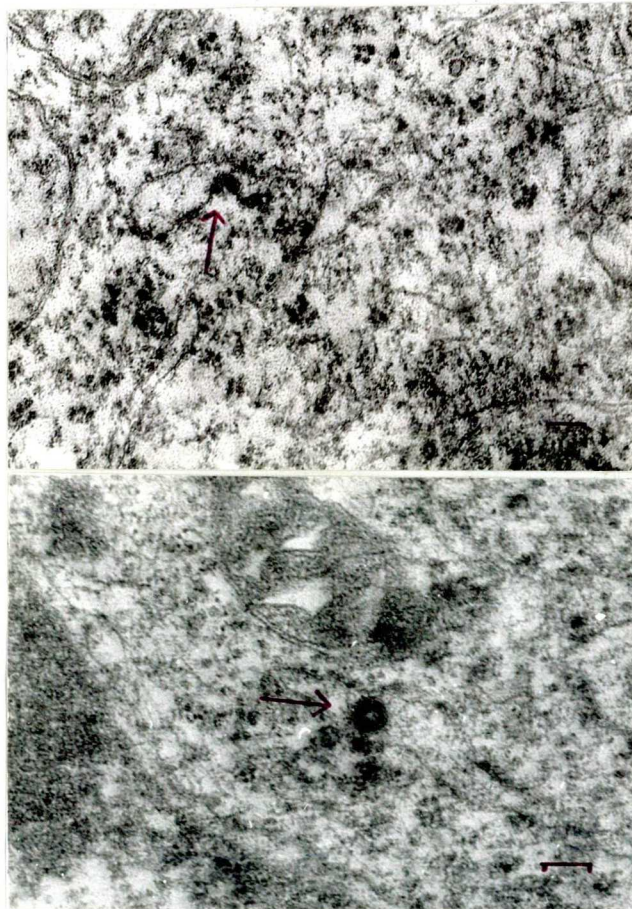


1/b : Intraciszternális A-partikulum
60 000-szeres nagyítás



1/c : Csoportosan elhelyezkedő intraciszternális
A-partikulumok
80 000-szeres nagyítás

Az intraciszternális A-partikulumok az un. "budding" során jutnak be a ciszternába. Ennek során a "core"-partikulum a sejt endoplazmatikus membránjának segítségével lefűződik az intraciszternális tér felé /2. ábra/.

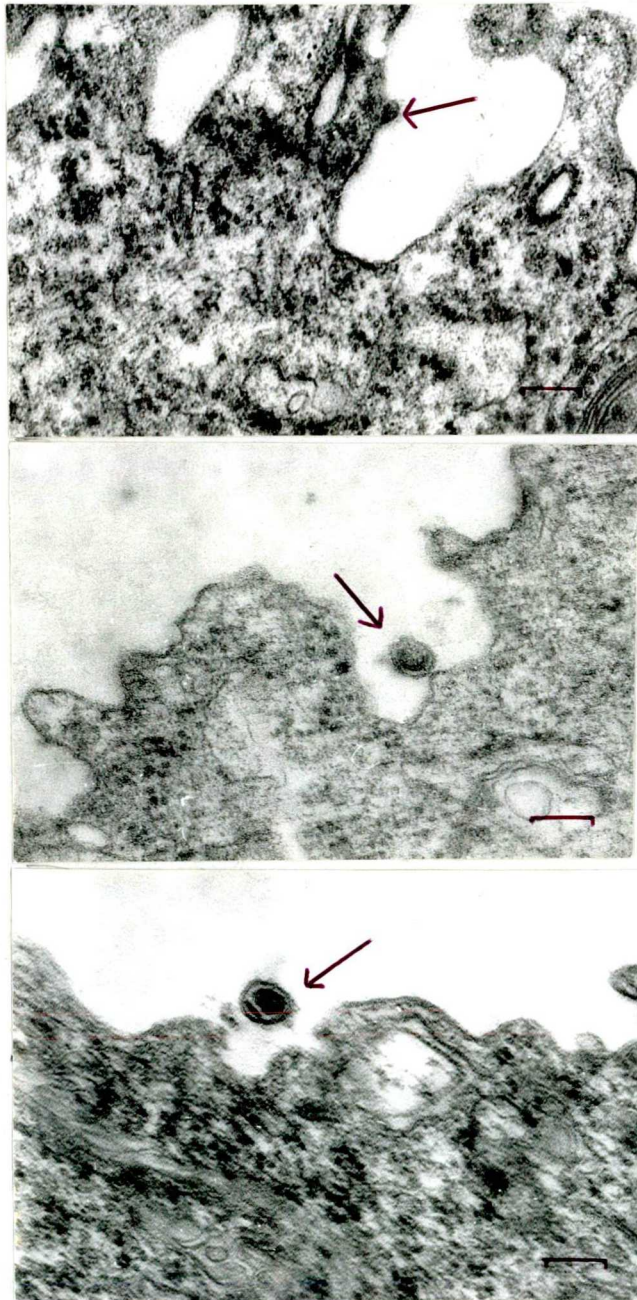


2. ábra

A-partikulumok lefűződése és az intraciszternális térbe jutása un. "budding" mechanizmussal

— : 100 nm

Hasonló partikulumok igen ritkán extraciszternálisan is megfigyelhetők. Ennél viszonylag gyakrabban megfigyelhető jelenség a részecskék kijutása az extracelluláris térbe, szintén "budding" mechanizmussal /3/a; 3/b; 3/c ábra/.



3. ábra

A-partikulumok extracelluláris formái Ehrlich ascites
tumorsejtekben

— : 200 nm



3.2. Az Ehrlich-sejtek A-virusszerű részecskéinek részleges tisztítása és biokémiai jellemzése

Izopiknikus szaharózgrádiens centrifugálás.

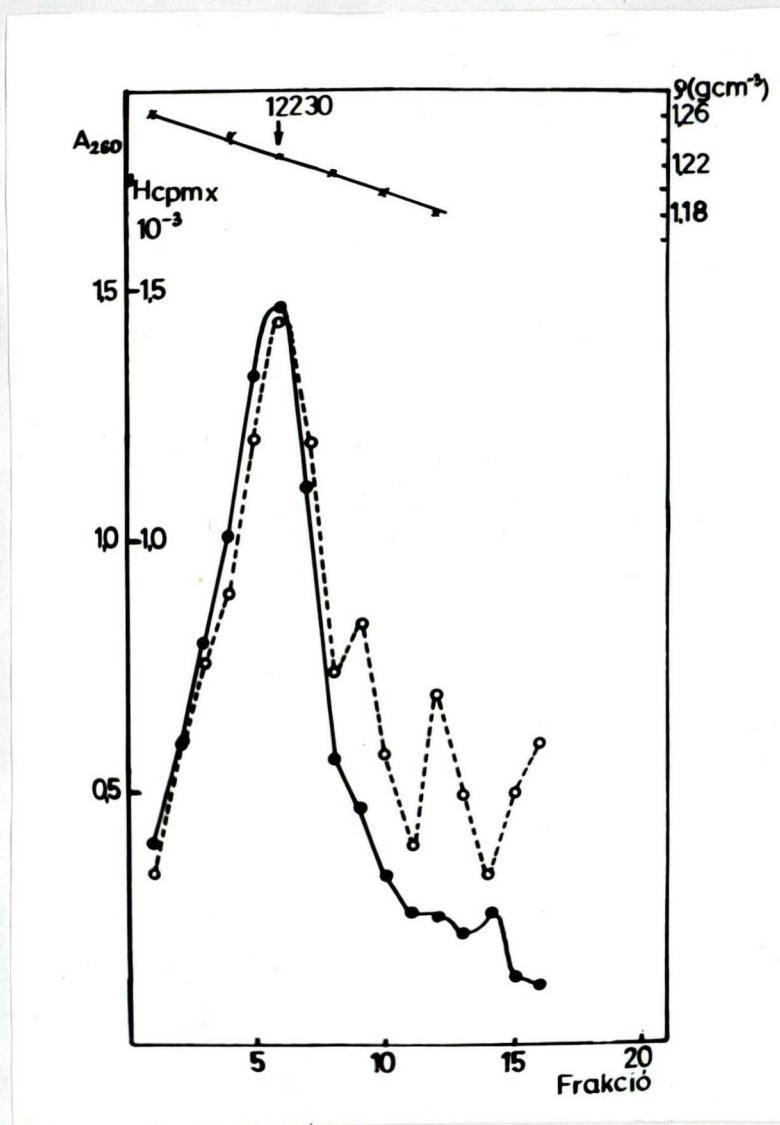
Az A-partikulum RNS-ének jelölésére a daganat átoltását követő hatodik és hetedik napon $7,4 - 7,4 \text{ MBq } ^3\text{H-Na-}$ -orotátot adtunk intraperitoneálisan, s a daganatsejteket a nyolcadik napon bocsájtottuk le. Az A-partikulumokat a tumor sejtekből az Anyagok és Módszerek című fejezetben leírtak szerint izoláltuk /lásd: alább/.

Az izolálás során a sejteket redukáló közegben és detergens jelenlétében homogenizálva /lásd: 2.1. fejezet/ nemcsak a sejtmembránok degradálódnak, hanem a sejt belső membránrendszere is. Mint ismeretes, ilyenkor a külső magmembrán is tönkremegy, s hogy a sejtmagok ilyenkor még egészében leülepíthetők, az a magok ellenálló matrixszerkezetének köszönhető. A kiindulási anyagként szolgáló, a magok leülepitése után kapott felüluszó így főleg citoplazma-törmeléket tartalmazott. A hozzáadott EDTA hatására szétestek a riboszómák is, s az alacsony ionerősség mellett a legtöbb nukleoproteid erősen duzzadt állapotban van. A citoplazma extraktumot az $1,17 \text{ g/cm}^3$ sűrűségű szaharózrétegen átülepítve, eleve csak a legkevésbé duzzadt, kompakt képződmények jutnak át: a vírus-részecskék mellett kevés kromatin /nyilván különösen kompakt szerkezetű heterokromatin-törmelék/ és riboszómális eredetű anyag. A virusszerű partikulumokat a hozzájuk kötve maradt membrántörmeléktől és

kromatin szennyezéstől hidrodinamikus zuzással megszabadítottuk /injekciós tűn való átpréseléssel/. Az A-partikulum további tisztítását 33 - 68%-os izopiknikus szacharóz grádiensben történő centrifugálással végeztük. A partikulum a grádiens $1,22 \text{ g/cm}^3$ zónájában /SW 55 rotorban 45 000 ford/perc sebességgel centrifugálva 18 óra alatt/ jut egyensúlyba /4. ábra/.

A fent említett centrifugálási körülmények között az A-partikulumokkal nagy mennyiségű riboszóma is koszedimentál. Valóban a grádiens $1,22 \text{ g/cm}^3$ zónáját kiülepítve és elektronmikroszkóposan vizsgálva /lásd: Anyagok és Módszerek című fejezet 2.6. pontja/ a viruspartikulumok mellett nagy mennyiségű riboszóma-szennyeződés látható /5. ábra/.

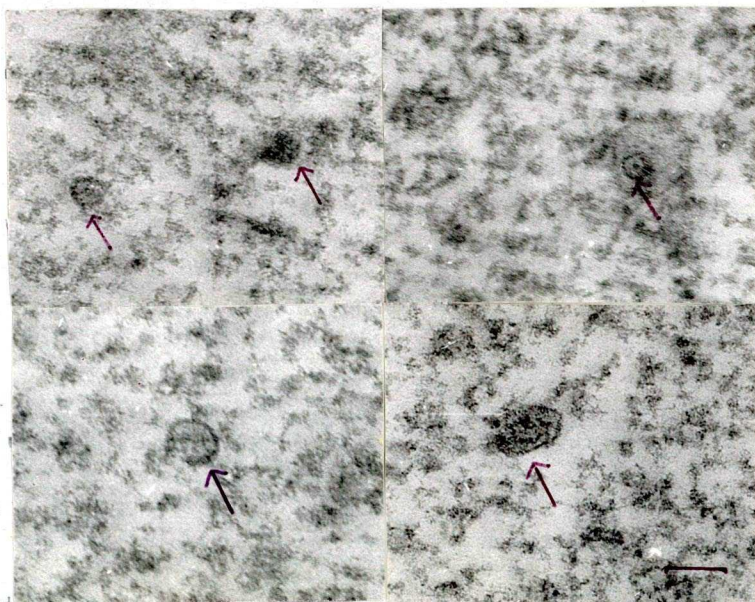
Később, amikor a futtatás sebességét 25 000 ford/percre csökkentettük, a virusszerű részecskék változatlan helyen jelentkeztek, de a riboszóma eredetű frakció alig mozdult el, a grádiens tetején maradt. Ilyen futtatás szedimentogramját mutatja a később ismerttetett 8. ábra is.



4. ábra

^3H -orotsavval jelölt Ehrlich ascites A-partikulumok szedimentációja 33-68%-os izopiknikus cukorgrádiensben. SW 55 rotor; 45 000 ford/perc; 18 óra.

- • - optikai denzitás 260 nm-en
- o - ^3H -savval kicsapható radioaktivitás



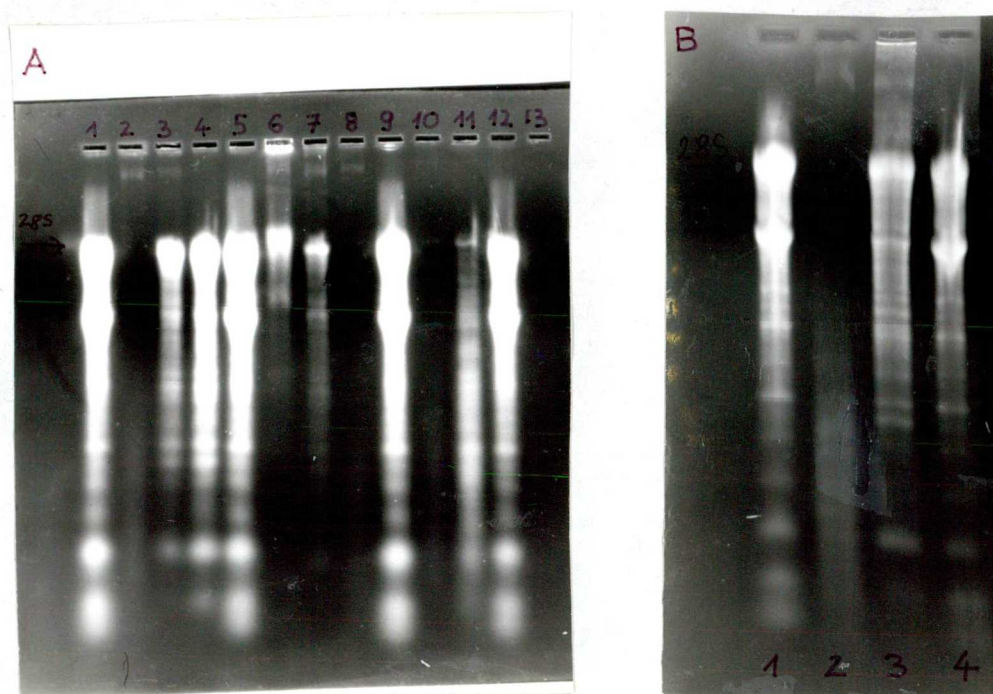
5. ábra

Izolált cukorgrádiensben tisztított A-partikulumok
ultravékony elektronmikroszkópos metszete

— : 100 nm

3.3. Az Ehrlich ascites carcinoma sejtek A-partikulumai- nak ribonukleinsavai

A szaharózgrádiensben tisztított részecskékből az Anyagok és Módszerek című fejezet 2.2. pontjában leírt módon állítottunk elő RNS-t és analizáltuk agarózgél elektroforézissel. A 6. ábrán látható, hogy a meg lehetős heterogén eloszlású RNS-ek a grádiens mentén végig, minden frakcióban megtalálhatók, de emellett a peaknek megfelelően megjelenik egy 60-70 S és egy kisebb, 32-35 S komponens. A 28 S-nél kisebb RNS populáció, részben a partikulum saját nagy molekulású RNS-einek degradációs termékei, és kis molekulású RNS-ei, valamint riboszómális RNS-ektől származó szennyeződés. A grádiens könnyebb zónájából /riboszóma csucs/ izolált RNS profilja megegyezik a markerével /6. ábra/. A jellemzést igen megnehezíti, hogy ebben a tartományban /32-60 S/ nehéz megfelelő RNS markert találni, s a bomlékony RNS teljes denaturációja sem érhető el biztosan annak veszélye nélkül, hogy az RNS közben ne degradálódna. Egyes frakciókban megfigyelhető, hogy a start-zónában "beragadt", el nem mozdult anyag van, ami feltehetően DNS természetű.



6. ábra

Intraciszternális A-partikulumokból izolált RNS elektroforézise 6 M ureát tartalmazó 1,5%-os agaróz gélben /10 V/cm - 5,4 - 5 óra/

Festés: 10 µg/ml Etidiumbromid 20'

A : 1 - 5 - 9 - 12: patkánymáj citoplazmatikus RNS marker
2 - 8 : a grádiens $1,22 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ zónájából izolált RNS két különböző kísérletből;
3 - 7 : ugyanaz, mint a 2-8, csak nagyobb mennyiségű RNS került felvitelre;
4 : a grádiens könnyebb zónájából izolált RNS.

B : 1 - 2 - 3 - 4 : Az A 1-2-3-4 hosszabb ideig exponálva, nagyobb nagyításban.

3.4. A részecske fehérjéi

A szaharózgrádiensen tisztított részecskék fehérjéinek elektroforetikus képe jóval egyértelműbb, mint az RNS-eké. Denaturáló körülmények között, 9%-os SDS-poliakrilamid gélben futtatva /lásd: Anyagok és Módszerek című fejezet, 2.4. pontja/ kilenc kifejezett frakció ismerhető fel, ezek molekulásúlya csökkenő sorrendben: 176, 151, 97, 94, 82, 60, 45, 36 és 31 kilodalton. A többi, egérből izolált ismert A-részecskében jellemző egy 73 000 molekula tömegű fő fehérjekomponens /Lueders és Kuff, 1975; Kuff és mtsai., 1972/, ezt Ehrlich sejtekből kimutatni nem lehetett. A 7. ábrán látható elektroferogramok szerint legnagyobb mennyiségben a 45, 60 és 97 kd tomegű fehérjekomponensek figyelhetők meg /7. ábra/.

Kísérleteink alapján nem ítéltethető meg e fehérjék élettani szerepe, csupán annyi, hogy az RNS-függő DNS polimeráz a nehéz frakciók valamelyike lehet.



7. ábra

Ehrlich ascites tumor sejtekből izolált A-partikulumok
fehérjéinek SDS-poliakrilamid gélelektroforézise

/9%-os 1 mm vastag slab gél; 120 V - 5 óra/

Festés : 0,05%-os Comassie Brilliant Blue R 250

1. Marker - ovalbumin /43000/

3.-5. Marker - foszforiláz "b" /94000/, albumin /67000/.
ovalbumin /43000/, karbonanhydráz
/30000/

2. Gradiens /8. ábra/ csúcs fehérjéi /11 fr/

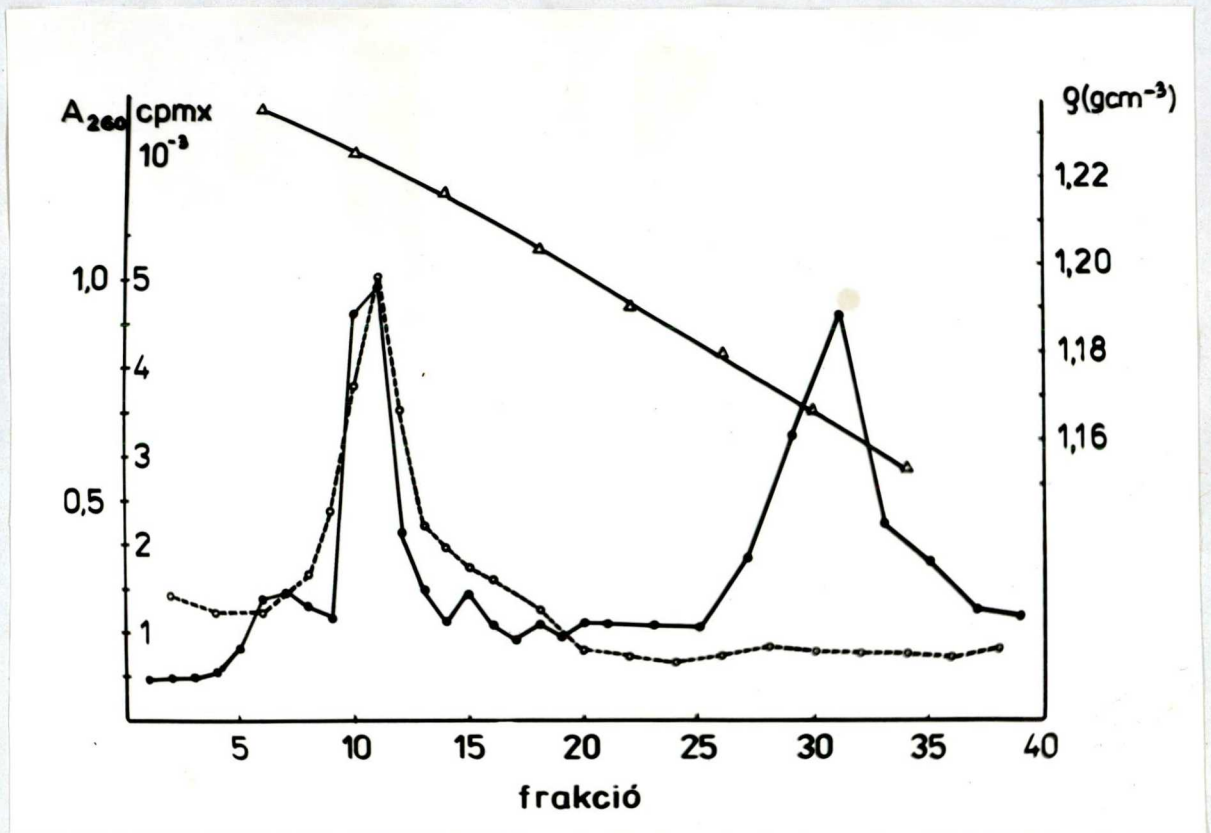
4. Gradiens /8. ábra/ 10-12-13 fr. fehérjéi

3.5. A részecskékhez kötött RNS-függő DNS polimeráz

A grádiens különböző frakcióit dezoxi-ribonukleozid trifoszfátokkal /dTTP, triciált volt/, oligo /dT/₈₋₁₂ primer jelenlétében inkubálva az A-partikulumokat tartalmazó zóna poli-dezoxiribonukleotid láncot szintetizált /lásd: Anyagok és Módszerek című fejezet, 2.5. pontja/. Mivel a virusszerű partikulumok DNS-t nem tartalmaznak, így templátként csak a partikulum saját RNS-e jöhet szóba.

Ez azt bizonyítja, hogy a partikulumok reverz transzkriptáz aktivitással rendelkeznek /8. ábra/. Ezt alátámasztja az is, hogy az enzimaktivitás RNase érzékeny volt. A grádiens egyéb zónájában reverz transzkriptáz aktivitás nem volt mérhető.

Az általunk izolált entitások virusszerű jellegének legfontosabb bizonyítéka, hogy endogén DNS polimeráz aktivitással rendelkeznek. Mivel a részecskék DNS-t nem tartalmaznak, nyilvánvalóan revertáz hatásról van szó. Az Anyagok és Módszerek című fejezet 2.5. pontjában leírtak szerint meghatároztuk a részecskék végső tisztítására használt szaharóz sűrűséggrádiens frakcióinak endogén DNS polimeráz aktivitását /8. ábra/. Az enzimaktivitás RNase érzékeny volt, s maximuma egybeesett a grádiens $1,22 \text{ g/cm}^3$ sűrűségű szakaszával, ahol a részecskék egyébként is kimutathatók voltak. Az $1,22 \text{ g/cm}^3$ peaken kívül revertáz aktivitás nem volt mérhető a grádiens frakcióiban.



8. ábra

Izopiknikus cukorgrádiensben /33-68% szaharóz SW 28'1 rotor 25 000 ford/perc; 16 óra/ tisztított A-partikulumok endogén reverz transzkriptáz aktivitása.

- • - 260 nm-en mért optikai denzitás
Az $1,22 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ sűrűségű csucs felel meg az A-partikulumoknak. A könnyebb zóna a riboszómális szennyezést tartalmazza.
- o - Endogén reverz transzkriptáz aktivitás
 ^3H -TTP-ből polinukleozid láncba beépült savval kicsapható radioaktivitás.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

1. In situ ELMI felvételeken kimutattuk, hogy az Ehrlich ascites tumor sejtek is tartalmazznak a citoplazmájukban virusszerű A-partikulumokat. Elhelyezkedésük főleg intraciszternális, bár néhány esetben extracelluláris lokalizáció is megfigyelhető. Ezen részecskékre, egyéb tumor sejtekből izoláltakéhoz hasonlóan, jellemző az elektrondenz mag és az azt körülvevő kettős membrán. Méretük kb. 70 nm.
2. Ezen részecskéket 33 - 68 %-os izopiknikus cukorgrádiensben részlegesen tisztítottuk, sűrűségük $1,22 \text{ g/cm}^3$.
3. Elektroforézissel az intraciszternális A-partikulumokra jellemző 60 - 70 S, illetve 32 - 35 S RNS-ek Ehrlich ascites A-partikulumaiban is kimutathatók.
4. Az A-partikulum fehérje profilja heterogénebb, mint az irodalomban általában közölt egyéb A-partikulumok fehérjéi. Fő fehérjéi: 45, 60 és 97 kd tömegűek.
5. Kimutattuk, hogy ezen partikulumok endogén reverz transzkriptáz aktivitással is rendelkeznek.



Tehát az Ehrlich ascites carcinoma sejtekben található és azokból izolálható részecskék tulajdonságaik alapján virusszerű intraciszternális A-partikulumoknak tekinthetők.

A virusszerű intraciszternális A-partikulum jellemzése és tisztítására kidolgozott módszer lehetővé teszi, hogy a jövőben behatóbban vizsgálhassuk az onkogén vírusok, és az A-partikulumok közötti kapcsolatot, amely feltehetően közelebb visz a vírus-aetiológiájú tumorok keletkezésének megismeréséhez.

5. IRCDALOMJEGYZÉK

1. BERNHARD,W. /1960/ The detection and study of tumor viruses with the electron microscope.
Cancer Res., 20:712-727.
2. CALARCO,P.G. and SZOLLOSI,D. /1973/ Intracisternal A-Particles in Ova and Preimplantation Stages of the Mouse. Nature, New Biology, 243:91-93.
3. HANAFUSA,H. and HANAFUSA,T. /1971/ Noninfectious RSV deficient in DNA polimerase.
Virology, 43:313-316.
4. KRUEGER,R.G. /1976/ Intracisternal A-Particles from FLOPC-1 BALB/c Myeloma: Presence of High-Molecular-Weight RNA and RNA-Dependent DNA Polymerase.
Journal of Virology, 18 /2/:745-756.
5. KUFF,E.L., WIVEL,N.A. and LUEDERS,K.K. /1968/ The Extraction of Intracisternal A-Particles from a Mouse Plasma-Cell Tumor.
Cancer Research, 28:2137-2148.
6. KUFF,E.L., LUEDERS,K.K., OZER,H.L. and WIVEL,N.A./1972/ Some Structural and Antigenic Proporties of Intracisternal A-Particles Occuring in Mouse Tumors.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69 /1/:218-222.

7. LAEMMLI, U.K. /1970/ Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature /London/ 227:680-685.
8. LEHRACH, H., DIAMOND, D., WOZNEY, J.M. and BOEDTKER, H. /1977/ RNA Molecular Weight Determinations by Gel Electrophoresis under Denaturing Conditions, a Critical Reexamination. Biochemistry, 16/21/:4743-4751.
9. LUEDERS, K.K. and KUFF, E.L. /1975/ Synthesis and Turnover of Intracisternal A-Particle Structural Protein in Cultured Neuroblastoma Cells. J. Biol. Chem., 250:5192-5199.
10. LUEDERS, K.K. and KUFF, E.L. /1977/ Sequences Associated with Intracisternal A-Particles are Reiterated in the Mouse Genome. Cell, 12:963-972.
11. LUEDERS, K.K., SEGAL, S. and KUFF, E.L. /1977/ RNA Sequences Specifically Associated with Mouse Intracisternal A-Particles. Cell, 11:83-94.
12. MARCIANI, D.J. and KUFF, E.L. /1973/ Isolation and Partial Characterization of the Internal Structural Proteins from Murine Intracisternal A-Particles. Biochemistry, 12/25/:5075-5083.
13. ONO, M., COLE, M.D., WHITE, A.T. and HUANG, R.C.C. /1980/ Sequence Organization of Cloned Intracisternal A-Particle Genes. Cell, 21:465-473.

14. ROSEN, J.M., WOO, S.L.C., HOLDER, J.W., MEANS, A.R.
and O'MALLEY, B.W. /1975/ Preparation and Preliminary
Characterization of Purified Ovalbumin Messenger
RNA from the Hen oviduct.
Biochemistry, 14 /1/:69-78.
15. ROBERTSON, D.L., BAENZIGER, N.L., DOBBERTIN, D.C. and
THACH, R.E. /1975/ Characterization of DNA Polyme-
rase and RNA Associated with A-Type Particles from
Murine Myeloma Cells.
Journal of Virology, 15 /2/:407-415.
16. YANG, S.S. and WIVEL, N.A. /1973/ Analysis of High-
-Molecular-Weight Ribonucleic Acid Associated with
Intracisternal A-Particles.
Journal of Virology, 11 /2/:287-298.
17. WIVEL, N.A. and SMITH, G.H. /1971/ Distribution of
intracisternal A-particles in a variety of normal
and neoplastic tissues.
Int. J. Cancer, 7:167-175.
18. WONG-STAAAL, F., REITZ, M.S.Jr., TRAINOR, C.D. and
GALLO, R.C. /1975/ Murine Intracisternal Type A-
-Particles: a Biochemical Characterization.
Journal of Virology, 16 /4/:887-896.

