

## **Intracristale lineare Einschlüsse in Mitochondrien menschlicher Rhabdomyomzellen**

K.-H. Marquart

Abteilung für Allgemeine und Experimentelle Pathologie,  
Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München,  
Ingolstädter Landstraße 1, D-8042 Neuherberg, Bundesrepublik Deutschland

### **Intracristal Linear Inclusions in Mitochondria of Human Rhabdomyoma Cells**

**Summary.** Electron microscopic study of a rhabdomyoma of the soft palate of a 50-year-old woman revealed linear structures within the intracristal spaces of mitochondria. In the center of most cristae, an electron-dense line was found located in parallel arrangement to the limiting cristal membrane. The linear inclusion was separated from the cristal membrane by a narrow space of lower electron-density. Thus, when sectioned longitudinally, the abnormal cristae exhibited a pentalaminar appearance. Additionally, they were characterized by a greater diameter than that of normal cristae and a "rigid" configuration. Higher magnification showed that the intracristal line consisted of a row of periodically arranged, electron-dense dots. Sometimes, these seemed to be connected with the wall of the intracristal space by fine, electron-dense cross-striations.

In some mitochondria of rhabdomyoma cells, crystals with a linear substructure were observed in both intra- and extracristal spaces. The crystalline bodies located within cristae had probably been formed by accumulation of linear inclusions. The extracristal bodies seemed to have arisen from fusion of pentalaminar cristae.

It is supposed that the intracristal linear inclusions in mitochondria of rhabdomyoma cells represent crystallized proteins of mitochondrial enzymes.

**Key words:** Rhabdomyoma — Mitochondria — Intracristal linear inclusions.

### **Einleitung**

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung eines Rhabdomyoms des weichen Gaumens fanden Cornog und Gonatas (1967) in Mitochondrien elektronen-

---

Fräulein H. Büscher und Fräulein B. Halter wird für ihre Mitarbeit gedankt

dichte, teilweise rechteckige Einschlüsse. Diese lagen manchmal in intracristalen Räumen und schienen aus wellen- oder helixförmig angeordneten filamentären Substrukturen zu bestehen. Tandler et al. (1970) beobachteten in Zellen eines Rhabdomyoms der Lippe gelegentlich Mitochondrien, die innerhalb der Cristae sowie zwischen äußerer und innerer Hüllmembran elektronendichtes Material enthielten. Mitochondrien mit feingranulären Einschlüssen in erweiterten, deformierten Intracristalräumen sahen Wyatt et al. (1970) in einem Rhabdomyom der Zungenbasis. Lineare Strukturen in Cristae mitochondriales von Rhabdomyomzellen sind bisher noch nicht mitgeteilt worden und sollen deshalb in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden.

## Material und Methoden

Ein etwa hühnereigroßer Tumor des weichen Gaumens wurde bei einer 50jährigen Frau operativ entfernt. Bei der Geschwulst handelte es sich, wie die lichtmikroskopische Untersuchung ergab, um ein Rhabdomyom.

Aus dem Tumormaterial wurde ein kleines Gewebstück herausgeschnitten, sofort in gekühlte, cacodylatgepufferte 3%ige Glutaraldehydlösung (pH 7,3) gebracht und in kleine Würfel von etwa 1 mm Kantenlänge zerteilt. Diese wurden nach mehrstündiger Fixierung in der Glutaraldehydlösung mit Chrom-Osmiumsäurelösung (Dalton, 1955) nachfixiert, in aufsteigender Äthylalkoholreihe entwässert und in Epon 812 eingebettet. Mit einem Reichert-Ultramikrotom Om U3 stellten wir Ultradünnschnitte her, die mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert wurden. Die Schnitte wurden mit einem TESLA-Elektronenmikroskop BS 500 untersucht.

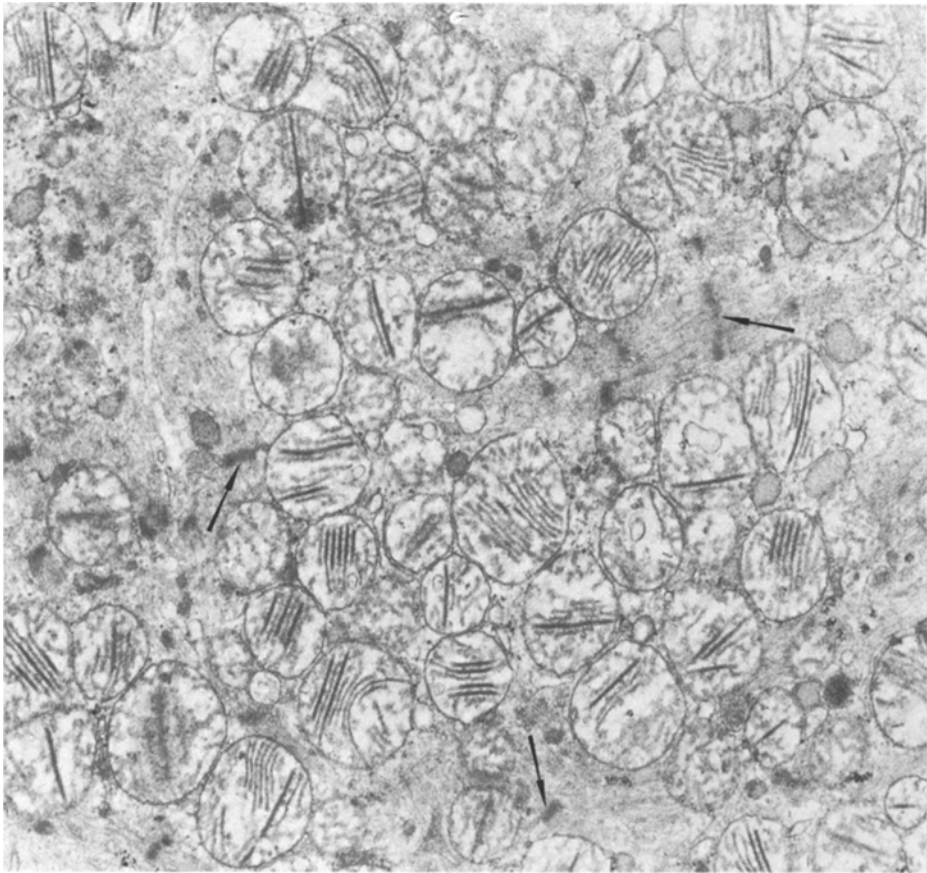
## Befunde

Die elektronenmikroskopische Untersuchung des Rhabdomyomgewebes zeigte, daß die Tumorzellen ungeordnet verlaufende, relativ kurze Myofilamentbündel unterschiedlicher Dicke enthielten. Z-Streifen waren vereinzelt zu sehen (Abb. 1).

In den Zellen waren pro Cytoplasmafläche sehr viele Mitochondrien vorhanden (Abb. 1). Anhäufungen von ihnen füllten oft große Cytoplasmaareale in Zellmembrannähe aus. Die Mitochondrien waren überwiegend oval geformt und gelegentlich sehr groß. Ihre Matrix war meist hell, in manchen Zellen jedoch auch auffällig elektronendicht.

Fast alle Mitochondrien besaßen neben normal aussehenden eigenartig veränderte Cristae. Der intracristale Raum dieser Cristae schien bei schwacher Vergrößerung gleichmäßig mit einem sehr elektronendichten Material ausgefüllt zu sein (Abb. 1). Außerdem sahen solche Cristae, im Gegensatz zu normalen, sehr gestreckt und „starr“ aus, waren gleichmäßig dick und oft in Stapeln genau parallel zueinander ausgerichtet (Abb. 1).

Bei stärkerer Vergrößerung war im Intracristalraum der abnormen Cristae ein Einschuß erkennbar, der sich im Cristalängsschnitt als elektronendichte gerade Linie darstellte. Diese Linie verlief immer genau in der Mitte des intracristalen Raumes parallel zur umhüllenden Cristamembran (Abb. 2 und 3). Da der lineare Einschuß durch einen sehr schmalen, weniger elektronendichten

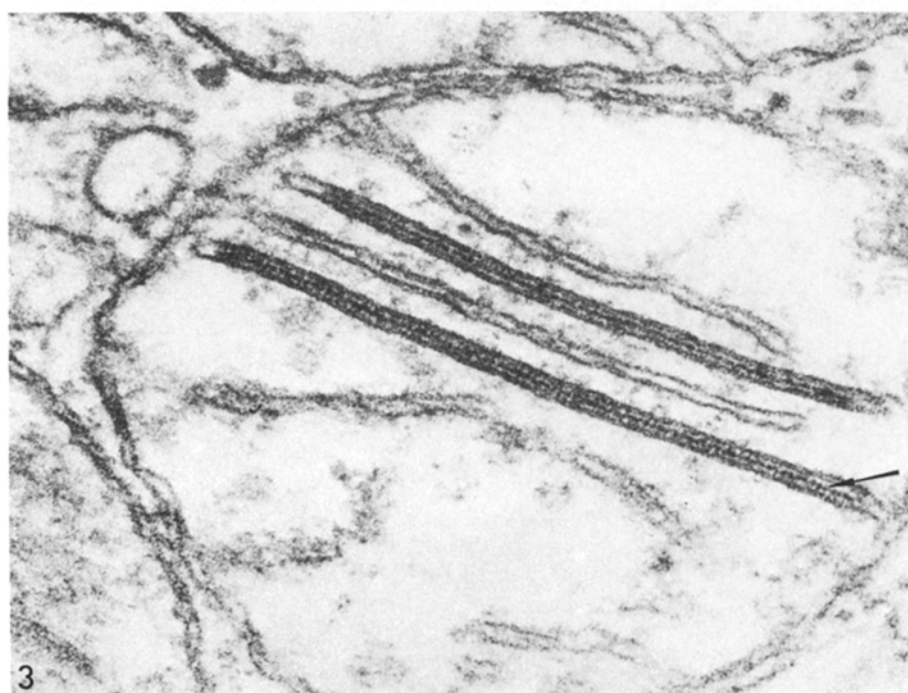
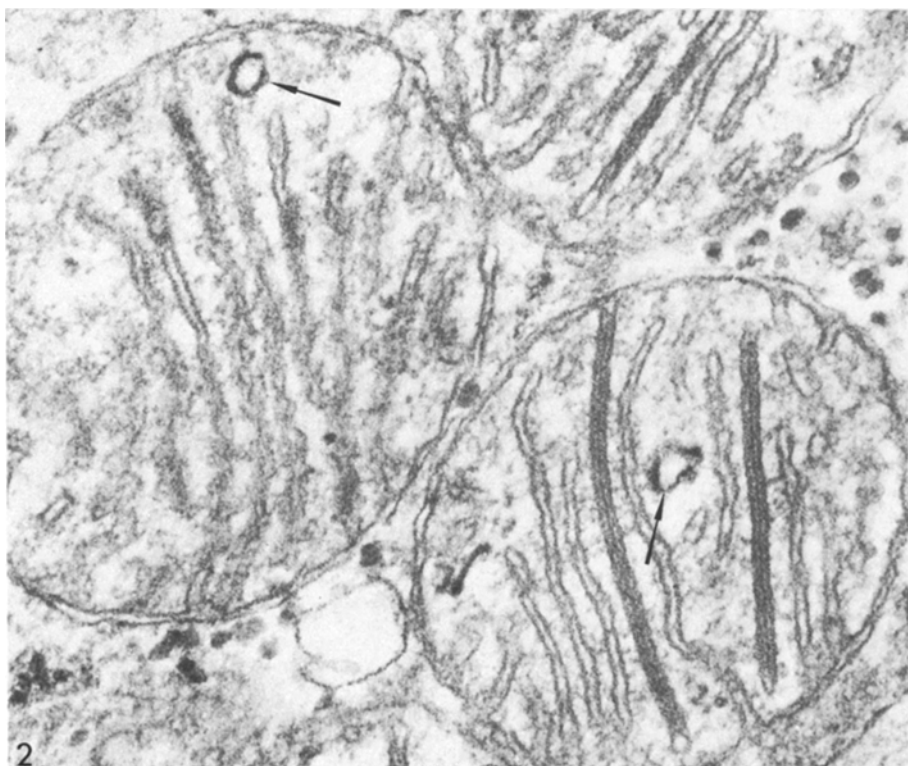


**Abb. 1.** Ausschnitt einer Rhabdomyomzelle im elektronenmikroskopischen Bild. Man erkennt Myofibrilbündel mit Z-Streifen (*Pfeile*). Die zahlreich vorhandenen Mitochondrien enthalten normale und elektronendichte, „starre“ Cristae, die teilweise parallel gestapelt sind.  $\times 20000$

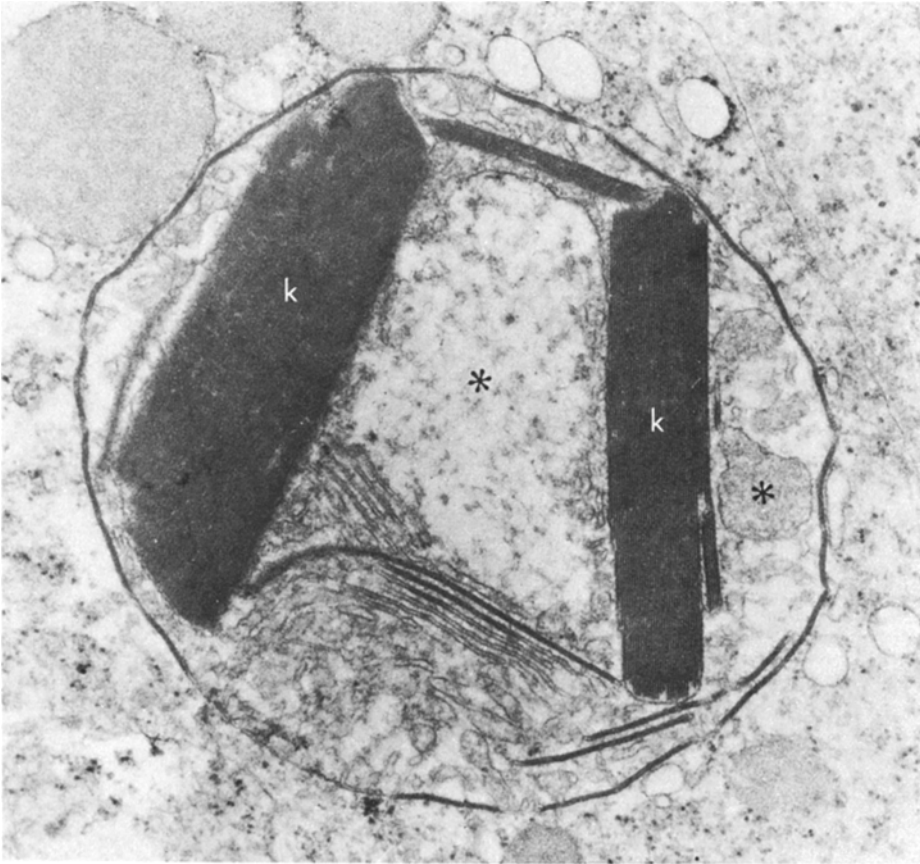
Zwischenraum von der Cristamembran getrennt war, hatten die abnormen Cristae im Längsschnitt nicht wie die normalen ein tri-, sondern ein pentalaminare Aussehen (Abb. 2 und 3).

Der lineare Einschuß erstreckte sich nie über die gesamte Länge einer Crista hinweg. Ein kurzes Stück am Anfang und Ende einer pentalaminar veränderten Crista war immer ohne Einschuß (Abb. 2 und 3). Oft kamen auch pentalaminare Cristae vor, die längere trilaminare Abschnitte aufwiesen. Während normal aussehende Cristae einen zwischen etwa 11 nm und 17 nm schwankenden Durchmesser hatten, waren die Cristae oder Cristaabschnitte, die einen linearen Einschuß enthielten, gleichmäßig etwa 23 nm dick.

In Mitochondrien, die intracristale lineare Einschlüsse enthielten, waren tri- und pentalaminare Cristae nicht nur, wie üblicherweise, quer zur Mitochondrienlängsachse angeordnet. Einzeln oder zu mehreren parallel nebeneinander gesta-



**Abb. 2.** Mitochondrien mit einzelnen Cristae, die lineare Einschlüsse enthalten. Deutlich ist der gegenüber normalen Cristae verbreiterte Intracristalraum zu sehen. In der Matrix zweier Mitochondrien ist jeweils ein großes, unregelmäßig geformtes Granulum mit hellem Zentrum und dunklem Randsaum vorhanden (*Pfeile*).  $\times 88000$

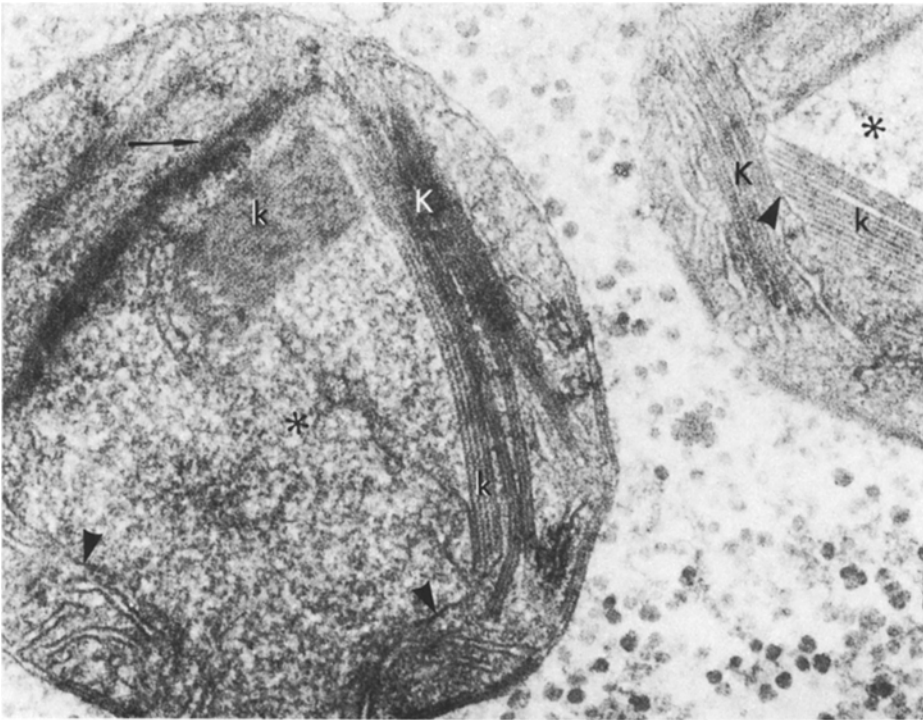


**Abb. 4.** Sehr großes Mitochondrium mit tri- und pentalaminaren Cristae. Stark dilatierte Intracristalräume enthalten feingranuläres und flockiges Material (*Sterne*) oder elektronendichte kristalline Körper (*k*) mit linearer Substruktur. Die Membran der aufgeblähten Cristae besteht teilweise nur aus Fragmenten. Die polygonale Mitochondrienhüllmembran ist fast durchgehend pentalaminar strukturiert.  $\times 28000$

pelt, verliefen normale und pentalaminare Cristae manchmal schräg, häufig aber parallel zur Längsachse eines oval oder länglich geformten Mitochondriums (Abb. 2 und 3). Längslamelläre pentalaminare Cristae waren oft deutlich länger als parallel zu ihnen angeordnete trilaminare (Abb. 3).

Bei starker Vergrößerung zeigte sich, daß die intracristale Linie aus periodisch aneinandergereihten, elektronendichten Punkten bestand (Abb. 3). Diese schienen manchmal durch dünne, elektronendichte Querstreifen mit der Wand des

**Abb. 3.** Zwei parallel zur Mitochondrienlängsachse angeordnete Cristae mit linearen Einschlüssen bei starker Vergrößerung. Die beiden Cristae sind breiter und länger als die parallel zu ihnen verlaufenden normalen Cristae. Man erkennt, daß der lineare Einschuß im Intracristalraum aus periodisch aneinandergereihten, elektronendichten Punkten besteht (*Pfeil*). Diese scheinen manchmal durch Querstreifen mit der Wand des intracristalen Raumes verbunden zu sein.  $\times 128000$



**Abb. 5.** Ausschnitt zweier Mitochondrien mit teilweise pentalaminarer Hüllmembran und stark dilatierten Cristae. Diese enthalten feingranuläres Material (*Sterne*) und Kristalle (*k*) mit linearer Substruktur. Von der rupturierten Membran der Cristae sind nur Fragmente erhalten (*Pfeilspitzen*). Extracristale Kristalle (*K*) setzen sich offenbar aus parallel und dicht nebeneinander gestapelten pentalaminaren Cristae zusammen. Tangential angeschnittene elektronendichte Cristae sind unscharf begrenzt und weisen eine periodische Querstreifung auf (*Pfeil*).  $\times 64000$

intracristalen Raumes verbunden zu sein (Abb. 3). Die Periodizität der Punkte oder Streifen betrug ungefähr 8 nm. Eine ähnliche, periodisch angeordnete, hell-dunkle Querstreifung war gelegentlich in unscharf begrenzten, scheinbar homogen elektronendichten Cristae zu sehen (Abb. 5). In solchen tangential angeschnittenen Cristae war auch bei starker Vergrößerung kein linearer Einschluß erkennbar.

In mehreren sehr großen Mitochondrien kamen tri- und pentalaminare Cristae mit stark dilatiertem Intracristalraum vor. Die ballonartig aufgeblähten Cristae nahmen meist große Areale eines Mitochondriums ein und enthielten feingranuläres oder flockiges Material (Abb. 4 und 5). Teilweise war die Membran solcher Cristae rupturiert, manchmal waren auch nur Fragmente von ihr erhalten (Abb. 4 und 5).

Gelegentlich befanden sich in dilatierten intracristalen Räumen unterschiedlich große, elektronendichte Kristalle (Abb. 4 und 5), die entweder zusammen mit feingranulärem Material auftraten oder manche erweiterten Cristae vollständig ausfüllten. Die kristallinen Körper waren annähernd rechteckig geformt

und zeigten eine periodische lineare Substruktur. Elektronendichte Linien waren parallel nebeneinander angeordnet und durch schmale, weniger elektronendichte Zwischenräume voneinander getrennt (Abb. 4 und 5). Der Abstand zwischen den Linien entsprach etwa dem zwischen einem linearen Cristaeinschluß und der ihn umgebenden Cristamembran. Bei stärkerer Vergrößerung zeigten die linearen Substrukturen der kristallinen Körper eine periodische Punktierung oder Querstreifung, die der intracristaler linearer Einschlüsse sehr ähnlich war.

Außer membranbegrenzten, intracristalen Kristallen kamen in Mitochondrien des Tumors auch nicht membranbegrenzte, frei in der Mitochondrienmatrix lokalisierte kristalline Körper vor. Sie waren ungefähr rechteckig und besaßen eine lineare Substruktur, die derjenigen intracristaler Kristalle glich (Abb. 5). Die extracristal gelegenen Kristalle befanden sich manchmal dicht neben den intracristalen und schienen mit ihnen zu verschmelzen. In einigen Anschnitten sah man, daß die extracristalen Kristalle sich aus parallel und dicht nebeneinander gestapelten pentalaminaren Cristae zusammensetzten (Abb. 5).

Lineare Einschlüsse waren in manchen Mitochondrien nicht nur in den Cristae, sondern auch oder ausschließlich im verbreiterten Spaltraum zwischen der äußeren und inneren Mitochondrienhüllmembran zu finden. Offenbar bedingt durch die „Starre“ der Einschlüsse, war die Hülle solcher Mitochondrien nicht rundlich, sondern polygonal (Abb. 4 und 5).

In der Matrix von Mitochondrien, die Cristae mit linearen Einschlüssen enthielten, war gelegentlich ein unregelmäßig geformtes Granulum mit einem Durchmesser von etwa 55–90 nm zu sehen. Solche ungewöhnlich großen Mitochondriengranula waren entweder in ihrem gesamten Querschnitt elektronendicht oder bestanden aus einem hellen, etwa 35–55 nm großen Zentrum und einem dunklen Randsaum (Abb. 2).

## Diskussion

Längslamelläre Cristae mitochondriales mit linearen, manchmal auch periodisch quergestreiften oder hexagonal gemusterten Einschlüssen sind gelegentlich beschrieben worden. Mitochondrien mit solchen Cristastrukturen scheinen ubiquitär vorzukommen. Sie wurden in Pflanzenzellen (Newcomb et al., 1968), einem menschlichen Glioblastoma multifforme (Tani et al., 1971), Leberzellen verschiedener Tierspecies unter normalen und pathologischen Bedingungen (Lit. bei Riede und Nobmann, 1974) sowie in Follikelzellen der normalen Schilddrüse beim Kaninchen (Nathaniel, 1976) beobachtet. Besonders häufig wurde über das Vorkommen pentalaminarer Cristae in Mitochondrien der Herz- und Skelettmuskulatur von Säugetieren bei bestimmten in vivo- oder in vitro-Verhältnissen berichtet (Tabelle 1).

Ob ähnliche Bedingungen, wie sie bei der Entstehung intracristaler linearer Strukturen in Mitochondrien der Herz- oder Skelettmuskulatur von Säugetieren vorlagen (Tabelle 1), auch die hier mitgeteilten, in Mitochondrien menschlicher Rhabdomyomzellen vorgefundenen Cristaeinschlüsse induzierten, ist unklar. Da das Tumorgewebe in frischem Zustand sofort fixiert wurde, dürften bestimmte Faktoren, die postmortal die Mitochondrienfeinstruktur modifizieren können (Saito et al., 1974), ausscheiden. Eher wäre an eine intravitale Mangel durchblu-

**Tabelle 1.** Vorkommen intracristaler linearer Einschlüsse in Mitochondrien der Herz- und Skelettmuskulatur von Säugetieren

Autoren	Muskelgewebe	Species	Pathologische Bedingungen	Beschreibung der intracrystalen Einschlüsse
Reznik und Hansen (1969)	Skelet	Kaninchen	Akute Ischämie	“rod-like structures”
Hall und Crane (1970)	Herz	Rind	Isolierte Mitochondrien	“network of rod-like elements”
Wakabayashi et al. (1971)	Herz	Rind	Isolierte Mitochondrien	“paracrystalline structures”
Cheah et al. (1973)	Skelet	Schwein, Rind	Isolierte Mitochondrien; verzögerte Gewebefixierung	“paracrystalline arrays of helical configuration”
Morton et al. (1973)	Skelet	Schaf	Mechanische Druckeinwirkung auf das Gewebe	“intracrystal structures”
Karpati et al. (1974)	Skelet	Ratte	Akute Ischämie	“dark intracrystal plates”
Saito et al. (1974)	Herz, Skelet	Ratte, Rind	Isolierte Mitochondrien; verzögerte Gewebefixierung	“membrane junctions”
Armiger et al. (1975)	Herz	Hund	In vitro-System, Medium mit erniedrigtem pH-Wert	“linear electron densities”
Hízlanková und Schiaffino (1977)	Skelet	Ratte	Akute Ischämie	“paracrystalline plate-like inclusions”

tung des Tumors als mögliche Ursache für die Entstehung der pentalaminaren Cristae zu denken.

Die intra- und extracrystalen Kristalle, die wir gelegentlich in Mitochondrien von Rhabdomyomzellen sahen, sind nach unserer Meinung durch Anhäufung linearer Cristaeinschlüsse bzw. pentalaminarer Cristae entstanden. Die intracrystalen kristallinen Körper bildeten sich wahrscheinlich dadurch, daß in dilatierten Cristae zahlreiche lineare Einschlüsse sich parallel und in immer gleichen, schmalen Abständen voneinander stapelten. Die extracrystalen Kristalle entstanden offenbar durch parallele Aneinanderlagerung und Fusion von Cristae, die lineare Einschlüsse enthielten. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß bei verschiedenen menschlichen Myopathien rechteckige kristalline Körper, die eine Substruktur aus parallelen, punktierten Linien aufwiesen, in meist längslamellären Cristae mitochondriales von Skelettmuskelzellen auftraten (Lit. bei Chou, 1969).

Die Natur und Bedeutung linearer Strukturen in intracrystalen Räumen von Mitochondrien sind nicht bekannt. Es könnte sich bei solchen parakristallinen Einschlüssen um die Anhäufung von DNS (Riede und Nobmann, 1974; Nathaniel, 1976) oder eines Enzymkomplexes (Hall und Crane, 1970; Hanzlíková und Schiaffino, 1977) handeln. Für die Entstehung der Inclusionen könnte demnach eine „mitochondriale Polyploidisierung“ oder eine „mangelhafte Synchronisation der mitochondrialen Enzym- und Membransynthese“ verantwortlich sein



(Riede und Nobmann, 1974). Da die linearen Strukturen in Cristae mitochondrialen von Rhabdomyomzellen auch zu Kristallen zusammengelagert vorkamen, dürften sie zumindest eine Proteinkomponente besitzen. Intramitochondriale kristalline Körper sollen nämlich im allgemeinen aus Proteinmolekülen bestehen (Lit. bei Ghadially, 1975). Es wäre somit denkbar, daß die intracristalen linearen Einschlüsse in Mitochondrien von Rhabdomyomzellen kristallisierte Proteine mitochondrialer Enzyme darstellen.

## Literatur

- Armiger, L.C., Herdson, P.B., Gavin, J.B.: Mitochondrial changes in dog myocardium induced by lowered pH in vitro. *Lab. Invest.* **32**, 223–226 (1975)
- Cheah, K.S., Cheah, A.M., Voyle, C.A.: Paracrystalline arrays in mitochondria following ageing of mitochondria in situ. *J. Bioenerg.* **4**, 383–389 (1973)
- Chou, S.M.: "Megaconial" mitochondria observed in a case of chronic polymyositis. *Acta neuropath.* **12**, 68–89 (1969)
- Cornog, J.L., Gonatas, N.K.: Ultrastructure of rhabdomyoma. *J. Ultrastruct. Res.* **20**, 433–450 (1967)
- Dalton, A.J.: A chrome-osmium fixative for electron microscopy. *Anat. Rec.* **121**, 281 (1955)
- Ghadially, F.N.: Ultrastructural pathology of the cell. A text and atlas of physiological and pathological alterations in cell fine structure. London und Boston: Butterworths 1975
- Hall, J.D., Crane, F.L.: An intracristal structure in beef heart mitochondria. *Exp. Cell Res.* **62**, 480–483 (1970)
- Hanzlíková, V., Schiaffino, S.: Mitochondrial changes in ischemic skeletal muscle. *J. Ultrastruct. Res.* **60**, 121–133 (1977)
- Karpati, G., Carpenter, S., Melmed, C., Eisen, A.A.: Experimental ischemic myopathy. *J. neurol. Sci.* **23**, 129–161 (1974)
- Morton, D.J., Rowe, R.W.D., Macfarlane, J.J.: The formation of intracristal structures induced in skeletal muscle mitochondria by high pressure. *J. Bioenerg.* **4**, 445–453 (1973)
- Nathaniel, D.R.: Helical inclusions and atypical cristae in the mitochondria of the rabbit thyroid gland. *J. Ultrastruct. Res.* **57**, 194–203 (1976)
- Newcomb, E.H., Steer, M.W., Hepler, P.K., Wergin, W.P.: An atypical crista resembling a "tight junction" in bean root mitochondria. *J. Cell Biol.* **39**, 35–42 (1968)
- Reznik, M., Hansen, J.L.: Mitochondria in degenerating and regenerating skeletal muscle. *Arch. Path.* **87**, 601–608 (1969)
- Riede, U.N., Nobmann, E.: Atypische Lebermitochondrien, adaptative Sonderformen? III. Parakristalline Einschlüsse im intracristalen Raum. *Beitr. Path.* **153**, 319–329 (1974)
- Saito, A., Smigel, M., Fleischer, S.: Membrane junctions in the intermembrane space of mitochondria from mammalian tissues. *J. Cell Biol.* **60**, 653–663 (1974)
- Tandler, B., Rossi, E.P., Stein, M., Matt, M.M.: Rhabdomyoma of the lip. Light and electron microscopical observations. *Arch. Path.* **89**, 118–127 (1970)
- Tani, E., Ametani, T., Higashi, N., Fujihara, E.: Atypical cristae in mitochondria of human glioblastoma multiforme cells. *J. Ultrastruct. Res.* **36**, 211–221 (1971)
- Wakabayashi, T., Smoly, J.M., Hatase, O., Green, D.E.: A lattice structure in beef heart mitochondria induced by phosphotungstic acid. *J. Bioenerg.* **2**, 167–182 (1971)
- Wyatt, R.B., Schochet, S.S., McCormick, W.F.: Rhabdomyoma. Light and electron microscopic study of a case with intranuclear inclusions. *Arch. Otolaryng.* **92**, 32–39 (1970)