

ENCYCLOPAEDIA CINEMATOGRAFICA

Editor: G. WOLF

E 1325/1969

Toxoplasma gondii **Entwicklung proliferativer Formen in Zellkulturen**

GÖTTINGEN 1970

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Toxoplasma gondii

Entwicklung proliferativer Formen in Zellkulturen¹

W. BOMMER, Marburg

Allgemeine Vorbemerkungen

Toxoplasma gondii ist seit dem Jahre 1908 als tierischer Parasit und seit 30 Jahren als Erreger der menschlichen Toxoplasmose bekannt. Weit verbreitet sind latente, symptomlose menschliche Infektionen mit Toxoplasmen, die vermutlich von infizierten Haustieren erworben werden, ferner durch den Genuß rohen Fleisches. Fraglich ist die Rolle roher Milch oder roher Eier sowie die Bedeutung von Wurminfektionen als Toxoplasmaüberträger. Sicher ist, daß Toxoplasmen bei Schwangeren diaplazentar auf die Frucht übergehen und eine fetale bzw. Neugeborenentoxoplasmose hervorrufen können.

Toxoplasma gondii ist ein sichelförmiges Protozoon von 4 bis 8 μm Länge und 2 bis 4 μm Breite, welches im flüssigen Medium außerhalb der Wirtszelle lebhaftere Eigenbewegung entfalten kann, ohne Geißeln oder andere Bewegungsorganellen zu besitzen. Die Vermehrung des Parasiten erfolgt ausschließlich intrazellulär. Man unterscheidet zwei Formen der Entwicklung:

1. die der proliferativen Toxoplasmen und

2. die langsamere Vermehrung mit Ausbildung großer Zysten. Virulente Stämme zeigen die erste Form, welche zur Zerstörung der Wirtszelle führt mit anschließendem Befall neuer Zellen. Schwach virulente Stämme entwickeln sich dagegen langsam und bilden 60 bis 150 μm große Cysten, die Hunderte von Toxoplasmen enthalten können.

Der hier vorliegende Film befaßt sich mit der Entwicklung proliferativer Toxoplasmen eines sehr virulenten, ursprünglich vom Menschen isolierten Stammes (BK-Stamm). Das Thema wird in 3 Abschnitten be-

¹ Angaben zum Film und Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 7 u 8.

handelt, in welchen das aktive Eindringen der Parasiten in die Wirtszelle, die intrazelluläre Vermehrung und das Freiwerden der Toxoplasmen beim Zerreißen der Zellmembran gezeigt werden.

Zur Entstehung des Films

Die Untersuchungen wurden an infizierten Zellkulturen (Affennierenzellen, L-Zellen) im Phasenkontrast durchgeführt. Der auf einem Deckglas ausgewachsene einschichtige Zellrasen wurde mit Toxoplasmen (BK-Stamm) aus dem Peritonealexsudat der Maus inoculiert und auf eine Objektträger-Kulturkammer von ca. 1 mm Tiefe montiert. Als Nährlösung diente EAGLES Basalmedium mit 5 bis 10% Kälberserum. Es war darauf zu achten, daß nur ein Teil des Zellrasens mit Nährmedium bedeckt wurde und ein genügend großer Raum der Kammer mit Luft gefüllt blieb.

Zur Lebendbeobachtung und Mikrophotographie dienten ZEISS-Mikroskope (WL) mit Phasenkontrasteinrichtung nach ZERNIKE sowie ferner ein sog. „umgekehrtes Mikroskop“ (HEUNERT [3]). Kulturkammer und Mikroskop befanden sich dabei in einem Brutkasten aus Plexiglas mit einer konstanten Temperatur von 37° C. Die kinematographischen Aufnahmen wurden mit einer Filmkamera (35 mm) vorgenommen, teils mit Zeitraffung (4 und 8 Bilder pro Minute), teils mit normaler Frequenz (24 Bilder pro Sekunde).

Filmbeschreibung¹

Mäusefibroblasten (L-Zellen)

Nicht infiziert

8 B/min

Es wird eine unbeimpfte L-Zellenkultur gezeigt, in der normale Zellteilungen vor sich gehen.

Eindringen der Parasiten in die Wirtszelle

L-Zellen

24 B/s

Ein Toxoplasma mit „Suchbewegungen“ unmittelbar vor dem Eindringen in die Wirtszelle. Der Parasit gleitet an der Zelloberfläche entlang, bis er plötzlich die Zellmembran durchstößt und in das Innere der Zelle eindringt.

Die enge, rigide Öffnung in der Zellwand zwingt das Toxoplasma zu starker Verformung seines Körpers. Dabei entsteht vorübergehend das Bild einer Sanduhr.

Man kann das Hineinfließen der Organellen des Parasiten in die

¹ Die *Kursiv*-Überschriften entsprechen den Zwischentiteln im Film.

Wirtszelle deutlich beobachten. Im Inneren der Zelle nimmt das Toxoplasma wieder seine normale Gestalt an. Die aktive Beweglichkeit geht verloren.

Vermehrung von Toxoplasmen in der Wirtszelle

Affennierenepithel

4 und 8 B/min

Es folgt die Teilung der Toxoplasmen.

Zwei Parasiten sind unabhängig voneinander in die Zelle eingedrungen und liegen in Vacuolen eingeschlossen in unmittelbarer Nachbarschaft des Wirtszellkerns. Der untere Parasit bereitet sich zur Teilung vor. In der elterlichen Zelle werden zwei Tochterorganismen gebildet, die aktiv aus der alten gemeinsamen Hülle ausschlüpfen. Ein Parasitenpaar ist entstanden. Kern und Nucleolus eines jeden Tochterindividuums sind deutlich sichtbar.

Der obere Parasit geht in Teilung. Zwei Kerne entstehen. Das Ausschlüpfen der Tochterparasiten erfolgt diesmal nicht gleichzeitig, sondern nacheinander.

Ein Einzelparasit befindet sich in einer Vacuole, dicht am Wirtszellkern; er will sich teilen. Der Parasitenkern, als heller Bereich erkennbar, teilt sich zuerst. Zwei Tochterindividuen entstehen innerhalb der alten Hülle und schlüpfen aus. Die Hüllmembran wird zurückgestreift und allmählich resorbiert.

Der Kern eines Parasiten streckt sich in die Länge und teilt sich. Zwei Kerne werden deutlich sichtbar. Die Tochterzellen liegen dicht nebeneinander innerhalb der elterlichen Membran. Beim gleichzeitigen Ausschlüpfen entsteht vorübergehend eine „V-Form“ oder eine „Schmetterlingsfigur“.

Drei eingedrungene Toxoplasmen liegen in einer Wirtszelle. Der Wirtszellkern rotiert. Der Parasit rechts hat mit der Teilung begonnen. Die beiden anderen folgen nach. Die entstandenen Tochterzellen werden sich später in gleicher Weise teilen.

Diese Art der Vermehrung nennt man nach GOLDMAN und Mitarb. „innere Knospung“ oder „Endodyogenie“. Die Endodyogenie ist die einzige Teilungsform bei virulenten Toxoplasmen.

Die Parasiten eines Klons teilen sich immer zur gleichen Zeit. Ein Parasitenpaar zeigt „synchrone Endodyogenie“, so daß insgesamt vier Tochterindividuen entstehen.

Der Parasit rechts im Bild, der den Wirtszellkern etwas eindellt, wird sich teilen. Dabei entstehen diesmal ausnahmsweise drei Tochterzellen. Die gemeinsame Hüllmembran wird zurückgestreift und bleibt als runder Restkörper noch eine Zeitlang mit den Hinterenden der jungen Parasiten verbunden. Ein weiter oben im Bild liegendes Toxoplasma zeigt typische Zweiteilung durch Endodyogenie.

Im Wirtszellkern bereitet sich eine Mitose vor.

Auch infizierte Wirtszellen können noch normale Mitosen durchführen und sich regulär teilen.

Ein Parasitenpaar zeigt die Entstehung einer Viererform durch „synchrone Endodyogenie“. Zunächst verschwinden die Nucleoli aus den Parasitenkernen. Beide Kerne teilen sich. Die Tochterorganismen schlüpfen aus der elterlichen Membran. — In dieser Weise entstehen zuletzt Parasitenkolonien, welche das Aussehen von Rosetten haben.

Diese Bildfolge zeigt die Bildung von Toxoplasmakolonien durch fortgesetzte synchrone Zweiteilung. Schließlich erscheint das Zytoplasma der Wirtszelle ganz von Parasiten erfüllt. Die Kolonien sind rosettenförmig angeordnet.

Zwei große Rosetten liegen in einer doppelkernigen Affennierenzelle. Der dunkle Saum, der sie umgibt, besteht aus Wirtszellmitochondrien. In den Rosetten schreiten die Teilungen weiter fort.

Freiwerden der Parasiten aus der Wirtszelle
Affennierenepithel, L-Zellen
4 B/min und 24 /s

Gelegentlich können einzelne Toxoplasmen oder kleine Kolonien schon zu Beginn der Entwicklung aktiv die Wirtszelle verlassen. Meist geht die Zelle unmittelbar darauf zugrunde. Zunächst schreiten die ersten Teilungen der Parasiten normal voran. Plötzlich rundet sich jedoch die Zelle ab, und die Parasiten treten spontan nach außen.

In der Regel ist die Anpassungsfähigkeit der infizierten Zellen groß. Erst wenn das Zytoplasma ganz von Parasiten erfüllt erscheint, geht die Wirtszelle plötzlich zugrunde und gibt die eingeschlossenen Toxoplasmen frei. Mit einem Male zerreißt die Zellmembran. Der Kern ist nur noch als Schatten sichtbar.

Die freigewordenen Parasiten zeigen lebhaftige Beweglichkeit, welche einige Minuten andauert, und die sie befähigt, in neue Wirtszellen einzudringen. Der Kreis der Entwicklung ist geschlossen.

Literatur

- [1] BOMMER, W., K. H. HÖFLING und H. H. HEUNERT: Lebendbeobachtungen über das Eindringen von Toxoplasmen in die Wirtszelle. Dtsch. Med. Wschr. 13, H. 49 (1968), 2365—2367.
- [2] BOMMER, W., K. H. HÖFLING und H. H. HEUNERT: Die Vermehrung von Toxoplasmen in Zellkulturen. Dtsch. Med. Wschr. 14, H. 8 (1969), 399—405.
- [3] HEUNERT, H. H.: Die vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten des umgekehrten Mikroskops. Zeiss-Informationen 71 (1969), 32.

Angaben zum Film

Der Film ist ein Forschungsdokument und wurde 1969 zur Auswertung in Forschung und Hochschulunterricht veröffentlicht. Stummfilm, 16 mm, schwarzweiß, 146 m, 13 ½ min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden in den Jahren 1966/67. Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. R. SIEGERT): Priv.-Doz. Dr. W. BOMMER, und dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen (Direktor: Prof. Dr.-Ing. G. WOLF), Sachbearbeitung: Dr. K.-H. HÖFLING, Aufnahme: H. H. HEUNERT.

Inhalt des Films

Der Entwicklungszyklus virulenter (proliferativer) Toxoplasmen beginnt mit dem aktiven Eindringen der Parasiten in die Wirtszelle. Dabei wird das verlängerte zugespitzte Vorderende des Parasitenkörpers durch die Zellmembran gestoßen. Durch die so entstandene enge Öffnung preßt sich das Toxoplasma unter starker Verformung, bis es das Zellinnere erreicht hat. Dann geht in der Regel die aktive Beweglichkeit verloren. Der gesamte Eindringungsvorgang dauert 15—30 Sekunden.

Die Teilung der Toxoplasmen erfolgt durch sog. Endodyogenie oder innere Knospung, d. h. innerhalb des teilungsbereiten Parasiten entstehen zunächst zwei Tochterindividuen, die schließlich die elterliche Hüllmembran aktiv nach außen durchbrechen. Die alte Hülle wird zurückgestreift und allmählich resorbiert. Die Tochterparasiten teilen sich in der gleichen Weise, so daß geradzahlige Toxoplasmakolonien entstehen. Die Parasiten jedes Klons teilen sich stets gleichzeitig (synchrone Endodyogenie). Zwischen den einzelnen Teilungsschritten liegt ein Intervall von 4—5 Stunden. Die Parasitenkolonien zeigen rosettenförmige Anordnung und sind von einem dichten Saum aus Wirtszellmitochondrien umgeben.

Die infizierten Zellen sind meist sehr anpassungsfähig. Mitosen und normale Zellteilungen werden trotz mehrfacher Infektion noch längere Zeit durchgeführt. Zuletzt zerreißt jedoch die Zellmembran, und die eingeschlossenen Toxoplasmen werden frei. Die Parasiten entfalten jetzt eine lebhaftere Eigenbeweglichkeit, die sie befähigt, in neue Wirtszellen einzudringen.

Summary of the Film

The development cycle of virulent (proliferative) toxoplasms begins with the active penetration of the parasite into the host cell. To do this, the elongated sharp-pointed anterior end of the body of the parasite is thrust through the cell membrane. The toxoplasm is then forced through this narrow opening, with considerable deformation, until it reaches the interior of the cell. Active movement is then usually lost. The total penetration process occupies 15—30 seconds.

The division of the toxoplasm follows by the process known as endodyogeny or internal budding, i. e. inside the ready-to-divide parasite there arises first of all, two daughter individuals which actively break out through the paren-

tal enveloping membrane. The old envelope is turned back and gradually resorbed. The daughter parasites divide in the same fashion so that even-numbered colonies of toxoplasma arise. The parasites of each colony always divide simultaneously (synchronous endodyogeny). There is an interval of 4—5 hours between each individual division. The parasite colonies show a rosette-like arrangement and are surrounded by a dense fringe of host-cell mitochondria.

The infected cells are usually very adaptable. Mitosis and normal cell division are still carried on for a long time in spite of repeated infections. Finally, however, the cell membrane ruptures and the enclosed toxoplasms are liberated. The parasites now exhibit a brisk individual mobility which enables them to penetrate fresh host cells.

Résumé du Film

Le cycle de développement de toxoplasmes virulents commence avec la pénétration active des parasites dans l'hôte. L'extrémité avant allongée et pointue du corps du parasite est alors enfoncée à travers la membrane cellulaire. Par l'étroite ouverture ainsi pratiquée le toxoplasma se glisse en se déformant fortement jusqu'à ce qu'il est atteint l'intérieur de la cellule. En règle générale il perd alors sa mobilité active. Son introduction dure au total 15 à 30 secondes.

La division des toxoplasmes s'effectue par endodyogénie ou bourgeonnement interne, c.-à-d. qu'au sein des parasites prêts à la division, il se produit d'abord deux individus sœurs qui percent activement vers l'extérieur avec la membrane-enveloppe des parents. La vieille enveloppe est retroussée et progressivement résorbée. Les parasites sœurs se divisent de la même façon, de sorte qu'il se produit des colonies de toxoplasmes d'un nombre pair. Les parasites de chaque clone se divisent toujours simultanément (endodyogénie synchrone). Entre les différentes phases de division s'écoule un intervalle de 4 à 5 heures. Les colonies de parasites présentent une disposition en forme de rosace et sont ceintes d'une dense gaine composée de mitochondries de la cellule hôte.

Les cellules infectées sont généralement très adaptables. Mitoses et divisions normales de cellule sont encore effectuées pendant assez longtemps malgré une infection multiple. Finalement la membrane cellulaire se déchire cependant et les toxoplasmes enfermés sont libérés. Les parasites déploient maintenant une intense mobilité qui les rend aptes à pénétrer dans de nouvelles cellules hôtes.