

# ENCYCLOPAEDIA CINEMATOGRAFICA

Editor: G. WOLF

---

*E 1141/1967*

**Parainfluenza-Virus 3  
Cytopathische Veränderungen in der  
Gewebekultur (HEp-2)**

GÖTTINGEN 1975

---

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Film E 1141

**Parainfluenza-Virus 3**  
**Cytopathische Veränderungen in der**  
**Gewebekultur (HEp-2)**

K.-O. HABERMEHL und W. DIEFENTHAL, Berlin

**Allgemeine Vorbemerkungen<sup>1</sup>**

Die Parainfluenza-Viren rechnen zu den Paramyxoviren. Sie sind durch eine einsträngige RNS gekennzeichnet und haben eine helikale Kapsidsymmetrie. Das Virus hat ein breites Wirtsspektrum. Die zytopathischen Veränderungen sind unterschiedlich, der hier verwendete Stamm des Typ 3 ruft in HEp-2-Zellen besonders große polynukleäre Synzytien (Riesenzellen) hervor (CHANOCK et al. [1]). Bereits 1—2 Stunden nach Infektionsbeginn sind die ertsen Anzeichen einer Virus-induzierten Zellverschmelzung erkennbar. Die Vereinigung von Einzelzellen zu Riesenzellen erfolgt in der Weise, daß sich die Zellen zunächst aneinander lagern. Sodann bildet sich zwischen zwei Zeilen eine schmale Zytoplasmabrücke aus, die sich verbreitert und zur vollständigen Vereinigung der Zellen führt. Auch in bereits bestehende Riesenzellen können nachträglich noch Einzelzellen durch Zellverschmelzung inkorporiert werden. Die Zellkerne sind in solch einer Riesenzelle gleichmäßig über das Zytoplasma verteilt. Dies gilt keineswegs für alle Riesenzellenbildende Viren. So liegen beispielsweise in den durch Ektromelie Virus-induzierten Riesenzellen die Zellkerne konzentrisch um ein verdichtetes Zentrum herum angeordnet (DIEFENTHAL u. HABERMEHL [3], [4]).

<sup>1</sup> Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 6 u. 7.

Im weiteren Verlauf der Infektion treten Schrumpfungsprozesse in Erscheinung. Die Zelle retrahiert sich unter Zurücklassung eines strahlenförmigen Netzes zytoplasmatischer Ausläufer und zerfällt schließlich. Die Ausbildung multinukleärer Synzytien durch Zellverschmelzung mit Hilfe von Paramyxoviren hat sich als eine wertvolle Methode für die experimentelle Erzielung von Zellfusionen erwiesen.

### Methodik

Verwendet wurden Gewebekulturen menschlicher epithelialer Zellen (HEp-2) in einem Kulturmedium aus 90% EARLScher Lösung mit Lactalbuminhydrolysat (NBCO), Hefeextrakt (Difco, in Endkonzentration von 0,5% bzw. 0,1%), 10% Kälberserum und Antibiotikazusatz (100 E Penicillin, 100  $\gamma$  Streptomycin und 50 E Moronal pro ml). Zur Verwendung kam das Parainfluenza-Virus 3. Die Inokulationsdosis wurde so gewählt, daß eine Multiplizität von 20 Plaques bildenden Einheiten pro Zelle resultierte.

Technik der kinematographischen Registrierungen in Gewebekulturkammern:

Auf ein Deckglas wurde ein V 2 A-Stahling von 35 mm Außen- und 30 mm Innendurchmesser montiert, der eine Höhe von 2 mm hatte und der an einer Stelle eine Aussparung von 3 mm aufwies, um einen Gasaustausch zu ermöglichen.

Nach Befestigung des Ringes auf dem unteren Deckglas wurde die Aussparung im Ring mit Vaseline verschlossen, und die in Nährmedium resuspendierten Zellen wurden in das so entstandene Züchtungsgefäß hineingegeben. Nach 12- bzw. 24-stündiger Inkubation in einem Begasungsgefäß mit 5% CO<sub>2</sub> in Luft und 95% relativer Luftfeuchtigkeit (DIEFENTHAL u. HABERMEHL [2]) waren die Zellen ausgewachsen und konnten nach Absaugen des Nährmediums mit Virusinokulum infiziert werden. Nach einstündiger Adsorptionszeit wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen. Dann wurde die Vaseline aus der Aussparung des Stahringes entfernt und die Kammer mit einem oben aufgelegten Deckglas mit Vaseline verschlossen und schließlich umgedreht, so daß das mit den Zellen bewachsene Deckglas nach oben kam. Mit Spritze und Kanüle wurde durch die Aussparung des Stahringes eine kleine Menge Nährmedium (etwa 0,4 ml) so in das Zentrum der Kammer eingebracht, daß ein Flüssigkeitskontakt zwischen dem oberen und dem unteren Deckglas entstand. Die Flüssigkeitsmenge wurde so gewählt, daß der Durchmesser des im Zentrum der Kammer befindlichen Flüssigkeitsareals 5—7 mm betrug und innerhalb der Kammer noch genügend Luftraum für den Gasaustausch des Nährmediums zur Verfügung stand. Nachdem die so präparierte Kammer zur Einstellung einer Kohlensäurekonzentration von 5% nochmals für eine halbe Stunde in die Be-

gasungsanlage gestellt worden war, erfolgte der luftdichte Verschluss der Aussparung mit Vaseline. Ein Verlaufen des Tropfens an den Rand der Kammer wurde dadurch verhindert, daß das zweite (zellfreie) Deckglas mit vier kleinen Vaselinetropfen versehen wurde, zwischen denen sich später das Flüssigkeitsareal befand. Mit Hilfe dieser Kammer war es möglich, eine kontinuierliche mikroskopische Beobachtung in einem Zeitraum von 3 Tagen ohne Wechsel des Nährmediums durchzuführen. Die Einfachheit der technischen Ausführung und die geringen damit verbundenen Unkosten ermöglichten es, eine große Anzahl solcher Fotokammern gleichzeitig anzusetzen, so daß mehrere Untersuchungen parallel laufen konnten und unter einer größeren Anzahl von Fotokammern eine geeignete Auswahl getroffen werden konnte. Für die Aufnahmen wurde ein ZEISS-Phasenkontrastmikroskop verwendet, welches sich in einem Heizkasten befand; Phasenkondensator mit großem Arbeitsabstand, Öl-Apochromate 100x und 40x. Die Filmaufnahmen erfolgten mit einer 35-mm-Normalfilmkamera auf Kodak Plus-X-Film. Zeitraffung zwischen 1 B/min und 15 B/min.

### **Filmbeschreibung<sup>1</sup>**

#### *Nicht infizierte Zellen*

8 B/min

1. Übersicht, normale Gewebekulturzellen, Pinozytosevorgänge, Bildfeldbreite 110  $\mu\text{m}$ ; Aufn.-Freq. 8 B/min

#### *Bildung von Riesenzellen nach Virusinfektion*

2 bis 15 B/min

2. Eine zentral gelegene Riesenzelle verschmilzt mit angrenzenden Einzelzellen unter Ausbildung eines polynukleären Synzytiums. Später retrahiert sich die Riesenzelle unter Zurücklassung feiner zytoplasmatischer Fäden. Es bilden sich Kernpyknosen aus.

Bildfeldbreite 290  $\mu\text{m}$ ; Aufn.-Freq. 2 B/min

3. Wiederholung. Inkorporation von Einzelzellen in eine bereits bestehende Riesenzelle.

Bildfeldbreite 180  $\mu\text{m}$ ; Aufn.-Freq. 4 B/min

4. Wiederholung.

Bildfeldbreite 180  $\mu\text{m}$ ; Aufn.-Freq. 8 B/min

---

<sup>1</sup> Die *Kursiv*-Überschriften entsprechen den Zwischentiteln im Film.

5. Wiederholung. Verschmelzung einer Einzelzelle in die rechts oben im Bild gelegene Riesenzelle. Es bildet sich zunächst eine schmale Zytoplasmabrücke aus, die sich zunehmend verbreitert. Im weiteren Verlauf wandert der Kern in die rechts oben bestehende Riesenzelle hinein.

Bildfeldbreite 93  $\mu\text{m}$ ; Aufn.-Freq. 15 B/min

6. Zellverschmelzungsvorgang in stärkerer Vergrößerung.

Bildfeldbreite 76  $\mu\text{m}$ ; Aufn.-Freq. 8 B/min

7—9. Spätes Stadium der Infektion. Schrumpfung der Riesenzellen mit Kernpyknosen und Retraktion des Zytoplasmas unter Zurücklassung feiner, strahlenförmig ausgezogener Zytoplasmafäden, die an der Oberfläche des Kulturgefäßes haften bleiben. Mit dem Absterben der Riesenzelle ist das Endstadium der zytopathischen Veränderungen erreicht.

Bildfeldbreite 110 und 180  $\mu\text{m}$ ; Aufn.-Freq. 4 B/min

#### Literatur

- [1] CHANOCK, R. M., R. H. PARROTT, D. M. JOHNSON, A. Z. KAPIKIAN and J. A. BELL: Myxoviruses: Parainfluenza. *Ann. Rev. Resp. Dis.* 88 (1963), 152—166.
- [2] DIFENTHAL, W., und K.-O. HABERMEHL: Vorrichtung zur Einstellung eines bestimmten Kohlensäure-Luftgemisches für Monolayer-Gewebe-kulturen in Petrischalen. *Zbl. Bakt., I. Orig.* 185 (1962), 11—13.
- [3] DIFENTHAL, W., und K.-O. HABERMEHL: Verhalten und Nachweis von Ektromelievirus in der Gewebekultur. *Zbl. Bakt., I. Orig.* 175 (1959), 67—80.
- [4] HABERMEHL, K.-O., und W. DIFENTHAL: Kinematographische Untersuchungen an Fibroblasten nach Infektion mit Ektromelievirus (Mäusepocken). *Arch. Virusforsch.* XI (1962), 629—643.

---

#### Angaben zum Film

Das Filmdokument wurde 1967 zur Auswertung in Forschung und Hochschulunterricht veröffentlicht. Stummfilm, 16 mm, schwarzweiß, 65 m, 6 min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden im Jahre 1966. Veröffentlichung aus der Inneren Abteilung und dem Laboratorium für Virusforschung des Städt. Wenckebach-Krankenhauses Berlin (Direktor: Prof. Dr. W. D. GERMER), Priv.-Doz. Dr. K.-O. HABERMEHL, Priv.-Doz. Dr. W. DIFENTHAL, und dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen (Direktor: Prof. Dr.-Ing. G. WOLF), Dr. K.-H. HÖFLING; Aufnahme: H. H. HEUNERT.

### **Inhalt des Films**

Der Film zeigt die Fusion menschlicher epithelialer Zellen (HEp-2) in der Gewebekultur nach Infektion mit dem Parainfluenza-Virus 3. Unter dem Einfluß dieser Virusinfektion verschmelzen Einzelzellen unter Auflösung ihrer Zellmembran zu Riesenzellkomplexen, die erhebliche Größenausmaße annehmen können. Im weiteren Verlauf der Virusinfektion kommt es zur Pyknose der Zellkerne und zu einer Retraktion des Zytoplasmas der multinukleären Syncytien. Es bleiben feine, langausgezogene, strahlenförmig angeordnete Zytoplasmafäden zurück.

### **Summary of the Film**

The film shows the fusion of human epithelial cells (HEp-2) in tissue culture after infection with parainfluenza virus 3. Under the influence of this virus infection individual cells agglomerate, their membranes disappearing, to become giant cell complexes, which may grow to a considerable size. In the further course of the infection pyknosis of the nuclei and retraction of the cytoplasm of the multinuclear syncytia develop. Thin long drawn out filaments of cytoplasm arranged in a radiating pattern remain.

### **Résumé du Film**

Le film montre la fusion de cellules épithéliales humaines (HEp-2) dans la culture tissulaire après infection par le virus parainfluenza 3. Sous l'influence de cette infection virale, la membrane cellulaire se résout, et les cellules individuelles se fusionnent et forment des complexes cellulaires géants qui peuvent devenir très importants. Dans le décours de l'infection virale, il se produit une pycnose des noyaux cellulaires et une rétraction du cytoplasme des syncytiums multinucléaires. Il reste de fins fils cytoplasmiques étirés à disposition radiaire.