

ENCYCLOPAEDIA CINEMATOGRAPHICA

Editor: G. WOLF

E 1140/1967

**Vesicular-stomatitis-Virus (Stamm Indiana)
Cytopathische Veränderungen in der
Gewebekultur (HEp-2)**

GÖTTINGEN 1975

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

**Vesicular-stomatitis-Virus (Stamm Indiana)
Cytopathische Veränderungen in der
Gewegekultur (HEp-2)**

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

Allgemeine Vorbemerkungen¹

Das Vesicular-stomatitis-Virus wird zu den Rhabdoviren gezählt. Es weist eine einsträngige RNS mit einem helikalen Kapsid auf und rechnet zu den durch Arthropoden übertragbaren Viren, den Arboviren. Die kinematographische Untersuchung erlaubt die Erfassung der morphologischen Vorgänge an der infizierten Wirtszelle. Der Vorgang der zytopathischen Veränderungen verläuft langsamer als nach einer Infektion mit Picornaviren. Trotz der ablaufenden Virusinfektion können die infizierten Zellen ähnlich wie beispielsweise Poliomyelitis-Virus-infizierte Zellen (HABERMEHL u. DIEFENTHAL [3]) noch eine Mitose durchlaufen. Erst mehrere Stunden nach Infektionsbeginn erfolgt eine Abrundung der Zellen. Es treten in zunehmendem Maße Blasterbewegungen auf, die im Zusammenhang mit der Ausbildung langgestreckter zytoplasmatischer Protrusionen charakteristisch für eine Infektion mit Vesicular-stomatitis-Virus sind. Gegen Ende des Infektionsablaufes ist das Zytoplasma weitgehend aufgelöst, der Zellkern deutlich pyknotisch, und die Zellreste haften lediglich mit den zytoplasmatischen Ausläufern auf der Bodenfläche des Kulturgefäßes. Mit dem Zerfall des Zellrestes ist der zytopathische Effekt abgeschlossen (MELENDEZ [4], SELLERS et al. [5]).

Methodik

Verwendet wurden Gewebekulturen menschlicher epithelialer Zellen (HEp-2) in einem Kulturmedium aus 90% EARLScher Lösung mit Lactalbuminhydrolysat (NBCO), Hefeextrakt (Difco, in Endkonzentration

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

von 0,5% bzw. 0,1%), 10% Kälberserum und Antibiotikazusatz (100 E Penicillin, 100 γ Streptomycin und 50 E Moronal pro ml). Zur Verwendung kam der Stamm Indiana des Vesicular-stomatitis-Virus, der im hiesigen Laboratorium in fortlaufenden Passagen gehalten wurde. Die Inokulationsdosis wurde so gewählt, daß 20 Plaque-bildende Einheiten pro Zelle zur Anwendung kamen.

Technik der kinematographischen Registrierungen in Gewebekulturkammern:

Auf ein Deckglas wurde ein V 2 A-Stahlring 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% CO₂ in Luft und 95% relativer Luftfeuchtigkeit (DIEFENTHAL u. HABERMEHL [1], [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 Stahlringes 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 Stahlringes eine kleine Menge Nährmedium (etwa 0,4 ml) so in das Zentrum der Kammer eingebracht, daß ein Flüssigkeitskontakt zwischen dem oberen und 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 Begasungsanlage gestellt worden war, erfolgte der luftdichte Verschuß der Aussparung mit Vaseline. Ein Verlaufen des Tropfens an den Rand der Kammer wurde dadurch verhindert, daß das zweite (zellfreie) Deckglas mit vier kleinen Vaseline-tropfen 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 An-

zahl 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.

Filmbeschreibung¹

Nicht infizierte Zellen

8 B/min

1. Normale Gewebekulturzellen, Pinozytosevorgänge.

Bildfeldbreite 110 μm ; Aufn.-Freq. 8 B/min

2. In stärkerer Vergrößerung eine Mitose mit Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Rekonstitution der Tochterzellen.

Bildfeldbreite 58 μm ; Aufn.-Freq. 8 B/min

Nach Virusinfektion

4 und 8 B/min

3. Im frühen Stadium der Infektion tritt nur langsam eine Retraktion des Zytoplasmas und andeutungsweise eine Kernpyknose in Erscheinung. Im zweiten Verlauf kommt es zur Ausbildung filamentöser Ausläufer des Zytoplasmas, die an der Bodenfläche des Kulturgefäßes haften und an Länge zunehmen. Gegen Ende des Infektionsablaufes treten Blasterbewegungen hinzu, die bis zum Absterben der Zelle zu beobachten sind.

Bildfeldbreite 84 μm ; Aufn.-Freq. 8 B/min

4. Nochmals der gleiche Vorgang in stärkerer Zeitraffung.

Bildfeldbreite 110 μm ; Aufn.-Freq. 4 B/min

5. Bei diesen Zellen sind besonders gut die langausgezogenen Fortsätze des Zytoplasmas erkennbar, an denen die infizierte Zelle auf ihrer Unterlage haftet, ein für dieses Virus charakteristischer zytopathischer Effekt.

Bildfeldbreite 84 μm ; Aufn.-Freq. 8 B/min

6. Im oberen Bereich des Bildfeldes ist eine vollständig ablaufende Mitose in einer Vesicular-stomatitis-Virus-infizierten Zelle sichtbar. Unmittelbar nach der Rekonstitution der Tochterzellen tritt sodann der zytopathische Effekt in besonderem Ausmaße in Erscheinung.

Bildfeldbreite 110 μm ; Aufn.-Freq. 4 B/min

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

Literatur

- [1] DIEFENTHAL, W., und K.-O. HABERMEHL: Verhalten und Nachweis von Ektromelievirus in der Gewebekultur. Zbl. Bakt., I. Orig. **175** (1959), 67—80.
- [2] DIEFENTHAL, W., und K.-O. HABERMEHL: Vorrichtung zur Einstellung eines bestimmten Kohlensäure-Luftgemisches für Monolayer-Gewebekulturen in Petrischalen. Zbl. Bakt., I. Orig. **185** (1962), 11—13.
- [3] HABERMEHL, K.-O., und W. DIEFENTHAL: Der Einfluß von Virusinfektionen auf den Ablauf der Zellteilung. Zbl. Bakt., I. Orig. **199** (1966), 273—314.
- [4] MELENDEZ, L. V.: Multiplication and cytopathogenic effect of foot-and-mouth disease virus in cultures of fetal rabbit lung cells. Am. J. Vet. Res. **20** (1959), 815—818.
- [5] SELLERS, R. F., L. M. BURT, A. CUMMING, and D. L. STEWART: The behaviour of strains of the virus of foot-and-mouth disease in pig, calf, ox and lamb, kidney tissue cultures. Arch. Virusforsch. **IX** (1960), 637—646.

Angaben zum Film

Das Filmdokument wurde 1967 zur Auswertung in Forschung und Hochschulunterricht veröffentlicht. Stummfilm, 16 mm, schwarzweiß, 88 m, 8 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. DIEFENTHAL, 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 zytopathischen Veränderungen menschlicher epithelialer Zellen (HEp-2) in der Gewebekultur nach Infektion mit Vesicular-stomatitis-Virus.

Unter dem Einfluß der Virusinfektion kommt es zunächst zu einer Retraktion des Zytoplasmas und einer anfänglich geringgradigen Pyknose des Zellkerns. Später treten Blasterbewegungen auf und es bilden sich langgestreckte filamentöse Protrusionen der Zellmembran aus, an denen die Reste der immer stärker schrumpfenden Zelle mit dem Boden des Kulturgefäßes verbunden sind.

Summary of the Film

The film shows the cytopathic changes of human epithelial cells (HEp-2) in tissue culture after infection with vesicular stomatitis virus.

The virus infection initially causes retraction of the cytoplasm and minor pyknosis of the nucleus. Later on blast movements are seen, and extended filamentous protrusions of the cell membrane develop. These connect the remnants of the cell, which is shrinking increasingly, with the bottom of the culture vessel.

Résumé du Film

Le film montre les altérations cytopathologiques de cellules épithéliales humaines (HEp-2) dans la culture tissulaire après infection par le virus de la stomatite vésiculaire.

Sous l'influence de l'infection virale, il se produit d'abord une rétraction du cytoplasme et une pycnose mineure initiale du noyau cellulaire. Plus tard, on observe des mouvements blastiques, et on voit se former des protrusions longues filamenteuses de la membrane cellulaire qui relient les restes de la cellule de plus en plus rétractée au fond du récipient de culture.