

ENCYCLOPAEDIA CINEMATOGRAPHICA

Editor: G. WOLF

E 400/1961

Mäusefibroblasten
Morphologische Veränderungen
unter Einwirkung von Ektromelievirus
(Mäusepocken)

Mit 4 Abbildungen

GÖTTINGEN 1966

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Der Film ist ein Forschungsdokument und wurde zur Auswertung in Forschung und Hochschulunterricht veröffentlicht. Länge der Kopie (16-mm-Stummfilm, schwarzweiß): 137 m. Vorführdauer: 12½ Min. — Vorführgeschwindigkeit: 24 B/s

Inhalt des Films

Der Film zeigt die Fusion von embryonalen Mäusefibroblasten zu Riesenzellen nach Infektion mit Ektromelievirus.

Unter dem Einfluß von Ektromelievirus kommt es in den Riesenzellen zur Bildung von Einschlußkörpern, die kontinuierlich an Größe zunehmen und bisweilen miteinander verschmelzen.

Die in den Randgebieten der Zellen liegenden Elementarkörper und deren Freisetzung durch verschiedenartige cytoplasmatische Protrusionen der Zellen werden dargestellt.

Die Aufnahme des Films erfolgte im Jahre 1961 durch das Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen

(Direktor: Prof. Dr.-Ing. G. WOLF)

Sachbearbeitung: Dr. K.-H. HÖFLING

Aufnahme: H. H. HEUNERT

Wissenschaftliche Leitung: Priv.-Doz. Dr. K.-O. HABERMEHL und

Priv.-Doz. Dr. W. DIEFENTHAL

Innere Abteilung und Laboratorium für Virusforschung des Städt. Wenckebach-Krankenhauses Berlin-Tempelhof

(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. W. D. GERMER)

Mäusefibroblasten
Morphologische Veränderungen
unter Einwirkung von Ektromelievirus
(Mäusepocken)

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

Allgemeine Vorbemerkungen

Die kinematographische Untersuchung virusinfizierter Zellen erlaubt sowohl die Erfassung der morphologischen Veränderungen der Wirtszellen als auch einzelner Stadien der Virussynthese. Darüber hinaus ist es mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie möglich, die Viren der Pockengruppe lichtoptisch zu erfassen ([1], [4] bis [7]). Mit dem Ziel, eine räumliche und zeitliche Zuordnung der in der Zelle ablaufenden Veränderungen bei einer Ektromelievirusinfektion geben zu können, wurden die Verschmelzung der Einzelzellen zu Riesenzellen, die Bildung der Einschlußkörper und die Freisetzung der Viruselementarkörper kinematographisch untersucht [3].

Methodik

Verwendet wurden Gewebekulturen primär angesehter Mäusefibroblasten in einem Kulturmedium aus 80% EARLScher Lösung mit Lactalbuminhydrolysat (NBCO), Hefeextrakt (Difco, in Endkonzentration von 0,5% bzw. 0,1%), 20% Kälberserum und Antibioticazusatz (100 E Penicillin, 100 γ Streptomycin und 50 E Moronal pro ml). Zur Verwendung kam ein Ektromelievirusstamm, der ursprünglich eiadaptiert war und im hiesigen Laboratorium mit fortlaufenden Gewebekulturpassagen und Tierpassagen gehalten wurde. Die Inokulationsdosis wurde so gewählt, daß mehr als eine plaquebildende Einheit pro Zelle zur Anwendung kam.

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 Nährmedien resuspendierten Zellen wurden in das so entstandene Züchtungsgefäß hineingegeben. Nach 12- bzw. 24stündiger Inkubation in einem Begasungsgefäß mit 5% CO₂ in Luft und 95% relativer Luftfeuchtigkeit [2] waren die Zellen ausgewachsen und konnten nach Absaugen des Nährmediums mit Virusinokulum infiziert werden. Nach zweistündiger 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 zuoberst 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 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 Begasungsanlage 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 Vaseline-tropfen versehen wurde, wozwischen 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; Phasenkondensor mit großem Arbeitsabstand, Öl-Apochromate 100× und 60×. Die Filmaufnahmen erfolgten mit einer 35-mm-Normalfilmkamera auf Kodak Plus-X-Film. Zeitraffung zwischen 1 B/Min. und 15 B/Min.

Befunde

1. Zellaneinanderlagerung und Verschmelzung zu Riesenzellen:

Die Ausbildung der Riesenzellen und deren zeitliches Auftreten wird durch die Infektionsmultiplizität bestimmt. Bei der hier verwendeten Multiplizität von etwa 1 treten die ersten morphologischen Veränderungen 10 Stunden nach Infektionsbeginn auf. Gleichzeitig nehmen die

Pinocytose und die Beweglichkeit der Zellen ab. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Aneinanderlagerung der Zellen und zur Ausbildung unterschiedlich großer Zellkomplexe, wobei gelegentlich eine Überlappung der Randbereiche das Bild einer echten Verschmelzung schon zu einem frühen Zeitpunkte des Infektionsablaufes vortäuschen kann. In den meisten Fällen kommt es kurz nach der Aneinanderlagerung zu einer echten Verschmelzung von Einzelzellen unter Auflösung der Zellwand.

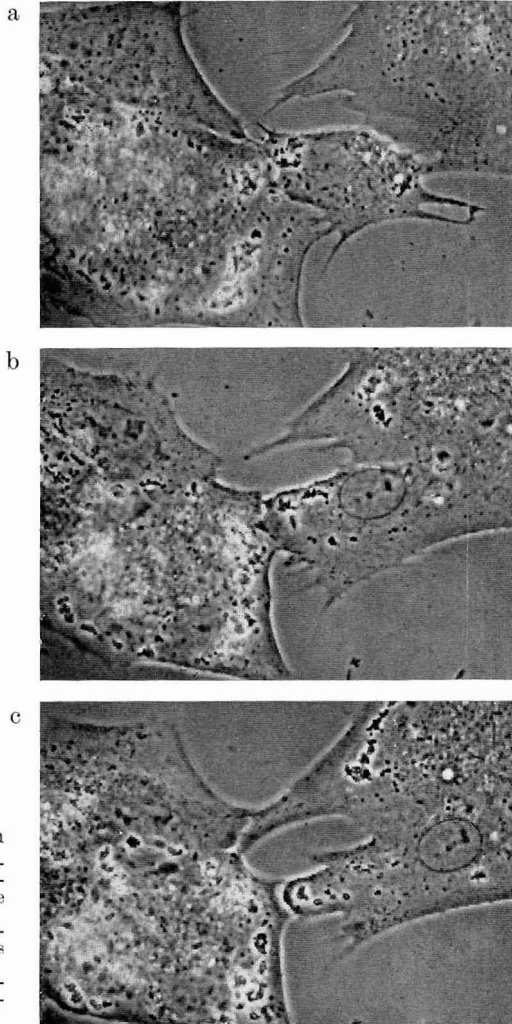
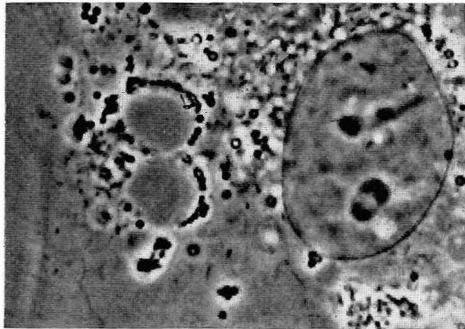


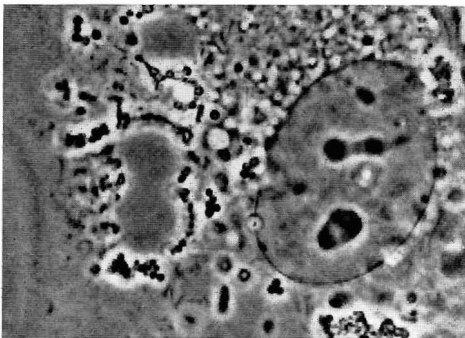
Abb. 1. Zellverschmelzung
13 Stunden nach Infektion

a: Die in der Mitte des Bildes befindliche Zelle lagert sich an die Riesenzelle rechts im Bild an und bildet eine schmale Protoplasmabrücke aus
b: Verbreiterung der Protoplasmabrücke, beginnende Einwanderung des Zellkernes
c: Verschmelzungsvorgang abgeschlossen, der Zellkern befindet sich im Inneren der Riesenzelle

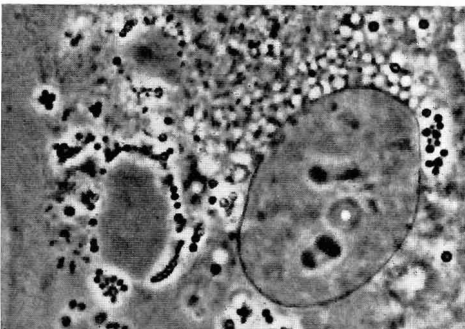
Dieser Vorgang beginnt zwischen der 8. und 15. Stunde des Infektionsbeginnes und ist im allgemeinen bis zur 24. Stunde abgeschlossen. Es bildet sich zunächst eine schmale Cytoplasmabrücke, die sich im Verlaufe mehrerer Stunden verbreitert. Nach Auflösung der Zellmembran wandert der Kern in den neugebildeten Riesenzellkomplex ein (Abb. 1). Dann ordnen sich die Zellkerne ringförmig um ein verdichtetes Zentrum an. Auch bereits ausgebildete Riesenzellkomplexe können noch mitein-



a



b



c

Abb. 2. Riesenzelle 23 Stunden nach Infektion

a: Neben dem Zellkern zwei dicht beieinanderliegende Einschlusskörper
 b: Beginnende Verschmelzung der Einschlusskörper
 c: Verschmelzungsvorgang der Einschlusskörper abgeschlossen

ander verschmelzen, so daß dann größere Komplexe entstehen. 48 bis 72 Stunden nach Infektionsbeginn kommt es zu regressiven Veränderungen in den Riesenzellen; die Zellen ziehen sich zusammen und nehmen an Dichte zu. Weiterhin kommt es zu einer Abrundung und Lösung von der Glasfläche mit Zerfall und Freisetzung von Zellbestandteilen. Dieser Vorgang geht einher mit Kernpyknose, Margination des Chromatins, Chromatolyse und Karyorhexis.

2. Entstehung und Verschmelzung virusspezifischer Einschlußkörper:

Etwa 20 Stunden nach der Inokulation beginnt die Bildung der virus-spezifischen Einschlußkörper, die im Randbereich des Cytoplasmas der Riesenzellen, etwas außerhalb der ringförmig angeordneten Zellkerne, in Erscheinung treten. Die anfänglich kleinen, runden, homogen erscheinenden Gebilde nehmen im Laufe der nächsten Stunden kontinuierlich an Größe zu, lagern sich aneinander und verschmelzen (Abb. 2). Ein solcher Verschmelzungsvorgang dauert 15 Minuten. Vergleichende histologische Untersuchungen haben gezeigt, daß es sich bei den Einschlußkörpern um die eosinophilen, Feulgen-negativen „MARCHALSchen

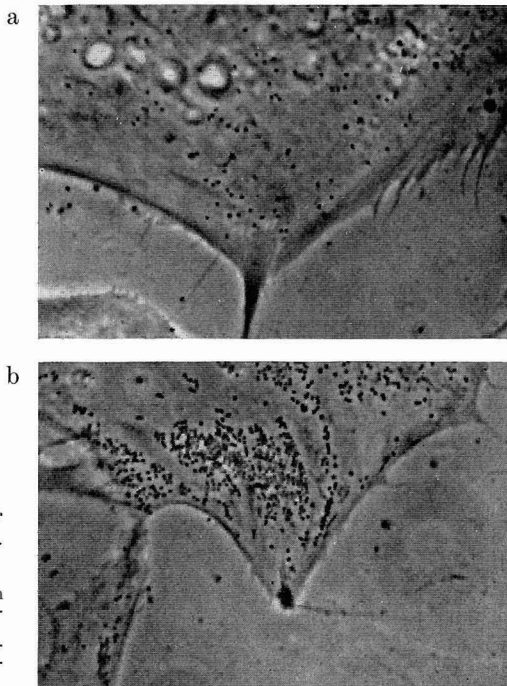


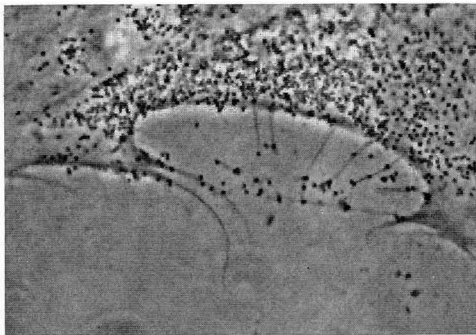
Abb. 3. Randbereich einer Riesenzelle 17 und 27 Stunden nach Infektion

a: 17 Stunden nach Infektion; Beginn des Auftretens von Virus-Elementarkörpern
 b: 27 Stunden nach Infektion; zunehmende Zahl der Virus-Elementarkörper

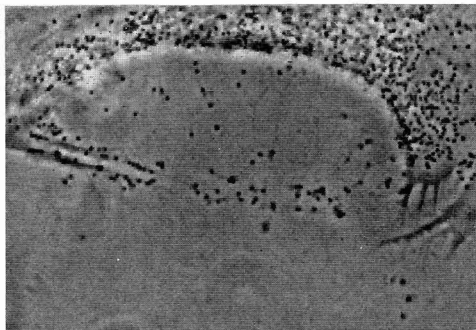
Körperchen“ handelt. Es konnte gezeigt werden, daß kein Zusammenhang zwischen diesen Einschlußkörpern und den Viruselementarkörpern besteht.

3. Auftreten und Freisetzung der Viruselementarkörper:

Etwa 14 Stunden nach Infektionsbeginn sind im Phasenkontrastmikroskop die ersten Viruselementarkörper mit einem Partikeldurchmesser von $180 \times 220 \mu$ sichtbar. Die im Randbereich der Riesenzellen im Cytoplasmasaum gut sichtbaren Ansammlungen von Elementarkörpern nehmen im Laufe der Beobachtung an Zahl zu (Abb. 3). Es findet sich eine lebhafte BROWNSche Molekularbewegung. Der Freisetzungsvorgang geht so vonstatten, daß die randständigen Elementarkörper in feine Protoplasmaausläufer eingeschleust werden. Durch Abreißen solcher Protoplasmafäden erfolgt eine Loslösung der Viruselementarkörper von der Zelle. Im weiteren Infektionsablauf wird das Bild der Virusfreisetzung vorwiegend dadurch beherrscht, daß sich das Cytoplasma der Zellen zurückzieht. Hierdurch werden lange protoplasmatische Ausläufer zurückgelassen, die ebenfalls reichlich Elementarkörper enthalten. Diese Verbindungen reißen im weiteren Verlauf ab, so daß die in dem



a



b

Abb. 4. Randbereich einer Riesenzelle 34 und 41 Stunden nach Infektion

a: 34 Stunden nach Infektion; Anreicherung zahlreicher Virus-Elementarkörper. Feine cytoplasmatische Ausläufer, die Elementarkörper enthalten
b: 41 Stunden nach Infektion; Retraction des Cytoplasma unter Zurücklassung feiner Cytoplasmafäden mit darin befindlichen Elementarkörpern

Cytoplasmafaden befindlichen Elementarkörper in das Nährmedium freigesetzt werden (Abb. 4). Gemessen an der sehr großen Zahl der innerhalb der Riesenzellen sichtbaren Elementarkörper ist die Zahl der insgesamt freigesetzten Viruspartikel gering. Sie beträgt, wie es für die Pockenvirusinfektion charakteristisch ist, etwa $\frac{1}{10}$ der Gesamtmenge der neu gebildeten Elementarkörper.

Filminhalt¹⁾

Fibroblasten nicht infiziert 8 B/Min.

1. Übersicht: Normale Gewebekulturzellen; die amöboide Bewegung der Zellen wird deutlich.

Bildfeldbreite 140 μ ; Dauer des Vorgangs 55 Min.

2. Eine Zelle in starker Vergrößerung; die fadenförmigen Mitochondrien im linken unteren Feld sind deutlich sichtbar.

Bildfeldbreite 50 μ ; Dauer des Vorgangs 41 Min.

15 B/Min.

3. Eine normale bipolare Mitose.

Bildfeldbreite 90 μ ; Dauer des Vorgangs 44 Min.

4. Eine normale tripolare Mitose.

Bildfeldbreite 90 μ ; Dauer des Vorgangs 57 Min.

Infizierte Fibroblasten *Aneinanderlagerung der Zellen und Ausbildung von Riesenzellen* 2 B/Min.

5. Übersicht: Ausbildung mehrerer verschieden großer Riesenzellkomplexe. Im linken unteren Bildfeld ist die Ausbildung einer Riesenzelle aus zahlreichen Einzelzellen und Zellkomplexen sowie deren anschließender Zerfall zu sehen.

Bildfeldbreite 330 μ ; Aufnahmebeginn 12 $\frac{1}{2}$ Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 11 Std. 28 Min.

8 B/Min.

6. Im frühen Stadium der Infektion findet sich oft nur eine Aneinanderlagerung von Zellen ohne eindeutige Verschmelzung. Die Zellen sind jedoch relativ unbeweglich und bleiben über lange Zeit hindurch dicht beieinander liegen.

Bildfeldbreite 90 μ ; Aufnahmebeginn 13 Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 2 Std. 16 Min.

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

7. In einer dichten Fibroblastenkultur ist das gleichzeitige Vorkommen einer Aneinanderlagerung von Zellen ohne Ausbildung einer Riesenzelle und andererseits eine echte Zellverschmelzung zu beobachten.

Bildfeldbreite 90 μ ; Aufnahmebeginn 13 Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 5 Std. 24 Min.

8. Hier ist eine echte Zellverschmelzung im linken oberen Bildbereich dargestellt. Ein Zellkern wandert vom Bereich oben links nach unten rechts in eine breit ausgebildete Riesenzelle hinein.

Bildfeldbreite 90 μ ; Aufnahmebeginn 13 Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 2 Std. 18 Min.

9. Echte Verschmelzung einer Einzelzelle mit dem rechts im Bild befindlichen Riesenzellkomplex. Es findet sich zunächst nur eine schmale Cytoplasmabrücke, die sich im Laufe der Zeit deutlich verbreitert. Es treten Granula aus der Einzelzelle in den Riesenzellkomplex über, und schließlich folgt der Zellkern, der mit den anderen ringförmig aneinandergelagerten Zellkernen des Riesenzellkomplexes Kontakt aufnimmt.

Bildfeldbreite 90 μ ; Aufnahmebeginn 13 Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 3 Std. 10 Min.

Entstehung und Verschmelzung der virusspezifischen Einschlußkörper *1 B/Min.*

10. Ausschnitt einer Riesenzelle: Ringförmig um ein verdichtetes Zentrum liegen Zellkerne und die homogen erscheinenden, eosinophilen Einschlußkörper. Im linken oberen Bildbereich ist die Verschmelzung zweier dieser Einschlußkörper zu sehen.

Bildfeldbreite 90 μ ; Aufnahmebeginn 26 Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 7 Std. 25 Min.

8 B/Min.

11. Verschmelzung von zwei dicht beieinander liegenden Einschlußkörpern, außerdem langsame Größenzunahme im Laufe des Infektionsvorgangs.

Bildfeldbreite 30 μ ; Aufnahmebeginn 24 Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 44 Min.

12. Verschmelzung von Einschlußkörpern und Größenzunahme derselben im Laufe der Zeit.

Bildfeldbreite 30 μ ; Aufnahmebeginn 23 Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 44 Min.

Prophasearretierung und Chromatinverklumpung

8 B/Min.

13. In einer dichten Fibroblastenkultur befinden sich drei Zellkerne im Stadium der Prophase, die während der langen Beobachtungszeit nicht in das Metaphase-Stadium übergehen. Es handelt sich hier um eine Prophasearretierung und eine Verklumpung des Chromatins.

Bildfeldbreite 90 μ ; Aufnahmebeginn 9 ½ Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 56 Min.

14. Deutliche Verklumpung und Margination des Chromatins, intensive Kernrotation in der rechts im Bild gelegenen Zelle.

Bildfeldbreite 90 μ ; Aufnahmebeginn 9 ½ Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 1 Std. 28 Min.

Auftreten und Freisetzung der Elementarkörper

8 B/Min.

15. Es ist hier ein Ausschnitt aus einer Riesenzelle dargestellt, und zwar der dünn ausgezogene Randbereich. Die Viruselementarkörper sind deutlich als dunkle, in Brownscher Molekularbewegung befindliche Partikelehen zu erkennen. Die Zahl nimmt im Verlauf der Beobachtung deutlich zu.

Bildfeldbreite 30 μ ; Aufnahmebeginn 18 Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 1 Std. 7 Min.

16. Anderer Ausschnitt aus dem Rand einer Riesenzelle; die Zahl der Elementarkörper nimmt zu.

Bildfeldbreite 30 μ ; Aufnahmebeginn 17 Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 56 Min.

17. Ansammlung von Elementarkörpern; die Elementarkörper lagern sich im Laufe der Beobachtungszeit dicht aneinander und zeigen eine relativ scharfe Abgrenzung gegen das Innere der Riesenzelle hin.

Bildfeldbreite 30 μ ; Aufnahmebeginn 27 Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 1 Std. 10 Min.

18. Freisetzung von Elementarkörpern durch feine Plasmaprotrusionen. Abreißen derselben bei Retraktion des Cytoplasmas und dadurch bedingte Freisetzung der in den Protrusionen befindlichen Viruselementarkörper in das umgebende Nährmedium.

Bildfeldbreite 30 μ ; Aufnahmebeginn 41 Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 1 Std. 19 Min.

4 B/Min.

19. Gleicher Vorgang wie bei 18., an einer anderen Zelle gezeigt.

Bildfeldbreite 30 μ ; Aufnahmebeginn 34 Std. nach Infektion, Dauer des Vorgangs 5 Std. 10 Min.

Literatur

- [1] BLAND, I. O. W., und C. F. ROBINOW: The inclusion bodies of vaccinia and their relationship to the elementary bodies studied in cultures of the rabbit's cornea. *J. Path. Bact.* **48** (1939), 381—403.
- [2] DIEFENTHAL, W., und K. O. HABERMEHL: Verhalten und Nachweis von Ektromelie-Virus in der Gewebekultur. *Zbl. Bakt. I. Orig.* **175** (1959), 67—80.
- [3] HABERMEHL, K.-O., und W. DIEFENTHAL: Kinematographische Untersuchungen an Fibroblasten nach Infektion mit Ektromelie-Virus (Mäusepocken). *Arch. ges. Virusforsch.* **11** (1962), 629—643.
- [4] HERZBERG, K.: Mikrophotographische Darstellung einer intrazellulären Virusentwicklung. *Zbl. Bakt. I. Orig.* **130** (1933/34), 326—329.
- [5] HERZBERG, K., und W. BOMMER: Vaccine-Virus und Kanarienspocken-Virus im Phasenkontrastbild. *Arch. ges. Virusforsch.* **5** (1953), 264—276.
- [6] PETERS, W., und W. STOECKENIUS: Untersuchungen am Virus der Variola-Vaccine. IV. Enzymatischer Abbau des Innenkörpers. *Z. Naturforsch.* **9b** (1954), 524—529.
- [7] STOECKENIUS, W.: Zur Darstellung von Viren der Pockengruppe im Phasenkontrast-Mikroskop. *Z. Tropenmed.* **5** (1954), 342—347.