

ENCYCLOPAEDIA CINEMATOGRAPHICA

Editor: G. WOLF

E 1142/1967

Poliomyelitis-Virus (Typ 1)
Cytopathische Veränderungen in der Gewebekultur
(HEp-2 und Affenmierenepithel)

GÖTTINGEN 1975

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Film E 1142

Poliomyelitis-Virus (Typ 1)
Cytopathische Veränderungen in der Gewebekultur
(HEp-2 und Affennierenepithel)

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

Allgemeine Vorbemerkungen¹

Die Poliomyelitis-Viren rechnen zu den Picornaviren. Sie weisen eine einsträngige RNS und eine Proteinhülle in Form eines ikosaedrischen Kapsids auf. Das Virion läßt sich nur auf menschlichen Zellen oder Zellen von Primaten vermehren. Die Infektion ist lytisch, d. h. sie führt zum Zerfall der jeweils befallenen Wirtszelle.

Die zytopathischen Veränderungen lassen sich besonders gut an Affennierenepithelzellen mit ihrem dünn ausgebreiteten Zytoplasma demonstrieren. Zwei bis drei Stunden nach Infektionsbeginn kommt es zur Verlagerung zytoplasmatischer Bestandteile in die nähere Umgebung des Zellkernes. Es bleibt ein breiter Saum von Hyaloplasma zurück. Gelegentlich ist eine Rotation des Zellkernes zu beobachten. Später tritt eine Kernpyknose ein, und das Zytoplasma zerfällt unter Zurücklassung eines charakteristischen, verzweigten Gerüsts zytoplasmatischer Ausläufer (ROBBINS et al. [5], [6], [7]). Diese Zellreste bleiben über lange Zeit unbeweglich liegen, der zytopathische Effekt findet damit seinen Abschluß.

Bei einer Virusinfektion werden die terminierenden genetischen Faktoren des Virus in die Wirtszelle eingebracht. Führt dies zu starken Abweichungen vom normalen Zellstoffwechsel, so kommt es zu den

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

oben beschriebenen schweren zytopathischen Veränderungen. Aber bereits in den frühen Stadien des Reproduktionszyklus können funktionelle Reaktionen der Poliomyelitis-Virus-infizierten Zelle beobachtet werden. Hierher gehören Chromosomenbrüche (BARTSCH et al. [1]), eine Stimulierung der Mitose und auch Arretierungen der Mitose in der Metaphase (sog. Colchizin-ähnliche Effekte) (HABERMEHL u. DREFFENTHAL [3], [4]). Die für ein zytozides Virus ungewöhnliche, für das Poliomyelitis-Virus charakteristische Stimulierung der Mitose läßt sich filmisch gut demonstrieren.

Methodik

Verwendet wurden Gewebekulturen primär angesetztter Affenierenepithelzellen oder von HEp-2-Zellen in einem Kulturmedium aus 90% EARLScher Lösung mit Lactalbuminhydrolysat (NBCO), Hefeextrakt (Difco, in Endkonzentrationen 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 Poliomyelitis-Virus-Stamm Mahoney des Typ 1. Die Inokulationsdosis wurde so gehalten, daß mit einer Multiplizität von 20 Plaque-bildenden Einheiten pro Einzelzelle infiziert wurde.

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 (DREFFENTHAL 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 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 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 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, 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; 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

HEp-2-Zellen nicht infiziert

8 B/min

1. Normale Gewebekulturzellen, Pinozytosevorgänge.

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

Nach Virusinfektion

8 B/min

2. Eine Zelle in stärkerer Vergrößerung. Verlagerung von subzellulären Bestandteilen in die nähere Umgebung des Zellkernes (Ausbildung eines Hyaloplasmas). Kernpyknose. Retraktion des Hyaloplasmas unter Zurücklassen feiner zytoplasmatischer Fäden. Ablösung einiger der infizierten Zellen vom Boden des Kulturgefäßes. Später Ausbildung eines langgestreckten verzweigten Netzes zytoplasmatischer Ausläufer.

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

3. Wiederholung des gleichen Vorganges.

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

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

Affennierenepithel nicht infiziert

8 bis 30 B/min

4. Bei dieser Zellart sind die dünn ausgebreiteten Säume des Zytoplasmas besonders gut erkennbar.

Bildfeldbreite 150 μm ; Aufn.-Freq. 8 B/min

5. Ablauf einer Mitose (Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase, Rekonstitution der Kerne).

Bildfeldbreite 58 μm ; Aufn.-Freq. 30 B/min

6. Ablauf einer Mitose.

Bildfeldbreite 60 μm ; Aufn.-Freq. 15 B/min

Nach Virusinfektion

4 und 8 B/min

7. Verlagerung von subzellulären Bestandteilen in die nähere Umgebung des Zellkernes (Ausbildung eines Hyaloplasmas). Kernpyknose. Gelegentliche Kernrotation. Das Hyaloplasma bleibt noch längere Zeit bestehen; dann bilden sich die feinen verzweigten Ausläufer des Zytoplasmas aus, die gegen Ende des zytopathischen Effektes wie ein Netzwerk auf dem Boden des Kulturgefäßes zurückbleiben.

Bildfeldbreite 180 μm ; Aufn.-Freq. 4 B/min

8. Wiederholung des gleichen Vorganges.

Bildfeldbreite 150 μm ; Aufn.-Freq. 8 B/min

9. Mitoseablauf in einer Virus-infizierten Zelle. Es laufen alle Stadien der Mitose bis zur Rekonstitution der Tochterzellen ab. Erst dann, nach einem längeren Zeitintervall, kommt es zu dem für dieses Virus charakteristischen zytopathischen Effekt.

Bildfeldbreite 150 μm ; Aufn.-Freq. 8 B/min

10. Wiederholung des gleichen Vorganges. Nach Rekonstitution der Virus-infizierten Tochterzellen erfolgt ein Bildsprung, um die Zellen wieder in das Bildfeld zu bekommen und den nachfolgenden Zellenzerfall zu erfassen.

Bildfeldbreite 120 μm ; Aufn.-Freq. 8 B/min

Literatur

- [1] BARTSCH, H. D., K.-O. HABERMEHL and W. DIEFENTHAL: Correlation between poliomyelitisvirus-reproduction-cycle, chromosomal alterations and lysosomal enzymes. Arch. ges. Virusforsch. 27 (1969), 115—127.

- [2] DIEFENTHAL, 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] HABERMEHL, K.-O., und W. DIEFENTHAL: Der Einfluß von Virusinfektionen auf den Ablauf der Zellteilung. *Zbl. Bakt., I. Orig.* **199** (1966), 273—314.
- [4] HABERMEHL, K.-O., R. DIEFENTHAL und W. DIEFENTHAL: Nachweis eines Colchizin-ähnlichen Effektes in Poliomyelitis-infizierten Gewebekulturen nach Unterbrechung der Virusreproduktion durch Guanidin. *Arch. ges. Virusforsch.* **26** (1969), 138—148.
- [5] ROBBINS, F. C., J. F. ENDERS and T. H. WELLER: Cytopathogenic effect of poliomyelitis virus in vitro on human embryonic tissues. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* **75** (1950), 370—374.
- [6] ROBBINS, F. C., J. F. ENDERS, T. H. WELLER and G. L. FLORENTINO: Studies on the cultivation poliomyelitis viruses in tissue culture. V. The direct isolation and serologic identification of virus strains in tissue culture from patients with non-paralytic and paralytic poliomyelitis. *Am. J. Hyg.* **54** (1951), 286—293.
- [7] ROBBINS, F. C., T. H. WELLER and J. F. ENDERS: Studies on the cultivation of poliomyelitis viruses in tissue culture. II. The propagation of the poliomyelitis viruses in roller-tube cultures of various human tissues. *J. immunol.* **69** (1952), 673—694.

Angaben zum Film

Das Filmdokument wurde 1967 zur Auswertung in Forschung und Hochschulunterricht veröffentlicht. Stummfilm, 16 mm, schwarzweiß, 122 m, 11 min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden im Jahre 1966. Veröffentlichung aus der Inneren Abteilung und dem Laboratorium für Virusforschung des Städt. 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 und Affeniereneithelien in der Gewebekultur nach Infektion mit Poliomyelitis-Virus vom Typ 1. Unter dem Einfluß der Infektion kommt es zunächst zu einer Verlagerung zellulärer zytoplasmatischer Bestandteile in die Umgebung des Zellkernes mit Ausbildung eines Hyaloplasmas. Sodann erfolgen eine Pyknose des Zellkernes und der Zerfall des Zytoplasmas unter Ausbildung eines verzweigten Netzes feiner zytoplasmatischer Fäden, die noch für längere Zeit auf dem Boden des Kulturgefäßes haften. Die in den Poliomyelitis-Virus-infizierten Zellen zu beobachtende Stimulierung der Zell-

teilung wird demonstriert. Im Anschluß an die durchgemachte Teilung tritt in den Tochterzellen der für diese Virusart charakteristische zytopathische Effekt auf.

Summary of the Film

The film shows the cytopathic changes of human epithelial cells and of epithelia of monkey kidneys in tissue culture after infection with poliomyelitis virus type 1. Under the influence of the infection certain cellular cytoplasm components are at first displaced into the region surrounding the cell nucleus, and a hyaloplasm is formed. Then pyknosis and dissociation of the cytoplasm occur with formation of a branched reticulum of fine cytoplasm filaments, which stick for some time to the bottom of the culture vessel. The stimulation of cell division observed in the cells infected with poliomyelitis virus is shown. After division the daughter cells show the cytopathic effect characteristic for this type of virus.

Résumé du Film

Le film montre les altérations cytopathologiques de cellules épithéliales humaines et d'épithéliums rénaux de singe dans la culture tissulaire après infection par le virus de la poliomyélite du type 1. Sous l'influence de l'infection, il se produit d'abord un transfert d'éléments cellulaires cytoplasmiques dans la zone du noyau cellulaire avec formation d'un hyaloplasme. Ensuite surviennent une pycnose du noyau cellulaire et la destruction du cytoplasme avec formation d'un réseau remifé de fins fils cytoplasmiques qui adhèrent pendant quelque temps encore au fond du récipient de culture. La stimulation de la division cellulaire, que l'on observe dans les cellules infectées par le virus de la poliomyélite, est démontrée. A la suite de la division, on voit apparaître dans les cellules filles l'effet cytopathologique caractéristique de cette variété virale.