

ENCYCLOPAEDIA CINEMATOGRAPHICA

Editor: G. WOLF

E 1121/1967

Vaccinia-Virus
Cytopathische Veränderungen in der Gewebekultur
(Affennierenepithel)
Freisetzung der Viren

GÖTTINGEN 1975

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Film E 1121

Vaccinia-Virus
Cytopathische Veränderungen in der Gewebekultur
(Affennierenepithel)
Freisetzung der Viren

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

Allgemeine Vorbemerkungen¹

Die kinematographische Untersuchung Pocken-Virus-infizierter Zellen erlaubt sowohl die Erfassung der morphologischen Veränderungen der infizierten Wirtszellen als auch einzelner Stadien der Virussyntese. Insbesondere ist es mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie möglich, die Viren der Pockengruppe lichtoptisch zu erfassen (BLAND u. ROBINOW [1], DIEFENTHAL u. HABERMEHL [4], [7], [8], HERZBERG [9], HERZBERG u. BOMMER [10], PETERS u. STOECKENIUS [13], STOECKENIUS [16]).

Bei dem Vaccinia-Virus handelt es sich um einen Vertreter der Pockenvirus-Gruppe, die durch eine doppelsträngige DNS und eine komplexe Struktur, bestehend aus einem Core, Lateralkörpern und äußerer Membran, gekennzeichnet ist. Das Virion hat ein Ausmaß von $300 \times 200 \times 100$ nm.

Nach Infektion mit dem Vaccinia-Virus tritt zu Beginn gelegentlich ein zytotoxischer Effekt auf, der zu einer schnell einsetzenden Abrundung und Aggregation von Zellen führt. Vereinzelt sind auch Blasterbewegungen zu beobachten. Nach einigen Stunden breiten sich die Zellen wieder aus, es werden feine Zytoplasmasäume ausgesandt, und eine lebhafte amöboide Bewegung der Zellen setzt ein. Dieser kurz nach Infektionsbeginn einsetzende toxische Effekt ist zwar an die Virus-

¹ Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 8 u. 9.

inokulation, nicht jedoch an das Ablaufen eines vollständigen Reproduktionszyklus gebunden. Für sein Zustandekommen ist ein hohes Virusinokulum erforderlich. Dieser Effekt ist inkonstant und nur bei einigen Virusstämmen und einigen Zellarten vorhanden (BROWN et al. [2], [3], SCHERER [15], VIEUCHANGE et al. [17]).

Erst im weiteren Infektionsablauf kommt es zu den charakteristischen zytopathischen Veränderungen. Die Zellen bleiben in ausgebreitetem Zustand oder auch abgerundet längere Zeit liegen, später kommt es zum Zerfall.

Auch die weiteren durch das Vaccinia-Virus hervorgerufenen zytopathischen Veränderungen sind abhängig vom Virusstamm und der Zellart. Es werden sowohl Abrundungen und Aneinanderlagerungen von Zellen als auch gelegentlich die Bildung von Riesenzellen beschrieben (BLAND u. ROBINOW [1], NAUCK u. ROBINOW [12], RIVERS et al. [14], SCHERER [15]).

Die bei einigen Viren der Pockengruppe zu beobachtenden Einschlußkörper im Zytoplasma der infizierten Zellen sind von unterschiedlicher Zusammensetzung. Beim Vaccinia-Virus handelt es sich hierbei um die sich im Bereich der Virusmatrix ansammelnden Virionen (GAYLORD u. MELNICK [6], MORGAN u. WYCKOFF [11]). Im Gegensatz hierzu sind bei einer Infektion mit dem Virus der Mäusepocken in den eosinophilen Marchalschen Einschlußkörpern keine Viren nachweisbar (HABERMEHL u. DIEFENTHAL [7]).

Im späteren Infektionsablauf werden die Viren aus ihrem Bildungszentrum, der Matrix, in die Peripherie der Zelle ausgeschleust und sammeln sich hier in größeren Mengen an. Die Freisetzung der Viren aus der Zelle erfolgt einerseits durch dünne Protrusionen der Zellmembran, an deren Ende sich jeweils ein Virion befindet. Andererseits finden sich langausgezogene Zytoplasmafäden, in denen sich Virionen befinden. Retrahiert sich die infizierte Zelle, so reißen diese an der Unterlage haftenden Zytoplasmafäden von der Zelle ab und bewirken so die Loslösung.

Die gleichen Freisetzungsmechanismen konnten auch nach Infektion mit dem Virus der Mäusepocken beobachtet werden (DIEFENTHAL u. HABERMEHL [4]). Mit dem Zerfall der sich retrahierenden Zellen findet der zytopathische Effekt der Vaccinia-Virus-infizierten Zellen seinen Abschluß.

Methodik

Verwendet wurden Gewebekulturen primär angesetztter Affennierenepithelien 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 γ Streptomycin und 50 E Moronal pro ml). Zur

Verwendung kam der Stamm Berlin des Vaccinia-Virus, der im hiesigen Laboratorium in fortlaufenden Gewebekulturpassagen gehalten wurde. Die Inokulation erfolgte mit einer Multiplizität von 10 Plaque-bildenden Einheiten pro Zelle.

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 [5]) 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 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. Gewebekulturzellen mit dünn ausgebreitetem Zytoplasmasaum.
Bildfeldbreite 525 μm ; Aufn.-Freq. 8 B/min

Toxischer Effekt und Wiederausbreitung der Zellen nach Virusinfektion

8 B/min

2. Schnell einsetzende Abrundung der Zellen mit Retraktion des Zytoplasmas, vereinzelt Blasterbewegungen, gelegentlich amöboide Bewegungen, Aneinanderlagerung der Zellen. Mit der sich hieran anschließenden Wiederausbreitung der Zellen ist die Periode des toxischen Effektes abgeschlossen.

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

3. Wiederholung der Vorgänge beim toxischen Effekt.

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

Bildungszentrum der Viren (Matrix)

8 B/min

4. Stärkere Vergrößerung einer Einzelzelle mit der rechts oberhalb des Zellkernes sichtbaren Matrix in Form eines feinkörnigen dichten Areals.
Bildfeldbreite 48 μm ; Aufn.-Freq. 8 B/min

Ansammlung von Viren am Zellrand

4 B/s

5. Randbereich einer Zelle in starker Vergrößerung. Die kleinen dunklen Punkte stellen Vaccinia-Virionen dar. Lebhaftige Brownsche Molekularbewegung.

Bildfeldbreite 45 μm ; Aufn.-Freq. 4 B/s

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

6. Randbereich einer Zelle. Im rechten Bereich des Bildrandes werden in Schüben Vaccinia-Virionen in die Peripherie der Zelle ausgeschleust. Bildfeldbreite 45 μm ; Aufn.-Freq. 4 B/s

Freisetzung von Viren aus der Zelle

2 B/s bis 8 B/min

7. Randbereich einer Zelle, die gegen Ende des Reproduktionszyklus mit zahlreichen Vaccinia-Virionen angefüllt ist, die lebhafte Brownsche Molekularbewegung aufweisen. Die Zelle beginnt sich zu retrahieren, und in feinen Zellausläufern bleiben die darin befindlichen Viren zurück.

Bildfeldbreite 45 μm ; Aufn.-Freq. 15 B/min

8. Randbereich einer Zelle. In den feinen Ausläufern der Zellmembran liegen zahlreiche Virionen, die bei der Retraktion der Zelle auf der Unterlage zurückbleiben.

Bildfeldbreite 48 μm ; Aufn.-Freq. 15 B/min

9. Stärkste Vergrößerung eines Teils der Zelloberfläche mit schlauchförmigen Protrusionen der Zellmembran, an deren Spitze sich jeweils ein Virion befindet. Im rechten Bildrand sind einige Freisetzungsvorgänge aus solchen Protrusionen sichtbar.

Bildfeldbreite 45 μm ; Aufn.-Freq. 1 und 2 B/s

10. Absterbende Zelle, die sich retrahiert. In den zurückbleibenden Zytoplasmaresten liegen Virionen, die hierdurch ihre Loslösung von der Zelle erfahren.

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

Literatur

- [1] BLAND, I. O. W., and 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] BROWN, A., S. A. MAYYASI and J. E. OFFICER: The agglutination of L-cells by vaccinia virus. II. The cell virus interaction related to the agglutination reaction. *J. Immunol.* **83** (1959), 521—528.
- [3] BROWN, A., S. A. MAYYASI and J. E. OFFICER: The toxic activity of vaccinia virus in tissue culture. *J. infect. Dis.* **104** (1959), 193—202.
- [4] DIFENTHAL, W., und K.-O. HABERMEHL: Verhalten und Nachweis von Ektromelie-Virus in der Gewebekultur. *Zbl. Bakt., I. Orig.* **175** (1959), 67—80.
- [5] DIFENTHAL, 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.

- [6] GAYLORD, W. H., and J. L. MELNICK: Intracelluläre Formen von Pockenviren, wie sie durch das Elektronenmikroskop (Vaccinia, Ectromelia, Molluscum contagiosum) dargestellt werden. *J. exptl. Med.* **98** (1953), 157—172.
- [7] HABERMEHL, K.-O., und W. DIEFENTHAL: Kinematographische Untersuchungen an Fibroblasten nach Infektion mit Ektromelie-Virus (Mäusepocken). *Arch. ges. Virusforsch.* **11** (1962), 629—643.
- [8] HABERMEHL, K.-O., und W. DIEFENTHAL: Der Einfluß von Virusinfektionen auf den Ablauf der Zellteilung. *Zbl. Bakt., I. Orig.* **199** (1966), 273—314.
- [9] HERZBERG, K.: Mikrophotographische Darstellung einer intrazellulären Virusentwicklung. *Zbl. Bakt., I. Orig.* **130** (1933/34), 326—329.
- [10] HERZBERG, K., und W. BOMMER: Vaccine-Virus und Kanarienvirus im Phasenkontrastbild. *Arch. ges. Virusforsch.* **5** (1953), 264—276.
- [11] MORGAN, C., and R. G. W. WYCKOFF: The electron microscopy of fowl pox virus within the chorio-allantoic membrane. *J. immunol.* **65** (1950), 285—295.
- [12] NAUCK, E. G., und C. E. ROBINOW: Untersuchungen über Guanierische Körperchen in der Gewebekultur. *Zbl. Bakt., I. Orig.* **135** (1935), 437—445.
- [13] PETERS, W., und W. STOECKENIUS: Untersuchungen am Virus der Variola-Vaccine. IV. Enzymatischer Abbau des Innenkörpers. *Z. Naturforsch.* **9b** (1954), 524—529.
- [14] RIVERS, T. M., E. HAAGEN and R. S. MUCKENFUSS: Development in tissue cultures of the intracellular changes characteristic of vaccinia and herpetic infection. *J. exptl. Med.* **50** (1929), 665—672.
- [15] SCHERER, W. F.: Agglutination of a pure strain of mammalian cells (L-strain Earle) by suspensions of vaccinia virus. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* **80** (1952), 598—602.
- [16] STOECKENIUS, W.: Zur Darstellung von Viren der Pockengruppe im Phasenkontrast-Mikroskop. *Z. Tropenmed.* **5** (1954), 342—347.
- [17] VIEUCHANGE, J., G. de BRION et J. GRUEST: De l'action cytopathogène du virus vaccinal en culture de tissu et de l'hypothèse d'un effet cytotoxique. *Ann. Inst. Pasteur* **93** (1957), 218—224.

Angaben zum Film

Das Filmdokument wurde 1967 zur Auswertung in Forschung und Hochschulunterricht veröffentlicht. Stummfilm, 16 mm, schwarzweiß, 105 m, 10 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. W. DIEFENTHAL, Priv.-Doz. Dr. K.-O. HABERMEHL, 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 morphologischen Veränderungen von Nieren-Epithelzellen der Gewebekultur nach Infektion mit Vaccinia-Virus. Zunächst ist ein zytotoxischer Effekt sichtbar, der durch eine anfängliche Abrundung und Aneinanderlagerung der Zellen gekennzeichnet ist. Im Anschluß hieran erfolgt eine Wiederausbreitung der Zellen mit nur noch vereinzelt amöboiden Bewegungen. Im Verlaufe des Virus-Reproduktionszyklus wird perinukleär die Matrix der Virus-Reproduktion sichtbar. In zeitlichem Zusammenhang hiermit erfolgten die Ausschleusung der neu synthetisierten Virionen in die Peripherie der Zelle und die Ansammlung größerer Mengen von Virionen im Zellrandbereich. Die Freisetzung erfolgt einerseits durch dünne schlauchförmige Protrusionen der Zellmembran, andererseits durch feine Zytoplasmafäden und Reste von Zytoplasma, die bei der Retraktion der absterbenden Zelle auf der Unterlage des Kulturgefäßes haften bleiben und von der Zelle abreißen.

Summary of the Film

The film shows the morphological changes of epithelial cells of the kidney in tissue culture after infection with vaccinia virus. At first a cytotoxic effect becomes apparent, characterised by initial rounding and agglomeration of the cells. The cells then move apart again with occasional ameboid movements. In the course of the viral reproduction cycle the matrix of virus reproduction becomes visible around the nucleus. In a temporal relationship with this event the newly synthesised virions move into the periphery of the cell, and great numbers of virions accumulate in the border region of the cell. They are liberated through thin tubular protrusions of the cell membrane and also by thin cytoplasm fibrils and remnants of cytoplasm that have become agglutinated to the bottom of the culture vessel, torn off the cells when the dying cells retract.

Résumé du Film

Le film montre les altérations morphologiques de cellules épithéliales rénales de la culture tissulaire après infection par des virus-vaccins. On observe d'abord un effet cytotoxique qui est caractérisé par un arrondissement initial et une juxtaposition des cellules. Puis les cellules s'étalent de nouveau et ne présentent plus que des mouvements amiboïdes isolés. Au cours du cycle de reproduction des virus, la matrice de la reproduction virale apparaît autour du noyau. Parallèlement, les virions nouvellement synthétisés envahissent la périphérie de la cellule et se déposent en quantités plus importantes dans la zone marginale de la cellule. La libération s'effectue d'une part par de fines protrusions tubulaires de la membrane cellulaire et d'autre part par de fins fils cytoplasmiques et des restes de cytoplasme qui adhèrent au fond du récipient de culture lors de la rétraction de la cellule mourante et se détachent de la cellule.