

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
(Direktor: Prof. Dr. H.-W. ALTMANN)

Über Coccidien als „Kerneinschlüsse“ Beobachtungen an *Cyclospora caryolytica* Schaudinn

Von

H.-W. ALTMANN

Mit 2 Textabbildungen in 10 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 25. Februar 1961)

Die bereits seit R. HEIDENHAIN (1888) bekannte Tatsache, daß es in der Protozoenordnung der Coccidien, und zwar in der Unterordnung der Schizococcidien (s. GRELL) einige wenige Arten gibt, die ihre Entwicklung im Kerne statt im Cytoplasma der befallenen Zellen durchlaufen (s. DAVIS u. Mitarb.), ist auch in karyologischer Hinsicht von besonderem Interesse. Nicht nur wegen der damit augenscheinlich verbundenen allmählichen Kernzerstörung, sondern vor allem wegen der Frage, wie die relativ großen Sporoziten oder Merozoiten in den Kern gelangen, genauer, wie sie die Kernmembran durchsetzen können, ohne den Kern dabei sogleich zugrunde zu richten. Denn es steht außer jedem Zweifel, daß die elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Membranporen (z. B. BARNES und DAVIS, WATSON) ihrer Kleinheit wegen als vorgebildete Eintrittspforte nicht in Frage kommen. Die bisher vorliegende Literatur gibt darauf keine bündige Antwort, obwohl bereits SCHAUDINN, der am Beispiel der Infektion des Maulwurfdarmes mit *Cyclospora caryolytica* Schaudinn die cytologischen Verhältnisse sehr eingehend untersucht hat, das Eindringen des langgestreckten Parasiten in den Kern und seine spätere intranucleäre Abkugelung nicht nur beschrieben, sondern sogar zeichnerisch festgehalten hat. Auch die übrigen Arbeiten, die sich mit der gleichen *Cyclospora*-art (TANABE) oder mit anderen, meist das Darmepithel (z. B. STEINHAUS, RAY u. DAS-GUPTA) von Kaltblütern betreffenden Species befassen, helfen in diesem Punkte nicht weiter. Dagegen ist eine Angabe von DAVIS, BOWMAN und BOUGHTON, die das einzige intranucleäre Coccidium eines Haustieres, *Eimeria alabamensis* Christensen, im Rinderdarm studiert haben, wesentlich. Sie haben nämlich an einem Schnitt zwei Sporoziten in je einer seitlich gelegenen Delle des leicht elongierten Kernes gesehen und dies für eine Momentaufnahme der Penetration der Kernmembran gehalten. Es erhebt sich also die Frage, ob eine solche Einfaltung der Kernmembran, die, geringer und vorübergehend, auch bei rein cytoplasmatischen Coccidieninfektionen auftreten kann, nicht öfter zu beobachten ist und ob sich dadurch nicht vielleicht das Rätsel des Kernbefalles lösen lasse.

Der Gedanke liegt um so näher, als auch auf den übrigen von DAVIS u. Mitarb. vorgelegten Photographien um die jungen eben abgerundeten Parasiten eine chromatinbesetzte Hülle zu erkennen ist, die genauso aussieht wie die äußere Kernmembran. Auch manche Zeichnungen älterer Arbeit erwecken den gleichen Eindruck. Ja, selbst der gerade in den Kern eindringende Sporozoit, den SCHAUD-

DINN wiedergegeben hat, ist von einer scharfen dunklen Linie umgeben, die ihn vom Caryoplasma trennt und an der Peripherie in die genauso dargestellte Kernmembran übergeht. Die zeichnerische Dokumentation sagt in diesem Falle also womöglich mehr aus als die zugehörige Beschreibung — sie entspricht jedenfalls den späteren Angaben, welche die amerikanischen Autoren (DAVIS u. Mitarb.) von entsprechenden Stadien gemacht haben.

Dank der Güte des verstorbenen Professor Dr. E. REICHENOW hatten wir Gelegenheit, einen formolfixierten und in Paraffin eingebetteten Maulwurfsdarm, der mit *Cyclospora caryolytica* Schaudinn infiziert war, mit den üblichen Methoden selbst zu untersuchen und uns von den morphologischen Gegebenheiten ein eigenes Bild zu machen. Die Infektion war mäßig; der Epithelverband war also noch erhalten und die befallenen Zellen lagen meist, dem Infektionsmodus entsprechend, in kleinen Gruppen nebeneinander.

Zwar gelang es uns nicht, einen langgestreckten Sichelkeim auf seinem Wege in den Kern zu fassen; wir fanden aber viele junge Parasiten, die sich gerade eben im Kerne abgerundet hatten. Und dabei ließ sich erkennen, daß sie auch dann noch stets von einer besonderen Membran umgeben waren (Abb. 1a—c). Sie wird bei phasenoptischer Betrachtung besonders deutlich und umhüllt in einiger Entfernung das heranwachsende Coccidium, gleichgültig, ob es sich dabei um einen Schizonten oder um einen Gamonten handelt. Daß wir es hier mit einem Derivat der Kernmembran zu tun haben, wird dadurch nahegelegt, daß die Struktur derjenigen der äußeren Kernbegrenzung völlig gleicht (Abb. 1b, c). Den endgültigen Beweis liefern aber erst solche, freilich nur selten vorkommenden Kerne, in denen die den Parasiten umgebende kugelige chromatinbesetzte Hülle mit einem schmalen zylindrischen Stiel kontinuierlich in die Kernmembran übergeht (Abb. 1a). In seinem Innern ist in günstigen Fällen ein Lumen eben noch erkennbar, welches den von dem Parasiten eingenommenen Raum mit dem des Cytoplasmas verbindet. Das alles besagt aber, daß die Coccidie, zumindest auf den ersten Stadien ihrer Entwicklung, zwar nahezu vollständig vom Kern umfangen wird, aber doch nicht im Caryoplasma, sondern nur in einer tiefen Tasche der Kernmembran gelegen ist. Mit anderen Worten: Die Kernmembran wird gar nicht perforiert, sondern nur eingedellt oder eingezogen, und das Coccid setzt seine Entwicklung zunächst in dieser Kerneinstülpung fort, die dabei seinen Gestaltveränderungen weitestgehend folgt. Da sich der Sporozoit in der Taschentiefe abrundet und vergrößert, wird dieser Bereich ausgeweitet, während sich der peripher gelegene parasitenfrei gewordene Anteil verschmälert und damit ein stielartiges Aussehen gewinnt.

Die Bilder, die dabei zustande kommen, gleichen grundsätzlich denjenigen, die man von andersartigen membranumzogenen „Kerneinschlüssen“ seit langem kennt. Zum Beweis sei hier nur die Abbildung eines „intranucleären“ Fetttropfens in der Leberzelle einer Maus wiedergegeben (Abb. 2a), dessen membranumzogener Raum gleichfalls nur noch mit einem engen Porus nach außen mündet und auf Grund elektronenoptischer Untersuchungen (WESSEL, LEDUC u. WILSON) mit Sicherheit als eingestülpter Plasmabezirk aufzufassen ist. Da es sich auch bei der großen Mehrzahl aller eiweißhaltigen, bislang je nach den auftretenden sekundären Veränderungen (WESSEL, LEDUC u. WILSON) als Kernkugeln, Kernvacuolen, nucleoläre Blasen oder dergleichen bezeichneten membranumzogenen Einschlüssen

in normalen (z. B. CORDIER u. DE HARVEN) wie besonders in pathologischen Zellformen (KLEINFELD u. GREIDER, WESSEL, LEDUC u. WILSON, FRUHLING u. PORTE) um solche Einschlüsse plasmatischen Materials handelt und das gleiche nach eigenen Untersuchungen auch für die Pigmentinklusionen in Melanomzellen (APITZ) oder in hämosiderinhaltigen Leberepithelien [BERG (3)] anzunehmen ist, stellt die Lage des Parasiten in einer solchen tiefen Membraninvagination nichts

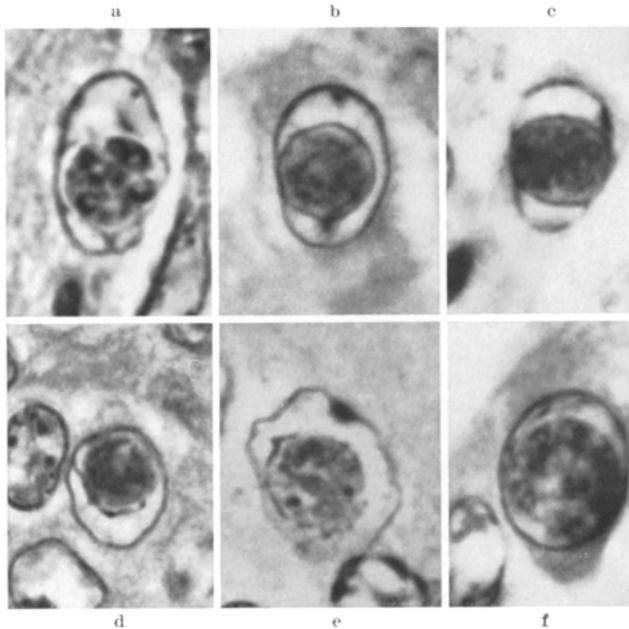


Abb. 1 a—f. Zellkerne mit Parasiten. a—c Die Coccidien sind von einer chromatinbesetzten Membran umgeben, die bei a mit einem schmalen, aber noch lumenhaltigen Stiel in die Kernhülle übergeht (unten) und bei b den Ansatz dieses Stieles gerade noch erkennen läßt. d—f Zunehmender Abbau der den Parasiten umgebenden Membrananteile, die bei f völlig geschwunden sind. Formalin, a, d = van Gieson und Phasenkontrast, b = van Gieson, c, f = Eisenhämatoxylin, e = HE. Vergr. 2400 ×

grundsätzlich Neues, sondern nur ein weiteres Beispiel für einen besonders unter pathologischen Bedingungen oft verwirklichten Vorgang dar.

Weshalb es im Einzelfalle zur Bildung derartiger Membrantaschen kommt, ist zwar noch nicht befriedigend geklärt (vgl. WESSEL, CORDIER und DE HARVEN) und wohl auch nicht immer in gleicher Weise zu beantworten. Bei den Coccidieninfektionen wird man aber wohl mit einer aktiven Beteiligung des Parasiten rechnen und damit wirklich von einer Eindellung sprechen dürfen.

Die mitgeteilten Beobachtungen besagen indessen nicht, daß der Parasit ständig in seiner Membrantasche beschlossen bliebe. Es mag freilich sein, daß auch dieses gelegentlich vorkommt, ja, daß der weiterentwickelte Parasit bzw. die aus ihm entstandenen Merozoiten oder Mikrogameten auf dem gleichen Wege, ohne den Kern grob zu zerstören, wieder in den Zelleib gelangen, so wie das STEINHAUS bei *Eimeria salamandrae* seinerzeit angenommen und gezeichnet hat. Aber wir selber haben dergleichen nicht gesehen. Wir fanden vielmehr, daß auf späteren Stadien der Zellinfektion, also um reife Schizonten oder Gamonten, eine umhüllende Kernmembran mit lichtmikroskopischen Methoden meist nicht

mehr nachweisbar ist (Abb. 2f). Dabei gibt es zwischen den membranumzogenen und den membranfreien „Einschlüssen“ alle Übergänge, sei es daß der Nachweis der Membran unsicher wird, sei es, daß nur hier und da noch einzelne Bruchstücke davon erkennbar sind (Abb. 1d—f). Bisweilen hält sich das kondensierte Chromatin, das den ehemaligen Stiel begrenzt hat, besonders lange; eine Lichtung

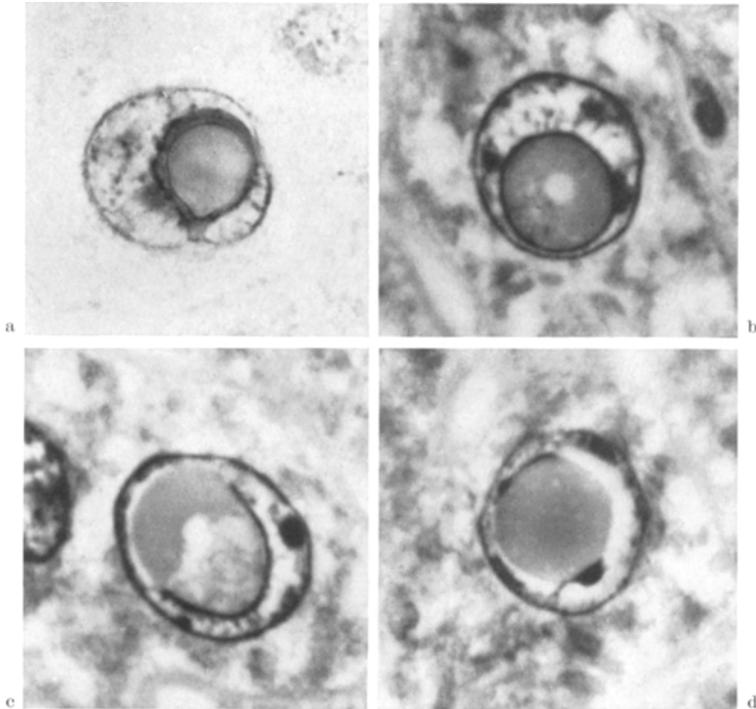


Abb. 2a—d. Cytoplasmatische Einschlüsse in stark vergrößerten Leberzellkernen der weißen Maus. a Fetttropfen (mit zentralem Flüssigkeitstropfen) von einer Membrantasche umgeben, die unten kontinuierlich in die Kernhülle übergeht. Formol, Hämatoxylin-Sudan. Vergr. 1500 \times . b—d Zunehmender Membranverlust um eine eingeschlossene, coagulierte (und daher stark acidophile) Plasmaportion. Susa, Goldner. Vergr. 1900 \times

ist aber nie mehr zu erkennen, und schließlich ist auch dieser Rest der Kernbucht nicht mehr nachzuweisen. Erst wenn der verbindende Membranstiel „oblitert“ und die anfänglich vorhandene Hülle zugrunde gegangen ist, liegt der Parasit also wirklich im strengen Sinne des Wortes intranucleär.

Auch dieser zweite Vorgang, die sekundäre Aufnahme in den Binnenraum des Kernes durch Abbau der Hüllmembran, ist von den oben erwähnten andersartigen Kerneinschlüssen her bekannt. Bereits im Lichtmikroskop wird dergleichen deutlich und ist deshalb auch früher schon hervorgehoben worden, als diese Einschlüsse selbst noch nicht als Einstülpungen des Cytoplasmas erkannt waren und fälschlich, auch von uns selbst, noch für nucleolären Ursprungs gehalten wurden. Als Beleg seien sichere, sekundär allerdings stark veränderte Cytoplasmaeinschlüsse in vergrößerten Leberkernen weißer Mäuse wiedergegeben, an denen diese progressive Membranzerstörung klar erkennbar ist (Abb. 2b—d). Auch elektronenoptische Beobachtungen, nach denen Fetttropfen gelegentlich

zwar in unmittelbarer Nähe einer Membranfalte liegen, aber selbst nicht mehr davon umzogen sind (LEDUC u. WILSON), machen den späteren Abbau einer zunächst vorhandenen Membran sehr wahrscheinlich.

Da die sekundäre Membranauflösung somit bei jeglichen Kerninklusionen auftreten kann, ist sie kein Spezifikum der Coccidieninfektion und somit in diesem Falle nicht oder nicht allein der Wirkung des Parasiten zur Last zu legen. Sie geht in erster Linie wohl darauf zurück, daß die invaginierten Membrananteile stoffwechselphysiologisch allzu schlecht gestellt sind, wenn sie mit der Versorgungsbasis des energieliefernden Cytoplasmas nur noch durch einen schmalen Porus oder gar nicht mehr verbunden sind. Die so bedingte Störung der Versorgungs- und Austauschvorgänge ist ja auch für die schweren Veränderungen verantwortlich zu machen, die an dem Ergastoplasma oder an den Mitochondrien eingeschlossener Plasmaportionen elektronenmikroskopisch nachgewiesen sind (WESSEL LEDUC u. WILSON) und lichtmikroskopisch u. U. in einer Homogenisierung, Koagulation und Denaturierung des gesamten eingeschlossenen Materials zum Ausdruck kommen (vgl. Abb. 2b—d). Der Untergang der Hüllmembran ist also bei parasitären wie bei rein cytoplasmatischen Kerneinschlüssen der Ausdruck dafür, daß ihr Erhaltungsstoffwechsel nicht mehr gewährleistet ist. Das macht verständlich, daß er eintreten kann, aber nicht eintreten muß. Es ist daher sehr wohl denkbar, daß er auch bei den umschlossenen Parasiten gelegentlich einmal ausbleiben kann (vgl. STEINHAUS), wenngleich hier die Bedingungen durch das Wachstum des Parasiten und die damit verbundene progressive Dehnung der Membran besonders ungünstig liegen. In jedem Falle aber ist der umschriebene Membranverlust und die dadurch erst verwirklichte echte intranucleäre Lage des Parasiten mehr eine zufällige, besser vielleicht eine zusätzliche Folge der Membraninvagination als ein „beabsichtigter“ Effekt.

Der geschilderte Mechanismus bringt aber noch eine weitere Besonderheit mit sich. Sie beruht darauf, daß sich der zunächst vorhandene Porus, der den Inhalt der Membrantasche mit dem Cytoplasma verbindet, verschließt, daß der allenfalls nachweisbare Stiel obliteriert. Der Vorgang ist der gleiche, der etwa bei der Verschmelzung benachbarter Karyomeren beobachtet werden kann und der auch hier zu einer Membranauflösung an den Kontaktstellen führt. Es muß in beiden Fällen offenbleiben, ob das allein eine Folge allzu großer Annäherung der Membranabschnitte ist oder ob sich nicht auch darin die verschlechterte Kommunikation mit dem übrigen Plasma äußert, die womöglich zunächst nur zu einem Untergang der elektronenoptisch darstellbaren, dem endoplasmatischen Reticulum angehörenden äußeren Membranschicht führt. Auf jeden Fall wird dadurch bewerkstelligt, daß der „Einschluß“, mag es sich nun um Cytoplasma oder um einen Parasiten handeln, schließlich im Binnenraum des Kernes liegt, ohne daß es je zu einer unmittelbaren und abrupten Kommunikation von Kerninhalt und Cytoplasma gekommen wäre. Man kann diesen Ablauf, selbstverständlich nur formalgenetisch, dem der Pinocytose, der sich an der äußeren Zellmembran abspielt, vergleichend an die Seite stellen; man kann aber auch, ebenfalls rein deskriptiv, von einem „Schleusenmechanismus“ (BERG) sprechen, nur daß er in allen diesen Fällen in genau der entgegengesetzten Richtung verläuft, wie BERG das seinerzeit für die von ihm studierten Vorgänge angenommen hatte.

Wenn also die geschilderten Kernveränderungen innerhalb der cellulären Protozoenerkrankungen auch ungewöhnlich sind, im Rahmen der allgemeinen Karyologie handelt es sich doch nicht um isolierte und einzig dastehende Sonderfälle. Ja, selbst der Kerntod, der sich im Gefolge der intranucleären Verlagerung des Parasiten einzustellen pflegt, ist an andersartigen Kerneinschlüssen nicht ohne Beispiel, obschon er hier verständlicherweise viel seltener zustande kommt. Denn auch hier kann, wenn die Menge des ins Kerninnere gelangten Materials nur groß genug ist, das gesamte zu einer schmalen Kugelschale umgewandelte Caryoplasma schließlich zugrunde gehen, so daß der ehemalige Kerneinschluß, wofern ein zweiter Kern das Leben der Zelle erhält, noch einige Zeit frei im Zelleib aufzufinden ist (ALTMANN).

Zusammenfassung

Am Beispiel der in den Epithelien des Maulwurfsdarmes parasitierenden Coccidienart *Cyclospora caryolytica* SCHAUDINN wird gezeigt, daß die intranucleare Lage des Parasiten anfänglich nur vorgetäuscht ist. In Wirklichkeit liegt er in einer tiefen Kernbucht, die nur noch durch einen schmalen Stiel mit dem Cytoplasma verbunden ist.

Erst später, wenn die Wandung dieser Membrantasche zugrunde gegangen ist, liegt der Parasit wirklich im Binnenraum des Kernes. Die Vorgänge sind im Prinzip die gleichen, die auch an anderen auf Verlagerungen cytoplasmatischen Materials zurückgehenden Kerneinschlüssen nachzuweisen sind.

Summary

Using the example of the *Cyclospora caryolytica* Schaudinn, a coccidial parasite found in the mucosa of the mole intestine, it could be shown, that at the onset the intranuclear position of the parasite is only apparent. In reality, the parasite lies within an indentation deep into the nucleus. This invagination communicates with the cytoplasm by a narrow tract. Only later, when the membranous wall of this invagination disintegrates, does the parasite actually come to lie within the nucleus. The processes involved are principally the same as those demonstrable with other nuclear inclusions related to the deposition of cytoplasmic material.

Literatur

- ALTMANN, H.-W.: Zur Morphologie der Wechselwirkung von Kern und Cytoplasma. *Klin. Wschr.* **33**, 306—314 (1955).
- APITZ, K.: Über die Pigmentbildung in den Zellkernen melanotischer Geschwülste. I. Beitrag zur Pathologie des Zellkernes. *Virchows Arch. path. Anat.* **300**, 89—112 (1937).
- BARNES, B. G., and J. M. DAVIS: The structure of nuclear pores in mammalian tissue. *J. ultrastruct. Res.* **3**, 131—146 (1959/60).
- BERG, W. (1) Über den Übertritt von Kernstoffen in das Cytoplasma. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **28**, 565—577 (1932).
- (2) Über den mikroskopisch nachweisbaren Übertritt von Stoffen aus dem Cytoplasma in den Kern der Leberzelle. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **35**, 146—180 (1934).
- (3) Über Fett- und Pigmenteinschlüsse in den Leberzellkernen des Menschen. Ihre Entstehung und ihre Ausscheidung. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **38**, 644—659 (1935).
- CORDIER, R., et E. DE HARVEN: Les inclusions nucléaires de la glande de Loewenthal du rat mâle en microscopie électronique. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **250**, 398—400 (1960).

- DAVIS, L. R., D. C. BOUGHTON and G. W. BOWMAN: Biology and pathogenicity of *Eimeria alabamensis* Christensen, 1941, an intranuclear coccidium of cattle. *Amer. J. vet. Res.* **16**, 274—281 (1955).
- The endogenous development of *Eimeria alabamensis* Christensen, 1941, an intranuclear coccidium of cattle. *J. Protozool.* **4**, 219—225 (1957).
- FRUHLING, L., et A. PORTE: Contribution de la microscopie électronique à l'étude d'un sarcome plasmocytaire. *Ann. anat. path., N. s.* **3**, 538—557 (1958).
- GRELL, K. G.: Protozoologie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.
- HEIDENHAIN, R.: Beiträge zur Histologie und Physiologie der Dünndarmschleimhaut. *Pflügers Arch.* **43**, Suppl. (1888).
- KLEINFELD, R., and M. H. GREIDER: Electron microscopy of intranuclear inclusions found in human and rat liver parenchymal cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 435—439 (1956).
- LEDUC, E. H., and J. W. WILSON: An electron microscope study of intranuclear inclusions in mouse liver and hepatoma. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 427—430 (1959).
- RAY, H., and M. DAS-GUPTA: *Isospora knowlesi* n. sp. (Coccidia) from the intestine of a lizard, *Hemidaactylus flaviviridis* (Rüppel). *Arch. Protistenk.* **88**, 269—278 (1937).
- SCHAUDINN, F.: Studien über krankheitserregende Protozoen. I. *Cyclospora caryolytica* Schaudinn, der Erreger der perniciosen Enteritis des Maulwurfs. *Arb. Kais. Gesundh.-Amt* **18**, 378—416 (1902).
- STEINHAUS, J.: *Karyophagus salamandrae*. Eine in den Darmepithelzellkernen parasitisch lebende Coccidie. *Virchows Arch. path. Anat.* **115**, 176—185 (1889).
- TANABE, M.: On three species of coccidia of the mole, *Mogera wogura coreana* Thomas, with special reference to the life history of *Cyclospora caryolytica*. *Keiō J. Med.* **9**, 21—52 (1938).
- WATSON, M. L.: The nuclear envelope. Its structure and relation to cytoplasmic membranes. *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, 257—270 (1955).
- Further observations on the nuclear envelope of the animal cell. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 147—156 (1959).
- WESSEL, W.: (1) Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Einschlüssen in Leberzellkernen nach Colchicinbehandlung. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **47**, 299—302 (1958).
- (2) Elektronenmikroskopische Untersuchungen von intranucleären Einschlusskörpern. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 314—328 (1958).

Professor Dr. H.-W. ALTMANN, Pathologisches Institut
Staatl. Luitpoldkrankenhaus Würzburg