

Untersuchungen über die Entstehung von Riesenzellen in Mäusemakrophagenkulturen nach Infektion mit dem Mäusehepatitisvirus (MHV-3)

RAINER LAUFS*

Ludwig-Aschoff-Haus, Pathologisches Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. H. U. ZOLLINGER)

Eingegangen am 10. Dezember 1966

A. Einleitung

GLEDHILL und ANDREWES beschrieben 1951 eine virusbedingte, übertragbare Mäusehepatitis, die wegen der Ähnlichkeit ihres histologischen Bildes mit dem der akuten menschlichen Virushepatitis besonderes Interesse gefunden hat. In der Folge stellte sich heraus, daß es verschiedene Virusstämme gibt, die der Gruppe der Mäusehepatitisviren zuzurechnen sind (ANDREWES, 1964). Für unsere Versuche verwendeten wir das von DICK et al. 1956 isolierte Mäusehepatitisvirus 3 (MHV-3). Es zeigt bei der Filtration durch Gradocol-Membranen eine Größe von 80—100 m μ , es wird bei 56° C in 30 min inaktiviert und ist ätherempfindlich (DICK, 1956). FUDR und Actinomycin D hemmten die Virusvermehrung nicht; wahrscheinlich handelt es sich um ein RNS-Virus, das zur Gruppe der Myxoviren gehört (MALLUCCI, 1965). MALLUCCI (1965) beobachtete, daß der cytopathologische Effekt des MHV-3 in Mäusemakrophagenkulturen mit der Entstehung von Riesenzellen einhergeht. Es soll nun virologisch, floureszenzserologisch und autoradiographisch untersucht werden, welcher Zusammenhang zwischen der Virusvermehrung und der Entstehung mehrkerniger Riesenzellen besteht.

B. Material und Methoden

Virus. Das MHV-3 Virus, das Dr. GLEDHILL freundlicherweise als lyophilisiertes Mäuseleberhomogenisat zur Verfügung stellte, wurde 8—10 g schweren (16—22 Tage alten) Jungmäusen des Stammes CF 1 intraperitoneal injiziert. Aus den Lebern der moribunden Tiere wurde mit physiologischer NaCl-Lösung ein 10%iges Homogenisat hergestellt. Dieses wurde bei +4° C zentrifugiert (1500 rpm für 10 min) und der Überstand bei —60° C aufbewahrt.

Zellkultur. Ausgewachsene Mäuse (Stamm CF 1) beiderlei Geschlechts erhielten eine 2%ige sterile Stärkelösung (2 g Stärke in 100 ml phys. NaCl) intraperitoneal injiziert. 60 Std später wurde die Peritonealhöhle mit 2 ml Kulturmöedium ausgespült. Die Anzahl der Zellen dieser Suspension wurde in einer Zählekammer bestimmt und durch Verdünnung in Nährmedium auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Je 2 ml Zellsuspension wurden in Kulturflaschen mit Deckgläsern (Bodenfläche 45 × 10 mm) gefüllt. Kulturröhrchen zur Virustiterbestimmung erhielten lediglich je 1 ml Zellsuspension. Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37° C gehalten. Nach 12 Std wurden sie beim Wechsel der Nährösung mit Salzlösung nach HANKS ge-

* Herrn L. BIANCHI und Herrn W. OEHLMER, Pathologisches Institut Freiburg, sowie Herrn A. VOGT und Herrn K. KOZIMA, Hygiene-Institut Freiburg, danke ich für ihre freundliche Hilfe. Besonderen Dank schulde ich Herrn R. THOMSEN, Hygiene-Institut Freiburg, der mich bei der Versuchsplanung beraten hat.

waschen. Die am Glas haftenden, fast ausschließlich mononukleären Zellen erwiesen sich im Phagocytoseversuch mit Tuschepartikeln als Makrophagen. Die Makrophagen teilen sich in der Zellkultur nicht. Die Zellzahl nach 24 Std ist der Menge der Makrophagen proportional, mit der die Kultur angelegt wurde. Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden 24 Std alte Deckglaskulturen verwendet. Das Nährmedium enthielt 20% 30 min bei 56° C erhitze Kälberserum und 0,2% Natriumbicarbonat in TCM 199 sowie 10 IE Heparin/ml.

Virustitration. Herstellung einer Verdünnungsreihe in \log_{10} Stufen. Beimpfung von jeweils 4 Röhrchen der Zelldichte 2×10^6 Makrophagen/ml mit je 1 ml der betreffenden Verdünnung. Die Riesenzellbildung und die folgende Zerstörung der Zellkultur wurde 6 Tage lang mit dem Mikroskop abgelesen. Zu späterer Zeit wurde niemals ein zusätzlicher CPE beobachtet. Der Endtiter ist im allgemeinen schon am 3. Tag erreicht. Die Berechnung des Virustiters erfolgte nach REED und MUENCH, Angaben in TCID 50/ml.

Anti-MHV-3 Serum. 9 ml Virussuspension wurden mit 1 ml 1%igem Aluminiumhydroxyd 10 min lang bei Zimmertemperatur geschüttelt. Das Aluminiumhydroxyd wirkt als Adjuvans und scheint die Pathogenität des Virus abzuschwächen. Bei dem Adsorbens handelt es sich um ein Tonerdegel *cyclodextrin*, hergestellt nach einem modifizierten Verfahren nach WILLSTÄTTER und KRAUT. Ausgewachsene Mäuse (Stamm CF 1) wurden zuerst mit 10^2 TCID 50/ml an das Adsorbens gekuppeltem Virus und dann in 12-tägigem Abstand 4 mal mit 10^4 TCID 50/ml i.p. infiziert. Das Serum dieser Tiere wurde gesammelt und bei -20°C aufbewahrt. Der Neutralisationstiter wurde im Röhrchentest bestimmt, er lag bei einer Verdünnung von 1:1024. Das in Nährmedium verdünnte Antiserum wurde dabei zusammen mit gleichen Mengen Virussuspension eine Stunde *in vitro* inkubiert. Das für die Neutralisation verwendete Virus wurde parallel titriert; danach betrug die in den Virus-Serum-Gemischen vorhandene Virusinfektiosität etwa 500 TCID 50 pro Röhrchen.

Identität des Virus. Nach 10 Kulturpassagen ließ sich das MHV-3 durch das gleiche Antiserum neutralisieren. Es verlor durch Kultur- und Tierpassagen nicht seine Fähigkeit, in der Zellkultur Riesenzellen und bei Jungmäusen eine akute Virushepatitis hervorzurufen.

Virusbeimpfung. Die Virusadsorptionszeit betrug 1 Std. Danach wurde der Zellrasen gewaschen und wieder mit frischem Nährmedium oben angegebener Zusammensetzung überschichtet.

Intra- und extracelluläres Virus. 40 Deckglaskulturen (der Zelldichte 3×10^6 Makrophagen/ml) wurden gleichzeitig mit je $10^{4,5}$ TCID 50/ml Virus beimpft. Jeweils eine Kultur wurde zur ständlichen Virustitration herangezogen. Aus dem Überstand der Kultur (1 ml) wurde der extracelluläre Virustiter bestimmt. Zur Bestimmung des intracellulären Virustiters wurde der Zellrasen gewaschen und durch wiederholtes Einfrieren in 1 ml phys. NaCl bei -60°C zerstört.

Immunfluorescenz. Zum Antigennachweis mit fluoreszierenden Antikörpern wurde die von COONS (1950) angegebene direkte Methode angewendet. Die Globuline des Anti-MHV-3 Serums und des Kontrollserums, durch Fällung bei 50,40 und 40% Ammoniumsulfatsättigung gewonnen, wurden mit Fluoresceiniothiocyanat (5 mg FITC/100 mg) nach den Angaben von NAIRN (1962) gekuppelt. Zur Entfernung der unspezifischen Fluorescenz wurden die markierten Globulinfraktionen über Sephadex G-25 gelfiltriert und anschließend über DEAE-Cellulose stufenweise (0,02, 0,05 und 0,1 m Phosphatpuffer pH 8,0) chromatographiert. Die optimal markierten Portionen (gewöhnlich bis zu einer Elution von 0,05 m) wurden gepoolt.

Die Makrophagendeckglaskulturen wurden zu verschiedenen Zeiten nach Virusbeimpfung in gep. NaCl gewaschen, 10 min in Aceton fixiert und nach Lufttrocknung in gep. NaCl gewässert. Die Kulturen wurden in der feuchten Kammer mit dem fluoresceinmarkierten Antiserum überschichtet, nach 60 min gewässert und in verdünntes Glycerin für die Fluorescenzmikroskopie eingebettet. Die Kontrollen bestanden aus nicht infizierten Zellen, die mit spezifischem fluorescierendem Antiserum sowie aus infizierten Zellen, die mit fluorescierendem Normalserum behandelt wurden.

Einbau von ^3H -Cytidin und ^3H -Thymidin. Es wurden 20 Makrophagendeckglaskulturen unter gleichen Bedingungen aus einem Zellpool mit 2×10^6 Zellen/ml hergestellt und gleichzeitig mit je $10^{3,5}$ TCID 50/ml MHV-3 Virus beimpft. Nach der Beimpfung wurde in der 1., 6., 12., 18. und 24. Std der ^3H -Cytidin- und ^3H -Thymidin-Einbau untersucht. Dazu wurde der Nährösung der Kulturen 10 min lang $15 \mu\text{C}/\text{ml}$ Tritium-Cytidin bzw. -Thymidin zugesetzt

und danach sorgfältig abgewaschen. Die Deckglaskulturen wurden anschließend in Formalindampf fixiert, mit der Zellschicht nach oben auf Objekträger aufgeklebt und mit flüssiger Photoemulsion (K 2 von Ilford) überzogen. Nach vierwöchiger Expositionszeit wurden die Autoradiogramme entwickelt, fixiert und durch die Photoemulsion hindurch mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt.

C. Ergebnisse

I. Virusvermehrung in der Maus

Das Mäusehepatitisvirus-3 führt bei Jungmäusen zur akuten Hepatitis, die der akuten Virushepatitis beim Menschen histologisch sehr ähnlich ist. Bereits 38 Std nach Infektion sind herdförmige Veränderungen regellos über die Leber-

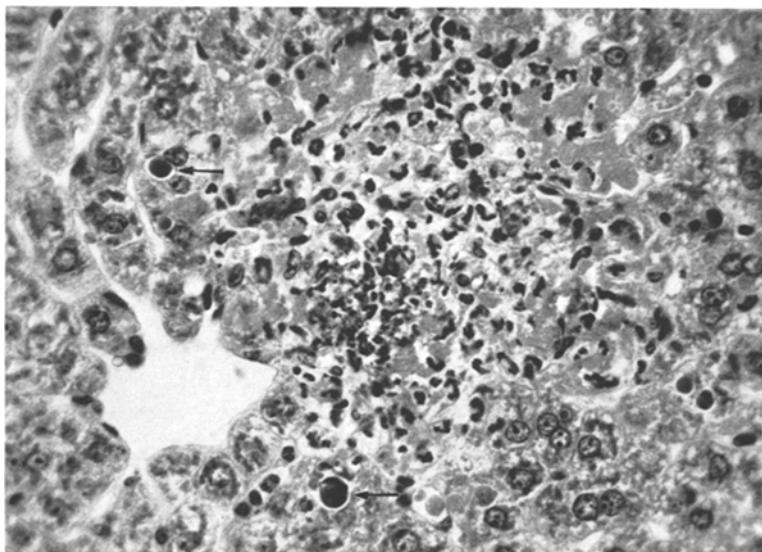


Abb. 1. Experimentelle Virushepatitis bei der Jungmaus 58 Std p.i.: Eosinophile Gruppennekrosen, Mesenchymeschwellung und polynukleäre Leukocyten. Beachte Councilmankörper (Pfeile). Vergr. 360×, Färbung HE

läppchen verteilt. Die Primärläsionen bestehen aus einer acidophilen Degeneration einzelner oder kleiner Gruppen von Leberzellen. Vereinzelt sind Councilman-Körper nachweisbar. Nach 58 Std haben sich die Einzelzellnekrosen zu Gruppennekrosen zusammengeschlossen (Abb. 1). Man erkennt eine deutliche Schwellung des Mesenchyms und einzelne polynukleäre Leukocyten. Die Leberzellkerne sind geschwollen, die Nucleolen vergrößert und verdichtet. Die Primärherde vergrößern sich und verschmelzen mit benachbarten Herden. Es bilden sich bandartige Nekroseabschnitte, die in das Bild einer akuten Leberdystrophie übergehen. Die Mäuse erliegen der Infektion am 3. Tag.

Der Infektiositätstiter des Leberhomogenisates betrug bei der Titration in Jungmäusen $10^{6,0-7,0}$ LD 50/ml, bei der Titration in der Makrophagenzellkultur $10^{6,0-7,0}$ TCID 50/ml. Da die durch Verwendung der Zellkulturen gewonnenen Titerwerte in guter Übereinstimmung mit den durch Infektion erzielten Werten stehen, wurde zur Bestimmung von Viruskonzentrationen das leichter zu handhabende Invitrosystem der Zellkulturen verwendet.

II. Virusvermehrung in der Zellkultur

1. Morphologische Veränderungen bei der Riesenzellentstehung

Die Infektion von Makrophagendeckglaskulturen mit MHV-3 (10^{-2} — 10^{-5} TCID 50 pro Zelle) führt zur Bildung von gleichmäßig über den Zellrasen verteilten Riesenzellen (Abb. 2). Die Riesenzellbildung bleibt aus, wenn man Kontrollkulturen mit virusfreiem Leberhomogenisat beimpft (Abb. 3). Die Riesenzellen bilden sich durch Verschmelzung einzelner Makrophagen. Während ihrer Entstehung können keine Mitosen beobachtet werden.

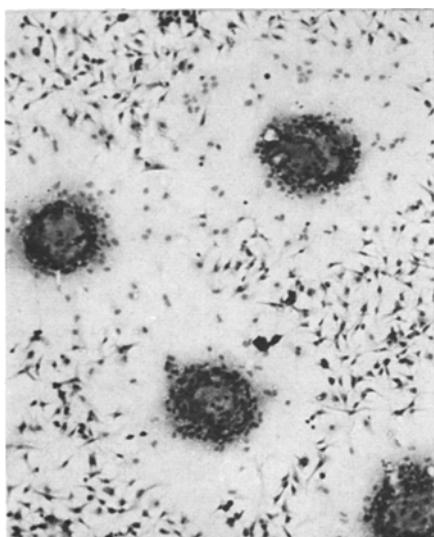


Abb. 2

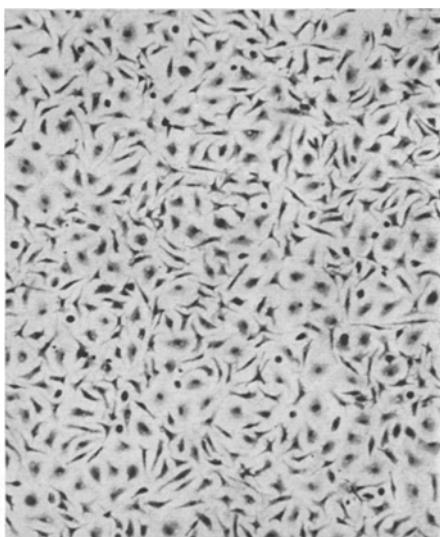


Abb. 3

Abb. 2. Mehrkernige Riesenzellen in einer Makrophagenkultur nach Beimpfung mit dem MHV-3. Vergr. 100×, Färbung HE

Abb. 3. Nicht infizierte Kontrollkultur 24 Std nach Anlegen der Deckglaskultur mit 3×10^6 Makrophagen/ml. Vergr. 1150×

Im einzelnen lässt sich die Riesenzellbildung auf folgende Art charakterisieren: Zu Beginn der Riesenzellbildung schließen sich an mehreren Stellen des Zellrasens zunächst zwei oder drei Makrophagen durch Zellfusion zusammen, denen in kurzer Zeit weitere folgen. Die Zellkerne liegen im Zentrum des Zellverbandes zusammengerückt. Sie sind deutlich geschwollen, ihre Nucleoli erscheinen verdichtet und vermehrt. Das Cytoplasma dieser jungen Riesenzellen ist weniger dicht als das der nicht infizierten Makrophagen und hat sich breit auf dem Deckglas ausgedehnt. Die Zellgrenzen sind nur noch schwach zu erkennen (Abb. 4).

Die Riesenzelle tritt durch ihre Pseudopodien mit Makrophagen der Umgebung in Verbindung (Abb. 4 und 6). Dabei verschmelzen Pseudopodien der Riesenzelle mit Pseudopodien des Makrophagen. An den Berührungsstellen der Pseudopodien scheinen sich die Zellmembranen aufzulösen, und es entstehen Cytoplasmabrücken. Unmittelbar nach Vollzug der Verbindung zur Riesenzelle ändert sich das cytologische Bild des Makrophagen. Das Cytoplasma wird ausgezogen, was eine auffällige Verbreiterung der cytoplasmatischen Zone zur Folge hat. Der

Zellkern vergrößert sich, und das Chromatin lockert sich auf. Die Nucleolen treten deutlich hervor.

Nun beginnt der Makrophage seinen Standort zu verändern und wandert in Richtung auf die Riesenzelle. Die Verschmelzung mit der Riesenzelle erfolgt über mehrere Cytoplasmabrücken, die sich zunehmend verbreitern. Zwischen diesen Cytoplasmabrücken bilden sich runde, cytoplasmafreie Areale aus, die langsam

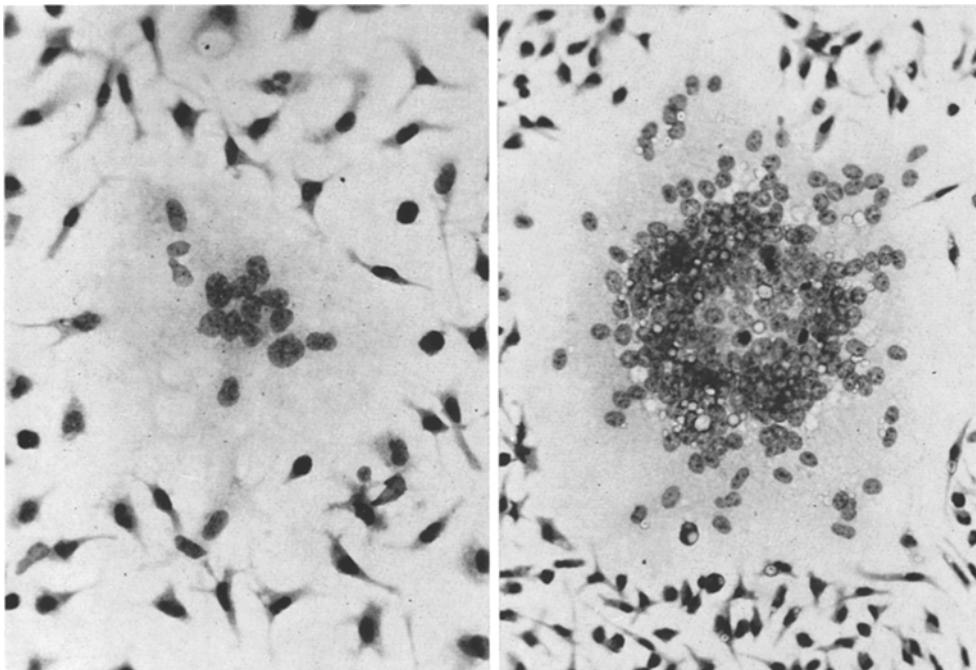


Abb. 4

Abb. 5

Abb. 4. Riesenzelle 6 Std nach Beimpfung einer Makrophagenkultur mit MHV-3. Die Zellkerne liegen im Zentrum der Zelle zusammengerückt. Sie sind deutlich geschwollen. Die Nucleoli erscheinen verdichtet. Cytoplasmabrücken verbinden die Riesenzelle mit umliegenden Makrophagen. Vergr. 460 ×

Abb. 5. Riesenzelle nach 12 Std. Beginnende eosinophile Veränderung des zentralen Cytoplasmas. Um die Riesenzelle beginnt sich ein zellarmer Hof auszubilden. Vergr. 360 ×

kleiner werden und schließlich ganz verschwinden. Währenddessen wandert der Zellkern durch das Cytoplasma in das Zentrum der Riesenzelle (Abb. 4).

Im weiteren Verlauf der Riesenzellentstehung bildet sich durch das Abwandern der Makrophagen um die Riesenzelle ein zellarmer Hof aus (Abb. 5), der sich mehr und mehr verbreitert (Abb. 6). Jetzt wandern die Makrophagen in Gruppen, meist kettenförmig angeordnet, auf die Riesenzelle zu. Das Cytoplasma dieser Zellen ist bereits miteinander verschmolzen und erweckt den Eindruck von „Straßen“, in denen sich Kerne und Cytoplasma durch den zellfreien Hof zur Riesenzelle hin bewegen (Abb. 6).

Die Lage der Zellkerne ändert sich beim Wachstum der Riesenzelle. Sie wandern dabei aus dem Zentrum (Abb. 4) in die Zellperipherie (Abb. 6). Der Wandern der Zellkerne geht eine eosinophile Veränderung des Cytoplasmas voraus, die im Zentrum der Riesenzelle beginnt (Abb. 5) und langsam zur Zellperipherie

hin zunimmt. Dabei wandern ihr die Zellkerne voraus und umschließen sie kranzförmig (Abb. 6). Um den Ring der Zellkerne entsteht an der Zellperipherie ein Cytoplasmasmaum.

Zu späten Versuchszeiten werden die Kerne der Riesenzelle pyknotisch. Zuerst sind davon die an das eosinophil veränderte Cytoplasma angrenzenden Kerne betroffen. Die absterbende Riesenzelle steht noch über Pseudopodien mit den in

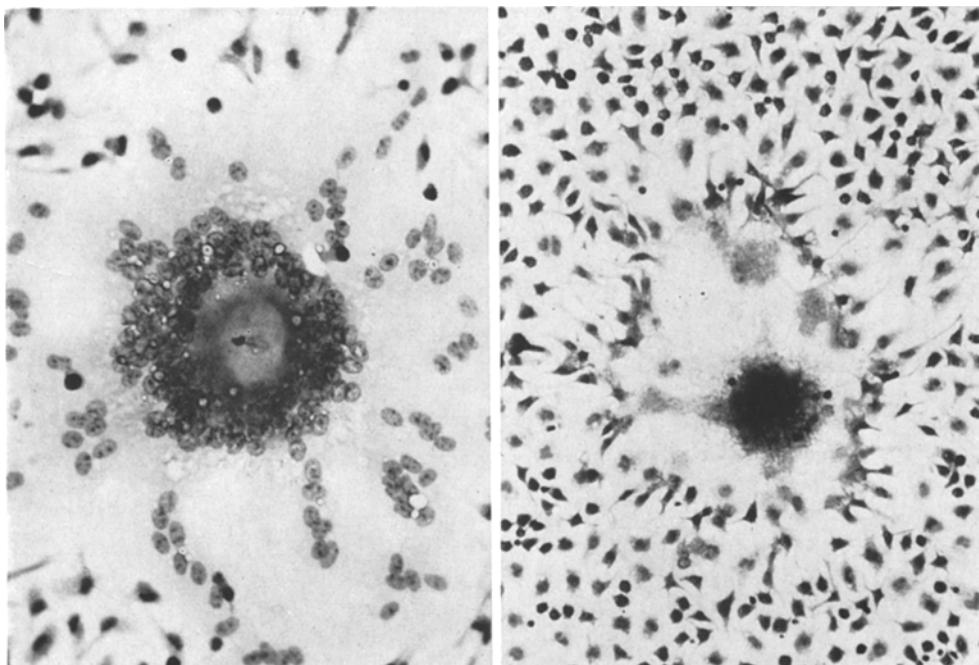


Abb. 6

Abb. 7

Abb. 6. Riesenzelle nach 24 Std. Die Zellkerne haben sich in die Zellperipherie zurückgezogen und umschließen kranzförmig die zentrale Cytoplasmadegenerationszone. In der Umgebung frisch infizierte Makrophagen auf der Wanderung zur Riesenzelle. Vergr. 360 \times

Abb. 7. Die in der Umgebung der absterbenden Riesenzelle liegenden Makrophagen stellen sich radiär zu ihr ein. Es bilden sich Tochterriesenzellen. Vergr. 250 \times

ihrer unmittelbaren Nähe liegenden Makrophagen in Verbindung (Abb. 7). Diese wandern jedoch nicht mehr auf die Riesenzelle zu, sondern stellen sich radiär zu ihr ein. Sie treten untereinander in Verbindung und bilden Tochterriesenzellen. Gelegentlich beobachtet man eine radiäre Einstellung der Makrophagen ohne Veränderung ihres Zellbildes und ohne Bildung von Tochterriesenzellen.

Kernzahl und Infektionsdauer. Die ersten Riesenzellen sind unter den oben genannten Versuchsbedingungen 6 Std nach Infektion des Zellrasens zu beobachten. Sie haben zu dieser Zeit durchschnittlich 11 Kerne ($s = \pm 7$). Die Kernzahl steigt in den folgenden Stunden rasch an, sie liegt 9 Std nach Infektion bei durchschnittlich 114 Kernen pro Riesenzelle ($s = \pm 32$) und nach 12 Std bei 169 Kernen ($s = \pm 38$) (Abb. 8). Nach der 12. Std wächst die Riesenzelle nur noch geringfügig. Das zentrale Cytoplasma beginnt sich eosinophil zu verändern, und die Kerne wandern in die Zellperipherie. Nach 24 Std bilden sie einen Ring um das

zentral veränderte Cytoplasma, und die ersten Kernpyknosen treten auf. In den folgenden Stunden löst sich die zugrundegehende Riesenzelle vom Deckglas ab.

Wanderungsdauer. Die Wanderung der Makrophagen von Beginn der Kernschwellung bis zu ihrer Eingliederung in die Riesenzelle dauert zu Beginn der Riesenzellbildung in der 6. Std nach Infektion ungefähr 20 min. Diese Zeitspanne nimmt in späteren Versuchszeiten mit steigender Entfernung des Makrophagen von der Riesenzelle zu.

Effekt der Zelldichte. Wird die Zelldichte der Makrophagenkulturen erhöht, so wächst entsprechend auch die Kernzuwachsrate der Riesenzellen, und die Überlebenszeit der Riesenzellen verkürzt sich.

Multiplizität des Impfvirus. Wenn der Titer des Impfvirus im Bereich niedriger Multiplizität erhöht wird, so ändert sich bei gleicher Zelldichte der Kultur nur die Anzahl der Riesenzellen, nicht aber die Geschwindigkeit der Zellfusion.

Phagocytose. 12 Std nach Infektion ist die Phagocytosefähigkeit aller Riesenzellen in der Kultur gegenüber nicht infizierten Makrophagen noch nicht verändert. Sie speichern im gesamten Cytoplasmabereich Tuscheartikel, Eisenaluminat, Neutralrot und in Nährlösung emulgiertes Olivenöl. Nach 24 Std bleibt die Phagocytose im zentralen eosinophil veränderten Cytoplasma der Riesenzellen aus.

2. Korrelation der cytologischen Veränderung mit der Virusvermehrung

a) *Intra- und extracelluläre Virustiter*

Um den zeitlichen Zusammenhang der Riesenzellbildung mit der Virusvermehrung zu klären, wurde die intra- und extracelluläre Viruskonzentration ständig gemessen.

Nach dem Waschen der mit Virus infizierten Zellkulturen bleibt nur intracellulär eine gewisse Restinfektiosität nachweisbar, die in den folgenden 4 Std nicht weiter ansteigt. 6 Std nach Infektion beginnt die intracellulär nachweisbare Virusinfektiosität rasch anzusteigen. Der intracelluläre Virustiter erreicht in der 10.—12. Std ein Maximum mit $10^{4,5}$ TCID 50/ml. Nach der 12. Std fällt die intracelluläre Viruskonzentration langsam ab. Der extracelluläre Virustiteranstieg verzögert sich gegenüber dem intracellulären um 1 Std. Die extracelluläre Viruskonzentration geht der intracellulären mit einem zeitlichen Abstand von 1—2 Std parallel und liegt von der 14. Std an höher als die intracelluläre (Abb. 8).

Bei diesen Befunden ist zu berücksichtigen, daß das MHV-3 Virus bei Wärme schnell inaktiviert. Eine Virussuspension des Titers $10^{5,5}$ TCID 50, die bei 36°C inkubiert wird, verliert ca. $0,5 \log$ 10 TCID 50 pro Stunde.

Es besteht eine deutliche Korrelation zwischen der intracellulären Virusneusynthese und der Kernzahl der Riesenzellen, wie aus Abb. 8 zu ersehen ist. Sobald intracellulär in der 6. Std p.i. neusynthetisiertes Virus nachweisbar wird, treten auch die ersten Riesenzellen auf. Die Anzahl ihrer Kerne nimmt mit dem intracellulären Virustiter zu. Wenn dieser in der 12. Std sein Maximum erreicht hat, wächst die Kernzahl der Riesenzellen nur noch geringfügig. Je tiefer die intracelluläre Viruskonzentration absinkt, um so ausgedehnter wird die eosinophile Veränderung des zentralen Cytoplasmas der Riesenzelle.

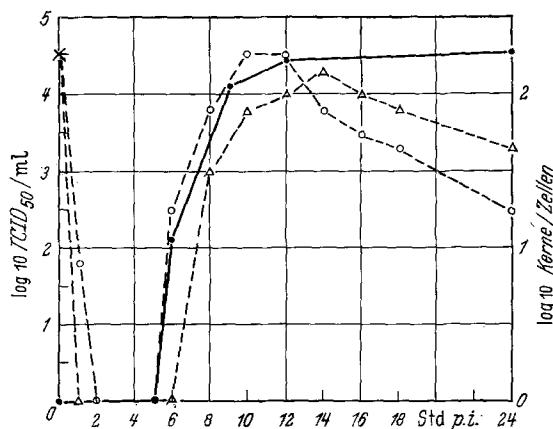


Abb. 8. Intrazelluläre Virustiter (Kreise), extrazelluläre Virustiter (Dreiecke) und durchschnittliche Kernzahl der Riesenzellen (schwarze Punkte) im Verlauf der Riesenzellbildung

Wirkung von Antiserum. Um die Adsorption des Virus an die Zellen zu verhindern, wurde die Zellkultur vor der Zugabe des Virus mit Antiserum (1:10 verdünnt in Nährmedium) überschichtet. Unter diesen Bedingungen blieb die intrazelluläre Virusvermehrung und die Bildung von Riesenzellen aus. Wenn man jedoch das Virus zuerst für 60 min an die Zellen adsorbieren läßt, ehe das Antiserum der Kultur zugefügt wird, so vollzieht sich die Riesenzellbildung wie gewohnt, ohne daß extrazellulär freies Virus nachweisbar ist. Dieser Befund spricht dafür, daß Antiserum nicht die Zellfusion infizierter Zellen verhindert, und daß die extrazelluläre Virusausbreitung für die Riesenzellbildung wahrscheinlich keine Bedeutung hat. Sekundäre Infektionszentren sind unter diesen Bedingungen in der Kultur nicht zu beobachten.

b) Immunfluorescenz

Mit Hilfe fluoresceinmarkierter Antikörper wurde untersucht, wo Virusantigen im Verlauf der Riesenzellentstehung nachweisbar ist. Alle Angaben beziehen sich dabei auf die mit dem hier verwendeten AS spez. reagierenden Antigene.

Untersucht man eine infizierte Zellkultur 6 Std p.i., so findet man spez. Fluorescenz ausschließlich im Cytoplasma der zu dieser Zeit vorhandenen Riesenzellen, nicht dagegen in den einzelnen Makrophagen (Abb. 9). Die Zellkerne der Riesenzellen sind von der Fluorescenz deutlich ausgespart. 9 Std nach Infektion der Makrophagenkultur (Abb. 10) ist die cytoplasmatische Fluorescenz deutlich erkennbar, ihre Intensität in den Riesenzellen nimmt mit der Zahl der Kerne der Riesenzellen zu. Die Riesenzellen sind untereinander und mit den umliegenden Makrophagen durch Cytoplasmabrücken verbunden, in denen deutlich Antigen nachweisbar ist. Es findet sich in der Peripherie der Pseudodien der Riesenzellen herdförmig angereichert. In den einzelnen Makrophagen beobachtet man wiederum keine Fluorescenz. Die Fluorescenz des Cytoplasmas erreicht ihren Höhepunkt nach 12 Std. Nach 24 Std finden sich erstmals einzelne fluoreszierende Makrophagen, die durch den weiten Abstand von den anderen Zellen keine Chance des Kontaktes mehr haben (Abb. 11).

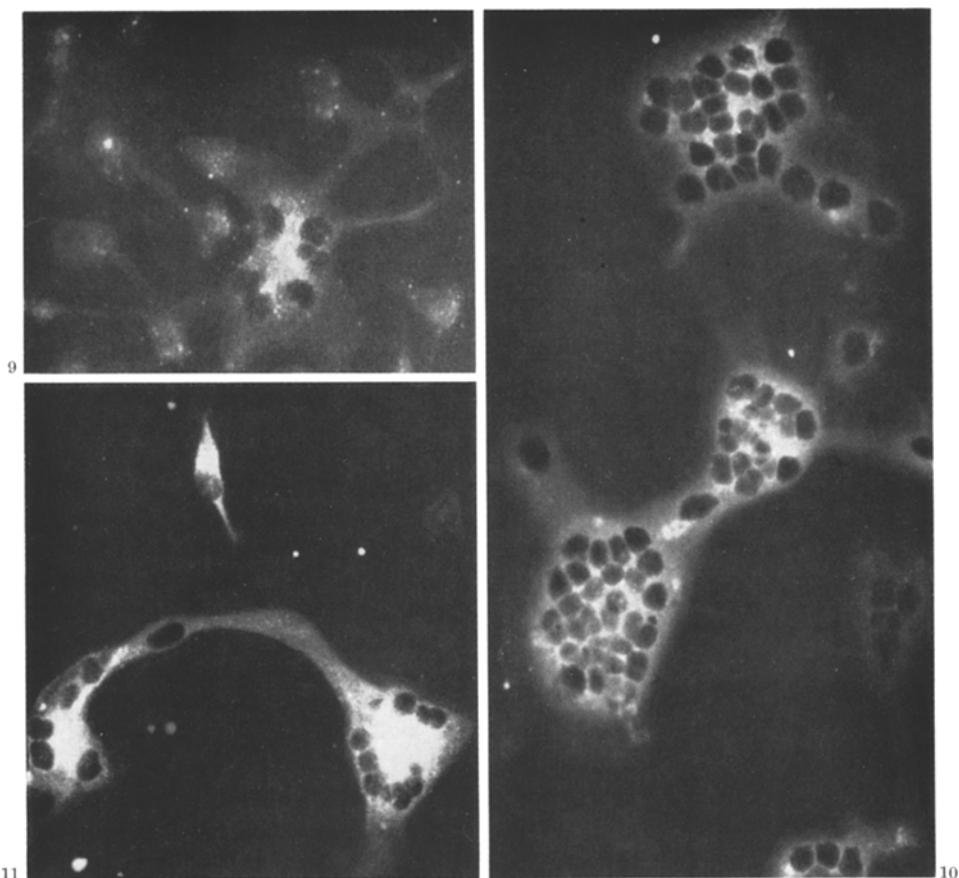


Abb. 9. 6 Std nach Infektion der Zellkultur wird die erste spezifische Immunfluoreszenz im Cytoplasma der jungen Riesenzellen erkennbar. Vergr. 300×

Abb. 10. 9 Std nach Infektion findet sich eine starke cytoplasmatische Fluoreszenz in den Riesenzellen, von der die Zellkerne deutlich ausgespart sind. Auch die in unmittelbarer Riesenzellnähe liegenden Makrophagen zeigen keine spezifische Fluoreszenz. Vergr. 300×

Abb. 11. Nach 24 Std finden sich durch Cytoplasmabrücken verbundene Riesenzellen, in denen das Virusantigen nachweisbar ist. Daneben erstmals auch ein einzelner virussynthetisierender Makrophage. Vergr. 300×

c) Autoradiographie

Bei Kontrollkulturen, die mit virusfreiem Leberhomogenisat beimpft wurden, beobachtet man nach 6 Std bei 10 min langer Markierung mit 15 µC Tritium-Cytidin/ml und sofort anschließender Fixierung eine fast ausschließliche Markierung der Zellkerne, das Cytoplasma dagegen ist weitgehend frei von Silberkörnern (Abb. 12). Das gleiche Bild zeigen auch die einzeln liegenden Makrophagen der infizierten Zellkulturen. Bei den zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Riesenzellen liegt jedoch ein anderes Markierungsmuster vor. Die Zellkerne sind deutlich geschwollen. Die Silberkörner liegen über dem Euchromatin, während die Nucleoli weitgehend frei von Silberkörnern sind. Zusätzlich ist im ausgezogenen Cytoplasma jetzt erstmals eine geringe Markierung erkennbar (Abb. 13).

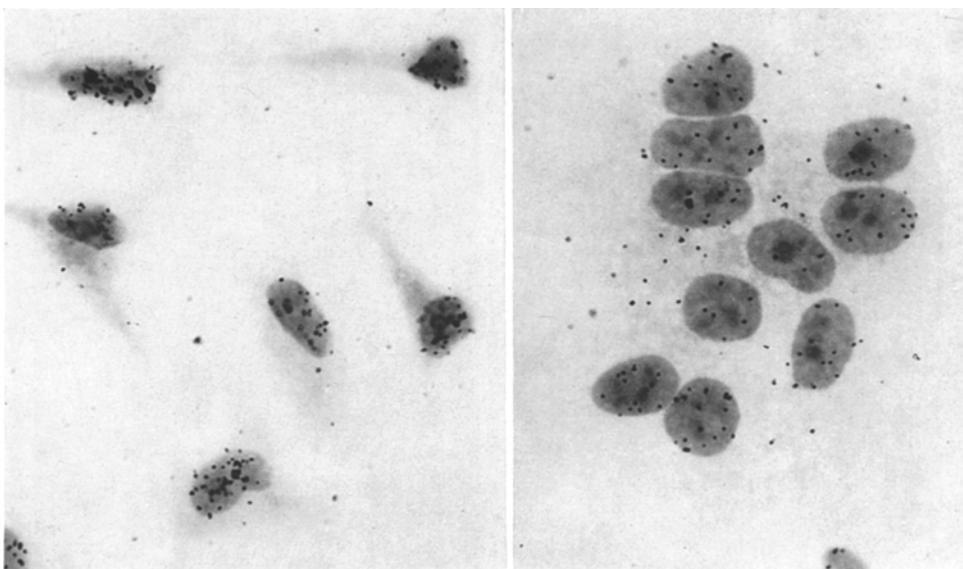


Abb. 12

Abb. 13

Abb. 12. Makrophagen einer nicht infizierten Kontrollkultur nach 10 min langer Inkubation mit ^3H -Cytidin. Sie zeigen eine fast ausschließliche Markierung der Zellkerne, das Cytoplasma ist weitgehend frei von Silberkörnern. Vergr. 1150 \times

Abb. 13. Riesenzelle 6 Std nach Infektion des Zellrasens. Bei gleicher Versuchsanordnung wie Abb. 12 tritt jetzt auch eine initiale Markierung des Cytoplasmas auf. Vergr. 900 \times

12 Std nach Beginn der Infektion hat sich das Markierungsmuster der Riesenzellen weiter geändert. Charakteristisch ist jetzt die auffallende Zunahme der Silberkörner über dem Cytoplasma. Auch die Markierung des Euchromatins der Zellkerne scheint dichter als bei dem nach 6 Std gefundenen Zelltyp (Abb. 14). Die umliegenden Makrophagen zeigen das bei nicht infizierten Kontrollkulturen gefundene Markierungsbild, vor allem keine Aktivität über dem Cytoplasma. Nach 24 Std haben sich die Zellkerne der Riesenzelle in das Cytoplasma der Zellperipherie zurückgezogen. Das zentrale Cytoplasma ist eosophil verändert und zeigt keinen Cytidineinbau mehr. In den zellperipheren Abschnitten dagegen erfolgt der Cytidineinbau unverändert. Auch über den zellperipheren Kernen liegen noch zahlreiche Silberkörner (Abb. 15).

Zu keiner Versuchszeit konnte ein Einbau von ^3H -Thymidin in die Riesenzellen oder einzelne Makrophagen beobachtet werden.

Autoradiographisch zeigt sich demnach, daß bei kurzer Inkubation mit Tritium-Cytidin im Cytoplasma der Riesenzellen ^3H -Cytidin eingebaut wird, nicht aber im Cytoplasma der einzelnen Makrophagen, auch nicht in unmittelbarer Umgebung der Riesenzellen. Unter gleichen Bedingungen konnte in Zellen nicht-infizierter Kulturen ebenfalls keine cytoplasmatische Markierung nachgewiesen werden. Die cytoplasmatische Aktivität setzt in den Riesenzellen zum gleichen Zeitpunkt ein wie das Auftreten einer virusspezifischen Fluorescenz und wie der Nachweis von intracellulär neugebildetem infektiösem Virus in der Kultur. Die

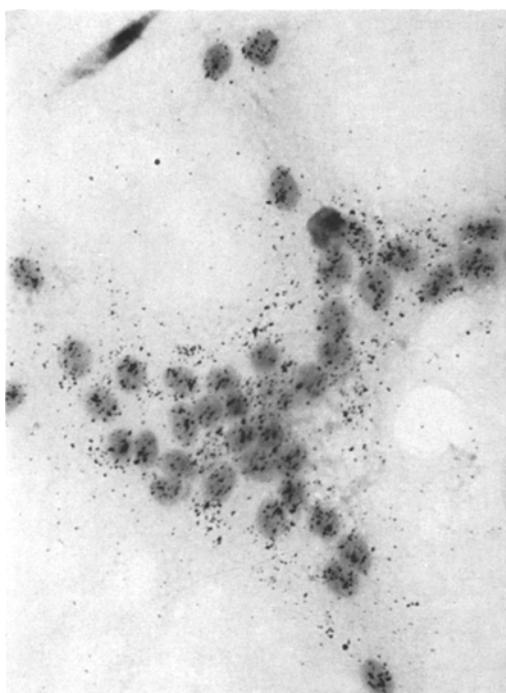


Abb. 14

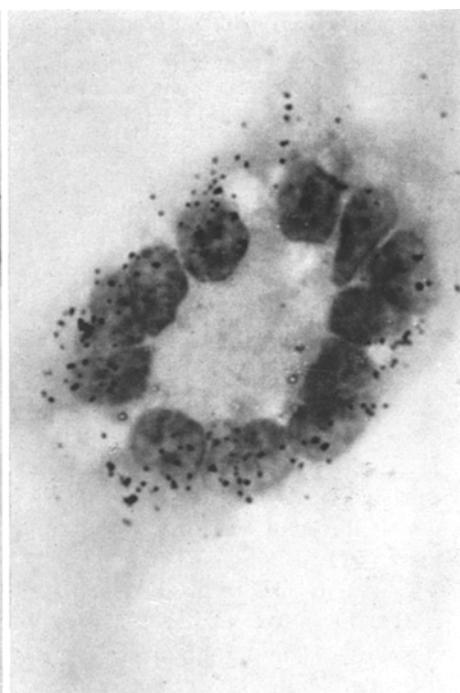


Abb. 15

Abb. 14. Das Markierungsmuster der Riesenzelle hat sich nach 12 Std weiter verändert. Charakteristisch ist jetzt die auffallende Zunahme der Silberkorndichte über dem Cytoplasma. Gleiche Versuchsanordnung wie Abb. 12 u. 13.
Vergr. 1150 \times

Abb. 15. Nach 24 Std wird im zentralen Cytoplasma der Riesenzellen kein Cytidin mehr eingebaut. In den peripheren Zellabschnitten erfolgt der Einbau unverändert. Gleiche Versuchsanordnung wie Abb. 12—14.
Vergr. 1000 \times

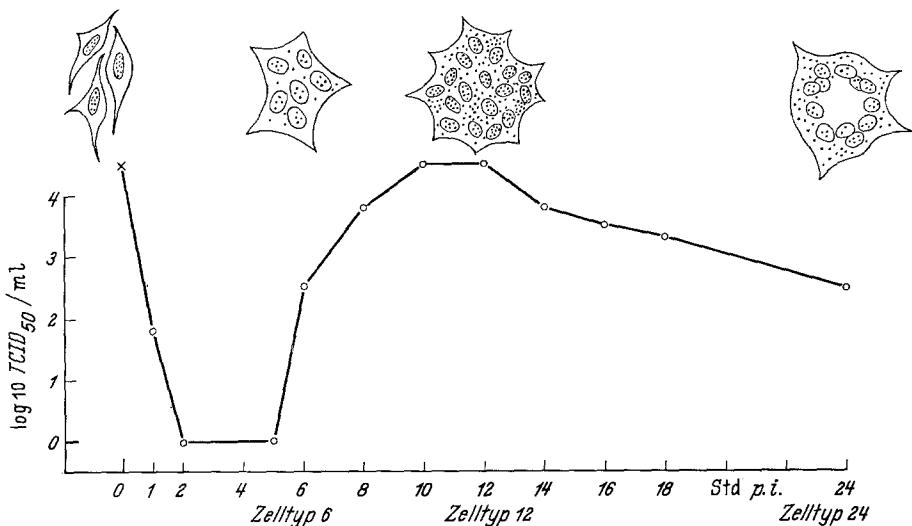


Abb. 16. ^3H -Cytidineinbau der Riesenzellen schematisch in zeitlichem Zusammenhang mit der intracellulären Viruskonzentration dargestellt

Silberkorndichte über dem Cytoplasma der Riesenzellen strebt zur gleichen Zeit wie der intracelluläre Virustiter und die virusspezifische cytoplasmatische Fluorescenz in der 12. Std p.i. einem Höhepunkt zu (Abb. 16).

D. Besprechung der Ergebnisse

Viele Virusstämme besitzen die Fähigkeit, in Zellkulturen eine Zellfusion auszulösen. Auch die durch das MHV-3 hervorgerufenen Riesenzellen (MALLUCCI, 1965) entstehen durch Verschmelzung einzelner Zellen. Die vorliegende Arbeit bestätigt diesen Befund; amitotische Kernteilungen, wie sie für das Pseudorabies Virus (REISSIG and KAPLAN, 1960) und das Herpes simplex Virus (GRAY, 1958), beides DNS-Viren, beschrieben worden sind, wurden nicht beobachtet. Außerdem war autoradiographisch während der Riesenzellbildung keine DNS-Neubildung nachweisbar.

Ausgangspunkt der Riesenzellbildung ist nach cytologischen und virologischen Ergebnissen eine primär mit MHV-3 infizierte Zelle, in der nach 6 Std Latenzzeit eine Virusneubildung nachweisbar ist. Dieses Stadium wird in den vorliegenden Untersuchungen durch die ersten Riesenzellen, die noch wenig Kerne enthalten ($11, s = \pm 7$), repräsentiert. Zu diesem Zeitpunkt sind in der Kultur die ersten neusynthetisierten Viren nachweisbar. Im Cytoplasma der Riesenzellen treten die erste spezifische Immunfluorescenz und die erste ^3H -Cytidinmarkierung auf, während Fluorescenz und Radioaktivität im Cytoplasma der einzeln liegenden Makrophagen nicht nachweisbar sind.

Die primär infizierte und virussynthetisierende Zelle tritt über ihre Pseudopodien mit den umliegenden Makrophagen in Verbindung. An den Kontaktstellen bilden sich cytoplasmatische Brücken aus, die sich verbreitern und über die es schließlich zur Zellfusion kommt. Stets wandern dabei einzeln liegende Makrophagen, in denen eine Virussynthese nicht nachweisbar ist, zur virussynthetisierenden Riesenzelle hin. Durch das Abwandern der Makrophagen bildet sich um die Riesenzelle ein zellarmer Hof aus.

Unmittelbar bei Beginn der Zellfusion setzt eine auffallende Volumenvergrößerung des Zellkernes des zur Riesenzelle wandernden Makrophagen ein. Seine Nucleolen treten deutlich hervor. Der ^3H -Cytidineinbau in den Zellkern ist zu dieser Zeit jedoch nicht vermehrt. Ob diese initiale Kernvergrößerung der Ausdruck der durch die Zellwanderung und Zellfusion erhöhten Stoffwechselleistung des Makrophagen (OKADA, 1962 b) oder aber erster Ausdruck der Virusinfektion ist, bleibt offen.

Im Anschluß an die Bildung der ersten Riesenzellen erfolgt zwischen der 6. und 12. Std p.i. eine stetige Zunahme der Größe der Riesenzellen durch weitere Anlagerung von Makrophagen, die mit dem Virustiteranstieg, der Zunahme der spezifischen cytoplasmatischen Fluorescenz und dem cytoplasmatischen ^3H -Cytidineinbau gut korreliert ist. Auch in dieser Phase, deren Ende durch maximalen Virustiter und hohe Kernzahl der Riesenzellen ($169, s = \pm 38$) gekennzeichnet ist, wurden in den einzeln liegenden Makrophagen bis auf einige Ausnahmen keine Veränderungen gefunden, die auf eine Virussynthese hinweisen, z.B. spezifische Fluorescenz oder ^3H -Cytidineinbau im Cytoplasma. Aus diesen Befunden kann gefolgert werden, daß alles bis 12 Std nach Infektion neugebildete Virus in den Riesenzellen synthetisiert wurde.

Der Einbau des RNS-Vorläufers ^3H -Cytidin in das Cytoplasma der Riesenzellen wird aus folgenden Gründen als Ausdruck einer virusspezifischen RNS-Synthese angesehen: Die cytoplasmatische Aktivität wird nur in infizierten Kulturen beobachtet. Sie findet sich nur im Cytoplasma jener Zellen, in denen auch eine spezifische Fluorescenz auftritt. Ihre Stärke nimmt mit dem Virus-titer und der Fluorescenz zu. Bei der gewählten kurzen Markierungszeit mit ^3H -Cytidin ist es unwahrscheinlich, daß es sich bei der im Cytoplasma nachweisbaren Aktivität um im Kern synthetisierte, markierte und dann ausgeschleuste RNS handelt.

Eine unspezifische Fähigkeit der Riesenzellen zur Aufnahme von fluoresceinmarkierten Seren wurde durch Kontrollen ausgeschlossen. Ein Ausschluß der Möglichkeit, daß Virusbestandteile außer im Cytoplasma auch in den Zellkernen gebildet werden, ist nicht möglich, da nicht bekannt ist, ob das verwendete Antiserum Antikörper gegen alle in der Zelle gebildeten Virusantigene enthält.

Wie eingangs erwähnt, gehört das MHV-3 nach den Befunden von MALLUCCI (1965) wahrscheinlich zur Gruppe der RNS-Viren. Ein weiteres Beweisstück dafür, daß das MHV-3 ein RNS-Virus ist, ergibt sich daraus, daß in den Makrophagenkulturen, die reine postmitotische Zellpopulationen sind, auch während der Synthese des Virus weder in den einzelnen Makrophagen noch in den Riesenzellen eine DNS-Neubildung nachweisbar ist.

Als Ausbreitungsweg des MHV-3 in der Zellkultur kommen die beobachteten Cytoplasmabrücken oder aber der Weg durch das Nährmedium in Betracht. Unsere Befunde sprechen dafür, daß die Infektion der in der Umgebung einer sich entwickelnden Riesenzelle liegenden Makrophagen über die Cytoplasmabrücken erfolgt. Dafür sprechen folgende Ergebnisse: 1. Die Zellfusion läuft auch bei Anwesenheit spezifischer neutralisierender Antikörper im Nährmedium unverändert ab. 2. Das Virus ist fluoreszenzoptisch in den Cytoplasmabrücken nachweisbar. 3. Extracelluläres Virus tritt erst 1 Std nach Beginn der Riesenzellbildung auf. Riesenzellen, die durch Infektion über das Nährmedium hinweg entstanden sein könnten, werden erst 12 Std nach Infektion der Zellkultur beobachtet. Diese Riesenzellen können an ihrer Größe erkannt werden, denn die primär entstandenen Riesenzellen vergrößern sich bemerkenswert synchron und zeigen zu diesem Zeitpunkt eine hohe, wenig streuende mittlere Kernzahl.

Bis zum Auftreten der ersten Riesenzellen und dem Nachweis des ersten neu gebildeten Virus vergeht eine Latenzzeit von 6 Std. Die riesenzellbildende Eigenschaft des MHV-3 tritt in dieser Latenzzeit nicht in Erscheinung, in einem Zeitraum, in dem in den primär infizierten Zellen sicherlich virusspezifische Synthesevorgänge ablaufen. Andererseits nimmt die Zahl der Zellfusionen nach der Latenzzeit in Korrelation mit der Anzahl der infektiösen Viruspartikel zu. Es scheint deshalb möglich, daß die riesenzellbildende Eigenschaft des MHV-3 von reifem Virus oder Bestandteilen von reifem Virus abhängig ist.

Nimmt man an, daß die Infektion der von der Riesenzelle aufgenommenen Makrophagen erst bei Kontakt mit der Riesenzelle erfolgt, so ergibt ein Vergleich der Latenzzeit nach primärer Infektion mit der Geschwindigkeit der Virussynthese in den frisch fusionierten Zellen, daß hier die lange Latenzzeit bis zum Auftreten der reifen Viruspartikel nicht notwendig ist. Man kann daraus den Schluß ziehen, daß möglicherweise initiale Mechanismen der Virussynthese, die während

der Latenzzeit in den primär infizierten Zellen in Gang gesetzt werden, auch den bei Fusion neu infizierten Zellen zur Verfügung stehen und somit eine raschere Virussynthese ermöglichen.

Zusammenfassung

Die durch das MHV-3 in der Makrophagenkultur hervorgerufenen mehrkerigen Riesenzellen (bis über 200 Kerne) entstehen durch Zellfusion. Dies ergibt sich aus morphologischen und autoradiographischen Studien (keine DNS-Neubildung). Nach 6 Std treten die ersten noch wenig Kerne enthaltenden Riesenzellen auf. Zum gleichen Zeitpunkt ist die erste intracelluläre, neugebildete Infektiosität in der Kultur, sind ferner die erste spezifische Immunfluorescenz und die erste spezifische autoradiographische RNA-Aktivität (nach Einbau von ^3H -Cytidin) im Cytoplasma der Riesenzellen nachweisbar. Anschließend besteht bis zur 12. Std zwischen der Kernzahl der Riesenzellen und dem Anstieg des intracellulären Virustiters eine gute Korrelation. Auch Fluorescenz und Cytidineinbau nehmen zu. Spezifische Fluorescenz und Radioaktivität werden bis zu dieser Zeit stets nur im Cytoplasma der Riesenzellen, nicht im Cytoplasma der einzeln liegenden Makrophagen nachgewiesen. In den bei der Riesenzellbildung durch Zellfusion infizierten Makrophagen scheint die Virussynthese mit einer kürzeren Latenzzeit als in der primär infizierten Zelle anzulaufen.

The Formation of Giant Cells in Mouse Macrophage Cultures Infected with Mouse Hepatitis Virus (MHV-3)

Summary

MHV-3 stimulates the formation of multinucleated giant cells (with more than 200 nuclei) in culture of macrophages. As is shown by morphological and autoradiographic studies (i.e., there is no synthesis of DNA) giant cells originate by cell fusion. Six hours after infection the first young giant cells containing up to 11 nuclei ($s = \pm 7$) may be detected. At the same time the first, newly-formed virus is found intracellularly. Simultaneously, the first specific immunofluorescent foci and the first autoradiographic RNA activities (uptake of ^3H -Cytidine) appear in the cytoplasm of the giant cells. From the 6th to the 12th hour after infection there is a good correlation between the number of nuclei in the giant cells and the increase in the titer of infectious virus. Up to the 12th hour the fixation of specific fluorescent antibody and the incorporation of ^3H -Cytidine also increase, but can be detected only within the cytoplasm of the giant cells, not within the cytoplasm of single cells. Viral synthesis begins with a much shorter latent period in cells that have been infected by fusion with a giant cell than in cells that have been primarily infected.

Literatur

- ANDREWES, C. H.: Viruses of vertebrates. London: Baillière 1964.
- COONS, A. H., and M. H. KAPLAN: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. exp. Med.* **91**, 1–13 (1950).
- DICK, G. W. A., J. S. F. NIVEN, and A. W. GLEDHILL: A virus related to that causing hepatitis in mice (MHV). *Brit. J. exp. Path.* **37**, 90–98 (1956).
- GLEDHILL, A. W., and C. H. ANDREWES: A hepatitis virus of mice. *Brit. J. exp. Path.* **32**, 559–568 (1951).

- GRAY, A., T. TOKUMARU, and T. F. McNAIR SCOTT: Different cytopathogenic effects observed in HeLa cells infected with herpes simplex virus. Arch. ges. Virusforsch. **8**, 59—76 (1958).
- MALLUCCI, L.: Observation on the growth of mouse hepatitis virus (MHV-3) in mouse macrophages. Virology **25**, 30—37 (1965).
- NAIRN, R. C.: Fluorescent protein tracing. Edinburgh and London: E. & S. Livingstone LTD. 1962.
- OKADA, Y.: Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. Exp. Cell Res. **26**, 119—128 (1962 b).
- REED, L. J., and M. MUENCH: A simple method of estimating fifty per cent end point. Amer. J. Hyg. **27**, 493—497 (1938).
- REISSIG, M., and A. S. KAPLAN: The induction of amitotic nuclear division by pseudorabies virus multiplying in single rabbit kidney cells. Virology **11**, 1—11 (1960).
- WILLSTÄTTER, R., u. H. KRAUT: Zur Kenntnis der Tonerdehydrate. Ber. dtsch. chem. Ges. **57**, 58 (1924).

Dr. R. LAUFS
Hygiene-Institut der Universität
78 Freiburg i. Br., Hermann Herder-Str. 11