

Quantitative histochemische Untersuchungen an der Chorion-Allantoismembran nach Virusinfektion und unspezifischen Reizen

VON W. SANDRITTER und M. BERG

Aus dem Senckenbergischen Pathologischen Institut der Universität Frankfurt/Main
(Direktor: Prof. Dr. A. LAUCHE)

(Z. Naturforschg. 14 b, 379—382 [1959]; eingegangen am 29. Januar 1959)

UV-mikrospektrophotometrische Messungen der Nucleinsäuren- und Eiweißkörper-Konzentration sowie der Kern- und Nucleolengröße nach Virusinfektion und unspezifischer Reizung der Chorion-Allantoismembran zeigen, daß es in beiden Fällen zu einer gleich starken Stimulierung des nucleinsäuren- und eiweißkörperbildenden Systems der Zelle kommt. Bei der Infektion mit Vaccinevirus auf das Ektoderm setzt die Reaktion der Membranzellen in der Eklipse ein, nach Infektion mit Newcastle-Disease-Virus fällt der Titeranstieg mit der Zellreaktion zeitlich zusammen.

Die Viren stellen obligate Zellparasiten dar, die auf Kosten der Nucleinsäuren und Eiweißkörper in der Zelle identisch reproduziert werden. Diese Bildung des Virusmaterials geht mit einer Anregung der Nucleinsäuren- und Eiweißkörper-Synthese im Zellkern und Cytoplasma der Wirtszelle einher¹⁻⁷.

Quantitative cytochemische Methoden bieten die Möglichkeit, diese Zusammenhänge an der Einzelzelle bzw. dem Zellverband zu untersuchen. In den vorliegenden Untersuchungen versuchten wir zu klären, inwieweit Viren mit verschiedener Vermehrungsintensität und Gewebsaffinität im Vergleich zu unspezifischen Reizen den Nucleinsäuren- und Eiweißstoffwechsel der Wirtszelle beeinflussen.

Als Kriterien der Leistungen des Zellstoffwechsels wurden hierbei die Größe der Zellkerne und Nucleolen sowie die uv-mikrospektrographisch gemessene Nucleinsäure- und Eiweißkörper-Konzentration im Cytoplasma der Wirtszellen herangezogen.

Material und Methode

Als Untersuchungsobjekt diente die Chorion-Allantoismembran (CAM) 10 Tage alter Bruteier, bei denen die Infektion entweder mit Vaccine-Virus auf das Ektoderm oder mit Newcastle-Virus (NDV) in die Allantoishöhle

erfolgte, so daß in diesem Falle die Entodermzellen infiziert wurden. Die Infektionsdosen bestanden aus hohen Viruskonzentrationen (Vaccine-Virus $0,2 \text{ cm}^3 10^6$, NDV $0,2 \text{ cm}^3 10^8$), um eine etwa gleichzeitige Infektion einer möglichst großen Zahl von Membranzellen zu gewährleisten*. Der Hämagglutinintiter in der Allantoisflüssigkeit (NDV) und der Infektionstiter (Vaccine-Virus) wurden bis zu 24 Std. verfolgt. In einer Kontrollserie wurden $0,3 \text{ cm}^3$ unverdünntes normales Rinderserum auf das Ektoderm der Membranen aufgebracht. Sie wurden nach Gefriertrocknung in Paraffin eingebettet und gallcyanin-chromalaun gefärbt, bzw. für die UV-Messungen präpariert. Die Größen der Kerne und Nucleolen wurden mit einem Mikroplanimeter^{8,9} bestimmt. Für die Zellkerne beträgt der mittlere Fehler bei zwei verschiedenen Untersuchern im Durchschnitt für Kerne 4%, bei kleineren Objekten wie Nucleolen 12 Prozent.

Die Nucleinsäure-Eiweißkörper-Konzentration im Cytoplasma der Zellen wurde mit einem automatisch registrierenden UV-Mikrospektrographen^{10,11} bei den Wellenlängen $\lambda 265 \text{ m}\mu$, $\lambda 280 \text{ m}\mu$ und $\lambda 313 \text{ m}\mu$ gemessen. Es handelt sich um ein nach der elektrischen Kompensationsmethode arbeitendes Gerät mit zwei Strahlen und einem Photomultiplier. Die Messungen sind mit einem Fehler von $\pm 1\%$ reproduzierbar. Die Messungen erfolgten mit einem Quarzobjektiv der nA 0,85 und einem Quarzkondensator, der auf eine Arbeitsapertur von 0,3 abgeblendet wurde. Die automatisch registrierenden Messungen wurden mit einer Blende von $0,5 \mu$ Größe im Cytoplasmabereich von etwa 50 Zellen in jedem Präparat im Abstand von 2μ vorgenommen. Es

¹ A. GRATIA, J. BRACHET u. R. JEENER, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 139, 72 [1945].

² T. CASPERSSON u. H. HYDEN, Nord. med. Tidskr. 28, 2631 [1945].

³ H. HYDEN, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. XII, 104 [1947].

⁴ G. A. KAUSCHE u. H. HOFFMANN-BERLING, Z. Naturforschg. 7b, 518 [1952].

⁵ H. ZECH, Planta 40, 461 [1952].

⁶ T. CASPERSSON u. K. G. THORSSON, Klin. Wschr. 1953, 205.

⁷ W. SANDRITTER u. R. SIEGERT, Verh. dtsh. Ges. Pathol., 38, Tag. 1954, S. 102.

* Herrn Professor R. SIEGERT, Direktor des Hygiene-Institutes der Universität Marburg/Lahn, danken wir für die Bestimmung des Infektions- und Hämagglutinintiters.

⁸ T. CASPERSSON, T. FREDRIKSON u. K. G. THORSSON, Hereditas 9, 258 [1950].

⁹ W. SANDRITTER u. F. HÜBOTTER, Frankfurter Z. Pathol. 65, 219 [1954].

¹⁰ T. CASPERSSON, Cell Growth and Cell Function. W. W. Norton. New York 1950.

¹¹ W. SANDRITTER, Hdb. d. Histochemie, Bd. 1, S. 220, Fischer, Stuttgart 1958.

wurden jeweils 2 Membranen untersucht und die mittlere Extinktion bei den entsprechenden Wellenlängen ermittelt. Von der gemessenen Extinktion bei λ 265 $m\mu$ und λ 280 $m\mu$ wurde die Extinktion bei λ 313 $m\mu$ abgezogen. Die unspezifische Extinktion war in allen Fällen sehr gering (unter E 0,02).

Befunde

1. Morphologie

Während das Ektoderm der unbeimpften CAM nur aus einer dünnen Lage (1–2 Zellen) von Zellen mit runden bis ovalen Kernen und kleinen Nukleolen besteht, sieht man 6 Stdn. nach Infektion mit Vaccine-Virus im Beimpfungsbereich eine Zellvermehrung, die mit einer Vergrößerung der Zellkerne und Nukleolen einhergeht. Häufig werden Mitosen beobachtet sowie ein Ödem und Blutungen im Mesenchym. Die Zellproliferation nimmt kontinuierlich bis zur 16. Stde. zu. Im Epithel und Mesenchym entstehen später (bis zu 24 Stdn.) Nekrosen und Blutungen. Etwa von der 10. Stunde an beobachtet man eine Lageverschiebung der Nukleolen. Sie rücken näher an die Peripherie des Zellkernes, und manchmal sieht man eine Verschmelzung des perinukleären Chromatins mit der Kernmembran. Vereinzelt beobachtet man auch eine Unterbrechung der Kernmembran an dieser Stelle (Extrusion von Nukleolarmaterial?), wobei typische „Kernausbuchtungen“ entstehen, wie sie von ALTMANN^{12, 13} beschrieben wurden.

Bei der Infektion mit NDV findet man am Ektoderm prinzipiell gleiche Veränderungen, die allerdings schon nach 4 Stdn. einsetzen und nach 12 Stdn. ihr Maximum erreichen. Im Cytoplasma der proliferierten Entodermzellen beobachtet man zahlreiche optisch leere Vakuolen. Nach Überschreiten der maximalen Zellproliferation treten mit zunehmend längerer Zeit ausgedehnte Nekrosen und oberflächliche Ulcerationen in den Membranen auf. Dies ist der Zeitpunkt, an dem die Nukleolen kleiner werden und die Zellkerne als Ausdruck degenerativer Veränderungen weiter an Größe zunehmen. Im Mesoderm treten ebenfalls Nekrosen und Blutungen auf.

Beim Einbringen von Rinderserum auf das Ektoderm der CAM beobachtet man nach 4–6 Stdn. eine bis zur 18. Stde. zunehmende stärkere Proliferation der Membranzellen an der Impfstelle. Im Zentrum

der gewucherten Membranzellen sieht man ein Ulcus, das bis zum Mesenchym reichen kann und dessen Rand von vergrößerten Epithelzellen gebildet wird. Nach der 18. Stde. nimmt die Proliferation an Stärke und Ausdehnung ab. Im Prinzip bestehen keine morphologischen Unterschiede zwischen den durch Virus und unspezifische Reize hervorgerufenen Membranreaktionen.

2. Ergebnisse der Messungen

Wie Tab. 1 und Abb. 1 zeigen, kommt es nach Infektion mit Vaccine-Virus auf das Ektoderm der CAM zu einer mit der 8. Stde. einsetzenden Ver-

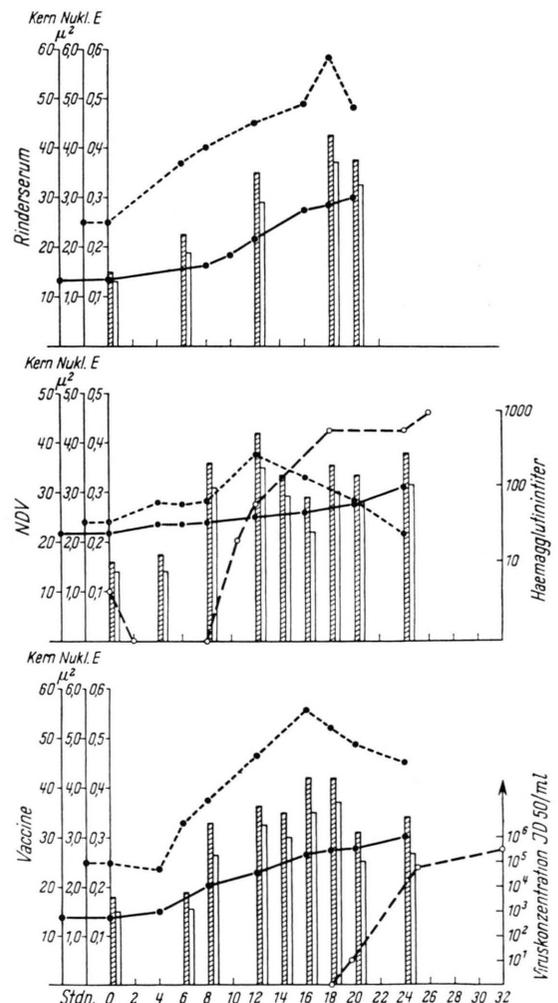


Abb. 1. Schematische Darstellung der Kern- und Nukleolengröße (μ^2), der mittleren Extinktion bei λ 265 $m\mu$ und λ 280 $m\mu$ sowie des Virus- und Hämagglutinin-titers verschiedene Zeit nach Beimpfung der CAM. Oberste Abbildung zeigt die Veränderungen nach Beimpfung mit Rinderserum.

¹³ H. W. ALTMANN, Z. Krebsforsch. **58**, 632 [1952].

¹² H. W. ALTMANN, Z. Naturforschg. **4b**, 138 [1949].

	[Stdn.]	<i>n</i>	Kerne [μ^2]	<i>n</i>	Nukleolen [μ^2]	<i>E</i> 265 $m\mu$	<i>E</i> 280 $m\mu$
Vaccine- Virus	0	150	13,5 ± 1,4	150	2,5 ± 0,6	0,18 ± 0,029	0,15 ± 0,027
	8	150	20,1 ± 1,6	150	3,8 ± 1,0	0,33 ± 0,05	0,27 ± 0,048
	12	150	22,7 ± 1,7	150	4,7 ± 0,9	0,37 ± 0,058	0,33 ± 0,061
	16	150	26,7 ± 1,3	150	5,7 ± 0,85	0,42 ± 0,067	0,35 ± 0,054
	18	150	27,0 ± 1,0	150	5,2 ± 1,2	0,42 ± 0,065	0,37 ± 0,072
	24	150	29,7 ± 0,7	150	4,6 ± 1,1	0,34 ± 0,056	0,27 ± 0,059
Newcastle- Virus	0	150	22,0 ± 1,9	150	2,5 ± 0,3	0,16 ± 0,023	0,14 ± 0,04
	4	150	23,1 ± 1,5	150	2,5 ± 0,5	0,18 ± 0,039	0,14 ± 0,035
	8	150	23,5 ± 2,1	150	2,8 ± 0,9	0,36 ± 0,065	0,31 ± 0,07
	12	150	24,8 ± 1,4	150	3,8 ± 0,7	0,42 ± 0,051	0,35 ± 0,065
	16	150	26,0 ± 1,9	150	3,3 ± 0,4	0,29 ± 0,055	0,24 ± 0,069
	20	150	27,4 ± 2,2	150	2,9 ± 0,9	0,33 ± 0,062	0,28 ± 0,072
24	150	30,8 ± 4,3	150	2,2 ± 0,8	0,38 ± 0,062	0,32 ± 0,051	
Rinder- serum	0	100	13,5 ± 1,5	100	2,5 ± 0,7	0,15 ± 0,024	0,13 ± 0,031
	6	100	16,9 ± 1,3	100	3,6 ± 1,0	0,23 ± 0,048	0,19 ± 0,044
	12	100	21,8 ± 2,1	100	4,6 ± 1,1	0,35 ± 0,053	0,29 ± 0,061
	16	100	27,4 ± 1,5	100	4,9 ± 0,6	—	—
	18	100	28,7 ± 2,3	100	5,9 ± 0,8	0,43 ± 0,062	0,37 ± 0,07
	20	100	30,1 ± 1,9	100	4,8 ± 1,3	0,37 ± 0,08	0,32 ± 0,09

Tab. 1. Kernfläche, Nukleolenfläche und mittlere Extinktion des Cytoplasmas bei λ 265 $m\mu$ und λ 280 $m\mu$ nach Virusinfektion und unspezifischer Reizung.

größerung der Zellkerne und einem Anstieg der mittleren Extinktion bei λ 265 $m\mu$ und λ 280 $m\mu$. Während die Kernvergrößerung bis zur 24. Stde. laufend fortschreitet, erreicht die Konzentration an Nucleinsäure und Eiweißkörpern in der 16. bis 18. Stde. ihr Maximum, um dann wieder abzusinken. Die Reaktion der Nukleolen setzt mit einer Vergrößerung schon in der 6. Stde. ein, erreicht mit 16 Stdn. das Maximum und fällt dann bis zur 24. Stde. wieder ab. Wie der Vergleich mit dem Virustiter zeigt, liegen die Zunahme der Nucleinsäuren- und Eiweißkörper-Konzentration sowie der Größenanstieg der Kerne und Nukleolen zeitlich vor dem Anstieg des Virustiters. Mit Freiwerden der Viren setzen in zunehmendem Maße degenerative Veränderungen ein, die sich in einer Abnahme der mittleren Extinktion und der Nukleolengröße ausprägen.

Bei der Infektion der Entodermzellen mit NDV wird prinzipiell der gleiche phasenhafte Ablauf beobachtet. Allerdings fallen hier der Anstieg des Virustiters, der Nucleinsäure- und Eiweißkörper-Konzentration sowie der Nukleolengröße zeitlich zusammen. Die Kerne vergrößern sich kontinuierlich bis zum Ende des Versuches.

Die unspezifische Reizung des Ektoderms der CAM prägt sich in einer bis zur 18. Stde. ansteigenden Zunahme der Nucleinsäure- und Eiweißkörper-Konzentration aus. Gleichlaufend damit vergrößern

sich die Nukleolen. Der Anstieg der Kerngröße erfolgt wie in den vorhergehenden Beobachtungen kontinuierlich. Mit Verringerung der Proliferation in der 20. Stde. sinkt sowohl die Nucleinsäure- und Eiweißkörper-Konzentration als auch die Größe der Nukleolen.

Besprechung der Ergebnisse

Unsere Untersuchungen zeigen den bekannten Zusammenhang zwischen Virussynthese und der Anregung der Nucleinsäure-Eiweißkörper-Synthese im Cytoplasma der Wirtszellen. Wie CASPERSSON⁶ und andere gezeigt haben, setzt die Nucleinsäuren- und Eiweißkörper-Vermehrung schon in der Eklipse ein, zu einer Zeit also, in der noch kein infektiöses Virusmaterial gewonnen werden kann. Diese Zusammenhänge konnten neuerdings auch bei der Reproduktion von Phagen erneut bestätigt werden^{14, 15}. In unseren Versuchen ist die Reaktion der Membranzellen im Ektoderm (Vaccine-Virus) in der Eklipse deutlicher ausgeprägt als im Entoderm nach Infektion mit NDV. Allerdings ist im letzten Falle auch der Beobachtungszeitraum kürzer. Unterschiede in der Zellart sowie im Ort der Virussynthese intrazellulär (Vaccine-Virus an der Kernmembran¹⁶,

¹⁴ A. D. HERSHEY, Brookhaven Sympos. Biol. 8, 6 [1956].

¹⁵ R. M. HERRIOT, Baltimore Johns Hopkin Press, S. 399, 1957.

NDV im Ektoplasma¹⁷⁾ könnten ebenfalls dafür verantwortlich sein.

Eine Gegenüberstellung der Reaktionen des Ektoderms und Entoderms läßt erkennen, daß die Entodermzellen zwar die gleiche Nucleinsäuren- und Eiweißkörper-Konzentration im Cytoplasma aufweisen, die Nukleolen aber wesentlich kleiner bleiben als im Ektoderm.

Die Reaktionen der Wirtszellen auf die Virusinfektion sind, wie unsere Versuche gezeigt haben, keineswegs spezifisch. So weit mit den verwendeten Methoden zu erfassen, kommt es auch bei unspezifischer Reizung zu einem Anstieg der Nucleinsäuren-Eiweißkörper-Konzentration im Cytoplasma und Vergrößerung der Kerne und Nukleolen. Die Stärke der Reaktion ist in virusinfizierten und unspezifisch gereizten Zellen gleich^{6, 18-20}. BRACHET und Mitarb.²¹ fanden nach „Infektion“ der CAM mit Mikrosomen ebenfalls einen Anstieg der Basophilie und haben auf Grund der Versuche von LECCLERC²² vermutet, daß es sich um einen „spezifischen“ Effekt handelt (Mikrosomen als selbstreproduzierende Elemente).

Unsere Versuche mit einem nucleinsäurefreien Eiweißkörper sprechen gegen einen solchen Zusammenhang. Die Nucleinsäuren- und Eiweißkörper-

Synthese im Cytoplasma (wahrscheinlich Mikrosomenvermehrung) kann auf ganz verschiedene Weise angeregt werden und bedarf keineswegs einer spezifischen „Matrize“ wie bei Virusinfektion oder Mikrosomen-„Infektion“.

Diese unspezifische Reaktion der „Wirtszellen“ läßt sich nach unseren Versuchen sehr deutlich mit einer Vergrößerung der Nukleolen und gleichzeitigen Zunahme der Nucleinsäuren- und Eiweißkörper-Konzentration im Cytoplasma kennzeichnen. Damit wird der Zusammenhang zwischen Nukleolus und Nucleinsäuren-Eiweißkörper-Synthese^{9, 10} erneut bestätigt. Die Kerngröße ist kein verlässlicher Gradmesser der Zellaktivität. In vielen Versuchen wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Kerngröße und Synthese von Eiweißkörpern im Cytoplasma gefunden (z. B. bei der Stimulierung innersekretorischer Organe²³⁻²⁵). Die Kernvergrößerung wurde als Kernödem²⁶ gedeutet bzw. durch die Zunahme an Nichthistonprotein bedingt angesehen^{24, 25}. Aus den vorliegenden Versuchen wird deutlich, daß die Kernvergrößerung auch als Degenerationsvorgang eintreten kann, wobei die Nukleolen an Größe abnehmen und die Nucleinsäuren-Eiweißkörper-Konzentration im Cytoplasma absinkt.

¹⁶ W. H. GAYLORD u. J. L. MELNICK, *J. exp. Medicine* **98**, 157 [1953].

¹⁷ F. B. BANG, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **92**, 291 [1953].

¹⁸ W. P. COVELL, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **32**, 51 [1934].

¹⁹ N. E. GOLDSWORTHY u. W. MOPPETT, *J. Pathol. Bacteriol.* **41**, 529 [1935].

²⁰ R. WYLER u. H. A. E. v. TONGEREN, *J. Pathol. Bacteriol.* **74**, 275 [1957].

²¹ I. R. SHAVER u. J. BRACHET, *Experientia* [Basel] **5**, 235 [1949].

²² J. LECCLERC, *Experientia* [Basel] **10**, 251 [1954].

²³ J. KRACHT u. J. G. RAUSCH-STROHMANN, *Naturwissenschaften* **43**, 180 [1956].

²⁴ M. ALFERT, H. A. BERN u. R. H. KAHN, *Acta Anat.* [Basel] **23**, 185 [1955].

²⁵ W. SANDRITTER, U. BECKER, D. MÜLLER u. E. F. PFEIFFER, *Endokrinologie* **37**, 193 [1959].

²⁶ A. BENNINGHOFF, *Anat. Nachr.* **1**, 50 [1950].