

Miscellanea : Beiträge zur Pinocytose von "Trypanosoma" (trypanozoon) "brucei", Plimmer & Bradford, 1899

Autor(en): **Geigy, R. / Steiger, R. / Hecker, H.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Acta Tropica**

Band (Jahr): **27 (1970)**

Heft 3

PDF erstellt am: **17.05.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-311649>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Beiträge zur Pinocytose
von *Trypanosoma* (Trypanozoon) *brucei*,
Plimmer & Bradford, 1899¹

R. GEIGY, R. STEIGER und H. HECKER
Schweizerisches Tropeninstitut Basel

Abstract.

With peroxidase as a protein-tracer pinocytosis could be demonstrated in bloodforms of *Trypanosoma brucei*. The surface coat, the flagellar pocket, pinocytotic vesicles and lysosome-like organelles in the cytoplasm were quite distinctively marked.

Einleitung

Am Schweizerischen Tropeninstitut werden im Rahmen einer elektronenmikroskopischen Arbeit über den Zyklus von *Trypanosoma brucei* (1) in der Tsetsefliege auch Untersuchungen zur Abklärung von Pinocytosevorgängen bei den Blutformen des Nagana-Erregers vorgenommen.

Endocytose bei Trypanosomatiden wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (2–16). Trypanosomen von Kaltblütern zeigen Cytostom/Cytopharynx-Komplexe (2–5), wobei dort die Eiweißaufnahme mittels Ferritin als elektronendichtem Protein-Tracer dargestellt worden ist (2, 4 und 5). In Trypanosomen von Warmblütern (*T. rhodesiense*) konnte mit derselben Methode bewiesen werden, daß bei fehlendem Cytostom/Cytopharynx-System die Membran der Geißeltasche (= «Reservoir») der einzige Ort mit Pinocytose-Aktivität ist (6 und 7). Eine Ausnahme bildet *T. cruzi*, für das erst vor kurzem ein Cytopharynx beschrieben worden ist (3) und bei dem auch Pinocytose an der Oberfläche möglich sein soll (16).

Die Pinocytose steht in engem Zusammenhang mit dem lysosomalen Abbau des aufgenommenen Materials. Saure Phosphatase als Leitenzym für Lysosomen wurde bei Trypanosomen nachgewiesen. Katabole Organellen sind in der Region um die Geißeltasche häufiger als im übrigen Cytoplasma (16–19).

Peroxidase und Catalase werden oft zur Untersuchung von Transportvorgängen an Metazoen verwendet (20–22). In dieser Arbeit wird versucht, mit Peroxidase als Protein-Tracer erstmals Pinocytosevorgänge bei Protozoen darzustellen.

Material und Methoden

Gewinnung des Citratblutes durch Herzpunktion aus 3 mit *T. brucei* (Stamm: STIB 30, 9. Passage, 14. Tag nach Infektion) infizierten Mäusen. Trennung der Protozoen von den Erythrozyten durch Zentrifugation (10 min bei 2,000 rpm, MSE Super Multex).

Nach der von MOPPERT (23) und uns modifizierten Methode nach GRAHAM & KARNOVSKY (20) werden die Trypanosomen weiterbehandelt:

a) Inkubation während 5, 10 und 15 min bei 20° C in Peroxidase-Lösung (Meerrettich-Peroxidase, Boehringer Typ II). Drei verschiedene Konzentrationen wurden verwendet: 0,9 mg Peroxidase (P), 2,3 mg P oder 3,75 mg P (gelöst in NaCl phys.) jeweils pro 1 ml Blutplasma mit Trypanosomen und NaCl phys.

¹ Die Arbeit wurde vom Schweiz. Nationalfonds unterstützt. Fräulein S. Bleiker danken wir für ihre technische Mitarbeit.

b) Zentrifugat mit 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatbuffer (= CP, pH 7,2) bei 4° C während 30 min vorfixieren.

c) Waschen in 0,2 M CP + 5% Saccharose bei 4° C während 2 Std.

d) Inkubation nach Originalrezept (20) (3'3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid = DABTH, Sigma und H₂O₂, Perhydrol, Merck).

e) Auswaschen: viermal abwechselnd in 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) und NaCl phys.

f) Zentrifugat in einem 45° C warmen Tropfen 2% Agar (DIFCO-Bacto Agar), in NaCl phys. gelöst, aufnehmen und als Gewebestückchen weiterbehandeln.

g) Nachfixation mit 2% OsO₄ in 0,2 M CP bei 4° C während 1 Std.

h) Entwässern: Aceton und Propylenoxyd; Durchdringen: Propylenoxyd/Epon; Einbetten: Epon; Schneiden: Glasmesser, Reichert OmU2; leichte Nachkontrastierung mit 5% Uranylacetat; Aufnahmen: Philips EM 300.

Kontrollen wurden gleich behandelt, jedoch ohne Inkubation in Peroxidase.

Resultate

Das durch die Peroxidase und H₂O₂ oxidierte DABTH ist als elektronendichter, flockiger Niederschlag oder dunkle Markierung erkennbar (Fig. 1, 3 und 4).

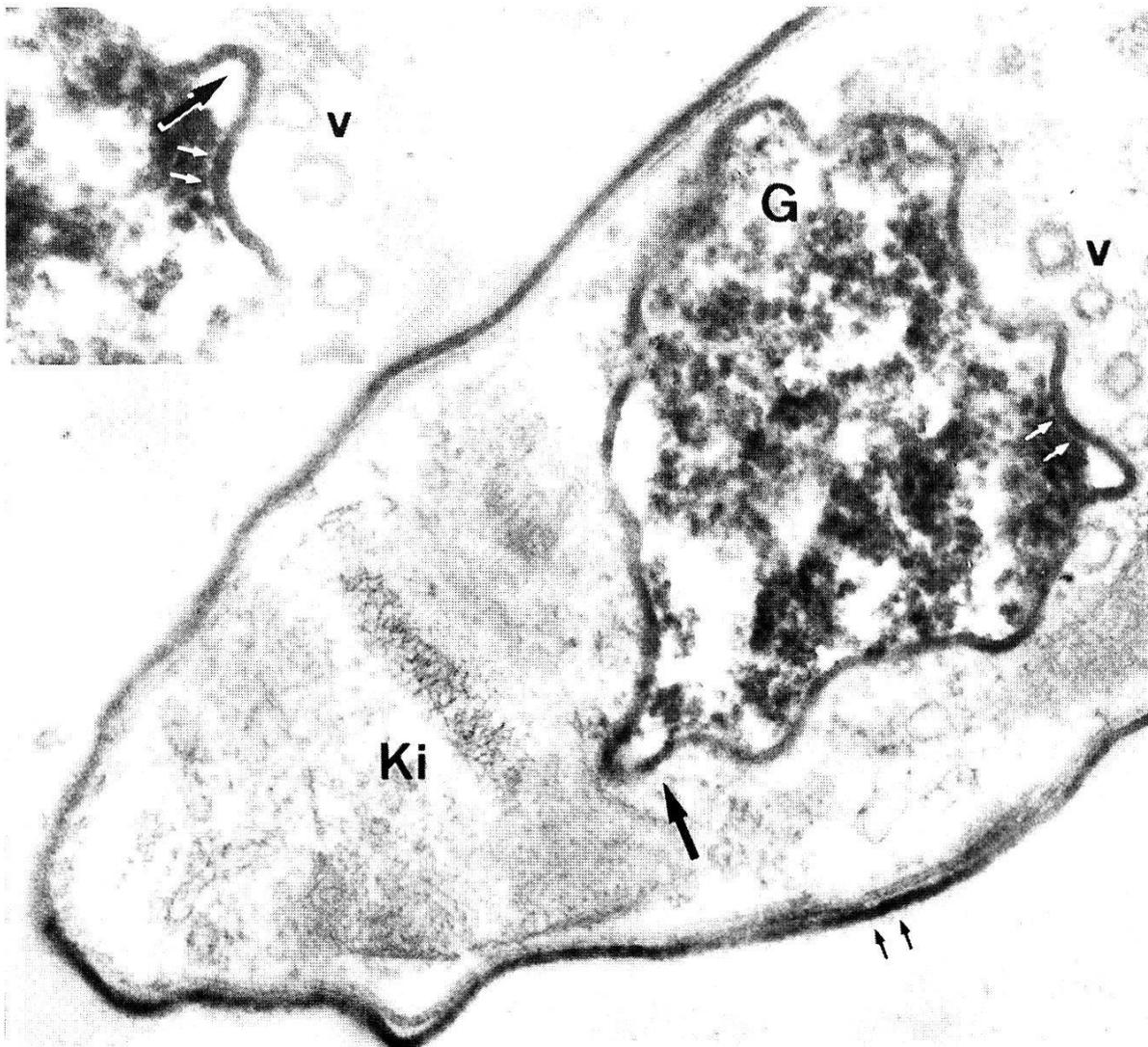


Fig. 1. Peroxidase-Inkubation (3,75 mg/ml): Geißeltasche oder «Reservoir» (G) enthält flockigen Niederschlag (s. auch inset). «Coat» der Zellmembran markiert (≡). Geißeltasche mit fingerförmigen Fortsätzen ins Cytoplasma (→, s. auch inset). Kinetoplast (Ki) hinter dem Reservoir. Unmarkierte Vesikel (v, s. auch inset). × 50 000, inset: × 62 000.

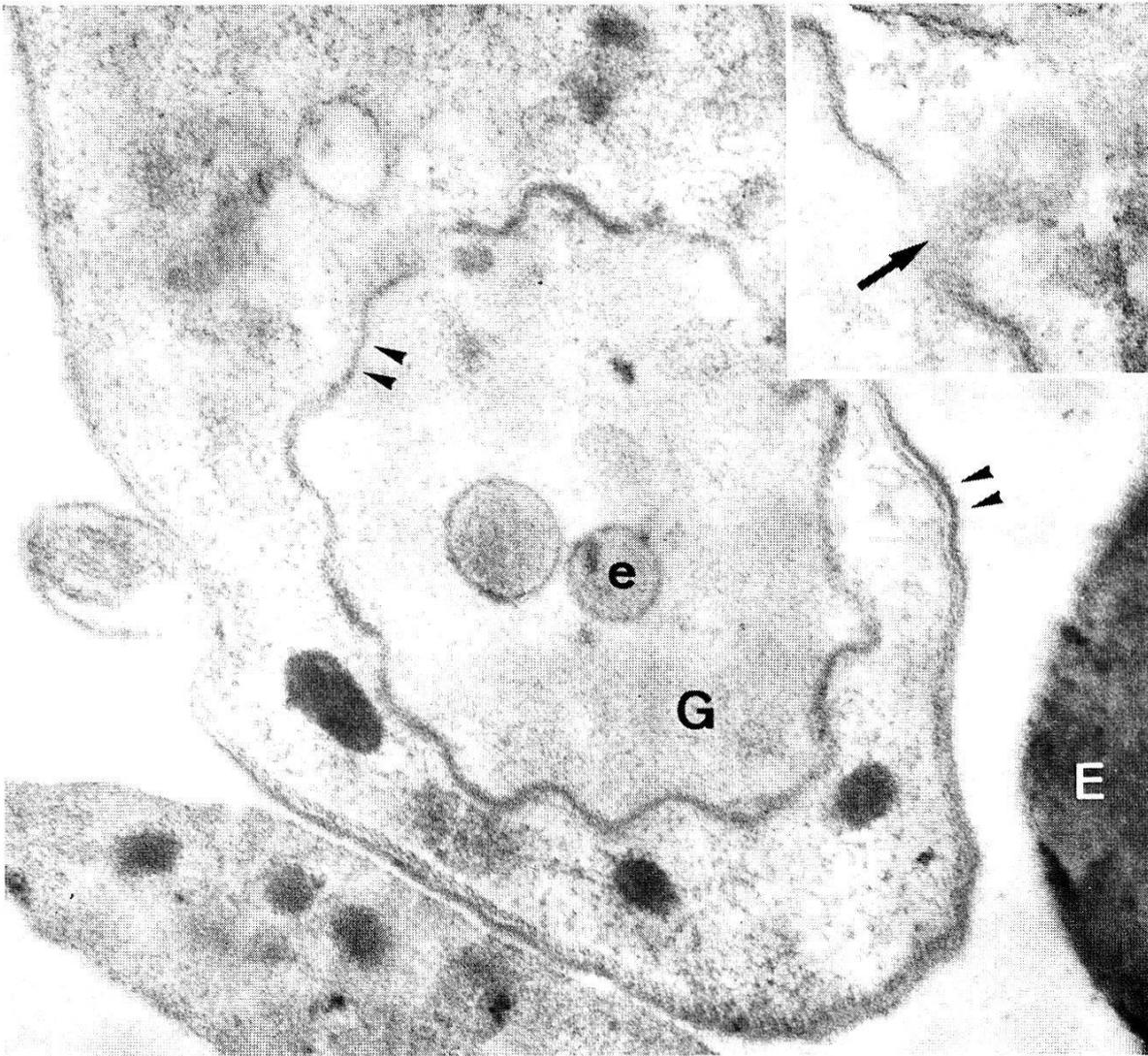


Fig. 2. Kontrolle: Reservoir (G) ohne Reaktionsprodukt. Membranen, «coat» (◄) und exocytiertes Material (e) unmarkiert. Pinocytosebläschen in Bildung (→, inset: Ausschnitt aus einer andern Aufnahme). E = Erythrocyt. $\times 39\ 000$, inset: $\times 77\ 000$.

Dieser Niederschlag ist in der Geißeltasche (= «Reservoir») deutlich angehäuft (Fig. 1, 3 und 4). Auch der «coat» (15), welcher der gesamten Oberflächenmembran, inklusive der Geißel, aufliegt, zeigt eine deutlich dunkle Markierung (Fig. 1, 3 und 4). Die Membran der Geißeltasche besitzt cytoplasmawärts fingerförmige Fortsätze (Fig. 1 und 3). Von diesen aus scheinen sich Pinocytose-Bläschen abzuschneiden (Fig. 2 und 3). Im Kontrollversuch sind diese nicht markiert (Fig. 2). Nach Applikation von Peroxidase sind die Vesikel peripher dunkel kontrastiert (Fig. 3, inset und 4). Neben markierten sind aber immer auch unmarkierte Bläschen zu sehen (Fig. 1 und 4). Letztere sind bedeutend häufiger. Die meisten dunkel markierten Vesikel sind vor der Geißeltasche, einige jedoch auch hinter und seitlich neben dem «Reservoir» lokalisiert. Im vorderen Teil des Trypanosomen-Cytoplasmas (zwischen «Reservoir» und Kern) sind lysosomen-ähnliche Organellen dunkel angefärbt (Fig. 4).

Die Inkubation im 0,9 mg Peroxidase enthaltenden Milieu erbringt keine eindeutige Reaktion weder auf dem «coat» noch im «Reservoir» noch im Cytoplasma. Jedoch beobachtete man bei erhöhter Peroxidase-Konzentration (3,75 mg) deutliche Niederschläge. Die verschiedenen Inkubationszeiten bei gleicher Kon-

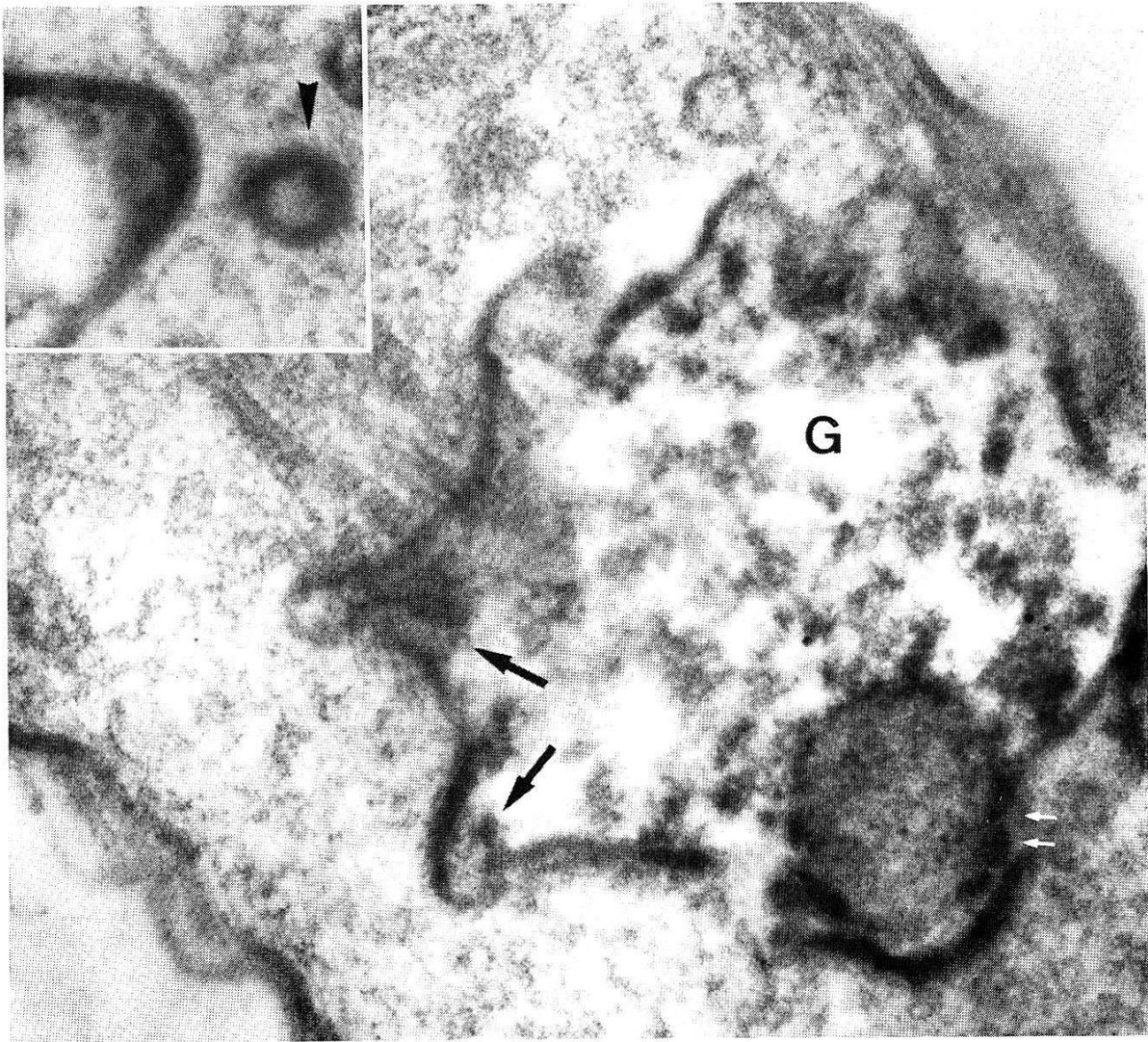


Fig. 3. Peroxidase-Inkubation (2,3 mg/ml): Geißeltasche (G) mit Niederschlag. Geißelmembran und «coat» markiert (⇔). Aus den Fortsätzen des Reservoirs schnüren sich Bläschen ab (→). Inset: Detail aus einer andern Aufnahme: ein abgeschnürtes Bläschen ist peripher markiert (→). $\times 61\ 000$, inset: $\times 100\ 000$.

zentration zeigten praktisch keine Unterschiede in Lage und Dichte des Reaktionsproduktes. Nicht alle Trypanosomen eines Einbettblocks waren gleich stark markiert.

Neben Pinocytosevorgängen wird oft exocytiertes markiertes Material in der Geißeltasche beobachtet (Fig. 4, inset).

In den Kontrollen ohne Anwendung von Peroxidase finden wir keine positiven Reaktionen, weder im «Reservoir», noch im Cytoplast, noch auf dem «coat» (Fig. 2). Aber auch dort erscheint die Geißeltasche nie leer. Sie ist angefüllt von fein flockigem, zum Teil exocytiertem Material mittlerer Elektronendichte (Fig. 2).

Diskussion

Unsere Resultate passen gut zu den Ergebnissen früherer Untersuchungen, wonach die Geißeltasche bei Warmblüter-Trypanosomen den einzigen Ort mit Pinocytose-Aktivität darstellt. Die Anwendung von Peroxidase als Protein-Tracer zeigt die starke Aufnahme von Eiweißen in die Geißeltasche. Dies bestätigt die

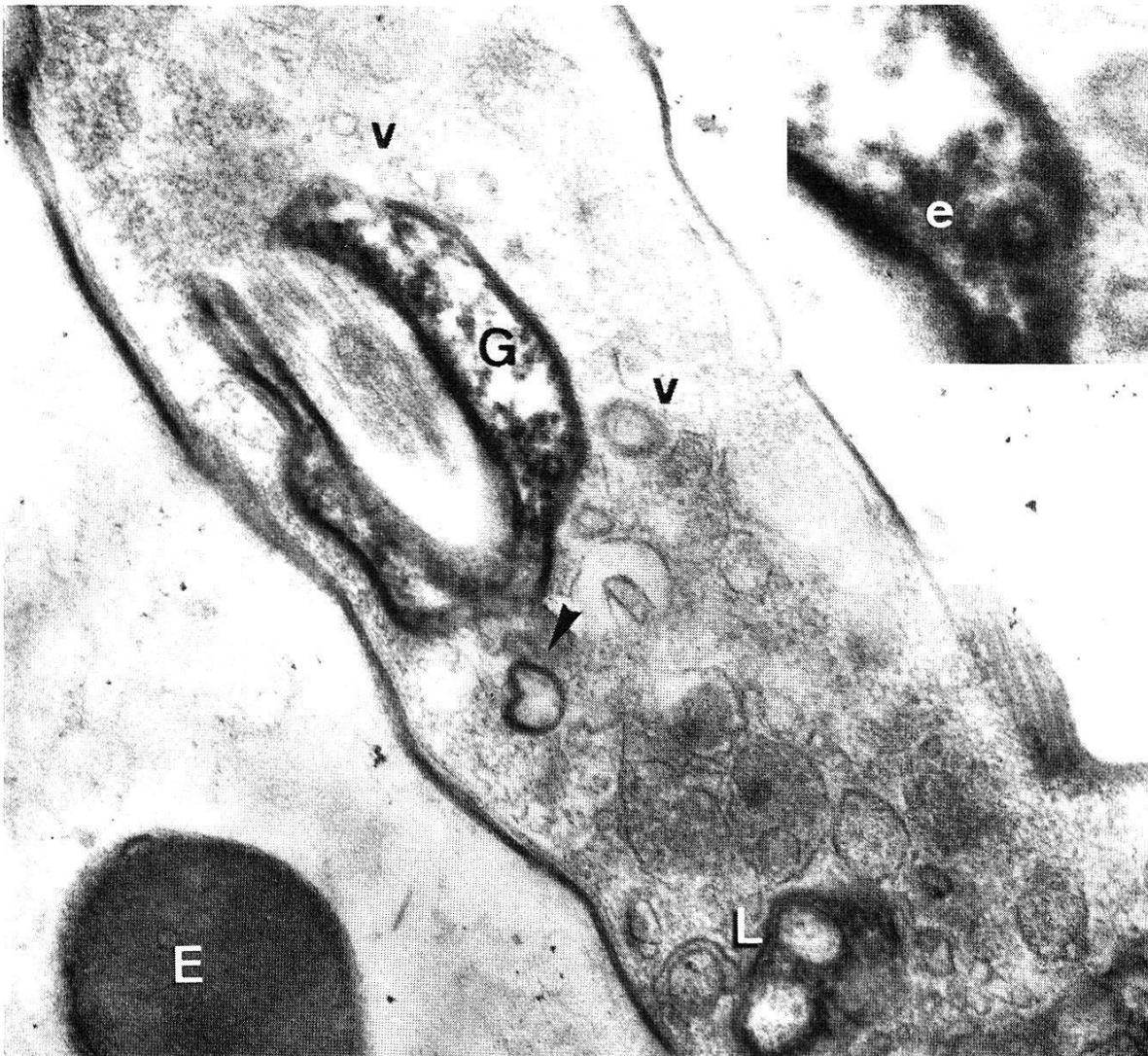


Fig. 4. Peroxidase-Inkubation (3,75 mg/ml): Reservoir (G) und Pinocytosebläschen (→) dunkel markiert. Unmarkierte Vesikel (v), eventuell Lysosomen. Weiter vorne im Cytoplasma lysosomenähnliche Strukturen (L) dunkel kontrastiert. e = exocytotiertes, markiertes Bläschen im Reservoir (inset). E = Erythrocyt. $\times 39\ 000$, inset: $\times 77\ 000$.

Vermutung über die Funktion des sogenannten «Reservoirs», Substanzen aufzunehmen und zu speichern. Die deutliche Markierung des «surface coat» unterstützt die Vermutung von VICKERMAN (15), daß diese aufgelagerte Schicht Proteine binde. Dies scheint, im Zusammenhang mit dem Fehlen von subpelliculären Tubuli im Gebiet der Geißeltasche, die Pinocytose und Exocytose zu begünstigen. Fingerförmige Fortsätze der Reservoir-Membran als Ort der Vesikel-Bildung wurden früher beschrieben (7). Die dort abgeschnürten Bläschen sind peripher markiert (Fig. 3, inset). Eventuell besitzt die Membran spezifische Bindungsorte, vielleicht sind aber auch osmotische Gründe für diesen Effekt verantwortlich. Wenig ist bekannt über die Wanderung der Vesikel im Cytoplasma. Ein lysosomaler Abbauweg ist erwiesen, und verschiedene Organellen scheinen an der «Verdauung» des pinocytierten Materials beteiligt zu sein (2–7, 9, 10, 13, 16–19 und 24), unter anderem auch die früher beschriebenen «membrane-bound dense bodies» (6 und 7) zwischen Reservoir und Kern, die unsern markierten lysosomenähnlichen Organellen (Fig. 4) entsprechen dürften.

Um den Transportweg aufgenommener Substanzen genauer abzuklären, wer-

den in der Folge Experimente mit längeren Inkubationszeiten und andern Konzentrationen durchgeführt; zumal wir auch vermuten, daß die Peroxidase einen hemmenden Einfluß auf die normale Pinocytose-Aktivität ausübe. Der Ferritin-Einbau in Trypanosomen erfolgt nämlich bedeutend schneller (6 und 7) als die Aufnahme von Peroxidase. Dies würde auch verständlich machen, warum unsere Inkubationszeiten zwischen 5 und 10 Minuten kaum Differenzen zeigten und warum in den Kontrollversuchen häufiger Pinocytose beobachtet wurde.

Literatur

1. STEIGER, R. (in Vorbereitung).
2. BROOKER, B. & PRESTON, T. M. (1967). The cytostome in trypanosomes and allied flagellates. – J. Protozool. *14*, Suppl. 41–42.
3. MILDNER, R. & DEAN, M. P. (1969). The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *T. conorhini*. – J. Protozool. *16*, 730–737.
4. PRESTON, T. M. (1969). The form and function of the cytostome-cytopharynx of the culture forms of the elasmobranch haemoflagellate *Trypanosoma raiiae* Laveran & Mesnil. – J. Protozool. *16*, 320–333.
5. STEINERT, M. & NOVIKOFF, A. B. (1960). The existence of a cytostome and the occurrence of pinocytosis in the trypanosome *Trypanosoma mega*. – J. biophys. biochem. Cytol. *8*, 563–569.
6. ARMSTRONG, J. A. A., BROWN, K. N. & VALENTINE, R. C. (1964). The ingestion of protein molecules by bloodforms of *Trypanosoma rhodesiense*. – Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. *58*, 291–292.
7. BROWN, K. N., ARMSTRONG, J. A. & VALENTINE, R. C. (1965). The ingestion of protein molecules by bloodforms of *Trypanosoma rhodesiense*. – Exp. Cell Res. *39*, 129–135.
8. ANDERSON, W. A. & ELLIS, R. A. (1965). Ultrastructure of *Trypanosoma lewisi*: flagellum, microtubulus, and the kinetoplast. – J. Protozool. *12*, 483–499.
9. BRACK, C. (1968). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. – Acta trop. *25*, 289–356.
10. CREEMERS, J. & JADIN, J. M. (1967). L'ultrastructure et la biologie de *L. mexicana*, Biaggi 1903. 2. Les formes en rosaces. – Bull. Soc. Path. exot. *60*, 53–58.
11. HERBERT, I. V. (1965). Cytoplasmic inclusions and organelles of *in vitro* cultured *Trypanosoma theileri* and *Trypanosoma melophagium* and some speculations on their function. – Exp. Parasit. *17*, 24–40.
12. JADIN, J. M. & CREEMERS, J. (1966). L'ultrastructure des formes en rosaces de *Leishmania tropica*, Wright, 1903. – Ann. Soc. belge Méd. trop. *46*, 349–354.
13. JADIN, J. M. & CREEMERS, J. (1968). Etude de la pinocytose dans les formes en rosaces de *Leptomonas ctenocephali*. – Acta trop. *26*, 363–366.
14. VICKERMAN, K. (1969). The fine structure of *Trypanosoma congolense* in its bloodstream phase. – J. Protozool. *16*, 54–69.
15. VICKERMANN, K. (1969). On the surface coat and flagellas adhesion in trypanosomes. – J. Cell Sci. *5*, 163–194.
16. WÉRY, M. & DE GROODT-LASSEEL, M. (1966). Ultrastructure de *Trypanosoma cruzi* en culture sur milieu semi-synthétique. – Ann. Soc. belge Méd. trop. *46*, 337–348.
17. BROOKER, B. E. & VICKERMAN, K. (1964). Acid phosphatase in trypanosomes. – Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. *58*, 293–294.
18. HARMSSEN, R. (1967). Cytochemical localization of phosphatases in *Trypanosoma brucei*. – J. Protozool. *14*, Suppl. 19–20.

19. SEED, J. R., BYRAM, J. & GAM, A. A. (1967). Characterization and localization of acid phosphatase activity of *Trypanosoma gambiense*. – J. Protozool. 14, 117–125.
20. GRAHAM, R. C. & KARNOVSKY, M. J. (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. – J. Histochem. 14, 291–302.
21. VENKATACHALAM, M. A. & DARIUSH, F. (1969). The use of beef-liver catalase as an protein tracer for electron microscopy. – J. Cell. Biol. 42, 480–489.
22. VENKATACHALAM, M. A., KARNOVSKY, M. J. & COTRAN, R. S. (1969). Glomerular permeability: ultrastructural studies in experimental nephrosis using horseradish peroxidase as a tracer. – J. exp. Med. 130, 381–399.
23. MOPPERT, J. M. (1969). Persönliche Mitteilung.
24. BIRD, R. G., MOLLOY, J. O. & ORMEROD, W. E. (1966). Granules and tubules in the cytoplasm of the sleeping sickness trypanosome: an electron microscope study. – Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 60, 753–760.