

Serumfreie Zucht von *Toxoplasma gondii* in vitro: Ein Weg zu besser definierten Antigenen

A. Haßl, H. Aspöck

Einleitung

In den letzten Jahren sind vermehrt Anstrengungen unternommen worden, die Massen-zucht von *Toxoplasma gondii* von der Maus in die Gewebekultur zu verlagern (1, 5, 6, 7, 8). Damit sollen möglichst standardisierte und besser definierte Antigene für serologische Tests gewonnen werden, zugleich erfüllt die Methode andererseits den Wunsch nach Reduktion von Tierversuchen. Bei der Zucht von *Toxoplasma gondii* in der Gewebekultur gibt es jedoch ein grundsätzliches und auch grundlegendes Problem: Aufgrund der Eigenschaft der Toxoplasmen, an ihrer Zelloberfläche Wirtsproteine anzulagern (4), führt die konventionelle, wiederholt beschriebene und ertragreiche Kultivierung in vitro mit serumhaltigen Nährmedien zur Gewinnung von Toxoplasmen, deren Antigene sich sogar schlechter definieren lassen als jene von in der herkömmlichen Zucht in der Maus gewonnenen Parasiten. Um diesem Nachteil zu begegnen wurde versucht, die Zugabe von Serum möglichst zu verringern; dies führte allerdings zu einem drastischen Abfall der Vermehrungsrate der Toxoplasmen (5). Erst der Einsatz von für solche Zwecke adaptierten, speziellen Nährmedien führte zum Erfolg (3, 4). In dieser Studie haben wir versucht, die Verwendbarkeit von verschiedenen Nährmedien mit geringem oder von solchen ohne jeden Serumzusatz zu vergleichen und die Veränderungen im Proteinmuster von solcherart gezüchteten Toxoplasmen zu studieren.

Material und Methoden

Toxoplasma-Stamm:

BK, hochvirulent.

Zelllinie:

Humane Larynxkarzinom-Zellen HEp-2; CCL 23, American Type Culture Collection (Rockville, USA).

Nährmedien:

Modifiziertes Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen und 2 g/l Natriumbikarbonat (Flow Lab., GB) und 1% l-Glutamin (Gibco, GB), 1% Antibiotica/Antimycotica und

1. mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (Gibco, GB), seronegativ gegenüber *Toxoplasma gondii* im indirekten Hämagglutinationstest.
2. mit 2% Ultrosor G (Gibco, GB).
3. ohne Serumzusatz.

Außerdem wurden folgende Medien getestet:

4. SHITE Nährmedium und Iscove's Medium (4).
5. serumfreies PC-1 Medium (Ventrex Lab. Inc., ME, USA).

Kultivierung:

Die HEp-2 Zellen wurden in 75 cm² ventilierten Polystyrolflaschen (Costar, NL) bei 37° C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre gezüchtet. Das Auszählen der Toxoplasmen erfolgte in einer Bürker-Türk-Zählkammer.

Antigencharakterisierung:

Die aus der konventionellen Zellkultur gewonnenen Toxoplasmen und jene aus der PC-1 Kultur wurden durch ein 8 µm Membranfilter von den HEp-2 Zellen getrennt, sodann wurden jeweils 2×10^8 /ml Trophozoiten in Probenpuffer für eine SDS-PAGE lysiert (Rezept: Pharmacia LKB Biotechnology, Wien). Die Proteine wurden auf einem Gradienten-Gel 10 - 15 (Phast-System, Pharmacia LKB Biotechnology) gemeinsam mit einem Proteinmarker (Pharmacia LKB Biotechnology) separiert und dann mit Coomassie-Blau gefärbt (wie in 3 beschrieben). Die Proteinbandmuster der beiden Lysate wurden sodann mittels eines Lesegerätes (PhastImage-System, Pharmacia LKB Biotechnology) in Graphen der optischen Dichte umgewandelt, die Hintergrundreaktion subtrahiert und die Kurven in einem Bild vereinigt. Schließlich wurde die Molekulargewichtskurve berechnet und den Proteinkurven unterlegt.

Ergebnisse

Die Vermehrungsraten von *Toxoplasma gondii* in den Zuchten in vitro unter verschiedenen Nährbedingungen sind aus Abbildung 1 ersichtlich. Abbildung 2 zeigt die optischen Dichten (= Proteinbanden; OD) der verschiedenen Toxoplasma-Antigene bei unterschiedlichen Molekulargewichten (MW).

Diskussion

Die Zucht in vitro von *Toxoplasma gondii* ist prädestiniert, zukünftig einen großen Teil des Antigenbedarfs für die Toxoplasmose-Serodiagnostik zu decken, sofern sie reproduzierbar, preiswert und möglichst einfach durchgeführt werden kann. Solcherart gezüchtete Toxoplasmen werden insbesondere als Antigene in jenen serologischen Tests genutzt werden, bei denen unzerstörte Trophozoiten eingesetzt werden (z. B. IIFT, SFT, ISAGA, DA). Es zeigt sich jedoch, daß die Entwicklung solcher Kulturverfahren eine überaus langwierige und aufwendige Arbeit ist. Wie wir in dieser Studie zeigen konnten, ist die Zusammensetzung des serumarmen oder serumfreien Nährmediums von entscheidender Bedeutung für die Vermehrungsrate der Parasiten und somit auch für die Rentabilität der Zucht. Während sich die Trophozoiten in serumarmen Nährmedien im allgemeinen nur schlecht oder überhaupt nicht vermehrten, erbrachte die Verwendung des serumfreien Mediums PC-1, das sich durch einen ungewöhnlich geringen Anteil von Proteinen auszeichnet, eine gegenüber der konventionellen Zellkultur gleich gute Vermehrungsrate (Abb. 1). Gerade die Zusammensetzung dieses Mediums ist aber nicht eruierbar, sodaß über die für die Toxoplasmavermehrung entscheidenden Faktoren keine Aussage gemacht werden kann. Noch erstaunlicher für uns war aber, daß die Toxoplasmen in dieser Zellkultur ihre morphologischen und physiologischen Eigenschaften veränderten; sie werden erheblich größer und die Generationsfolge wird schneller (3). Zu diesen im IIFT sich vorteilhaft auswirkenden Eigenschaften

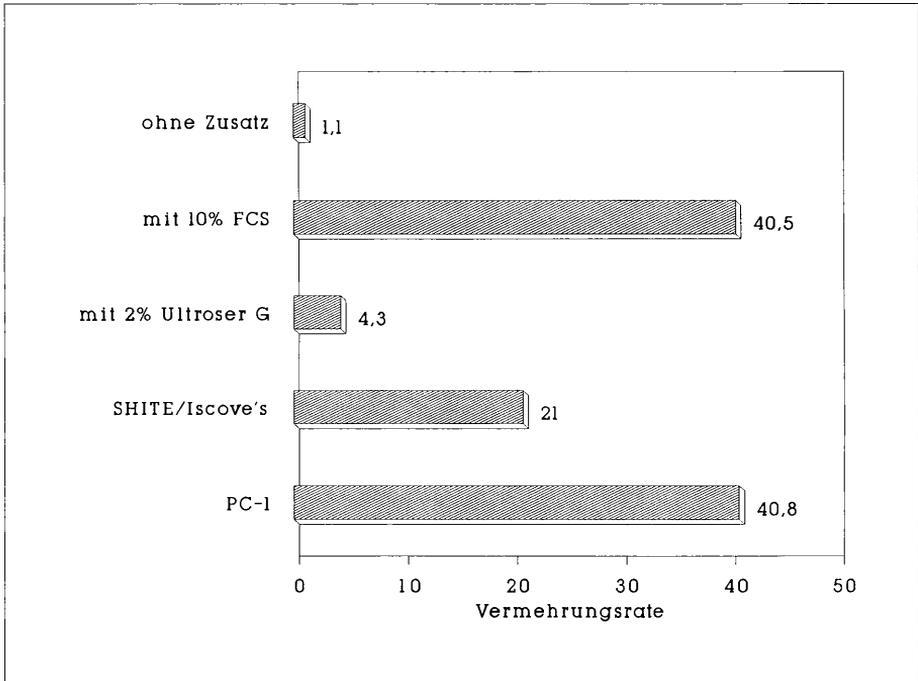


Abb. 1:

Vermehrungsraten (= Vielfaches des Inokulums) am 4. Tag p. i. von *Toxoplasma gondii* während der Zucht in HEp-2 Zellen bei Verwendung verschiedener Nährmedien oder Nährmediumzusätzen (z. T. nach 5).

der Toxoplasmen kommt, daß das Arbeiten mit diesem serumfreien Medium bedeutend einfacher ist als jenes mit einem aus vielen Komponenten zusammengesetzten, konventionellen Nährmedium. Der gravierende Nachteil jeder Zucht in vitro von *Toxoplasma gondii*, nämlich die relativ starke Verunreinigung der Toxoplasma-Suspension mit Wirtszellen und Wirtszelltrümmern, konnte hingegen nicht behoben werden. Allerdings entwickelten wir inzwischen ein effektives und schnelles Verfahren zur Reinigung von Toxoplasmen, die in einem IIFT Verwendung finden (2).

Die aufbereiteten Graphen der beiden Antigene (Abb. 2) zeigen sehr viel deutlicher als die originalen Bandenmuster im Gel die entscheidenden Unterschiede zwischen den Antigenen aus den verschiedenen Kulturverfahren (3). Die Konzentration bestimmter Proteine, in diesem Falle niedrigmolekularer, nimmt ab, — völlig andere Proteine sind jedoch nur in wenigen Bereichen und ausnahmsweise nachweisbar, so z. B. bei 90 kD. Welchen Einfluß diese Proteinmuster-Verschiebungen auf die Serodiagnostik bei Verwendung solcher Toxoplasma-Trophozoiten als Antigen haben, ist derzeit noch unklar. Erste Versuche haben jedoch gezeigt, daß Toxoplasmen aus einer serumfreien Kultur in vitro sehr viel sensitivere Antigene im IIFT darstellen als konventionell — sei es in der Gewebekultur, sei es in der Maus — gezüchtete Toxoplasmen.

Zusammenfassung

Toxoplasma gondii (Stamm BK) wurde in vitro in HEp-2 Zellen mit verschiedenen Nährmedien unter proteinarmen und/oder serumfreien Bedingungen gezüchtet.

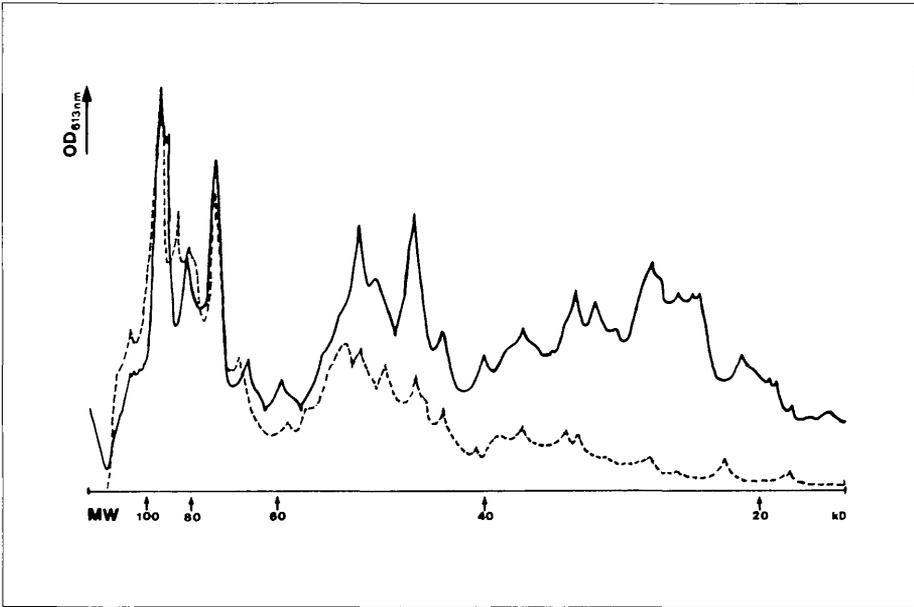


Abb. 2:

Graph der SDS-PAGE unter reduzierenden Verhältnissen von Lysaten von *Toxoplasma gondii*-Trophozoiten aus Zellkulturen, die in MEM-Medium mit 10% fötalem Kälberserum (durchgehende Linie) bzw. in PC-1 serumfreiem Medium (strichlierte Linie) gezüchtet wurden. OD: Optische Dichte bei 613 nm; MW: Molekulargewicht.

In einem dieser Medien (PC-1 Medium) war die Vermehrungsrate der Toxoplasmen ebenso hoch wie in einer konventionellen, serumreichen Zellkultur. Die Proteinzusammensetzung von Lysaten aus Toxoplasmen-Trophozoiten veränderte sich allerdings unter den serumfreien Kulturbedingungen, niedermolekulare Proteine wurden seltener.

Schlüsselwörter

Toxoplasma gondii, Gewebekultur, serumfrei, proteinarm, PC-1 Medium, Proteinmuster.

Summary

Serumfree propagation of *Toxoplasma gondii* in vitro: a way towards better defined antigens

Toxoplasma gondii (strain BK) was propagated in vitro in a HEp-2 tissue culture with different culture media under low-protein and/or serumfree conditions. In one of these media (PC-1 medium) the multiplication rate of the parasites was equal to that in a conventional, serum-enriched tissue culture. The protein composition of the trophozoite lysate changed during the serum-free propagation, the amount of low molecular weight proteins decreased considerably.

Key words

Toxoplasma gondii, tissue culture, serumfree, low-protein, PC-1 medium, protein pattern.

Diese Studie wurde im Rahmen des vom Österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung subventionierten Projekts P7151-MED durchgeführt. Für die gewissenhafte technische Assistenz danken wir Fr. Sabine Kreinecker und Fr. Susan Schuster.

Literatur

1. BRAVENY, I., WINTER, W., DISKO, R. (1978):
A method of mass cultivation of *Toxoplasma gondii* in cell culture.
Tropenmed. Parasitol. 29, 432-434.
2. HASSL, A., ASPÖCK, H. (1990):
A rapid and simple method of purification of *Toxoplasma gondii* originating from tissue culture for use in the indirect immunofluorescent antibody test.
Zbl. Bakt. 272, 509-513.
3. HASSL, A., ASPÖCK, H. (1990):
Unusual properties of *Toxoplasma gondii* produced in serum-free tissue cultures.
ICOPA VII, Paris, abstract 7F14.
4. HERMENTIN, K., AUER, H., ASPÖCK, H. (1987):
In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* under defined, serum-free conditions.
J. Parasitol. 73, 1276-1277.
5. HERMENTIN, K., HEPPE, E., AUER, H., ASPÖCK, H. (1986):
Kriterien der Produktion von *Toxoplasma*-Antigen in der Gewebekultur.
Mitt. Österr. Tropenmed. Parasitol. 8, 145-151.
6. HERMENTIN, K., ASPÖCK, H. (1987):
Higher yields and increased purity of in vitro grown *Toxoplasma gondii*.
Zbl. Bakt. Hyg. A, 267, 272-276.
7. HERMENTIN, K., HEPPE, E., AUER, H., HASSL, A., ASPÖCK, H. (1987):
Toxoplasma gondii in tissue culture: multiplication rates, degrees of purity, cost-benefit relation.
Zbl. Bakt. Hyg. A 265, 528.
8. HERMENTIN, K., HEPPE, E., AUER, H., ASPÖCK, H. (1987):
Versuche zur Dauerkultivierung von *Toxoplasma gondii* in der Gewebekultur.
Mitt. Österr. Tropenmed. Parasitol. 9, 95-99.

KORRESPONDENZADRESSE:

Univ. Ass. Dr. A. Haßl
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Hygiene-Institut der Universität Wien

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1991

Band/Volume: [13](#)

Autor(en)/Author(s): Hassl Andreas R., Aspöck Horst

Artikel/Article: [Serumfreie Zucht von *Toxoplasma gondii* in vitro: Ein Weg zu besser definierten Antigenen. 159-164](#)