

Mechanismen der zellzerstörenden Wirkung von *Entamoeba histolytica*

H. Stemberger*, O. Scheiner**, H. Hudler*, H. Kollaritsch* und G. Wiedermann*

* = Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. G. Wiedermann)

** = Institut für Allgemeine und Experimentelle Pathologie der Universität Wien
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. M. Peterlik)

Einleitung

Die Pathogenese aller klinischen Manifestationen der Amöbiasis läßt sich auf die gewebserstörende Wirkung dieser Protozoen zurückführen. Als ein in vitro-Korrelat der zytotoxischen Aktion von Amöben ist der erstmals von McCaul (4) beschriebene Chromfreisetzungstest zu betrachten, bei welchem Kulturamöben mit ^{51}Cr -markierten Gewebekulturzellen inkubiert werden. Durch verschiedene Eingriffe in den Reaktionsablauf dieses Tests war es möglich, Aufschlüsse über den Mechanismus der zellzerstörenden Aktivität von *E. histolytica* zu erhalten.

Material und Methodik

Zielzellen:

Gewebekulturzellen vom Typ K562 (abgeleitet von einer menschlichen Erythroleukämie) wurden in Suspension in RPMI mit 10% fetalem Kälberserum (RPMI/FCS) kultiviert.

Radioaktive Markierung der Zielzellen:

$2,5 \times 10^6$ K562 Zellen wurden einmal in RPMI/FCS gewaschen und zum Bodensatz $100\mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ mit einer spezifischen Aktivität von 1 mCi/ml 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal in RPMI/FCS gewaschen und auf eine Dichte von 5×10^4 Zellen/ml in TYI-S33 Medium eingestellt.

Amöben:

Trophozoen des Stammes SFL₃ wurden monoxenisch in Medium TYI-S3 (1) kultiviert. Für alle Versuche wurden 72-Stunden-Kulturen eingesetzt.

Zytotoxizitätstest):*

Für den Zytotoxizitätstest wurde als Medium TYI-S33 bzw. RPMI/FCS im Falle von Ansätzen mit Komplement verwendet. Es wurden jeweils 0,2 ml der Suspension radioaktiv markierter Zielzellen in einer Dichte von 5×10^4 /ml, 0,2 ml der Amöbensuspension mit $2,5 \times 10^5$ /ml bzw. anstelle der Amöben als Negativkontrolle 0,2 ml Medium sowie 0,2 ml Medium, Komplement oder unmarkierte Zielzellen (5×10^4 /ml) in 1 ml-Röhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden dann entweder zentrifugiert (2 min. bei 600 g) und in diesem Zustand weiterinkubiert (Pelletansatz) oder als Suspensionsansatz, während der gesamten Inkubationszeit in Bewegung gehalten oder als „Pellet-Suspensions-Ansatz“ wie oben zentrifugiert, nach 5 Minuten resuspendiert und bis zum Ende des Versuches in Suspension gehalten. Zur Feststellung der aufgetretenen Lyse wurden die Röhrchen – soweit es nötig war – kurz suspendiert, anschließend 2 Minuten lang bei 600 g zentrifugiert und der halbe Überstand in ein zweites Röhrchen transferiert.

*) Dieser Test wurde nach der von SCHEINER et al. (5) beschriebenen Methode durchgeführt.

Sowohl das Röhrchen, in welchem der Bodensatz + der halbe Überstand enthalten war, als auch das Röhrchen, welches nur den halben Überstand enthielt, wurden in einem Beckmann-Gamma-Counter gezählt. Die Chromfreisetzung wurde nach der Formel

$$\% \text{ Lyse} = \frac{2 \times \ddot{U}}{\ddot{U} + B} \times 100$$

als Maß für die Zielzell-Lyse berechnet, wobei

\ddot{U} die Radioaktivität in 0,3 ml Überstand,

B die Radioaktivität im Bodensatz in 0,3 ml Überstand + Bodensatz

bedeutet. Alle Werte wurden in Dreifachansätzen bestimmt, die Ergebnisse wurden gemittelt.

Hemmung der Zytotoxizität:

Zur Blockade der Zytotoxizität verwendeten wir frisches Normal-Humanserum, das in IHA, IIFT und im Latextest keine Antikörper gegen *E. histolytica* erkennen ließ. Dieses Serum hatte gegen die K562-Zellen in dem im Test eingesetzten Konzentrationen keinerlei zytotoxische Wirkung. Wie schon in einer früheren Arbeit gezeigt (7), lysiert dieses Serum 40–60% der Amöben.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 1 zeigt eine Zeitstudie der zytotoxischen Wirkung von Amöben auf Zielzellen in den verschiedenen Modifikationen des Zytotoxizitätstests. Wurde durch Zentrifugation ein enger Kontakt zwischen Amöben und Zielzellen erzwungen, so zeigt sich typischerweise ein steiler Anstieg in der Zielzell-Lyse, der bereits nach 10 Minuten etwa die Hälfte des Gesamtausmaßes der erreichbaren Lyse beträgt. Auch in einem reinen Suspensionsansatz kommt es zur Lyse von Zielzellen, die allerdings sehr zögernd auftritt und auch nach 3 Stunden kaum die Hälfte des 30-Minuten-Wertes im Pellet-Ansatz erreicht. Dieses Ergebnis zeigt, daß die zytotoxische Aktion von *Entamoeba histolytica* auf Gewebekulturzellen eines direkten Kontaktes bedarf, wobei die

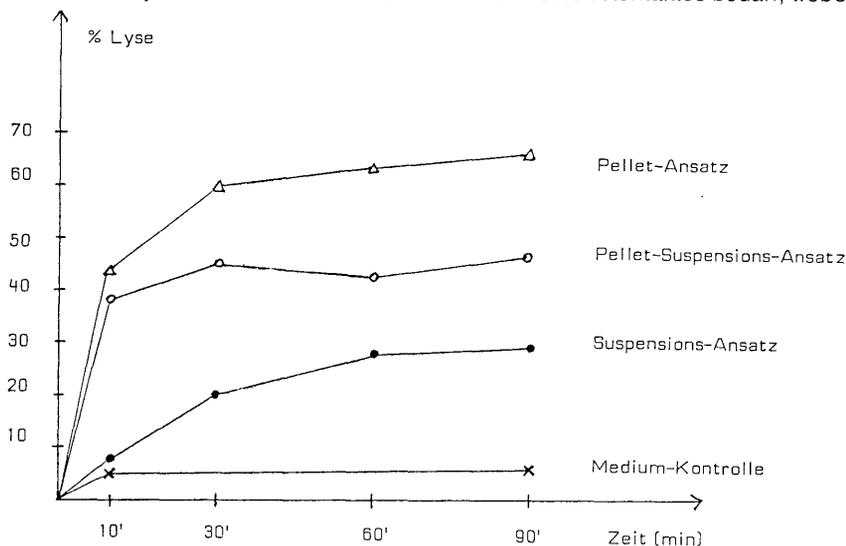


Abb. 1: Zeitstudie eines Chromfreisetzungstests unter verschiedenen Versuchsbedingungen. SFL₃:K562 = 5 : 1

Dauer des Kontaktes nur relativ kurz zu sein braucht, weil die Unterbrechung des Kontaktes nach 5 Minuten durch Resuspendierung beider Reaktionspartner (Pellet-Suspension-Ansatz) zumindest zu Beginn der Zytotoxizitätsreaktion keine wesentliche Hemmung der Zielzell-Lyse im Vergleich zum Pelletansatz herbeiführt.

Daß dieser Kontakt tatsächlich nur sehr kurz zu bestehen braucht und daß vor allem für den Fortgang der Zielzell-Lyse zytotoxisch wirksame Amöben nicht mehr vonnöten sind, zeigt der nächste Versuch (Abbildung 2):

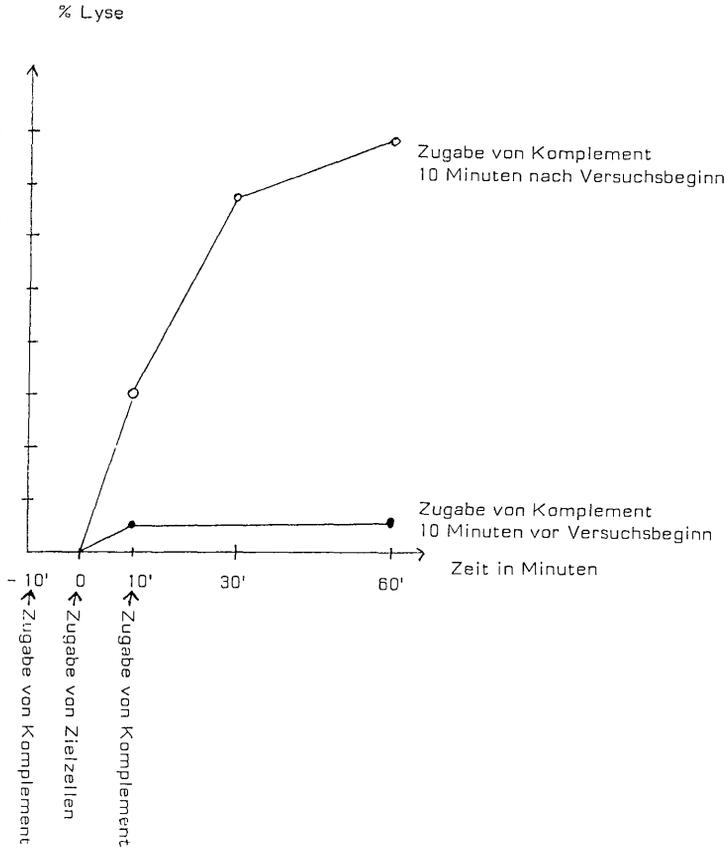


Abb. 2: Einfluß von Normalhumanserum als Komplementquelle auf die zytotoxische Wirksamkeit von SFL₃ auf K562

Setzen wir 10 Minuten vor Zugabe der radioaktiv markierten Zielzellen zu den Amöben Normalhumanserum als Komplementquelle, so zeigte sich, daß die zytotoxische Aktion der Amöben damit fast völlig, zumindest für 90 Minuten, auszuschalten war.

Wurden zu den Amöben allerdings zuerst die radioaktiv markierten Zielzellen und erst 10 Minuten später die gleiche Menge Komplement zugesetzt, so zeigte sich die gewohnte Kinetik der zytotoxischen Aktion von Amöben auf die Zielzellen.

Aus diesem Versuch kann abgeleitet werden, daß sich der Ablauf der zytotoxischen Reaktion in 2 Phasen vollzieht:

Die Phase, die darin besteht, daß ein irreversibler Zellschaden durch die Amöbe entsteht und die offenbar kontaktabhängig ist, und zweitens die Phase des Austritts zytoplasmatischer Substanzen aus der Zielzelle, für welche die Anwesenheit zytotoxisch aktiver Amöben nicht mehr erforderlich ist. Diese Ansicht wird durch die Beobachtung gestützt, daß beide Phasen unterschiedliche Temperaturansprüche besitzen:

Wurden Amöben und Zielzellen im Pellet 10 Minuten bei 4°C vorinkubiert, anschließend resuspendiert, ein Teil der Ansätze auf 37°C erwärmt, ein weiterer Teil der Ansätze bei 4°C belassen und beide Ansätze für den Rest der Versuchsdauer in Suspension gehalten, so zeigte sich, daß bei Weiterführung des Versuches bei 37°C eine Lysekinetik zu beobachten ist, die sich praktisch nicht von der in einem analogen Ansatz unterscheidet, bei welchem der Zellkontakt während der ersten 10 Minuten des Versuches bei 37°C stattgefunden hatte. Es kann also der „letale Hit“ bei 4°C und 37°C mit der gleichen Effektivität gesetzt werden.

Die zweite Phase ist jedenfalls temperaturabhängig, da eine signifikante Chromfreisetzung nur dann beobachtet werden konnte, wenn die Versuchsansätze auf 37°C erwärmt wurden.

Die Tatsache, daß der „letale Hit“ zwischen 4°C und 37°C offensichtlich temperaturunabhängig und innerhalb sehr kurzer Zeit geführt wird, läßt die Vermutung zu, daß in der Membran der Amöben eine zytotoxisch wirksame Substanz präformiert und gespeichert vorliegt und dem von LYNCH et al. (3) sowie YOUNG et al. (7) beschriebenen „Poreforming material“ entspricht. Den Anstoß zur Freisetzung dieser Substanzen scheint der Kontakt zur Zielzelle zu liefern, der offenbar durch Lektinbindungen zustandekommt (2).

% Lyse

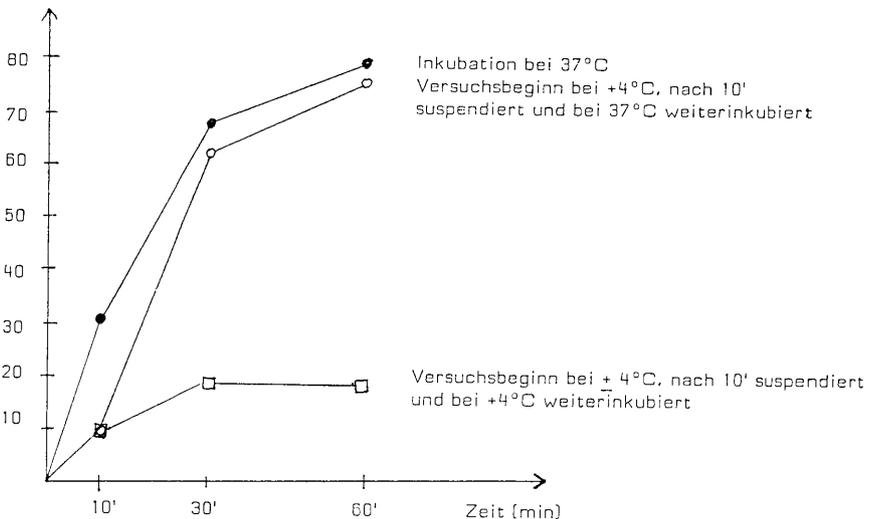


Abb. 3: Chromfreisetzungstest im Pellet-Suspensionsansatz bei verschiedenen Temperaturen. SFL₃:K562 = 5 : 1

Wir versuchten daher im folgenden Experiment, die Amöben durch fortgesetzte, aber kurzdauernde Kontakte mit nicht radioaktiv markierten Zielzellen in einem Suspensionsansatz von dieser zytotoxischen Substanz zu depletieren. Zu diesem Zweck ver-

setzten wir Amöben mit kalten Zielzellen in einem Verhältnis von 5:1 und hielten beide Reaktionspartner durch ständige Bewegung in Suspension, entnahmen zu verschiedenen Zeiten Proben, setzten radioaktiv markierte Zielzellen zu und überprüften die verbleibende zytotoxische Aktivität der Amöben in einem Pellet-Suspensions-Ansatz. Die jeweilige Ausgangslyse wurde in einem parallel geführten Suspensions-Ansatz mit radioaktiv markierten Zielzellen ermittelt.

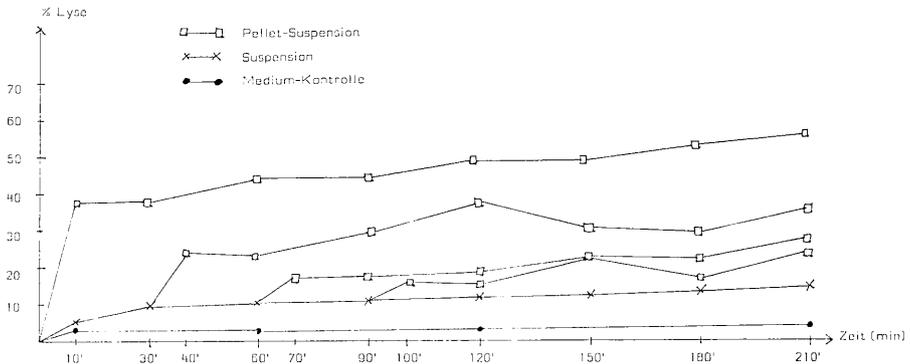


Abb. 4: Chromfreisetzungstest mit Amöben nach verschieden langer Vorinkubation mit unmarkierten Zielzellen

Wie aus Abbildung 4 ersichtlich ist, nimmt die zytotoxische Kapazität der Amöben mit zunehmender Dauer der Inkubation mit nicht markierten Zielzellen unter Suspensionsbedingungen laufend ab. Dieser Versuch läßt den Schluß zu, daß unter Suspensionsbedingungen die Kontakte zwischen Amöben und Zielzellen zeitlich so begrenzt sind, daß es zu einer Triggerung der Amöben und dadurch zu einer Freisetzung des Zytotoxins kommt, die Zeit jedoch nicht ausreicht, damit das Zytotoxin auf die Zielzelle übertragen wird. Es geht somit in die wäßrige Phase über und verliert hier sehr rasch seine Wirksamkeit, wie das bei hydrophoben Proteinen beschrieben wird (7).

Aus den vorliegenden Daten können wir somit den Schluß ziehen, daß die Zielzell-Lyse durch Trophoziten von *Entamoeba histolytica* sich in 2 Schritten vollzieht:

Der erste Schritt besteht im Setzen eines letalen Signals und ist

- kontaktabhängig, bedarf
- des Vorhandenseins funktionell intakter Amöben und vollzieht sich
- weitgehend temperaturunabhängig.

Der zweite Schritt besteht in der Auflösung der Zielzelle, die sich

- auch in Abwesenheit funktionell intakter Amöben vollzieht und
- temperaturabhängig ist.

Zusammenfassung

In einem Chromfreisetzungstest wurden die Mechanismen der zellzerstörenden Wirkung von Trophoziten von *Entamoeba histolytica* untersucht. Durch verschiedene Eingriffe in den Ablauf des Zytotoxizitätstests lassen die erhaltenen Ergebnisse folgende Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Lysemechanismen zu:

Die zytologische Aktion von *E. histolytica* vollzieht sich in 2 Schritten:

1. dem Setzen des letalen Schlages, ein Vorgang, der
 - a) Kontaktabhängig,
 - b) abhängig von der Anwesenheit funktionell intakter Amöben und
 - c) temperaturunabhängig ist.
2. der Lyse der Zielzellen, die
 - a) nur bei 37° C und
 - b) unabhängig von der Anwesenheit funktionell intakter Trophozoiten abläuft.

Daraus wird der Schluß gezogen, daß Trophozoiten von *Entamoeba histolytica* ein präformiertes zytotoxisches Agens an ihrer Oberfläche besitzen, das bereits nach kurzem Kontakt mit der Zielzelle auf diese übertragen wird und in weiterer Folge nach Art des „membrane-attack-complex“ einen Verlust der elektrochemischen Eigenschaften der Zielzellenmembran den Austritt zytoplasmatischer Substanzen bewirkt.

Summary

Mechanisms of the cytolytic action of *Entamoeba histolytica*

The cytotoxic action of trophozoites of cultured *E. histolytica* against tissue culture cells was investigated in a ⁵¹Cr-release test. Obviously, the target cell lysis followed a two step mechanism: The first step (lethal signal) proved to be

- i) contact dependent,
- ii) temperature independent and required
- iii) the presence of viable amoebae.

A close contact between Trophozoites and target cells for only 5 min was sufficient to set the lethal signal. The second step (lytic event)

- i) did not require functionally intact amoebae and was
- ii) temperature dependent since the chromium release only proceeded at 37° C.

Literatur

- 1) DIAMOND L. S., D. R. HARLOW, C. C. CUNNICK (1980): A new medium for the axenic cultivation of *E. histolytica* and other Entamoebae. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 431.
- 2) KOBILER, D., D. MIRELMAN (1980): Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Immun.* 29 (1) 221.
- 3) LYNCH, E. C., I. M. ROSENBERG, C. GITLER (1982): An ion-channel forming Protein produced by *Entamoeba histolytica*. *The EMBO-Journal* 1m 801.
- 4) McCAUL, T. F., R. M. POSTON, R. G. BIRD (1977): *E. histolytica* and *E. invadens*: Chromium release from labelled human liver cells in culture. *Exp. Parasitol* 43, 342.
- 5) SCHEINER, O., G. WIEDERMANN, H. RUMPOLD, R. STEINER, D. KRAFT, H. STEMBERGER (1980): Modulation of NK and K cell activity by trypsin-treatment of effector cells. *Immunobiol* 157, 343.
- 6) SCHEINER, O., H. HUDLER, H. STEMBERGER, H. KOLLARITSCH, G. WIEDERMANN: *Entamoeba histolytica*: The cytotoxic action of Trophozoites and influence of humoral defence mechanisms.. *Immunology*, submitted for publication.
- 7) YOUNG, J. D.-E., T. M. YOUNG, L. P. LU, J. C. UNKELESS, Z. A. COHN (1982): Characterization of a membrane pore-forming Protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 156, 1677.

KORRESPONDENZADRESSE:

Univ.-Doz. Dr. Heinrich Stemberger
Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien

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: 1984

Band/Volume: [6](#)

Autor(en)/Author(s): Stemberger Heinrich, Scheiner O., Hudler Helmut, Kollaritsch Herwig, Wiedermann Gerhard

Artikel/Article: [Mechanismen der zellzerstörenden Wirkung von Entamoeba histolytica. 87-92](#)