Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Lebenszyklus von "Trypanosoma cruzi" : unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklungsformen im Überträger "Rhodnius prolixus"

Autor(en): **Brack, Christine**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Acta Tropica**

Band (Jahr): **25 (1968)**

Heft 4

PDF erstellt am: **10.08.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-311542

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.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Schweizerischer Tropeninstitut, Basel

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*

Unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklungsformen im Überträger *Rhodnius prolixus*

CHRISTINE BRACK

Inhaltsverzeichnis

I. *Einleitung* 289

II. *Beschreibung des Zyklus von Trypanosoma cruzi Stamm G in Rhodnius prolixus* 291
A. Material und Methoden 291
B. Resultate 292
C. Diskussion 295

III. *Ultrastruktur der verschiedenen Entwicklungsformen* 297
A. Material und Technik 297
B. Feinstruktur der Entwicklungsformen 298
C. Diskussion 312

IV. *Versuche mit Einzell-Kulturen in vivo und in vitro* 321
A. Arbeitsmethoden 321
B. Resultate 323
C. Diskussion 325

V. *Literaturverzeichnis* 326
Résumé 329
Summary 330

I. Einleitung

Trypanosoma cruzi, der Erreger der südamerikanischen Trypanomiase (Chagas-Krankheit), wurde 1909 von Carlos Chagas erstmals beim Menschen isoliert und beschrieben (CHAGAS, 1909).

Fassen wir kurz das Wichtigste über die Biologie von *T. cruzi* zusammen. *T. cruzi* parasitiert im Blut und Gewebe von Säugetieren und Menschen. Die vom Parasiten befallenen Gewebe sind Muskulatur, RES und Nervensystem; hier erfolgt die Umwandlung der trypomastigoten Formen [1] in amastigote [1] Gewebeformen. Aus diesen können sich, nach Vermehrung durch Zweiteilungen, neue

[1] Bezeichnung nach der neuen Terminologie von HOARE & WALLACE (1966): trypomastigote Form (= Trypanosomaform), amastigote Form (= Leishmaniaform), epimastigote Form (= Crithidiaform). In den Literaturbesprechungen werden wir jeweils noch die alten Bezeichnungen verwenden, wie sie von den entsprechenden Autoren gebraucht wurden.

trypomastigote Formen entwickeln, welche wieder in die Blutbahn gelangen oder neue Gewebe befallen.

Wie alle Blutparasiten sind die Trypanosomen für die Übertragung auf blutsaugende Insekten angewiesen. Vektoren von *T. cruzi* sind Reduviiden verschiedener Gattungen, z. B. *Rhodnius* und *Triatoma*. Die mit der infektiösen Blutmahlzeit aufgenommenen Trypanosomen wandeln sich im Wanzendarm in epimastigote Formen um, welche sich stark vermehren, für den Säuger aber nicht infektiös sind. Im hintersten Darmabschnitt (Rektalampulle) entstehen wieder infektiöse, sogenannte metacyclische Trypanosomen. Mit dem Kot der Insekten gelangen diese auf die Haut oder die Schleimhäute eines neuen Wirtes Durch Verschmieren des trypanosomenhaltigen Kotes über der Einstichstelle durch Einkratzen in Hautläsionen oder aber direkt durch die Schleimhäute dringen die Trypanosomen in die Blutbahn ein.

Seit der Beschreibung durch CHAGAS sind über Biologie, Lebenszyklus und Entwicklungsformen von *Trypanosoma cruzi* zahlreiche Arbeiten veröffentlicht worden (MAYER & DA ROCHA-LIMA, 1914; BRUMPT, 1914; DIAS, 1934; MUÑIZ & FREITAS, 1946; ROMAÑA & MEYER, 1942; NOBLE, 1955; DA SILVA, 1959, u. a.). Eine ausführliche Zusammenstellung und Diskussion dieser Publikationen findet sich bei NOBLE (1955).

Wir wollen hier kurz einige Arbeiten anführen, die sich mit der Frage der Entstehung der trypomastigoten Form befassen, da die Ansichten der verschiedenen Autoren diesbezüglich stark auseinandergehen.

CHAGAS (1909, 1927) erwähnt schon neben den beiden Hauptstadien im Insektendarm (Trypanosomaform und Crithidiaform) das Vorkommen einer weiteren, leishmanoiden runden Form und vermutet, daß sie eine Phase im Entwicklungszyklus darstellen könnte.

BRUMPT (1912) beschreibt die Entstehung der metacyclischen Trypanosomen im Enddarm des Überträgers folgendermaßen: « Les crithidias diminuent de taille, leur blépharoplaste émigre, et on obtient finalement de vrais trypanosomes. » Auf diesen Angaben basieren die meisten späteren Lehrbücher. Für den Zyklus im Warmblütler nimmt BRUMPT (1936) ebenfalls an, daß die Entwicklung der Trypanosomen aus der leishmanoiden Gewebeform über ein Crithidiastadium geht.

MAYER & DA ROCHA-LIMA (1914) nennen zwei weitere Möglichkeiten für die Bildung der Trypanosomenformen aus leishmanoiden Rundformen: 1. eine direkte Entwicklung durch «Ausrollung» einer mit Geißel umwundenen Rundform; 2. eine indirekte Entwicklung, wobei die Rundform durch Streckung zuerst zur Crithidia wird, aus der sich sekundär die Trypanosomaform bildet.

ELKELES greift später das Problem erneut auf und setzt sich intensiv mit den Theorien seiner Vorgänger auseinander (1945, 1951, 1959). Er betont, daß in allen bekannten Medien (Kultur, Gewebe, Insektendarm) die Entwicklung gleich verlaufe: direkt von leishmanoiden Formen in die Trypanosomenform — ohne dazwischengeschaltetes Crithidiastadium. Er beschreibt allerdings einen anderen Rundform-Typ («microleishmanias» oder «elementary pairs of nuclei»), der durch multiple Teilung aus Rundformen oder Crithidien entsteht. Er enthält nur Kern, Kinetoplast und wenig Protoplasma. Im Gegensatz dazu werden die «Leishmania zweiter Ordnung» (große, begeißelte Rundformen) zu Crithidien.

WOOD (1951) beschreibt ebenfalls eine direkte Entwicklung begeißelter Rundformen zu Trypanosomenformen im Herzmuskel von Mäusen. DA SILVA (1959) kommt zu den gleichen Ergebnissen wie MAYER & DA ROCHA-LIMA (1914). Er erklärt zugleich mit den beiden Entwicklungsarten die Bildung von kurzen, plumpen Blutformen einerseits (direkt durch Ausrollung) und von schlanken, langen Trypanosomen andererseits (indirekt via Crithidiaform).

Aus diesen Arbeiten geht hervor, daß sich verschiedene mögliche Entwicklungsgänge aufstellen lassen. Im Darm der Raubwanze kommen immer viele Entwicklungsstadien nebeneinander vor, und diese lassen sich je nach Interpretation in die diversen Schemata einordnen.

Angesichts dieser Probleme stellten wir uns die Frage, ob sich in der Feinstruktur der einzelnen Formen strukturelle Unterschiede finden lassen, welche einen Hinweis geben könnten auf die Reihenfolge der Entwicklung. Die bis jetzt veröffentlichten elektronenmikroskopischen Arbeiten über *T. cruzi* befassen sich mit einzelnen Stadien aus Kulturen und Gewebe (MEYER & PORTER, 1954; MEYER et al., 1958; MEYER & QUEIROGA, 1960; SCHULZ & MACCLURE, 1961; SANABRIA, 1963, 1964; WÉRY & DE GROODT-LASSEEL, 1966). Das Gewicht unserer Studien soll deshalb hauptsächlich auf die Stadien im Überträger *Rhodnius prolixus* gelegt werden, wobei Blut- und Kulturformen lediglich zu Vergleichszwecken verwendet werden.

Gegen den Abschluß meiner elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist die Publikation von SANABRIA (1966) über das Zeitschriftenabonnement im Frühjahr 1967 in meine Hände gelangt. Der Autor befaßt sich ebenfalls mit den *T. cruzi*-Formen im Wanzendarm, behandelt aber nur die epimastigoten und trypomastigoten Stadien, bei welchen er zu ähnlichen Resultaten kommt. Im Interesse einer geschlossenen Übersicht über das Ganze wird in der vorliegenden Arbeit trotzdem eine lückenlose Beschreibung der Ultrastruktur sämtlicher Stadien gegeben. Auf Berührungspunkte mit den Befunden von SANABRIA wird von Fall zu Fall hingewiesen.

Wir wollen zunächst den Zyklus von *Trypanosoma cruzi* im Darm von *Rhodnius prolixus* beschreiben, wie er in unseren Versuchen beobachtet wurde. Daraus werden wir sehen können, wann und in welchen Darmabschnitten die verschiedenen Entwicklungsstadien auftreten. Danach soll die Feinstruktur der einzelnen Formen beschrieben werden. Zuletzt werden wir Versuche besprechen, in denen wir einzelne Stadien isoliert züchteten und ihre Entwicklung einerseits im Wanzendarm, andererseits in Deckglaskulturen verfolgten.

Die vorliegende Arbeit wurde als Dissertation unter der wissenschaftlichen Anleitung meines verehrten Lehrers Herrn Prof. Dr. R. GEIGY, Vorsteher des Schweizerischen Tropeninstitutes in Basel, durchgeführt. Für sein ständiges Interesse und viele anregende Diskussionen möchte ich ihm an dieser Stelle herzlich danken; ebenso auch dafür, daß er mir für diese Untersuchungen einen Arbeitsplatz an der elektronenmikroskopischen Abteilung des Tropeninstitutes zur Verfügung gestellt hat. Es ist mir ein besonderes Anliegen, auch Herrn P.D. Dr. H. Mühlpfordt (Tropeninstitut Hamburg), dem ich meine Arbeit vorlegen durfte, für seine wertvollen Anregungen meinen herzlichen Dank auszusprechen. Danken möchte ich auch den Herren Dr. P. Suter und Dr. H. Hecker, die mich in die elektronenmikroskopische Technik eingeführt haben und mir bei meinen Untersuchungen stets mit Rat und Hilfe zur Seite gestanden sind.

II. Beschreibung des Zyklus von Trypanosoma cruzi Stamm G in Rhodnius prolixus

A. Material und Methoden

1. Trypanosomen

Der untersuchte Stamm von *T. cruzi* wurde 1950 von V. Nussenzweig in Brasilien isoliert. In der Literatur ist er bekannt als

Stamm «Y». Eine genauere Charakterisierung findet sich bei DA SILVA & NUSSENZWEIG (1953). Im Schweizerischen Tropeninstitut ist er 1961 anläßlich einer Laborinfektion vom Menschen (mittels Xenodiagnose) neu isoliert worden und wird seither als Stamm G zyklisch in weißen Mäusen und Raubwanzen gehalten.

2. Wanzen

Die verwendeten Wanzen *(Rhodnius prolixus)* stammten aus den Zuchten des Tropeninstituts (der Stamm wurde 1951 aus Venezuela eingeführt). Sie wurden bei konstanter Temperatur von 26° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50—60% gezüchtet (Zuchtmethoden siehe GEIGY & HERBIG, 1955). Für unsere Versuche fütterten wir die Tiere des 3. und 4. Larvenstadiums auf Mäusen, die mit *T. cruzi* infiziert waren, und zwar stets bei ansteigender Parasitaemie.

An den darauffolgenden Tagen wurden jeweils zwei Wanzen seziert und ihr Darminhalt auf Parasiten untersucht. Der Darmtrakt der Reduviiden gliedert sich in folgende drei Abschnitte: auf den Oesophag folgt der magenartig erweiterte vorderste Teil des Mitteldarms, der Proventikel (im folgenden bezeichnet als Vorderdarm); darauf folgt ein dünnes, gewundenes Stück des Mitteldarms, abschließend der Enddarm, der sich zur sogenannten Rektalampulle erweitert.

Um den Parasitenbefall der einzelnen Darmabschnitte gesondert beobachten zu können, wurden von jedem Teil getrennt Ausstriche angefertigt. Die Präparate wurden in Methanol fixiert und mit Romanowsky-Giemsa gefärbt (8% pH 7,6 45 Min.).

3. Kulturen

Für die späteren elektronenmikroskopischen Vergleiche und für die experimentellen Untersuchungen hielten wir *T. cruzi* auch in Kulturen. Sie wurden auf Davis-Pifano-Nährböden bei 24° C gezüchtet (GEIGY & HERBIG, 1955, p. 409) und alle 14 Tage überimpft.

B. Resultate

Der zeitliche Ablauf des Entwicklungszyklus ist schematisch in Figur 1 dargestellt.

Schon wenige Stunden nach der infektiösen Blutmahlzeit sind im Vorderdarm neben normalen Blutformen (a) [2] einige verkürzte,

[2] Die Buchstaben beziehen sich auf die entsprechenden Stadien in Figur 1.

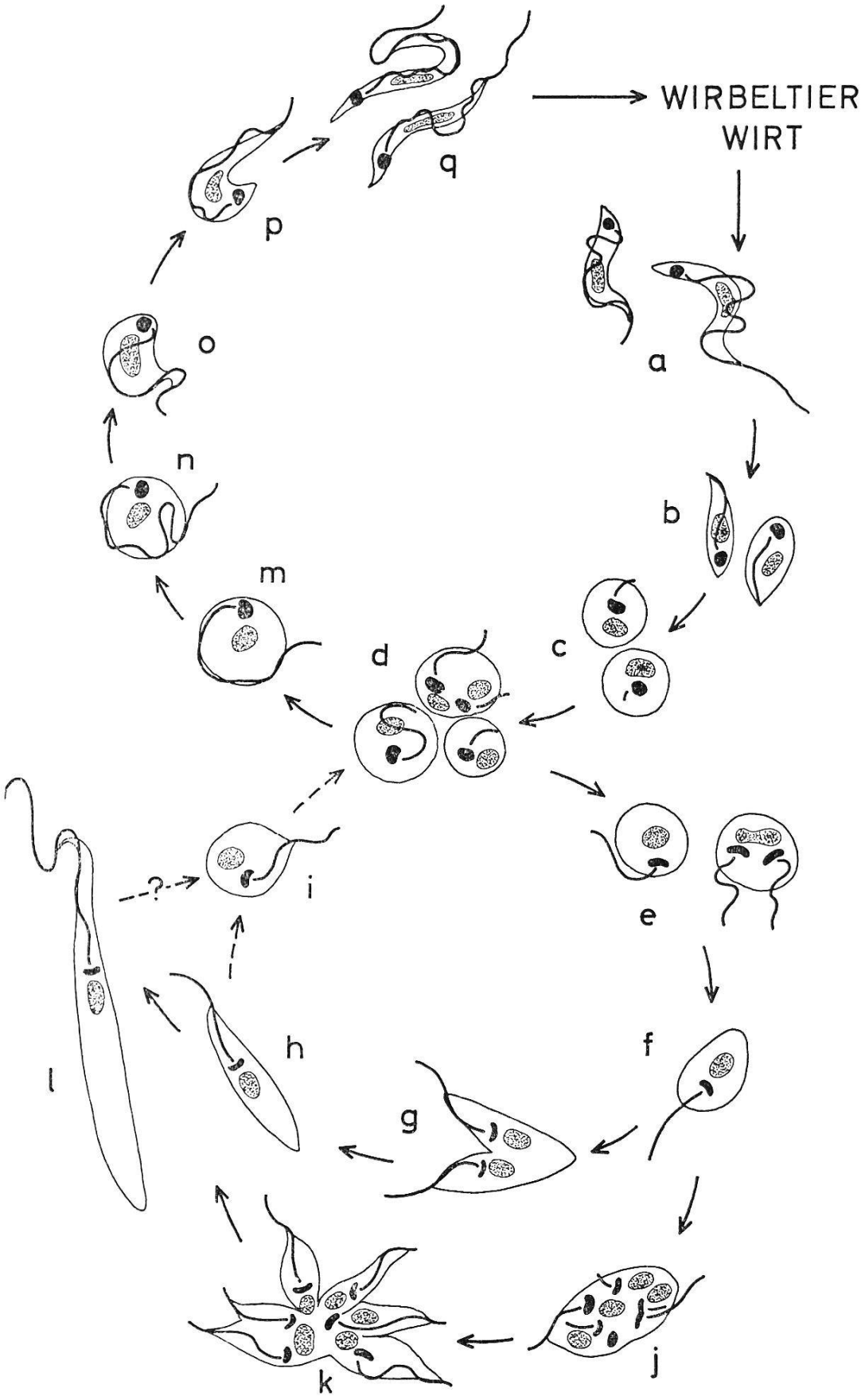


Fig. 1. Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von **Trypanosoma cruzi** in **Rhodnius prolixus.** a) Blutform, b) spindelförmig verkürzte Blutform, c) amastigote Form, d) sphaeromastigote Formen, e) sphaeromastigote Form, Teilung, f) kurze epimastigote Form, g) Längsteilung, epimastigote Form, h) mittlere epimastigote Form, i) Verkürzung der epimastigoten Form, j) multiple Teilung, k) Rosette, l) lange epimastigote Form, m) sphaeromastigote Form, von Geißel umwachsen, n, o, p) Übergangsformen zur metacyclischen trypomastigoten Form q) trypomastigote Form, a–d im Vorderdarm, c–l im Mitteldarm, g–i und l–q im Enddarm.

spindelförmige Trypanosomen (b) festzustellen, deren Geißel weitgehend abgebaut ist. Nach 14—20 Stunden finden sich im Vorderdarm amastigote Formen (c) oder «Rundformen» mit kurzem Geißelrest (c). Im Vorderdarm sind an den folgenden Tagen regelmäßig größere Nester der amastigoten Formen anzutreffen, welche sich durch Zweiteilung vermehren, hier aber keine weitere Entwicklung durchmachen.

Gelangen die «Rundformen» mit dem Darminhalt in den Mitteldarm (ca. 24 Stunden nach der Blutmahlzeit), so wächst ihre Geißel aus (d, e) und im Verlauf der folgenden Teilungen nimmt der Kinetoplast die für das epimastigote Stadium typische scheibenförmige Gestalt an. Durch Streckung der Zellen entstehen kurze (f) und mittlere (h) epimastigote Formen (10—20 μ), welche sich ebenfalls durch Zweiteilung vermehren (g). Bei extrem langen Formen (35—40 μ) konnte hingegen nie Teilung beobachtet werden (l). Gelegentlich findet man Zellen mit 6 bis 8 Kernen und Kinetoplasten (j). Diese multiple Teilung führt zur Bildung von Rosetten (k).

In der Rektalampulle erscheinen die ersten epimastigoten Stadien am 3.—4. Tag. Vom 5. Tag an beobachten wir neben kurzen und langen epimastigoten Formen plötzlich in steigender Zahl «Rundformen», die zunächst noch ähnlich gebaut sind wie diejenigen im Mitteldarm. Die Geißel umwächst den Körper, der Kinetoplast ist jedoch rund und liegt meist marginal (m, n). Nach etwa 7—8 Tagen treten die ersten «metacyclischen» trypomastigoten Formen auf (q). Sie sind schlanker als die plumpen Blutformen und zeichnen sich vor allem durch ihren schmalen, langgezogenen Zellkern aus. Verschiedene Übergangsformen im Enddarm (o, p) können als Zwischenstadien einer direkten Entwicklung von der «Rundform» zur trypomastigoten Form angesehen werden.

Spätere Versuche (vgl. Kap. IV) weisen darauf hin, daß noch eine weitere Möglichkeit in Betracht gezogen werden muß: die kleinen, teilungsfähigen epimastigoten Formen können sich anscheinend wieder zu «Rundformen» verkürzen (i) und sind dann erneut Ausgangspunkt für alle andern Stadien (d).

Ob auch die extrem langen epimastigoten Flagellaten (l) noch zu einer solchen Umwandlung fähig sind, läßt sich schwer bestimmen. Wir sind der Meinung, es handle sich dabei um ausgewachsene Zellen, die am Ende ihrer Entwicklung stehen. Da sie sich nicht mehr teilen, ist auch kaum anzunehmen, daß sie sich noch weiter differenzieren können. Diese langen Formen machen allerdings nur 15—20% aller im Insektendarm vorkommenden epimastigoten Formen aus.

C. Diskussion

Wir haben den Begriff «Rundformen» bis jetzt in Anführungszeichen gesetzt. Dieses Stadium ist klar zu unterscheiden von der amastigoten Gewebeform, die intrazellulär im Hauptwirt lebt. Die runde Form aus dem Darmlumen des Überträgers ist ausgezeichnet durch den Besitz einer Geißel. In Anlehnung an die Nomenklatur von HOARE & WALLACE (1966), welche dieses Stadium nicht berücksichtigt, schlagen wir vor, für die «runde begeißelte Form» die Bezeichnung s p h a e r o m a s t i g o t e F o r m einzuführen.

Wie wir aus unseren Untersuchungen ersehen können, treten im Enddarm zeitlich vor den trypomastigoten Formen regelmäßig sphaeromastigote Stadien auf. Es scheint daher naheliegend, diese in Zusammenhang mit der Neubildung der infektiösen Form zu bringen. Die sphaeromastigoten Formen gelangen, wohl weil sie sich nicht aktiv fortbewegen, erst nach den epimastigoten in die Rektalampulle. Dort entwickeln sie sich vermutlich direkt zu trypomastigoten Formen (m, n, o). Die langen epimastigoten Formen hingegen erscheinen dank ihrer relativ großen Beweglichkeit bald im Enddarm und wurden deshalb oft als Vorstadium zur metacyclischen Form angesehen.

Wenn wir nun, unseren Beobachtungen zur Folge, eine direkte Entwicklung der trypomastigoten Form aus der sphaeromastigoten annehmen, so wird damit die Bedeutung des epimastigoten Stadiums in Frage gestellt. Wozu dient in diesem Fall die im Wanzendarm viel häufigere, vermehrungsfähige epimastigote Form, wenn sie für die Bildung der metacyclischen Trypanosomen nicht nötig ist?

Wenn wir versuchen wollen, diese Frage zu beantworten, kommen wir nicht umhin, kurz auf das vieldiskutierte Problem der Phylogenese der Trypanosomen einzugehen. Die meisten Autoren vertreten heute die Ansicht von LÉGER (1904), nach der sich die zweiwirtigen Haemoflagellaten aus ursprünglich einwirtigen Darmbewohnern von Insekten (vom Typus *Crithidia* oder *Leptomonas*) entwickelt haben (vgl. LAVERAN & MESNIL, 1912; REICHENOW, 1934a; HOARE, 1948, 1957; DOFLEIN & REICHENOW, 1953; CAMERON, 1956; BAKER, 1963, 1965).

Innerhalb der Entwicklungsreihe dieser Anpassung der Flagellaten an ein Leben im warmblütigen Wirt stellt *T. cruzi* eine relativ primitive Form dar, bei welcher das infektiöse Stadium im Enddarm des Insektes gebildet und durch den Kot übertragen wird. Für die Arterhaltung ist *T. cruzi* nicht unbedingt auf einen zweiwirtigen Zyklus angewiesen; eine Übertragung von Insekt zu Insekt

kann auch direkt erfolgen (durch Koprophagie oder gegenseitiges Anstechen; BRUMPT, 1914; REICHENOW, 1934b).

Nach diesen Überlegungen können wir uns fragen, ob in der Wanze nicht ein doppelter Zyklus möglich wäre. Der erste Zyklus würde der ursprünglichen Entwicklungsfolge der Insektenflagellaten (z. B. Gattung *Crithidia*) entsprechen. Diese führt von einer amastigoten Cystenform über ein sphaeromastigotes in das epimastigote Stadium (Vermehrungsform) und im Enddarm durch Verkürzung über ein sphaeromastigotes Stadium wieder zurück zur amastigoten Ruheform (DOFLEIN & REICHENOW, 1953). Diesen Stadien entsprechen, allerdings ohne die Cystenform, die Stadien d—h und zurück zu d in unserer schematischen Darstellung (Fig. 1).

In diesem Modell dient also die epimastigote Form lediglich der Arterhaltung, d. h. der Fortdauer der Infektion in den Insekten.

Als sekundäre Anpassung an ein Leben im Warmblüter bildete sich bei blutsaugenden Wanzen, parallel zum ersten, ein zweiter Zyklus heraus. Dabei entstanden die für den Wirbeltierwirt infektiösen, beweglichen trypomastigoten Formen. Sie dienen in unserem Modell nur der Infektion des Warmblüters und sind für die Wanzen weiter nicht von Bedeutung. (DIAS stellte 1934 fest, daß nach der Infektion von Wanzen mit metacyclischen Trypanosomen — durch Injektion oder durch saugen lassen — keine Entwicklung der Parasiten erfolgt.)

CHAGAS (1911) glaubte schon an das Vorkommen von zwei Entwicklungsprozessen im Insekt. Er sprach allerdings von einem sexuellen Prozeß, der zur Bildung der infektiösen Form führe. Daneben stellt der ungeschlechtliche Prozeß eine einfache Vermehrung der Parasiten dar und führt zur Bildung von Crithidiaformen.

Ein weiteres Merkmal für die «primitive» Stellung des *T. cruzi* in der Entwicklungsreihe der Blutflagellaten ist die Tatsache, daß sich die trypomastigoten Formen nicht teilen. Die metacyclischen Trypanosomen wandeln sich nach dem Eindringen in den neuen Wirt sofort zu amastigoten Gewebeformen um, welche hier das einzige vermehrungsfähige Stadium darstellen. Auch die daraus sich entwickelnden Blutformen teilen sich nicht; sie dienen lediglich der Weiterverbreitung im Wirtsorganismus (durch Befall neuer Wirtszellen) oder der Reinfektion der Insekten. Sie unterscheiden sich von den metacyclischen Formen dadurch, daß sie sich im Insektendarm wieder via sphaeromastigotes Stadium zu epimastigoten Flagellaten entwickeln können.

Die trypomastigote Form spielt eine wichtige Rolle als infektiöses Stadium, welches sich aber erst sekundär, parallel mit Wirtswechsel und Parasitismus, entwickelt hat.

Im Zentrum beider Entwicklungszyklen steht somit die sphaeromastigote Form, die den Weg gefunden hat, sich sowohl im wirbellosen Wirt als auch im Wirbeltierwirt zu entwickeln. Im ersten Zyklus führt sie zur Bildung der ursprünglichen, epimastigoten Insektenflagellaten, im zweiten Zyklus zur Bildung der trypomastigoten Form, welche eine Ausdehnung des Lebensraums auf den warmblütigen Wirt ermöglicht. Die sphaeromastigote Form kann in dieser Funktion verglichen werden mit der resistenten Dauerform (Cyste), die primären Insektendarmflagellaten zur Übertragung diente.

In diesem Zusammenhang sei auf eine Arbeit von PIZZI & CHRISTEN (1950) hingewiesen. Die Autoren haben gezeigt, daß in Kulturen von *T. cruzi,* die bei niederem pH oder bei tiefen Temperaturen (bis 0° C) gezüchtet wurden, «runde Formen» als Überdauerungsstadien der ungünstigen Milieuverhältnisse auftreten können. Wir wissen allerdings nicht, ob dies Degenerationsformen sind, oder ob sie direkt mit den sphaeromastigoten Stadien aus dem Wanzendarm verglichen werden dürfen.

In unseren alten Kulturen treten oft auch abgerundete, atypische Formen auf. Im gefärbten Ausstrichpräparat lassen sich jedoch diese absterbenden, oft stark vakuolisierten Zellen mit gestreckter Geißel deutlich unterscheiden von den sphaeromastigoten Formen, die von der Geißel umwunden sind, sich lebhaft teilen und den Formen im Wanzendarm gleichen.

Wenn wir nun die Eigenschaft der sphaeromastigoten Form, sich als widerstandsfähigstes Stadium an andere Verhältnisse anzupassen, berücksichtigen, so scheint ihre zentrale Stellung in unserem Schema nicht mehr so fragwürdig.

Wir sind uns bewußt, daß auch diese Interpretation der Entwicklungszyklen im Insektendarm noch weitgehend spekulativ ist. Sie soll uns aber als Arbeitshypothese für die nachfolgenden Untersuchungen dienen.

III. Ultrastruktur der verschiedenen Entwicklungsformen

A. Material und Technik

Alle Entwicklungsstadien wurden aus den verschiedenen Darmabschnitten der Raubwanze isoliert und so weit wie möglich getrennt verarbeitet. Dazu wurden die Wanzen an bestimmten Tagen nach der infektiösen Blutmahlzeit seziert und der Inhalt der einzelnen Darmteile in physiologische NaCl-Lösung entleert. Epimastigote Formen wurden am 5.—6. Tag aus dem Mitteldarm isoliert,

trypomastigote Formen vom 10. Tag an aus dem Enddarm. Die sphaeromastigoten Formen wurden aus Mitteldarm und Enddarm gewonnen.

Die Trypanosomensuspension wurde mit Fixierflüssigkeit versetzt und 5—10 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert (Anreicherung der Parasiten).

Aus dem Blut von infizierten Mäusen und aus dem Kulturmedium (14tägige Kulturen) wurden die Trypanosomen ebenfalls durch Zentrifugieren angereichert (1500 rpm, 5 Min.).

Zwei verschiedene Fixiermethoden kamen zur Anwendung:

Fixierung I (nach Palade)

OsO_4 1%	(Veronalpuffer pH 7,6)	0—4° C	20—40 Min.

Fixierung II

Glutardialdehyd 3%	(Phosphatpuffer pH 7,2)	0—4° C	60 Min.
OsO_4 2%	(Phosphatpuffer pH 7,2)	0—4° C	30 Min.

Die weitere Verarbeitung der Trypanosomensuspension erfolgte nach der klassischen Methode: Entwässerung in aufsteigender Acetonreihe, Durchdringung und Einbettung in Durcupan ACM (Fluka) oder Epon; Polymerisation der Blöcke bei 60—70° C während 2—4 Tagen. Dünnschnitte wurden mit dem LKB Ultrotome I hergestellt und die Präparate mit Uranylacetat und Bleihydroxid, respektive Bleicitrat nachkontrastiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten auf dem Zeiß EM 9.

Als Identifikation der Stadien im Dünnschnitt diente die Lagebeziehung Kern-Kinetoplast. Es wurden z. B. nur diejenigen Zellen als trypomastigot bezeichnet, bei welchen eindeutig festzustellen war (evtl. durch eine Schnittserie), daß der Kinetoplast hinter dem Zellkern liegt. Die sphaeromastigoten Formen erkennt man am Verlauf der Geißel und an der Größe des Zelldurchmessers.

B. Feinstruktur der Entwicklungsformen

Die schematische Darstellung (Fig. 2) gibt am Beispiel der epimastigoten Form eine Übersicht über die Organisation in der Flagellatenzelle.

Zellmembran (Pellikula)

Eine Zellmembran («unit membrane») von 100—120 Å Dicke begrenzt den Flagellatenkörper (Abb. 1 b, 3, 32).

An der Austrittstelle der Geißel ist die Zellmembran eingebuchtet.

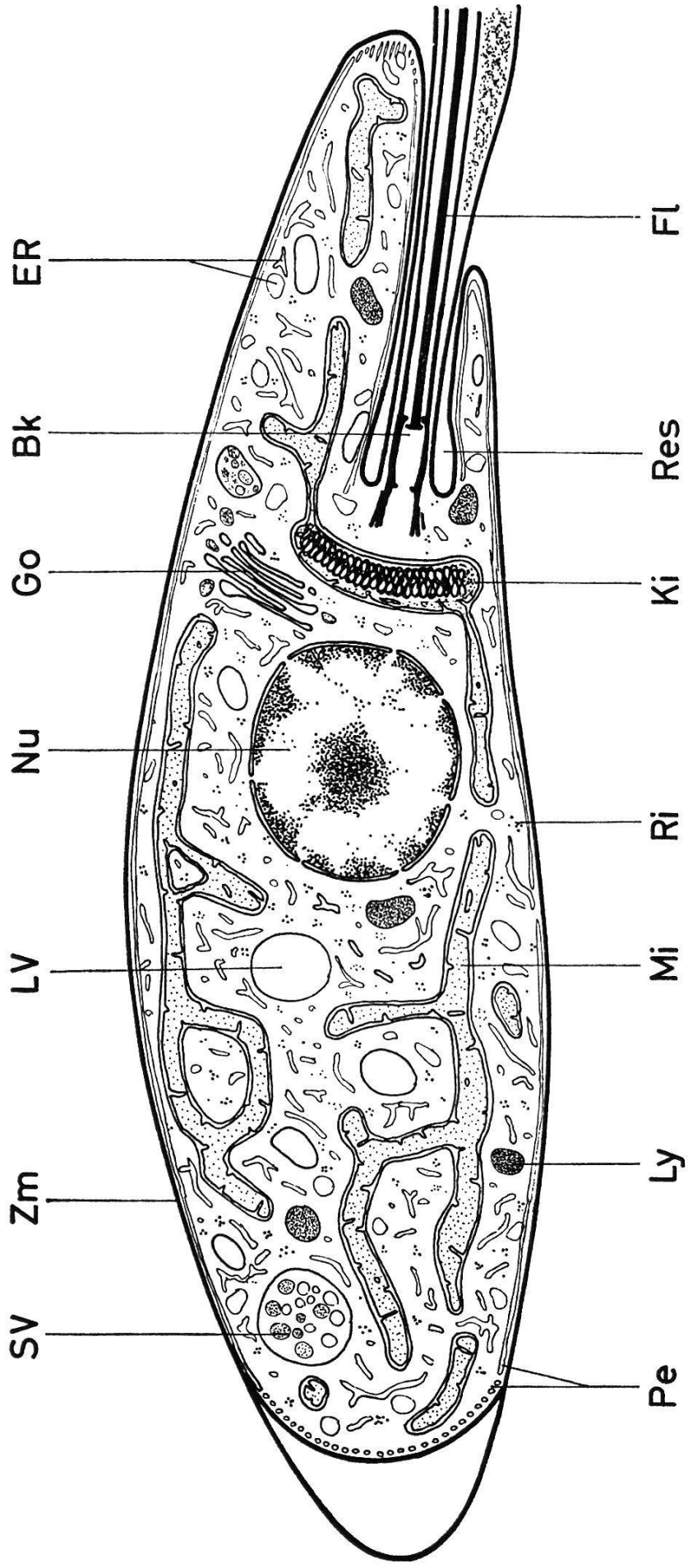


Fig. 2. Längsschnitt durch eine epimastigote Form von **Trypanosoma cruzi.** (Alphabetische Liste der verwendeten Abkürzungen siehe S. 331).

Sie begleitet das Flagellum bis an seine Basis und setzt sich nachher als Geißelhüllmembran fort. Am Grunde der Einstülpung ist diese Geißeltasche erweitert zum sogenannten Reservoir (Abb. 5).

Bei der epimastigoten Form ist die Geißeltasche 0,4—0,8 μ tief. Bei der trypomastigoten Form hingegen verläuft das Flagellum nur ein kurzes Stück innerhalb der Zelle; die Geißeltasche mißt hier 0,2—0,3 μ.

In der Nähe des Reservoirs findet man im Cytoplasma oft verschieden große Bläschen und Vakuolen, welche möglicherweise auf pinocytotische Vorgänge zurückzuführen sind (Abb. 14, 37).

Periplast

Unterhalb der Pellikula befindet sich eine Schicht regelmäßig angeordneter, parallel zur Längsachse verlaufender feiner Tubuli, der sogenannten Periplastfibrillen (Abb. 3, 6, 28). In anderen Arbeiten werden die entsprechenden Strukturen als «pellicular fibrils» (VICKERMAN, 1962), «sub-pellicular striations» (MEYER & PORTER, 1963) oder «subpellicular tubules» (ANDERSON & ELLIS, 1965) beschrieben.

Die Struktur dieser Periplast-Tubuli ist bei allen drei Entwicklungsformen gleich. Es sind röhrenförmige Elemente mit einem Durchmesser von 200—250 Å, die ungefähr 100 Å von der Zellmembran entfernt verlaufen (Abb. 1 b, 3, 6). Im allgemeinen liegen die einzelnen Tubuli in sehr regelmäßigen Abständen von ca. 300 Å nebeneinander (Abb. 3, 6, 28). Bei den sphaeromastigoten Formen sind sie manchmal unregelmäßig angeordnet und fehlen streckenweise vollständig (Abb. 36).

Einige Periplast-Tubuli — in der Regel sind es deren vier — begleiten die Einstülpung der Zellwand in die Geißeltasche hinein und führen, neben dem Reservoir, bis auf die Höhe des Basalkörpers (Abb. 14, 24, Fig. 3).

Gegen das Ende der Zellen hin hören einzelne Tubuli unvermittelt auf, so daß ihre Zahl abnimmt, der Abstand zwischen zwei benachbarten Elementen aber immer gleich bleibt (vgl. Tangentialschnitte Abb. 2 a, b). In Querschnitten durch die Zellspitze sind daher nur wenige Tubuli zu sehen, nur 3 bis 4 davon ziehen bis in die äußersten Enden.

Flagellum

Das Flagellum zeigt den für alle tierischen und pflanzlichen Cilien und Geißeln typischen Aufbau aus 9 + 2 Längsfibrillen, die in eine amorphe Matrix eingebettet sind. Sie sind immer nach dem

gleichen Muster angeordnet: 1 Paar einzelne Fibrillen im Zentrum umgeben von 9 peripheren Fibrillen, von denen jede in Subfibrille A und B unterteilt wird (FAWCETT, 1961).

Diese kontraktilen Elemente erscheinen im Querschnitt röhrenförmig, mit einem Durchmesser von 240—250 Å. Subfibrille A (meist etwas dicker als Subfibrille B) kann kleine Fortsätze («arms») besitzen, die gegen die B-Fibrille des nächsten Paares gerichtet sind (Abb. 4 c, f). Die beiden zentralen Fasern sind in eine nach Glutardialdehyd-Fixierung relativ elektronendichte Substanz eingebettet (Abb. 6).

Neben den äußern Geißelfibrillen finden wir eine elektronendichte Substanz (Abb. 6), die in Längsschnitten eine Gitterstruktur bildet (Abb. 7, 8 a). Diese wurde als «intra-flagellar structure» oder «honey comb» beschrieben (ANDERSON & ELLIS, 1965; MILDER & DEANE, 1967). Manche Autoren halten sie für die «undulierende Membran» (wir werden später auf diese Frage zurückkommen). Die Gitterstruktur befindet sich ebenfalls noch innerhalb der Geißel-Hüllmembran und ist durch diese auf der ganzen Länge vom Trypanosomenkörper getrennt (Abb. 7 a, 8 a).

Der Verlauf des Flagellums nach dem Verlassen der Geißeltasche ist nicht bei allen Entwicklungsformen gleich. Bei der sphaeromastigoten Form liegt die Geißel relativ gestreckt neben dem Körper (Abb. 8, 35); bei der trypomastigoten Form schlängelt sie sich entlang der Zelle, so daß in Längsschnitten immer nur Teilstücke zu sehen sind. In den epimastigoten Formen verläuft die Geißel zuerst gerade und nachher ebenfalls geschlängelt.

In allen Fällen liegt die Geißelhüllmembran in direktem Kontakt mit der Pellikula. Eine strukturelle Verbindung zwischen den beiden Membranen konnte jedoch nicht beobachtet werden.

ANDERSON & ELLIS (1965) beschreiben eine desmosomenartige Struktur, welche an den Kontaktstellen («attachment zones») eine Verbindung zwischen Flagellum und Pellikularmembran herstellen. Wir können gelegentlich eine entsprechende feingranuläre Substanz zwischen den beiden Membranen feststellen (Abb. 7 a, b). Es könnte aber sein, daß sie durch die Fixierung zustande kommt, denn auch zwischen zwei dicht nebeneinanderliegenden Zellen ist manchmal die gleiche Struktur zu sehen (Abb. 6, 14).

Basalkörper

An der Basis der Geißelfilamente befindet sich der Basalkörper (Synonyme: Blepharoplast, Kinetosom, Basalkorn, Basalkörner. Wir wollen hier den allgemeineren Begriff Basalkörper beibehalten). Es handelt sich um einen Hohlzylinder, der begrenzt wird

von 9 Fibrillen, der Fortsetzung der peripheren Geißelfibrillen (vgl. Fig. 2 und 3 und Abb. 4 und 5). Die peripheren Fibrillen bilden nach innen zwei Septen. Die zentralen Fibrillen durchstoßen das vordere Septum und enden kurz danach in einer basalen Platte (Abb. 5, 14, 32). Die weiterziehenden peripheren Fibrillen sind immer noch doppelt und scheinen manchmal mit der Hüllmembran verbunden zu sein (Abb. 4 b, e). Sie können sich nachher weiter aufteilen, so daß im Querschnitt 9 × 3 Fibrillen vorhanden sind, sogenannte «triplets» (Abb. 4 a, d), die leicht spiralig angeordnet sind. In den von GIBBONS & GRIMSTONE (1960) beschriebenen Flagellaten wird der ganze Basalkörper von solchen dreifachen Fibrillen begrenzt. Der ganze Komplex des Basalkörpers, vom Ende der zentralen Fibrillen an, mißt 0,4—0,5 μ. Er ist bei allen Entwicklungsformen gleich gebaut.

Zu Beginn einer Zellteilung verdoppelt sich der Basalkörper. In Abb. 1 a ist neben der ersten Geißel bereits der Basalkörper der Tochterzelle zu erkennen. Die sich bildende zweite Geißel wächst in die schon bestehende Geißeltasche vor. Es ist nicht sicher festzustellen, wie sich dieser Vorgang der Neubildung der Geißel abspielt: ob vom Basalkörper ausgehend neue Filamente einzeln vorwachsen, oder ob die Fibrillen in der Grundsubstanz neu organisiert werden (Abb. 14). Wir können nur wahrnehmen, daß oft zwei fertig ausgebildete Flagellen in der gleichen Geißeltasche liegen (Abb. 4 f).

Auffallend ist die strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem Basalkörper und den Centriolen (FAWCETT, 1966). Die beiden Organellen können auch in bezug auf ihre Funktion verglichen werden. Sie leiten beide die Zellteilung ein und stehen in Verbindung mit tubulären Elementen (mit Geißelfibrillen, beziehungsweise Spindelfibrillen).

Zellkern

Der Zellkern der epimastigoten Form ist rundlich. In der metacyclischen trypomastigoten Form ist der Kern, wahrscheinlich infolge der schlankeren Gestalt der Zelle, viel schmaler und langgezogen, bis 3,5 μ lang (Abb. 1 b, 41). Bei sphaeromastigoten Formen findet man sowohl runde als auch längliche Kerne.

Abgesehen von diesen Unterschieden ist der Kern bei allen drei Formen gleich aufgebaut. Zwei Membranen («unit membranes») umschließen das Kernplasma. Gelegentlich ist die äußere Membran dicht mit Ribosomen besetzt (Abb. 9). Die OsO_4-Fixierung allein erlaubt keine Differenzierung in Eu- und Heterochromatin, das Karyoplasma erscheint homogen aufgebaut und wird mit Ausnahme

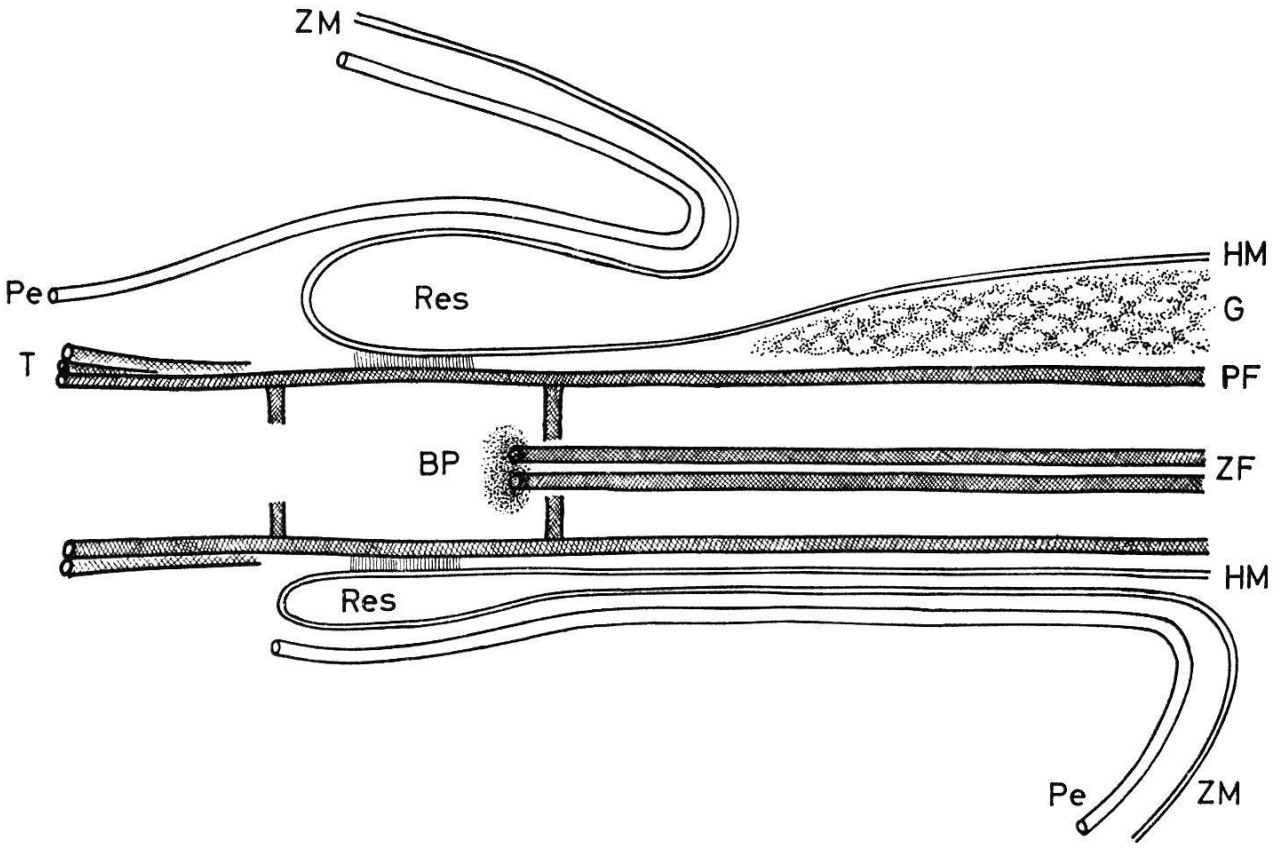


Fig. 3. Medianer Längsschnitt durch Basalkörper und Geißel. BP = Basalplatte der zentralen Geißelfibrillen, G = Gitterstruktur, HM = Geißel-Hüllmembran, Pe = Periplast-Tubuli, PF = periphere Geißelfibrillen, Res = Reservoir, ZM = Zellmembran (Pellikula), T = «Triplets».

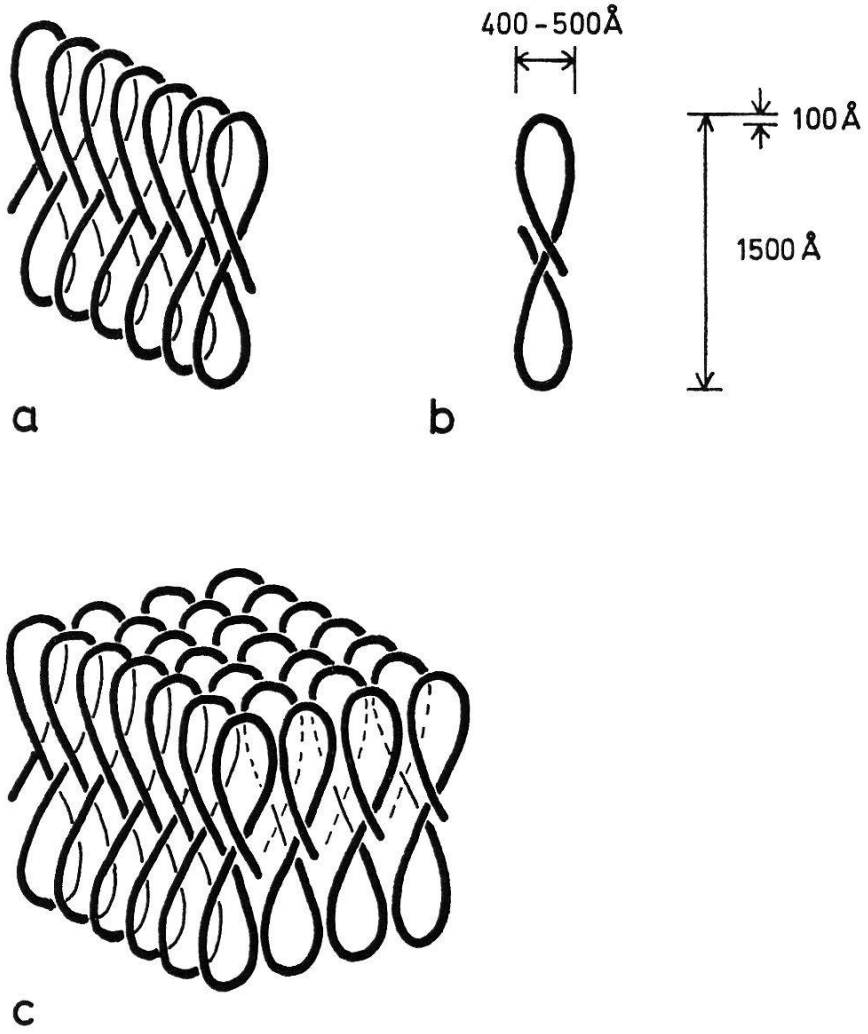


Fig. 4. DNS-Fibrillen im Kinetoplasten. Die 100 Å dicken DNS-Fibrillen sind in Figur-8-förmigen (b) Doppelschleifen zu kontinuierlichen Reihen angeordnet (a). Mehrere dieser Einheiten nebeneinandergelagert bilden den scheibenförmigen Kinetoplasten der epimastigoten Form (c).

des elektronendichten Nucleolus gleichmäßig kontrastiert (Abb. 10, 11, 30, 41, 42). Glutardialdehyd-Vorfixierung und Uranylacetat-Kontrastierung hingegen lassen das Chromatin deutlich gegenüber der Matrix hervortreten. Das kontrastreichere Heterochromatin ist an der Peripherie und um den Nucleolus angeordnet (Abb. 9, 16, 33).

Relativ wenige Kernporen stellen die Verbindung zwischen Karyoplasma und Cytoplasma her. Die äußere und die innere Kernwand gehen hier direkt ineinander über. Die Öffnung der Poren hat einen Durchmesser von 350—400 Å und ist von einem Diaphragma durchzogen (Abb. 10). Die Kernmembran ist an den Rändern etwas verdickt; das erkennen wir besonders in einem tangential zur Kernoberfläche verlaufenden Schnitt, wo die Poren als dickrandige Öffnungen mit einem Gesamtdurchmesser von ungefähr 800 Å erscheinen (Abb. 31). Eine strukturelle Verbindung zu den Membranen des endoplasmatischen Reticulum konnte nicht festgestellt werden.

Nach NOBLE (1955) bleibt bei der Kernteilung die Kernmembran bestehen. Abb. 11 bestätigt diese Annahme: in dieser Teilungsform kann man 150 Å dicke Microtubuli erkennen, welche die durchgeschnürten Kernhälften verbinden. Möglicherweise handelt es sich dabei um Spindelfasern, die innerhalb der Kernmembran gebildet worden sind. In der Regel teilt sich der Zellkern erst nach dem Kinetoplasten. Gelegentlich kann aber auch eine abnormale Teilungsfolge beobachtet werden, wo die beiden Kerne schon getrennt nebeneinanderliegen, die Kinetoplasten aber noch verbunden sind.

Kinetoplast

Der Kinetoplast ist eine Organelle, die ausschließlich bei Flagellaten der Familien *Trypanosomatidae* und *Bodonidae* bekannt ist. In der Arbeit von MÜHLPFORDT (1964) findet sich eine ausführliche Zusammenstellung und Diskussion aller bis dahin bekannten Literatur über Terminologie, Struktur und Funktion des Kinetoplasten.

Wie wir schon bei unseren lichtmikroskopischen Untersuchungen gesehen haben, sind die drei Entwicklungsstadien von *T. cruzi* unter anderem ausgezeichnet durch unterschiedliche Form und Lage des Kinetoplasten. Der Kinetoplast befindet sich immer in unmittelbarer Nähe der Geißelbasis. Bei der epimastigoten Form ist die Organelle scheibenförmig und liegt vor dem Zellkern. Der Kinetoplast der trypomastigoten Form ist kugelförmig (an der dem Basalkörper zugekehrten Seite ist die Kugel leicht eingebuchtet; Abb. 38, 39, 45) und liegt im hinteren Körperende. In der sehr schmalen metacyclischen Form wird die Zellspitze durch den großen Kinetoplasten aufgetrieben (Abb. 1 b, 38). In den sphaero-

mastigoten Stadien finden wir scheibenförmige oder kugelförmige Kinetoplasten (Abb. 30 bis 37).

Morphologie

Nach MÜHLPFORDT (1963, 1964) sind immer drei Elemente am Aufbau des Kinetoplasten beteiligt. Wir können auch bei *T. cruzi* diese verschiedenen Strukturen unterscheiden.

1. Die Organelle ist begrenzt von einer doppelten Membran (bestehend aus zwei «unit membranes»).

2. Unmittelbar daran anschließend und den ganzen Kinetoplasten ausfüllend befindet sich eine feingranuläre, amorphe Substanz (Matrix), die besonders gut bei Glutardialdehyd fixierten Präparaten zu erkennen ist (Abb. 12 c, 14, 20, 21, 37).

3. In diesen granulären Massen ist eine el-dichte, fibrilläre Struktur eingelagert. An diese Zentralstruktur ist die DNS des Kinetoplasten gebunden.

Je nach dem verwendeten Fixierungsmittel weist die DNS-Struktur eine ganz unterschiedliche Anordnung auf. Die folgenden Beschreibungen beziehen sich auf die mit Glutardialdehyd vorfixierten Präparate. Nach OsO_4-Fixierung ist die Struktur nicht so regelmäßig erhalten.

Die DNS-Zentralstruktur scheint aus zusammenhängenden Fibrillen zu bestehen. Die Fibrillen sind ~ 100 Å dick und in Figur-8-förmige, kontinuierliche Schleifen angeordnet. Die Höhe der Schleifen beträgt ca. 1500 Å, die Weite zwischen den Fibrillen 200—300 Å. Eine räumliche Rekonstruktion führt zu folgendem Schema (Fig. 4 a). Die Baueinheiten sind die linear angeordneten Doppelschleifen, welche von vorn gesehen eine 8-Figur bilden (Fig. 4 b), von der Seite hingegen eine Schlangenlinie oder «Spirale» (vgl. SCHULZ & MACCLURE, 1961). Die Windungen können mehr oder weniger eng «spiralisiert» sein. Mehrere solcher Einheiten können nun nebeneinander, respektive ineinander geschoben werden. Dadurch wird der Raum gleichmäßig ausgefüllt (Fig. 4 c).

Zum besseren Verständnis stellen wir uns das räumliche Modell des Kinetoplasten nicht als Scheibe, sondern als rechteckige Platte vor. Wir können somit verschiedene Schnittrichtungen unterscheiden: a) Querschnitt senkrecht zu den Reihen, b) Querschnitt parallel den Reihen, c) Horizontalschnitt (entspricht einem Aequatorialschnitt durch den Kinetoplasten). Ein Schnitt a ergibt das typische Bild einer Doppelreihe, bestehend aus nebeneinandergereihten 8-Schleifen mit deutlichem Mittelstreifen (Abb. 12 a, 14). Schnitt b ergibt dichte Lagerung der Fibrillen ohne deutliche Mittellinie (Abb. 12 f, 17 b, e). Eine Verwischung dieser regelmäßigen Struktur kommt zustande erstens durch schräge Schnitt-

richtung und zweitens durch die Schnittdicke (sie umfaßt meistens mehrere hintereinanderliegende Windungen); deshalb ist nicht in allen Schnitten die regelmäßige Doppelreihe erkennbar. Im Horizontalschnitt c sind die DNS-Fibrillen quer getroffen (Abb. 13). Sie scheinen aus noch kleineren Einheiten zusammengesetzt zu sein. Nach unseren Aufnahmen beurteilend, glauben wir nicht, daß es sich dabei um tubuläre Elemente handelt. Eine tubuläre Anordnung kann vorgetäuscht werden, wenn mehrere 100 Å-Fibrillen zusammengelagert sind.

Wie verhält sich nun die DNS-Zentralstruktur im Verlauf der Teilung des Kinetoplasten? Nach Beurteilung der Schnittpräparate können zwei verschiedene Teilungsmechanismen angenommen werden. Die häufigere Teilungsart ist die allgemein beschriebene Querteilung. Der Kinetoplast verlängert sich bis zur doppelten Größe; die Zentralstruktur bleibt dabei als durchgehende Doppelreihe vollständig erhalten. Der zweite Basalkörper wird gebildet und nachher wird die Scheibe in der Mitte quer durchgeschnürt (Abb. 1 a, 14, 15, 16, Fig. 5 B).

In selteneren Fällen (ca. 10% aller beobachteten Teilungsformen) finden wir eine Anordnung der DNS-Fibrillen, welche auf eine zweite Teilungsrichtung schließen lassen: eine aequatoriale Teilung parallel zur Längsachse des Kinetoplasten. Dabei wird zuerst die DNS-Struktur verdoppelt, zwei Doppelreihen liegen übereinander in der gleichen Hülle (Abb. 12 b, e, 17 a). Zur selben Zeit werden auch schon der zweite Basalkörper und die zweite Geißel gebildet. Nachher verschiebt sich die obere DNS-Scheibe an den Rand der ersten (Abb. 17 b) und gleitet neben diese, so daß die beiden Kinetoplasten nebeneinander zu liegen kommen (Abb. 17 c—e, Fig. 5 C—E).

Mit Hilfe unseres Modells können wir versuchen, uns den Mechanismus dieser beiden Teilungsarten vorzustellen. Die einzelnen Einheiten (Doppelreihen) sind gegeneinander verschiebbar, sowohl in der horizontalen als auch in der vertikalen Ebene. Angenommen das DNS-Material vermehre sich durch Verdoppelung jeder einzelnen Reihe (analog der Replikation der Chromosomen), so kann die nachfolgende Teilung des Kinetoplasten auf zwei Wegen erfolgen:

1. durch horizontales Auseinandergleiten der (verdoppelten) Reihen wird die Scheibe verbreitert, nachher wird sie in der Mitte quer durchgetrennt;

2. durch vertikale Verschiebung der (verdoppelten) Reihen entstehen zwei übereinanderliegende Scheiben. Die beiden Schichten gleiten auf der horizontalen Teilungsebene nebeneinander.

In den Kinetoplasten der trypomastigoten Formen (metacyclische und Blutform) ist die DNS-haltige Zentralstruktur ebenfalls

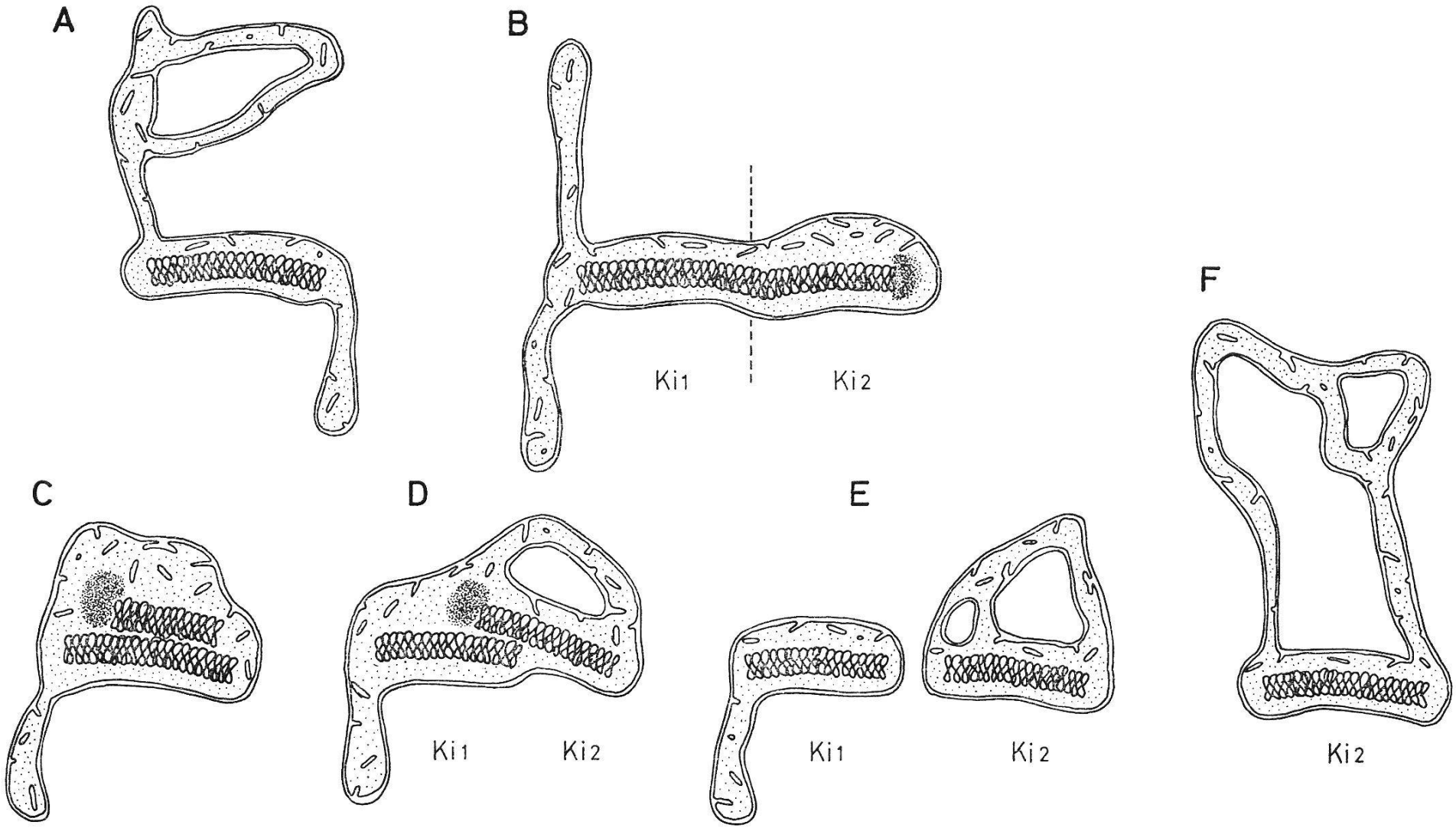


Fig. 5. Kinetoplast-Teilung und Mitochondrienbildung. A. Scheibenförmiger Kinetoplast mit verzweigtem Mitochondriensystem. B. Verlängerung der DNS-Zentralstruktur, anschließend Querteilung. C. Aequatoriale Teilung: zwei Scheiben bestehend aus DNS-Doppelreihen liegen übereinander in einer Mitochondrienerweiterung. D. Die beiden DNS-Scheiben gleiten voneinander; Bildung eines Mitochondriensäckchens am zweiten Kinetoplasten (Ki 2). E. der alte Kinetoplast (Ki 1) bleibt mit dem Mitochondriensystem verbunden. Vergrößerung des Mitochondriensäckchens am Ki 2. F. Bildung eines neuen verzweigten Mitochondriensystems am Ki 2.

aus den gleichen Bauelementen zusammengesetzt, wobei immer 3—4 Doppelreihen (d. h. räumlich gedacht «Scheiben») parallel übereinanderliegen (Abb. 12 c, d; 45, 46). In Schnittserien kann man, je nachdem ob die Schnittebene durch die Peripherie oder das Zentrum der Kugel verläuft, eine bis vier Doppelreihen erkennen. Wenn die Schnittrichtung nicht senkrecht zu den Reihen verläuft, sind die Doppelreihen nicht deutlich voneinander abgegrenzt (Abb. 39, 40).

In einigen sphaeromastigoten Formen liegt der Kinetoplast neben dem Zellkern, hat aber schon eine kugelige Gestalt mit 3 bis 4 Doppelreihen DNS (Abb. 32, 33, 34). Vermutlich sind diese Zellen im Begriff, sich zu trypomastigoten Flagellaten zu entwickeln.

Verbindung mit Mitochondrien

Der Kinetoplast steht in direkter Verbindung mit dem Mitochondriensystem der Zelle. Bei allen Entwicklungsstadien können solche Verbindungen zwischen den beiden Organellen gesehen werden (Abb. 1 a, 1 b, 18, 28, 31, 41, 42). Die doppelte Membran des Kinetoplasten geht dabei direkt in die Hüllmembran der Mitochondrien über. Es besteht auch keine strukturelle Trennung zwischen der Matrix der beiden Organellen (Abb. 12 c, 18, 21). Sowohl in den Mitochondrien als auch im Kinetoplasten bildet die innere der beiden begrenzenden Membranen tubuläre und lamellenförmige Einstülpungen, welche in die feingranuläre Grundsubstanz hineinragen (Abb. 1 a, 1 b, 12 c, 14, 16, 38, 42, 46). Man könnte also sagen, die DNS-Doppelreihen sind in eine Erweiterung des Mitochondriensystems eingelagert; der Kinetoplast wäre demnach ein Bestandteil des Mitochondriensystems. Wir werden in einem späteren Kapitel auf diesen Zusammenhang zurückkommen.

Im Kinetoplasten der epimastigoten Form können Zonen auftreten, in welchen die regelmäßige Struktur der DNS unterbrochen ist. An diesen Stellen ist eine Anhäufung granulärer el-dichter Substanz zu sehen. Sie besteht aus 60—80 Å großen Grana und sieht aus wie eine Verdichtung der Matrix.

Solche granuläre Massen finden wir vor allem in Teilungsstadien des Kinetoplasten; sie sind entweder am Rand der Scheibe angehäuft (Abb. 1 a, 12 e, 17 a—c, Fig. 5 B—D) oder in der Mitte, wo sie die DNS-Reihe «aufbrechen» (Abb. 12 f).

Eine strukturelle Beziehung zwischen dem Basalkörper der Geißel und dem Kinetoplasten konnte nicht festgestellt werden. Wir haben bei unseren Untersuchungen auch keine direkte Verbindung zwischen der Kernmembran und dem Kinetoplasten beobachten können.

Mitochondrien

Die epimastigoten Formen aus dem Wanzendarm zeigen ein besonders stark entwickeltes Mitochondriensystem. Schlauchförmige Mitochondrien mit einem Durchmesser von 0,1 bis 0,2 μ durchziehen die ganze Zelle bis in ihre äußersten Spitzen (Abb. 1 a). Die Schläuche können sich verzweigen und Anastomosen bilden. Sie sind von zwei Membranen begrenzt; von der inneren Membran ragen lamellenförmige oder tubuläre Einstülpungen in die feingranuläre Matrix vor (Abb. 18). *T. cruzi* besitzt demnach Mitochondrien, welche Cristae und Tubuli enthalten (= gemischter Typ).

In manchen Zellen finden wir Mitochondrien, die knäuelförmig oder lamellenförmig um den Kinetoplasten konzentriert sind (Abb. 20—23). Wir werden über mögliche Zusammenhänge zwischen dieser speziellen Anordnung der Mitochondrien und der Kinetoplast-Teilung einerseits und der Mitochondrienbildung andererseits später diskutieren.

Die trypomastigoten Formen (metacyclische und Blutformen) enthalten ebenfalls ein verzweigtes, schlauchförmiges Mitochondriensystem, das sich bis in die Zellspitzen erstreckt (Abb. 1 b, 38, 39, 40, 41). In dieser Beziehung weichen unsere Befunde von anderen Beschreibungen ab, nach denen die metacyclischen oder adulten Formen von *T. cruzi* keine typischen Mitochondrien enthalten (WÉRY & DE GROODT-LASSEEL, 1966; SANABRIA, 1966).

Im Vergleich zu den Mitochondrien der epimastigoten Form weisen die trypomastigoten Mitochondrien eine reichere Innenstruktur auf; die Cristae mitochondriales sind länger und dichter gelagert (Abb. 39). In den Blutformen sind diese Merkmale besonders stark ausgeprägt (Abb. 42, 46).

Auch in den sphaeromastigoten Formen sind schlauchförmige Mitochondrien mit dem Kinetoplasten verbunden. Sie sind weniger verzweigt als in den epimastigoten Stadien, ihre Innenstruktur ist unterschiedlich stark entwickelt (Abb. 30, 31).

Wahrscheinlich bildet das ganze verzweigte Mitochondriensystem eine strukturelle und funktionelle Einheit, die auch den Kinetoplasten mit einschließt. Die verschiedenen kleinen und großen Mitochondrien im Dünnschnitt sind nur Teilstücke dieses zusammenhängenden Systems.

Endoplasmatisches Reticulum

Das Cytoplasma der epimastigoten Form ist durchzogen von einem Netz feiner Kanälchen, das sich aus verzweigten Röhrchen

(mit einem Durchmesser von ca. 400 Å) und kleinen Bläschen (bis 800 Å Durchmesser) zusammensetzt (Abb. 1 a, 18). Die einzelnen Elemente sind begrenzt von einer 80—100 Å dicken «unit membrane». Dieses Membransystem ist vergleichbar dem glatten endoplasmatischen Reticulum, wie es für viele Zellen von Metazoen beschrieben wird. Wir finden bei den epimastigoten Formen aus dem Wanzendarm nie mit Ribosomen besetzte «granuläre» Membranen.

Bei der metacyclischen trypomastigoten Form ist das endoplasmatische Reticulum nicht so ausgeprägt entwickelt. Wir finden kein dichtes Netz von tubulären Elementen, sondern nur vereinzelte Tubuli, Bläschen und mit Ribosomen besetzte Membranstücke (Abb. 38). Eine ähnliche Anordnung beobachten wir auch in den sphaeromastigoten Formen, bei denen manchmal Ribosomen an kürzere Membranen angelagert sind (Abb. 30, 31, 37).

Am auffälligsten ist die Ausbildung der cytoplasmatischen Membranen in den trypomastigoten Blutformen. Sie enthalten die typisch «rauhe oder granuläre» Form des endoplasmatischen Reticulums, bestehend aus flachen langen Säckchen, die im Dünnschnitt als Röhrchen erscheinen und die dicht mit Ribosomen besetzt sind (Abb. 42 bis 46).

Golgi-Komplex

Ebenfalls aus glatten Membranen zusammengesetzt ist der Golgi-Komplex, der in Flagellaten oft auch als Parabasalkörper bezeichnet wird (GRIMSTONE, 1959; GRASSÉ, 1966). Er liegt bei epimastigoten und sphaeromastigoten Formen meistens in der Nähe der Geißelbasis und des Kinetoplasten (Abb. 1 a, 24—28), bei trypomastigoten Formen in der Nähe des Zellkerns (Abb. 1 b). Der Golgi-Komplex besteht aus einer Reihe parallel übereinanderliegender flachgedrückter Säckchen (= Golgi-Zisternen), die im Dünnschnitt wie feine Kanälchen aussehen. An den Rändern erweitern sich die Lamellen und kleine Bläschen werden abgeschnürt. Die Lamellen sind 150—200 Å dick und bis zu 1 μ lang. Ihre Zahl variiert stark: es können nur wenige, aber auch mehr als zehn Zisternen übereinandergeschichtet sein. Morphologisch gehören die Elemente des Golgi-Komplexes dem gleichen Typ cytoplasmatischer Membranen an wie die oben beschriebenen Tubuli des endoplasmatischen Reticulums. Einige Aufnahmen aus Teilungsformen lassen vermuten, daß bei der Zellteilung der Golgi-Komplex auf die beiden Tochterzellen verteilt wird, indem die langen Zisternen in der Mitte durchgeschnürt werden (Abb. 26, 27).

In der Nähe der Golgi-Zisternen treten oft bestimmte Zelleinschlüsse auf. Es handelt sich um Vakuolen, die von einer «unit membrane» begrenzt sind und kleine Bläschen und Tröpfchen enthalten (Abb. 24, 25, 29). In welcher Reihenfolge diese Vakuolen entstehen, kann man anhand eines fixierten statischen Bildes nicht aussagen. Es könnte sein, daß die kleinen, von den Golgi-Zisternen abgeschnürten Bläschen sich zu größeren Tröpfchen vereinigen und somit die im Golgi-Feld gebildeten oder gesammelten Sekrete enthalten.

Cytoplasma-Einschlüsse

Im Cytoplasma sind verschiedene Granula und Vakuolen verteilt. Man kann drei verschiedene Sorten von Einschlußkörpern unterscheiden, die alle von einer «unit membrane» begrenzt und mit verschieden elektronendichten Substanzen gefüllt sind.

1. Granula aus stark osmiophilem, feinkörnigem Material von 0,1 bis 0,25 μ (Abb. 1 a, 10, 28, 31, 46). Vergleiche mit anderen Arbeiten (STEINERT & NOVIKOFF, 1960; WÉRY & DE GROODT-LASSEEL, 1966) lassen uns vermuten, daß es sich bei diesen Strukturen um Lysosomen handelt. Eine Bestimmung von saurer Phosphatase wurde allerdings nicht durchgeführt. BIRD et al. (1966) beschreiben entsprechende Einschlußkörper in *Trypanosoma rhodesiense* als Granula Typ I.

2. Vakuolen verschiedener Größe mit homogenem, je nach Fixation mehr oder weniger elektronendurchlässigem Inhalt stellen eventuell Lipidvakuolen dar (Abb. 1 a, 23, 28, 30). Sie entsprechen den Granula Typ II von BIRD et al. (1966).

3. Die dritte Sorte von Einschlußkörpern wurde schon im Kapitel Golgi-Komplex erwähnt. Es sind die großen, mit Sekrettröpfchen gefüllten Vakuolen (Abb. 19, 37). Ähnliche Strukturen wurden von WÉRY & DE GROODT-LASSEEL (1966) als «corps multivésiculaires» mit unbekannter Funktion beschrieben.

Die epimastigoten Stadien enthalten alle drei beschriebenen Typen von Einschlüssen. Vor allem die langen Formen aus dem Enddarm sind oft dicht angefüllt mit Einschlüssen und Vakuolen.

Bei den sphaeromastigoten Formen konnten — in sehr unterschiedlichen Mengen — ebenfalls alle drei Strukturen beobachtet werden.

In den trypomastigoten Stadien kommen nur die beiden erstgenannten Zelleinschlüsse vor, die größeren, mit Tröpfchen gefüllten Vakuolen wurden nie beobachtet. Manchmal erkennt man hingegen eine weitere Sorte Granula: 300—400 Å große, osmiophile Partikel (Abb. 38, 41).

In Glutardialdehyd-OsO_4-fixierten Präparaten können wir ge-

legentlich cytoplasmatische Mikrotubuli erkennen, die kreuz und quer durch das Cytoplasma verlaufen und oft bündelartig angeordnet sind (Abb. 29). Diese Mikrotubuli sind etwas kleiner im Durchmesser (ca. 200 Å) und dünnwandiger als die Tubuli des Periplasten und des Flagellums. Ihre Funktion ist unbekannt; wir fanden sie vor allem in epimastigoten Teilungsformen.

Ribosomen

Im Cytoplasma sind zahlreiche 150—200 Å große Granula («Palade's particles» oder Ribosomen) verteilt, die entweder einzeln oder in Gruppen (Polysomen) vorkommen. Bei epimastigoten Formen liegen sie vorwiegend einzeln, locker verteilt in der Grundsubstanz, nie aber gebunden an das ER. In Teilungsformen sind sie vermehrt und häufig zu Polysomen gruppiert (Abb. 11, 16, 26, 27, 29).

Das Cytoplasma der trypomastigoten Formen enthält viel mehr einzeln, aber dicht gelagerte Ribosomen. In Blutformen sind sie regelmäßig auch an Membranen des ER gebunden. Bei metacyclischen, trypomastigoten und bei sphaeromastigoten Formen sind oft einzelne Ribosomen an kürzere Membranstücke angelagert.

C. Diskussion

Periplast

In Übereinstimmung mit anderen Beschreibungen finden wir die Hülle der Trypanosomen aus einer Plasmamembran (= Pellikula) und den darunter liegenden Periplast-Tubuli aufgebaut. In den uns aus der Literatur bekannten Darstellungen besteht der Periplast aus parallelen Längsfibrillen oder aus Tubuli, die ohne Anfang und Ende rund um die Zelle verlaufen (MEYER et al., 1958; SCHULZ & MACCLURE, 1961; VICKERMAN, 1962; SANABRIA, 1963). Es drängt sich nun die Frage auf, wie diese Tubuli über die ganze Zelle hin angeordnet sind. Verzweigen sie sich, oder sind an den dickeren Stellen des Körpers zusätzliche Elemente eingebaut?

MEYER & PORTER (1954) beschreiben an Totalpräparaten von *T. cruzi,* daß die subpellikulären Fibrillen durch fortgesetzte Verzweigung an Zahl zunehmen. PITELKA (1963) vermutet, daß die Fibrillen spiralig um den Körper der Flagellaten verlaufen und an den Zellspitzen durch Verschmelzung zusammenlaufen.

In den tangential zur Zelloberfläche verlaufenden Schnitten konnten wir aber sehen, daß sich die Tubuli nicht verzweigen (resp. verschmelzen), sondern daß die einzelnen Elemente eines nach dem

andern aufhören, ohne miteinander in Berührung zu kommen (Abb. 2a, b).

Im Zusammenhang mit dem Formenwechsel wäre es vor allem interessant, den Verlauf der Fibrillen in den sphaeromastigoten Formen zu kennen. Wenn man sich z. B. vorstellt, die Tubuli seien wie Meridiane um eine Kugel angeordnet, so müßten zwei Pole vorhanden sein, von denen die Fibrillen ausstrahlen. Mit diesem Modell könnte man sich erklären, daß durch Streckung der Mikrotubuli die Zellen wieder trypomastigote oder epimastigote Formen annehmen würden. Die Frage, ob und wie sich die sphaeromastigoten Stadien zu Trypanosomen «ausrollen» können, wäre allerdings damit nicht gelöst.

Da aber, wie oben gezeigt, die Periplastfibrillen in den sphaeromastigoten Formen oft unregelmäßig angeordnet sind, scheint es nicht ausgeschlossen, daß sie während der Umwandlung abgebaut und erst nachträglich wieder aufgebaut werden. AIKAWA (1966) beschreibt einen entsprechenden Vorgang bei Plasmodien. Die freien Merozoiten besitzen eine Schicht subpellikulärer Mikrotubuli. Beim Eindringen in Erythrocyten verschwinden die Tubuli; sie werden erst nach der Teilungsphase in den Tochtermerozoiten wieder neu gebildet.

Die Tubuli des Periplasten besitzen wahrscheinlich kontraktile Fähigkeiten wie die «Fibrillen» der Cilien und Geißeln und bestehen offenbar wie diese aus Proteinen, da sie durch Pepsin- oder Proteinase-Behandlung abgebaut werden (MEYER & PORTER 1954). Sie stellen vermutlich eine Art geschmeidiger Stützelemente dar und dienen der Aufrechterhaltung der Körperform. In einer Reihe von Zellen anderer Organismen sind nämlich strukturell ähnliche Elemente beschrieben worden — zusammengefaßt unter dem Begriff «Mikrotubuli» —, denen ebenfalls die Rolle eines Zellskeletts zugeschrieben wird (FAWCETT, 1966).

Cytostom — Geißelreservoir

STEINERT & NOVIKOFF (1960) beschreiben bei *Trypanosoma mega* ein «Cytostom», das von einer Einbuchtung der Periplastfibrillen gebildet wird und nicht weit von der Geißelbasis entfernt liegt. Die Autoren zeigen ferner, daß in diesem «Cytostom» durch Pinocytose Ferritin aufgenommen wird.

Wir sehen bei *T. cruzi* nur ganz selten eine ähnliche Anordnung von einigen Periplastfibrillen, die ins Zellinnere hineinragen. Wir vermuten aber, es handle sich dabei um einen Schnitt entlang der eingebuchteten Membran der Geißeltasche und um die vier Periplastfibrillen, welche diese Einstülpung bis zum Reservoir beglei-

ten. Wenn nämlich zusätzlich zum Reservoir ein Cytostom vorhanden wäre, müßte diese Struktur häufiger, vor allem auch in den andern Entwicklungsstadien, zu finden sein.

Die von STEINERT & NOVIKOFF (1960) beobachtete Pinocytose würde unserer Ansicht, es handle sich beim «Cytostom» um die Geißeltasche, nicht widersprechen. Schon mehrere Autoren haben nämlich im Geißelreservoir von Trypanosomen Pinocytose beobachten können (GRASSÉ, 1966; HERBERT, 1965; JADIN & CREEMERS, 1966; WÉRY & DE GROODT-LASSEEL, 1966).

«Undulierende Membran»

Aus der Lichtmikroskopie ist uns bekannt, daß die Geißel durch eine «undulierende Membran» mit dem Trypanosomakörper verbunden ist. Die elektronenmikroskopischen Präparate zeigen uns aber, daß keine strukturelle Verbindung besteht, die den heutigen Begriffen einer Membran entspricht. Man sollte deshalb bei elektronenmikroskopischen Beschreibungen von Trypanosomen von dieser Bezeichnung abkommen. (Anders sind die Verhältnisse z. B. bei Spermien, wo eine doppelte Membran die Geißel und die Zelle verbindet. Vgl. FAWCETT, 1961).

Wir können uns vorstellen, daß die «undulierende Membran» dadurch zustande kommt, daß beim Ausstreichen auf dem Objektträger die Geißelhülle, welche durch Adhäsion am Körper «befestigt» ist, auseinandergezogen wird.

Wie der Kontakt zwischen Geißel und Zellmembran aufrecht erhalten wird und ob dabei eine Desmosomenstruktur oder die Gitterstruktur (die allerdings in der Geißelhülle eingeschlossen ist) eine Rolle spielen, können wir nicht entscheiden.

Kinetoplast

Da der Kinetoplast mit Kernfarbstoffen gut darstellbar ist, wurde er ursprünglich als zweiter Zellkern angesehen. Durch die Feulgenfärbung und durch Markierung mit Thymidin (STEINERT et al., 1958) konnte der Gehalt an DNS bewiesen werden. Die DNS des Kinetoplasten unterscheidet sich aber in ihrer chemischen Zusammensetzung und in der Homogenität von der nucleären DNS (DU BUY et al., 1965, 1966).

Im Gegensatz zur Kern-DNS ist die Kinetoplasten-DNS in elektronenmikroskopischen Präparaten immer als eine regelmäßige, geordnete Struktur darstellbar. Die zusammenhängenden DNS-Fibrillen können in ihrer Größenordnung ($\phi \sim 100$ Å) mit den Elementarfibrillen von Chromosomen verglichen werden.

Wir haben gesehen, daß eine regelmäßige Darstellung der DNS-

Zentralstruktur im Kinetoplasten von der Fixierungstechnik abhängig ist. Nach Glutardialdehyd-OsO_4-Fixierung erscheint die DNS-Struktur in allen Entwicklungsformen aus gleichen Einheiten aufgebaut zu sein. Die unterschiedliche Wirkung der Fixierung läßt sich besonders deutlich an den Kinetoplasten der trypomastigoten Formen zeigen. Die bis heute fast ausschließlich verwendete OsO_4-Fixierung nach Palade führte zur Vorstellung, daß bei der Umwandlung in die trypomastigote Form die vorhandene DNS auf das ganze Volumen des viel größeren, kugelförmigen Kinetoplasten verteilt («aufgelockert» oder «verdünnt» werde) (Abb. 1 b, 38, 41, 42). Nach Glutardialdehyd-OsO_4-Fixierung sehen wir aber, daß der große kugelförmige Kinetoplast ebenfalls vollständig ausgefüllt ist von mehreren übereinandergeschichteten Lagen der DNS-Einheiten (Abb. 12 c, d, 45, 46).

Unsere Aufnahmen zeigen also, daß die Größe und Form des Kinetoplasten (vom Lichtmikroskop her gesehen) lediglich durch die Menge der vorhandenen DNS bestimmt wird. Mit der Vergrößerung des Volumens muß also eine Vermehrung der DNS-Struktur einhergehen.

In seinen vergleichenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen über normale Trypanosomen und Stämme mit atypischem Kinetoplasten konnte MÜHLPFORDT (1963) schon zeigen, daß der lichtmikroskopische Nachweis des Kinetoplasten von seinem DNS-Gehalt abhängt. In der Kinetoplastregion von mit Trypaflavin behandelten, «kinetoplastfreien» Trypanosomen ist wohl eine Erweiterung des Mitochondriensystems zu sehen, die DNS-haltige Zentralstruktur aber fehlt. Deshalb gelingt die Anfärbung mit den üblichen Kernfarbstoffen und damit die Darstellung des Kinetoplasten im Lichtmikroskop nicht mehr. TRAGER & RUDZINSKA (1964) kamen ebenfalls zum Schluß, daß der Verlust des Kinetoplasten bei Acriflavin-Behandlung auf einen Verlust der DNS zurückzuführen sei.

Wir haben versucht, die verschiedenen Aspekte der DNS-Zentralstruktur in Teilungsformen und in Entwicklungsstadien anhand eines Modells zu diskutieren. Die Annahme, die DNS-Fibrillen seien in parallelen Reihen angeordnet, hat den Vorteil, daß die einzelnen Doppelreihen gegeneinander verschiebbar sind, so daß sich die meisten beobachteten Kinetoplastbilder auf die gleichen Bauelemente zurückführen lassen.

Erstens lassen sich mit dem Modell die beiden beobachteten Teilungsmechanismen durch Verdoppelung und horizontale, resp. vertikale Verschiebung der DNS-Einheiten erklären. Dabei bleibt allerdings die Frage offen, weshalb zwei verschiedene Teilungsarten vorkommen. MILDER & DEANE (1967) beschreiben für *T.*

conorhini ebenfalls die zweite Teilungsfolge und schlagen vor, daß nach der horizontalen Teilung eine DNS-Reihe neben die andere wandert, so daß ein durchgehendes Band zustande kommt, welches nachher in der Mitte durchgeschnürt wird. Das erste Teilungsbild (verbreiterte, eingebuchtete Scheibe) wäre somit nur ein Stadium der horizontalen Teilung. Es scheint uns aber kaum möglich, daß die beiden DNS-Einheiten nach einem Voneinandergleiten so kontinuierlich nebeneinander zu liegen kommen (z.B. Abb. 14, 15).

Aus unserem Modell können wir zweitens ersehen, daß die Vergrößerung und Umformung des Kinetoplasten beim Übergang von der Scheiben- zur Kugelform durch Vermehrung und Übereinanderschichten mehrerer DNS-Einheiten zustande kommen kann.

Ein wesentliches Problem muß weiterhin unbeantwortet bleiben: warum ist die DNS in den einzelnen Entwicklungsformen verschieden angeordnet, beziehungsweise weshalb enthalten sie unterschiedliche Mengen von DNS? Sehr wahrscheinlich sind diese morphologischen Unterschiede ein Ausdruck von stoffwechselphysiologischen Änderungen. Vielleicht besteht ein Zusammenhang zwischen der reicheren Ausbildung der Mitochondrien-Innenstruktur (lange, dicht gelagerte Cristae) und der vermehrten Kinetoplasten-DNS bei den trypomastigoten Formen. MÜHLPFORDT (1963) konnte nämlich nachweisen, daß die DNS des Kinetoplasten nur für die Bildung der Innenstruktur der Mitochondrien verantwortlich ist, sonst aber keinen morphogenetischen Einfluß hat.

Verbindung mit Mitochondrien

In allen bisher untersuchten Flagellaten der Familie *Trypanosomatidae* (vgl. zusammenfassende Arbeit von MÜHLPFORDT, 1964) steht der Kinetoplast in Verbindung mit den schlauchförmigen Mitochondrien. Der Kinetoplast wird deshalb als ein speziell organisiertes, besonders DNS-reiches Mitochondrium angesehen. Wenn wir das Mitochondriensystem als eine zusammenhängende Einheit betrachten (STEINERT, 1964), können wir sogar sagen, daß die DNS dieses «Chondrioms» in einer ganz bestimmten Region zu einer geordneten Struktur konzentriert ist; diese Region wäre der Kinetoplast.

STEINERT & STEINERT (1962) formulierten die Hypothese, daß die Kinetoplasten-DNS die genetische Information für die Mitochondrienbildung enthalte.

In diesem Zusammenhang gewinnen vielleicht die an gewissen Kinetoplasten beobachteten Strukturveränderungen an Bedeutung. Wir haben darauf hingewiesen, daß an bestimmten Stellen — vor allem in sich teilenden Kinetoplasten — die regelmäßige DNS-

Struktur verändert ist (Abb. 17 a—c, 12 e—f). Diese Bilder erinnern an die sogenannten Puffs oder Balbiani-Ringe der polytaenen Riesenchromosomen. Dort sind Auflockerungen der Chromosomenstruktur die direkte Äußerung einer genetischen Aktivität, welche sich in einer lokalen Synthese spezifischer RNS ausdrückt. Die im Kinetoplasten beobachteten, lokal begrenzten Anhäufungen feingranulärer, amorpher Substanz könnten möglicherweise als Ausdruck einer Informationsabgabe an die Mitochondrienmatrix gedeutet werden.

Verschiedene Autoren schlagen vor, die Mitochondrien würden vom Kinetoplasten gebildet, abgeschnürt und liegen nachher frei im Cytoplasma (STEINERT, 1960; SCHULZ & MACCLURE, 1961; VICKERMAN, 1962, 1963). Wenn man aber annimmt, die gesamte DNS des Mitochondriensystems sei im Kinetoplasten konzentriert, so sind die Mitochondrien nur im Zusammenhang mit dem Kinetoplasten funktionsfähig und müssen folglich ständig mit ihm verbunden bleiben. Dies setzt weiter voraus, daß in den teilungsfähigen Stadien ständig neue Mitochondrien gebildet werden.

Um dem Problem der Mitochondrienbildung näher zu kommen, müssen wir uns deshalb auf das Studium der epimastigoten Teilungsformen konzentrieren.

Beim Vergleich der Mitochondrienverteilung in den verschiedenen epimastigoten Stadien fällt auf, daß sich in den längeren Wanzendarmformen meist ein reich verzweigtes Mitochondriensystem durch die ganze Zelle erstreckt (Abb. 1 a). In den kleineren epimastigoten Formen, vor allem in den Kulturformen, sind die Mitochondrien jedoch weniger verzweigt und oft um den Kinetoplasten konzentriert. Man kann also annehmen, daß bei den sich rasch teilenden Kulturformen jedesmal eine Neubildung vom Kinetoplasten ausgeht.

Auffällig sind nun in diesem Zusammenhang die Formen, bei denen der Kinetoplast mit knäuelförmigen Mitochondriensäckchen verbunden ist (Abb. 17, 20—23). Daß es sich bei diesen Strukturen um Mitochondrien handelt, kann aus der typischen Innenstruktur abgeleitet werden.

Ist diese besondere Form der Mitochondrien Ausdruck eines stoffwechselphysiologischen Geschehens oder sind es Stadien einer Mitochondrienbildung? Da diese Knäuel vor allem in Teilungsformen auftreten, nie aber in trypomastigoten Formen, kann man sie in Beziehung bringen zur Teilung des Kinetoplasten. Bei der oben beschriebenen zweiten Teilungsart (Aequatorialteilung) sind die übereinanderliegenden DNS-Reihen oft in ein vergrößertes Mitochondriensäckchen eingebettet (Abb. 17 a—d). In Abbildung 17 a ist zugleich noch eine Verbindung mit einem schlauchförmigen

Mitochondrium zu sehen. Man kann sich vorstellen, daß eine DNS-Einheit mit dem verzweigten Mitochondriensystem der Mutterzelle in Verbindung bleibt, währenddem die zweite Scheibe bei der Verschiebung einen Teil der Mitochondrienmembran mitnimmt (Abb. 17 e). Das Mitochondriensäckchen vergrößert sich (Abb. 21, 22) und wächst wieder zu einem neuen Mitochondriensystem aus (vgl. Fig. 5 C—F). In einer Teilungsform konnte ein Stadium gefunden werden, bei dem die beiden getrennten Kinetoplasten noch in der selben Zelle liegen (Abb. 23). Der neue Kinetoplast (Ki_2) hat schon einen größeren, noch geschlossenen Mitochondrienbogen gebildet, der ältere Kinetoplast (Ki_1) ist noch mit den verzweigten Schläuchen verbunden (diese Verbindung ist nicht in der gleichen Schnittebene zu sehen, konnte aber an einer Schnittserie bestätigt werden). Ein Querschnitt durch dieses Stadium würde einem Bild entsprechen, wie es Abb. 28 zeigt.

Bei der ersten Teilungsart (Querteilung) kann der Kinetoplast einerseits in der Mitte durchgeschnürt werden; das Mitochondriensystem wird dadurch auf die beiden Tochterzellen verteilt. Andererseits ist es denkbar, daß die DNS am Rande der Scheibe auswächst; dann ist der neue Kinetoplast ebenfalls ohne Mitochondrien (vgl. Fig. 5 B).

Der hier beschriebene Vorgang der Mitochondrienbildung (ausgehend von lamellären Strukturen oder Knäueln am Kinetoplasten) scheint auch bei anderen Gattungen der Familie *Trypanosomatidae* verbreitet zu sein. PYNE (1960) beschreibt bei *Leishmania tropica* «formations concentriques» (aus Doppelmembranen bestehende konzentrische Lamellen), welche mit Erweiterungen des Kinetoplasten oder mit Mitochondrien verbunden sein können. STEINERT (1960) beobachtete an den Kinetoplasten von *Trypanosoma mega* ebenfalls konzentrisch angeordnete Membranen und diskutierte ihre Bedeutung. PANNESE (1966) beschreibt bei Neuroblasten von Hühnerembryonen konzentrische Lamellen («membranous whorls»), welche entweder mit der Kernmembran oder mit Mitochondrien verbunden sind. Er vermutet, daß ein Zusammenhang bestehe zwischen diesen Lamellenstrukturen und der Neubildung von Mitochondrien.

VICKERMAN (1962, 1963) stellt eine Hypothese auf über den Zusammenhang zwischen Mitochondrienwachstum und Morphogenese bei den afrikanischen Trypanosomen. Anhand seiner elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Kulturformen und Blutformen von *Trypanosoma rhodesiense* postuliert er, daß der Formenwechsel im übertragenden Insekt auf Veränderungen des Stoffwechsels und den damit verbunden Änderungen des Mitochondriensystems zurückzuführen sei. Wenn die Blutform, die nur ein redu-

ziertes tubuläres vorderes Mitochondrium enthält, in den relativ sauerstoffarmen Darm der Tsetsefliege gelangt, muß eine respiratorische Anpassung an das neue Milieu erfolgen. Dies geschieht durch Auswachsen eines mit dem Kinetoplasten verbundenen hinteren Mitochondriums. Dabei wird der Kinetoplast verschoben und bewirkt eine Umwandlung der Trypanosomenform.

Wir glauben nicht, daß auch bei *T. cruzi* der Formenwechsel durch entsprechende Vorgänge erklärt werden kann. Da alle Entwicklungsformen von *T. cruzi* (Insektendarm- und Blutformen) ein mehr oder weniger ausgedehntes Mitochondriensystem besitzen, welches sich durch die ganze Zelle erstreckt, scheint eine Kinetoplastverschiebung durch einseitiges Mitochondrienwachstum nicht in Frage zu kommen.

SANABRIA (1966) geht in seiner Untersuchung über die Formen von *T. cruzi* im Rectum von *Rhodnius prolixus* nicht näher auf das Problem des Entwicklungszyklus ein. Er erwähnt indessen, die metacyclischen Trypanosomen entstehen kontinuierlich direkt aus epimastigoten Formen, indem der Kinetoplast in das hintere Körperende wandert und sich zur «posterior vacuole» umwandelt. Entsprechende Übergangsformen werden aber nicht gezeigt.

Endoplasmatisches Reticulum

Das ER ist in den verschiedenen Entwicklungsformen sehr unterschiedlich ausgebildet. Die epimastigote Form besitzt nur glatte Elemente des ER (Tubuli und verschieden große Vesikeln), die Ribosomen sind frei im Cytoplasma. Bei der trypomastigoten Blutform hingegen besteht das ER aus langen flachen Säckchen, welche dicht mit Ribosomen besetzt sind. Wir können vermuten, daß bei den trypomastigoten Formen im Wanzendarm (metacyclische Formen) und bei den sphaeromastigoten Formen der Aufbau von solchen «granulären» Membranen beginnt.

Die Beschreibungen von SANABRIA (1966) weichen in dieser Beziehung von unseren Resultaten ab. Er findet ein «rauhes» ER nicht nur in der trypomastigoten, sondern auch in der epimastigoten Form. In dieser sind manchmal granuläre cytoplasmatische Membranen konzentrisch um eine elektronendichte Masse angeordnet und bilden einen «Nebenkern». Wir haben in unseren Untersuchungen nie eine solche Struktur feststellen können.

Die Arbeit von MILDER & DEANE (1967) über *T. conorhini* deckt sich wiederum mit unseren Befunden. Die Autoren betonen, daß in den epimastigoten Formen dieser Trypanosomenart das ER relativ wenig entwickelt ist und hauptsächlich aus glatten Membranen besteht, welche verschieden große Vesikeln begrenzen.

Golgi-Komplex

Über die Funktion des Golgi-Komplexes in Protozoen ist recht wenig bekannt. Vielleicht spielt er wie bei Metazoenzellen eine Rolle bei der Sekretion oder Resorption von Stoffen.

GRIMSTONE (1959) zeigt in einer Arbeit über *Trichonympha* den Zusammenhang zwischen dem «Parabasalkörper» (= Golgi-Komplex) und dem System von granulären cytoplasmatischen Membranen. Er vermutet, daß die Säckchen des Parabasalkörpers von diesen Membranen gebildet werden. Der Golgi-Apparat ist ein dynamisches System, welches im Gleichgewicht mit dem Stoffwechsel der Zelle steht und je nach Bedarf und Aktivität der Zelle auf- oder abgebaut wird.

HERBERT (1965) untersuchte Kulturformen von *T. theileri* und *T. melophagium* und fand vor allem bei wachsenden Trypanosomen mit aktivem Stoffwechsel ein ausgedehntes Golgi-Feld, in alternden Kulturformen hingegen nicht.

Auch bei unseren verschiedenen Entwicklungsformen von *T. cruzi* ist der Golgi-Komplex auffallend unterschiedlich ausgebildet, vermutlich in Abhängigkeit vom Metabolismus der Zellen. In den Stadien aus dem Wanzendarm variiert die Zahl der Zisternen und Bläschen beträchtlich. Das Milieu unterliegt hier wahrscheinlich starken Schwankungen (Temperatur, Nährstoffgehalt, pH, O_2 respektive CO_2 conc.), so daß empfindliche Organellen wie Golgi-Komplex, cytoplasmatische Membranen und Mitochondrien ständig im Umbau begriffen sind. Im Warmblüter hingegen ist der Parasit keinen starken Milieuschwankungen ausgesetzt. Die Blutformen weisen immer einen gleichmäßig ausgebildeten, aus einer größeren Zahl von Zisternen bestehenden Golgi-Komplex auf.

In der Einführung haben wir uns gefragt, ob die Kenntnis der Ultrastruktur uns vielleicht ermöglichen wird, etwas über den Entwicklungsverlauf der verschiedenen Formen auszusagen. Zusammenfassend können wir feststellen, daß strukturelle Unterschiede vor allem im Kinetoplasten (Menge und Anordnung der DNS) und in der Ausbildung des ER (rauhe oder glatte Form) zu beobachten sind. Danach beurteilt, zeigen einige sphaeromastigote Formen Merkmale, die sie als Übergangsstadien zwischen der epimastigoten und der trypomastigoten Form kennzeichnen: kugelförmiger Kinetoplast mit mehreren Schichten DNS-Struktur, Mitochondrien mit gut entwickelter Innenstruktur, viele Ribosomen im Cytoplasma, eventuell Bildung von granulären cytoplasmatischen Membranen.

Was die Verteilung der anderen Zellorganellen betrifft, so haben unsere Untersuchungen gezeigt, daß schon innerhalb einer Entwicklungsform beträchtliche Variationen möglich sind, denn die Ausbildung vieler Organellen ist vom Milieu, vom Alter der Zellen und vom Metabolismus abhängig. Das Material, das für die elektronenmikroskopischen Präparate aus dem Wanzendarm gewonnen wird, ist in dieser Hinsicht sehr heterogen. Die relativ geringen Unterschiede zwischen den drei Formen gestatten daher keine endgültige Aussage.

Man muß sich auch immer bewußt bleiben, daß in der Elektronenmikroskopie mit fixierten Objekten gearbeitet wird. Ein dynamischer Prozeß wie die Umwandlung und Neuorganisation einer Trypanosomenzelle läßt sich nicht allein anhand fixierter Dünnschnittpräparate festlegen. Aus diesem Grund sollen nun noch einige Experimente angeführt werden, in denen die Entwicklung einzelner Formen in Einzell-Kulturen untersucht wurde.

IV. Versuche mit Einzell-Kulturen in vivo und in vitro

A. Arbeitsmethoden

1. Anordnung der Versuche

Bei der Diskussion des zweiten Kapitels dieser Arbeit sind wir zur Ansicht gekommen, daß die sphaeromastigoten Formen Übergangsstadien zur epimastigoten oder zur trypomastigoten Form sein könnten. Aus dem vorangegangenen Kapitel über die Ultrastruktur der Entwicklungsformen ist kein eindeutiger Beweis für oder gegen diese Hypothese hervorgegangen. Deshalb wollen wir nun noch versuchen, dem Problem von einer anderen Seite her etwas näher zu kommen.

In diesen Experimenten geht es darum, isolierte epimastigote, trypomastigote und sphaeromastigote Formen in Einzell-Kulturen im Wanzendarm und in hängenden Tropfen zu züchten und dort ihre weitere Entwicklung zu verfolgen. Erwartet wird im günstigsten Fall Wachstum, Vermehrung und eventuell Umwandlung bei der sphaeromastigoten und der epimastigoten Form. Die metacyclischen Trypanosomen aber, die sich nie teilen und sich im Wanzendarm auch nicht mehr verändern, dienten uns zu Kontrollbeobachtungen.

2. Isolierung einzelner Trypanosomenformen

Zum Isolieren einzelner Parasiten verwendeten wir die Bakterien-Isolationsmethode von Lederberg (nach DIETRICH, 1955).

Man überschichtet einen Objektträger mit Paraffinöl und setzt mit einer Kapillarpipette unter diese Ölschicht kleine Tröpfchen einer aus Wanzendärmen gewonnenen Trypanosomensuspension. Die Tröpfchen sind dadurch vor dem Austrocknen geschützt. Unter dem Mikroskop werden die Tröpfchen kontrolliert und diejenigen, die nur einen Erreger enthalten (epi-, trypo- oder sphaeromastigote Form) werden mit einer Mikropipette aufgenommen und anschließend in Wanzen oder in Nährlösung gebracht.

3. Infektion von Wanzen

Nymphenstadien von *Rhodnius prolixus* wurden auf den Rücken gelegt und mit einer Kapillarpipette die isolierte Trypanosomenform in einem Tropfen physiologischer Natriumcitratlösung in die Rektalampulle eingeführt (klistiert). Die Tiere wurden nachher einzeln in Glastuben gehalten. Zur Kontrolle haben wir den Wanzen nach 1, 2, 3, 4, 6 und 8 Wochen ein Tröpfchen Na-citrat in die Rektalampulle gespritzt, wieder herausgezogen und unter dem Mikroskop auf Parasiten untersucht. Wenn Tiere im Verlauf der Versuche starben, wurden sie seziert und ihr Darminhalt kontrolliert.

4. Deckglas-Einzell-Kulturen

Für diese Versuche haben wir ein flüssiges, klares Nährmedium (leicht abgeändert nach ZELEDON, 1959) verwendet, worin die Entwicklung der Trypanosomen unter dem Mikroskop verfolgt werden kann.

Nährlösung: 3,7 g Brain Heart Infusion (Difco) werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und 10 ml haemolysiertes (gefrorenes) Rinderblut zugegeben. Die Flüssigkeit wird 2—3mal aufgekocht, durch ein Papierfilter filtriert und autoklaviert (20 Min. 1,5 m^3/cm). Zur Verhütung von Verunreinigung durch Mikroorganismen wurden der Nährlösung Penicillin (300 i.E./ml) und Streptomycin (0,004 g/ml) zugesetzt.

In hängende Tropfen von 0,005 ml Nährlösung brachte man je eine isolierte Trypanosomenform. Die Kulturen wurden bei 24° C inkubiert und ein- bis zweimal täglich unter dem Mikroskop beobachtet. Kontrollkulturen zur Beurteilung des Nährmediums sind mit einer größeren Anzahl von Parasiten beimpft worden (ca. 100 bis 200 Zellen).

B. Resultate

1. Einzell-Kulturen im Wanzendarm

Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

TABELLE 1

Klistierte Trypanosomenform	Anzahl Wanzen	davon positiv
Epimastigote Form	44	0
Sphaeromastigote Form	37	1
Trypomastigote Form	23	0

In der ersten Gruppe von Versuchstieren, die mit epimastigoten Formen klistiert worden waren, konnte nie eine Vermehrung der Parasiten beobachtet werden.

Bei den mit metacyclischen trypomastigoten Formen infizierten Wanzen waren keine positiven Resultate zu erwarten. Es konnten dann auch nie Trypanosomen nachgewiesen werden.

Ein einziges positives Ergebnis war aus der dritten Gruppe zu verzeichnen. Dabei handelte es sich um eine Wanze, die mit einer sphaeromastigoten Form infiziert worden war. Nach 42 und auch nach 60 Tagen konnten in einer Probe aus dem Enddarm verschiedene Entwicklungsformen beobachtet werden: kurze und lange epimastigote sowie metacyclische trypomastigote Formen.

Daß von den 37 angesetzten Versuchen der 3. Gruppe nur einer positiv ausfiel, heißt noch nicht, daß die übrigen sphaeromastigoten Stadien nicht auch die Fähigkeit besitzen, sich zu vermehren und zu anderen Formen zu evoluieren.

Die Ursache der geringen Ausbeute muß wahrscheinlich in der Versuchsanordnung gesucht werden. Die Methode schließt verschiedene Fehlerquellen ein. Erstens bestehen viele Gelegenheiten, bei denen die isolierte Zelle beschädigt werden oder verlorengehen kann (Aufsaugen des Tröpfchens, Ausblasen der Pipette etc.). Zweitens kann es vorkommen, daß die Wanze sofort wieder die klistierten Trypanosomen mit dem Kot ausscheidet. Drittens ist die Wahrscheinlichkeit, jeweils bei der Kontrolle eines kleinen Kottröpfchens aus der Rektalampulle auf eventuell vorhandene Trypanosomen zu stoßen, sehr klein. Es ist deshalb sehr wohl möglich, daß nicht alle positiven Resultate erfaßt worden sind.

2. Einzell-Kulturen *in vitro*

Tabellen 2 und 3 geben eine Übersicht über die Resultate. Dazu wurden folgende Abkürzungen verwendet:

S	sphaeromastigote Form
Ek	kurze epimastigote Form
El	lange epimastigote Form
T	metacycl. trypomastigote Form
Tlg	Teilungsstadium
+	Form unverändert, lebend
—	Form tot

TABELLE 2

Stadium	Anzahl Kulturen	Überlebende nach n Tagen						Umwandlung od. Vermehrung in dieser Zeit
		1	2	3	4	5	6	
S	87	47	20	10	7	4	4	15*
E	72	23	3	2	0	0	0	3*

* Detailliertes Protokoll siehe Tabelle 3.

In den wenigsten Kulturen (Tröpfchen) waren während mehr als 2—3 Tagen lebende Formen festzustellen; vor allem die epimastigoten Stadien starben relativ rasch ab. In den Kontrollkulturen, die mit vielen Trypanosomen beimpft worden waren, konnten über mehrere Wochen normales Wachstum und Vermehrung der Zellen beobachtet werden[3]. Das Nährmedium scheint also nicht ungünstig zu sein. Es ist aber denkbar, daß Einzell-Kulturen von *T. cruzi* schlecht angehen, weil gewisse Stoffwechselprodukte oder Faktoren von abgestorbenen Zellen notwendig sind für ein Wachstum, und daß vor allem eine Umwandlung der Trypanosomen nur möglich ist in Gegenwart mehrerer, sich gegenseitig beeinflussender Zellen. Es ist dies eine Erscheinung, die auch bei anderen Mikroorganismen angetroffen wird (DIETRICH, 1955).

Wenn wir die positiven Resultate überblicken, können wir immerhin feststellen, daß sich vor allem die sphaeromastigoten Formen vermehrten und sich zum Teil zu epimastigoten, in einem Fall zu einer trypomastigoten Form entwickelten. In keinem einzigen Tröpfchen wurde hingegen ein Übergang von einer epimastigoten zur metacyclischen Form beobachtet. Nur in einer Kultur entstand aus einer kurzen epimastigoten eine sphaeromastigote Form (vgl. Stadium i im Schema des Entwicklungszyklus, Fig. 1).

[3] Interessanterweise ist eine Kultur noch jetzt (nach mehr als 8 Monaten) gut positiv. Die Nährlösung ist nie gewechselt worden.

TABELLE 3

Stadium	6 Std.	12 Std.	24 Std.	48 Std.	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag
S	Tlg	Tlg + S	—	—	—	—	—	—	—
S	+	Ausrollf.	—	—	—	—	—	—	—
S	+	+	Ek	—	—	—	—	—	—
S	T	+	+	—	—	—	—	—	—
S	Ek	+	—	—	—	—	—	—	—
S	Tlg	+	2 S	+	—	—	—	—	—
S	2 S	+	+	—	—	—	—	—	—
S	+	Ek	1 Ek	2 Ek	1 S	+	+	+	—
			1 El	1 El	1 El	+	+	+	—
S	+	+	Tlg	+	2 S	+	+	—	—
S	+	+	+	2 S	+	+	+	1 S	—
S	+	+	Tlg	4 S	+	3 S	+	2 S	—
						1 Ek	+	1 Ek	—
S	+	+	Tlg	2 S	+	+	—	—	—
S	+	Ek	+	+	+	+	—	—	—
S	+	Tlg	Tlg	+					
		1 S	1 S	+	+	—	—	—	—
			3 Ek	2 Ek	—	—	—	—	—
S	+	Tlg	2 S	+	+	1 S	+	—	—
Ek	Tlg	2 Ek	—	—	—	—	—	—	—
Ek	+	1 Ek	2 S	1 S	—	—	—	—	—
		1 S							
Ek	El	+	+	—	—	—	—	—	—

3. Diskussion

Von allen isolierten Entwicklungsstadien haben sich nur die sphaeromastigoten und einige wenige kurze epimastigote Formen durch Zweiteilung vermehrt. Aus den sphaeromastigoten Formen entwickelten sich oft epimastigote, je einmal im Wanzendarm und in Kultur auch metacyclische trypomastigote Formen.

Sphaeromastigote Formen können vermutlich auch durch Verkürzung aus jungen, noch differenzierungsfähigen epimastigoten Stadien entstanden sein. Insofern könnte man also von einem indirekten Übergang von epimastigoten zu trypomastigoten Formen sprechen.

Unsere Versuche zeigten weiter, daß sich einzelne Trypanosomen nicht gut züchten lassen. Solange keine besseren Methoden bekannt sind, um die isolierten Parasiten länger am Leben zu erhalten, kann auch ihre volle Entwicklungsfähigkeit noch nicht erfaßt werden.

Es muß daher einer anderen Arbeit vorbehalten bleiben, Versuche mit Einzell-Kulturen in größerem Maßstab, vielleicht mit

einer besseren Nährlösung, durchzuführen. Dabei sollten andere Faktoren, die den Formenwechsel der Trypanosomen ebenfalls beeinflussen können, mit einbezogen werden. Temperatur, pH, sowie gewisse chemische Stoffe können einen entscheidenden Einfluß auf die Morphogenese der Trypanosomen ausüben (vgl. z. B. PIZZI & CHRISTEN, 1950; DEANE & KIRCHNER, 1963; STEINERT, 1965).

V. Literaturverzeichnis

AIKAWA, M. (1966). The fine structure of the erythrocytic stages of three avian malarial parasites: *Plasmodium fallax, P. lophurae,* and *P. cathemerium.* — Amer. J. trop. Med. Hyg. *15,* 449-471

ANDERSON, W. A. & ELLIS, R. A. (1965). Ultrastructure of *Trypanosoma lewisi:* Flagellum, microtubules, and the kinetoplast. — J. Protozool. *12,* 483-499

BAKER, J. R. (1963). Speculations on the evolution of the family *Trypanosomatidae* Doflein, 1901. — Exp. Parasit. *13,* 219-233

BAKER, J. R. (1965). The evolution of parasitic protozoa. In: Evolution of parasites. Ed. A. Taylor. — Oxford: Blackwell Scientific Publications

BIRD, R. G., MOLLOY, J. O. & ORMEROD, W. E. (1966). Granules and tubules in the cytoplasm of the sleeping sickness trypanosomes, an electron microscope study. — Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. *60,* 753-760

BRUMPT, E. (1912). Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus, Cimex lectularius, Cimex boueti* et *Ornithodorus moubata.* Cycle évolutif de ce parasite. — Bull. Soc. Path. exot. *5,* 360-367

BRUMPT, E. (1914). Importance du cannibalisme et de la coprophagie chez les Réduvidés hématophages *(Rhodnius, Triatoma)* pour la conservation des trypanosomes pathogènes en dehors de l'hôte vertébré. — Bull. Soc. Path. exot. *7,* 702-705

BRUMPT, E. (1936). Précis de Parasitologie, 5e éd. — Paris: Masson et Cie, vol. 1, p. 316-322

DU BUY, H. G., MATTERN, C. F. T. & RILEY, F. L. (1965). Isolation and characterisation of DNA from kinetoplasts of *Leishmania enrietti.* — Science *147,* 754-756

DU BUY, H. G., MATTERN, C. F. T. & RILEY, F. L. (1966). Comparison of DNA's obtained from brain nuclei and mitochondria of mice and from the nuclei and kinetoplasts of *Leishmania enrietti.* — Biochim. biophys. Acta *123,* 298-305

CAMERON, T. W. M. (1965). Parasites and parasitism. — London: Methuen & Co. Ltd., p. 23 ff.

CHAGAS, C. (1909). Über eine neue Trypanosomiasis des Menschen. — Mem. Inst. Osw. Cruz *1,* 159-218

CHAGAS, C. (1911). Ein neu entdeckter Krankheitsprozeß des Menschen (Bericht über die ätiologischen und klinischen Beobachtungen). — Mem. Inst. Osw. Cruz *3,* 219-275

CHAGAS, C. (1927). Quelques aspects évolutifs de *Trypanosoma cruzi* dans l'insecte transmetteur. — C. R. Soc. Biol. *97,* 829-832

DEANE, M. P. & KIRCHNER, E. (1963). Life cycle of *Trypanosoma conorhini.* Influence of temperature and other factors on growth and morphogenesis. — J. Protozool. *10,* 391-399

DIAS, E. (1934). Estudos sôbre o *Schizotrypanum cruzi.* — Mem. Inst. Osw. Cruz *28,* 1-110

DIETRICH, F. M. (1955). Über die Einzellisolierungsmethode nach Lederberg. — Schweiz. Z. Path. *18,* 369-374

DOFLEIN, F. & REICHENOW, E. (1953). Lehrbuch der Protozoenkunde. 6. Aufl. — Jena: Gustav Fischer

ELKELES, G. (1945). Experimental studies and critical considerations regarding the life cycle of *Trypanosoma cruzi.* — Amer. J. trop. Med. *25,* 141-143

ELKELES, G. (1951). On the life cycle of *Trypanosoma cruzi.* — J. Parasit. *37,* 379-386

ELKELES, G. (1959). Über die Chagaskrankheit und das *Trypanosoma cruzi* sowie die anderen amerikanischen Trypanosomeninfektionen. — Z. Tropenmed. Parasit. *10,* 268-284

FAWCETT, D. W. (1961). Cilia and Flagella. In: The Cell, Biochemistry, Physiology, Morphology. Ed. by Jean Brachet & Alfred E. Mirsky. — New York, London: Academic Press, Vol. 2, p. 217-298

FAWCETT, D. W. (1966). An atlas of fine structure. — Philadelphia, London: W. E. Saunders Co., 448 pp.

GEIGY, R. & HERBIG, A. (1955). Erreger und Überträger tropischer Krankheiten. — Basel: Verlag für Recht und Gesellschaft AG., 472 pp. Acta trop. Supplementum 6

GIBBONS, I. R. & GRIMSTONE, A. V. (1960). On flagellar structure in certain flagellates. — J. biophys. biochem. Cytol. *7,* 697-716

GRASSÉ, P. P. (1966). Précis de biologie animale. 8e éd. — Paris: Masson et Cie., p. 16

GRIMSTONE, A. V. (1959). Cytoplasmic membranes and the nuclear membrane in the flagellate *Trichonympha.* — J. biophys. biochem. Cytol. *6,* 369-378

HERBERT, I. V. (1965). Cytoplasmic inclusions and organelles of *in vitro* cultured *Trypanosoma theileri* and *Trypanosoma melophagium.* — Exp. Parasit. *17,* 24-40

HOARE, C. A. (1948). The relationships of the haemoflagellates. — Proc. 4th Internat. Congr. trop. Med. Malaria, Washington, Vol. 2, 1110-1118

HOARE, C. A. (1957). The transmission of trypanosomes and its evolutionary significance. — Biol. Aspects transm. Dis., 95-100

HOARE, C. A. & WALLACE, F. G. (1966). Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. — Nature *212,* 1385-1386

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

KAY, D. H. (1965). Techniques for electron microscopy. 2nd ed. — Oxford: Blackwell Scientific Publications, 560 pp.

LAVERAN, A. & MESNIL, F. (1912). Trypanosomes et trypanosomiasis, 2e éd. — Paris: Masson et Cie

LÉGER, L. (1904). Sur les affinités de l'*Herpetomonas subulata* et la phylogénèse des trypanosomes. — C. R. Soc. Biol. *56,* 615-617

MAYER, M. & ROCHA-LIMA, H. DA. (1914). Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in Warmblütern und Arthropoden. — Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. *18,* 101-136

MEYER, H. & PORTER, K. R. (1954). A study of *Trypanosoma cruzi* with the electron microscope. — Parasitology *44,* 16-23

MEYER, H., OLIVEIRA MUSACCHIO, M. DE & ANDRADE MENDONÇA, I. (1958). Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* in thin sections of infected tissue cultures and blood-agar forms. — Parasitology *48,* 1-8

MEYER, H. & QUEIROGA, L. T. (1960). Submicroscopic aspects of *Schizotrypanum cruzi* in thin sections of tissue culture forms. — J. Protozool. *7,* 124-127

MILDER, R. & DEANE, M. P. (1967). Ultrastructure of *Trypanosoma conorhini* in the crithidial phase. — J. Protozool. *14,* 65-72

MUEHLPFORDT, H. (1963). Über die Bedeutung und Feinstruktur des Blepharoplasten bei parasitischen Flagellaten. — Z. Tropenmed. Parasit. *14,* 1. Teil 357-398, 2. Teil 475-501

MUEHLPFORDT, H. (1964). Über den Kinetoplasten der Flagellaten. — Z. Tropenmed. Parasit. *15,* 289-323

MUÑIZ, J. & BORRIELLO, A. (1945). Estudos sôbre a ação lítica de diferentes sôros sôbre as formas de cultura e sanguicolas do «*Schizotrypanum cruzi*». — Rev. bras. Biol. *5,* 563-567

MUÑIZ, J. & FREITAS, G. (1946). Realização in vitro do ciclo do *Schizotrypanum cruzi* no vertebrado, em meios de caldo-liquido peritoneal. — Rev. bras. Biol. *6,* 467-484

NOBLE, E. R. (1955). The morphology and life cycles of trypanosomes. — Quart. Rev. Biol. *30,* 1-28

NOVIKOFF, A. B. (1961). Mitochondria. In: The Cell, Biochemistry, Physiology, Morphology. Ed. by Jean Brachet & Alfred E. Mirsky. — New York, London: Academic Press, Vol. 2, p. 299-422

PANNESE, E. (1966). Structures possibly related to the formation of new mitochondria in spinal ganglion neuroblasts. — J. Ultrastruct. Res. *15,* 57-65

PEASE, D. C. (1962). Histological techniques for electron microscopy. — New York, London: Academic Press, 274 pp.

PITELKA, D. R. (1963). Electron microscopic structure of protozoa. — Oxford: Pergamon Press, p. 137

PIZZI, T. & CHRISTEN, R. (1950). Influencias de variaciones mantenidas de temperatura y pH en medios de cultivo de *Trypanosoma cruzi.* — Bol. Inform. parasit. chil. *5,* 5

PYNE, C. K. (1960). Etudes sur la structure inframicroscopique du cinétoplaste chez *Leishmania tropica.* — C. R. Acad. Sci. *251,* 2776

REICHENOW, E. (1934 a). Die Entwicklung des Parasitismus und die Anpassung an die parasitische Lebensweise bei Protozoen. — Med. Welt *41,* 1435-1439

REICHENOW, E. (1934 b). Beiträge zur Kenntnis der Chagas-Krankheit. — Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. *38,* 459-477, 499-518

REIMER, L. (1959). Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden. — Berlin: Springer Verlag, 300 pp.

ROMAÑA, C. & MEYER, H. (1942). Estudos do ciclo do *Schizotrypanum cruzi* em cultura de tecidos de embrião de galinha. — Mem. Inst. Osw. Cruz *37,* 19-27

SANABRIA, A. (1963). Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* in mouse myocardium. I. Trypanosome form. — Exp. Parasit. *14,* 81-91

SANABRIA, A. (1964). Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* in mouse myocardium. II. Crithidial and leishmanial forms. — Exp. Parasit. *15,* 125-137

SANABRIA, A. (1966). Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* in the rectum of *Rhodnius prolixus.* — Exp. Parasit. *19,* 276-299

SCHULZ, H. & MACCLURE, E. (1961). Elektronenmikroskopische Untersuchungen des *Trypanosoma cruzi* mit besonderer Berücksichtigung des Periplasten und des Blepharoplasten. — Z. Zellforsch. *55,* 389-412

SILVA, L. H. P. DA. (1959). Observaçôes sôbre o ciclo do *Trypanosoma cruzi.* — Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo *1,* 99-118

SILVA, L. H. P. DA & NUSSENZWEIG, V. (1953). Sôbre uma cêpa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. — Folia clin. biol. (S. Paulo) *20,* 191-207

STEINERT, M. (1960). Mitochondria associated with the kinetonucleus of *Trypanosoma mega.* — J. biophys. biochem. Cytol. *8,* 542-546

STEINERT, M. (1964). Le chondriome de *Trypanosoma mega*. Observations *in vivo* et par la réaction cytochimique de la NADH-diaphorase. — J. Cell Biol. *20*, 92-97

STEINERT, M. (1965). Morphogenesis versus division in *Trypanosoma mega*. — J. Protozool. *12*, 291-292

STEINERT, M., FIRKET, H. & STEINERT, G. (1958). Synthèse d'acide désoxyribonucléique dans le corps parabasal de *Trypanosoma mega*. — Exp. Cell Res. *15*, 632-635

STEINERT, M. & NOVIKOFF, A. B. (1960). The existence of a cytostome and the occurrence of pinocytosis in the trypanosome, *T. mega*. — J. biophys. biochem. Cytol. *8*, 563-569

STEINERT, M. & STEINERT, G. (1962). La synthèse de l'acide désoxyribonucléique au cours du cycle de division de *Trypanosoma mega*. — J. Protozool. *9*, 203-211

TRAGER, W. & RUDZINSKA, M. A. (1964). The riboflavin requirement and the effects of acriflavin on the fine structure of the kinetoplast of *Leishmania tarentolae*. — J. Protozool. *11*, 133-145

VICKERMAN, K. (1962). The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *Trypanosoma brucei* sub-group: a hypothesis based on ultrastructural observations. — Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. *56*, 487-495

VICKERMAN, K. (1963). The role of mitochondria in some protozoan life cycles. — Proc. Linn. Soc. Lond. *174*, 46-49

WÉRY, M. & GROODT-LASSEEL, M. DE. (1966). Ultrastructure de *Trypanosoma cruzi* en culture sur milieu semi-synthétique. — Ann. Soc. belge Méd. trop. *46*, 337-348

WOOD, S. F. (1951). Development of Arizona *Trypanosoma cruzi* in mouse muscle. — Amer. J. trop. Med. *31*, 1-11

ZELEDON, R. (1959). Differentiation of *Trypanosoma rangeli* and *Schizotrypanum cruzi* in a liquid medium, with notes on the nutrition of haemoflagellates. — J. Parasit. *45*, 652

Résumé

1° Dans le présent travail, nous avons étudié le cycle évolutif et la morphogénèse des différentes formes du *Trypanosoma cruzi G* dans son vecteur *Rhodnius prolixus*.

En étudiant, à l'aide de frottis colorés, le développement du parasite dans le tube digestif de l'insecte, nous avons trouvé régulièrement à côté des formes épimastigotes et trypomastigotes, des formes rondes, pourvues d'un flagelle. Nous proposons de nommer f o r m e s p h a e r o m a s t i g o t e ce stade évolutif.

2° Il est possible que deux cycles parallèles se déroulent dans l'intestin de la punaise. Les formes sphaeromastigotes, dont l'importance est primordiale, peuvent probablement devenir, soit des formes épimastigotes, soit des formes trypomastigotes.

L'auteur soutient l'hypothèse que la forme épimastigote ne représente pas le stade précédant la forme métacyclique.

3° Nous avons examiné, au microscope électronique, les coupes minces des différentes formes évolutives isolées de l'intestin de réduvidés. On décrit la structure fine de ces formes et nos résultats sont comparés avec ceux d'autres auteurs.

4° Quelques détails de la morphologie et de la division du kinétoplaste ont retenu particulièrement notre attention. A l'aide d'un modèle, l'auteur discute la structure centrale du kinétoplaste qui est régulière et riche en ADN. Dans

toutes les formes évolutives, cette structure est composée de fibrilles d'ADN, lesquelles sont disposées en rangées parallèles. Lors du cycle évolutif du parasite, le kinétoplaste change de forme et de volume. Il semble que ces changements ont leur origine dans une augmentation de l'ADN qui, dans les kinétoplastes trypomastigotes, est arrangée en plusieurs couches superposées.

On tente d'expliquer les deux modes de division observés, c'est-à-dire les divisions transversale et équatoriale. Les préparations de formes en division ont permis d'étudier la formation des mitochondries. Celles-ci évoluent à partir du kinétoplaste.

5o Dans la troisième partie de ce travail, nous avons essayé de suivre, en microscope optique, l'évolution des formes épimastigotes, trypomastigotes et sphaeromastigotes, isolées en monocultures ou injectées par voie rectale à des punaises. Il faut souligner que *T. cruzi* se maintient mal en monocultures. Les quelques résultats positifs enregistrés nous permettent cependant de confirmer la possibilité de deux modes d'évolution des formes sphaeromastigotes : évolution directe en forme trypomastigote métacyclique et formation de stade épimastigote.

Summary

1. The first part of this work is dedicated to the examination of the life cycle and the morphogenesis of the developmental stages of *Trypanosoma cruzi G* in its vector *Rhodnius prolixus*.

The evolution of the parasites has been studied in stained preparations made from the guts of infected insects. Apart from epimastigote and trypomastigote stages, there was always observed a varying number of rounded forms with a flagellum. The term s p h a e r o m a s t i g o t e is suggested in order to characterize this stage.

2. The possible existence of two parallel cycles in the insect is discussed. It seems likely that the spaeromastigote stages develop either into metacyclic trypanosomes or into epimastigote stages. If this assumption is correct, the sphaeromastigotes play a decisive part in the parasite's life cycle in the vector.

The present results seem to support the hypothesis of other authors that the epimastigote stages do not give rise to metacyclic trypanosomes.

3. In the second part of this study the ultrastructure of the three developmental stages of *T. cruzi* isolated from the vector has been examined with the electron microscope.

4. The author was particularly interested in problems concerning the kinetoplast morphology and its division.

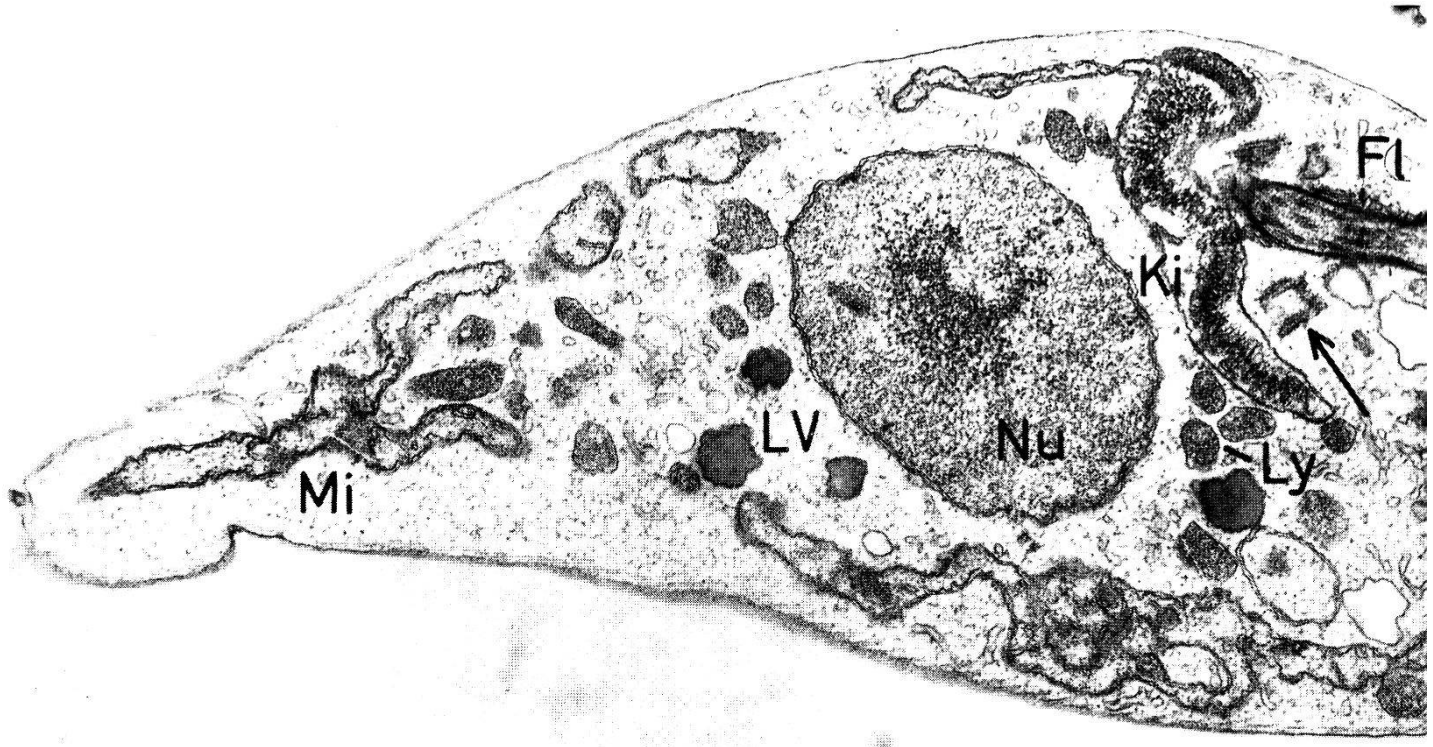
In all developmental stages the DNA-containing central structure of the kinetoplast is arranged in regular patterns. The DNA-fibrils are arranged in parallel rows of continuous loops. The variations of size and shape of the kinetoplast during the developmental cycle of the parasite are thought to be due to the varying amount of DNA present, as well as to the arrangement of the DNA-loops in one layer (epimastigote stage) or in 3–4 layers (trypomastigote stage) respectively.

As to the kinetoplast division, two different types have been observed: transverse and equatorial division. The relations between the kinetoplast division and the formation of new mitochondria are discussed.

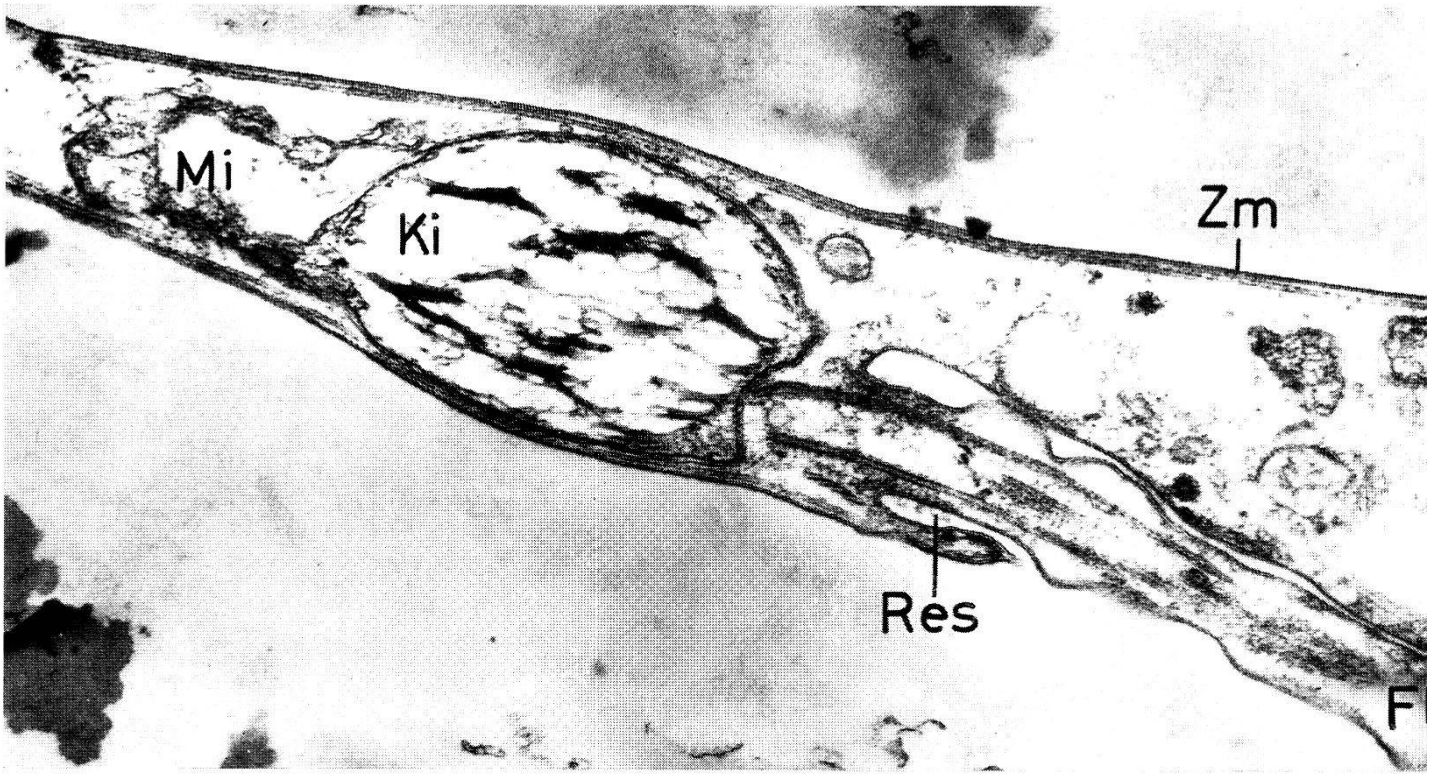
5. In the third part of these investigations it was attempted to follow the evolution of isolated epimastigotes, trypomastigotes, and sphaeromastigotes in monocell-cultures *in vitro* and *in vivo* (rectal infection of bugs). It was difficult to maintain the stages alive for a sufficiently long time. A few positive results, however, confirm the two possibilities of differentiation by the sphaeromastigote stage, either to metacyclic trypanosomes, or to epimastigotes.

Liste der Abkürzungen zu den Bildern

Bk	Basalkörper
Bp	Basalplatte der zentralen Geißelfibrillen
Cr	Cristae mitochondriales
ER	Endoplastisches Reticulum
Fl	Flagellum
Go	Golgi-Komplex
Ki	Kinetoplast
LV	Lipidvakuole
Ly	Lysosomen
Mi	Mitochondrium
NP	Kernporen
Nu	Nucleus
Pe	Periplastfibrillen
Res	Geißelreservoir
Ri	Ribosomen
SV	Sekretvakuole
Zm	Zellmembran



1a



1b

Abb. 1a. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Längsschnitt durch Teilungsform: Der Kinetoplast (Ki) ist verbreitert, der zweite Basalkörper wird gebildet (➔). Ein verzweigtes Mitochondriensytem durchzieht die ganze Zelle (Mi). Dichtes Netz von glatten cytoplasmatischen Membranen (Tubuli und Bläschen des ER). Zelleinschlüsse: «Lysosomen» und Lipidvakuolen (LV). Fix. OsO_4. Vergrößerung 27 000 ×.

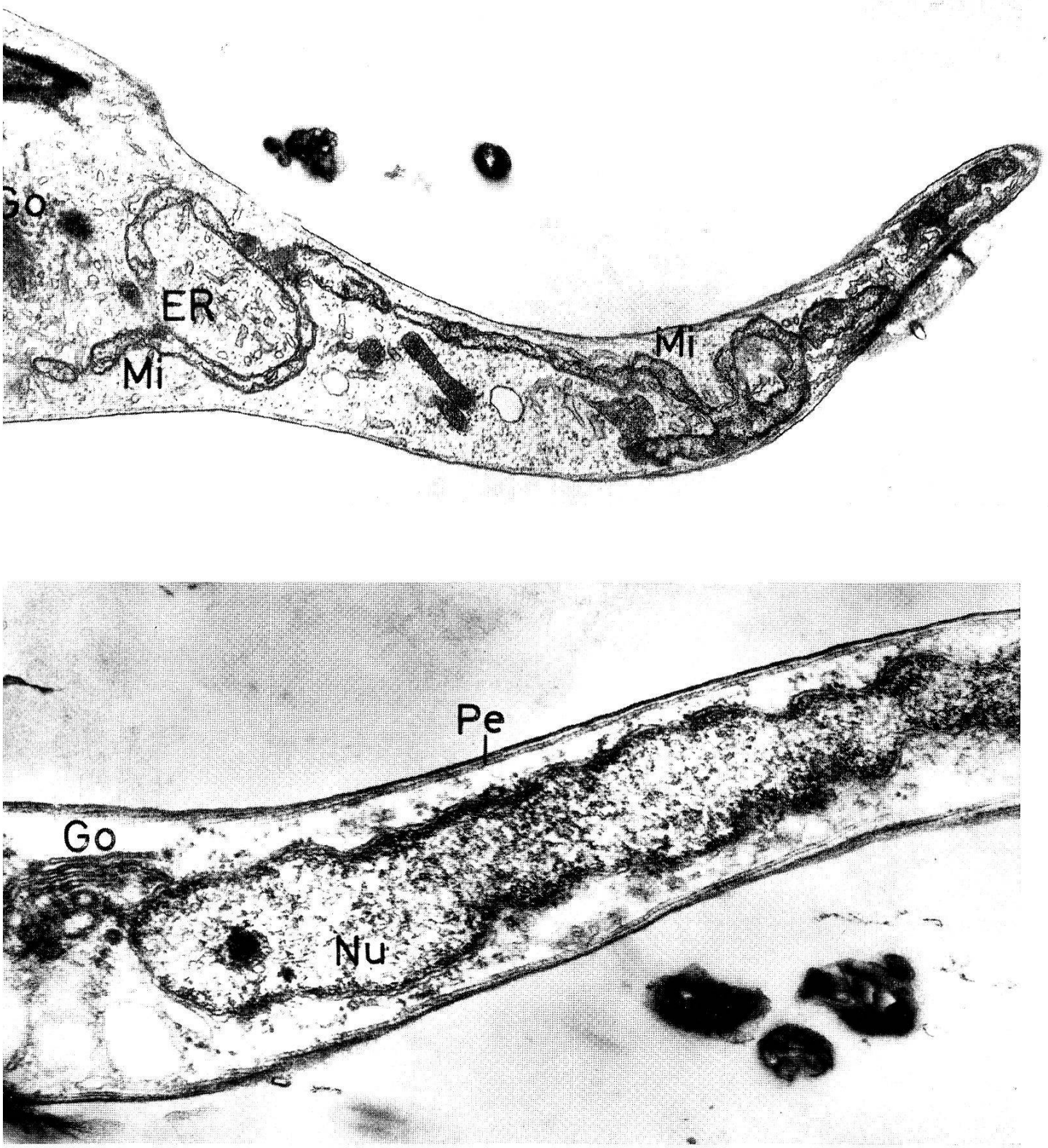
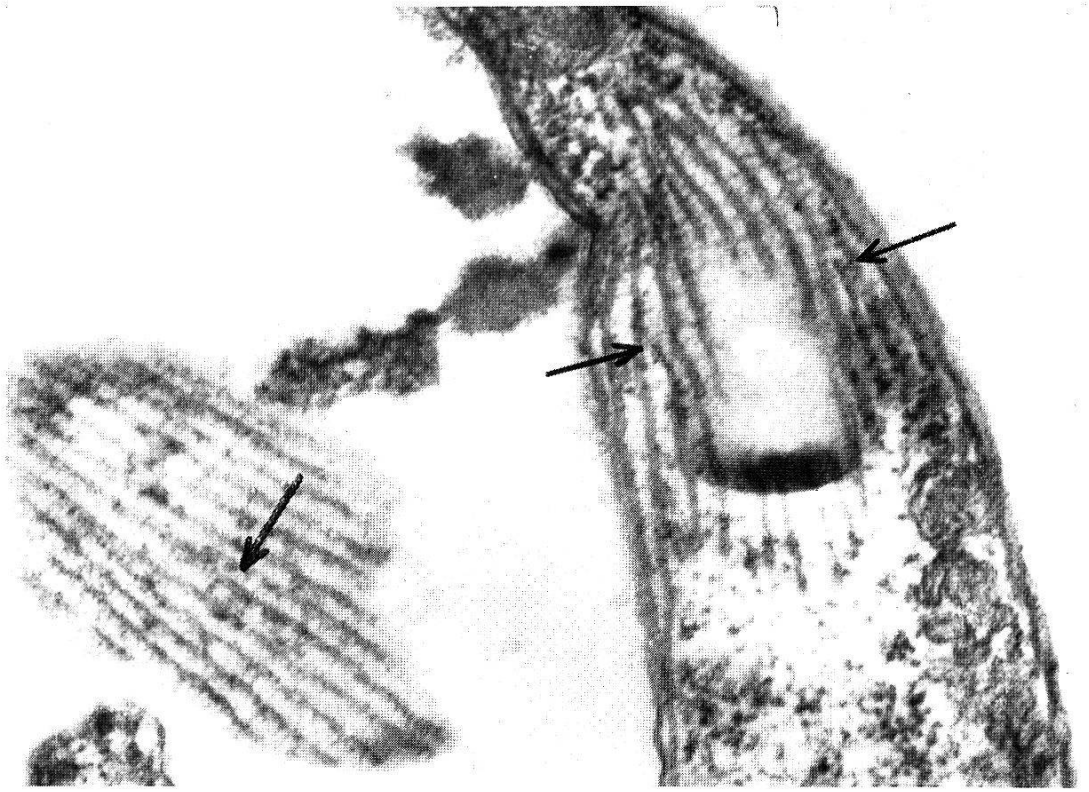
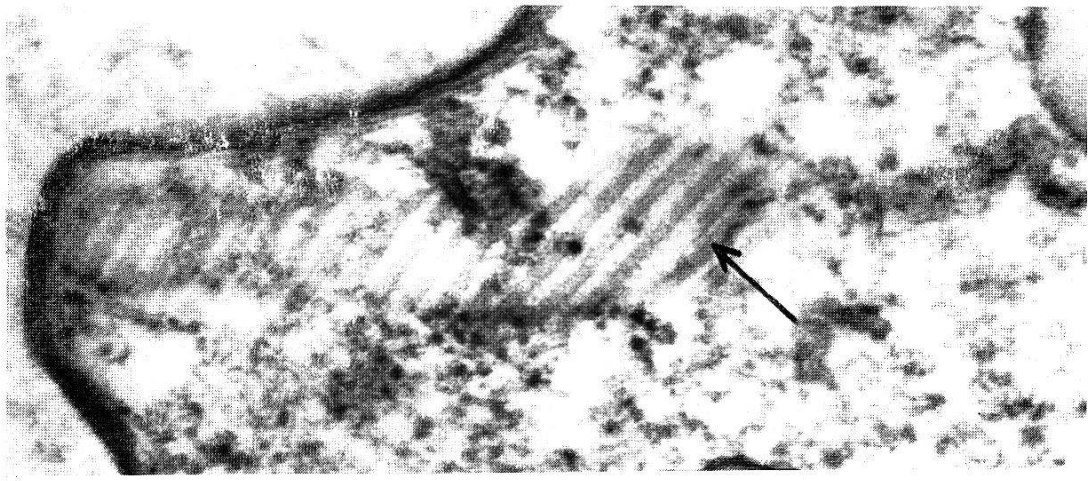


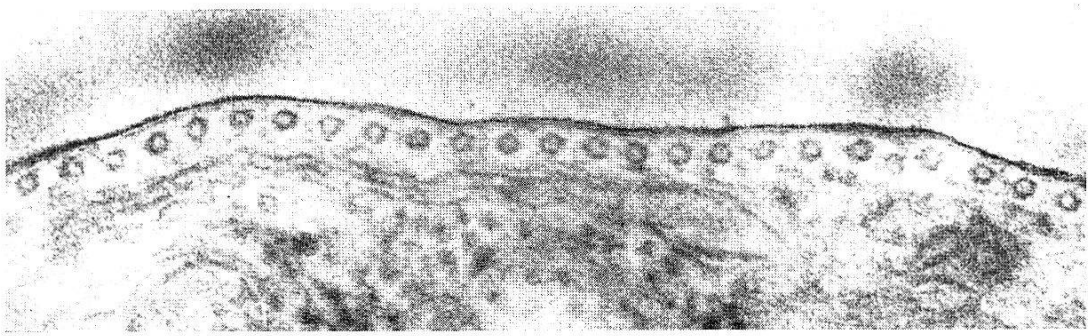
Abb. 1b. **Trypomastigote Form** (Enddarm). Längsschnitt durch ganze Zelle: Der kugelförmige Kinetoplast liegt im hinteren Körperende, die DNS-Zentralstruktur scheint nach der OsO_4-Fixierung «aufgelockert». Verbindung mit tubulären Mitochondrien; Cristae mitochondriales auch an der Innenmembran des Kinetoplasten. Langgestreckter Zellkern (Nu), daneben Golgi-Komplex (Go). Periplast-Tubuli verlaufen längs parallel der Zellmembran (Pe). Fix. OsO_4. Vergrößerung 50 000 ×.



2a



2b



3

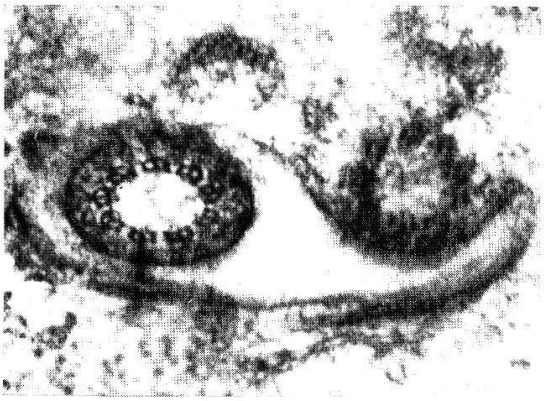
Abb. 2a. **Trypomastigote Form** (Enddarm). Tangentialschnitt an der Zelloberfläche: die einzelnen Periplast-Tubuli beginnen ohne Verzweigung (➛). Fix. OsO_4. Vergrößerung 63 000 ×.

Abb. 2b. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Periplast-Tubuli im Tangentialschnitt. Einzelne Tubuli werden eingelagert (➛). Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 63 000 ×.

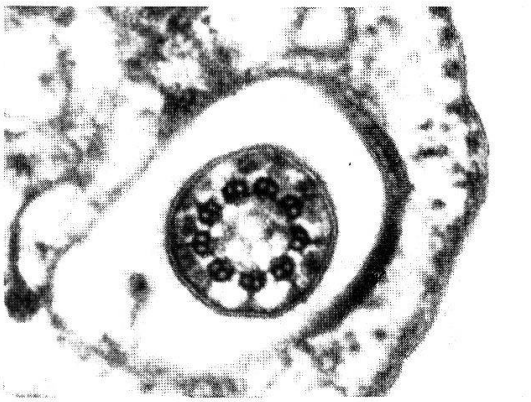
Abb. 3. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Querschnitt: Zellmembran = Pellikula («unit membrane»). Ungefähr 100 Å darunter liegen in regelmäßigen Abständen von ca. 300 Å die Periplast-Tubuli. Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 100 000 ×.

4 d

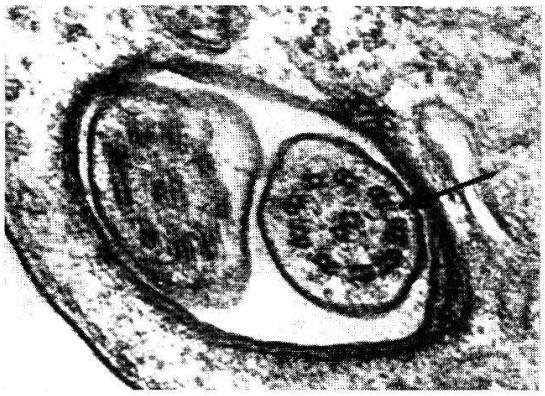
4a



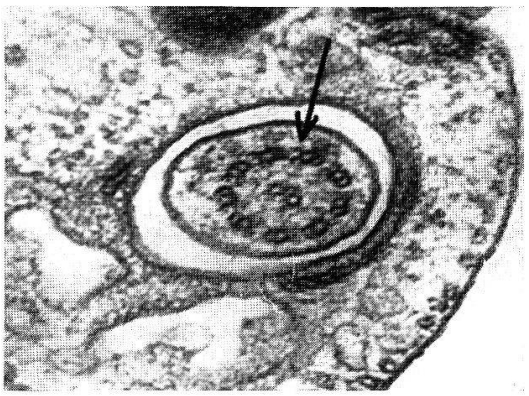
4e



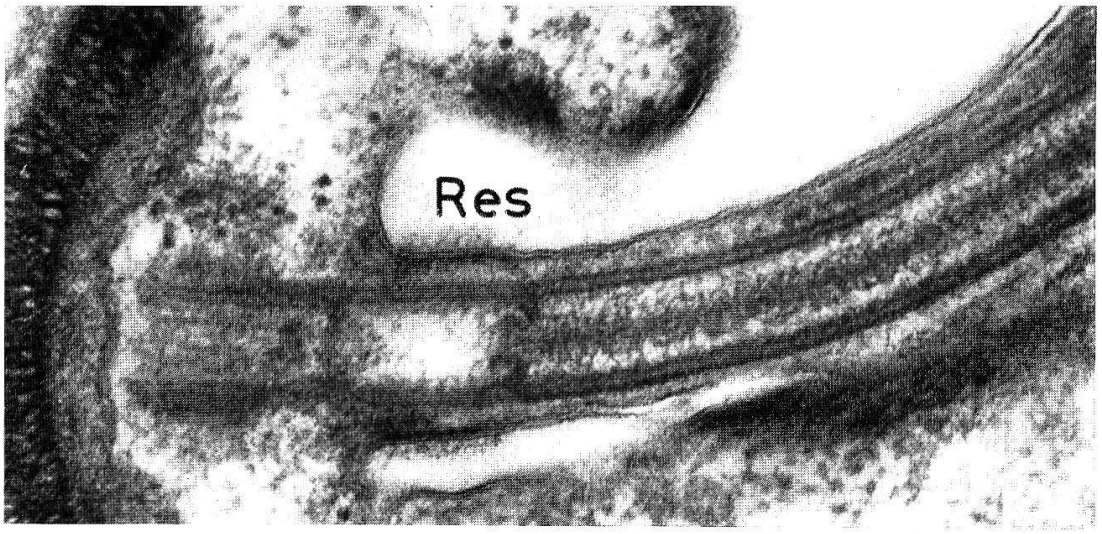
4b



4 f



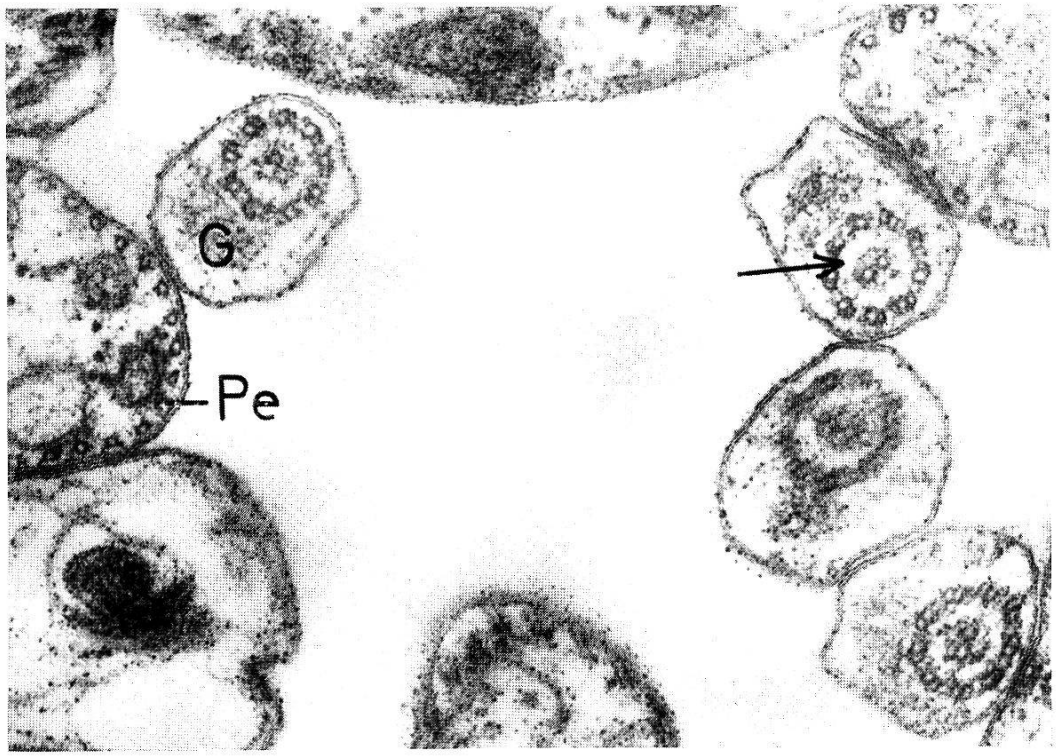
4c



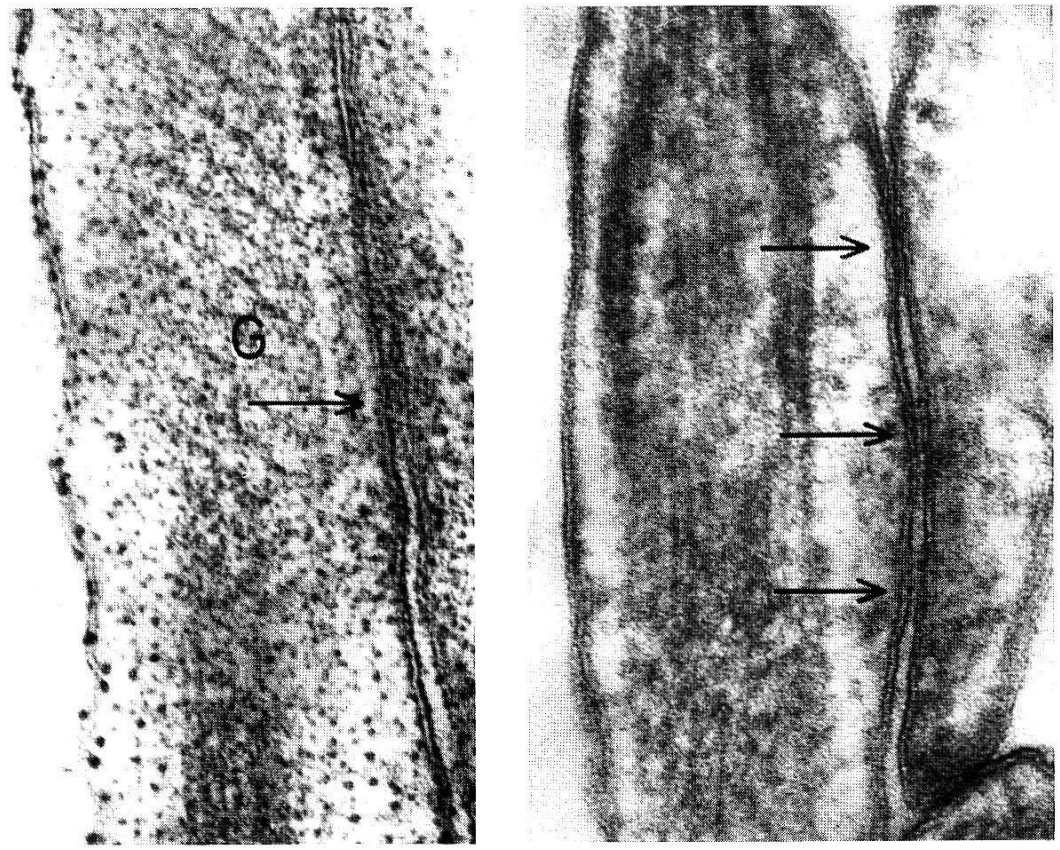
5

Abb. 4. Querschnitte durch den Basalkörper einer Geißel (a, b, c), beziehungsweise einer Teilungsform mit zwei Geißeln (d, e, f). Die dreifachen peripheren Fibrillen («triplets») enden frei im Cytoplasma (a, d). Die peripheren Fibrillen sind doppelt, umgeben von der Geißelhüllmembran im Reservoir (b, e). Querschnitte durch Geißeln im Reservoir: neun äußere Doppelfibrillen (z. T. mit «arms» ➤) und ein Paar zentrale Fibrillen (c, f). Fix. OsO_4. Vergrößerung 72 000 ×.

Abb. 5. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Medianer Längsschnitt durch den Basalkörper und das Flagellum im Geißelreservoir (Res.). Fix. Glut + OsO_4. Vergrößerung 72 000 ×.



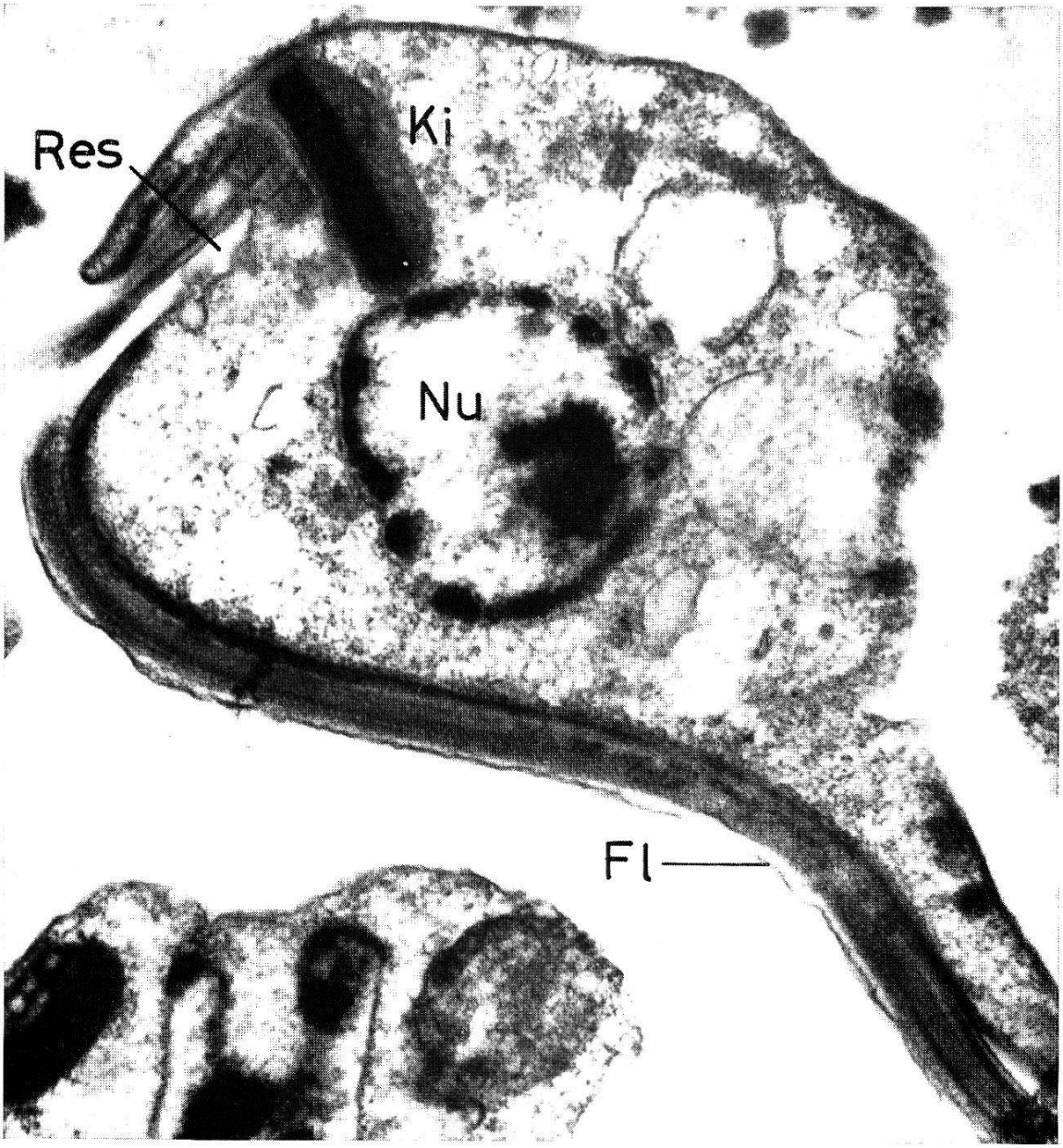
6



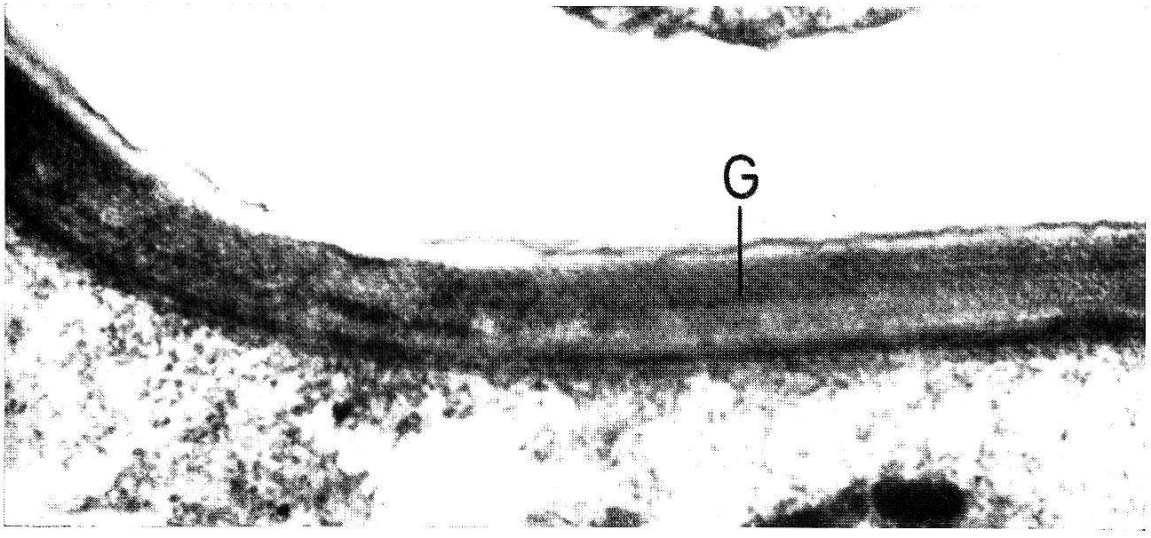
7a 7b

Abb. 6. Querschnitte durch freie Geißeln. Die zentralen Fibrillen sind in eine el-dichte Substanz eingebettet (➛). Neben den peripheren Fibrillen befindet sich ebenfalls eine el-dichte Substanz (G) = «intra-flagellar structure». Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 67 000 ×.

Abb. 7a, b. Längsschnitte durch Flagellum. Innerhalb der Hüllmembran (= Fortsetzung der Pellikula) bildet die el-dichte Substanz ein Gitter (G). Zwischen Zellmembran und Geißelhüllmembran an Kontaktstellen eine feingranuläre Substanz (➛). Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 140 000 ×.



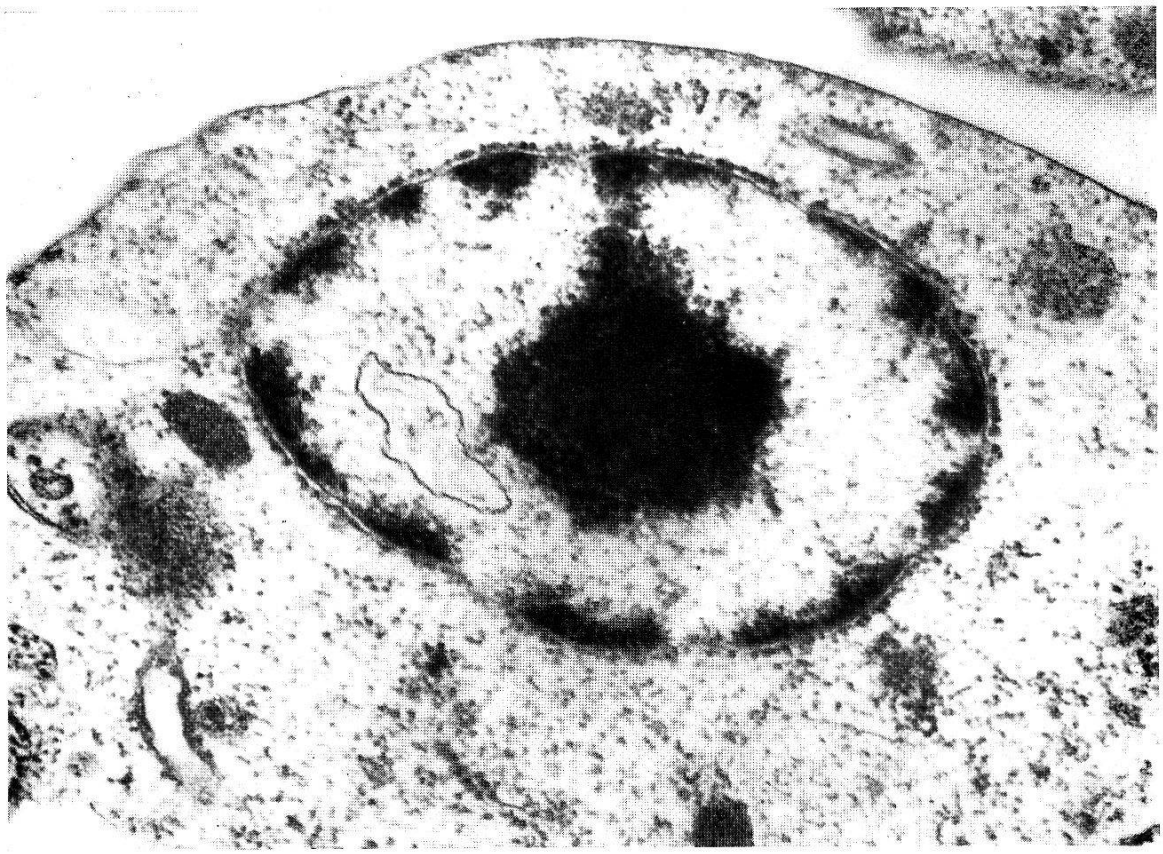
8



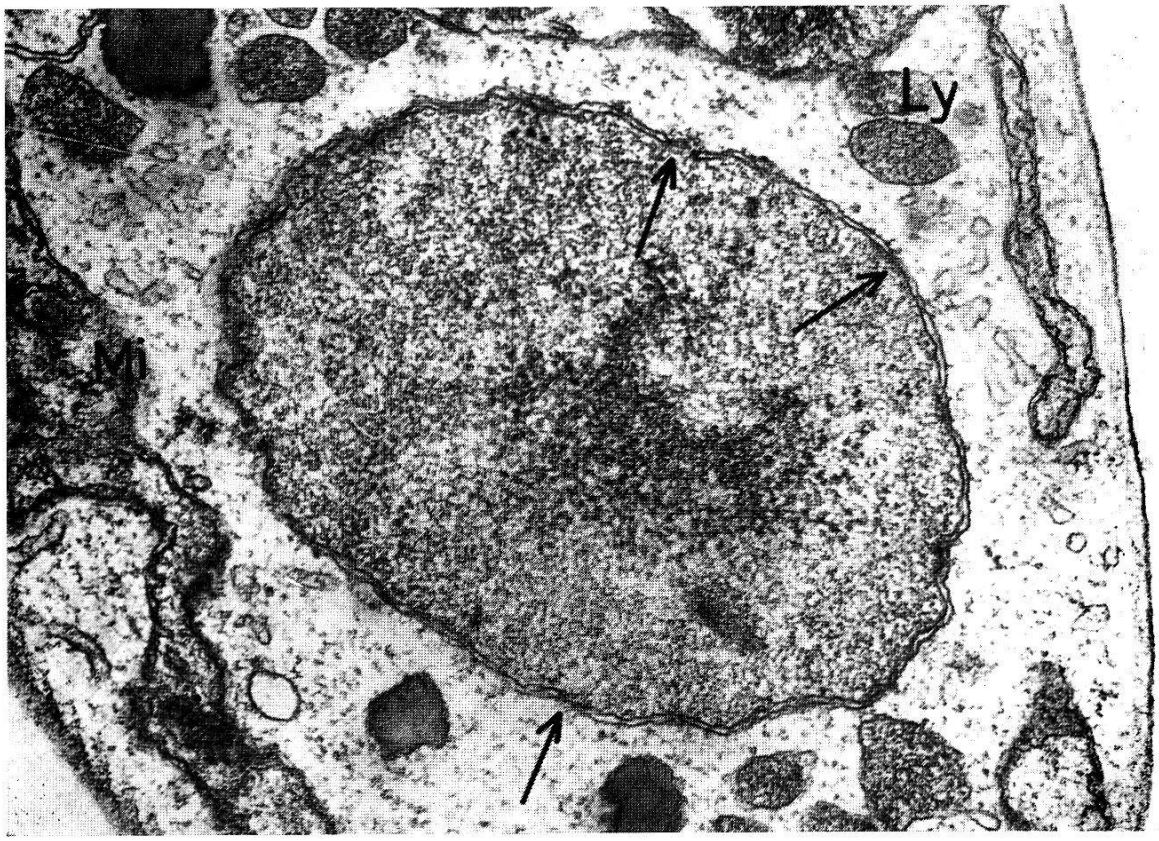
8a

Abb. 8. **Sphaeromastigote Form** (Enddarm). Das Flagellum (Fl) umwindet den Zellkörper, verläuft aber gerade. Kinetoplast scheibenförmig, verbreitert sich zur Teilung. Fix. Glut + OsO_4. Vergrößerung 28 000 ×.

Abb. 8a. Ausschnittvergrößerung aus Abb. 8. Gitterstruktur (G). Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 48 000 ×.



9

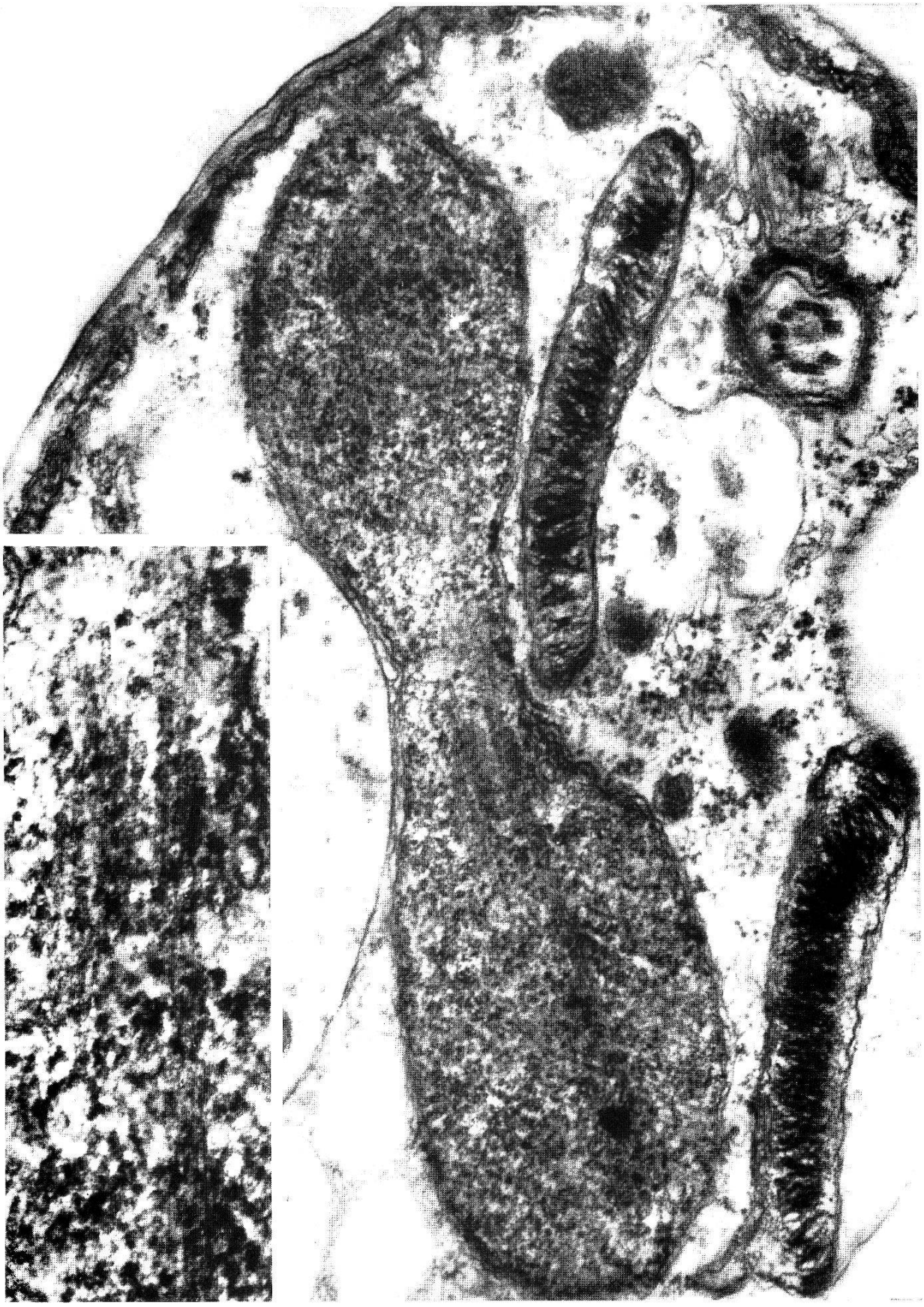


10

Abb. 9. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Zellkern nach Fixierung mit Glutardialdehyd + OsO_4. Das Heterochromatin ist um den Nucleolus und an der Peripherie angeordnet. Die äußere Kernmembran ist mit Ribosomen besetzt. Vergrößerung 45 000 ×.

Abb. 10. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Zellkern nach Fixierung mit nur OsO_4. Das Nucleoplasma erscheint homogen. Kernporen (➤). Vergrößerung 45 000 ×.

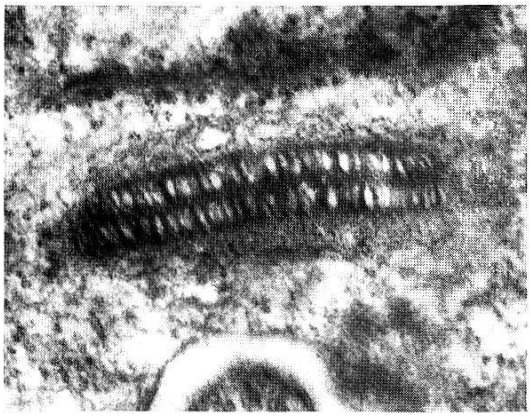
11

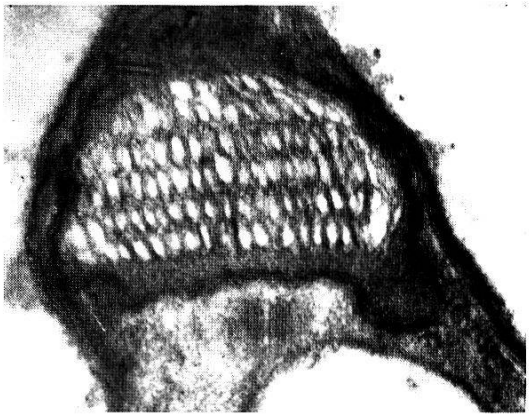


11a

Abb. 11. **Epimastigote Form** (Enddarm). Teilungsstadium: Kinetoplasten schon getrennt; Zellkern in Teilung, Kernmembranen bleiben bestehen. Mikrotubuli verbinden die beiden Kernhälften (= Spindelfasern?). Fix. OsO_4. Vergrößerung 54 000 × (Ausschnitt a 120 000 ×).

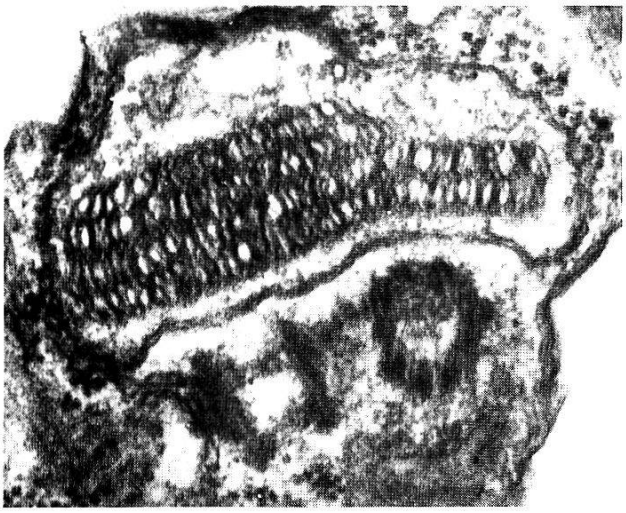
12a

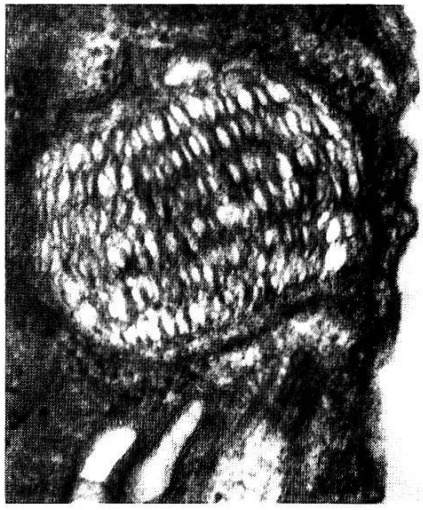




12c

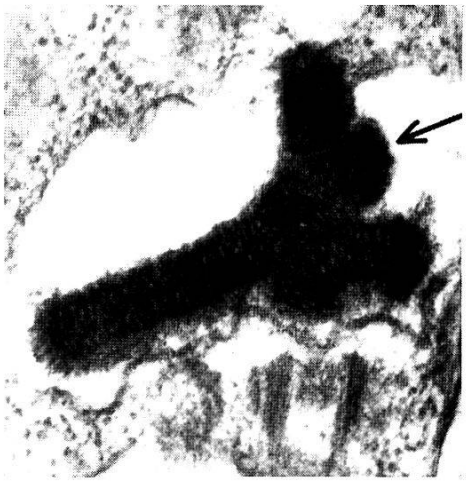
12b





12d

12e

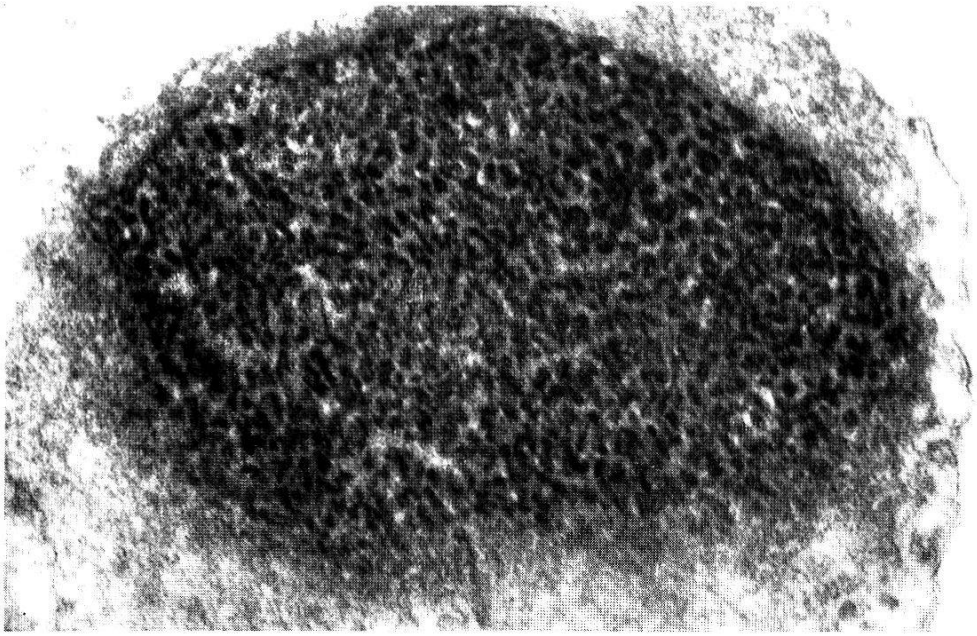


12f

Abb. 12a–d. Anordnung der DNS-Zentralstruktur im Kinetoplasten. **Epimastigote Form:** eine Doppelreihe (a); bei der aequatorialen Teilung liegen zwei Doppelreihen parallel übereinander (b). **Trypomastigote Form:** in Blutform (c) und metacyclischer Form (d) sind je drei Doppelreihen übereinandergeschichtet.

Abb. 12e, f. **Epimastigote Form** (Kultur). Aequatoriale Teilung des Kinetoplasten. Die regelmäßige, geordnete DNS-Struktur ist an bestimmten Stellen unterbrochen (➛) Anhäufung einer feingranulären Substanz. Fix. Glut. + OsO_4 Vergrößerung 40 000 ×.

13



14

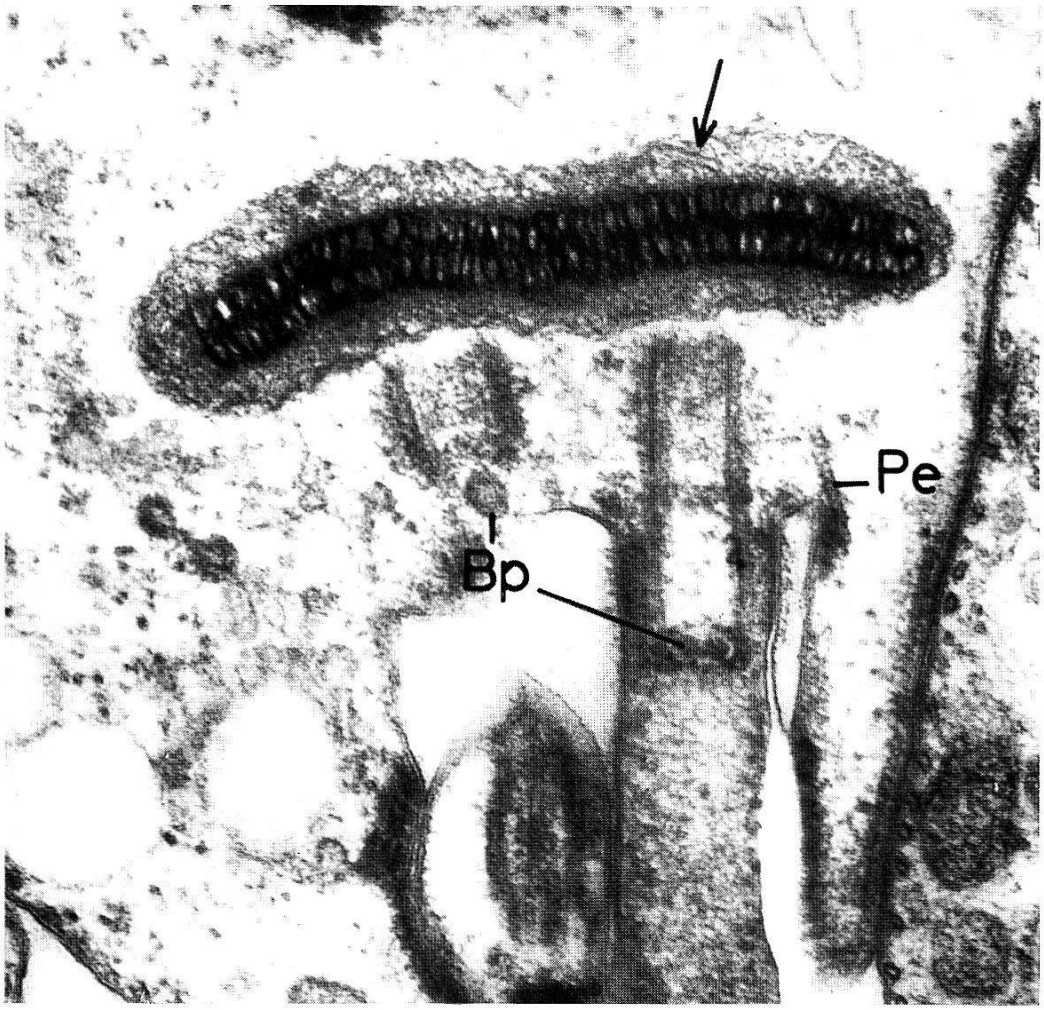
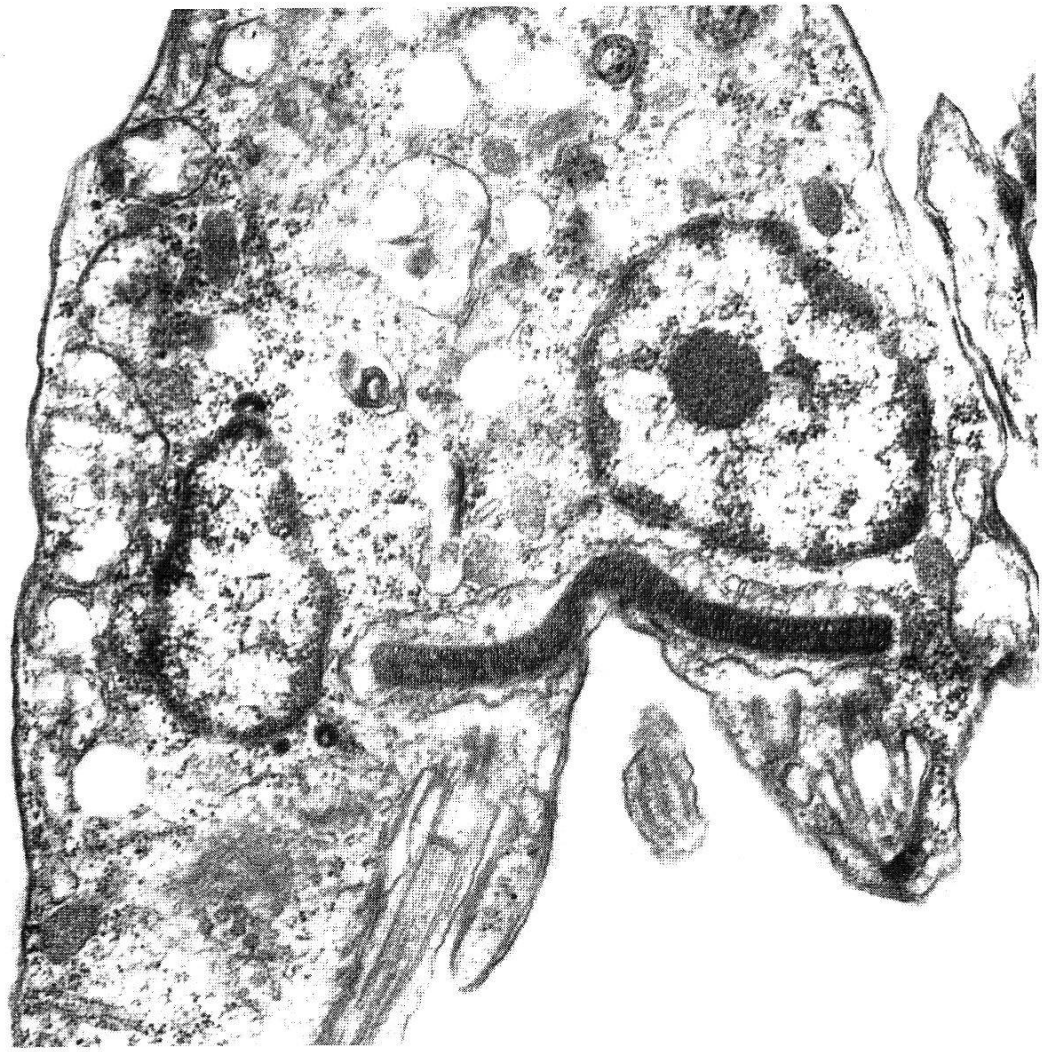


Abb. 13. **Epimastigote Form** (Kultur). Horizontalschnitt durch Kinetoplast, DNS-Fibrillen sind quergeschnitten. Mehrere Fibrillen zusammengelagert können eine tubuläre Struktur vortäuschen. Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 80 000 ×.

Abb. 14. **Epimastigote Form** (Kultur). Querteilung des Kinetoplasten. Die Scheibe ist verbreitert, die DNS-Zentralstruktur ist kontinuierlich, eingelagert in eine amorphe Matrix (Cristae mitochondriales →). Die zweite Geißel wird gebildet. Bp = Basalplatte der zentralen Geißelfibrillen. Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 63 000 ×.

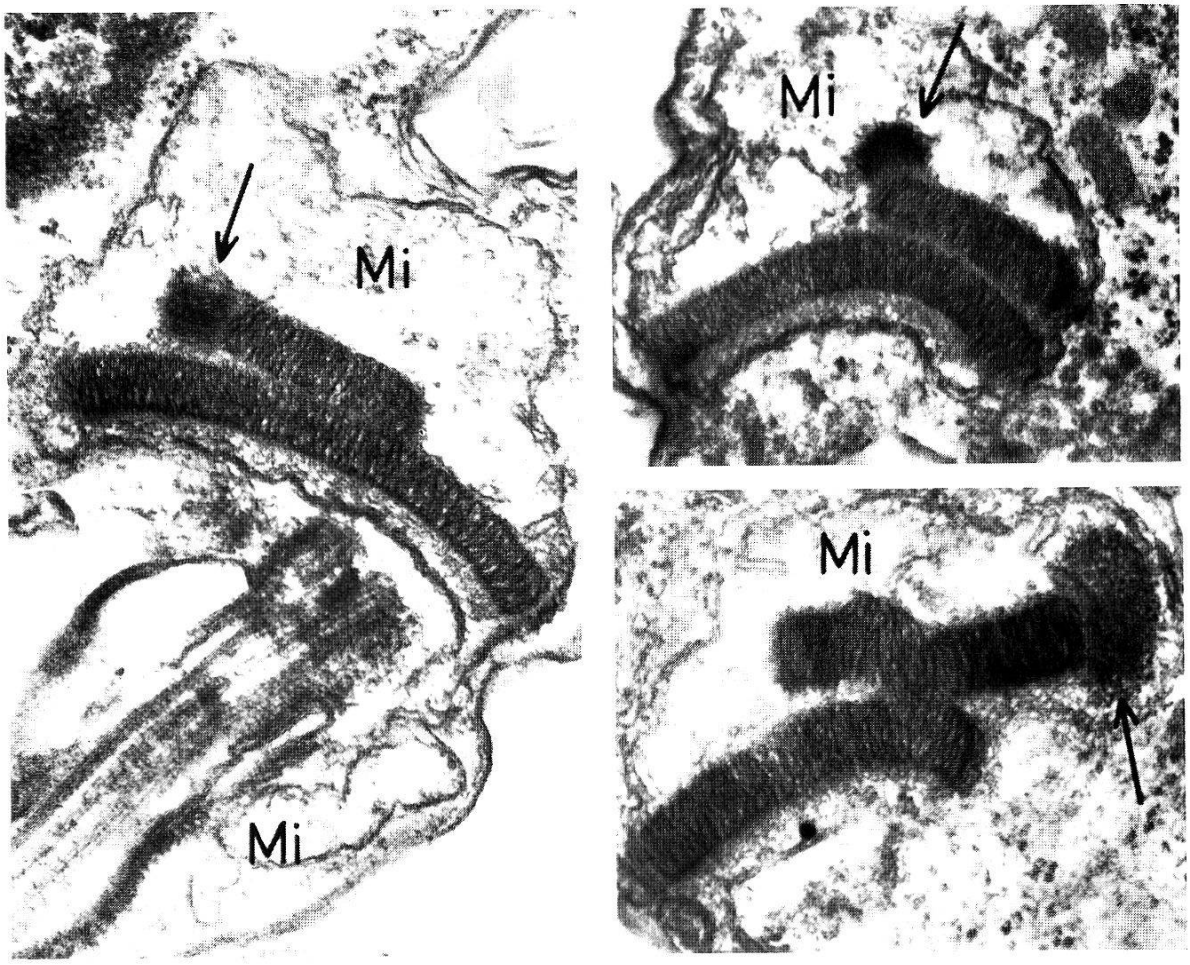
15



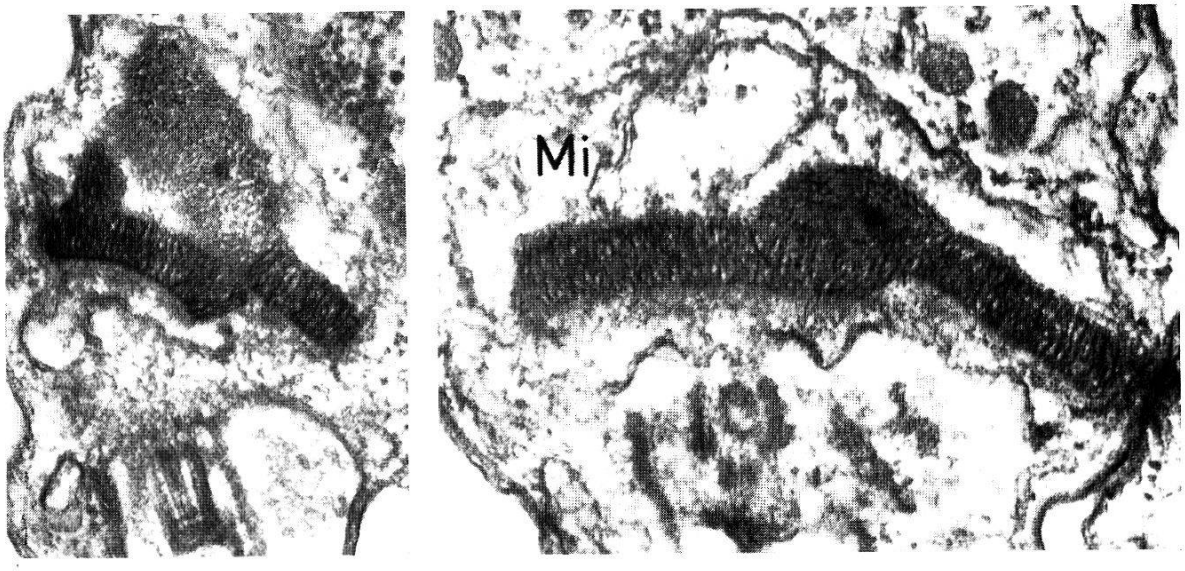
16

Abb. 15. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Teilungsform mit drei Basalkörpern. Der Kinetoplast ist verbreitert, die DNS-Struktur durchgehend. Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 40 000 ×.

Abb. 16. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Teilungsform mit zwei Zellkernen; die Kinetoplasten sind noch verbunden, kurz vor der Durchschnürung quer zur Längsachse. Im Cytoplasma sind zahlreiche Ribosomen zu Polysomen gruppiert. Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 28 000 ×.

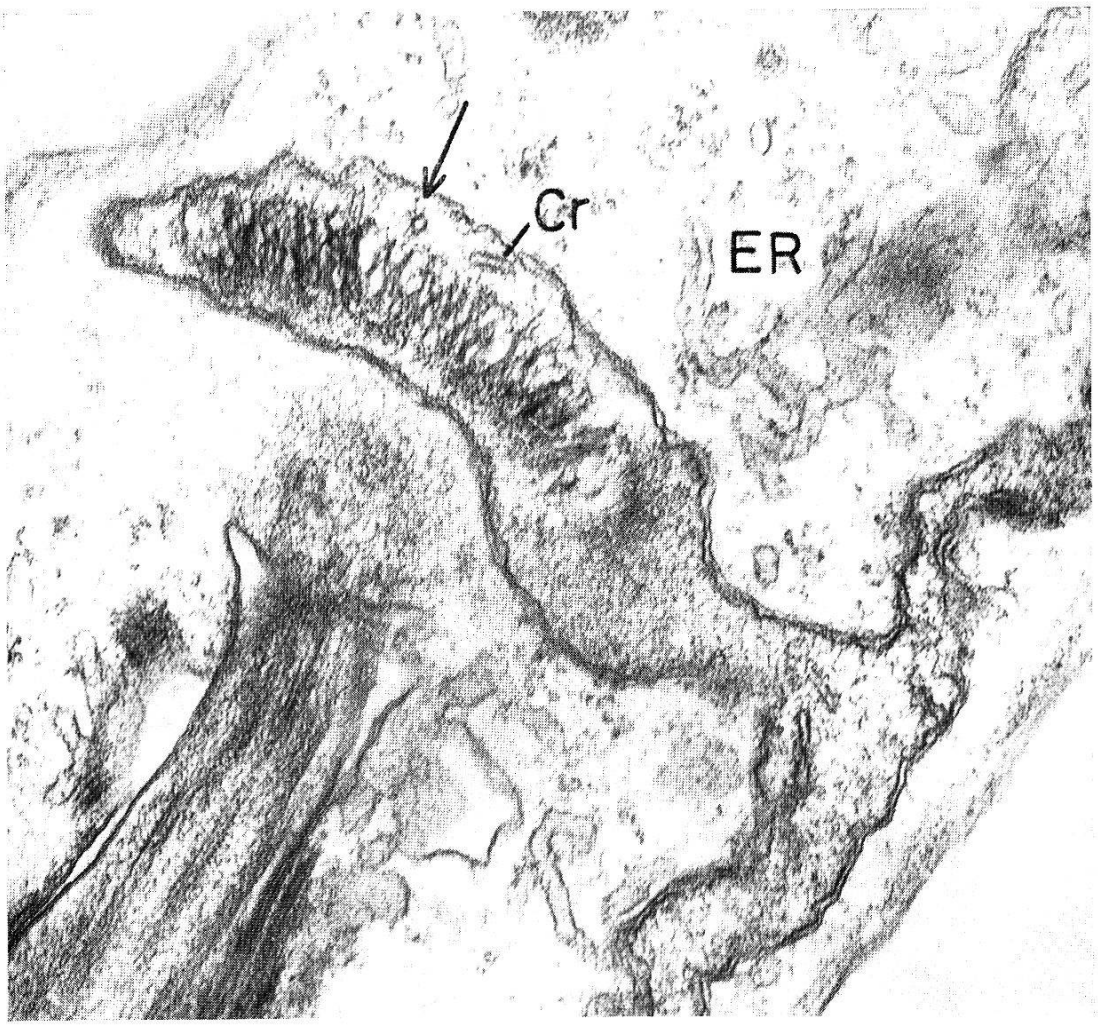


17a 17b 17c



17d 17e

Abb. 17. **Epimastigote Formen** (Kultur). Aequatoriale Teilung des Kinetoplasten (parallel zur Längsachse). Über der ersten DNS-Doppelreihe wird parallel liegend, eine zweite gebildet (a), welche sich seitwärts verlagert (b) und am Rande der Scheibe neben den ersten Kinetoplasten gleitet (c, d, e). Beide Kinetoplasten liegen in einer Erweiterung des Mitochondriensystems (Mi). Anhäufung einer feingranulären Substanz am Rande der DNS-Scheibe (➤). Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 40 000 ×.

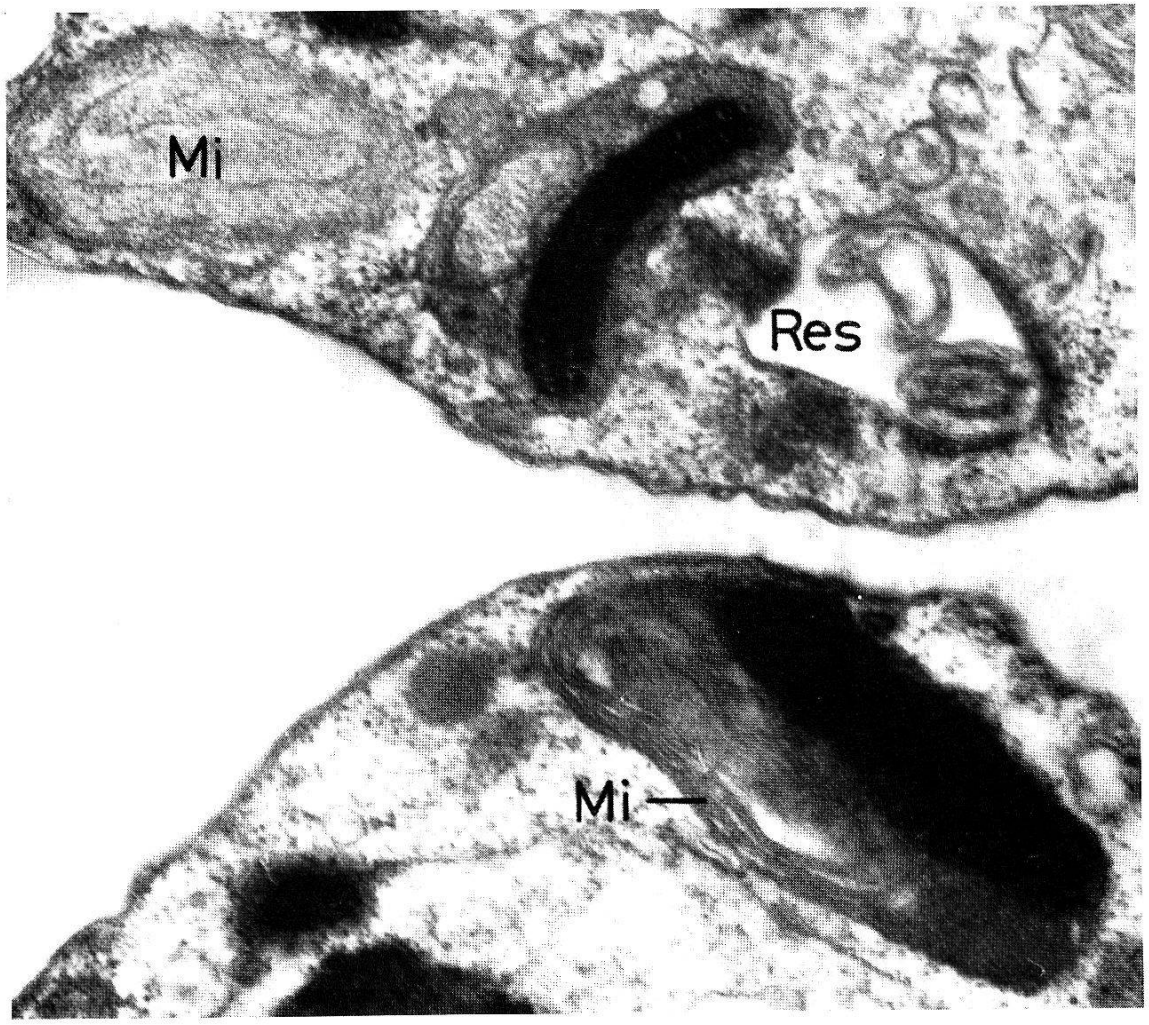


18

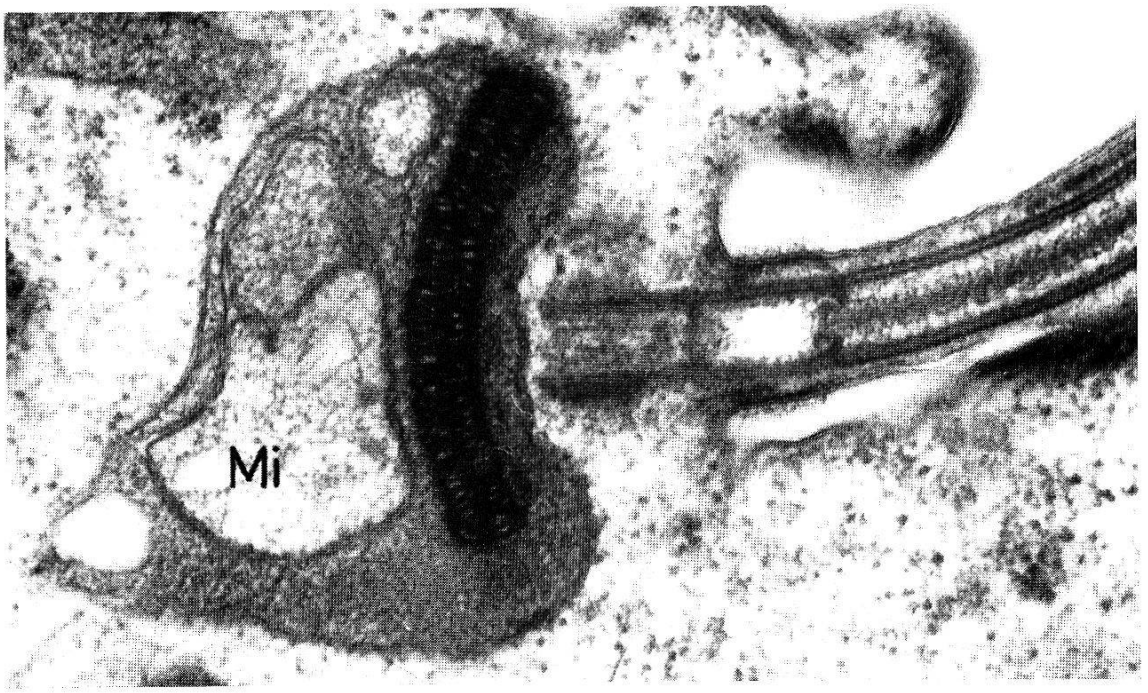
19

Abb. 18. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Kinetoplast verbunden mit Mitochondrienschlauch. Cristae (Cr) und Tubuli (➤) mitochondriales. Verzweigte Tubuli des glatten ER. Fix. OsO_4. Vergrößerung 60 000 ×.

Abb. 19. **Epimastigote Form** (Enddarm). Vakuole begrenzt von «unit membrane» gefüllt mit kleinen Bläschen. Verzweigtes Mitochondrium verbunden mit dem Kinetoplasten. Fix. OsO_4. Vergrößerung 60 000 ×.



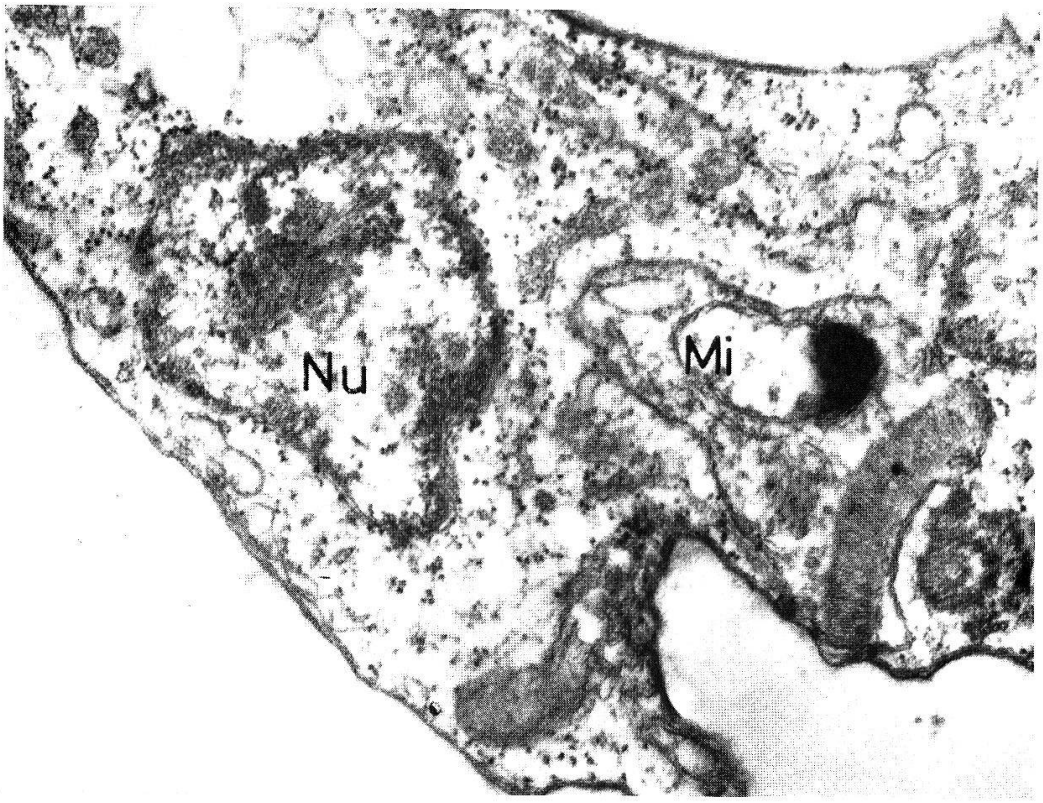
20



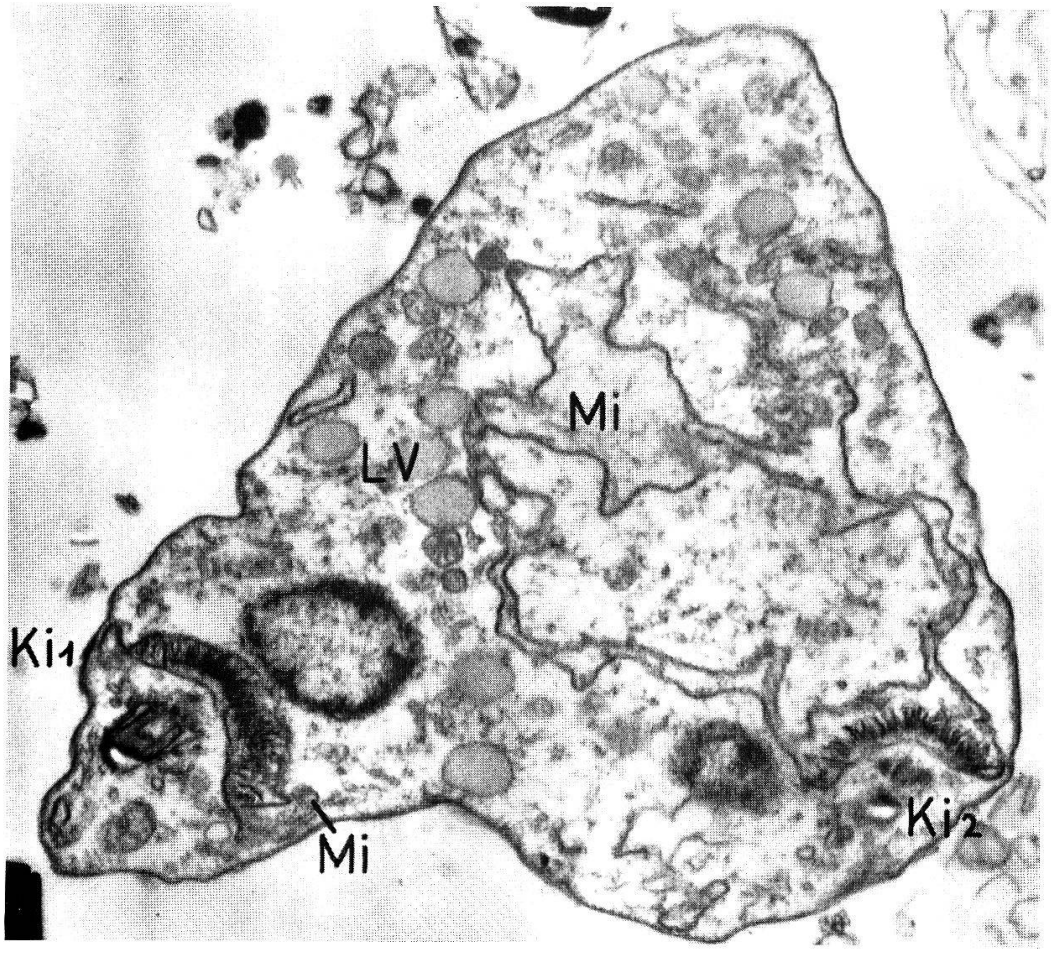
21

Abb. 20. **Epimastigote Form** (Kultur). Der Kinetoplast ist verbunden mit lamellären oder knäuelförmigen Mitochondriensäckchen (Mi). Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 42 000 ×.

Abb. 21. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Kinetoplast mit auswachsendem Mitochondriensäckchen. Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 54 000 ×.



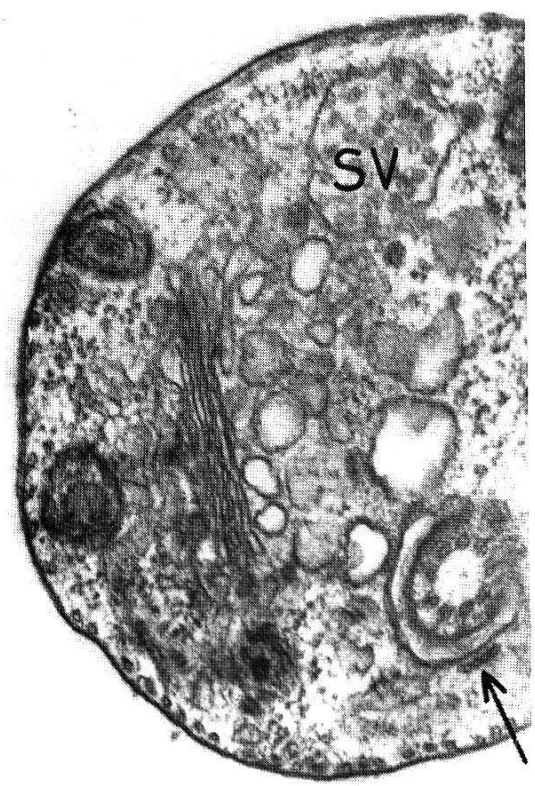
22



23

Abb. 22. **Epimastigote Form** (Enddarm). Teilungsform: ein Kinetoplast mit auswachsendem Mitochondriensäckchen (Mi.). Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 33 000 ×

Abb. 23. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Teilungsform mit zwei Kernen und zwei getrennten Kinetoplasten (Ki 1 und Ki 2). Der neugebildete Kinetoplast (Ki 2) hat bereits ein größeres, noch geschlossenes Mitochondriensystem gebildet. Der alte Kinetoplast (Ki 1) steht in Verbindung mit Mitochondrienschläuchen (nicht in Schnittebene). Im älteren Teil der Zelle sind zahlreiche Einschlüsse. Fix. OsO_4. Vergrößerung 16 000 ×.



24

25

26

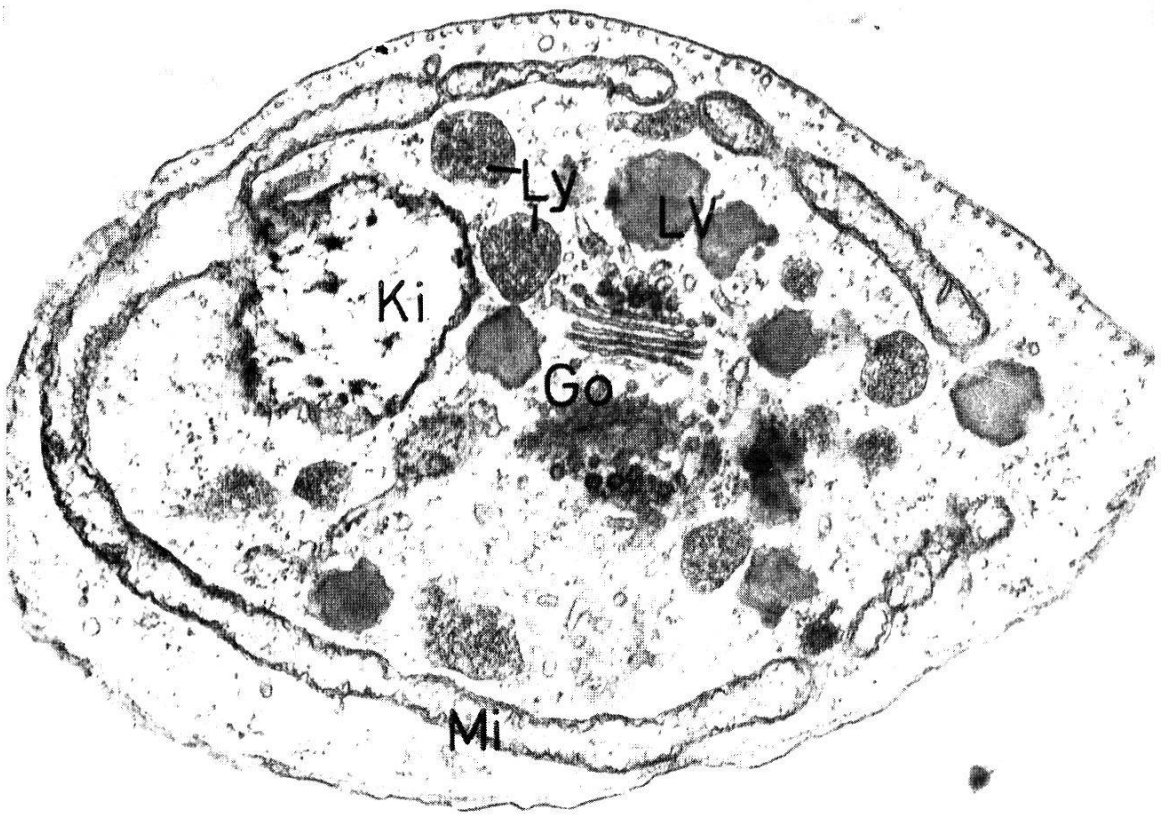
27

Abb. 24. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Querschnitt: Golgi-Komplex bestehend aus flachen Säckchen (Zisternen) und Bläschen (Vesikeln). Daneben eine Vakuole mit Sekrettröpfchen (SV). Querschnitt durch den Basalkörper im Geißelreservoir, daneben die vier Periplast-Tubuli (➔). Fix. OsO_4. Vergrößerung 40 000 ×.

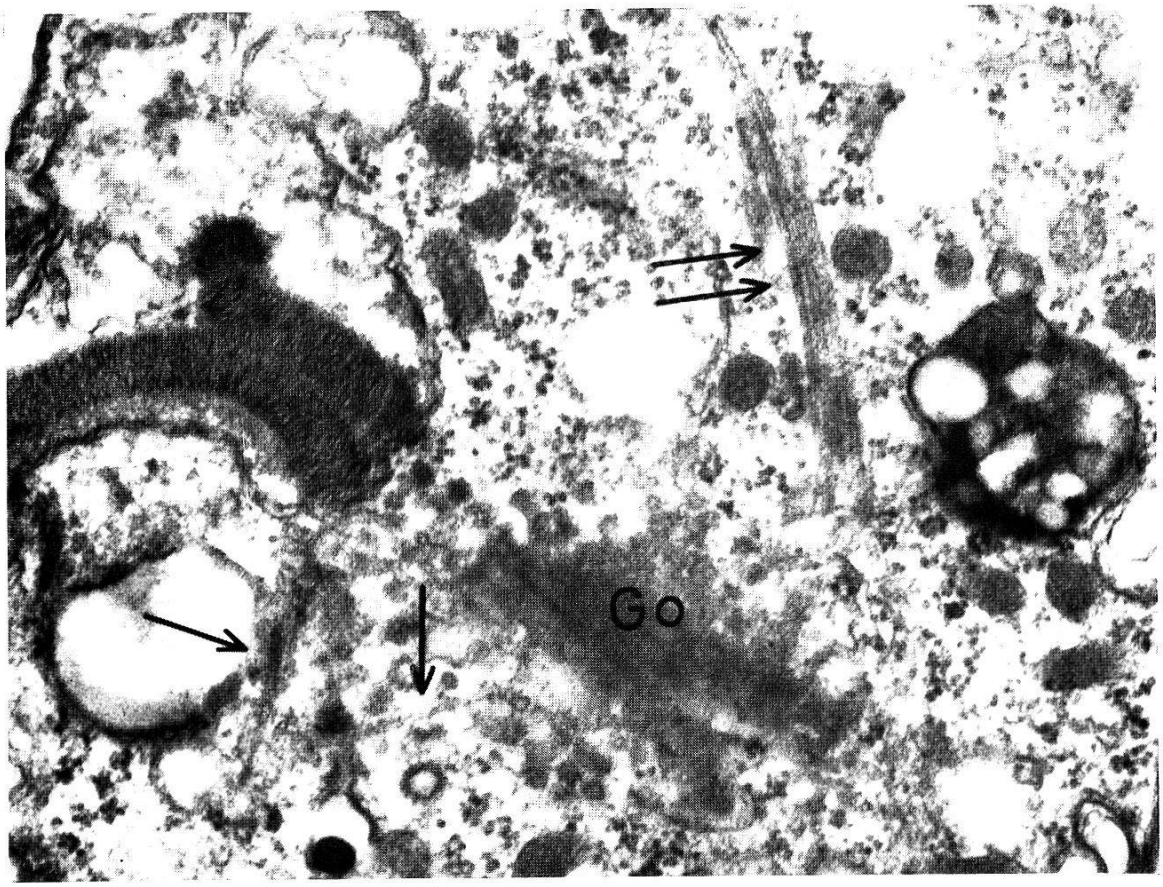
Abb. 25. **Epimastigote Form** (Enddarm). Golgi-Komplex: von den Zisternen abgeschnürte Bläschen vereinigen sich zu Sekretvakuolen (SV). Fix. OsO_4. Vergrößerung 40 000 ×.

Abb. 26. **Epimastigote Form** (Enddarm). Teilungsform mit sehr langen Golgi-Zisternen. Viele Polysomen. Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 40 000 ×.

Abb. 27. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Teilungsform mit zwei Golgi-Feldern (entstanden durch Teilung der Zisternen?). Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 40 000 ×.



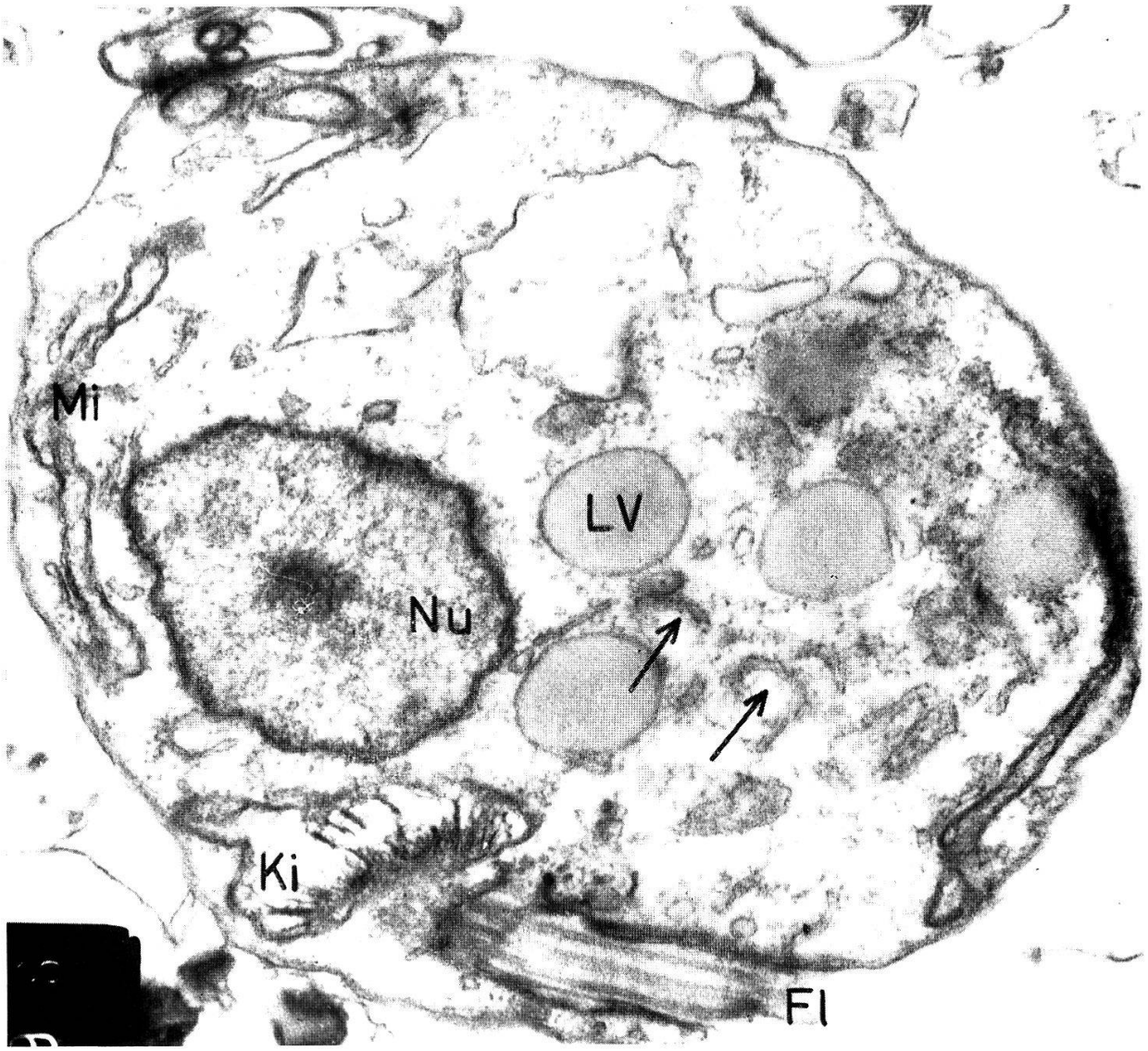
28



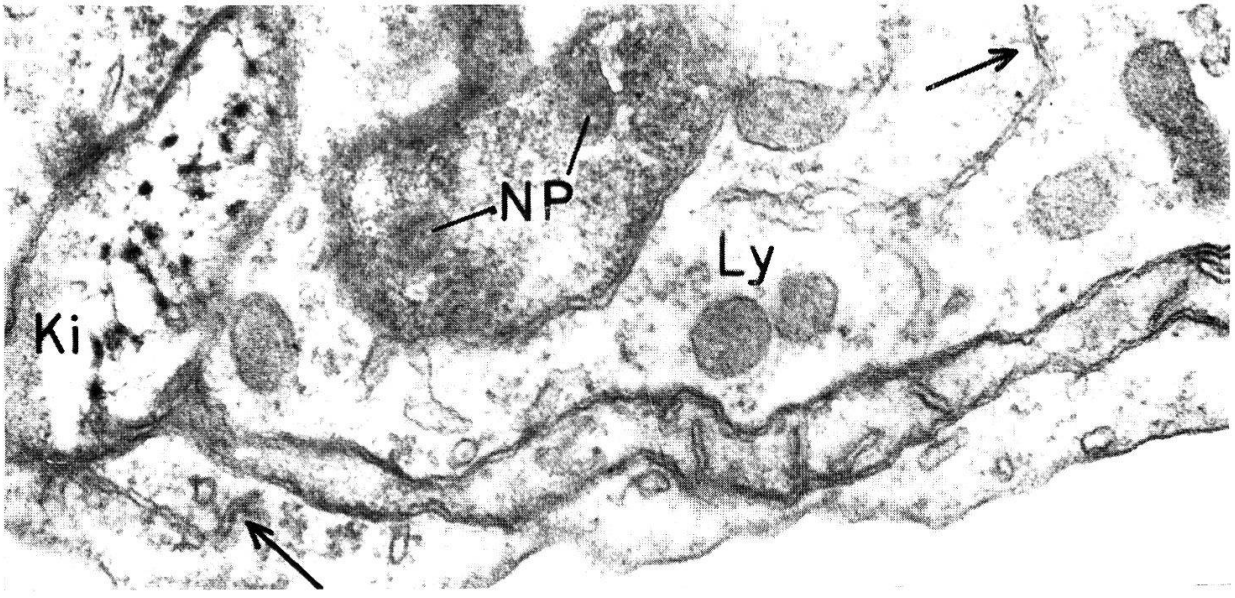
29

Abb. 28. **Epimastigote Form** (Mitteldarm). Querschnitt: Kinetoplast verbunden mit zusammenhängenden Mitochondrienschläuchen, welche einen „Mantel" bilden. Viele Zelleinschlüsse, „Lysosomen" (Ly) und Lipidvakuolen (LV). Fix. OsO_4. Vergrößerung 35 000 ×.

Abb. 29. **Epimastigote Form** (Kultur). Cytoplasmatische Mikrotubuli einzeln (➔) oder in Bündeln (➔➔). Zahlreiche Ribosomen gruppiert zu Polysomen. Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 40 000 ×.



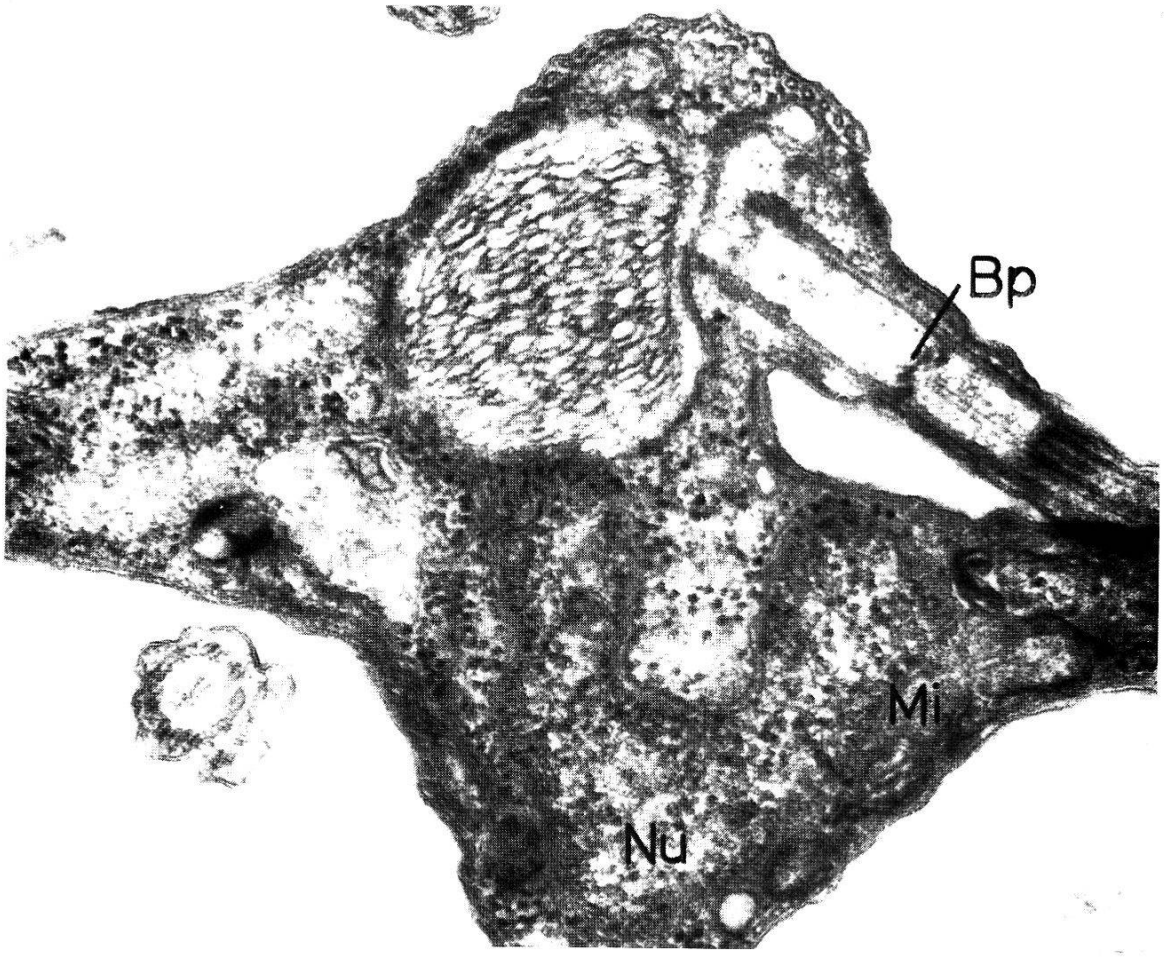
30



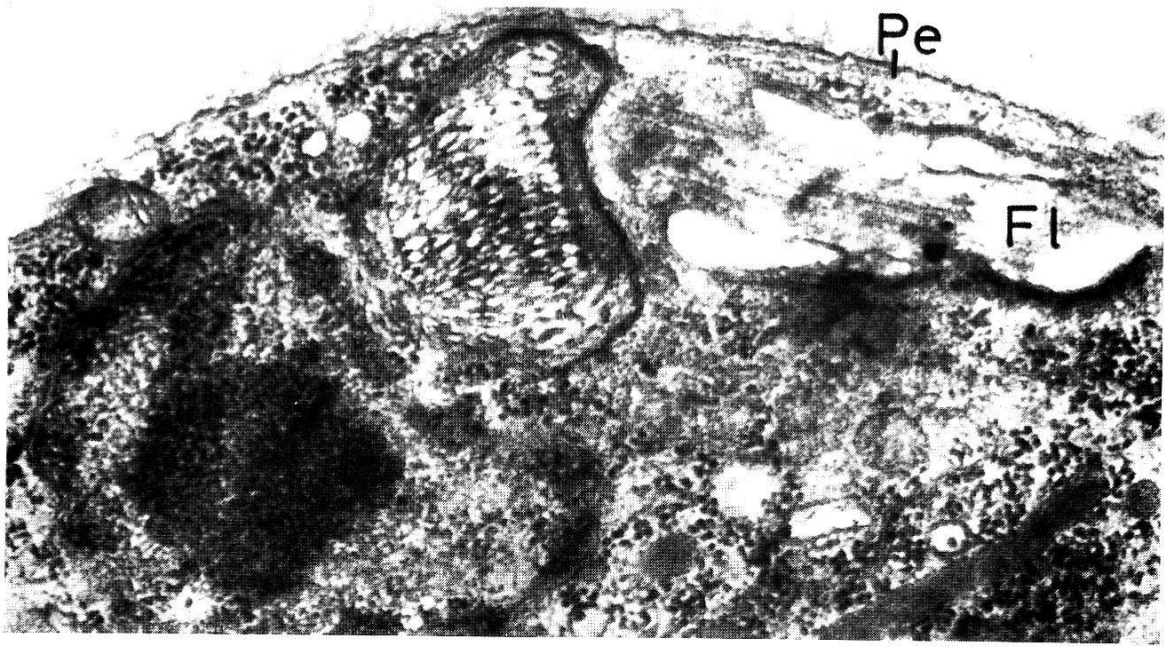
31

Abb. 30. **Sphaeromastigote Form** (Enddarm). Langer Mitochondrienschlauch ist mit dem Kinetoplasten verbunden. Relativ viele und lange Cristae mitochondriales. Cytoplasmatische Membranen mit Ribosomen (➤). Kernmembran mit Kernporen (NP). Fix. OsO_4. Vergrößerung 60 000 ×.

Abb. 31. **Sphaeromastigote Form** (Enddarm). Langer Mitochondrienschlauch ist mit dem Kinetoplasten verbunden. Relativ viele und lange Cristae mitochondriales. Cytoplasmatische Membranen mit Ribosomen (➤). Kernmembran mit Kernporen (NP). Fix. OsO_4. Vergrößerung 60 000 ×.



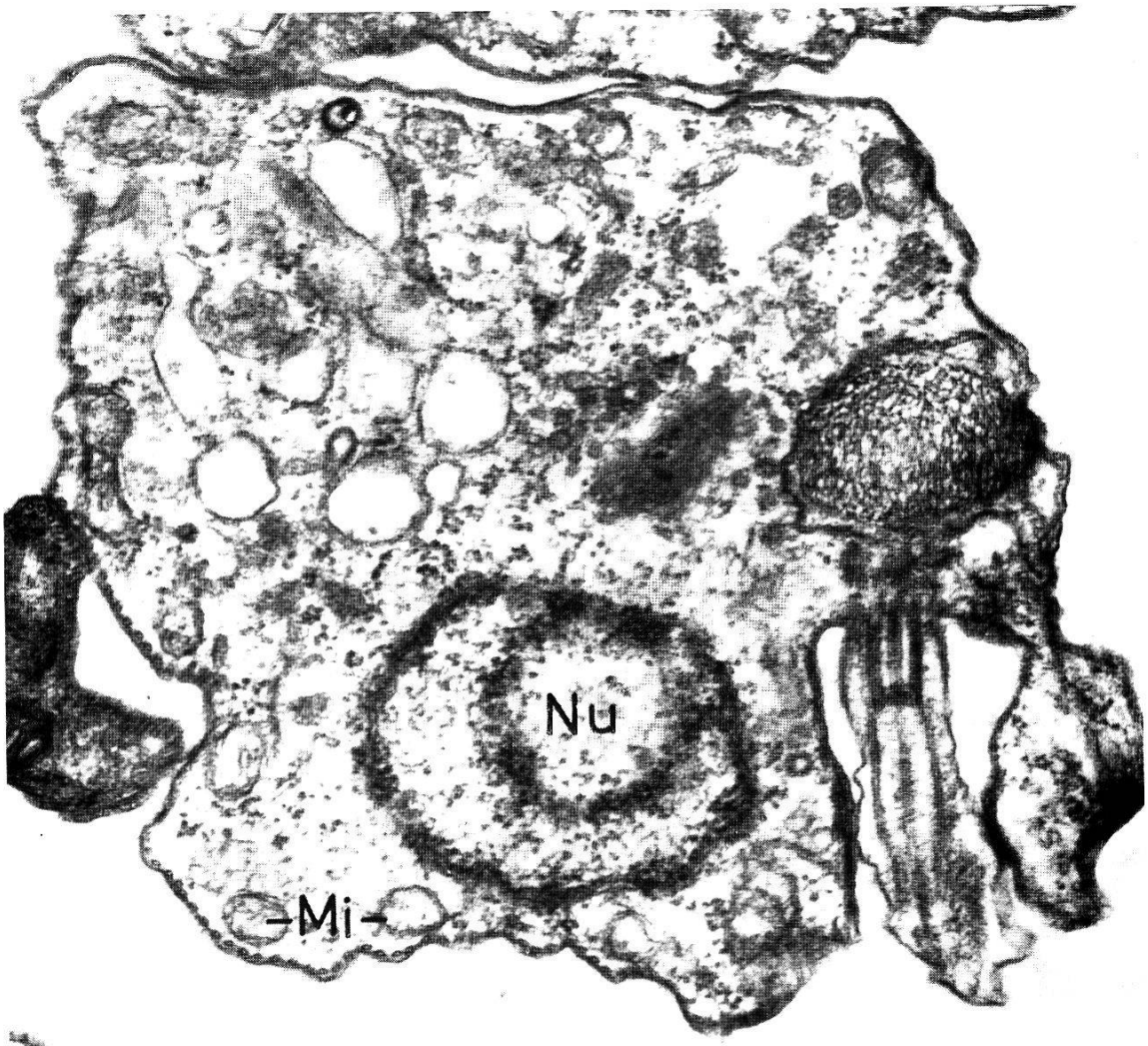
32



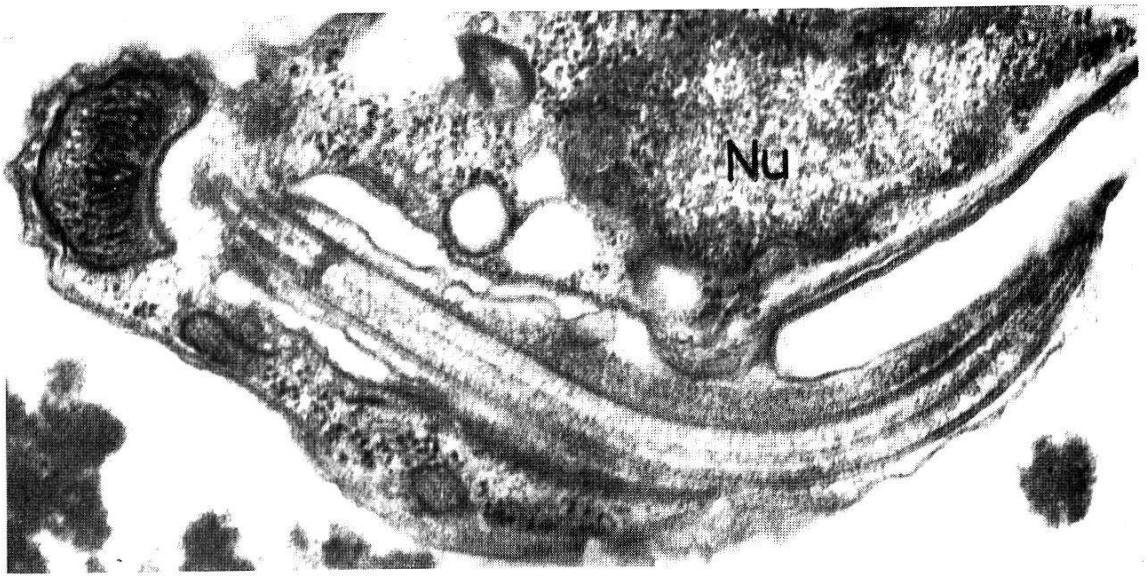
33

Abb. 32. **Sphaeromastigote Form** (Enddarm). Der Kinetoplast liegt neben dem länglichen Zellkern. Er ist kugelförmig (wie in der trypomastigoten Form) und enthält 3–4 Doppelreihen DNS. Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 47 000 ×.

Abb. 33. **Sphaeromastigote Form** (Kultur). Kinetoplast enthält drei Doppelreihen DNS. Cytoplasma dicht angefüllt mit Ribosomen. Die Periplast-Tubuli verlaufen parallel der Zellmembran (Pe). Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 47 000 ×.



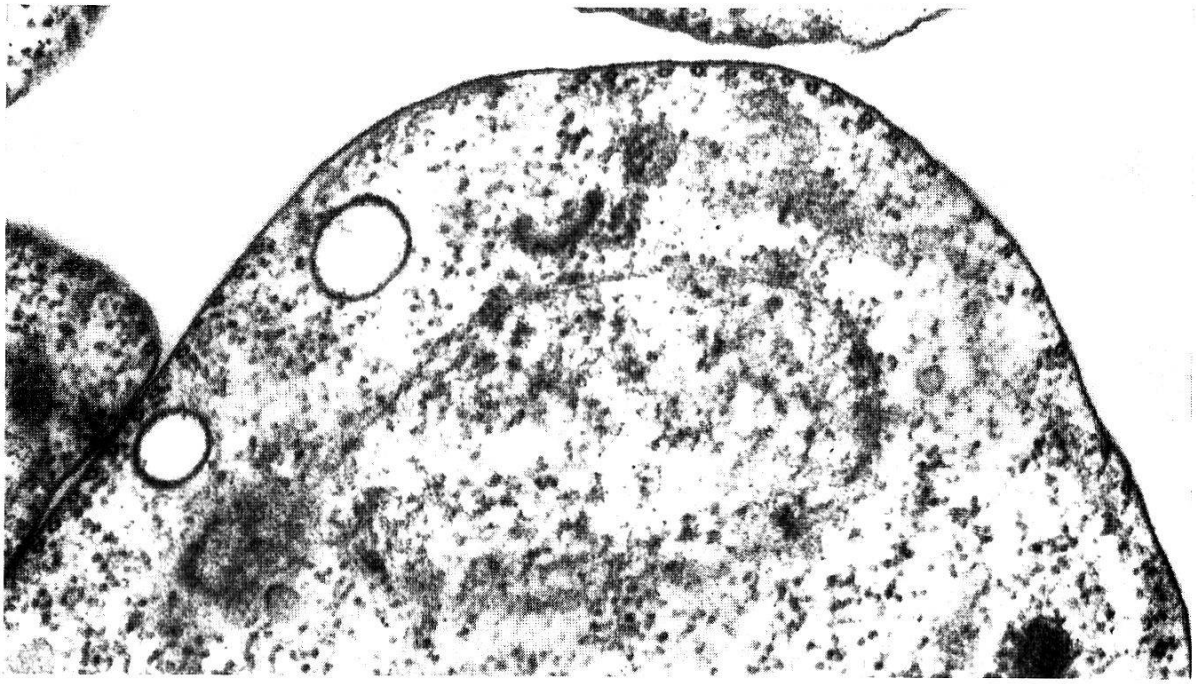
34



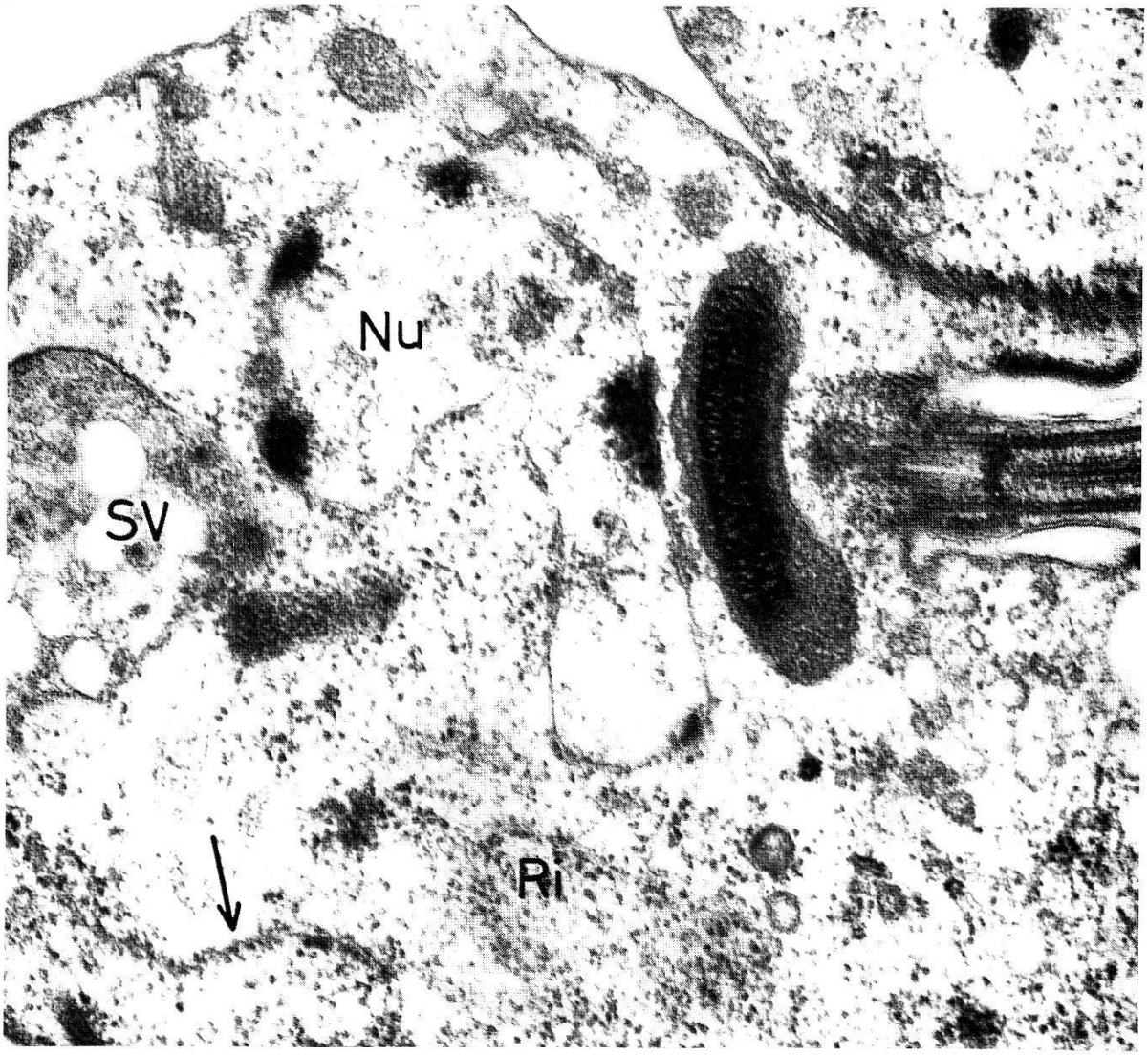
35

Abb. 34. **Sphaeromastigote Form** (Enddarm). Kinetoplast kugelförmig. Cytoplasma enthält viele Polysomen und kleine Vakuolen. Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 36 000 ×.

Abb. 35. **Sphaeromastigote Form** oder junge **trypomastigote Form** (Enddarm). Der Kinetoplast liegt hinter dem Zellkern. Die Geißel verläuft noch gestreckt entlang der Zelloberfläche. Ribosomen regelmäßig und dicht gelagert im Cytoplasma. Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 36 000 ×.



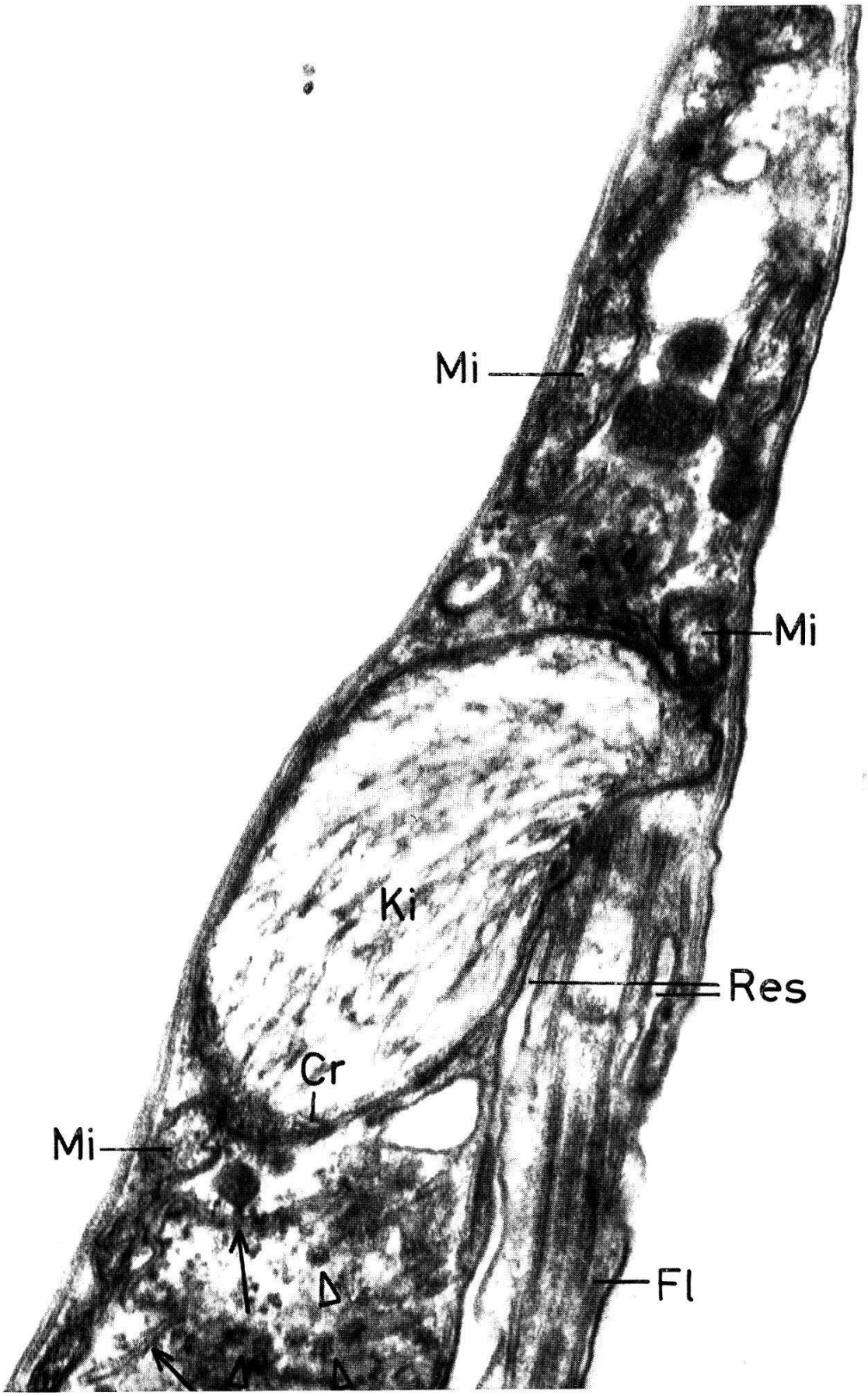
36



37

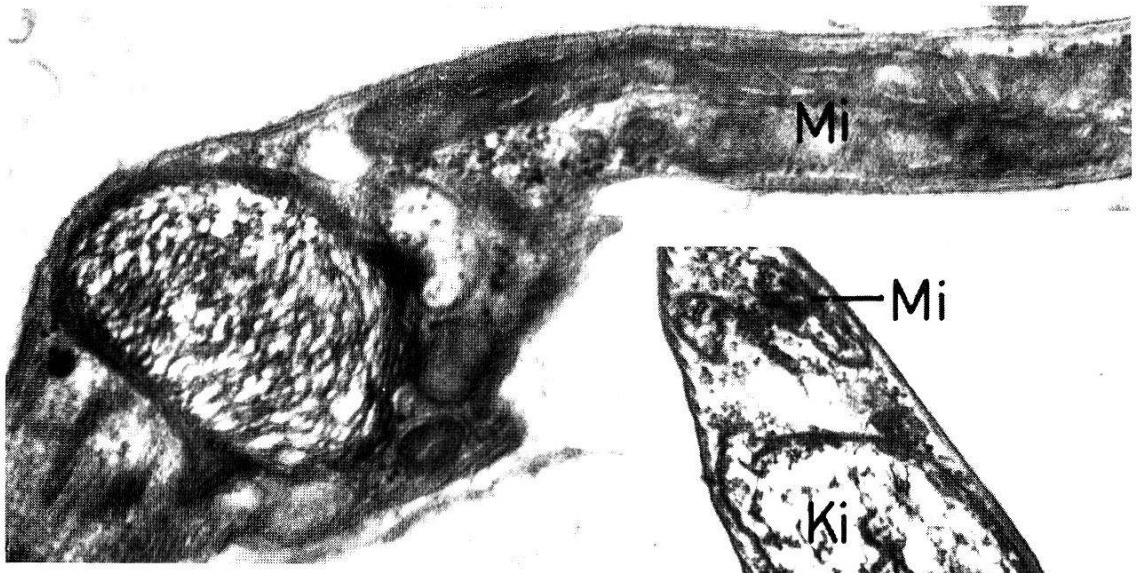
Abb. 36. **Sphaeromastigote Form** (Enddarm). Periplast-Tubuli liegen in unregelmäßigen Abständen voneinander unterhalb der Zellmembran. Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 48 000 ×.

Abb. 37. **Sphaeromastigote Form** (Enddarm). Der Kinetoplast ist scheibenförmig (mit einer Doppelreihe DNS) und liegt vor dem Zellkern. Ribosomen gleichmäßig verteilt im Cytoplasma, z. T. auch an kurzen Membranstücken des ER angelagert (↠). Die vielen kleinen Bläschen in der Nähe des Geißelreservoirs wurden evtl. durch Pinocytose gebildet. Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 48 000 ×.

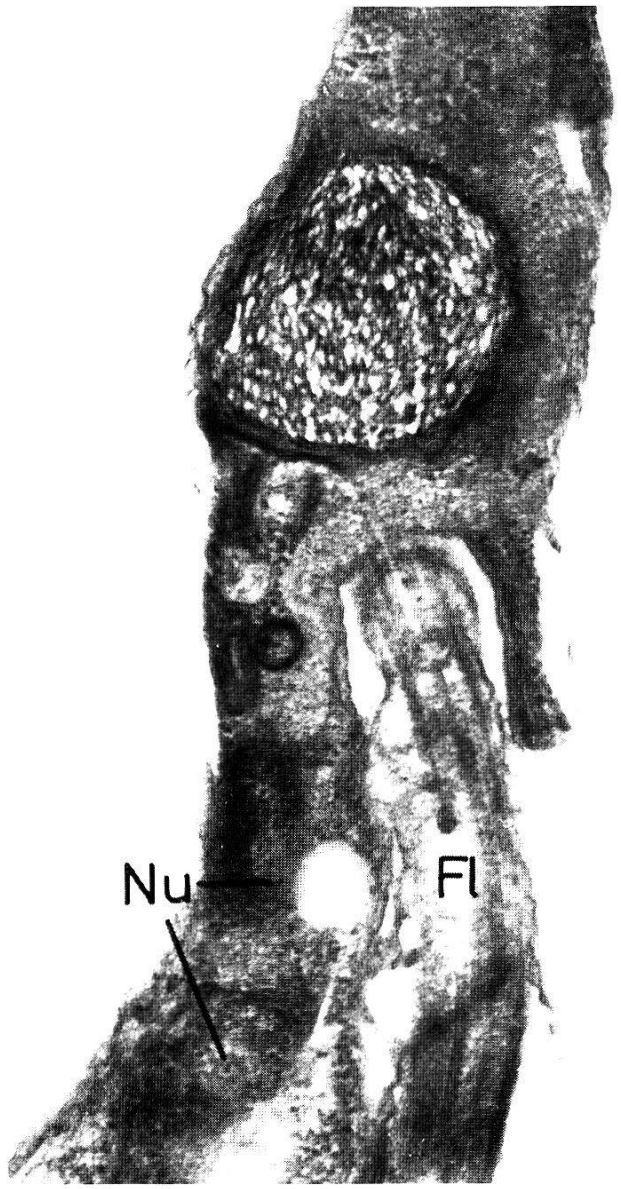


38

Abb. 38. **Trypomastigote Form** (Enddarm). Der große Kinetoplast füllt die ganze Breite der Zellspitze aus. Er ist verbunden mit vorderen und hinteren Mitochondrien. Kurze cytoplasmatische Membranen mit Ribosomen (➔). Osmiophile Granula (▷). Fix. OsO_4. Vergrößerung 63 000 ×.



39

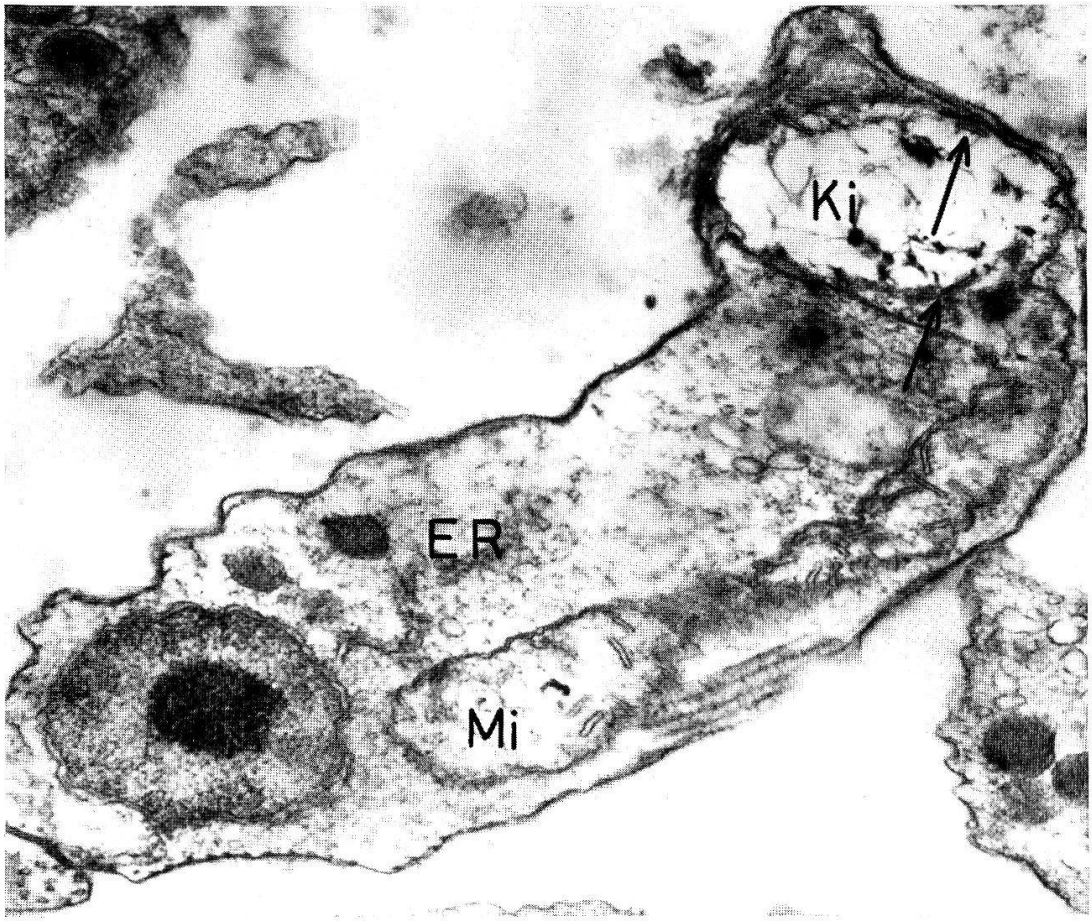


40

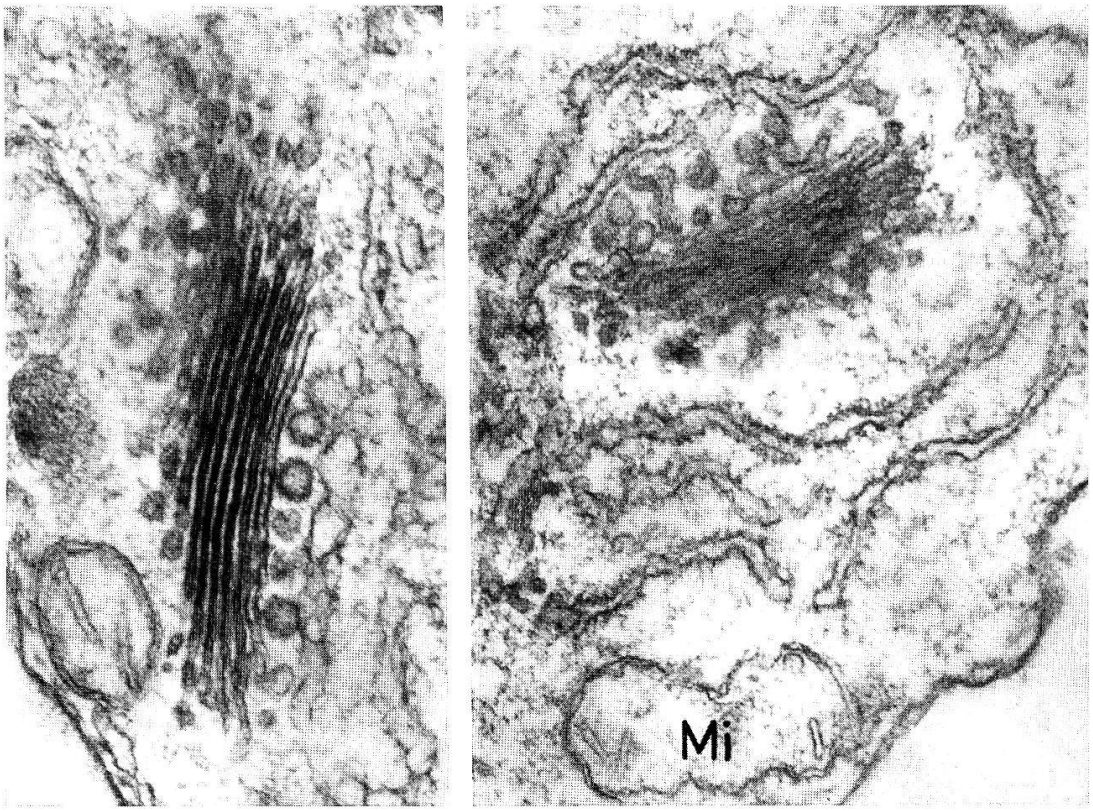
41

Abb. 39, 40. **Trypomastigote Formen** (Enddarm). Der Kinetoplast ist kugelförmig, die DNS ist in parallele Reihen angeordnet (je nach Schnittebene sichtbar) und füllt den ganzen Kinetoplasten aus. Lange Mitochondrienschläuche mit reicher Innenstruktur (lange Cristae mitochondriales) erstrecken sich bis in das Zellende (39). Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 40 000 × (39); 36 000 × (40).

Abb. 41. **Trypomastigote Form** (Enddarm). Länglicher Zellkern. Kinetoplast verbunden mit langen Mitochondrien. Osmiophile Granula (▷). Fix. OsO_4. Vergrößerung 35 000 ×.



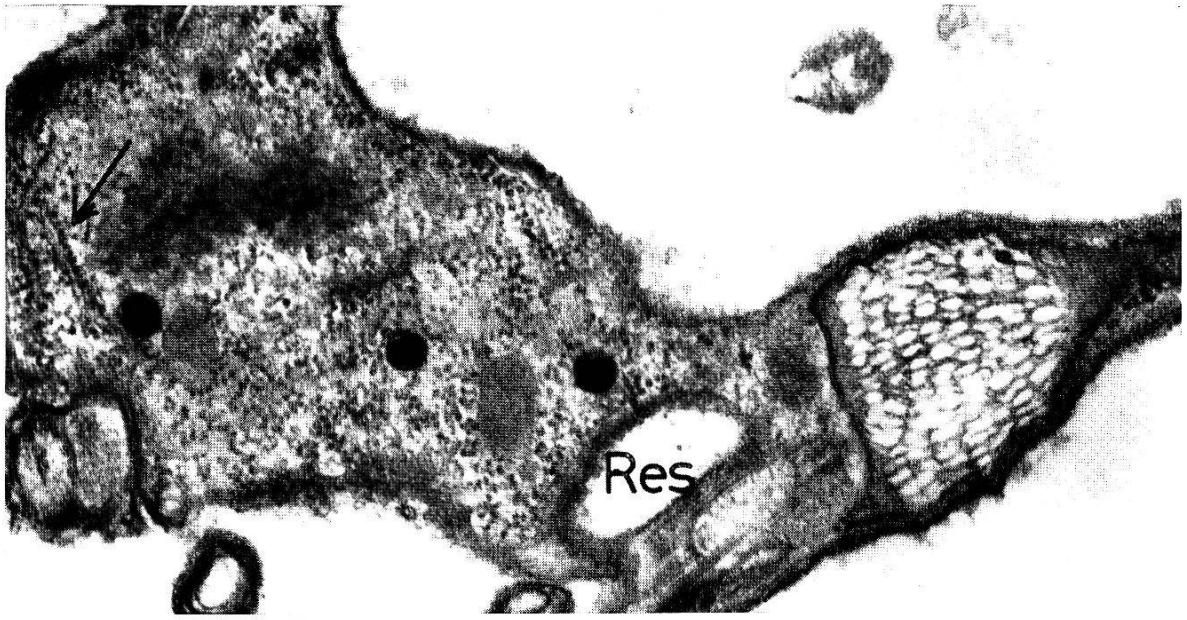
42



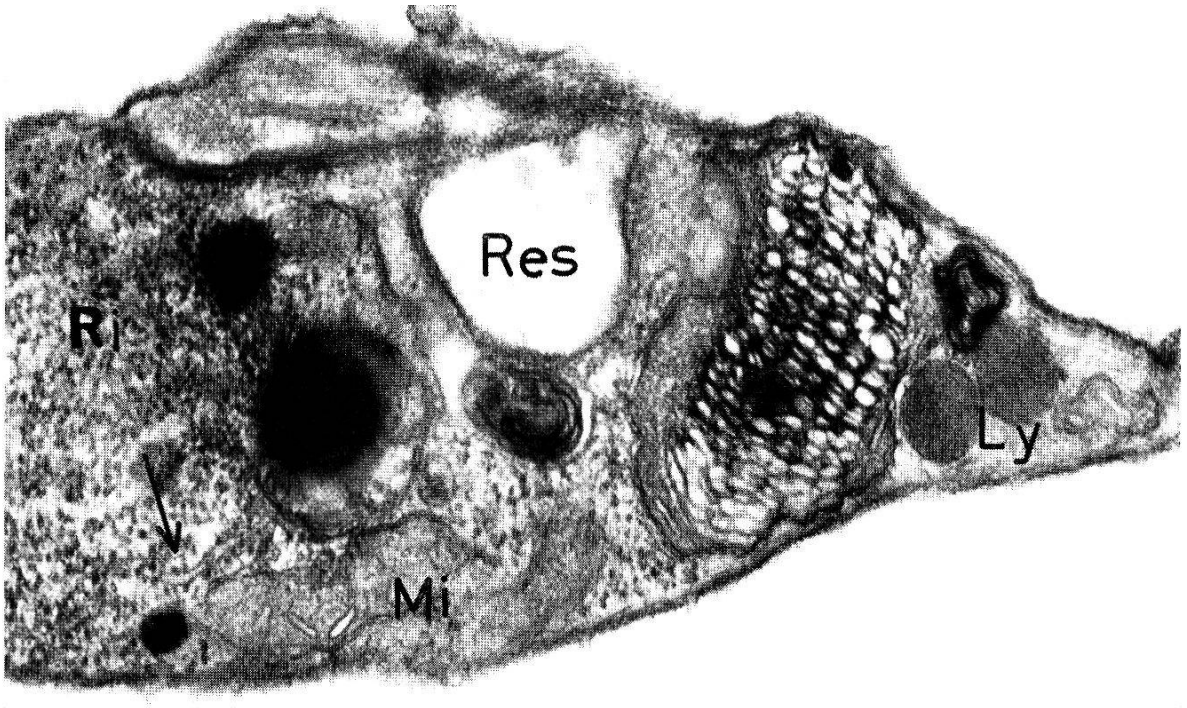
43 44

Abb. 42. **Trypomastigote Form** (Mäuseblut). Der Kinetoplast ist mit einem breiten Mitochondrienschlauch verbunden, welcher eine reiche Innenstruktur aufweist. Cristae mitochondriales auch im Kinetoplasten (➤). Die DNS des Kinetoplasten erscheint «aufgelockert». Membranen des ER sind mit Ribosomen besetzt. Fix. OsO_4. Vergrößerung 32 000 ×.

Abb. 43 und 44. **Trypomastigote Formen** (Mäuseblut). Golgi-Komplex aus vielen parallel geschichteten Lamellen (Zisternen) und kleinen Bläschen. Lange cytoplasmatische Membranen sind dicht mit Ribosomen besetzt (= rauhes ER). Mitochondrien mit langen Cristae. Fix. OsO_4. Vergrößerung 70 000 ×.



45



46

Abb. 45. **Trypomastigote Form** (Mäuseblut). Der kugelförmige Kinetoplast enthält 4 Doppelreihen DNS-Material, welches nach dieser Fixierung den ganzen Kinetoplasten regelmäßig ausfüllt. Ribosomen sehr dicht gelagert im Cytoplasma und an Membranen des ER (➛). Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 40 000 ×.

Abb. 46. **Trypomastigote Form** (Mäuseblut). Kinetoplast mit drei übereinanderliegenden Doppelreihen DNS. Viele Ribosomen einzeln im Cytoplasma und an Membranen angelagert (➛). Fix. Glut. + OsO_4. Vergrößerung 40 000 ×.