

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**In vitro- und ex vivo-
Untersuchungen zur Zytokinexpression im equinen Trachealepithel**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
SABINA GUSTAT
Tierärztin aus Chemnitz

Berlin 2003

Journal-Nr. 2771

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Leo Brunnberg

Erster Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Roland Rudolph

Zweiter Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Hanns Ludwig

Dritter Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Dr. Arthur Grabner

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): Horse; Cytokines; Cell Lines; Equine
Herpesvirus; Equine Rhinovirus

Tag der Promotion: 12. 12. 2003

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	9
2. Literaturübersicht	10
2.1 Zielsetzung	18
3. Eigene Untersuchungen	19
3.1 Material und Methoden	19
3.1.1 Materialnachweis	19
3.1.2 Equine Trachealzellen (ET Zellen)	20
3.1.3 Vermehrung von Zelllinien	20
3.1.4 Immunhistochemie	21
3.1.5 Elektronenmikroskopie	23
3.1.6 Virusinfektion der ET Zellen im Vergleich mit Equinen Dermalzellen (ED Zellen)	24
3.1.7 Virustitration	26
3.1.8 Stimulation / Infektion der ET Zellen für den Einsatz in die RNA-Präparation	27
3.1.8.1 Unspezifische Stimulation	27
3.1.8.2 Virale Infektion	28
3.1.9 Anfertigung weiterer primärer Trachealepithelkulturen	29
3.1.10 Untersuchung von Trachealepithel von weiteren Pferden	30
3.1.10.1 ohne Kultivierung	30
3.1.10.2 mit Kultivierung und Infektion zum Einsatz in die RNA-Präparation	31
3.1.11 RNA-Präparation aus Zellen für den Einsatz in die Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	32
3.1.12 RT-PCR	34
3.1.12.1 Reverse Transkription	34
3.1.12.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	35

	Seite
3.1.13 Agarose-Gelelektrophorese	38
3.2 Ergebnisse	40
3.2.1 Eigenschaften der ET Zellen	40
3.2.1.1 Bestätigung des Epithelzellcharakters mit Hilfe von Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie	40
3.2.1.2 Permissivität der ET Zellen für EHV-1, -2 und -4, VSV, EAV, equines Rhinitisvirus Perv, Rhinitisvirus 350/72 sowie Rhinitisvirus P 1436/73 und deren Wachstumsverhalten im Vergleich mit ED Zellen	43
3.2.1.3 Ergebnisse der β -Aktin-PCR und der Untersuchung auf DNA-Kontamination	52
3.2.1.4 Zytokin-mRNA-Expression durch ET Zellen	52
3.2.2 Anfertigung primärer Trachealepithelkulturen	58
3.2.3 Zytokinspektrum im Trachealepithel von weiteren Pferden	59
3.2.3.1 Histologische Beurteilung	59
3.2.3.2 Zytokinspektrum vor Kultivierung	61
3.2.3.3 Zytokinspektrum nach Kultivierung und Infektion	62
4. Diskussion	66
4.1 Änderung der Eigenschaften der ET Zellen nach Transformation	66
4.2 Permissivität der ET Zellen für respiratorische Viren des Pferdes	67
4.3 Zytokinexpression durch ET Zellen	69
4.4 Anfertigung weiterer Zellkulturen von equinen Trachealepithelzellen	71
4.5 Zytokinexpression im Trachealepithel	71
5. Zusammenfassung	73
6. Summary	75
7. Literaturverzeichnis	77

	Seite
8. Anhang	86
8.1 Abkürzungsverzeichnis	86
8.2 Virustiter nach Infektion der ET und ED Zellen	88
8.3 Eigene publizierte Ergebnisse	90
8.4 Danksagung	91
8.5 Lebenslauf	92
8.6 Selbständigkeitserklärung	93

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser (aqua destillata)
as	Antistrang (antisense)
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
β-ME	14,3 M β-Mercaptoethanol
BEGM	Bronchial Epithelial Cell Growth Medium
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CMC	Carboxymethylcellulose
COB	chronisch-obstruktive Bronchitis
ConA	ConcanavalinA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitolösung
EAV	Equines Arteriitisvirus
ED Zellen	Equine Dermalzellen
EDM	Eagles` s minimum essential medium, Dulbecco`s modification
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHV	Equines Herpesvirus
EMCV	Encephalomyokarditis Virus
ERAV	Equines Rhinitis A Virus
ERBV	Equines Rhinitis B Virus
ET Zellen	Equine Trachealzellen
FCS	Serum von Kälberfeten (fetal calf serum)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonienstimulierender Faktor
h	Stunde (n)
HRV	Humane Rhinoviren
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

LPS	Lipopolysaccharide
min	Minute (n)
MIP-2	Makrophagen-inflammatorisches Protein-2
MMLV/H-	Moloney Mäuse Leukämie Virus mit Punktmutationen der Rnase H-
m.o.i.	Infektionsmultiplizität (multiplication of infection)
NCS	Serum neugeborener Kälber (newborn calf serum)
NF-κB	Nuklear-Faktor κB
p	Passage (n)
PAS	Perjodsäure-SCHIFF` Reaktion
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFU	plaquebildende Einheiten (plaque forming units)
PHA-M	Phythämagglutinin
PIV	Parainfluenzavirus
PMA-Ca	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat + Ca-Ionophor
PWM	Pokeweed Mitogen
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
s	Strang (sense)
SAGM	Small airway Epithelial Cell Growth Medium
sec	Sekunde (n)
SPAOPD	Sommerweide-assoziierte obstruktive Lungenerkrankung (summer pasture associated obstructive pulmonary disease)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris buffered saline)
Th	T-Helferzellen
TNFα	Tumor Nekrosefaktor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
VSV	Vesikuläres Stomatitisvirus

8.2 Virustiter nach Infektion der ET und ED Zellen

Equines Rhinitisvirus Perv: Virustiter (in PFU/ml) nach Infektion der ET und ED Zellen

	Erstinfektion	1. Passage	2. Passage
<u>ET</u>			
Überstand	2×10^7	$1,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
<u>ED</u>			
Überstand	$4,5 \times 10^6$	$1,7 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$
Kokultivierung	1×10^6	$2,1 \times 10^5$	
Lysierte Zellen	$1,1 \times 10^7$	4×10^5	

Equines Rhinitisvirus 350/72: Virustiter (in PFU/ml) nach Infektion der ET und ED Zellen

	Erstinfektion	1. Passage	2. Passage
<u>ET</u>			
Überstand	$2,2 \times 10^7$	1×10^7	8×10^6
<u>ED</u>			
Überstand	3×10^6	$1,3 \times 10^5$	8×10^4
Kokultivierung	1×10^6	$4,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
Lysierte Zellen	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^4$

Equines Rhinitisvirus P 1436/73: Virustiter (in PFU/ml) nach Infektion der ET und ED Zellen

	Erstinfektion	1. Passage	2. Passage
<u>ET</u>			
Überstand	5×10^2	$2,5 \times 10^1$	1×10^2
Kokultivierung	2×10^4	$3,5 \times 10^4$	1×10^3
Lysierte Zellen	$1,9 \times 10^4$	9×10^3	4×10^3
<u>ED</u>			
Überstand	$2,2 \times 10^4$	8×10^2	5×10^2
Kokultivierung	$1,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$
Lysierte Zellen	9×10^5	$2,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$

Vesikuläres Stomatitis Virus: Virustiter (in PFU/ml) nach Infektion der ET und ED Zellen

	Erstinfektion	1. Passage	2. Passage
<u>ET</u>			
Überstand	2×10^7	8×10^6	6×10^6
<u>ED</u>			
Überstand	9×10^7	1×10^8	$1,7 \times 10^7$

Equines Arteriitis Virus: Virustiter (in PFU/ml) nach Infektion der ET und ED Zellen

	Erstinfektion	1. Passage	2. Passage
<u>ET</u>			
Überstand	$1,7 \times 10^7$	$2,9 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$
<u>ED</u>			
Überstand	$2,8 \times 10^4$	kein meßbarer Titer	
Kokultivierung	$2,3 \times 10^3$	kein meßbarer Titer	
Lysierte Zellen	$1,4 \times 10^4$	kein meßbarer Titer	

Equines Herpesvirus 1: Virustiter (in PFU/ml) nach Infektion der ET und ED Zellen

	Erstinfektion	1. Passage	2. Passage
<u>ET</u>			
Überstand	$2,9 \times 10^4$	$2,7 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$
Kokultivierung	4×10^3	$8,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$
Lysierte Zellen	7×10^3	3×10^4	6×10^3
<u>ED</u>			
Überstand	$2,5 \times 10^4$	$3,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$

Equines Herpesvirus 2: Virustiter (in PFU/ml) nach Infektion der ET und ED Zellen

	Erstinfektion	1. Passage	2. Passage
<u>ET</u>			
Überstand	7×10^5	$1,4 \times 10^5$	1×10^4
Kokultivierung	$1,3 \times 10^6$	3×10^4	
Lysierte Zellen	$1,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^3$	
<u>ED</u>			
Überstand	8×10^5	7×10^6	$3,7 \times 10^4$
Kokultivierung	4×10^6	4×10^4	
Lysierte Zellen	$1,8 \times 10^5$	6×10^5	

Equines Herpesvirus 4: Virustiter (in PFU/ml) nach Infektion der ET und ED Zellen

	Erstinfektion	1. Passage	2. Passage
<u>ET</u>			
Überstand	$2,8 \times 10^2$	8×10^2	2×10^2
Kokultivierung	1×10^2	3×10^2	$2,5 \times 10^3$
Lysierte Zellen	$2,5 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^1$
<u>ED</u>			
Überstand	$2,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$4,9 \times 10^8$
Kokultivierung	$2,3 \times 10^4$		
Lysierte Zellen	3×10^4		

8.3 Eigene publizierte Ergebnisse

Teile dieser Arbeit sind bereits an anderer Stelle vorgestellt oder veröffentlicht worden:

U. Wolfinger, S. Gustat, F. Steinbach, R. Rudolph (2002)

Anzucht einer equinen Lungenepithelzellkultur.

4. Workshop des Arbeitskreises für Vergleichende Pathologie und Pathophysiologie des respiratorischen Systems der Fachgruppe der DVG, 12.-13.03.2002, Bochum (Vortrag)

U. Wolfinger, S. Gustat, F. Steinbach (2002)

A permanent equine epithelium cell culture: characterization and studies for virus growth.

Symposium der *Veterinary Comparative Respiratory Society*, 04.-06.10.2002, Boston (Vortrag)

8.4 Danksagung

Allen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Dem Leiter des Instituts für Veterinär-Pathologie, Herrn Prof. Dr. Roland Rudolph danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung während der Durchführung meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Uta Wolfinger für die jederzeit gewährte freundschaftliche Betreuung sowie die hilfreichen Anregungen und Diskussionen bei der Durchführung, Auswertung und Abfassung dieser Arbeit.

Ein Teil der virologischen und molekularbiologischen Arbeiten wurde von mir im Institut für Virologie der FU Berlin durchgeführt. Für die großzügige Bereitstellung von Arbeitsplatz und Materialien möchte ich mich vielmals bei Prof. Dr. Hanns Ludwig und Frau Dr. Kerstin Borchers bedanken. Des weiteren danke ich Frau Tine Leiskau für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der virologischen und Zellkulturarbeiten.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Pferdeimmunologie, besonders Herrn Dr. Falko Steinbach, danke ich für nützliche Anregungen und die Bereitstellung von Ergebnissen aus früheren Untersuchungen. Frau Dr. Susanne Mauel sei für die Anfertigung und Überlassung von Positivkontrollen für die PCR vielmals gedankt.

Ganz herzlich möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Instituts für Veterinär-Pathologie bedanken, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und für ein freundschaftliches und angenehmes Arbeitsklima sorgten.

Herrn Mario Walter und den Angestellten des Schlachthofs Genthin danke ich für die Bereitstellung von Probenmaterial.

Bei Prof. Dr. P.S. Glatzel möchte ich mich für die Möglichkeit der Nutzung von Laborräumen und Geräten in der Tierklinik für Fortpflanzung bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums sei der Akademie für Tiergesundheit in Bonn-Bad Godesberg vielmals gedankt.

8.5 Lebenslauf

Name: Sabina Gustat
Geburtsdatum: 15.01.1970
Geburtsort: Chemnitz
Eltern: Maria Gustat
Maldonis Gustat

Schulbildung:

1976-1986 Polytechnische Oberschule in Prieros (Brandenburg)
1992-1995 Volkshochschulkolleg Charlottenburg in Berlin
06/1995 Abitur

Berufstätigkeit:

1986-1989 Ausbildung zur Krankenschwester im
Kreiskrankenhaus Königs Wusterhausen
1989-1992 Berufstätigkeit als Krankenschwester im Kreiskrankenhaus
Königs Wusterhausen sowie im Krankenhaus Moabit (Berlin)

Studium:

1995-2000 Studium der Veterinärmedizin an der FU Berlin
01/2001 Approbation als Tierärztin

Dissertation:

seit 01/2001 Dissertation am Institut für Veterinär-Pathologie
der FU Berlin
07/2001-12/2002 Stipendium der Akademie für Tiergesundheit e.V. (AfT),
Bonn-Bad Godesberg

8.6 Selbständigkeitserklärung

Ich versichere, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 10.09.2003