

## 1. Einleitung

Beim allergischen Asthma des Menschen wurde die Bedeutung der Epithelzellen des Atmungstraktes für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung klar erkannt: Sie sind die ersten Kontaktzellen für äußere Pathogene, wobei neben Allergenen auch Viren eine große Rolle spielen. Respiratorische Viren können allergisches Asthma vor allem über die Induktion von Zytokinen auslösen und verstärken (Folkerts et al., 1998). Die Zerstörung des Epithels führt dabei zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren durch mesenchymale Zellen mit dem Ziel der Regeneration. Beim allergischen Asthma scheint eine veränderte Antwort der Epithelzellen auf Proliferationsstimuli vorzuliegen, so daß das Epithel in einem Phänotyp der vermehrten Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verbleibt (Holgate, 2000). Es kommt zu strukturellen Veränderungen der Atemwege, die wesentlich zur Obstruktion beitragen (Chiappara et al., 2001).

Beim Pferd wurden bisher über die Rolle des Epithels bei respiratorischen Erkrankungen kaum Untersuchungen durchgeführt. Dabei sind Atemwegserkrankungen in der Pferdehaltung von großer Bedeutung und führen bei Chronifizierung häufig zur Unreitbarkeit des Pferdes. Innerhalb der respiratorischen Erkrankungen nimmt die chronisch-obstruktive Bronchitis (COB) eine herausragende Position ein. Bei COB handelt es sich um eine bei Pferden weit verbreitete, chronische, schlecht therapierbare Lungenerkrankung, deren Entstehung auf immunologischer Ebene erst ungenügend erforscht ist. Sie zeigt mehr Ähnlichkeiten zum allergischen Asthma als zur namensgleichen Lungenerkrankung des Menschen (Fabbri et al., 1998).

In Anlehnung an die Gemeinsamkeiten von COB beim Pferd und dem allergischen Asthma des Menschen soll der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Untersuchung viraler Infektionen des Atmungstraktes und der dadurch ausgelösten Zytokinproduktion liegen. Dafür wird überwiegend eine Zellkultur aus equinem Trachealepithel (ET Zellen) genutzt. Zur Durchführung des Zytokinnachweises findet eine RNA Isolierung aus infizierten Zellen statt, nach Umschreibung in cDNA und anschließender Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) wird die vervielfältigte DNA auf Agarose-Gel sichtbar gemacht.

## 2. Literaturübersicht

### COB beim Pferd

Für COB beim Pferd werden viele Bezeichnungen synonym gebraucht, u.a. *chronic obstructive pulmonary disease*, *recurrent airway obstruction*, *small airway disease* und *heaves*. Bei jungen Pferden handelt es sich als *inflammatory airway disease* möglicherweise um die frühe Form der Erkrankung.

Die Inzidenz der Erkrankung reicht je nach Studie von 12% im Norden der USA (Larson und Busch, 1985) bis hin zu 37% (Winder et al., 1991) bzw. 54% (Bracher et al., 1991) der Schweizer Pferde.

Es sind vor allem Pferde der nördlichen Hemisphäre betroffen, da kälteres Klima und feuchte Sommermonate eine längere Einstallung und schlechte Heu- und Strohqualität bedingen. Eine ähnliche Erkrankung ist im heißen und feuchten Südosten der USA bei Weidepferden als *summer pasture associated obstructive pulmonary disease* (SPAOPD) bekannt (Seahorn und Beadle, 1993). Diese Erkrankung wird auf eine Reaktion auf Schimmelpilzsporen im Weidegras zurückgeführt.

Im histologischen Bild zeigt sich, daß es sich trotz der hierzulande üblichen Bezeichnung chronisch-obstruktive Bronchitis um eine Bronchiolitis und Peribronchiolitis mit peribronchiolärer und perivaskulärer Ansammlung von mononukleären Zellen und intraluminaler Ansammlung von hauptsächlich neutrophilen Granulozyten handelt (Gerber, 1973; Winder et al., 1991). Die frühesten strukturellen Veränderungen werden am Epithel der terminalen Luftwege gefunden (Kaup et al., 1990 a, b).

### Zytokine

Zytokine, zu denen auch die als Lymphokine, Monokine, Interleukine (IL) und Interferone (IFN) bezeichneten Substanzen gehören, sind sezernierte Proteine von niedrigem Molekulargewicht. Zytokine wirken in nächster Entfernung parakrin und dienen der Kommunikation zwischen Entzündungszellen (Roitt, 1993). Sie steuern Stärke und Dauer der Immun- und Entzündungsreaktionen.

Die Zytokine des Menschen können nach ihrer Wirkungsweise unterteilt werden: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11, Tumor Nekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) und Granulozyten-Makrophagen-

Kolonienstimulierender Faktor (GM-CSF) werden als proinflammatorische Zytokine bezeichnet (Chung and Barnes, 1999). IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  benutzen den gleichen Rezeptor und haben demzufolge gleiche Wirkungen, wobei IL-1 $\alpha$  früher als IL-1 $\beta$  gebildet wird, IL-1 $\beta$  wiederum in größerer Menge. IL-1 $\beta$  hat viele Effekte, es verursacht Fieber, die Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark und stimuliert die Produktion von anderen Zytokinen durch eine Vielzahl von Zellen. Weiterhin ist es für die Aktivierung von T-Lymphozyten verantwortlich. IL-6 spielt ebenfalls bei der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen eine Rolle und hat darüber hinaus wachstumsregulierenden Einfluß auf viele Zellen. Es induziert in B-Zellen Immunglobulin (Ig) G, -IgA- und IgM-Sekretion, außerdem ist es ein wichtiger Kofaktor für die IL-4-abhängige IgE-Synthese. IL-11 wurde ursprünglich als essentieller Faktor für die Megakaryozyten- und Thrombopoese entdeckt. Einarsson et al. konnten allerdings 1996 nachweisen, daß es bei direkter Applikation in gesunde Mäuse zu Hyperreaktivität und Entzündung der Atemwege führt. TNF $\alpha$  zeigt größtenteils synergistische Effekte zu IL-1 $\beta$  und erhöht weiterhin dessen Freisetzung von antigen-präsentierenden Zellen. GM-CSF induziert die Synthese und Freisetzung einer Vielzahl von Zytokinen durch Makrophagen und verlängert die Überlebenszeit von Eosinophilen in der Kultur (Park et al., 1998).

IL-8 gehört zur Gruppe der Chemokine (Chung and Barnes, 1999) und ist ein potentes Stimulans für die Anlockung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten.

IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 und IFN $\gamma$  sind wichtig für die Unterscheidung zwischen Th (T-Helferzellen)1- und Th2-Antwort des Immunsystems (Roitt, 1993): Es werden zytotoxische T-Lymphozyten, die den CD8 (Cluster of Differentiation 8)-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche tragen, von T-Helferzellen unterschieden, die den CD4-Rezeptor besitzen. T-Helferzellen stimulieren bevorzugt die Synthese von Antikörpern in B-Zellen und lassen sich nach ihrem vorherrschenden Zytokinprofil in Th1- und Th2-Zellen unterteilen. Bei Vorliegen von Th1-Zellen wird IL-2 und IFN $\gamma$  nachgewiesen, Th2-Zellen sind durch die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 gekennzeichnet. IL-4 und auch IL-13 veranlassen die Umstellung der Produktion von Antikörpern auf IgE durch B-Lymphozyten, währenddessen IL-5 für die Aktivierung und Einwanderung von eosinophilen Granulozyten verantwortlich ist (Janeway und Travers, 1997).

IL-10 wird als inhibitorisches Zytokin bezeichnet (Chung and Barnes, 1999). Es verringert die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und IL-6 und wirkt immunsuppressiv durch Hemmung der Monozyten- und Makrophagenfunktion.

Mehrere equine Zytokine wurden bereits kloniert und sequenziert (zur Übersicht siehe Steinbach et al., 2002).

### Asthma beim Menschen

In der Humanmedizin wird zwischen allergisch bedingtem (extrinsischem) und nicht-allergischem (intrinsischem) Asthma unterschieden (Romanet-Manent et al., 2002). Allergisches oder atopisches Asthma wird zur Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I oder auch Überempfindlichkeit vom Soforttyp gerechnet. Dabei kommt es zur Degranulation von Mastzellen und Basophilen, die durch deren Vernetzung durch IgE vermittelt wird. So wird bei allergischen Asthmatikern ein höherer totaler IgE-Spiegel im Serum gemessen als bei Gesunden (Hizawa et al., 2001).

Die dominierende Lymphozyten-Subpopulation bei Asthma sind Th2-Zellen, was sich aus dem nachgewiesenen Zytokinprofil von IL-4, IL-5 und IL-13 schließen läßt (Koning et al., 1997; zur Übersicht siehe Jeffery, 1999).

Die genauen pathogenetischen Zusammenhänge der bei allergischem Asthma vorliegenden Hyperreaktivität der Atemwege bleiben noch unklar. Vermutlich spielen IgE, welche an Rezeptoren an der Zelloberfläche der glatten Muskelzellen binden, eine wichtige Rolle (Martin, 2001). Weiterhin konnte die Bedeutung der Zytokine IL-5, IL-1, TNF $\alpha$ , GM-CSF und IL-11 für die Entstehung der Hyperreaktivität nachgewiesen werden (Chung und Barnes, 1999).

Die Zytokine IL-4 und IL-13 stellten sich auch im Hinblick auf die genetische Grundlage von allergischem Asthma als wichtig heraus (Shirakawa et al., 2000).

### Virale Infektionen und Asthma

Von mehreren respiratorischen Viren ist bekannt, daß sie allergisches Asthma sowohl auslösen als auch verstärken können. Die wichtigsten Erreger sind dabei das Respiratorische Synzytialvirus (RSV) und Parainfluenzavirus (PIV) bei jüngeren Kindern sowie humane Rhinoviren (HRV) bei Erwachsenen (Nicholson et al., 1993; Johnston et al., 1995). Dabei sollen die Infektion der Epithelzellen und die dadurch ausgelöste Zytokinproduktion zu

Hyperreaktivität der Atemwege, Eosinophilie und IgE-Synthese führen (Folkerts et al., 1998; Chung und Barnes, 1999).

Verschiedene Untersucher konnten nach Infektion mit HRV sowohl *in vivo* in nasopharyngealen Aspiraten als auch *in vitro* eine Erhöhung bzw. Induktion der Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-11, TNF $\alpha$  und GM-CSF nachweisen (Zhu et al., 1996; Terajima et al., 1997; Schroth et al. 1999; zur Übersicht siehe Gern und Busse, 1999; Papadopoulos et al., 2000). Die *in vitro*-Versuche wurden auf primären und permanenten Epithelzellkulturen der Atemwege durchgeführt. Die Induktion der Zytokinproduktion nach viraler Infektion scheint dabei über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuklear-Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) stattzufinden. NF- $\kappa$ B kontrolliert die Induktion vieler inflammatorischer Gene. Kim et al. (2000) konnten die Beteiligung von NF- $\kappa$ B an der Produktion von GM-CSF nach viraler Infektion nachweisen, währenddessen für IL-6 und IL-8 ein NF- $\kappa$ B-unabhängiger Weg existiert.

Oh et al. wiesen 2002 erhöhte Spiegel von IL-6 und IL-11 in nasopharyngealen Aspiraten von Kindern nach Infektion mit RSV nach.

### Vergleich von COB beim Pferd mit dem allergischem Asthma des Menschen

Auch beim Pferd konnte in Untersuchungen auf der Grundlage von Verwandtschaftsbeziehungen eine genetische Disposition für das Auftreten von COB nachgewiesen werden (Marti et al., 1991). Weitere Forschungen über eine Prädisposition auf Genomebene stehen noch aus.

Die Zugehörigkeit von COB zu einem bestimmten Allergietyp ist umstritten. So konnten von einigen Untersuchern im Serum bzw. in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) COB-kranker Pferde erhöhte Spiegel von allergenspezifischem IgE nachgewiesen werden (Halliwell et al., 1993; Eder et al., 2000). Hauptallergene scheinen bestimmte Proteine von *Aspergillus fumigatus* und *Alternaria alternata* zu sein (zur Übersicht siehe Robinson et al., 1996), die auch beim Menschen mit Stauballergien eine Rolle spielen (Cramer, 1998). Die natürliche Exposition ruft beim Pferd eine stärkere Reaktion hervor als die Belastung mit einem einzelnen Allergen (Mc Gorum et al., 1993a). COB geht bei Haltung der Pferde im Freien oder unter geringer Allergenbelastung in Remission.

Die Bestimmung der IgE-Spiegel beim Pferd wird dadurch erschwert, daß gegenwärtig noch keine monoklonalen Antikörper für equines IgE zur Verfügung stehen. Hauttests, die beim Menschen zur Allergiediagnose genutzt werden können, sind beim Pferd nicht aussagekräftig, da die meisten Pferde positive Hautreaktionen auf übliche Allergene in ihrer Umgebung zeigen. Allerdings scheinen an COB erkrankte Pferde auf eine größere Anzahl von Allergenen positiv zu reagieren (Mc Gorum et al., 1993b).

Zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen die verschiedenen Untersucher im Hinblick auf die dominierende Lymphozyten-Subpopulation: Während Mc Gorum et al. (1993a) einen Anstieg der CD4+ Zellen nach Allergenexposition in der BALF COB-kranker Pferde nachwies, konnte dies von anderen Untersuchern nicht nachvollzogen werden (Berendonk, 2000). Lavoie et al. (2001) konnten mit Hilfe der in situ-Hybridisierung eine erhöhte Expression von IL-4- und IL-5-mRNA in der BALF COB-kranker Pferde im Vergleich zu gesunden Pferden nachweisen, sowie eine erniedrigte Expression von mRNA für IFN $\gamma$ , was ebenfalls wie bei Asthma auf eine durch Th2-Zellen vermittelte Immunantwort schließen läßt. Eine erhöhte Expression von mRNA für IL-4 und IL-13, aber nicht für IL-5 wurden von Bowles et al. (2002) in der BALF von an SPAOPD erkrankten Pferden während der Zeit klinischer Symptome gemessen. Allerdings wurde in dieser Untersuchung die RT-PCR als Nachweismethode genutzt.

Wie bei Asthma liegt bei COB beim Pferd eine Hyperreaktivität der Atemwege vor, die zu Bronchospasmus, Hypertrophie der glatten Muskulatur und zur Hyperplasie des Epithels führt, was eine wesentliche Rolle bei der Obstruktion der Atemwege spielt.

Die für das allergische Asthma des Menschen typische Eosinophilie tritt beim Pferd nur selten auf, dagegen wird in der BALF ein erhöhter Anteil an neutrophilen Granulozyten beobachtet. Franchini et al. (1998) führen dies auf eine vermehrte Produktion chemotaktisch wirkender Substanzen wie IL-8 und Makrophagen-inflammatorisches Protein-2 (MIP-2) zurück. Allerdings sind auch beim Menschen akute schwere Asthmaanfälle mit Neutrophilie im Sputum assoziiert (Fahy et al., 1995), vor allem wenn virale Infektionen als Auslöser nachgewiesen werden konnten.

### Virale Infektionen und COB

Beim Pferd gibt es eine Reihe von respiratorischen Viren, die aber im Hinblick auf ihre Beteiligung bei der Entstehung von COB nur ungenügend untersucht wurden. Für die equinen

Herpesviren Typ 2 und Typ 4 (EHV-2 und -4) wird ein Zusammenhang mit COB vermutet (Robinson et al., 1996).

Equines Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) konnte hauptsächlich als Erreger seuchenhafter Aborte und neurologischer Störungen erkannt werden, verursacht aber auch milde Erkrankungen des oberen Respirationstraktes (Studdert, 1974). Infektionen mit EHV-1 gehen mit Ausbildung einer Virämie einher.

Bei EHV-4 handelt es sich um den typischen Erreger der Rhinopneumonitis beim Pferd (Studdert, 1974). EHV-4-DNA konnte aber auch aus dem Liquor von drei Pferden mit neurologischen Störungen nachgewiesen werden (Thein et al., 1993) und ist ebenfalls bei Aborten gefunden worden (Ludwig et al., 1988).

Im Gegensatz zu EHV-1 und -4 ist die Bedeutung von Infektionen der Pferde mit EHV-2 noch unklar. EHV-2 wurde bei Pferden mit respiratorischen Erkrankungen auffällig häufig gefunden (Palfi et al., 1978; Murray et al., 1996; Wolfinger, 1998). Schlocker et al. stellten 1995 eine Beziehung zwischen respiratorischen Erkrankungen und EHV-2 fest, als sie das Virus in den Lungenmakrophagen von Pferden mit COB nachwiesen. Bei gesunden Pferden gelang eine Virusisolierung nicht.

Equine Rhinoviren werden ebenfalls mit milden Erkrankungen des oberen Respirationstraktes in Verbindung gebracht (Plummer, 1962; Steck et al., 1978). Da sie mittels konventioneller Methoden schwierig zu isolieren sind, wurde ihnen wenig Bedeutung zugemessen. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch ihre weite Verbreitung und lange Persistenzzeit (Li et al., 1997).

Die equinen Rhinoviren als Mitglieder der Familie der *Picornaviridae* und früher des Genus *Rhinovirus* wurden neu einklassifiziert. Der frühere Serotyp 1 wurde in Equines Rhinitis A Virus (ERAV) umbenannt und ins Genus *Aphthovirus* eingeordnet, währenddessen der frühere Serotyp 2 jetzt den Namen Equines Rhinitis B Virus (ERBV) trägt und das einzige Mitglied des Genus *Erbovirus* darstellt (Huang et al., 2001). ERAV und ERBV unterscheiden sich in ihrer Nukleotidsequenz stark voneinander. ERAV zeigt mehr Gemeinsamkeiten zum Erreger der Maul- und Klauenseuche (ebenfalls Genus *Aphthovirus*), währenddessen ERBV eher dem Encephalomyokarditis-Virus (EMCV, Fam.: *Picornaviridae*, Genus: *Murine Cardioviren*) ähnelt (Wutz et al., 1996).

Über die Zytokininduktion in den Atemwegen nach viraler Infektion wurden beim Pferd bislang noch keine Untersuchungen durchgeführt. Bureau et al. (2000) nutzten an COB erkrankte Pferde als Tiermodell für das allergische Asthma des Menschen. Sie konnten in Bronchialzellen von COB-Pferden während eines akuten Krankheitsschubes höhere Aktivitäten des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B im Vergleich zu gesunden Pferden und Pferden in Remission messen. Für NF- $\kappa$ B ist beim Menschen nachgewiesen, daß es nach viraler Infektion zur Aktivierung und damit zur Induktion inflammatorischer Gene kommt (Kim et al., 2000).

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Zytokinfreisetzung in der BALF COB-kranker Pferde: Franchini et al. wiesen 2000 eine erhöhte Freisetzung von IL-8 im Vergleich zu gesunden Pferden nach; erhöhte Spiegel von mRNA für IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-8 konnten von Giguere et al. (2002) gemessen werden.

### Rolle der Epithelzellen beim Asthma des Menschen

Nicht nur T- und B-Zellen, Mastzellen, eosinophile und neutrophile Granulozyten zeigen sich für die Immunpathogenese bei Asthma verantwortlich, auch dem Epithel der unteren Atemwege wird eine Schlüsselrolle zugesprochen.

Zum einen sind die Epithelzellen nicht nur passives Zielorgan verschiedener Viren, sondern sie produzieren nach viraler Infektion Zytokine, denen bei Asthma Bedeutung zugemessen wird (siehe oben: Virale Infektionen und Asthma).

Weiterhin wird das Bronchialepithel für die Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung und der klinischen Symptome auch in Abwesenheit von Allergenen verantwortlich gemacht. Dabei soll es durch die Produktion von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren zum Entzündungsgeschehen beitragen (Busse et al, 1999; Holgate et al., 1999 und 2000). Die vorliegenden strukturellen Veränderungen in Form von Wandverdickungen der Luftwege werden als *airway remodeling* bezeichnet und umfassen subepitheliale Fibrose, Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskulatur sowie der Myofibroblasten (Elias, 2000; Zhu, 2001). Dabei konnten die Verfasser zeigen, daß der subepithelialen Fibrose mit Kollagenablagerung eine Überexpression von IL-6 und IL-11 zugrunde liegt.

Beim COB-kranken Pferd können ähnliche histologische Veränderungen nachgewiesen werden, die allerdings mehr im Bereich der Bronchioli als der Bronchien oder Trachea zu finden sind (Kaup et al., 1990 a, b).

### 2.1 Zielsetzung

Es soll die Rolle der Epithelzellen bei der Immunpathogenese respiratorischer Erkrankungen des Pferdes untersucht werden. Dafür soll zum einen das Zytokinspektrum des equinen Trachealepithels bestimmt werden. Von Interesse ist weiterhin die Frage, welche respiratorischen Viren des Pferdes auch die unteren Atemwege infizieren und welche Zytokine durch sie induziert werden. Zentraler Untersuchungsgegenstand wird eine im Institut für Veterinär-Pathologie der FU Berlin etablierte equine Trachealepithelzellkultur (ET Zellen) sein (Wolfinger et al., 2002).

- Zu Beginn soll die Permissivität der ET Zellen für verschiedene respiratorische Viren des Pferdes *in vitro* überprüft werden.
- Daraufhin soll die Zytokinexpression der ET Zellen *in vitro* vor und nach viraler Infektion bestimmt werden.
- Anschließend soll Trachealepithel von weiteren Pferden gewonnen und infiziert werden, die dabei entstehenden *ex vivo* - Zytokinmuster sollen mit dem der ET Zellen verglichen werden.