

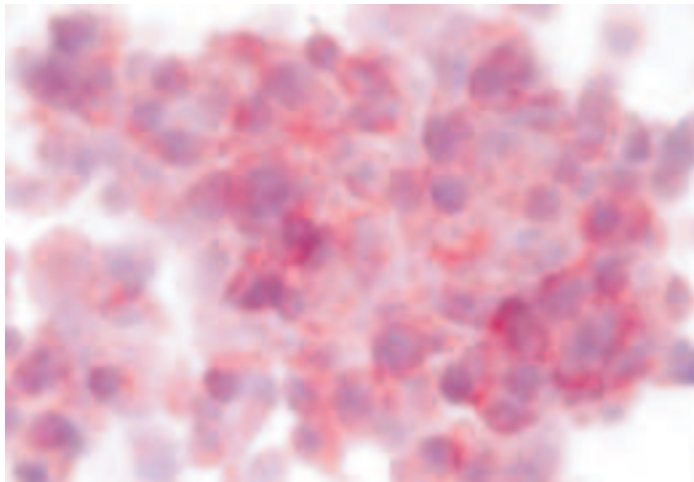
## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Eigenschaften der ET Zellen

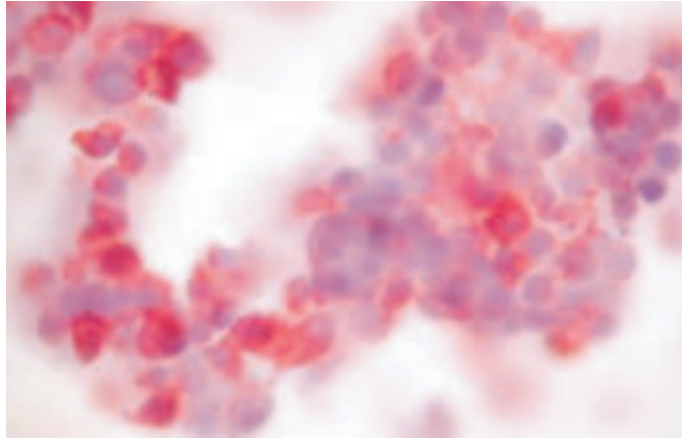
#### 3.2.1.1 Bestätigung des Epithelzellcharakters mit Hilfe von Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie

Die als Primärzellkultur gewonnenen ET Zellen wurden in frühen Zellpassagen (p) 1 und p10 immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch als Epithelzellen charakterisiert (Wolfinger et al., 2002). Da geklärt werden sollte, ob sie nach ihrer spontanen Transformation die charakteristischen Eigenschaften von Epithelzellen behielten, wurden im Rahmen dieser Arbeit in der 85. Passage der ET Zellen nochmals eine Färbung der Intermediärfilamente (3.1.4.) und elektronenmikroskopische Aufnahmen (3.1.5) angefertigt, um Aussagen über die Änderung der Eigenschaften der ET Zellen in Kultur zu erhalten.

Mit der Zytokeratinfärbung zeigte sich eine deutliche Anfärbung fast aller Zellen (Bild 1). Mit dem Anti-Vimentin Clone V9 reagierten mehr als die Hälfte der Zellen positiv (Bild 2). In den frühen Passagen p1 und p10 fanden sich dagegen noch keine Vimentin-positiven Zellen (persönl. Mitteilung, Wolfinger).



**Bild 1** Immunhistochemische Anfärbung von Zytokeratinen in ET Zellen, p85  
Gegenfärbung mit Hämalaun, Vergrößerung 320 x



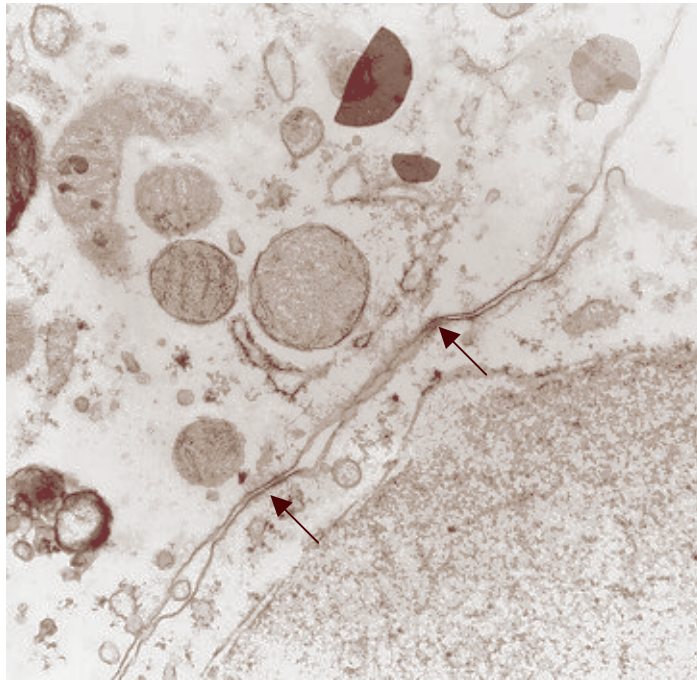
**Bild 2** Immunhistochemische Anfärbung von Vimentin in ET Zellen, p85  
Gegenfärbung mit Hämalaun, Vergrößerung 320 x

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten rundliche, leicht eckige Zellen, die größtenteils in Zellverbänden vorlagen. Der große, runde Zellkern war dezentral angeordnet, was auf eine bei Epithelzellen vorhandene Polarisierung hinweist.

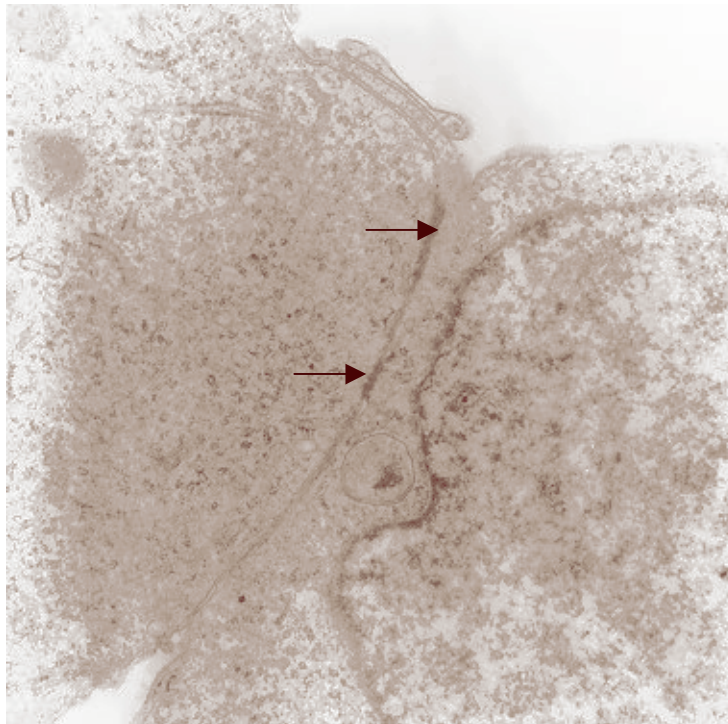
Die Aufnahmen wurden nach Zonulae adhaerentes (Gürteldesmosomen) und Zonulae occludentes (*tight junctions*) durchsucht. Gürteldesmosomen verlaufen gürtelförmig im apikalen Bereich als Teil der Schlußleisten von Epithelzellen. In ihrer Nachbarschaft ist meist eine Zonula occludens zu finden, die ebenfalls gürtelförmig um die Zelle verläuft. Im Bereich der Zonula occludens sind benachbarte Zellmembranen miteinander verschmolzen, so daß kein Interzellularspalt mehr nachweisbar ist.

Bei den ET Zellen konnten mehrmals sowohl Gürteldesmosomen als auch Zonulae occludentes dargestellt werden (Bild 3 a, b).

**a**



**b**



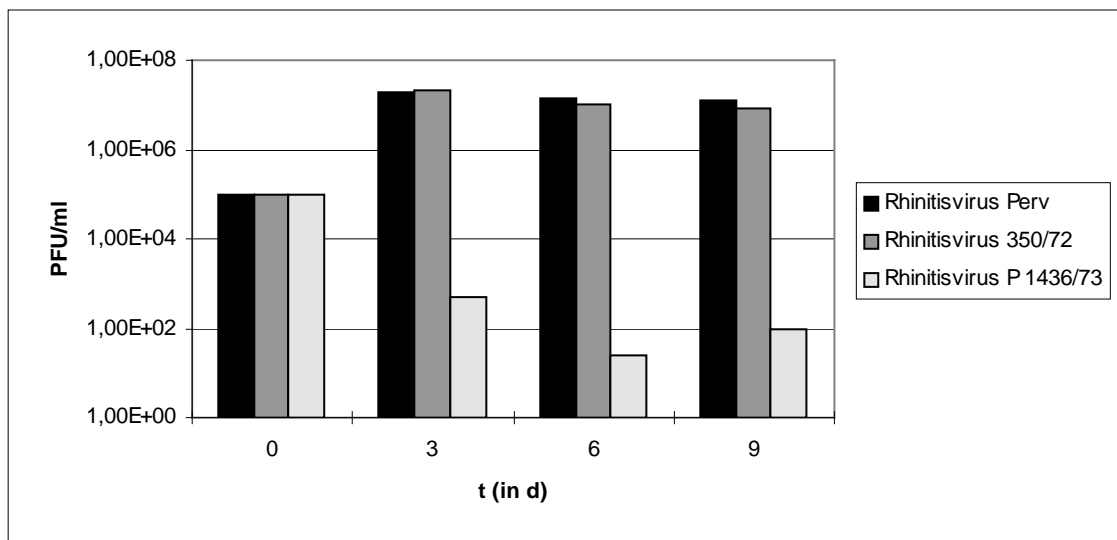
**Bild 3 a,b** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von ET Zellen, p85  
Vergrößerung a: 26000 x, b: 20800 x  
Auf beiden Bildern sind die für Epithelzellen typischen Zellverbindungen zu erkennen. ←

**3.2.1.2 Permissivität der ET Zellen für EHV-1, -2, -4, VSV, EAV, equines Rhinitisvirus Perv, Rhinitisvirus 350/72 sowie Rhinitisvirus P 1436/73 und deren Wachstumsverhalten im Vergleich mit ED Zellen**

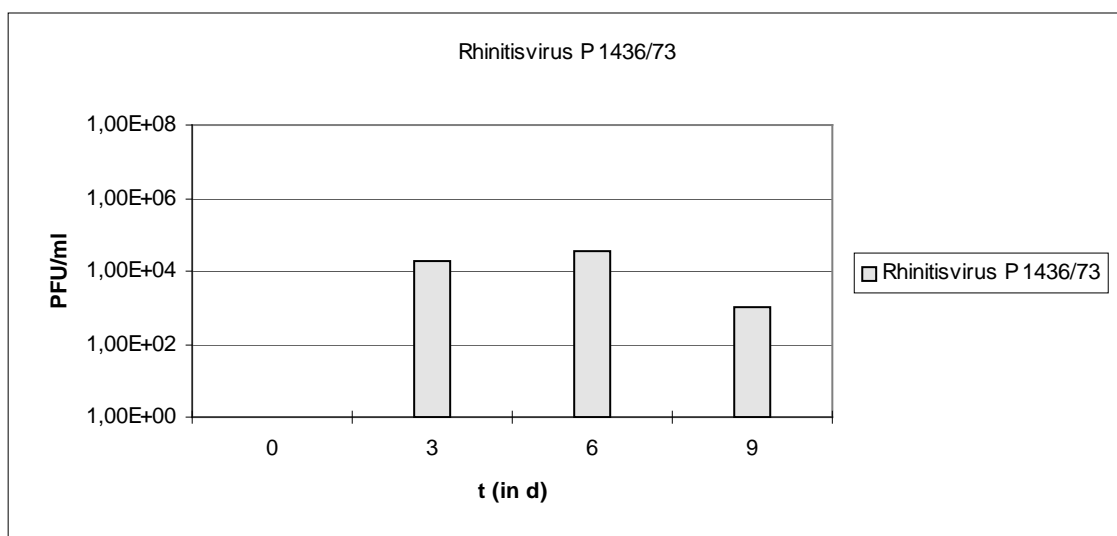
Die Permissivität der ET Zellen wurde im Vergleich mit ED Zellen für verschiedene Viren untersucht (3.1.6, 3.1.7).

Wachstumsverhalten equiner Rhinitisviren

In nachstehenden Diagrammen sind die Virustiter der equinen Rhinitisviren nach Infektion der ET Zellen und ED Zellen dargestellt.

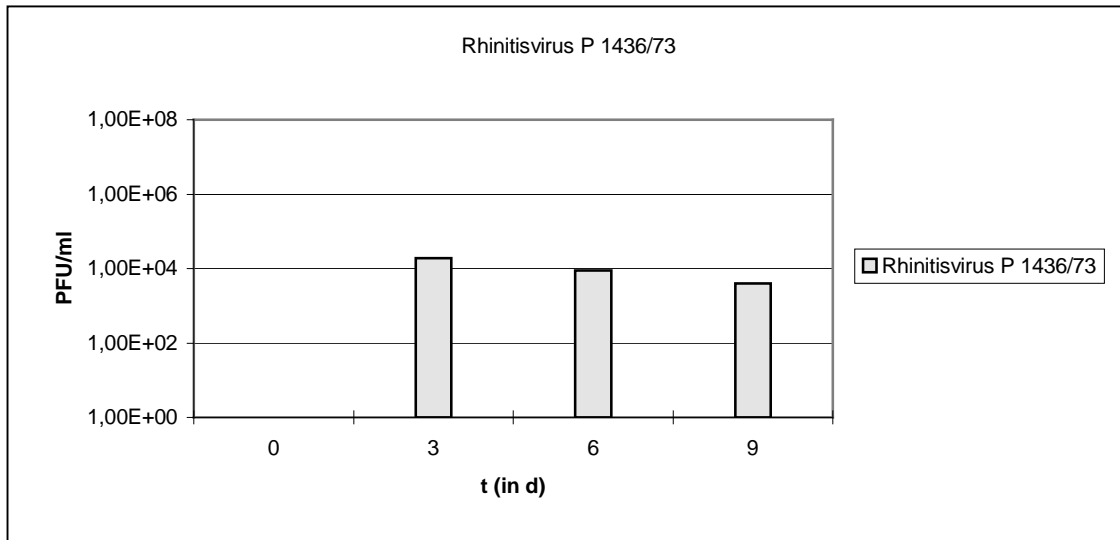


**Diagramm 1:** Virustiter der equinen Rhinitisviren in Zellkulturüberständen der ET Zellen

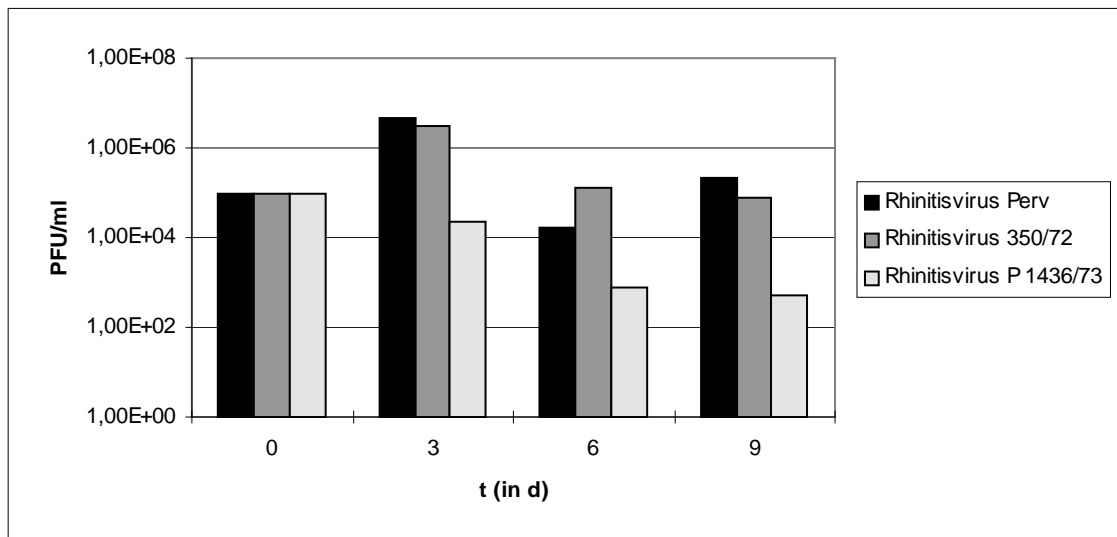


**Diagramm 2:** Virustiter des equinen Rhinitisvirus P 1436/73 nach Kokultivierung der ET Zellen

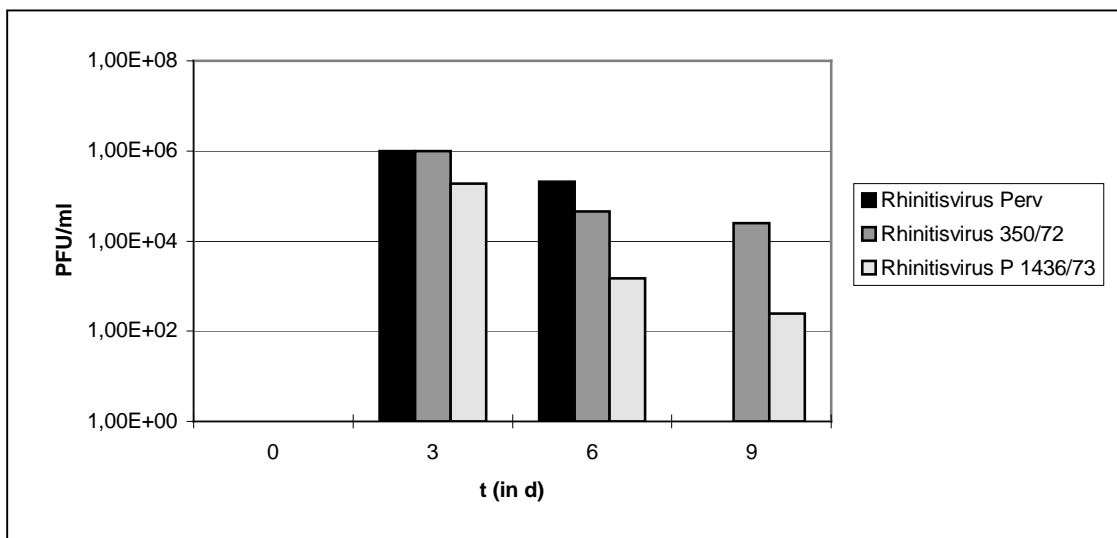
## Ergebnisse



**Diagramm 3:** Virustiter des equinen Rhinitisvirus P 1436/73 nach Lyse der **ED** Zellen

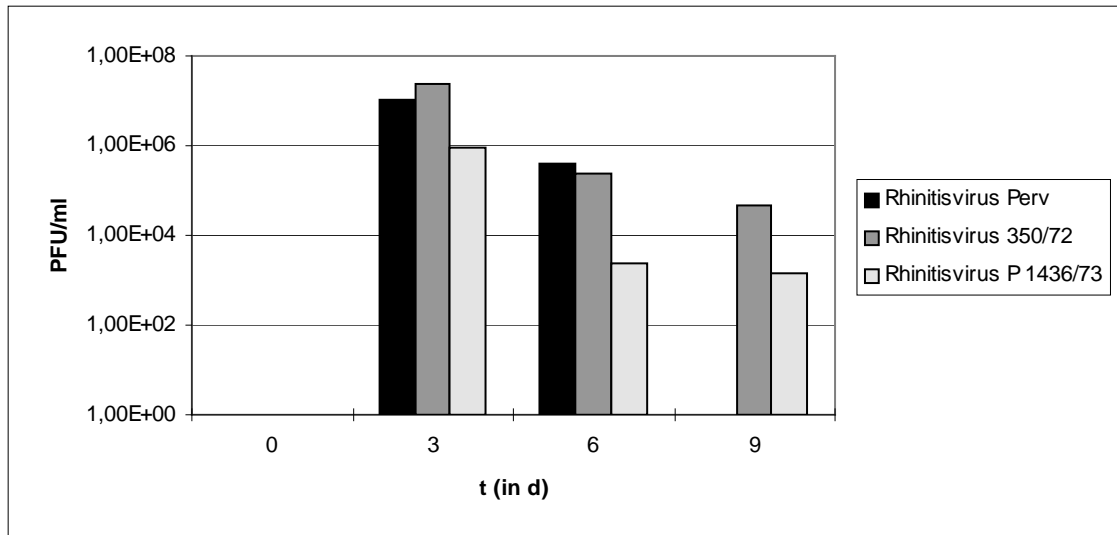


**Diagramm 4:** Virustiter der equinen Rhinitisviren in Zellkulturüberständen der **ED** Zellen



**Diagramm 5:** Virustiter der equinen Rhinitisviren nach Kokultivierung der **ED** Zellen

## Ergebnisse



**Diagramm 6:** Virustiter der equinen Rhinitisviren nach Lyse der **ED** Zellen

In nachstehender Tabelle 5 sind die Zellveränderungen bei ET Zellen und ED Zellen nach Infektion mit den equinen Rhinitisviren dargestellt.

**Tab. 5** Zellveränderungen bei ET Zellen und ED Zellen nach Infektion mit equinen Rhinitisviren

	Rhinitisvirus Perv	Rhinitisvirus 350/72	Rhinitisvirus P 1436/73
<b>ET</b>			
Erstinfektion	+++	+++	o
1. Passage	+++	+++	o
2. Passage	+++	+++	o
<b>ED</b>			
Erstinfektion	++	++	+
1. Passage	++	++	++
2. Passage	++	++	++

o keine Veränderung + vereinzelt Plaques ++ viele Plaques +++ vollständige Zellyse

Rhinitisvirus Perv und Rhinitisvirus 350/72 unterschieden sich nicht wesentlich in ihrem Wachstumsverhalten auf ET Zellen. Sie zeigten beide ein gutes Wachstum und führten nach spätestens 30h zur vollständigen Lyse der Zellen. Im Überstand wurden sehr hohe Titer von ca.  $10^7$  PFU / ml erreicht. Eine Kokultivierung bzw. Lyse der infizierten Zellen wurde nicht durchgeführt, da 3 Tage nach Infektion dafür nicht genügend intakte Zellen vorhanden waren.

Nach Infektion der ED Zellen erreichten beide Rhinitisviren etwas niedrigere Titer (ca.  $10^6$  PFU / ml). Dies betraf sowohl freies Virus im Überstand als auch latent vorhandenes und zellgebundenes Virus. Nach Lyse der Zellen erreichte vorher zellgebundenes Virus sogar Titerhöhen bis ca.  $10^7$  PFU / ml. Ausgeprägte Plaquebildung war vorhanden.

Im Gegensatz dazu konnten für Rhinitisvirus P 1436/73 nur sehr niedrige Titer von ca.  $10^2$  PFU / ml im Zellüberstand der ET Zellen nachgewiesen werden. Zellveränderungen wurden nicht beobachtet. Viel höhere Titer (ca.  $10^4$  PFU / ml) konnten allerdings mit Hilfe der Kokultivierung und nach Lyse der Zellen festgestellt werden, so daß trotz ausbleibenden zytopathologischen Effekten von einer produktiven Infektion der ET Zellen durch Rhinitisvirus P 1436/73 ausgegangen werden kann.

Nach Infektion mit Rhinitisvirus P 1436/73 zeigten die ED Zellen Plaquebildung. Auch hier wurden die höchsten Titer nach Kokultivierung bzw. Lyse der Zellen nachgewiesen ( ca.  $10^6$  PFU/ ml nach Lyse der Zellen im Gegensatz zu ca.  $10^3$  PFU / ml im Überstand).

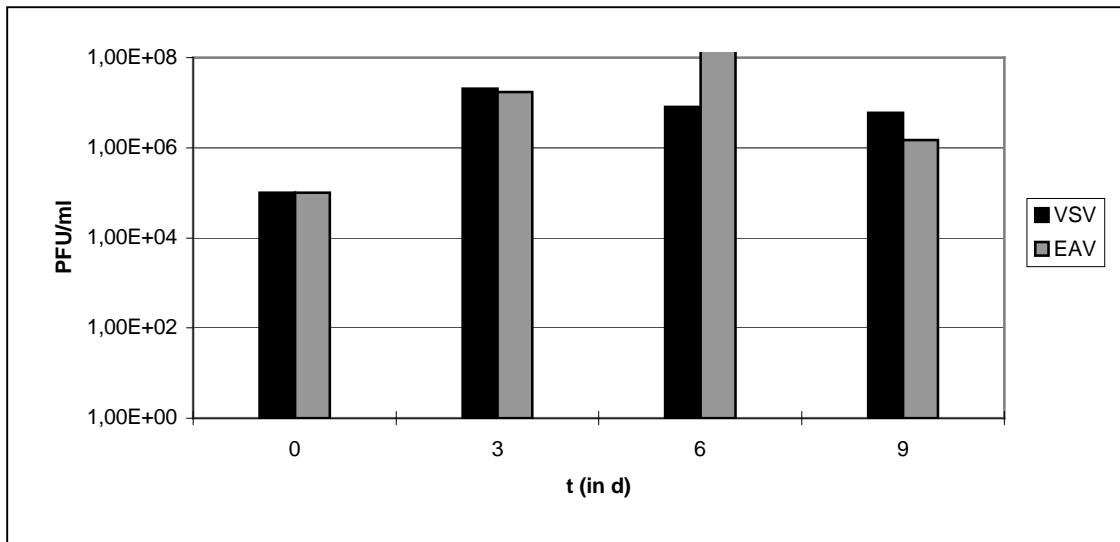
Wachstumsverhalten VSV und EAV

**Tab. 6** Zellveränderungen bei ET Zellen und ED Zellen nach Infektion mit VSV und EAV

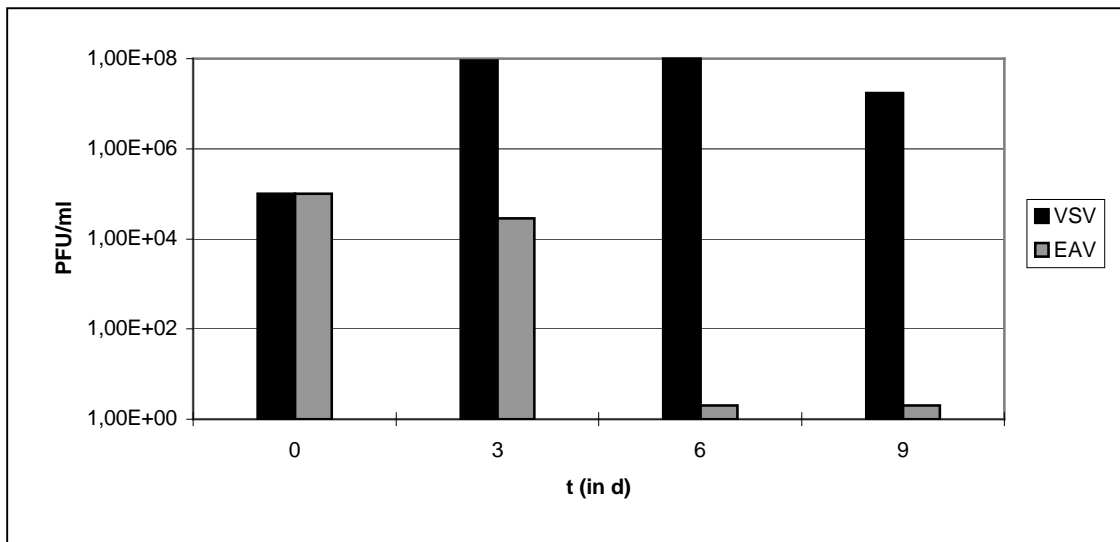
	VSV	EAV
<b>ET</b>		
Erstinfektion	+++	+++
1. Passage	+++	+++
2. Passage	+++	+++
<b>ED</b>		
Erstinfektion	+++	+
1. Passage	+++	o
2. Passage	+++	o

o keine Veränderung + vereinzelt Plaques ++ viele Plaques +++ vollständige Zellyse

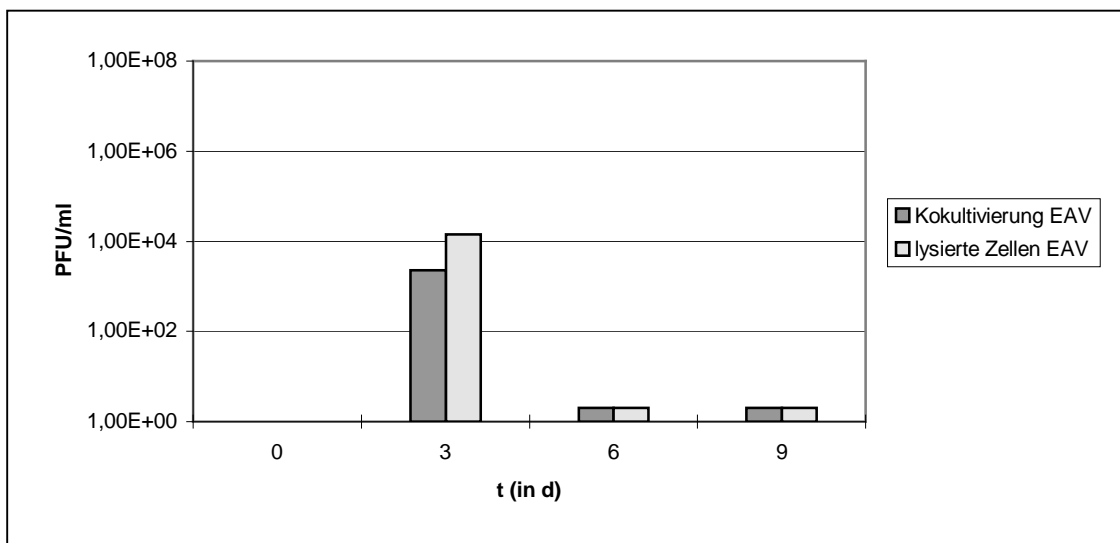
## Ergebnisse



**Diagramm 7:** Virustiter von VSV und EAV in Zellkulturüberständen der ET Zellen



**Diagramm 8:** Virustiter von VSV und EAV in Zellkulturüberständen der ED Zellen



**Diagramm 9:** Virustiter von EAV nach Kokultivierung und Lyse der ED Zellen



VSV zeigte auf beiden Zellarten sehr gutes Wachstum mit vollständiger Zellyse. Eine Kokultivierung bzw. Lyse der ET und ED Zellen wurde nicht durchgeführt, da drei Tage nach Infektion wiederum zuwenig intakte Zellen dafür vorhanden waren. Die max. erreichten Virustiter im Zellkulturüberstand von ET Zellen und ED Zellen unterschieden sich um den Faktor 10 voneinander (ca.  $10^7$  PFU / ml auf ET Zellen zu ca.  $10^8$  PFU / ml auf ED Zellen).

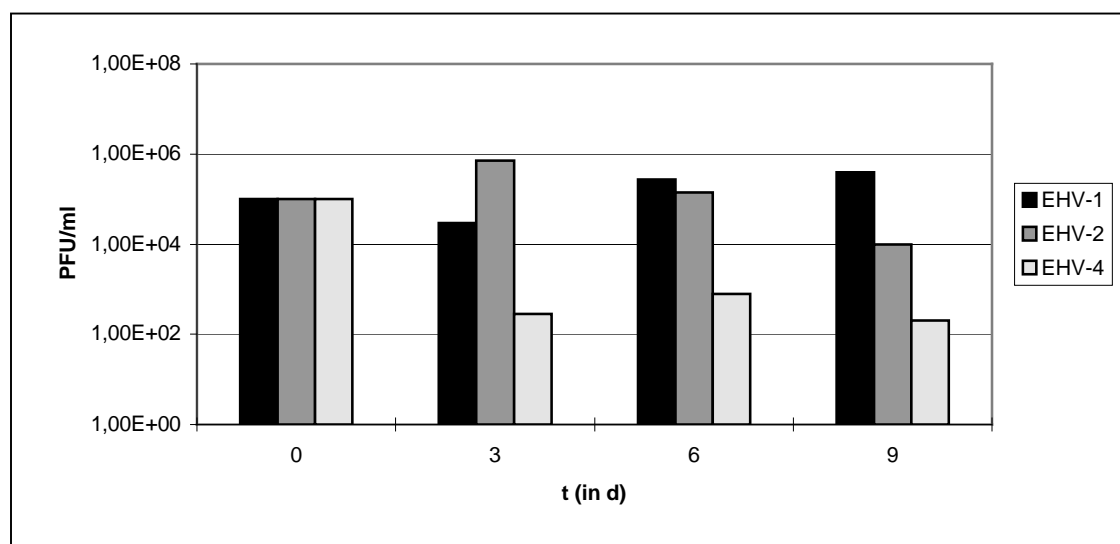
EAV zeigte mit ET Zellen ein völlig anderes Wachstumsverhalten als mit ED Zellen.

Mit ET Zellen kam es zur vollständigen Zerstörung der Zellen, deshalb wurden auch hier weder Kokultivierung noch Lyse der Zellen durchgeführt. Es wurden Virustiter im Überstand von max.  $10^8$  PFU / ml erreicht.

Dagegen stehen Virustiter von max.  $10^4$  PFU / ml mit ED Zellen in Überstand, Kokultivierung und lysierten Zellen. Nach der ersten Passage konnten keine meßbaren Titer für EAV mehr nachgewiesen werden, so daß von einer abortiven Infektion gesprochen werden kann.

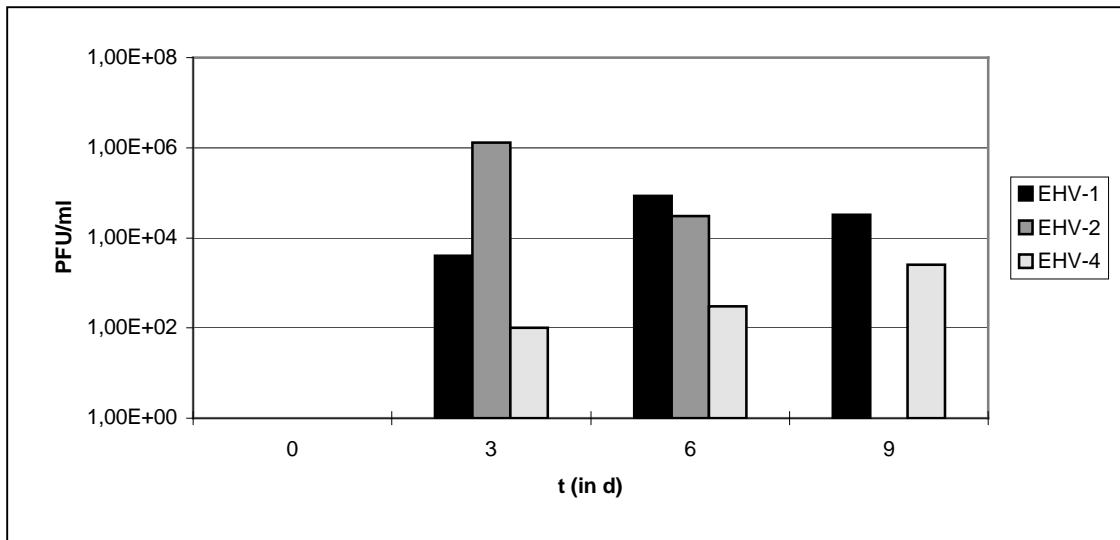
Kam es nach Erstinfektion noch zur geringgradigen Plaquebildung, konnten ab der ersten Passage keine Veränderungen an den ED Zellen mehr festgestellt werden.

#### Wachstumsverhalten EHV-1, -2 und -4

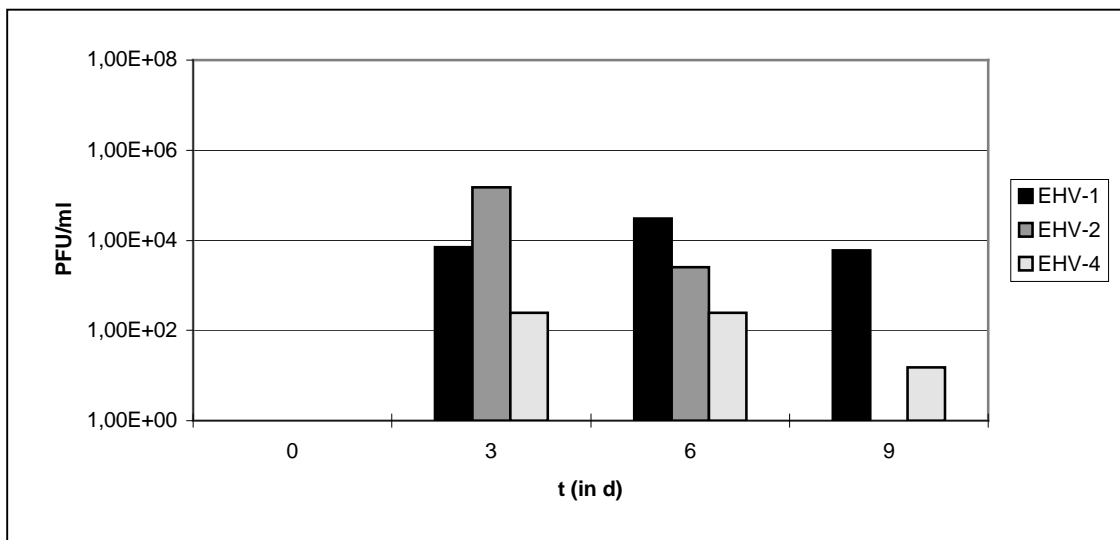


**Diagramm 10:** Virustiter von EHV-1, -2 und -4 in Zellkulturüberständen der ET Zellen

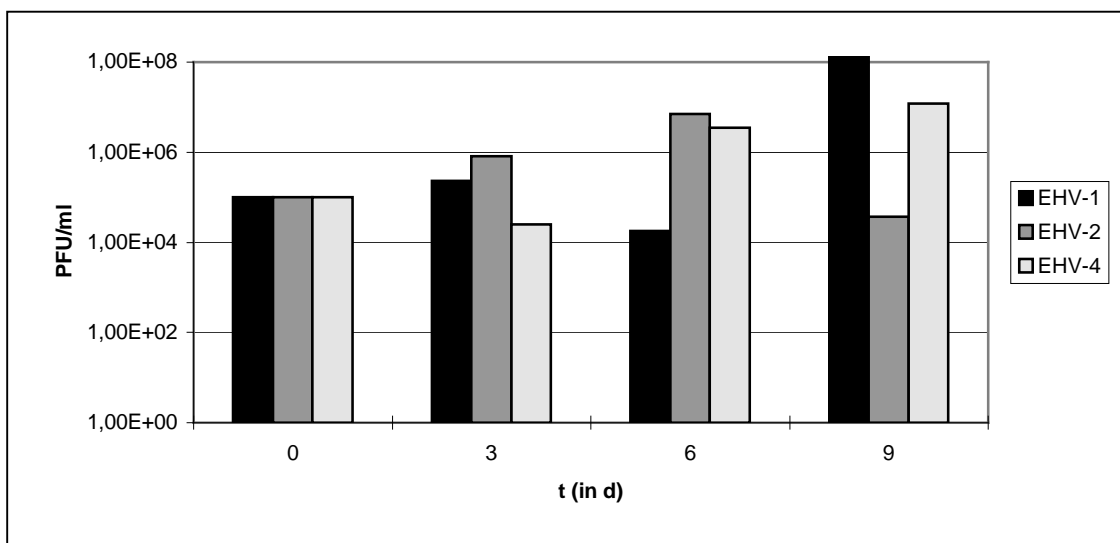
## Ergebnisse



**Diagramm 11:** Virustiter von EHV-1, -2 und -4 nach Kokultivierung der ET Zellen

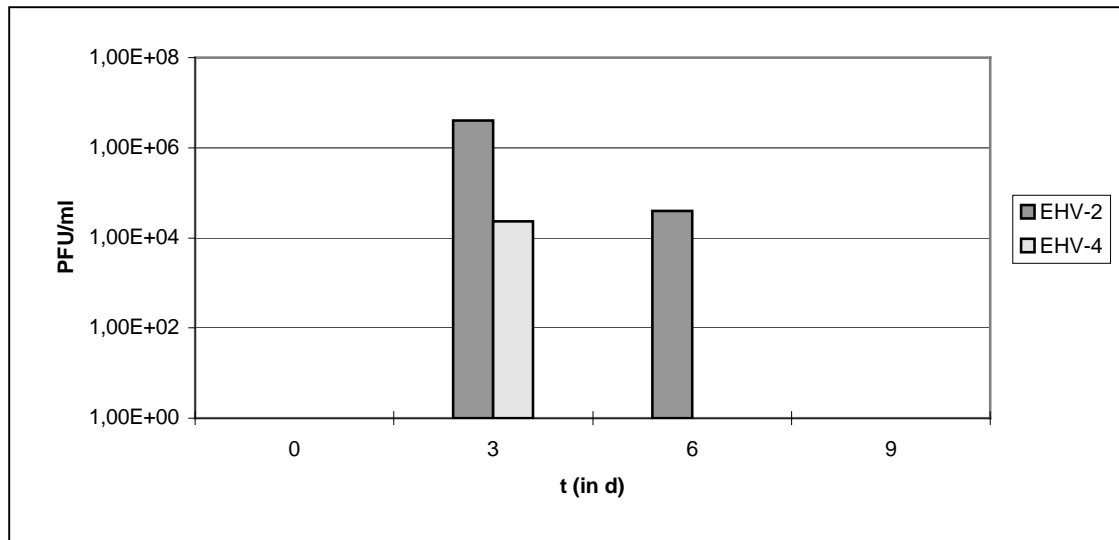


**Diagramm 12:** Virustiter von EHV-1, -2 und -4 nach Lyse der ET Zellen

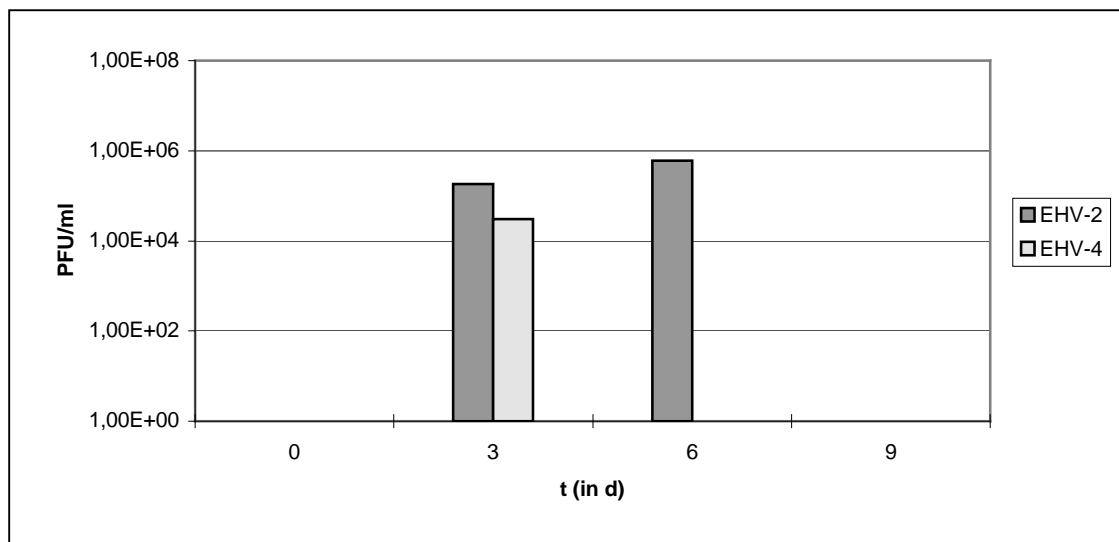


**Diagramm 13:** Virustiter von EHV-1, -2 und -4 in Zellkulturüberständen der ED Zellen

## Ergebnisse



**Diagramm 14:** Virustiter von EHV-2 und -4 nach Kokultivierung der ED Zellen



**Diagramm 15:** Virustiter von EHV-2 und -4 nach Lyse der ED Zellen

EHV-1 erreichte mit ET Zellen sowohl im Überstand als auch in den kokultivierten und lysierten Zellen relativ hohe Titer (bis ca.  $10^5$  PFU / ml im Überstand), was trotz nur geringgradiger Zellyse nach der zweiten Passage für eine produktive Infektion spricht.

Mit ED Zellen zeigte EHV-1 ein sehr gutes Wachstum mit vollständiger Zellyse und Titerhöhen bis ca.  $10^7$  PFU / ml, so daß hier keine Kokultivierung und Lyse der Zellen durchgeführt werden konnte.

EHV-2 führte ab der ersten Passage zu einer lytischen Infektion der ET Zellen, nach Erstinfektion konnten noch keine Veränderungen der Zellen beobachtet werden. Es wurden Titerhöhen von ca.  $10^5$  PFU / ml im Überstand bzw. ca.  $10^6$  PFU / ml durch Kokultivierung erreicht. Nach der zweiten Passage kam es wiederum zur vollständigen Zerstörung der Zellen.

## Ergebnisse

---

Damit zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zum Wachstumsverhalten von EHV-2 mit ED Zellen. Hier kam es früher (ab Erstinfektion) zur Lyse der Zellen, und es wurden um den Faktor 10 höhere Virustiter erreicht (ca.  $10^6$  PFU / ml in Überstand und Kokultivierung).

EHV-4 erreichte mit ET Zellen sehr niedrige Titer (max.  $10^3$  PFU / ml nach Kokultivierung). Zellveränderungen wurden ebenfalls nicht beobachtet.

Im Gegensatz dazu wurden mit ED Zellen für EHV-4 Virustiter bis ca.  $10^8$  PFU / ml (nach der zweiten Passage) im Überstand erreicht, weiterhin verursachte EHV-4 Plaquebildung bis hin zur vollständigen Zellzerstörung.

**Tab. 7** Zellveränderungen bei ET Zellen und ED Zellen nach Infektion mit EHV-1, -2 und -4

	EHV-1	EHV-2	EHV-4
<b>ET</b>			
Erstinfektion	o	o	o
1. Passage	o	++	o
2. Passage	+	+++	o
<b>ED</b>			
Erstinfektion	+++	++	++
1. Passage	+++	++	+++
2. Passage	+++	+++	+++

o keine Veränderung + vereinzelt Plaques ++ viele Plaques +++ vollständige Zellyse