

3.2.1.3 β -Aktin-PCR und Untersuchung auf DNA-Kontamination

In keinem Fall wurde eine DNA-Kontamination der präparierten RNA festgestellt.

Das Strukturprotein β -Aktin, welches in allen eukaryoten Zellen vorkommt, konnte in jeder Stichprobe nachgewiesen werden.

3.2.1.4 Zytokin-mRNA-Expression durch ET Zellen

Von Interesse waren in diesem Versuch sowohl das generell vorhandene Zytokinspektrum als auch Änderungen in der Zytokinexpression nach Stimulation / Virusinfektion.

Zytokin-mRNA-Expression vor Infektion / Stimulation

Die ET Zellen zeigten sich in der Lage, mRNA für equines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-11 zu exprimieren. Für alle Zytokine fand schon eine Expression vor Infektion / Stimulation statt. Für GM-CSF und TNF α konnte in keinem Fall mRNA nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde eine Abhängigkeit der Zytokin-mRNA-Expression von der Anzahl der Passagen festgestellt: In der 11. und 13. Passage war noch mRNA für die sechs nachgewiesenen Zytokine vorhanden, für IL-10 entstanden allerdings deutlich schwächere Banden auf dem Agarose-Gel im Vergleich zur 9. Passage. Für IL-11, IL-6, IL-1 β und IL-1 α konnten nicht zu jedem Zeitpunkt Banden auf dem Gel dargestellt werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß sich die mRNA-Expression für diese Zytokine an der Nachweisgrenze befand. Bei dem Infektionsversuch in der 25. Passage ergab sich nur noch für IL-10 ein positives Ergebnis, in der 48. Passage konnten überhaupt keine Zytokine mehr nachgewiesen werden.

Bei der verwendeten Methode der RT-PCR handelt es sich aufgrund der exponentiellen Vervielfältigung der cDNA um eine qualitative Nachweismethode, so daß quantitative Aussagen nur unter Vorbehalt möglich sind. Dies muß bei der Aussage berücksichtigt werden, daß keine Unterschiede in der Menge der vor Infektion / Stimulation produzierten mRNA zwischen den nachgewiesenen Zytokinen vorhanden zu sein schienen.

Für alle Zytokine konnte mRNA schon eine Stunde nach Versuchsbeginn nachgewiesen werden. Ein allgemeiner Trend zur Ab- oder Zunahme der produzierten Menge an mRNA

über die Zeit konnte hier nicht festgestellt werden. Für Aussagen darüber bedarf es ebenfalls der Quantifizierung.

Zytokin-mRNA-Expression nach Verwendung von unspezifischen Stimulantien

Nach Stimulation mit PMA-Ca, PWM, LPS und PHA-M. (3.1.8.1) konnte keine mRNA für weitere Zytokine als die bereits nachgewiesenen gemessen werden. In nachstehender Tabelle ist die Änderung der mRNA-Zytokin-Expression der ET Zellen in der 11. Passage nach Stimulation mit PWM und PMA-Ca im Vergleich zur nicht-stimulierten Zellkontrolle dargestellt. Über Änderungen der Expression über die Zeit sowohl vor als auch nach Stimulation konnten keine Angaben gemacht werden, da kein allgemeiner Trend festgestellt und eine Quantifizierung nicht durchgeführt wurde.

Tab. 8 mRNA-Expression durch ET Zellen in mit PWM oder PMA-Ca stimulierten und in nicht-stimulierten Zellen

	IL-1α	IL-1β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-11
Zell-kontrolle	kaum nachweisb.	kaum nachweisb.	kaum nachweisb.	deutlich	deutlich	negativ (außer 72h)
PWM	—	deutliche Erhöhung	schwache Erhöhung	—	negativ	Bande vorhanden
PMA-Ca	deutliche Erhöhung	deutliche Erhöhung	schwache Erhöhung	—	deutliche Erhöhung	—

kaum nachweisb.: kaum nachweisbar — : kein Unterschied
 fettgedruckte Schreibweise: quantitative Auswertung möglich

Im Hinblick auf die Expression vor Stimulation wird deutlich, daß in der 11. Passage der ET Zellen nur noch mRNA für IL-8 und IL-10 in größeren Mengen vorhanden zu sein scheint. Eine quantitative Auswertung der exprimierten mRNA kann dann vorgenommen werden, wenn eine Expression von Zytokin-mRNA im Unterschied zu einem negativen Vergleichswert nachgewiesen wurde. Dies traf in zwei Fällen für den Einsatz von PWM zu: Die mRNA für IL-10 wurde im Vergleich zur Zellkontrolle deutlich supprimiert, für IL-11 kam es zu einer Erhöhung der Expression nach Stimulation. Ansonsten können quantitative Aussagen nur unter Vorbehalt gemacht werden. Es scheint der Trend zu einer Stimulierung der Zytokin-mRNA-Expression durch PWM und PMA-Ca (Bild 4 a, b) zu bestehen (Ausnahme: Suppression von IL-10 durch PWM).

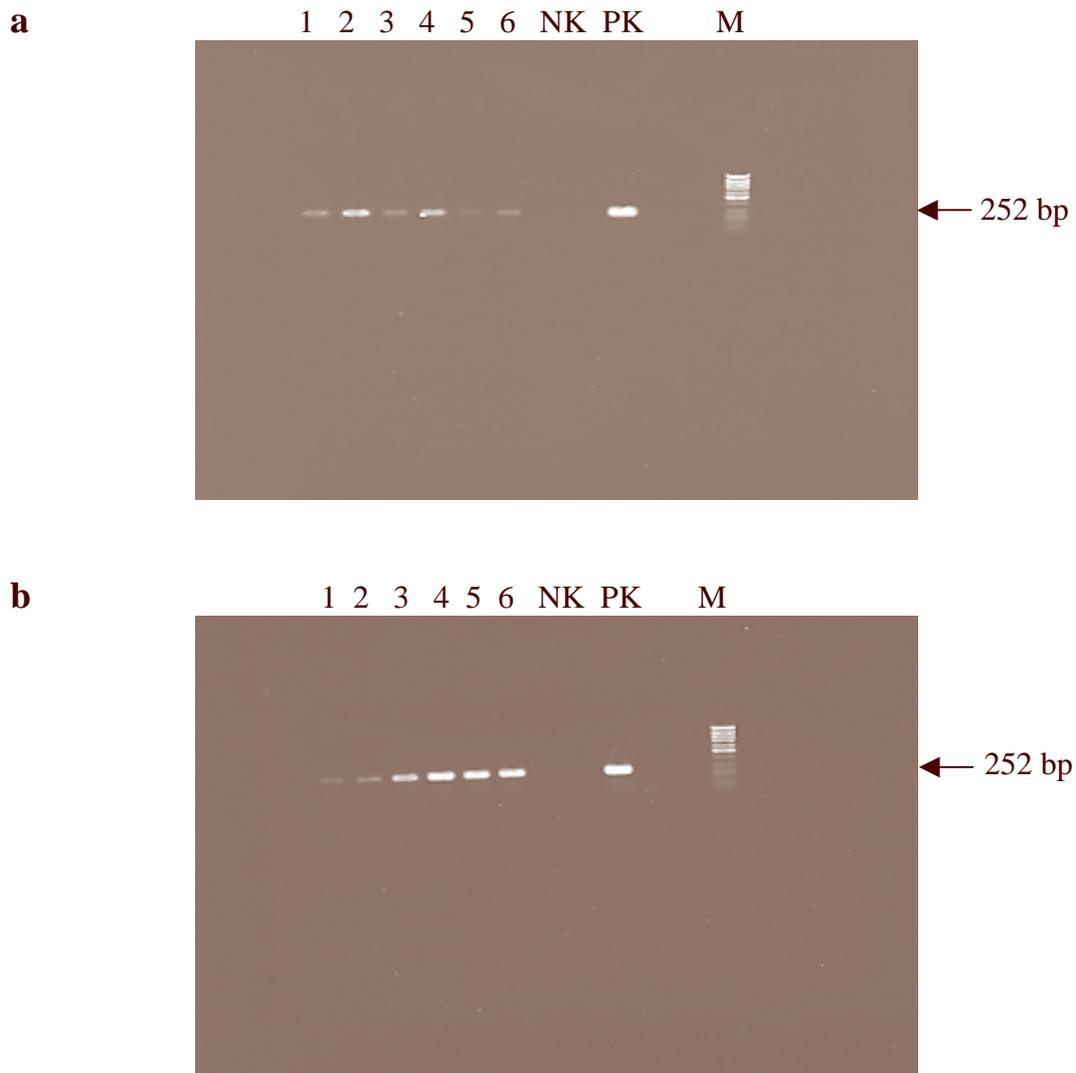


Bild 4 a,b mRNA für **IL-10** in ET Zellen vor (a) und nach (b) Stimulation mit PMA-Ca
1-6: IL-10 nach 1h, 2h, 4h, 8h, 16h und 24h; NK: Negativkontrolle; PK: Positivkontrolle; M: 50 bp Leiter

Die ET Zellen wurden in der 13. Passage mit LPS und PHA-M stimuliert.

Tab. 9 mRNA-Expression durch ET Zellen in mit LPS oder PHA-M stimulierten Zellen

	IL-1α	IL-1β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-11
Zell-kontrolle	negativ	kaum nachweisb.	kaum nachweisb.	deutlich	schwach vorhanden	kaum nachweisb.
LPS	schwache Erhöhung	—	—	—	—	—
PHA-M	schwache Erhöhung	—	—	—	—	—

kaum nachweisb.: kaum nachweisbar —: kein Unterschied
fettgedruckte Schreibweise: quantitative Auswertung möglich

Im Vergleich mit der Expression vor Stimulation in der 11. Passage wird deutlich, daß die mRNA-Expression durch die ET Zellen weiter abgenommen hat. mRNA für IL-1 α konnte basal nicht mehr nachgewiesen werden. LPS und PHA-M erhöhten beide die mRNA-Expression für IL-1 α .

Zytokin-mRNA-Expression nach Virusinfektion

Es wurden nur die Infektionen der ET Zellen in der 9. Passage mit EHV-1, -2, -4 und beiden ERAV sowie in der 13. Passage mit EHV-2 ausgewertet (3.1.8.2), da die Menge an nachgewiesener mRNA mit steigender Passage deutlich nachließ (siehe oben) und nach Infektion in der 25. Passage mit den equinen Rhinitisviren nur noch IL-10 exprimiert wurde. Nach Infektion in der 48. Passage konnte keine mRNA für die untersuchten equinen Zytokine mehr nachgewiesen werden.

Bei dem Infektionsversuch in der 9. Passage mit EHV-1, -2 und -4 sowie Rhinitisvirus Perv und Rhinitisvirus 350/72 wurden nach 4 h und 24 h infizierte Zellen und Negativkontrollen eingefroren. Das EHV-2-Genom enthält ein IL-10 ähnliches Gen, welches durch die von uns ausgewählten Primer für IL-10 erkannt wurde. Die Änderung der Expression von mRNA für IL-10 nach Infektion mit EHV-2 wurde deshalb nicht beurteilt, da mit den IL-10-Primern auch EHV-2 nachgewiesen werden konnte. Auch in diesem Versuch konnten nach Infektion keine weiteren als die bereits nachgewiesenen Zytokine gemessen werden. Es stellte sich heraus,

daß 4h nach Infektion die mRNA-Expression für alle Zytokine (außer IL-8) im Vergleich zur Zellkontrolle vermindert war (Bild 5 a, b). Für IL-8 konnte kein Unterschied zur Negativkontrolle festgestellt werden (Bild 5 c). Auch hier bedarf es wieder der Quantifizierung, um eindeutige Aussagen treffen zu können. Die Änderungen der Zytokin-mRNA-Expression 24 h nach Infektion sind in nachstehender Tabelle 10 dargestellt.

Tab. 10 Zytokin-mRNA-Expression durch ET Zellen in infizierten und nicht-infizierten Zellen nach 24 h

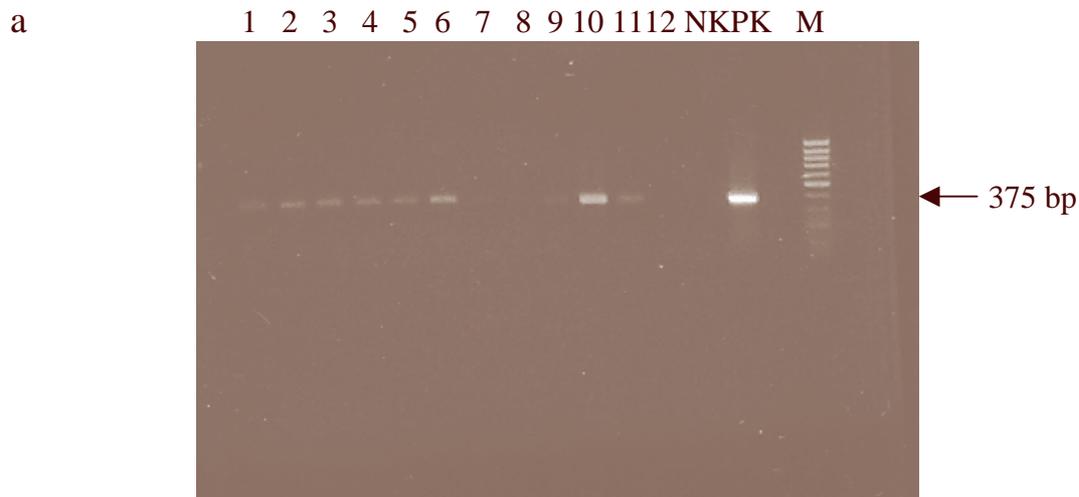
	IL-1α	IL-1β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-11
Zellkontrolle	vorhanden	vorhanden	vorhanden	vorhanden	vorhanden	negativ
EHV-1	deutliche Erhöhung	—	schwache Erhöhung	—	—	—
EHV-2	—	negativ	schwache Erhöhung	—	nicht auswertbar	—
EHV-4	deutliche Erhöhung	—	—	—	—	—
Rhinitis-Virus Perv	—	negativ	deutliche Erniedrig.	—	deutliche Erhöhung	deutlich vorhanden
Rhinitis-virus 350/72	deutliche Erniedrig.	negativ	negativ	—	deutliche Erhöhung	deutlich vorhanden

— : kein Unterschied fettgedruckte Schreibweise: quantitative Auswertung möglich

Aus der obenstehenden Tabelle wird deutlich, daß kein einheitliches Muster vorliegt. Eine Expression von mRNA für IL-11 in der Zellkontrolle konnte nach 24 h nicht mehr nachgewiesen werden. Aufgeschlüsselt nach Zytokinen besteht ein Trend der Hochregulierung der mRNA-Expression von IL-1 α , IL-10 und IL-11 nach viraler Infektion (IL-10 und IL-11 durch beide Rhinitisviren, IL-1 α durch EHV-1 und -4). IL-1 β und IL-6 (Bild 5 b) werden eher supprimiert (durch EHV-2 und beide Rhinitisviren). Beide Rhinitisviren führten zu einer deutlichen Erhöhung der mRNA für IL-10 und IL-11. IL-11 konnte vor Infektion nicht nachgewiesen werden, nach Infektion stellte sich für beide Rhinitisviren eine deutliche Bande auf dem Gel dar (Bild 5 a), so daß in diesem Fall sogar eine quantitative Aussage gemacht werden kann. Die Suppression von mRNA für IL-1 β und IL-6 nach Infektion mit beiden Rhinitisviren ist ebenfalls quantitativ nachweisbar (Herunterregulierung von IL-6 nur durch Rhinitisvirus 350/72). Die Infektion mit EHV-2 führte nach 24 h zu einer eindeutigen Suppression von mRNA für IL-1 β , mRNA für IL-6 scheint 24 h nach Infektion ebenfalls in geringerer Menge vorzuliegen. Aussagen über die Beeinflussung der mRNA-Expression der ET Zellen durch EHV-1 können aufgrund der

fehlenden Quantifizierung wiederum nur unter Vorbehalt gemacht werden: So scheint EHV-1 nach 24 h die Produktion von mRNA für IL-1 α und IL-6 durch die ET Zellen zu erhöhen. Selbst für EHV-4, welches ET Zellen nicht produktiv infiziert, scheinen Veränderungen der Zytokin-mRNA-Expression vorhanden zu sein. Diese Tatsache zeigt deutlich, wie notwendig eine Quantifizierung der mRNA für die Interpretation der Ergebnisse ist.

Die ET Zellen wurden in der 13. Passage nochmals mit EHV-2 infiziert. Auch in diesem Versuch ergab sich eine eindeutige Verringerung der Menge an mRNA für IL-1 β nach Infektion. In der Negativkontrolle war mRNA für IL-1 β zu jedem Zeitpunkt nach Infektion vorhanden, dagegen konnte in den infizierten Zellen ab 24 h nach Infektion keine mRNA-Expression für IL-1 β mehr nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die anderen Zytokine konnten keine Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen festgestellt werden. Die Ursache lag darin, daß aufgrund der steigenden Passage der ET Zellen außer für IL-8 nur noch sehr schwache Banden auf dem Gel erschienen.



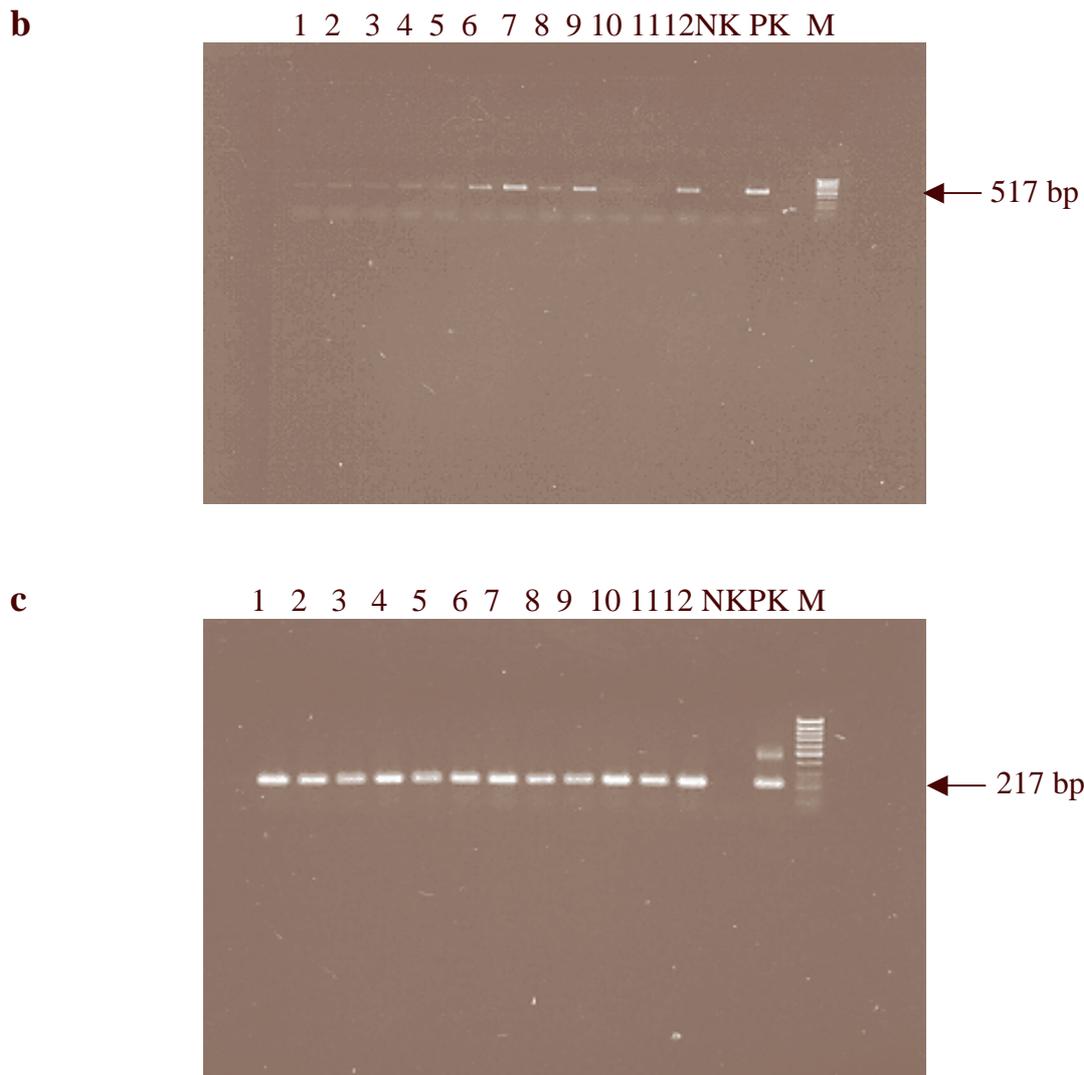


Bild 5 a,b,c mRNA für **IL-11** (a), **IL-6** (b) und **IL-8** (c) in ET Zellen 4h (1-6) und 24h (7-12) nach Infektion
 1,7; EHV-1; 2,8: EHV-2; 3,9: EHV-4; 4,10: equines Rhinitisvirus Perv;
 5,11: equines Rhinitisvirus 350/72; 6,12: Zellkontrolle; NK: Negativkontrolle; PK: Positivkontrolle; M: 50 bp Leiter

3.2.2 Anfertigung primärer Trachealepithelkulturen

Es konnten in jedem Fall Epithelzellen isoliert werden (3.1.9), die Adhäsion an die Zellkulturplatten zeigten und begannen zu proliferieren. An Zellkulturmedien wurden DMEM mit 5% NCS, SAGM und BEGM verwendet, es konnte zwischen ihnen kein Unterschied im Einfluß auf das Wachstumsverhalten der Epithelzellen festgestellt werden. Mikroskopisch wurde bei einigen Versuchen eine geringgradige Kontamination mit Fibroblasten festgestellt. Für Infektionsversuche war eine zu geringe Anzahl an Primärzellen vorhanden, so daß die Zellen subkultiviert werden sollten. Leider erwiesen sich die Primärzellen als äußerst

empfindlich gegenüber allen eingesetzten Dissoziationslösungen, so daß es regelmäßig zu einer Zerstörung der Epithelzellen durch das Passagieren kam bzw. zu deren Überwucherung mit Fibroblasten nach dem Passagieren.

Zusammenfassend ist es nicht gelungen, nochmals eine Primärkultur von equinem Trachealepithel anzufertigen, die für weitere Infektionsversuche genutzt werden konnte.

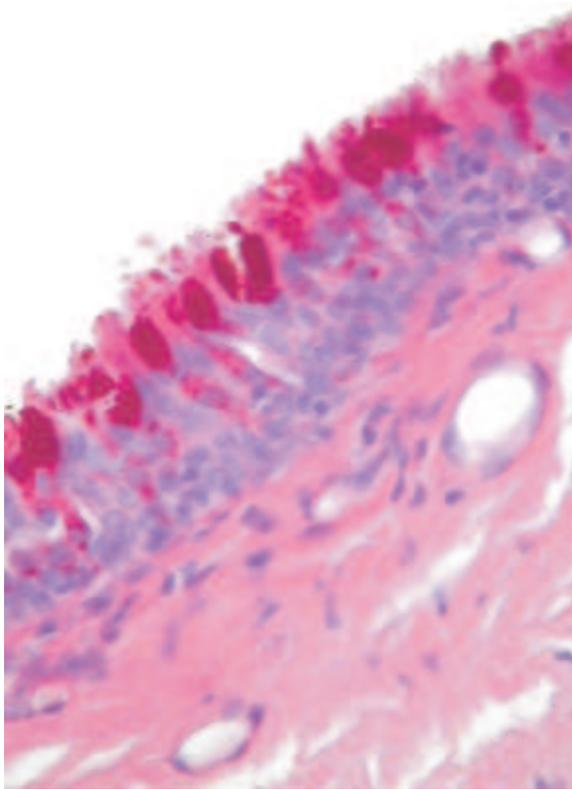
3.2.3 Zytokinspektrum im Trachealepithel von weiteren Pferden

3.2.3.1 Histologische Beurteilung

Mit Hilfe der Färbung nach Pappenheim zeigte sich, daß der Großteil der durch Abschaben mit dem Skalpell gewonnenen Zellen (3.1.10.1) aus Trachealepithelzellen bestand (Bild 7 und 8). Vereinzelt konnten auch Makrophagen und Lymphozyten sowie bei einem Pferd vermehrt neutrophile Granulozyten (Pferd Nr.7) nachgewiesen werden.

Bei der histologischen Untersuchung der Trachealringe wurde deutlich, daß durch Abschaben mit dem Skalpell die oberste Zellschicht bis zur Basalmembran entnommen wurde (Bild 6 a, b). Die Basalmembran blieb vollständig erhalten. In den intakten Gewebeproben stellte sich das Trachealepithel mit vereinzelter mononukleärer Zellinfiltration dar.

a



b

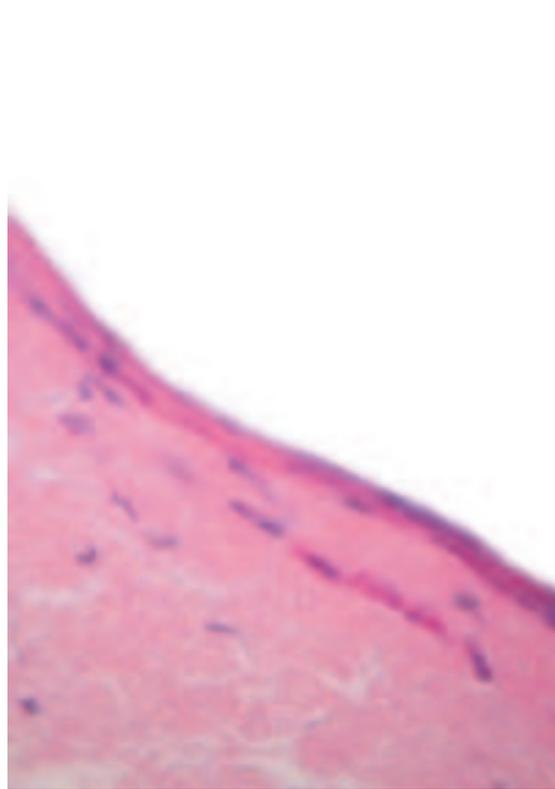


Bild 6 a,b Trachea, Pferd Nr. 14
a: intaktes Trachealepithel, b: nach Abschaben mit dem Skalpell,
Basalmembran vollständig erhalten
PAS-Färbung, Vergrößerung 320 x

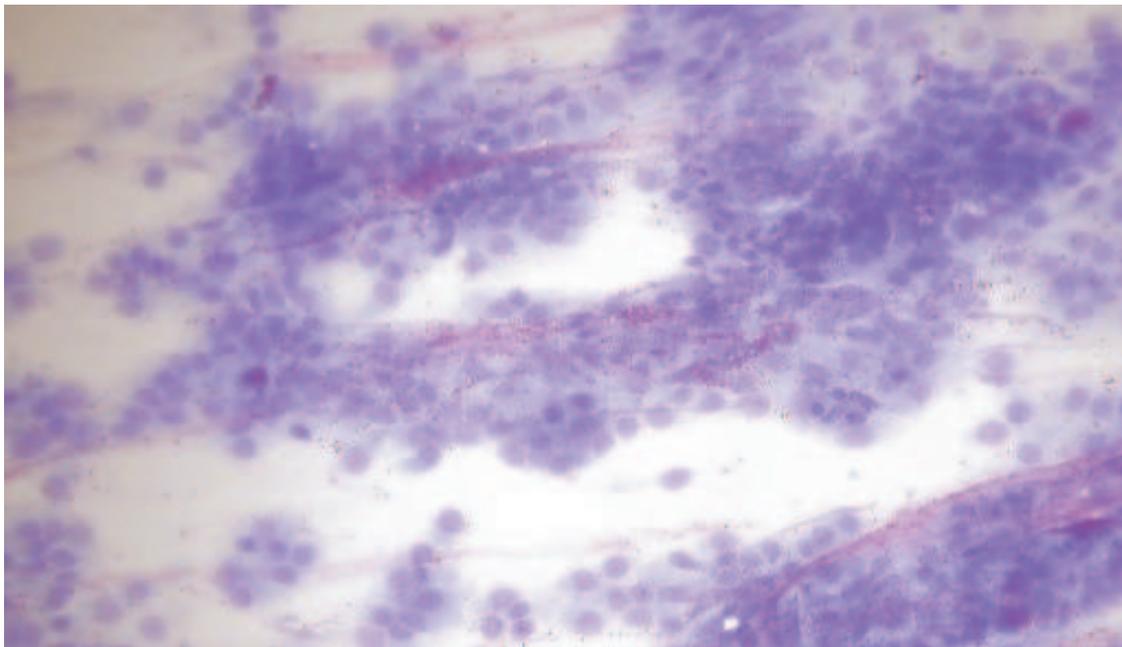


Bild 7 Ausstrich des abgeschabten Trachealepithels
Färbung nach Pappenheim, Vergrößerung 160 x

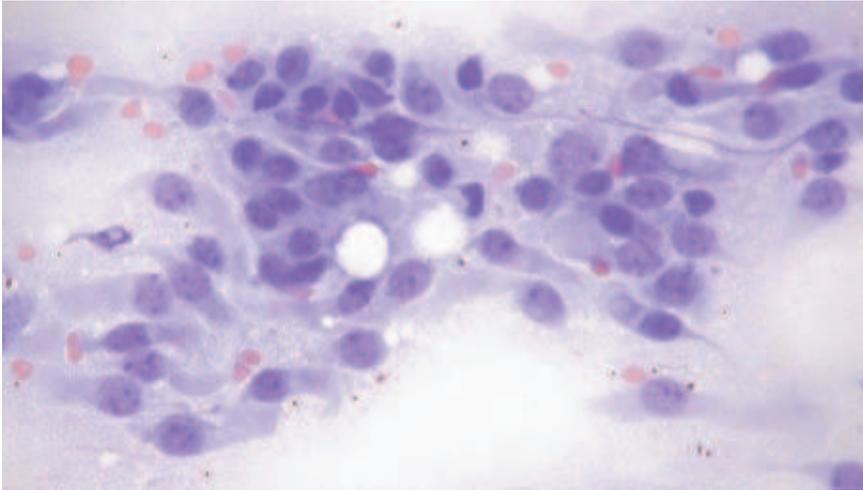


Bild 8 Ausstrich des abgeschabten Trachealepithels
Färbung nach Pappenheim, Vergrößerung 320 x

3.2.3.2 Zytokinspektrum vor Kultivierung

Das Zytokinspektrum des Trachealepithels *ex vivo* sollte in den durch Abschaben mit dem Skalpell gewonnenen Proben ermittelt werden (3.1.10.1).

Es konnte – wie bei den Equinen Trachealzellen- mRNA für equines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-11 nachgewiesen werden, zusätzlich aber auch für IL-2, GM-CSF, TNF α und IFN γ (Bild 10).

Tab. 11 mRNA in durch Abschaben mit dem Skalpell gewonnenen Proben vor Infektion

Pfd. Nr.	IL -1 α	IL -1 β	IL -2	IL -4	IL -5	IL -6	IL -8	IL -10	IL -11	IL -13	GM-CSF	TNF - α	IFN - γ
1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
2	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
6	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
8	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
9	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
10	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
11	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
12	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
13	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
14	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
15	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-

Pfd.: Pferd + mRNA nachgewiesen - keine mRNA nachweisbar

Aus obenstehender Tabelle wird deutlich, daß sich die Zytokinmuster der einzelnen Pferde stark voneinander unterscheiden und nicht von einem einheitlichen Spektrum gesprochen werden kann.

Das einzige Interleukin, für welches mRNA bei jedem Pferd nachgewiesen werden konnte, war IL-8 (100% der Pferde). mRNA für IL-4, IL-5 und IL-13 konnten bei keinem der untersuchten 15 Pferde nachgewiesen werden (0%). Bei 13% der Pferde (zwei von 15 Pferden) konnte mRNA für equines IL-11, TNF α bzw. GM-CSF gefunden werden. Davon wurden für ein Pferd (Nr.1) alle drei Zytokine nachgewiesen. Für IL-1 α reagierten drei der Pferde positiv (20%). mRNA für IFN γ konnte bei 8 Pferden gefunden werden (53%), 60% der Pferde (9 von 15) zeigten sich positiv für IL-1 β , IL-6 bzw. IL-10. IL-2 dagegen konnte für 10 Pferde nachgewiesen werden (67%).

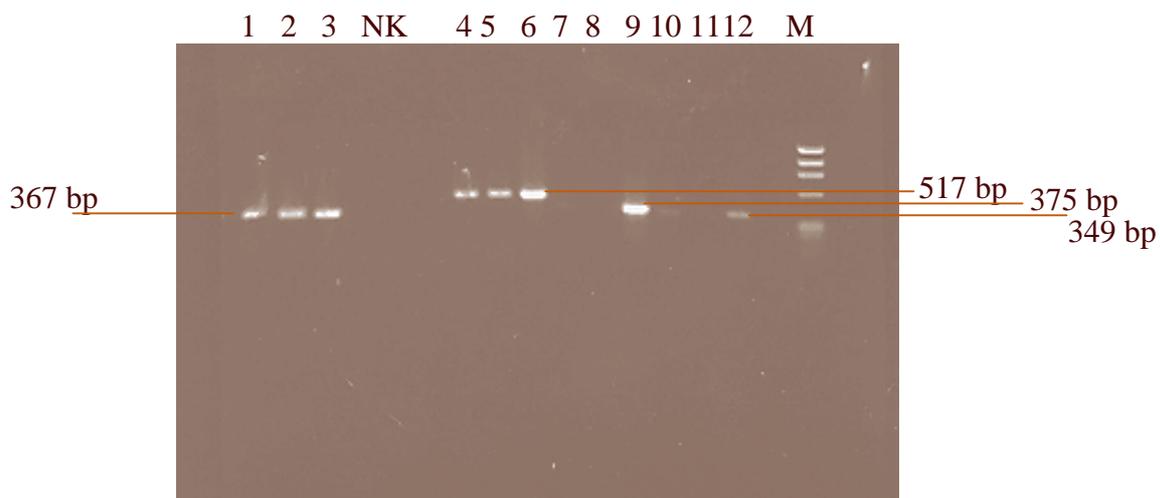


Bild 9 mRNA für **IL-1 β** (1-3), **IL-6** (4-6), **IL-11** (7-9) und **TNF α** (10-12) in abgeschabten Zellen; 1,4,7,10: Pferd Nr. 1; 2,5,8,11: Pferd Nr.2; NK: Negativkontrolle; Positivkontrollen: 3,6,9,12; M: λ -DNA-*Hind* III

3.2.3.3 Zytokinspektrum nach Kultivierung und Infektion

Die Änderungen der Zytokin-mRNA-Expression nach Infektion der abgeschabten Zellen (3.1.10.2) sollten mit denen nach Infektion der ET Zellen verglichen werden. In den nachstehenden Tabellen ist die Zytokinexpression im Trachealepithel vor Kultivierung und in den Zellkontrollen nach Kultivierung nach 4 h (Pferd Nr. 14 und 15 auch 24 h) dargestellt.

Tab. 12 Zytokinexpression im Trachealepithel bei Pferd Nr. 7

Pferd Nr. 7	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-6	IL-8	IL-10	IL-11	GM- CSF	IFN γ
v.K.	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4 h	+	+	-	+	+	-	-	-	-

v.K.: vor Kultivierung 4h: Zellkontrolle nach 4h

fettgedruckte Schreibweise: Änderung der Zytokinexpression nach Kultivierung

Tab. 13 Zytokinexpression im Trachealepithel bei Pferd Nr. 13

Pferde Nr. 13	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-6	IL-8	IL-10	IL-11	GM- CSF	IFN γ
v.K.	-	+	-	-	+	+	-	-	-
4 h	-	+	-	+	+	+	-	-	-

v.K.: vor Kultivierung 4h: Zellkontrolle nach 4h

fettgedruckte Schreibweise: Änderung der Zytokinexpression nach Kultivierung

Bei Pferd Nr.7 konnte vor der Infektion nur mRNA für IL-8 nachgewiesen werden, 4h nach Infektion fand sich in Zellkontrolle und infizierten Zellen mRNA für equines IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und IL-8. Bei Pferd Nr.13 wurde vor Infektion mRNA für IL-1 β , IL-8 und IL-10 nachgewiesen, nach Infektion konnte in der Negativkontrolle und in den infizierten Zellen mRNA für IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 gemessen werden.

Tab. 14 Zytokinexpression im Trachealepithel bei Pferd Nr. 14

Pferd Nr. 14	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-6	IL-8	IL-10	IL-11	GM- CSF	IFN γ
v.K.	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4 h	+	+	-	+	+	+	+	-	-
24 h	+	+	-	+	+	-	+	-	-

v.K.: vor Kultivierung 4h: Zellkontrolle nach 4h 24h: Zellkontrolle nach 24h

fettgedruckte Schreibweise: Änderung der Zytokinexpression nach Kultivierung

Tab. 15 Zytokinexpression im Trachealepithel bei Pferd Nr. 15

Pferd Nr. 15	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-6	IL-8	IL-10	IL-11	GM- CSF	IFN γ
v.K.	+	+	-	+	+	+	-	-	-
4 h	+	-	-	+	+	+	-	-	-
24 h	+	-	-	+	+	+	-	-	-

v.K.: vor Kultivierung 4h: Zellkontrolle nach 4h 24h: Zellkontrolle nach 24h
 fettgedruckte Schreibweise: Änderung der Zytokinexpression nach Kultivierung

Pferd Nr.14 zeigte sich vor Infektion positiv für mRNA für IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, GM-CSF und IFN γ , nach Infektion wurde in Zellkontrollen und infizierten Zellen mRNA für IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-11 nachgewiesen. Bei Pferd Nr.15 wurde vor Infektion mRNA für IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 gemessen, nach Infektion fand sich in Zellkontrollen und infizierten Zellen mRNA für IL-1 α , IL-6, IL-8 und IL-10.

Im Vergleich mit dem sofort eingefrorenen Material zeigt sich anhand der für die nachgewiesenen Zytokine positiven Zellkontrollen, daß die Zellen beginnen, mRNA für Zytokine zu exprimieren, wenn sie in Kultur genommen werden (Pferd Nr.7: IL-1 α , IL-1 β und IL-6; Pferd Nr.13: IL-6; Pferd Nr.14: IL-1 α). Andererseits kommt es auch zum Verschwinden der Zytokinexpression nach Kultivierung (Pferd Nr.14: IL-2, GM-CSF, IFN γ nach Kultivierung nicht mehr vorhanden; Pferd Nr.15: IL-1 β , IL-10 nach Kultivierung nicht mehr vorhanden, IL-10 dabei erst nach 24 h nicht mehr nachweisbar).

Aussagen über die Änderungen der Zytokin-mRNA-Expression nach viraler Infektion im Vergleich zur Zellkontrolle konnten nicht getroffen werden, da die Unterschiede zu gering waren (Bild 10), und dazu eine Quantifizierung durchgeführt werden müßte.

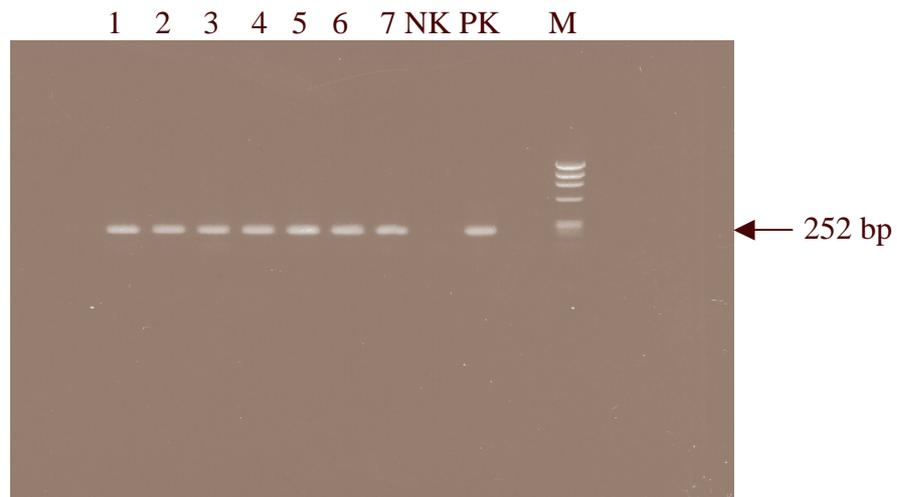


Bild 10 mRNA für **IL-10** in abgeschabten Zellen 4h nach Infektion; Pferd Nr. 13
1: EHV-1; 2: EHV-2; 3: EHV-4; 4: equines Rhinitisvirus P 1436/73; 5: equines Rhinitisvirus Perv; 6: equines Rhinitisvirus 350/72; NK: Negativkontrolle; PK: Positivkontrolle; M: λ -DNA-*Hind* III