

## 4. Diskussion

Ausgehend von den Gemeinsamkeiten von COB beim Pferd und dem allergischen Asthma des Menschen wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zu viralen Infektionen der unteren Atemwege des Pferdes und der dadurch ausgelösten Zytokinproduktion durchgeführt. Dafür wurden hauptsächlich die Eigenschaften einer Zellkultur aus equinem Trachealepithel (ET Zellen) untersucht. Die ET Zellen wurden mit verschiedenen respiratorischen Viren des Pferdes infiziert und die Zytokinexpression vor und nach Infektion mit Hilfe der RNA Isolierung und anschließender RT-PCR bestimmt. Weiterhin wurde versucht, die Anfertigung einer Zellkultur aus Trachealepithelzellen zu wiederholen. Anschließend wurde Trachealepithel von 15 weiteren Pferden für die RNA Präparation gewonnen, um dessen Zytokinspektrum *ex vivo* zu bestimmen. Die Zellen von vier Pferden wurden außerdem infiziert, um die entstandenen Zytokinmuster mit dem der ET Zellen zu vergleichen.

### 4.1 Änderung der Eigenschaften der ET Zellen nach Transformation

In der 85. Passage konnte für die ET Zellen mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung eine Expression von Zytokeratinen festgestellt werden. Allerdings zeigte sich ein kleiner Teil der Zellen Zytokeratin-negativ. Weiterhin kam es für über die Hälfte der ET Zellen zur Koexpression von Vimentin, welches für Bindegewebszellen charakteristisch ist.

Die für Epithelzellen typischen Zellverbindungen in Form von *tight junctions* und Gürteldesmosomen konnten auch in der 85. Passage noch nachgewiesen werden.

Bei dem Infektionsversuch in der 48. Passage wurde keine Zytokin-mRNA mehr gemessen.

Diese Ergebnisse sind eine Bestätigung dafür, daß es bei transformierten Zellen zur Entdifferenzierung kommt, die mit dem Verlust bestimmter Funktionen verbunden ist (Gruenert et al., 1995). Die zusätzliche Expression von Vimentin durch Epithelien, die in Kultur überführt wurden, wurde mehrmals beschrieben (Franke et al., 1979; Kim et al., 1987; Lazarides, 1982; Si et al., 1993). Eine Koexpression von Zytokeratin und Vimentin ist u.a. ebenfalls für Tumorzellen nachgewiesen worden (Lungenkarzinom: Gatter et al., 1986).

Sanders et al. (1998) und Kim et al. (2000) berichten über eine nachlassende Produktion von Zytokinen mit steigender Passage der Zellkultur. Da dies auch für ET Zellen gezeigt wurde, sollten für weitere Untersuchungen über den Nachweis einer Zytokinexpression möglichst frühe Passagen genutzt werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

muß außerdem die Tatsache berücksichtigt werden, daß es sich bei den ET Zellen um transformierte Epithelzellen in Kultur handelt, die in ihrem Verhalten von dem primärer Trachealepithelzellen abweichen können.

### 4.2 Permissivität der ET Zellen für respiratorische Viren des Pferdes

Die ET Zellen wurden in der 45. Passage mit EHV-1, -2, -4, equinem Rhinitisvirus Perv, Rhinitisvirus 350/72, Rhinitisvirus P 1436/73, VSV und EAV infiziert, und es wurden Wachstumskurven für diese Viren erstellt.

Die ET Zellen konnten erfolgreich mit den equinen Rhinitisviren infiziert werden. Die Rhinitisviren des Serotyps ERAV (Perv und 350/72) führten zur vollständigen Lyse der ET Zellen und erreichten hohe Titer in Überständen, nach Kokultivierung und Lyse der Zellen. ERBV (P 1436/73) führte ebenfalls zu einer produktiven Infektion der ET Zellen, allerdings mit niedrigeren Titern. Zytopathogene Effekte wurden hier nicht beobachtet. Damit ist anzunehmen, daß die equinen Rhinitisviren auch *in vivo* die unteren Atemwege infizieren. Bisher wurden sie beim Pferd nur mit milden Infektionen der oberen Luftwege in Verbindung gebracht (Plummer, 1962; Steck et al., 1978; Li et al., 1997; Carman et al., 1997), die allerdings mit hohem Fieber und Virämie einhergehen. Das Fehlen von zytopathogenen Effekten trotz produktiver Infektion ist sowohl für mehrere Stämme der ERAV (Li et al., 1997) als auch für einige Serotypen der HRV beschrieben worden (Winther et al., 1984). Die klinische Symptomatik wird deshalb beim Menschen weniger auf virale Zelltoxizität als auf die Produktion von inflammatorischen Mediatoren durch infizierte Zellen zurückgeführt (Subauste et al., 1995; Zhu, 1996). Die Fähigkeit von humanen Rhinoviren, Bronchialepithel des Menschen zu infizieren, konnte von Papadopoulos et al. (2000) nachgewiesen werden. Somit sind die durch HRV bei Asthma ausgelösten Mechanismen anscheinend auf eine direkte Infektion der unteren Atemwege zurückzuführen (Gern und Busse, 1999). Dies wäre im Hinblick auf die COB des Pferdes nun auch für die equinen Rhinitisviren denkbar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Von den drei verwendeten equinen Herpesviren wurden interessanterweise von EHV-2 die höchsten Virustiter mit ET Zellen erreicht, obwohl für EHV-1 und EHV-4 erwiesen ist, respiratorische Erkrankungen des Pferdes zu verursachen (Studdert, 1974). Mit EHV-1 zeigten die ET Zellen erst nach der 2. Passage geringgradige zytopathogene Effekte. Diese „Anlaufschwierigkeiten“ könnten damit zu erklären sein, daß die Anzucht der verwendeten

Herpesviren vorher auf ED Zellen stattfand. Wider Erwarten zeigte sich gerade EHV-4, bei dem es sich um den typischen Erreger der Rhinopneumonitis handelt, nicht in der Lage, die ET Zellen produktiv zu infizieren. Eine restringiert-persistente Infektion (Gendelman und Morahan, 1992) ist zu diskutieren, da geringe Virustiter auch nach der 2. Passage noch vorhanden waren. Evtl. lägen bei einer Brutschranktemperatur von 33°C (statt 37°C) bessere Infektionsbedingungen für EHV-4 vor, da die niedrigere Temperatur eher den tatsächlichen Verhältnissen in den Atemwegen entspricht. Dies sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

Mit EHV-2 kam es ab der 1. Passage zur Ausbildung von Plaques bis hin zur vollständigen Zerstörung der Zellen. Für EHV-2 wurde ein Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen des Pferdes (Blakeslee et al., 1975; Belak et al., 1980; Wolfinger, 1998) speziell mit COB (Schlocker et al., 1995; Robinson et al., 1996) vermutet. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die These, daß EHV-2 für Erkrankungen der unteren Atemwege verantwortlich gemacht werden kann.

EAV infizierte die ED Zellen nur abortiv. Es konnten ab der 1. Passage keine meßbaren Titer mehr nachgewiesen werden. Bis jetzt mußte EAV auf nicht-equinen oder nicht-epithelialen Zellkulturen angezüchtet werden. Im Gegensatz dazu wurden mit ET Zellen sehr hohe Virustiter erreicht und es zeigten sich zytopathogene Effekte. Damit steht jetzt mit den ET Zellen eine equine Epithelzelllinie für weitere Infektionsversuche mit EAV zur Verfügung.

VSV führte ebenfalls zu einer produktiven und lytischen Infektion der ET Zellen. Es besteht damit die Möglichkeit, VSV auch mit ET Zellen als Referenzvirus für die Testung antiviral wirkender Substanzen zu nutzen.

### 4.3 Zytokinexpression durch ET Zellen

Es wurde für die ET Zellen eine Expression von mRNA für IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-11 festgestellt. Die Tatsache, daß alle Zytokine schon vor Infektion / Stimulation vorhanden waren, macht eine Quantifizierung für an diese Arbeit anschließende Forschungen notwendig. Sie wurde für equine Zytokine von Giguere und Prescott (1999) beschrieben.

Interessanterweise konnte - auch bei Verwendung von serumfreiem Zellkulturmedium - im Gegensatz zu Arbeiten mit Trachealepithel des Menschen (Churchill et al., 1992; Terajima et al., 1997; Kim et al., 2000) - in keinem Fall mRNA für GM-CSF und TNF $\alpha$  nachgewiesen werden. GM-CSF ist verantwortlich für die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und verlängert deren Überlebenszeit in der Kultur (Park et al., 1998). Im Gegensatz zu der bei allergischem Asthma vorliegenden Eosinophilie scheint beim Pferd mit COB kein Zusammenhang zum Vorkommen von Eosinophilen zu bestehen. Ob dies mit der fehlenden Produktion von GM-CSF durch das Trachealepithel zusammenhängt, muß in weiteren Untersuchungen erforscht werden. Falls TNF $\alpha$  in der Immunpathogenese respiratorischer Erkrankungen des Pferdes eine Rolle spielt, scheint es nicht vom Trachealepithel produziert zu werden.

Die sonst für die unspezifische Stimulierung von PBMCs verwendeten Substanzen (PWM, PHA-M, LPS, PMA-Ca) können nach den Untersuchungen dieser Arbeit ebenfalls für die Stimulierung von ET Zellen eingesetzt werden. In den meisten Fällen lag eine Erhöhung der Zytokinexpression vor (Ausnahme: Suppression der mRNA für IL-10 durch PWM). Dabei scheint PMA-Ca das potenteste Stimulans für die ET Zellen zu sein. Die in den meisten Fällen fehlende Änderung der Expression durch LPS und PHA-M kann allerdings auch darauf zurückzuführen sein, daß die ET Zellen mit steigender Passage ihre Fähigkeit verlieren, auf Stimuli zu reagieren.

Den für die ET Zellen nachgewiesenen Zytokinen wird beim allergischen Asthma des Menschen Bedeutung zugesprochen: Erhöhte Spiegel von IL-1 $\beta$  (Borish et al., 1992) bzw. IL-8 (Chanez et al., 1996) wurden in der BALF von Asthmatikern gefunden. IL-1 $\beta$  führt weiterhin zur Neutrophilie der Luftwege und scheint zur Hyperreaktivität der Atemwege beizutragen (Tsukagoshi et al., 1994). Nach Kortikosteroid-Therapie -das am häufigsten eingesetzte Medikament zur Asthmatherapie- wurde bei Asthmapatienten eine Hemmung der IL-1 $\beta$ -Expression im Bronchialepithel beschrieben (Sousa et al., 1997). Für IL-8 (Marini et al., 1992) sowie für IL-11 (Minshall et al., 2000) konnte weiterhin eine erhöhte Expression im

Bronchialepithel von Asthmatikern nachgewiesen werden. Diese war für IL-11 direkt mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert. In transgenen Mäusen mit einer Überexpression von IL-11 kam es zur Ausbildung von *airway remodeling* einhergehend mit subepithelialer Fibrose, Hyperreaktivität und Obstruktion der Atemwege (Tang et al., 1996; Zheng et al., 2001). Auch beim Pferd liegen bei COB Hyperreaktivität und Obstruktion der Atemwege, sowie schnelles Ansprechen auf Kortikosteroid-Therapie (Robinson et al., 1996) vor. Das vom Trachealepithel gebildete IL-11 und IL-1 $\beta$  könnte dazu beitragen. IL-8 ist wichtig für die Anlockung von neutrophilen Granulozyten. Diese stellen bei der COB des Pferdes die vorherrschenden intratrachealen Zellen dar (Winder et al., 1991). In Übereinstimmung dazu konnten Giguere et al., (2002) erhöhte Spiegel von mRNA für IL-8 und IL-1 $\beta$  in der BALF COB-kranker Pferde im Vergleich zur BALF gesunder Pferde messen.

Weiterhin kam es in Untersuchungen beim Menschen zur Erhöhung von Zytokinen nach viraler Infektion: Erhöhte Spiegel von IL-6 können nach HRV-Infektion in Nasensekreten von Kindern gemessen werden (Zhu et al., 1996), sowie nach *in vitro* Infektion von Epithelzellen durch HRV. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen aus dieser Arbeit: Hier schien es zu einer Erniedrigung der IL-6-Expression 24 h nach Infektion der ET Zellen mit EHV-2 und beiden verwendeten ERAV zu kommen. Die Ursache dafür kann in der fehlenden Quantifizierung liegen. Denkbar wäre auch, daß es bei Fortführung des Versuches über eine längere Zeit als 24 h noch zu einer Erhöhung der Expression käme. Gleiches gilt für IL-1 $\beta$ , für das es ebenfalls zu einer Erniedrigung der Expression nach Infektion mit EHV-2 und beiden ERAV kam. IL-11 kann beim Menschen in Nasensekreten während viralen Infektionen des oberen Respirationstraktes nachgewiesen werden (Einarsson et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit induzierten beide ERAV deutlich die Expression von IL-11 in den ET Zellen 24 h nach Infektion. Eine besondere Bedeutung erhält dieses Ergebnis auch durch die fehlende Eosinophilie beim COB-kranken Pferd, so daß die eosinophilen Granulozyten als IL-11-Produzenten wegfallen. So bleiben beim COB-Pferd außer Stroma- und glatten Muskelzellen die Epithelzellen als vorrangiger Produktionsort für IL-11.

IL-10 wird als inhibitorisches Zytokin bezeichnet (Chung und Barnes, 1999). IL-10 unterdrückt die Produktion von Zytokinen durch Th1-Zellen und lenkt damit die Immunantwort in Richtung Th2-Zellen. Denkbar wäre, daß die nachgewiesene Erhöhung der IL-10-Expression der ET Zellen durch beide ERAV eine Verschiebung in Richtung Th2-Antwort nach viraler Infektion bedeutet. Ebenfalls möglich ist eine lokale Unterdrückung der Immunabwehr durch IL-10, die das Angehen der Infektion durch ERAV unterstützt.

Zu der in dieser Arbeit festgestellten Erniedrigung der Zytokinexpression 4 h nach Virusinfektion, die im Vergleich zur Zellkontrolle für alle eingesetzten Viren und alle nachgewiesenen Zytokine (außer IL-8) beobachtet wurde, konnten in der Literatur keine Hinweise gefunden werden. Möglicherweise handelt es sich um einen methodischen Fehler, welcher durch Wiederholung des Infektionsversuches ausgeschlossen werden muß.

#### **4.4 Anfertigung weiterer Zellkulturen von equinen Trachealepithelzellen**

Die Anzucht einer weiteren Zellkultur aus equinem Trachealepithel zeigte sich nicht erfolgreich. Zwar kam es trotz Verwendung von Zellkulturplatten ohne übliche Kollagenbeschichtung zur Adhäsion, die Epithelzellen wurden aber regelmäßig durch das Passagieren zerstört. Eine Transformation der Zellen fand in keinem der 25 Versuche statt, so daß es sich bei einer spontanen Transformation equiner Zellen um ein seltenes Ereignis zu handeln scheint. Dies steht in Übereinstimmung mit dem geringen Vorkommen equiner Tumoren im Vergleich zur Tumorfrequenz bei anderen Haustieren (Hance und Bertone, 1993) und könnte erklären, warum es sich bei den ET Zellen um die bisher einzige permanente equine Epithelzelllinie handelt.

#### **4.5 Zytokinexpression im Trachealepithel**

Die mikroskopische Auswertung des gewonnenen Trachealepithels und die vorhandenen Zytokine (z.B. IFN $\gamma$ , welches nur von Lymphozyten produziert wird) zeigen, daß die nachgewiesene Zytokinexpression nicht nur von den Epithelzellen stammen kann. Ein Vergleich mit dem Verhalten der ET Zellen vor und nach Infektion ist deshalb nicht möglich. Bei den ET Zellen handelt es sich um eine reine Epithelzellkultur ohne Interaktion mit anderen (Entzündungs-) Zellen. Mit der angewandten Methode kann aber, wie die Unversehrtheit der Basalmembran bestätigt, die Zytokinexpression im equinen Trachealepithel als Einheit beurteilt werden. Dies entspricht sogar eher den tatsächlichen Verhältnissen beim Pferd als die gesonderte Untersuchung nur einer Zellart.

Die Zytokinmuster der 15 untersuchten Pferde unterschieden sich zwar stark voneinander, trotzdem lassen sich auch Gemeinsamkeiten erkennen: mRNA für IL-8 konnte bei jedem Pferd nachgewiesen werden. Es kann vermutet werden, daß es permanent vom Epithel der

unteren Luftwege produziert wird. IL-11 wurde nur bei zwei Pferden entdeckt. Dies könnte damit erklärt werden, daß als Probenmaterial Tracheen von Lungen ausgesucht wurden, die makroskopisch keine oder nur minimale pathologische Veränderungen aufwiesen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob IL-11 bei Pferden mit (akuten) respiratorischen Erkrankungen häufiger vorkommt, und ob sogar ein Zusammenhang mit dem Nachweis equiner Rhinitisviren besteht. mRNA für TNF $\alpha$  und GM-CSF wurde ebenfalls bei 2 Pferden festgestellt. Da es für die ET Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, stammt die hier produzierte mRNA für TNF $\alpha$  und GM-CSF wahrscheinlich nicht von den Epithelzellen. IL-4, IL-5 und IL-13, welche kennzeichnend für das Vorkommen von Th2-Zellen sind, konnten in keinem Fall gefunden werden, interessanterweise dagegen bei einem Großteil der Pferde mRNA für IL-2 und IFN $\gamma$ . Da versucht wurde, Tracheen von Lungen ohne pathologische Veränderungen auszuwählen, spricht dieses Ergebnis für das Vorherrschen einer Th1-Immunität bei lungengesunden Pferden.

Die Änderungen der Zytokinexpression nach Infektion ließen sich aufgrund der geringen Unterschiede nicht beurteilen, auch hier müßte sich die Quantifizierung anschließen. Hervorzuheben ist allerdings, daß sich schon allein durch die Kultivierung der Zellen Änderungen in der Zytokinexpression ergaben. Diese Tatsache muß in weiteren Versuchen berücksichtigt werden.