Ein Modell der Plaquebildung

W. SCHWÖBEL *, H. GEIDEL und R. J. LORENZ *

Bundesforschungsanstalt für Viruserkrankungen der Tiere, Tübingen und Abteilung für angewandte Mathematik des Instituts für Physik und Meteorologie der Landwirtschaftlichen Hochschule, Stuttgart-Hohenheim

* Herrn Prof. Dr. ERICH TRAUB zum 60. Geburtstag gewidmet

(Z. Naturforschg. 21 b, 953—959 [1966]; eingegangen am 24. Mai 1966)

A model has been developed to simulate the spread of virus infection in cell cultures. The structure of the model assumes that a) cells of two dimensional monolayers are regular hexagons, b) the number of infective units produced by a single cell is a Poisson distributed variable, c) a virus releasing cell can only infect neighbouring cells, and d) all neighbouring cells have an equal chance to become infected.

The growth of model plaques was studied with the aid of a computer using different mean values (λ) of the Poisson distribution. The radius of model plaques increases linearly with time. The speed of this process depends upon the value of λ . The shape of the plaques varies and this variability is also a function of λ . The highest frequency of irregularly formed plaques is found when λ is 2.2. At low values of λ , plaque growth may end by itself.

Model plaque formation has been compared with actual plaque formation by foot and mouth disease virus and good agreement was observed. The use of the model for the study of other epidemiological phenomena is discussed.

Virus eines beliebigen Maul- und Klauenseuche (MKS)-Stammes bildet in Schweinenieren-Kulturen Plaques unterschiedlicher Größe. In einer früheren Arbeit¹ wurde zu zeigen versucht, daß die Variabilität der Plaquegröße maßgeblich durch statistische Schwankungserscheinungen der Infektionsausbreitung beim Beginn dieses Vorgangs verursacht wird. Um die vermuteten Erscheinungen deutlich zu machen, wurde der Vorgang des Plaquewachstums an Hand eines statistischen Modells unter vereinfachten Voraussetzungen simuliert. Die Ergebnisse dieser zunächst in kleinem Rahmen durchgeführten Experimente ließen einige Gesetzmäßigkeiten der Plaqueentstehung erkennen, die auch für das Verständnis anderer Infektionsausbreitungsvorgänge von Interesse zu werden versprochen. Mit Hilfe einer programmgesteuerten Rechenanlage (IBM 7010) wurde deshalb die Entwicklung von Modellplaques eingehend analysiert. Anschließend wurde geprüft, inwieweit sich die Dynamik der Plaquebildung des MKS-Virus mit den bei der Entwicklung von Modellplaques gefundenen Gesetzmäßigkeiten erklären läßt.

Das Modell

Der Aufbau des Modells: Die zweidimensionale Zellkultur, in der die Plaquebildung stattfindet, wird als regelmäßiges Sechsecknetz aufgefaßt. Die Anzahl der von einer infizierten Zelle (= Sechseck) ausgesandten infektiösen Einheiten (IE) wird als Zufallsgröße angenommen, die einer Poisson-Verteilung folgt, d. h. die Wahrscheinlichkeit P_n , daß n IE ausgesandt werden, beträgt

$$P_n = \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda}.$$

Mit dieser Verteilung soll die biologische Variabilität der Wirtszellen in ihrer Fähigkeit zur Bildung neuer IE zum Ausdruck gebracht werden. Der Parameter λ wird systematisch variiert. Er entspricht der mittleren Anzahl der von einer einzelnen Zelle ausgesandten IE.

Die von einer infizierten Zelle abgegebenen IE werden auf Nachbarzellen verteilt. Die Verteilung erfolgt zufällig und alle ausgesandten IE treffen gleichzeitig auf Zellen auf. Alle 6 Nachbarzellen sind als Empfängerzellen gleichberechtigt. Trifft eine IE zufällig auf eine bereits infizierte Zelle, so bleibt sie ohne Wirkung. Die Zeit von der Infektion einer Zelle bis zur Infektion neuer Zellen durch neugebildete IE wird als konstant angenommen und als die Dauer einer Virusgeneration bezeichnet. Unter einer Virusgeneration wird bei dem Modell die Summe aller IE verstanden, die gleichzeitig von infizierten Zellen abgegeben werden. Zu Beginn des Infektionsausbreitungsvorgangs wird eine Zelle als infiziert vorgegeben. Ebenso wird der Wert λ festgelegt, der für die Dauer der Plaqueentwicklung konstant bleibt.

Die Simulation: Die benötigten Pseudozufallszahlen z_n werden mit folgendem Algorithmus erzeugt:

$$\begin{aligned} a_n &= a_{n-1} + a_{n-2} \bmod 10^6 \\ z_n &= a_n \cdot 10^{-6} \quad \text{für } n = 1, 2, 3 \dots \end{aligned}$$

Dabei sind die a_n ganze Zahlen. Zu Beginn hat man zwei sechstellige Zahlen a_0 und a_{-1} zu wählen, die untereinander sowie zu 10^6 teilerfremd sind. Für jede infizierte Zelle wird mit Hilfe einer Pseudozufallszahl aus der Summenhäufigkeitskurve der Poisson-Verteilung bei vorgegebenem λ auf Grund der Beziehung

$$\sum_{i=1}^{n-1} P_i < z \leq \sum_{i=1}^n P_i$$

¹ W. SCHWÖBEL, Arch. ges. Virusforsch. 17, 73 [1965].

die Anzahl der neugebildeten IE bestimmt. Für jede neue IE wird dann mit einer neuen Zufallszahl unter Beachtung einer Gleichverteilung die Nachbarzelle ausgewählt, die neu infiziert werden soll. Es muß dann jedesmal geprüft werden, ob die betreffende Nachbarzelle empfänglich ist oder schon früher infiziert wurde.

Die Datenausgabe: Durch geeignete Numerierung der einzelnen Zellen ist es möglich, festzuhalten, ob und von welcher Virusgeneration eine Zelle infiziert wurde. Die Ausgabe dieser Angaben gibt Bilder von der Ausbreitung der Infektion, die direkt für die Erstellung von Plaquebildern (vgl. Abb. 4 und 5) verwendet werden können. Darüberhinaus wurde für jede Virusgeneration die Zahl der neugebildeten IE, die Zahl der neuinfizierten Zellen sowie die Zahl der IE ohne Wirkung ausgegeben. Ferner wurde für jede Virusgeneration die erreichte Größe der Modellplaques ermittelt. Als „Radius“ diente das halbe arithmetische Mittel aus der maximalen horizontalen und vertikalen Ausdehnung des Herdes infizierter Zellen. Die Berechnungen wurden, wenn die Infektionsausbreitung nicht von selbst aufhörte, nach der 99. Virusgeneration, oder aber, wenn ein vorgegebener Bereich der Plaquegröße überschritten wurde, abgebrochen. Für die verschiedenen λ -Werte wurden jeweils 100 Modellplaques gerechnet.

Ergebnisse

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Modellplaques: Bei vorgegebenem λ wächst der Plaqueradius linear mit der Zeit (Abb. 1). Eine Erhöhung des λ -Wertes bei kleinem λ bewirkt eine starke Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit, die jedoch bei weiterer Zunahme von λ immer geringer wird, bis die Wachs-

Abb. 1. Die Wachstumsgeschwindigkeiten der Radien von Modellplaques bei verschiedenen λ -Werten. Kreise: Radiusmittelwerte von jeweils n Plaques, $4 \leq n \leq 98$ (bei $\lambda = 2,0$ und 80. Virusgeneration nur $n = 4$ Plaques). Gestrichelte Linie: Maximal erreichbare Wachstumsgeschwindigkeit.

tumsgeschwindigkeit der Plaques einen Maximalwert erreicht (Abb. 1 und 2). Dieser ist erreicht, sobald von jeder Virusgeneration die Maximalzahl verfügbarer Zellen infiziert wird. Die Begrenzung der

Abb. 2. Die Zunahme des Plaqueradius von Modellplaques zwischen der 60. bis 70. Virusgeneration bei verschiedenen λ -Werten sowie die Streuung der Zunahme (untere Kurve). Mit Ausnahme bei $\lambda = 2,0$ bezeichnen die Kreise die Mittelwerte der Radiuszunahme von jeweils etwa 50 Plaques.

Wachstumsgeschwindigkeit ist eine Folge der Modellannahme, daß eine Infektion stets nur auf solche Zellen übergreifen kann, die der virusabgebenden Zelle benachbart sind. Von einer Virusgeneration zur nächsten kann deshalb der Plaqueradius höchstens um eine Zelleinheit zunehmen. Dieser Zustand ist praktisch bereits bei $\lambda = 10,0$ erreicht. Wie die untere Kurve in Abb. 2 zeigt, ist die einfache mittlere Streuung der Radiuszunahme selbst bei kleinen λ -Werten überaus gering.

Die Erlöschenswahrscheinlichkeit. Bei hinreichend großen λ -Werten wachsen alle Modellplaques unbegrenzt. Sind die λ -Werte klein, so kommt es vor, daß das Wachstum einzelner Plaques vorzeitig endet. Hierfür gibt es zwei Ursachen. Es kann der Fall eintreten, daß von allen infizierten Zellen – vielleicht schon von der primär infizierten Zelle – zufällig keine einzige neue IE ausgesendet wird. Die Wahrscheinlichkeit hierfür wird um so kleiner, je weiter das Wachstum eines Plaque fortschreitet, d. h. je mehr Senderzellen am Infektionsausbreitungsvorgang beteiligt sind. Ferner kann es vorkommen, daß alle IE einer Virusgeneration zufällig auf bereits früher infizierte Nachbarzellen verteilt werden, so daß ebenfalls keine einzige neue Zelle infiziert wird.

Aus diesen Gründen kann man von einer „Erlöschenswahrscheinlichkeit“ p eines Plaque sprechen, die von λ abhängt — $p = p(\lambda)$ — und um so größer ist, je kleiner λ wird. $p(\lambda)$ kann durch den beobachteten prozentualen Anteil vorzeitig erloschener Modellplaques geschätzt werden. In Abb. 3 sind für verschiedene λ -Werte die nach der Methode der gleitenden Mittelwerte ausgeglichenen Häufigkeitskurven für das Erlöschen von Plaques nach verschiedenen Anzahlen von Virusgenerationen angegeben. Die mit „0“ bezeichnete Kurve ist die Häufig-

Abb. 3. Die Erlöschenswahrscheinlichkeit von Modellplaques in Abhängigkeit vom λ -Wert. Erklärung im Text.

keit der Fälle, bei denen die Infektion auf die primär infizierte Zelle beschränkt bleibt. Die folgenden Kurven geben die Häufigkeiten des Erlöschens von Plaques bis zur 1., 5., 10. und 30. Virusgeneration an. Diese Kurven rücken nach rechts immer mehr zusammen, d. h. die Erlöschenswahrscheinlichkeiten nehmen mit zunehmender Anzahl Virusgenerationen immer schneller ab. Die letzte Kurve (dick ausgezogen) stellt näherungsweise die totale Erlöschenswahrscheinlichkeit dar, d. h. die Häufigkeit aller nicht unbegrenzt wachsenden Plaques, unabhängig davon, nach wieviel Virusgenerationen ihre Ausbreitung zum Stillstand kommt. Alle rechts von dieser Kurve liegenden Plaques wachsen unbegrenzt.

Der genaue Verlauf dieser Kurve ließ sich nicht bestimmen, weil das Wachstum der Modellplaques höchstens bis zur 99. Virusgeneration verfolgt wurde. Die Kurve dürfte in Wahrheit etwas weiter rechts verlaufen, denn auch nach der 99. Virusgeneration kommt es — wenn auch sehr selten — noch zum Erlöschen einzelner Plaques. Der Verlauf der Kurven in Abb. 3 zeigt, daß z. B. bei $\lambda \leq 1$ das Wachstum aller Plaques noch vor Erreichen der 10. Virusgeneration

zum Stillstand kommt. Auch bei $\lambda = 2$ erlöschen noch fast alle Plaques, obwohl einzelne bereits ein unbegrenztes Wachstum zeigen. Bei $\lambda = 3$ beträgt die Erlöschenswahrscheinlichkeit für die Plaques nur noch etwa 10%, d. h. 90 von 100 Modellplaques wachsen unbegrenzt. Schon bei $\lambda = 4$ erlöschen bereits praktisch überhaupt keine Plaques mehr.

Die Plaquegröße und ihre Variabilität: In Tab. 1 sind die mittleren Plaqueradien angegeben, die nach Beginn der Infektionsausbreitung zu verschiedenen Zeiten — gemessen durch die Anzahl Virusgenerationen — beobachtet wurden. Die Mittelwerte wurden jeweils aus 70 bis 90 Einzelwerten berechnet. Zu jedem Beobachtungszeitpunkt wurden alle Plaques berücksichtigt, unabhängig davon, ob ihr Wachstum schon beendet war oder nicht. Die Streuung der

λ	Anzahl Virusgenerationen			
	20.	40.	60.	80.
2,0	$4,4 \pm 67\%$	$5,6 \pm 79\%$	$6,2 \pm 89\%$	$6,4 \pm 96\%$
2,5	$9,8 \pm 36\%$	$18,5 \pm 40\%$	$26,8 \pm 42\%$	$35,2 \pm 42\%$
3,0	$13,5 \pm 17\%$	$27,9 \pm 13\%$	$42,8 \pm 13\%$	$57,9 \pm 12\%$
4,0	$17,0 \pm 6\%$	$34,3 \pm 3\%$	$51,7 \pm 2\%$	$69,2 \pm 2\%$

Tab. 1. Mittelwert und Streuung des Plaqueradius in Abhängigkeit von λ und der Anzahl Virusgenerationen.

Plaqueradien wird maßgeblich von der Häufigkeit des Erlöschens von Plaques bestimmt. Während des Plaquewachstums wird sie bei kleinen λ -Werten immer größer. Bei größeren λ -Werten nimmt sie dagegen während des Plaquewachstums ab. Das absolute Ausmaß der Streuung nimmt ebenfalls ab, wenn der λ -Wert größer wird.

Die Morphologie der Modellplaques: In Abb. 4 sind für 7 verschiedene λ -Werte Modellplaques dargestellt, wie sie als typische Formen nach Ablauf von 45 Virusgenerationen zu beobachten sind. Die ersten vier Plaques ($\lambda = 0,5; 1,0; 1,5$ und $2,0$) erreichten die 45. Virusgeneration nicht, sondern erloschen schon viel früher. Bei $\lambda = 0,5$ blieb die Infektion auf die primär infizierte Zelle beschränkt. Auffällig ist die Unregelmäßigkeit der äußeren Form der Plaques von $\lambda = 2,5$ und $3,0$. Außerdem sind in ihrem Innern zahlreiche Inseln nicht infizierter Zellen zu beobachten. Mit zunehmendem λ nähert sich jedoch die Gestalt der Plaques immer mehr der Kreisform, während gleichzeitig auch die Inseln nicht infizierter Zellen seltener und kleiner werden.

Abb. 4. Die häufigsten Formen von Modellplaques bei verschiedenen λ -Werten nach der 45. Virusgeneration. Die primär infizierte Zelle jedes Plaques ist durch ein kleines Kreuz gekennzeichnet. Schwarz gezeichnet sind die von der 1. bis 45. Virusgeneration infizierten Zellen. Die von der 16. bis 30. Virusgeneration infizierten Zellen sind doppelt und die von der 31. bis 45. Virusgeneration infizierten Zellen sind einfach schraffiert. Die Punkte am Plaquerand markieren die von der 45. Virusgeneration infizierten Zellen.

Abb. 5. Die morphologische Variabilität von Modellplaques bei $\lambda = 2,2$ nach der 97. Virusgeneration. Die meisten Plaques bei $\lambda = 2,2$ sind etwa doppelt so groß wie „c“. Die Schraffur wechselt nach jeweils 20 aufeinanderfolgenden Virusgenerationen (1.—20. schwarz; 21.—40. doppelt schraffiert; 41.—60. einfach schraffiert; 61.—80. schwarz; 80.—97. doppelt schraffiert).

Die morphologische Variabilität der Plaques erreicht ein Maximum bei einem λ von etwa 2,2. Eine Vorstellung darüber, wie verschieden die Gestalt der Plaques bei diesem λ sein kann, soll Abb. 5 vermitteln. Es ist hier der Zustand von 5 Plaques nach 97 Virusgenerationen wiedergegeben. Die Modellplaques a bis d waren bis dahin allerdings bereits erloschen. Abweichend von Abb. 4 sind jeweils die von 20 aufeinanderfolgenden Virusgenerationen infizierten Zellen besonders gekennzeichnet.

Das Plaquemodell und die Plaquebildung des MKS-Virus: Die dem Modell zugrunde gelegten Annahmen sind so einfach, daß eine Erklärung aller Erscheinungen eines wirklichen Plaquebildungsvorganges an Hand der Modellplaques nicht erwartet werden kann. Eine der wichtigsten Vereinfachungen besteht darin, daß die Infektionsausbreitung nur über jeweils benachbarte Zellen angenommen wird.

Für die Plaquebildung eines Virus trifft dies sicher nicht zu, da die im Plaquemedium diffundierenden IE auch entferntere Zellen infizieren können. Weiter wurde die Zeitspanne zwischen der Infektion einer Zelle und der Abgabe neuer IE für alle Zellen als konstant angenommen. Eine Vereinfachung ist schließlich auch die Annahme, daß die Abgabe aller von einer Zelle synthetisierten IE gleichzeitig geschieht.

Außerdem wird die Übertragbarkeit des Modells auf einen wirklichen Plaquebildungsvorgang noch dadurch eingeschränkt, daß im Modell das Verhalten der im Medium diffundierenden IE und ihr Einfluß auf die Infektionsausbreitung nicht berücksichtigt wird. Die Bedeutung dieser Vorgänge für die Wachstumsgeschwindigkeit von Plaques wurde von Koch² untersucht. Er konnte auch zeigen, daß aus Verteilung und Ausbreitungsgeschwindigkeit der IE in der Viruswolke über einem Plaque eine lineare

barkeitsschwelle, so wächst ihr Radius linear mit die Zeit³, wie dies auch für die Plaques anderer Virusarten beschrieben wurde⁴⁻⁶.

Bei hohen Tylose-Konzentrationen, d. h. bei hoher Viskosität des Plaquemediums, ist zu erwarten, daß wegen der geringen Beweglichkeit der IE nur verhältnismäßig wenige von ihnen am Infektionsausbreitungs-Vorgang beteiligt sind. Während der gesamten Dauer der Plaqueentwicklung müßten dann Bedingungen herrschen, unter denen sich die Infektion wie bei dem Modell bei kleinen λ -Werten ausbreitet. Dies müßte auch in der Morphologie der Plaques zum Ausdruck kommen. Daß dies der Fall ist, zeigt Abb. 7. Hier sind Plaques von zwei Kulturen wiedergegeben, die gleichzeitig mit demselben Virus in derselben Dosis infiziert wurden. Während auf die eine Kultur ein Plaquemedium mit 10 g/l Tylose³ gegeben wurde, erhielt die zweite Kultur ein Plaquemedium mit 30 g/l Tylose, dessen Viskosität dadurch sehr hoch war. Die Kulturen wurden 45 Std. bzw. 6 Tage post inf. fixiert. In beiden Kulturen hatten die Plaques zur Zeit der Fixierung etwa die gleiche mittlere Größe. Die bei hoher Viskosität entstandenen Plaques waren jedoch von auffällig unregelmäßiger Gestalt. Vergleicht man die vom Virus der MKS gebildeten Plaques in Abb. 7 mit den Modellplaques bei $\lambda = 2,5$ und $\lambda = 3,0$ in Abb. 4, so liegt es nahe, für die morphologischen Unterschiede der Plaques des MKS-Virus dieselben Ursachen anzunehmen, die auch die Morphologie der Modellplaques bei verschiedenen λ -Werten bestimmen.

Die Bedeutung des Modells für andere Infektionsausbreitungsvorgänge: Das Entstehen eines Plaque

in einem zweidimensionalen Zellrasen kann als einfacher, experimentell gut analysierbarer Sonderfall der Ausbreitung einer Virusinfektion aufgefaßt werden. Es läßt sich deshalb fragen, inwieweit die mit einem stochastischen Modell erklärbar Gesetzmäßigkeiten der Plaquebildung auch Erscheinungsformen der Ausbreitung von Virusinfektionen in andersartigen Wirtssystemen zu erklären vermögen (die Ausbreitung von Infektionen im Zellverband eines natürlichen Organismus oder die Infektionsausbreitung in Populationen von Organismen). Die Unterschiede zur Plaquebildung bestehen in diesen Fällen vor allem darin, daß hier die Infektionsausbreitung von einer Reihe Faktoren beeinflusst wird, die bei dem Plaquemodell nicht berücksichtigt sind. Die Herdbildung von Pflanzenviren in den Blättern ihrer Wirtspflanzen ist ein Beispiel für eine Infektionsausbreitung in vivo, die mit der Plaquebildung in vitro eine sehr große Ähnlichkeit hat. Wesentlich schwieriger ist dagegen die Ausbreitung eines Virus in einem tierischen Organismus zu erklären. Die Strukturen des tierischen Körpers sowie der Virus-transport durch Körperflüssigkeiten beeinflussen hier zusammen mit den Abwehrmechanismen des intakten Organismus die Virusausbreitung in maßgeblicher und im einzelnen meist schwer überschaubarer Weise. Zur Erklärung epidemiologischer Erscheinungen dürfte das Modell jedoch in geeigneten Fällen durchaus anwendbar sein.

Für das Ausführen der Rechenarbeiten sind wir den Farbwerken Hoechst zu Dank verpflichtet. Gleichzeitig danken wir den Herren Dipl.math. D. KOBELT und O. VANDERBEKE für ihren Rat und Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeiten.

Abb. 7. Die Morphologie von Plaques des Virus der MKS in Schweinenierenkulturen (Stamm ENS 244) unter Plaquemedien verschiedener Tylose-Konzentrationen. a) Plaquemedium mit 10 g/l Tylose; Zustand der Plaques 45 Stdn. post inf., b) Plaquemedium mit 30 g/l Tylose; Zustand der Plaques 6 Tage post inf.

³ W. SCHWÖBEL, Z. Naturforschg. 16 b, 479 [1961].

⁴ K. VAN ANGERER, Arch. Hyg. 92, 312 [1924].

⁵ A. MAYR-HARTING, Zbl. Bakteriolog. I. Abt. Orig. 171, 380 [1958].

⁶ J. LINDENMANN u. G. E. GIFFORD, Virology 19, 283 [1963].