

**Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden gegen  
proinflammatorische Zytokine bei der experimentellen  
Herpes Simplex Virus Typ 1 Keratitis und deren  
Einfluss auf die Immunreaktion**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.  
des Fachbereichs Biologie und Geografie  
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Susanne Wasmuth aus Essen  
Dezember 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Helmut Esche
  2. Gutachter: Prof. Dr. med. Arnd Heiligenhaus
  3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Bertram Opalka
- Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Gerhard Henkel

Tag der mündlichen Prüfung: 13. April 2005

---

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden im Histologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, dem zentralen Tierlabor und dem Institut für Virologie des Universitätsklinikums in Essen sowie im Ophtha-Lab der Augenärzte am St. Franziskus Hospital in Münster durchgeführt.

Berichte aus der Biologie

**Susanne Wasmuth**

**Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden  
gegen proinflammatorische Zytokine bei der  
experimentellen Herpes Simplex Virus Typ 1 Keratitis  
und deren Einfluss auf die Immunreaktion**

Shaker Verlag  
Aachen 2006

**Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Zugl.: Duisburg-Essen, Univ., Diss., 2005

Copyright Shaker Verlag 2006

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-4845-5

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

---

FÜR MEINE ELTERN

---

## INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Herpesviren	1
1.2. Erkrankungen durch Herpesviren	2
1.3. Herpetische stromale Keratitis allgemein	3
1.4. Zytokine allgemein	6
1.4.1. Das Zielzytokin Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$	6
1.4.2. Das Zielzytokin Interleukin-2	8
1.4.3. Das Zielzytokin Interferon- $\gamma$	9
1.5. Matrix Metalloproteinasen	10
1.6. Antisense-Oligonukleotide	12
1.7. Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	17
2.1. Material	17
2.1.1. Chemikalien	17
2.1.2. Verbrauchsmaterial	19
2.1.3. Geräte	20
2.1.4. Sonstiges	21
2.1.5. Medien für Zellkultur	21
2.1.5.1. RPMI+	21
2.1.5.2. RPMI-Agarose	21
2.1.5.3. Medium für Vero- und L929 Zellen	21
2.1.5.4. Lymphozytenmedium	22
2.1.5.5. Medium für CTLL-2 Zellen	22
2.1.5.6. Einfriermedium	22
2.1.6. Verwendete Zelllinien	22
2.1.6.1. Vero	22
2.1.6.2. CTLL-2	22
2.1.6.3. L929	22
2.1.7. Puffer und Lösungen	23
2.1.7.1. Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	23
2.1.7.2. Erythrozyten-Lysepuffer	23

---

2.1.7.3. HEPES-Mercaptoethanol	23
2.1.7.4. Tris-EDTA (TE)-Puffer	23
2.1.7.5. Gepuffertes Formalin zur Fixierung	23
2.1.7.6. Thiazolylblau Tetrazoliumbromid (MTT)-Lösung	23
2.1.7.7. Material für Durchflusszytometrie	24
2.1.7.7.1. Puffer für Durchflusszytometrie	24
2.1.7.7.2. Antikörper für Durchflusszytometrie	24
2.1.7.8. Abstopplösung für IL-2 Bioassay	24
2.1.7.9. Actinomycin D-Lösung	24
2.1.7.10. Kristallviolettlösung	24
2.1.7.11. Trypanblaulösung	24
2.1.7.12. Enzephalomyokarditis (EMC)-Virussuspension	25
2.1.7.13. Lösungen für enzygekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA)	25
2.1.7.13.1. Beschichtungspuffer pH 9,5	25
2.1.7.13.2. Beschichtungspuffer pH 6,5	25
2.1.7.13.3. Waschpuffer	25
2.1.7.13.4. Verdünnungslösung	25
2.1.7.13.5 Substratpuffer	25
2.1.7.13.6. Stopplösung	25
2.1.7.13.7. OptEIA™ Kits für ELISA	26
2.1.7.14. Lösungen für Zymographie	26
2.1.7.14.1. Probenpuffer	26
2.1.7.14.2. Laufpuffer für Elektrophorese	26
2.1.7.14.3. Reaktionspuffer	26
2.1.7.14.4. Coomassielösung	26
2.1.7.14.5. Entfärbelösung	26
2.1.7.15. Lösungen für Westernblot	27
2.1.7.15.1. Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (TTBS)	27
2.1.7.15.2. Blockpuffer	27
2.1.7.15.3. Antikörper	27



---

2.1.8. DNS-Oligonukleotide	27
2.1.9. Versuchstiere	28
2.1.10. Anzahl der eingesetzten Versuchstiere	28
2.2. Methoden	29
2.2.1. Zellen	29
2.2.1.1. Kultur	29
2.2.1.2. Einfrieren	29
2.2.1.3. Auftauen	30
2.2.2. Trypanblaufärbung	30
2.2.3. Histologie	30
2.2.3.1. Aminopropyltriethoxysilane (APES)-Beschichtung	30
2.2.3.2. Poly-L-Lysin- (PLL)-Beschichtung	30
2.2.3.3. Paraffineinbettung fixierter Präparate	31
2.2.3.4. Hematoxylin-Eosin-Färbung	31
2.2.3.5. Hoechstfärbung	32
2.2.4. Virusstamm	32
2.2.5. Virusvermehrung	32
2.2.6. Inaktivierung des Virus	32
2.2.7. Plaqueassay	33
2.2.8. In vitro Studien zur Wirkung der Oligonukleotide	33
2.2.9. In vitro Studien zur Aufnahme von ASON in Zellen	34
2.2.10. Fluoreszenzmikroskopie	34
2.2.11. Durchflusszytometrie	35
2.2.12. Behandlung der Versuchstiere	35
2.2.12.1. Haltung der Versuchstiere	35
2.2.12.2. Narkose der Versuchstiere	35
2.2.12.3. Tötung der Versuchstiere	36
2.2.13. HSV-Infektion	36
2.2.14. Klinische Bewertung	36
2.2.15. Proliferationstest mit $^3\text{H}$ -Thymidin	36
2.2.16. Bestimmung des neutralisierenden Antikörpertiters gegen HSV-1	37

---

2.2.17. Messung der Hautreaktion vom verzögerten Typ (DTH, delayed type hypersensitivity reaction)	37
2.2.18. Herstellung der Sucralfat-Pellets für den Mikropocketassay	38
2.2.19. Applikation der Oligonukleotide in vivo	38
2.2.19.1. Kornealer Mikropocketassay	38
2.2.19.2. Subkonjunktivale Injektion	38
2.2.19.3 Subepitheliale korneale Injektion	38
2.2.20. Aufarbeitung von ganzen Augen	39
2.2.21. Aufarbeitung von Hornhäuten	39
2.2.21.1. für die Bestimmung des Zytokingehalts	39
2.2.21.2. für die Zymographie und den Western Blot	39
2.2.22. Bestimmung des Proteingehalts	39
2.2.23. Zytokinquantifizierungen mit ELISA	40
2.2.24. Bestimmung von bioaktiven Zytokinen mit Bioassays	41
2.2.24.1. Bestimmung des TNF- $\alpha$ -Gehalts mit Bioassay	41
2.2.24.2. Bestimmung des IL-2-Gehalts mit Bioassay	41
2.2.24.3. Bestimmung des IFN- $\gamma$ -Gehalts mit Bioassay	42
2.2.25. Zymographie	42
2.2.26. Western Blot	43
2.2.27. Studiendesign	43
2.2.28. Statistik	44
3. Ergebnisse	45
3.1. Antisensefreisetzung aus Sucralfat-Pellets	45
3.2. Einfluss der Oligonukleotide auf Zellvitalität und Proliferation	45
3.3. In vitro Inkubation mit ASON und KON gegen TNF- $\alpha$ mRNA	46
3.4. In vitro Inkubation mit ASON und KON gegen IL-2 mRNA	49
3.5. In vitro Inkubation mit ASON und KON gegen IFN- $\gamma$ mRNA	52
3.6. Aufnahme der ASON in Zellen aus den regionalen Lymphknoten und der Milz	54
3.7. Einfluss der Stimulation auf die Aufnahme der ASON in Zellen	57
3.8. Applikation der Oligonukleotide in vivo	58
3.8.1. Sucralfat-Pellets	58

---

3.8.2. Subkonjunktivale Injektion	58
3.8.3. Subepitheliale Injektion	60
3.9. Lokale Effekte nach subepithelialer Gabe	
von ASON gegen TNF- $\alpha$ mRNA	62
3.9.1. Klinischer Verlauf	62
3.9.2. Histologie	65
3.9.3. Ulzerationsrate	66
3.9.4. Inflammatorische Zellen in der Kornea	67
3.9.5. Virusreplikation im Auge	67
3.9.6. Zytokingehalt in der Hornhaut	68
3.9.7. Caseinolytische und gelatinolytische Aktivitäten von Extrakten der Hornhaut	69
3.10. Systemische Effekte nach subepithelialer Gabe	
von ASON gegen TNF- $\alpha$ mRNA	73
3.10.1. Neutralisierender Serumantikörper	73
3.10.2. Hautreaktion vom verzögerten Typ	74
3.10.3. Proliferationsassay	75
3.11. Lokale Effekte nach subepithelialer Gabe	
von ASON gegen IL-2 mRNA	76
3.11.1. Klinischer Verlauf	76
3.11.2. Inflammatorische Zellen in der Hornhaut	79
3.11.3. Zytokingehalt in der Hornhaut	82
3.12. Systemische Effekte nach subepithelialer Gabe	
von ASON gegen IL-2 mRNA	82
3.12.1. Hautreaktion vom verzögerten Typ	82
3.12.2. Proliferationsassay	83
3.12.3. Zytokinseznernung nach IL-2-ASON-Behandlung	84
3.13. Lokale Effekte nach subepithelialer Gabe	
von ASON gegen IFN- $\gamma$ mRNA	85
3.13.1. Klinischer Verlauf	85
3.13.2. Inflammatorische Zellen in der Hornhaut	89
3.13.3. Zytokingehalt in der Hornhaut	92
3.14. Systemische Effekte nach subepithelialer Gabe	

---

von ASON gegen IFN- $\gamma$ mRNA	92
3.14.1. Hautreaktion vom verzögerten Typ	92
3.14.2. Proliferationsassay	93
3.14.3. Zytokinsezernierung nach IFN- $\gamma$ -ASON-Behandlung	94
4. Diskussion	97
4.1. ASON allgemein	97
4.2. In vitro Aufnahme von ASON in Zellen aus Milz und Lymphknoten	97
4.3. Wirksamkeit von ASON in vitro	100
4.3.1. Wirksamkeit von ASON gegen TNF- $\alpha$ mRNA	100
4.3.2. Wirksamkeit von ASON gegen IL-2 mRNA	101
4.3.3. Wirksamkeit von ASON gegen IFN- $\gamma$ mRNA	102
4.4. In vivo Aufnahme von ASON in der Hornhaut	102
4.4.1. Mikropocketassay	102
4.4.2. Subkonjunktivale Injektion	103
4.4.3. Subepitheliale Injektion	103
4.5. In vivo Daten allgemein	105
4.6. Blepharitis	107
4.7. Epitheliale Keratitis	107
4.8. Nach Behandlung mit ASON gegen TNF- $\alpha$ mRNA	108
4.9. Nach Behandlung mit ASON gegen IL-2 mRNA	113
4.10. Nach Behandlung mit ASON gegen IFN- $\gamma$ mRNA	115
4.11. In vivo Daten für alle ASON	118
4.12. Ausblick	119
5. Zusammenfassung	121
6. Literaturverzeichnis	123
7. Publikationsliste	139
7.1. Publikationen	139
7.2. Poster/Vorträge	139
8. Abkürzungsverzeichnis	143
Anhang	