

UNTERSUCHUNG DER ZYTOKINSEKRETION IM AUGE UND IN DEN REGIONALEN LYMPHKNOTEN BEI DER EXPERIMENTELLEN HSV-1 KERATITIS.

D. Bauer, A. Heiligenhaus, M. Zheng, S. Mrzyk, K.-P. Steuhl

Die T-Lymphozyten können aufgrund typischer Zytokinmuster in drei große Gruppen (Typen 0, 1, 2) unterteilt werden. Es ist bekannt, daß die Behandlung mit Zytokinen den Verlauf akuter viraler Infektionen beeinflussen kann. Daher untersuchten wir die Kinetiken der zellulären Antwort und der Zytokinsekretion bei der experimentellen HSV-1 Keratitis.

Methode: BALB/c Mäuse wurden korneal mit HSV-1 (KOS) infiziert. Die infizierten Augen, die regionalen Lymphknoten und die Milz wurden an unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. bezüglich der Zytokine von Typ 1 (IL-2, IFN γ) und Typ 2 (IL-4) T-Zell Populationen und bezüglich der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 untersucht. Die Analyse der Augen erfolgte histologisch, immunhistochemisch und mit der PCR-Technik; die regionalen Lymphknoten und die Milz wurden mittels PCR und FACS untersucht.

Ergebnisse: Alle Mäuse entwickelten bis zum Tag 14 eine schwere stromale Keratitis. Die zentrale Hornhaut wies nach dem 7. Tag eine dichte entzündliche Infiltration auf. IL-1 β , IL-2, IL-4 und IFN γ wurden immunhistochemisch in der Bindehaut und Hornhaut nach dem 4. Tag nachgewiesen; IL-6 war in den infizierten Hornhäuten nachweisbar. Die Analyse der Zytokin-mRNA mittels PCR untermauerte diese Ergebnisse.

Schlußfolgerungen: Typ 1 und Typ 2 Zytokine lassen sich in HSV-1 infizierten Hornhäuten bei Mäusen nachweisen. Die vorläufige Analyse der regionalen Lymphknoten bezüglich der zellulären Reaktionen und der Zytokine läßt vermuten, daß diese für den Verlauf der herpetischen Keratitis wichtig sind.

Augenklinik, Universität Essen, Hufelandstrasse 55, 45122 Essen. Unterstützt durch DFG Stipendium He 1877 /7-1.

Makrophagenprojekt

DIE SUBKONJUNKTIVALE BEHANDLUNG MIT CL₂MDP-LIPOSOMEN MODULIERT DIE IMMUNANTWORT NACH KORNEALER HSV-1 INFEKTION BEI BALB/C-MÄUSEN

D. Bauer¹, A. Schmitz¹, N. van Rooijen², K.-P. Steuhl¹, A. Heiligenhaus¹

Die subkonjunktivale Makrophagendepletion hat einen wesentlichen Einfluß auf den Verlauf der HSV-1 induzierten Keratitis bei BALB/c Mäusen. In dieser Studie wurde die Wirkung der Makrophagendepletion auf die Immunantwort nach der HSV-1 Infektion untersucht.

Methoden: BALB/c Mäuse wurden mittels subkonjunkivaler Injektionen von Cl₂MDP-Liposomen (Cl₂MDP-LIP) 7 und 2 Tage vor kornealer Infektion (10⁵ PFU HSV-1; KOS) behandelt. Die Mäuse wurden klinisch hinsichtlich der epithelialen und stromalen Keratitis untersucht. Die HSV-1 antigenspezifische DTH-Antwort und der Titer der virusneutralisierendem Antikörper wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion ermittelt. Ebenso wurde die Sekretion von IFN-gamma und IL-2 in den infizierten Hornhäuten und Lymphozyten, die aus den regionalen Lymphknoten isoliert wurden, mit ELISA und semiquantitativer PCR untersucht.

Ergebnisse: Die Depletion der konjunktivalen Makrophagen vor kornealer HSV-1 Infektion verzögerte die Abheilung der epithelialen Keratitis und die Eliminierung des Virus aus den infizierten Augen (Tag 7 p.i.: P < 0,05). Außerdem verringerte sich die Inzidenz und der Schweregrad der immunvermittelten stromalen Keratitis (Tag 14 p.i.: P < 0,05). Die makrophagendepletieren Mäuse zeigten an Tag 14 eine verringerte DTH-Antwort (P < 0,001). Der HSV-1 spezifische Antikörpertiter erhöhte sich nach Makrophagendepletion (Tag 10, 14 p.i. P < 0,05). Die makrophagendepletieren Mäuse zeigten eine verringerte Sekretion von IFN-g, IL-2 und IL4 in den infizierten Hornhäuten und den Lymphozyten aus den regionalen Lymphknoten.

Schlußfolgerung: Die Ergebnisse zeigen, daß Makrophagen den Verlauf der HSV-1 Keratitis beeinflussen. Neben ihrer Rolle in der Eliminierung des Virus aus dem infizierten Auge scheinen Makrophagen die T-Zell Antwort und die humorale Immunantwort gegen HSV-1 zu regulieren.

DFG He 1877/7-1

¹Universitäts-Augenklinik Essen, Hufelandstrasse 55, D - 45122 Essen

²Department of Cell Biology & Immunology, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands.

APOPTOSIS IN CORNEAL SPECIMEN FROM PATIENTS WITH HSV-1 STROMAL KERATITIS

S. Mrzyk, D. Bauer, G. Anastassiou, K.-P. Steuhl, A. Heiligenhaus

The pathogenesis of HSV-1 stromal keratitis is poorly understood. Keratocyte apoptosis has been found in response to experimental HSV-1 epithelial infection. Fas ligand (FasL)-induced apoptosis has been suggested as a mechanism to maintain immune privilege within the cornea. This study now investigated apoptotic cell death in keratectomy specimens from patients with HSV-1 stromal keratitis.

Methods The keratectomy specimens from patients with active HSV-1 nonulcerative (n=5) or ulcerative (n=10) necrotizing stromal keratitis were studied. Paraffin sections were analyzed histologically and by immunoperoxidase technique for the presence of HSV-1 antigens, Fas (CD95) and Fas ligand (FasL). The TUNEL-assay (TdT-mediated dUTP nick- end labeling) was used to detect apoptosis.

Results All samples with ulcerative keratitis showed an inflammatory cell infiltration in the epithelium and underlying stroma; HSV-1 antigens were noted in these areas. Apoptosis of infiltrating inflammatory cells was found. Numerous epithelial cells and keratocytes surrounding the ulceration were apoptotic. FasL-expression was observed on epithelial and endothelial cells outside the inflamed portion, but it had disappeared at the area of ulceration. Fas-expression was prominent in the epithelial cells and the keratocytes surrounding the ulceration. A significant number of cells within the inflammatory infiltrations were Fas+, FasL+, and TUNEL+. In the specimens with nonulcerative keratitis HSV-1 antigens, Fas expression, and apoptotic cells were located at areas of stromal inflammatory cell infiltration.

Conclusions Fas-system and apoptosis were identified in human HSV-1 stromal keratitis. The distribution of apoptosis differed between ulcerating and nonulcerating cases and correlated with HSV-1 antigen localization. The Fas- FasL system may modulate corneal tissue organization and the inflammatory response, and could play a role in maintaining corneal transparency in HSV-1 stromal keratitis.

DFG He 1877/7-1

Dept. of Ophthalmology, University, Hufelandstr. 55, 45122 Essen

Amnionmembran

AMNIONMEMBRAN TRANSPLANTATION BEEINFLUSST DEN VERLAUF DER EXPERIMENTELLEN HSV-1 KERATITIS.

A. Heiligenhaus¹, D. Bauer¹, S. Mrzyk¹, D. Meller^{1,2}, K. P. Steuhl¹, S. C. G. Tseng²
Es ist kürzlich nachgewiesen worden, daß bei der stromalen HSV-1 Keratitis (HSK) Neutrophile wesentlich zur Destruktion der Hornhaut beitragen. In dieser Studie wurde der Einfluß einer Transplantation von humaner Amnionmembran auf den Verlauf der HSK und insbesondere auf die Neutrophilen untersucht.

Methode: BALB/c Mäuse wurden korneal mit HSV-1 (KOS Stamm) infiziert. Bei Mäusen mit schwerer ulzerierender HSK (n=15) erfolgte eine Amnionmembran Transplantation. Nach der Operation wurden die Mäuse bezüglich der klinischen Zeichen der HSV-1 Keratitis kontrolliert. Die Augen wurden histologisch and immunhistochemisch (CD11b mAb) und mittels TUNEL Assay untersucht.

Ergebnisse: Bei allen unbehandelten Tieren in der Kontrollgruppe (n=15) nahm die Schwere der HSV-1 Keratitis deutlich zu. Im Gegensatz dazu besserten sich durch die Amnionmembran Transplantation innerhalb von 2 Tagen die korneale Entzündung und Ulzeration ($p < 0,001$); die Zahl der Neutrophilen und der CD11b+ Zellen in der Hornhaut reduzierte sich signifikant ($p < 0,001$); die Neutrophilen wiesen die typischen histologischen Merkmale von Apoptose auf und waren TUNEL-positiv.

Schlußfolgerungen: Eine Transplantation von humaner Amnionmembran verbessert die stromale Infiltration und Ulzeration bei der experimentellen HSV-1 Keratitis. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß für diesen Effekt eine Apoptose der Neutrophilen verantwortlich sein könnte.

Gefördert durch DFG He 1877/7-1

¹Universitäts-Augenklinik Essen, Hufelandstrasse 55, 45122 Essen;

²Ocular Surface & Tear Center, Bascom Palmer Eye Institute, and Department of Cell Biology & Anatomy, University of Miami School of Medicine, Miami, FL 2

Lokale Minderung von Tumor-Nekrose-Faktor Alpha bessert den Krankheitsverlauf bei der experimentellen Herpes-Keratitis

Wasmuth S.^{1,2}, Bauer D.¹, Yang Y.¹, Steuhl K. P.², Heiligenhaus A.¹

¹Ophtha-Lab und Augenabteilung am St. Franziskus Hospital, Münster; ²Universitätsaugenklinik Duisburg-Essen

Hintergrund: In dieser Studie wurde untersucht, ob die lokale Gabe von Antisense-Oligonukleotiden (ASON) gegen TNF-alpha den Verlauf der Herpes Simplex Keratitis (HSK) beeinflussen kann.

Methode: Milz- und Lymphknotenzellen von Herpes Simplex Virus-1 infizierten Tieren wurden mit Konzentrationen von 0,5 bis 20 µM ASON, sequenzunspezifischen Kontroll-Oligonukleotiden (KON) oder Medium inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellkulturüberstände auf ihren TNF-alpha-Gehalt im ELISA untersucht. Mit FITC-ASON wurde die Aufnahme der Oligonukleotide in Zellen im FACS analysiert. *In vivo* wurden FITC-ASON oder ungebundenes FITC in die Hornhaut von BALB/c Mäusen injiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Paraffinschnitte der behandelten Augen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. An Tag 0 wurden die Hornhäute von BALB/c Mäuse 10hoch5 PFU HSV-1 infiziert. Eine lokale Behandlung mit ASON gegen TNF-alpha erfolgte an den Tagen -1, 1 und 4. Kontrolltiere wurden nur infiziert bzw. mit KON oder Puffer behandelt. Die Mäuse wurden täglich klinisch untersucht.

Ergebnisse: Die getesteten ASON konnten die TNF-alpha-Produktion von Milz- und Lymphknotenzellen *in vitro* stark reduzieren. *In vivo* waren die FITC-ASON nach einmaliger intrakornealer Applikation mindestens 10 Tage lang in der Hornhaut nachweisbar. 48 h nach der Injektion von ungebundenem FITC konnte nur noch eine Fluoreszenz in der Größenordnung der Autofluoreszenz beobachtet werden. Im Tiermodell konnte die Entstehung der HSK durch die Gabe von ASON nahezu verhindert werden. Inflammatorische Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. KON besserte den Verlauf der Erkrankung leicht, die Verabreichung von Puffer hatte keinen Effekt auf die Klinik.

Schlussfolgerungen: Die lokale Applikation von ASON gegen TNF-alpha ist bei der experimentellen Herpes Simplex Keratitis als erfolgreicher Behandlungsansatz zu betrachten. TNF-alpha scheint eine zentrale Rolle bei der Entstehung der HSK zu spielen.

Suppression der murinen Herpes-Simplex-Keratitis durch topische Verabreichung von Interleukin-10 Plasmid DNA

D. Bauer¹, S. Wasmuth¹, M. Lu², M. Roggendorf², K.-P. Steuhl¹, A. Heiligenhaus^{1,3}

Bei der Herpes simplex Typ 1 (HSV-1) induzierten stromalen Keratitis (HSK) spielen immunpathologische Reaktionen von CD4+ Th1 Lymphozyten eine entscheidende Rolle. In dieser Studie wurde untersucht, ob der Verlauf der herpetischen stromalen Keratitis (HSK) durch topische Verabreichung von Interleukin-10 (IL-10) Plasmid DNA beeinflusst werden kann.

Methoden: BALB/c Mäuse wurden korneal mit 10^5 PFU von HSV-1 (KOS-Stamm) infiziert. Interleukin-10 Plasmid-DNA-Konstrukte wurde benutzt, um die Mäuse *in vivo* an Tag 7 p.i. mit Hilfe der Gene Gun zu transfizieren. PcDNA3.1 Vektoren unter der Kontrolle von CMV-Promotoren wurden für die Gentransfer Studien (*in vivo* und *in vitro*) benutzt. *In vitro* wurde das DNA-Konstrukt in kultivierte L929-Zellen mit Lipofektamine als Kontrolle für die Produktion von IL-10 transfiziert.

Ergebnisse: 80% der HSV-1 infizierten Kontrolltiere entwickelten eine nekrotisierende stromale Keratitis bis zum Tag 14 p.i.. Nach topischer Verabreichung von IL-10 Plasmid DNA war das Auftreten und der Schweregrad der Erkrankung signifikant reduziert und im histologischen Bild zeigten sich verminderte Zellinfiltrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur pcDNA 3.1 Vektor appliziert bekommen hatte.

Schlußfolgerung: Die Ergebnisse zeigen, daß der Krankheitsverlauf durch topische Verabreichung von Plasmid DNA, die protektive Zytokine kodieren, verbessert werden kann. Die Transfektion mit Hilfe der Gene Gun könnte in Zukunft eine therapeutische Option für die Behandlung von Entzündungskrankheiten darstellen. Die Technik des Goldpartikel-vermittelten Gentransfers scheint eine gute Technik zu sein, um den Effekt von Zytokinen auf den Verlauf der HSK zu untersuchen.

¹Augenklinik, Universität Essen;

²Institut für Virologie, Universität Essen;

³St. Franziskus-Krankenhaus, Münster, Deutschland

DMF-Projekt

Methylfumarate induzieren Interleukin-4 und -10 und bessern HSV-1-Keratitis bei BALB-c Mäusen

Heiligenhaus A.¹, Li H.¹, Wasmuth S.^{1,2}, Bauer D.¹

¹Ophtha-Lab, Augenabteilung am St. Franziskus Hospital, Münster; ²Universitätsaugenklinik, Universität Duisburg-Essen.

Hintergrund: Methylfumarate (MF) stimulieren T Helfer-2-Zytokine (Interleukin (IL)-4, -5, -10) ohne T-Helfer-1-Zytokine (IL-2, Interferon (IFN)-g) zu beeinflussen. Die stromale HSV-1 Keratitis (HSK) bessert sich nach systemischer Gabe von IL-4 oder -10. Diese Studie untersucht den Einfluss von MF auf die Sekretion von T Helfer-Zytokinen und auf die Entwicklung der HSK.

Methode: Die rechte Hornhaut von BALB/c Mäusen wurde mit HSV-1 (KOS) infiziert. Am Tag 14 nach Infektion (p.i.), wurden die Lymphozyten aus den regionalen Lymphknoten mit Monomethylfumarat (MMF) co-kultiviert und mit HSV-1 Antigen stimuliert. Die Sekretion von IL-2, -4, -10 und IFN-g wurde mittels ELISA bestimmt. Unterschiedliche Gruppen von Mäusen wurden systemisch behandelt mit: 1: Vehikel für 28 Tage vor Infektion; oder 2: Dimethylfumarat (DMF) für 28 Tage vor Infektion; oder 3: DMF für 14 Tage nach Infektion; oder 4: DMF vor und nach Infektion. Die Mäuse wurden bezüglich der klinischen Zeichen einer HSV-Keratitis untersucht. Die Hornhäute wurden histologisch beurteilt. Die Virusreplikation in den infizierten Augen wurde mit einem Plaque-Assay gemessen. Die DTH-Reaktion, die HSV-1 spezifische Zellproliferation in den regionalen Lymphknoten und die neutralisierenden Antikörper im Serum wurden bestimmt.

Ergebnisse: MMF steigerte die IL-4 und IL-10-Sekretion von Lymphozyten; IL-2 und IFN-g wurden nicht beeinflusst. 72% der Mäuse in Gruppe 1 (n=14) entwickelten am Tag 14 p.i. eine schwere stromale Keratitis. Die DMF-Behandlung verminderte die Entwicklung der Keratitis in den Gruppen 2 (35.2%, n=17), 3 (35%, n=20) und 4 (22%, n=19). Während die Virusreplikation, die DTH und die neutralisierenden Antikörpertiter unbeeinflusst blieben, war die HSV-1-spezifische Zellproliferation geringfügig reduziert.

Schlussfolgerungen: Die Daten zeigen, dass Methylfumarate die Sekretion von T Helfer-2-Zytokinen im Tiermodell der HSK induzieren. Dieses ist mit einer Besserung der stromalen HSV-1 Keratitis assoziiert.