

Polyphenolinduzierte Modulation der Makrophagenabwehr gegenüber Leishmanien

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Oliver Alexander Radtke

Berlin, 2006

Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Kolodziej

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. O. Kayser

Tag der Disputation: 08. Januar 2007

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie (Pharmazeutische Biologie), Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Kolodziej angefertigt. Für die Überlassung des Themas, für wertvolle Hinweise und Diskussionen sowie für die vielseitige Unterstützung meiner Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Kolodziej.

Die Arbeit entstand in Kooperation mit dem Robert Koch–Institut, Abteilung P22. Für die Unterstützung der infektionsbiologischen experimentellen Arbeiten, die Überlassung der Laboratorien und Geräte sowie ständige fachliche und persönliche Unterstützung am RKI danke ich Herrn Dr. Albrecht F. Kiderlen, Robert Koch-Institut, P22. Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. R. Burger und Dr. H. Schäfer, Robert Koch-Institut, Abt. 1, für die freundliche Erlaubnis, Teile der Laboratorien und Gerätschaften mitzunutzen.

Für fachliche und persönliche Unterstützung und materielle Hilfe sowie für die Übernahme des Korreferats danke ich Prof. Dr. O. Kayser, Rijksuniversiteit Groningen, Faculteit der Medische Wetenschappen en Farmacie.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie, die mich während meiner Arbeit in vielfältiger Weise unterstützt haben, insbesondere Herrn Dr. R. Gormann, Frau D. Emmrich und Frau C. Köhler, sowie des Robert Koch – Instituts, insbesondere Frau U. Folkens, Frau E. Radam, Frau U. Laube und Frau P. Matzk.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- Radtke OA, Kiderlen AF, Kayser O, Kolodziej H:** Gallic Acid as a Model Substance for Plant Polyphenolics Activates Macrophage-like RAW cells Against Intracellular *Leishmania major* Parasites. 48. Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung (GA), Zürich, 03. - 07.09.2000, Abstract P2B/09 (Poster)
- Radtke OA, Kiderlen AF, Kayser O, Kolodziej H:** Gallic acid induced cytokine gene expression in *Leishmania donovani* infected RAW cells. 12th Japanese-German Symposium on Protozoan Diseases, Bonn, 23.-27.09.200, Abstract 72 (Poster)
- Radtke OA, Kiderlen AF, Kayser O, Kolodziej H:** Cytokine Gene Expression in *Leishmania major*-Infected Macrophage-Like RAW Cells Treated with Gallic Acid. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie „Immunomodulation by Parasites“, Berlin, 05.-06.04.2001, Abstract P34 (Poster)
- Radtke OA, Kiderlen AF, Kayser O, Kolodziej H:** Zur Expression von Cytokingenen in *Leishmania donovani* –infizierten RAW 264.7-Zellen durch Polyphenole. Tagung „Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor“ der Landesgruppe Berlin-Brandenburg der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), 10.07.2001, Humboldt-Universität zu Berlin, Abstract P20 (Poster)
- Radtke OA, Kayser O, Kiderlen AF, Kolodziej H:** Cytokine gene induction by 3,5-digalloyl shikimic acid, epigallocatechin 3-gallate and a proanthocyanidin hexamer against intracellular *Leishmania donovani*. 49. Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung (GA), Erlangen, 02. - 06.09.2001, Abstract 3.56 (Poster)
- Radtke OA, Kiderlen AF, Kayser O, Kolodziej H:** Polyphenols modulate the Cellular Immune Response in *Leishmania*-infected Macrophages. Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies of Parasitology, Lübeck, 20.–23.03.2002, Abstract E 16 (Vortrag)
- Radtke OA, Kiderlen AF, Kayser O, Kolodziej H:** B-Type Proanthocyanidins induce IL-1, IL-12 and TNF- α mRNA production in *Leishmania major*-infected RAW264.7 cells. 5th COST B9 Congress on Antiprotozoal Chemotherapy, London, 23.-26.06.2002 Abstract A 9 (Poster)
- Radtke OA, Foo LY, Lu Y, Kiderlen AF, Kolodziej H:** Evaluation of sage phenolics for their antileishmanial activity and modulatory effects on interleukin-6, interferon and tumour necrosis factor-alpha-release in RAW 264.7 cells. 50. Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung (GA), Barcelona, 08. - 12.09.2002, Abstract A222 (Poster)
- Ercil D, Kaloga M, Radtke OA, Sakar MK, Kiderlen AF, Kolodziej H:** O-Galloyl Flavonoids from *Geranium pyrenaicum* and Their in vitro Antileishmanial Activity. 50. Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung (GA), Barcelona, 08. - 12.09.2002, Abstract A252 (Poster)

- Radtke OA, Kiderlen AF, Kayser O, Kolodziej H:** Induktion von Interleukin-1, -12 und TNF α -mRNAs durch Proanthocyanidine in *Leishmania major*-infizierten RAW-Zellen. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Berlin, 09-12.10.2002, Abstract P:B22 (Poster)
- Radtke OA, Foo LY, Lu Y, Kiderlen AF, Kolodziej H:** Evaluation of sage phenolics for their antileishmanial activity and modulatory effects on interleukin-6, interferon and tumour necrosis factor-alpha-release in RAW 264.7 cells. *Z. Naturforsch* 58c (2003): 395-400
- Kolodziej H, Kayser O, Radtke OA, Kiderlen AF, Koch E:** Pharmacological profile of extracts of *Pelargonium sidoides* and their constituents. *Phytomedicine* 10 (2003) Supp. IV: 18-24
- Radtke OA, Kiderlen AF, Kayser O, Kolodziej H:** Kinetische Untersuchungen zur Gallussäure-induzierten Transkription von Cytokingenen in *Leishmania major*-infizierten RAW 264.7-Zellen. Tagung „Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor“ der Landesgruppe Berlin-Brandenburg der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPHG), 05.07.2004, Freie Universität Berlin, Abstract V 7 (Vortrag)
- Radtke OA, Kiderlen AF, Kayser O, Kolodziej H:** Gene expression profiles of inducible nitric oxide synthase and cytokines in *Leishmania major*-infected macrophage-like RAW 264.7 cells treated with gallic acid. *Planta Medica* 70 (2004): 924-928
- Ercil D, Kaloga M, Radtke OA, Sakar MK, Kiderlen AF, Kolodziej H:** O-Galloyl Flavonoids from *Geranium pyrenaicum* and Their in vitro Antileishmanial Activity. *Turkish Journal of Chemistry* 29 (2005): 437-443
- Kolodziej H, Burmeister A, Trun W, Radtke OA, Kiderlen AF, Ito H, Hatano T, Yoshida T, Foo LY:** Tannins and related compounds induce nitric oxide synthase and cytokines gene expressions in *Leishmania major*-infected macrophage-like RAW 264.7 cells. *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2005): 6470-6476

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Leishmaniosen als Weltgesundheitsproblem	1
1.2	Antiparasitäre Wirkstoffe gegen Leishmaniosen	5
1.3	Zelluläre Immunmechanismen gegen Leishmanien	8
1.4	Biologische Aktivität von Polyphenolen	11
2	Zielsetzung	12
3	Isolierung von Corilagin	13
4	Antileishmanielle Wirkung ausgewählter Polyphenole	14
4.1	Wirkung gegenüber Promastigoten	14
4.2	Wirkung gegenüber Amastigoten	16
5	Zytokinbestimmung in Zellüberständen	19
5.1	Tumor-Nekrose-Faktor (Bioassay)	19
5.2	Interleukin-6 (Bioassay)	23
5.3	Interferon	27
	5.3.1 Bestimmung von Interferonaktivität (Bioassay)	28
	5.3.2 Bestimmung von IFN- α (ELISA)	30
	5.3.3 Bestimmung von IFN- γ (ELISA)	32
5.4	Interleukin-12 (ELISA)	33
6	Stimulus (IFN-γ/ LPS/ Gallussäure)-abhängige NO-Produktion und antileishmanielle Wirkung	36
6.1	Nicht infizierte Zellen	37
6.2	Infizierte Zellen	41
7	Einfluss von Polyphenolen auf die NO-Sekretion in RAW-Zellen und antileishmanielle Aktivität	48
8	Nachweis der Transkription ausgewählter Zytokingene durch semiquantitative RT-PCR	54
8.1	Kinetik der Zytokingentranskription nach Stimulation mit Gallussäure im Vergleich zu IFN- γ + LPS	54
	8.1.1 Nicht infizierte Zellen	54
	8.1.2 Infizierte Zellen	55
8.2	Zytokingen-Transkriptionsprofile von <i>L. major</i> und <i>L. donovani</i> infizierten RAW 264.7-Zellen nach Stimulation mit Polyphenolen	58
9	Diskussion	65

10	Zusammenfassung	74
11	Summary	79
12	Experimenteller Teil	83
12.1	Testsubstanzen	83
12.2	Geräte	83
12.3	Isolierung und Strukturaufklärung von Corilagin	83
12.4	Immunologische, toxikologische und molekularbiologische Arbeitstechniken	84
12.5	Molekularbiologische Techniken	96
12.6	ELISA	99
13	Literatur	102
14	Anhang	114
14.1	Abkürzungsverzeichnis	115
14.2	Datenanhang I (Kap. 7)	116
14.3	Datenanhang II (Kap. 8.1)	122
14.4	Datenanhang III (Kap. 8.2)	123
14.5	Strukturformeln der Testsubstanzen	126
14.6	Curriculum vitae	131
14.7	Selbständigkeitserklärung	132