

6. Stimulus (IFN- γ /LPS/Gallussäure)-abhängige NO-Produktion und antileishmanielle Wirkung

Wie aus vorausgegangenen Kapiteln ersichtlich, wurden Phenole als Testsubstanzen eingesetzt, IFN- γ + LPS diente als Positivkontrolle zur Aktivierung. Kenntnisse über eine mögliche gegenseitige Beeinflussung von Stimuli liegen bislang kaum vor. Zum Beispiel findet sich in einer Arbeit von Lin und Lin (1997) ein Hinweis darauf, dass Gallussäure die NO-Produktion in LPS-aktivierten Peritonealmakrophagen hemmt. Demgegenüber belegen unsere bisherigen Untersuchungen in Abwesenheit von LPS eine aktivierende Wirkung von Gallussäure und anderen Polyphenolen. Inwieweit die Anwesenheit zusätzlicher Stimuli die Makrophagenaktivierung beeinflusst, sollte exemplarisch mit Gallussäure näher untersucht werden. Hierzu wurden Gallussäure, IFN- γ und LPS sowohl als Einzelkomponenten als auch in Kombination aus jeweils zwei bzw. aller drei Komponenten eingesetzt und bezüglich NO-Induktion und antileishmanieller Wirkung betrachtet. Weiterhin war von Interesse, inwieweit bei Verabreichung von mehr als einer Komponente deren Reihenfolge sowie der Zeitpunkt der Gabe der Zweitkomponente das Ergebnis beeinflusst. Analoges gilt für die Kombination aus drei Komponenten. Aus diesen Überlegungen heraus wurde ein Kombinationsversuch durchgeführt, der 1.) alle möglichen kombinierten Gaben von IFN- γ , LPS und Gallussäure berücksichtigt, 2.) deren Reihenfolge und 3.) das Zeitfenster durch Verabreichung der Zweitkomponente zu den Zeiten 30 min, 3 h und 24 h nach der Erstkomponente mit einbezieht. Es stellte sich ebenfalls die Frage, ob die sukzessive Verabreichung von zwei Stimuli im Vergleich zur Inkubation mit einer Zweitkomponente nach dem Entfernen der ersten ein anderes Ergebnis liefert. Für den speziellen zweiten Fall wurde nach Inkubation mit der Erstkomponente das Medium komplett verworfen, der Zellrasen gewaschen und anschließend frisches Medium mit der Zweitkomponente gegeben.

Je einem Ansatz nicht infizierter, *L. major* infizierter und *L. donovani* infizierter RAW-Zellen wurden 100 U/ml r-mu-IFN- γ , 10 ng/mL LPS oder 50 μ g/ml Gallussäure als Erstkomponente verabreicht. Je einer dieser Ansätze diente als Kontrolle für die Einzelbehandlung, je einem weiteren Ansatz wurde nach 30

min, 3 h bzw. 24 h eine Zweitkomponente ins Medium beigefügt (bzw. wie oben beschrieben, gegen Medium mit der Zweitkomponente ausgetauscht). Weiterhin wurde die gleichzeitige Gabe von IFN- γ + LPS, IFN- γ + Gallussäure und LPS + Gallussäure betrachtet und nach 30 min, 3 h und 24 h die jeweils fehlende Komponente hinzupipettiert (bzw. ausgetauscht). Schließlich wurde die gleichzeitige Verabreichung von Interferon, LPS und Gallussäure mitgeführt. Nach 72 h wurden die Überstände entnommen und mittels Griess-Test die NO-Produktion gemessen. Die infizierten RAW-Zellen wurden lysiert und zur Anzucht überlebender Leishmanien die Post-Lysis eingeleitet. Proliferation der Leishmanien wurde 96 h nach der Lyse mittels MTT-Test bestimmt. Parallel wurde zur Kontrolle die Viabilität der RAW-Zellen bestimmt.

6.1 Nicht infizierte Zellen

Weder als Einzelkomponenten noch in irgendwelchen Kombinationen setzten IFN- γ , LPS oder Gallussäure die Vitalität von nicht infizierten RAW-Zellen so weit herab, dass derartige Ansätze nicht mehr auswertbar wären (Abb. 6.1). Auffällig ist aber, dass Stimulus-Kombinationen, die zu relativ hohen NO-Produktionen führten, die Viabilität negativ beeinflussten. So beträgt der MTT-Umsatz von IFN- γ +LPS-aktivierten Zellen nur etwa 70% einer unbehandelten Population.

Was die NO-Produktion anbetrifft, induzierten sowohl IFN- γ als auch LPS eine signifikante Freisetzung (65 bzw. 42 μ M). Gallussäure allein hatte dagegen nur einen geringen Effekt auf die NO-Produktion. Gemeinsam im selben Medium verabreicht, führten IFN- γ + LPS, unabhängig von der Reihenfolge der Zugabe und dem Zeitfenster, zu einer gesteigerten NO-Produktion auf das 1,5-fache (Abb. 6.1). Auffällig ist, dass Zellen, die mit IFN- γ behandelt wurden und deren Medium innerhalb von 3 h gegen solches mit 10 ng/mL LPS ausgetauscht wurde, kaum NO produzierten. Dagegen inhibierte Gallussäure die durch IFN- γ oder LPS induzierte NO-Produktion, wenn die Zweitkomponente innerhalb der ersten 3 h hinzugegeben wurde, und zwar wiederum unabhängig von der Reihenfolge: So ergibt beispielsweise der Ansatz mit Erstkomponente LPS und Zweitkomponente Gallussäure nahezu das gleiche Ergebnis wie der umgekehrte Ansatz.

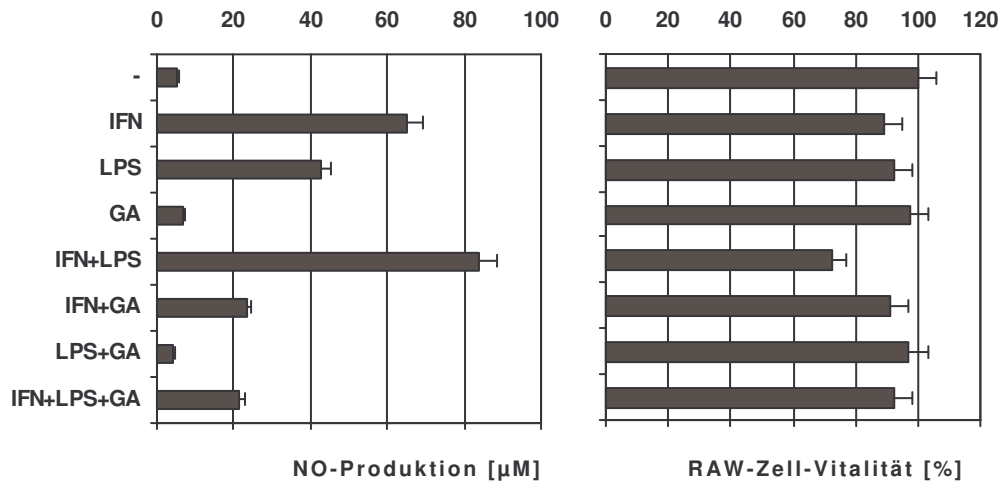


Abb. 6.1: NO-Produktion (Griess-Assay) und Vitalität (MTT-Assay) nicht infizierter RAW 264.7-Zellen nach 72 h in Abhängigkeit vom Stimulus: ohne Behandlung (-), 100 U/mL IFN- γ (IFN), 10 ng/mL Lipopolysaccharid (LPS), 50 μ g/mL Gallussäure (GA) oder gleichzeitige Applikation zweier oder aller drei Komponenten. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung.

Ob für die Hemmbarkeit der LPS-Wirkung durch Gallussäure analog Quercetin (Peet und Li, 1999) die Inhibition der I- κ B-Kinase (IKK) und somit der NF- κ B-Aktivierung anzunehmen ist, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Hinzu kommt jedenfalls, dass LPS nicht allein an seinen Rezeptor CD14 auf der Makrophagenoberfläche binden kann, sondern nur als Komplex mit dem LPS-bindenden Protein LBP aus dem Serumanteil des Mediums (Rietschel et al., 1993; Schütt und Schumann, 1993; Wiese et al., 1999). Es ist zu vermuten, dass eine hohe Konzentration an Gallussäure die Verfügbarkeit an freiem Protein erheblich verringert. Wurde mit Gallussäure vorbehandelt und als Zweitkomponente LPS appliziert, produzierten die Zellen nach 3 h immerhin 45 μ M NO, wenn das gallussäurehaltige Medium gegen frisches ausgetauscht wurde, ohne Mediumwechsel nicht (Abb. 6.4)!

Die Induktion der NO-Produktion durch IFN- γ war durch Gallussäure in wesentlich geringerem Maße inhibierbar. Bei IFN- γ als Erstkomponente wurde die Zellaktivierung offenbar hauptsächlich durch unmittelbar folgenden Mediumwechsel verhindert, denn weder Gallussäure noch LPS noch die Kombination beider führten dann zu einer messbaren NO-Produktion; die zusätzliche Applikation von Gallussäure allein oder zusammen mit LPS innerhalb von 3 h in denselben Überstand lieferten dagegen NO. Gallussäure inhibierte also die IFN- γ -bedingte Aktivierung teilweise und verhinderte offenbar die Wirkung von gleichzeitig appliziertem LPS.

Ergebnisse

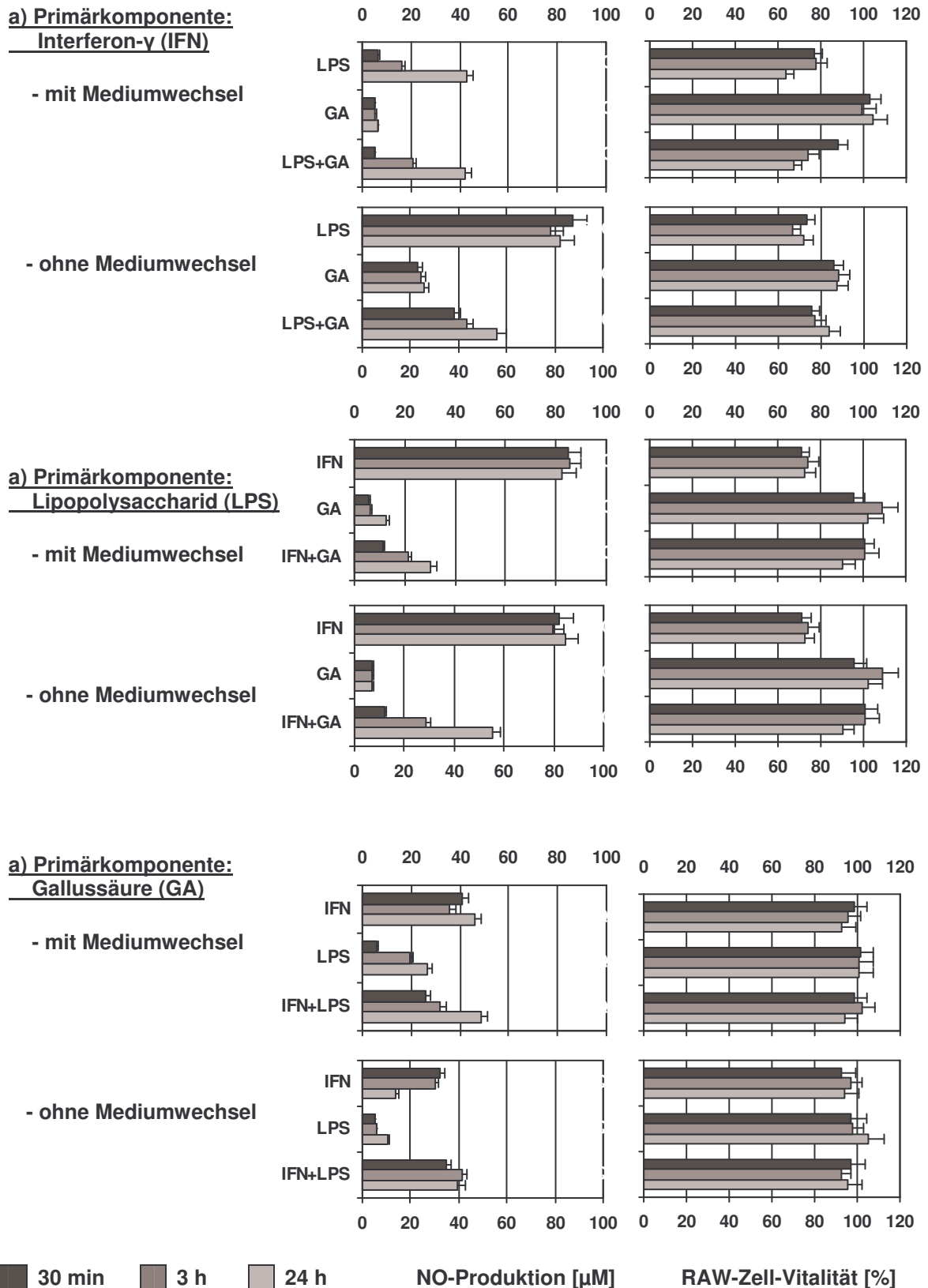


Abb. 6.2: NO-Produktion und Vitalität nicht infizierter RAW 264.7-Zellen infolge verschiedener Kombinationen von Interferon- γ (IFN), Lipopolysaccharid (LPS) und Gallussäure (GA); Zellen wurden jeweils in Medium mit der Erstkomponente vorinkubiert, nach 30 min, 3 h oder 24 h wurde die Zweitkomponente anstatt der (mit Mediumwechsel) bzw. zusätzlich zu der (ohne Mediumwechsel) Erstkomponente hinzugegeben.

Ergebnisse

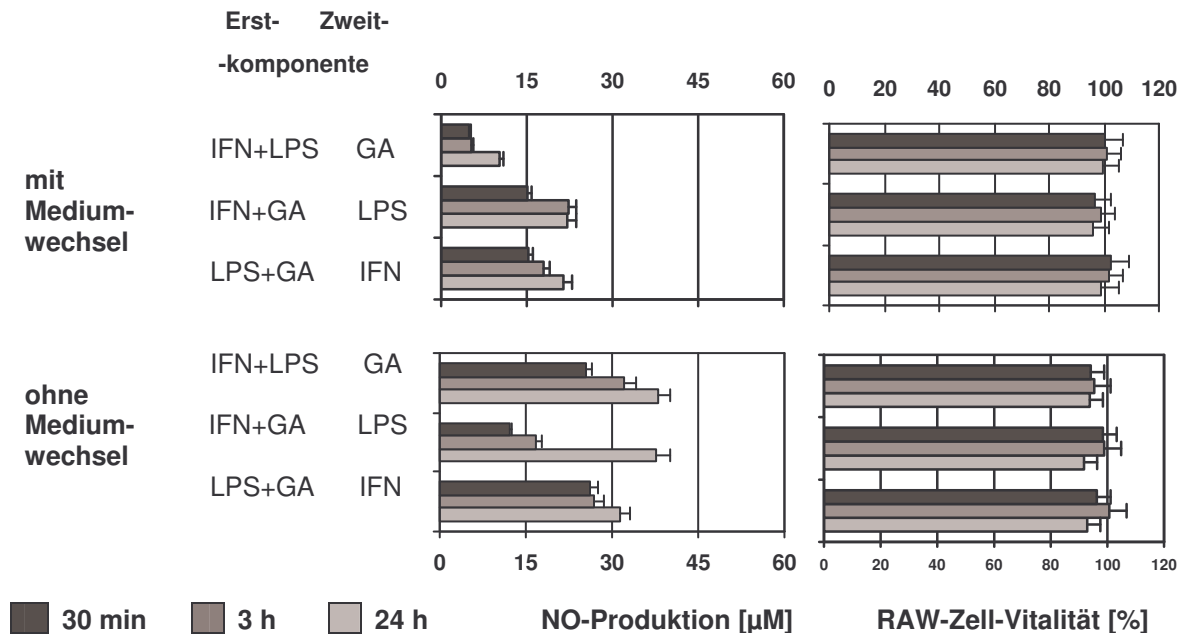


Abb. 6.3: NO-Produktion und Vitalität nicht infizierter RAW 264.7-Zellen infolge verschiedener Kombinationen der Behandlung mit binärer Erstkomponente; Zellen wurden jeweils mit zwei Erstkomponenten vorinkubiert; nach 30 min, 3 h oder 24 h wurde gegen die Zweitkomponente ausgetauscht bzw wurde hinzugefügt.

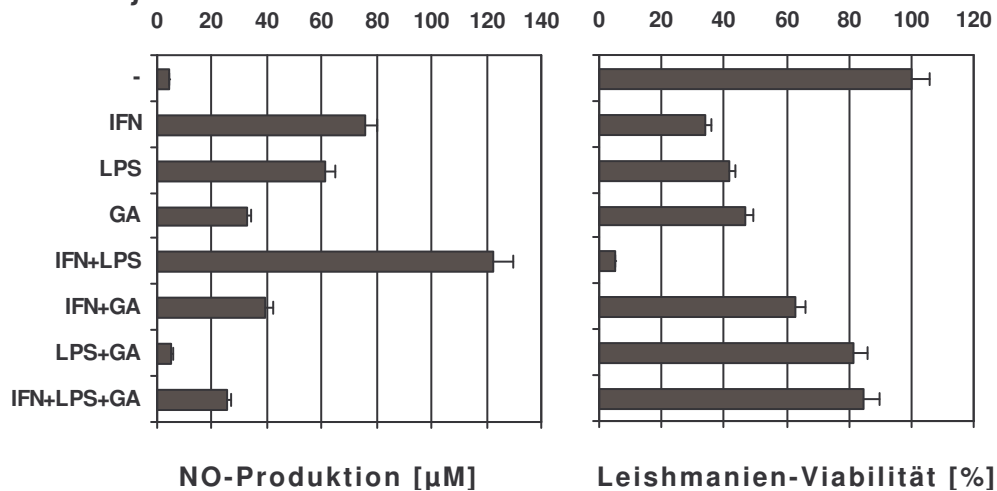
Über analoge Kombinations-Untersuchungen mit anderen Polyphenolen gibt es bislang wenig Hinweise: Sorimachi et al. (2003) behandelten Makrophagen aus dem Knochenmark der Ratte mit IFN- γ , LPS und dem Ligninderivat EP3. Jede dieser Behandlungen induzierte iNOS, TNF- α bzw. IL-8, die gleichzeitige Applikation von IFN- γ und EP3 erbrachte aber keine Aktivierung. Entsprechend stellten Feng et al. (2004) fest, dass 25 μM Resveratrol in der humanen Monozytenline THP-1 IL-1, IL-12 und TNF- α induzierte, deren Produktion durch IFN- γ -voraktivierte Zellen jedoch inhibierte.

Wurde Gallussäure allerdings 24 h nach einer Voraktivierung durch IFN- γ oder LPS dem Medium zugeführt, erhöhte das die NO-Produktion signifikant, und zwar als Zweitkomponente stärker (Abb. 6.4). Im selben Maße traf das zu auf Kombinationen von Gallussäure und insbesondere IFN- γ (oder LPS) als Erstkomponente und LPS (oder IFN- γ) als Zweitkomponente: Gallussäure verminderte die NO-Produktion, wenn sie innerhalb von drei Stunden zusammen mit IFN- γ oder LPS oder IFN- γ + LPS im Medium vorhanden war. Dieser Einfluss bestand nach 24 h nicht mehr, so dass dann erneut (und sogar stärker) eine NO-Produktion induziert werden konnte.

6.2 Infizierte Zellen

In leishmanieninfizierten Zellen war die NO-Produktion generell höher. Bemerkenswerte Unterschiede zwischen der Infektion mit *L. major* (Abb.6.4) und *L. donovani* (Abb. 6.5) bestanden nicht. Bei Einzelbehandlung bewegten sich die messbaren NO-Konzentrationen im Bereich von 75 μM (IFN- γ), 60 μM (LPS) und 35 μM (Gallussäure). Die kombinierte Gabe von IFN- γ und LPS führte zu einer Steigerung der NO-Konzentration im Überstand auf 100-120 μM , unabhängig davon, ob sie gleichzeitig oder einzeln innerhalb von 24 Stunden gegeben wurden (Abb. 6.4 und 6.5).

a) *Leishmania major*



b) *Leishmania donovani*

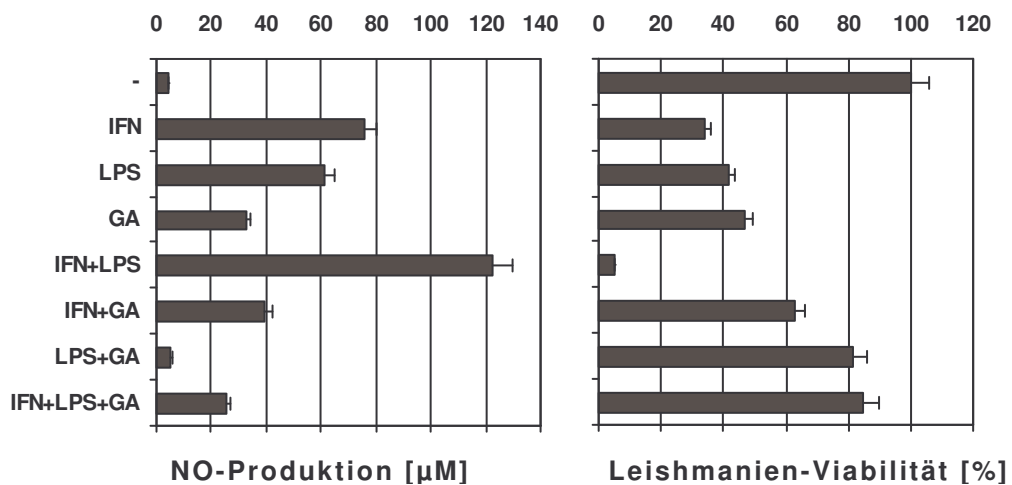


Abb. 6.3: NO-Produktion und Leishmanien-Viabilität infizierter Zellen nach 72 h; (Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung).

Ergebnisse

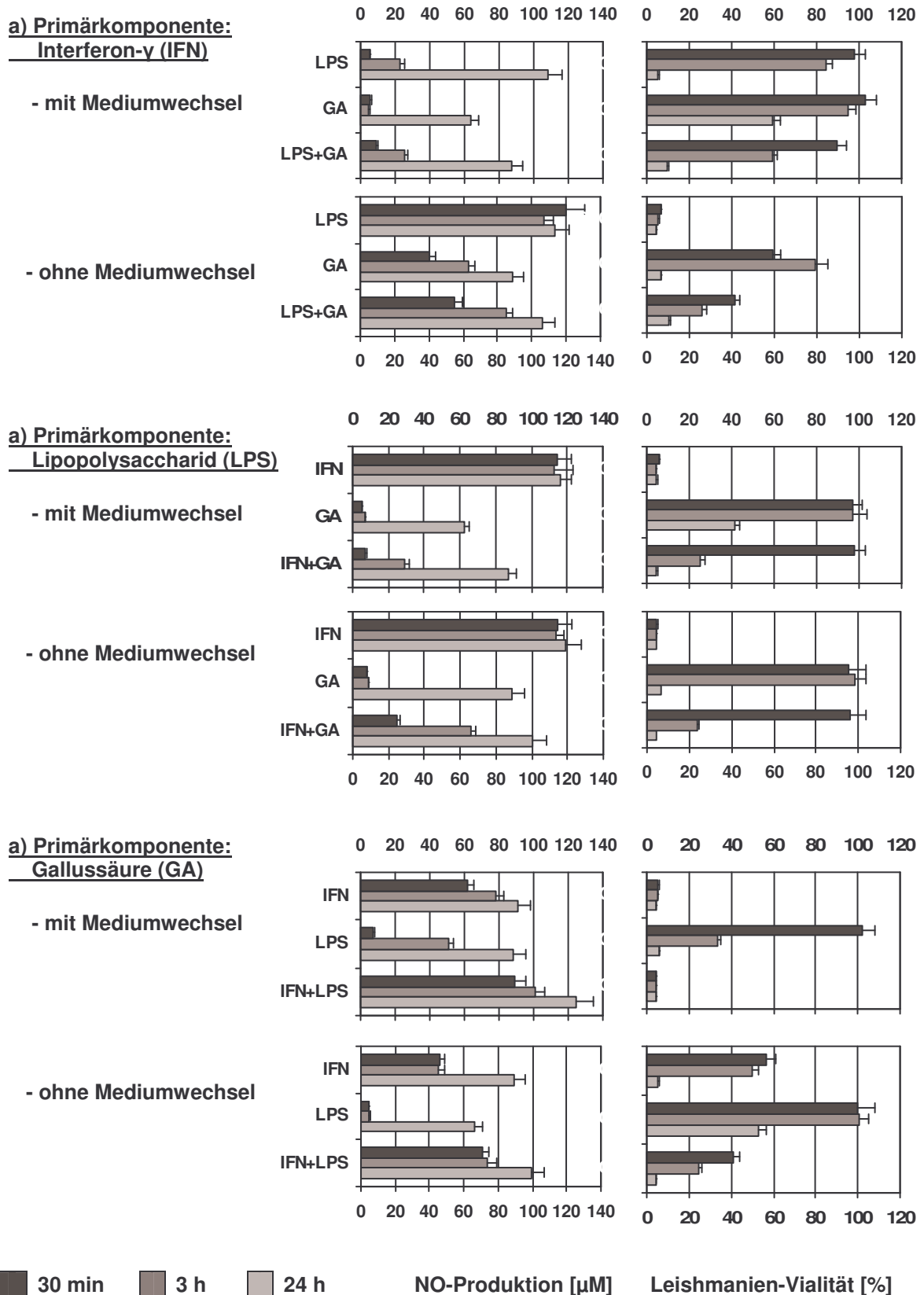


Abb. 6.4: NO-Produktion und Leishmanien-Viabilität in *Leishmania major*-infizierten RAW 264.7-Zellen infolge verschiedener Kombinationen von Interferon- γ (IFN), Lipopolysaccharid (LPS) und Gallussäure (GA); Zellen wurden jeweils in Medium mit der Erstkomponente vorinkubiert, nach 30 min, 3 h oder 24 h wurde die Zweitkomponente anstatt der (mit Mediumwechsel) bzw. zusätzlich zu der (ohne Mediumwechsel) Erstkomponente hinzugegeben.

Ergebnisse

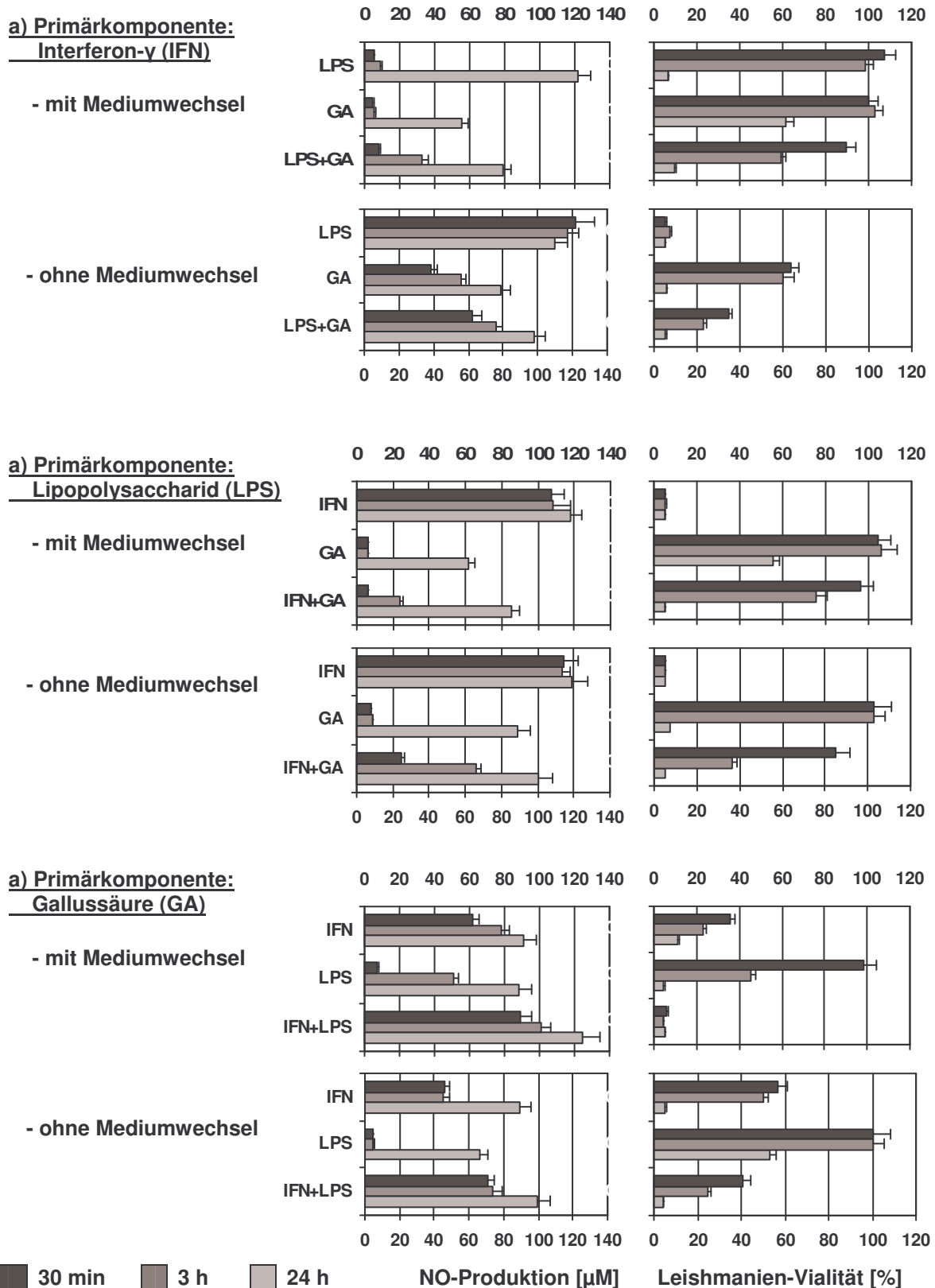


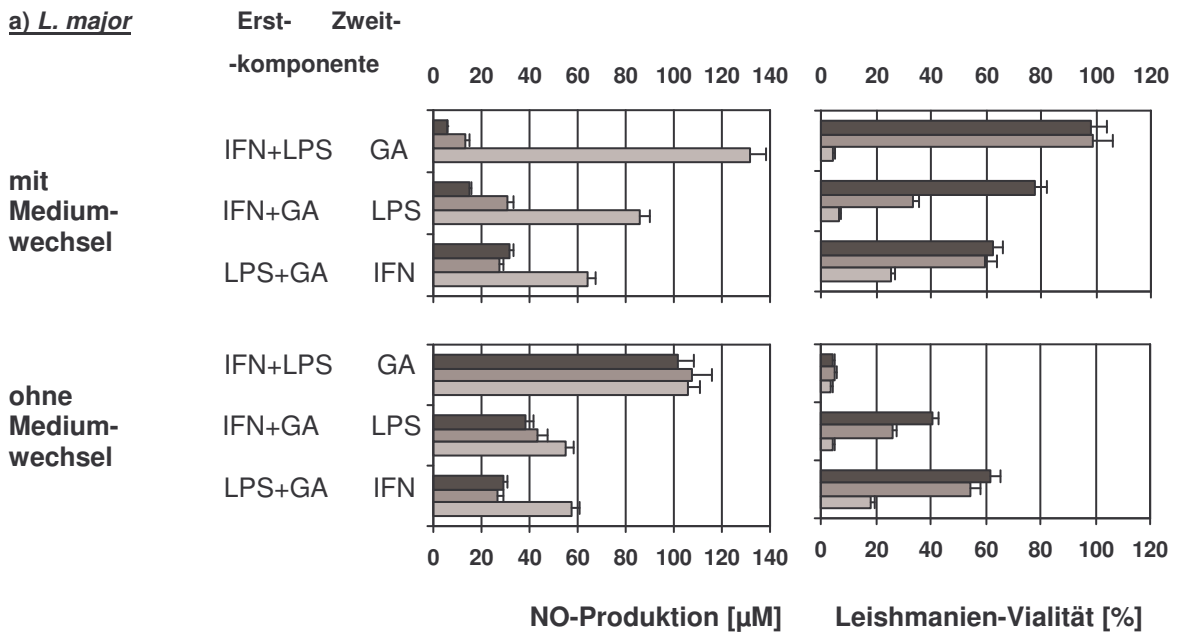
Abb. 6.5: NO-Produktion und Leishmanien-Viabilität in *Leishmania donovani*-infizierten RAW 264.7-Zellen infolge verschiedener Kombinationen von Interferon- γ (IFN), Lipopolysaccharid (LPS) und Gallussäure (GA); Zellen wurden jeweils in Medium mit der Erstkomponente vorinkubiert, nach 30 min, 3 h oder 24 h wurde die Zweitkomponente anstatt der (mit Mediumwechsel) bzw. zusätzlich zu der (ohne Mediumwechsel) Erstkomponente hinzugegeben.

Auch hier aktivierte LPS IFN- γ -vorbehandelte Zellen innerhalb von 3 h nur als Zusatzkomponente, nicht aber bei Mediumwechsel. Das Ausbleiben der NO-Produktion spiegelte sich in dem Versagen der Parasitenabwehr wider. Im Gegensatz dazu und wiederum der Situation bei nicht-infizierten Zellen entsprechend, verminderte Gallussäure die NO-Produktion in Kombination mit IFN- γ oder LPS bei kombinierter Gabe innerhalb von 3 h, auch zeigte sich der inhibierende Einfluss von Gallussäure auf LPS sehr viel stärker als auf IFN- γ , was die angesprochenen Überlegungen zum Ablauf der Reaktionen weiter bestätigt. Dass Gallussäure nicht nur durch zelluläre, sondern auch durch Mediumeffekte inhibiert, zeigte sich bei gallussäure-vorbehandelten Zellen. Als Zweitkomponente innerhalb von 3 h war der Effekt von LPS stark gehemmt, wogegen IFN- γ noch zur Steigerung der NO-Produktion beitrug. Gegenüber IFN- γ allein erbrachte IFN- γ + LPS keine Steigerung. Das Einbringen der Zweitkomponente in frisches Medium führte zu etwas höheren NO-Werten als ohne Mediumwechsel. In allen diskutierten Fällen fanden die Interaktionen innerhalb der ersten 3 h nach Kontakt mit der Erstkomponente statt. Nach 24 h vermochte Gallussäure weder eine zuvor erfolgte IFN- γ - oder LPS-bedingte Induktion der NO-Produktion abzuschwächen, noch war eine inhibierende Gallussäure-Vorbehandlung wirksam. Auch das ist verständlich, da die zur NO-Produktion notwendigen zellulären Signaltransduktionsschritte und die Aktivierung des iNOS-Gens innerhalb kurzer Zeit durch IFN- γ bzw. LPS induziert werden und die weiteren Schritte bis zur Sekretion von NO von äußeren Einflüssen unabhängig sind. Eine zur Bildung messbarer Medium-Nitritkonzentrationen ausreichende NO-Produktion erfolgt in jedem Fall erst später. Es hat sogar den Anschein, als aktiviere eine Zweitkomponente nach 24 h erneut. Wurden beispielsweise infizierte Zellen mit IFN- γ + LPS stimuliert, vermochte die Zugabe von Gallussäure 24 h später die NO-Produktion noch etwas zu steigern (130 μ M). Auch liefert das die Erklärung dafür, dass trotz der erheblichen Verzögerung –die Messung der Nitritkonzentration erfolgte immer 72 h nach Zugabe der Erstkomponente- eine weitere Aktivierung nach 24 h ebenso viel NO lieferte wie bei gleichzeitiger Gabe, etwa bei IFN- γ +LPS-Kombinationen. Als physiologisch sinnvoll dürfte eine derart hohe NO-Produktion allerdings kaum anzusehen sein. Bereits geringere NO-Mengen reichen zur Abtötung der gesamten Parasitenlast völlig aus, und

Ergebnisse

darüberhinausgehende Konzentrationen sind eher schädlich. Man muss zusätzlich bedenken, dass extrazelluläres NO den intrazellulären Parasiten ohnehin nicht mehr erreicht, sondern als (analytisch hilfreiche) Überproduktion anzusehen ist. Dieser Umstand findet in vivo seine Entsprechung darin, dass NO in bestimmten Mengen zur Bekämpfung intrazellulärer Makrophagenparasiten zwar unverzichtbar ist, über dieses Maß hinaus aber nicht mehr mit dem Schutz des Wirtsorganismus korreliert (Bories et al., 1997).

a) *L. major*



b) *L. donovani*

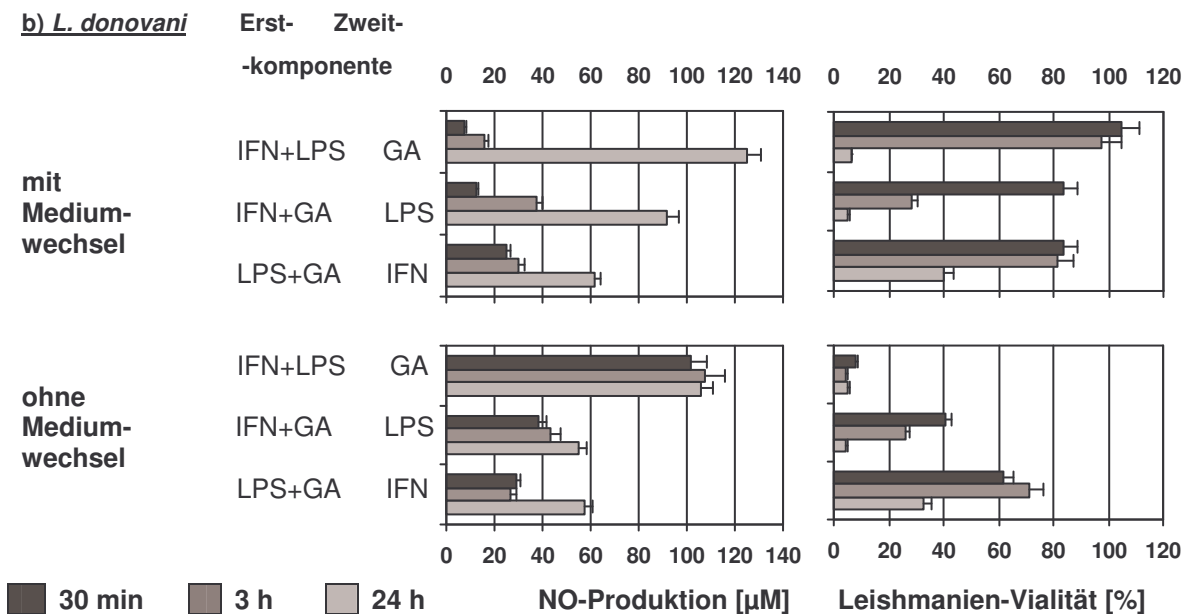


Abb. 6.6: NO-Produktion und Leishmanien-Viabilität in infizierten RAW-Zellen infolge verschiedener Kombinationen der Behandlung mit binärer Erstkomponente.

Stellt man die NO-Produktion dem Wachsen der Leishmanienpopulation gegenüber, so ergibt sich ein dazu komplementäres Bild. IFN- γ , LPS und Gallussäure allein reduzierten das Parasitenwachstum auf 30 bzw. 40 %. Kombinationen von IFN- γ und LPS vermochten das Überleben der Leishmanien stärker zu reduzieren, und zwar wiederum unabhängig von der Reihenfolge ihrer Zugabe und dem Zeitpunkt der Zugabe der Zweitkomponente. Wurden mit IFN- γ und/oder LPS voraktivierte Zellen innerhalb von 3 h mit Gallussäure behandelt, überlebten die Parasiten zu 75 - 90 %, aber nur zu 25 - 30 %, wenn Gallussäure erst 24 h nach der Erstbehandlung zugeführt wurde. Ein sehr ähnliches Resultat ergab sich durch Behandlung mit Gallussäure allein oder in Kombination mit IFN- γ oder LPS als Erstkomponente. Wurde die verbleibende Zweitkomponente innerhalb von drei Stunden zugeführt, überlebten die Parasiten zu 60 - 80 % verglichen mit 20 - 40 %, wenn die Applikation der Zweitkomponente erst nach 24 h erfolgte. Eine quantitativ begründete Sondererwähnung verdient wiederum der Fall einer Erstbehandlung mit IFN- γ + LPS und Gallussäurezugabe 24 h später: Hier ist mit einer Reduktion des Leishmanienwachstums auf < 5 % der niedrigste Wert aller betrachteten Situationen eingetreten.

Die generelle Übereinstimmung von hoher NO-Produktion und niedriger Leishmanien-Überlebensrate stimmen mit den bekannten Immunaktivierungsmechanismen zur Abwehr intrazellulärer Parasiten überein (Roach et al., 1991; Sadick et al., 1992; Reiner und Locksley, 1995; Warschkau und Kiderlen; 1995; Liew et al., 1997), ebenso mit der Empfindlichkeit der Leishmanien gegenüber reaktiven Stickstoffmetaboliten (Bogdan, 1997; Bories et al.; 1997; Mauel und Ransijn, 1997; Bogdan et al., 2000). IFN- γ und LPS sind bekanntermaßen potente Stimulatoren von Signaltransduktionswegen zur Aktivierung von iNOS, und Gallussäure ist als Induktor von NO und Zytokinen, die mit der Aktivierung der iNOS zusammenhängen, charakterisiert worden. Während sich für IFN- γ und LPS bei kombinierter Gabe ein klarer Synergismus nachweisen ließ, zeigte sich Gallussäure bei alleiniger Gabe als Aktivator, dagegen als Inhibitor, wenn es zusammen mit IFN- γ oder LPS oder beiden Komponenten gleichzeitig im System war. Die Zeitabhängigkeit dieser inhibierenden Wirkung weist darauf hin, dass Gallussäure in einen relativ frühen Schritt der Aktivierungskaskade

eingreift. Während der ersten drei Stunden interferieren Stimulation und Inhibition. Ein solcher zentraler Punkt in der frühen Aktivierungskaskade könnte die Ebene der Transkriptionsfaktoren sein, was mit der nachgewiesenen Inhibition von NF- κ B in LPS-vorstimulierten Zellen durch manche Polyphenole übereinstimmt (Yang et al., 1998; Cheon et al., 2000; Calixto et al., 2004). Indirekt kann dieses auch für IFN- γ angenommen werden: Zwar beinhaltet dessen Signaltransduktionskaskade selbst kein NF- κ B, allerdings eine Autostimulation durch TNF- α , welches infolge einer Interferin-Rezeptor-Interaktion gebildet und ausgeschieden wird (Thèze, 1999; Janeway et al., 2002; Li et al., 2002). Offenbar halten die für die beschriebenen Einflüsse empfindlichen Prozesse nur während der frühen Aktivierungsphase an, so dass 24 h nach der Erstaktivierung eine Zweitkomponente auf eine Zelle trifft, die sich bezüglich ihrer Aktivierbarkeit wieder im Ruhezustand befindet, bezüglich ihrer internen Abwehrmechanismen aber hochaktiv ist, so dass die Zweitkomponente eine Art „Booster-Effekt“ ausübt. Nur so ist es zu erklären, dass z.B. Gallussäure nicht nur nicht desaktiviert, sondern sogar einen noch höheren Aktivitätsstatus hervorruft als durch die Wirkung der Erstkomponente allein.