

## **8 Nachweis der Transkription ausgewählter Zytokingene durch semiquantitative RT-PCR**

Wie schon erwähnt, führt eine zelluläre Reaktion auf einen äußeren Signalstoff zur Expression bestimmter Gene. Infolgedessen sind im Zytoplasma aktivierter Zellen mRNAs als primäre Genprodukte nachweisbar, bevor die translatierten Proteine intra- oder extrazellulär in Erscheinung treten. Die Charakterisierung eines Zytokingen-Expressionsprofils ist also geeignet, den Aktivierungszustand einer Zellpopulation auf Transkriptionsebene zu beschreiben und die Ergebnisse eines funktionellen Bio-Assays oder ELISAs zu unterstützen. In einem ersten Schritt wurde die Kinetik der Transkription von Zytokingenen und iNOS durch Gallussäure im Vergleich zu IFN- $\gamma$  + LPS betrachtet.

### **8.1 Kinetik der Zytokingen-Transkription als Reaktion nach Stimulation mit Gallussäure im Vergleich zu IFN- $\gamma$ + LPS**

Um den Ablauf der Aktivierung von RAW 246.7-Zellen auf Transkriptionsebene zu untersuchen, wurden nicht infizierte und *Leishmania major*-infizierte Zellen nach einer 18-stündigen Ruheperiode mit 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Gallussäure behandelt. Als Positivkontrolle dienten 100 U/ mL IFN- $\gamma$  und 10 ng/ mL LPS, infizierte und nicht infizierte Proben als Negativkontrolle wurden parallel mitgeführt. Nach 2 h, 4 h, 6 h, 10 h, 18 h und 24 h wurde die Inkubation durch Verwerfen des Überstands und Einfrieren des Zell-Monolayers bei  $-70^\circ\text{C}$  abgebrochen. Gesamt-RNA wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) extrahiert und mittels RT-PCR die Transkription von HGPRT, IL-1, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und iNOS untersucht.

#### **8.1.1 Nicht infizierte Zellen**

In unbehandelten Zellen war zu keinem Zeitpunkt die Induktion einer Transkription von Zytokingenen nachweisbar. Die Zellen waren also während der ganzen Zeit in der Ruhephase. Die Behandlung mit IFN- $\gamma$  + LPS führte zu einer deutlichen Aktivierung der Zytokingentranskription, die bereits 2 h nach

der Verabreichung des Stimulus mit der mRNA für IL-1 und TNF- $\alpha$  einherging. Nach 4 h waren die Transkriptionsstärken von IL-1 und TNF- $\alpha$  auf ca. 60 % bzw. ca. 45 % relativ zum internen Standard HGPRT angestiegen. Zusätzlich waren die mRNAs für IL-12, IL-18 und iNOS nachweisbar. Dieser Zustand hielt sich auch nach 6 h, wobei lediglich die Expression für IL-18 zurückging. Auch ohne Infektion zeigten IFN- $\gamma$ +LPS-behandelte RAW 264.7-Zellen eine Immunantwort, wie sie für die Abwehr eines intrazellulären Parasiten charakteristisch ist.

Die Behandlung nicht infizierter RAW-Zellen mit Gallussäure führte erst nach 4 Stunden zu einer schwachen Transkription von IL-1 und TNF- $\alpha$  (jeweils ca. 30%) und nach 10 h zu einer Expression von IL-10 mRNA mit abregulierenden Eigenschaften. Eine Induktion der zur antileishmaniellen Abwehr notwendigen IL-12, IL-18 und iNOS-Transkripten fand nicht statt.

### 8.1.2 Infizierte Zellen

Infizierte Zellen ohne weitere Behandlung unterschieden sich nach 2 h in ihrem Expressionsprofil nicht von der Negativkontrolle. Nach 4 h zeigte sich eine deutliche Transkriptionsinduktion von IL-1 und TNF- $\alpha$  (jeweils ca. 50 % relativ zum internen Standard HGPRT), die in den folgenden 6 h wieder abfiel. Somit reagierten die Zellen ähnlich wie auf die Behandlung mit Gallussäure; eine effektive Aktivierung kam dabei nicht zustande, da die hierzu essentiellen IL-12, IL-18 und iNOS mRNAs nicht exprimiert wurden (Radtko et al., 2004).

Durch die Stimulation mit IFN- $\gamma$  + LPS wurde in *Leishmania major*-infizierten RAW 264.7-Zellen bereits nach 2 h die Transkription von IL-1 und TNF- $\alpha$  (ca. 30 bzw. 40 %) offenkundig, außerdem eine schwache Expression von IL-12 und IL-18 Transkripten (ca. 20 %). Nach 4 h waren die proinflammatorischen Zytokine IL-1 (ca. 70 %) und TNF- $\alpha$  (ca. 80 %) bereits maximal exprimiert. Es fand ebenfalls eine sehr starke Transkriptionsinduktion von IL-12, IL-18, iNOS, sowie IFN- $\alpha$  statt (jeweils ca. 55 - 60 %), die im Falle nicht infizierter Zellen sowie durch die Infektion allein nicht nachweisbar waren. Nach 6 h war zusätzlich IL-10 mRNA nachweisbar, dessen Transkription zeitlich mit der Abnahme der Signalstärke von IFN- $\alpha$ , IL-1, TNF- $\alpha$  und iNOS mRNA einherging. Mit relativen Intensitäten von jeweils > 80 % wurden hier die stärksten Signale

gemessen. Die Transkription von IL-12, IL-18 und IFN- $\alpha$  waren nach 10 h abreguliert, wogegen IL-1, IL-10 und iNOS weiterhin als mRNA nachweisbar waren. Die Induktion von iNOS war nach 18 h beendet, die von IL-1, TNF- $\alpha$  und IL-10 erst nach 24 h. Alles in allem zeigte sich in infizierten Zellen eine im Vergleich zu nicht infizierten Ansätzen länger andauernde und intensivere Transkription von Zytokingenen und der iNOS. Bis auf die zusätzliche Transkription von IFN- $\alpha$  entsprach der Ablauf einer IFN- $\gamma$ +LPS-vermittelten Aktivierungskaskade derjenigen in nicht infizierten Zellen, und Unterschiede waren vorwiegend quantitativer Natur.

Die Stimulation mit Gallussäure führte in *L. major*-infizierten RAW 264.7-Zellen nach 2 h ähnlich zur Transkription von IL-1 und TNF- $\alpha$  (ca. 30 % bzw. 40 %). Nach 4 h wurden zusätzlich zu IL-1 und TNF- $\alpha$  (ca. 80 % bzw. 60 %) IL-12, IL-18, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und iNOS transkribiert. In infizierten Zellen war also die Immunantwort der von IFN- $\gamma$  + LPS vergleichbar. Besonders auffällig war die einzigartige Expression von IFN- $\gamma$  mRNA. Nach 6 h waren die mRNAs für IL-1 und TNF- $\alpha$  unverändert intensiv, IL-18 und IFN- $\alpha$  waren geringer ausgeprägt und IL-12 und IFN- $\gamma$  nicht mehr nachweisbar. Dagegen fand sich IL-10 mRNA, deren erstmaliges Auftreten bei gleichzeitiger Abnahme der Signalstärken anderer Zytokingene als abregulierendes Signal zu werten ist. Nach 10 h war die Transkription von IL-10 mit ca. 80 % besonders stark, wogegen IL-1 und TNF- $\alpha$  nur noch schwach, die Induktion anderer Gene nicht mehr detektierbar war. Anders als für den Stimulus IFN- $\gamma$ +LPS festgehalten, verlief die Behandlung mit Gallussäure in leishmanieninfizierten RAW-Zellen qualitativ und quantitativ anders als in nicht infizierten Zellen. Inwiefern der einzig hier nachweisbaren mRNA-Expression für IFN- $\gamma$  eine Rolle zukommt, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Die Transkription von IFN- $\gamma$  in Zellen der Monozyten- und Makrophagenreihe ist in einigen Literaturstellen beschrieben (Gessani und Belardelli, 1998; Gigliotti-Rothfuchs et al., 2001); ihr Fehlen nach Behandlung mit IFN- $\gamma$  + LPS kann regulatorischer Natur sein, da hier, im Gegensatz zu Gallussäure-behandelten Proben, IFN- $\gamma$  im Medium zur Verfügung steht und damit einer negativen Rückkopplung unterliegen kann.

# Ergebnisse

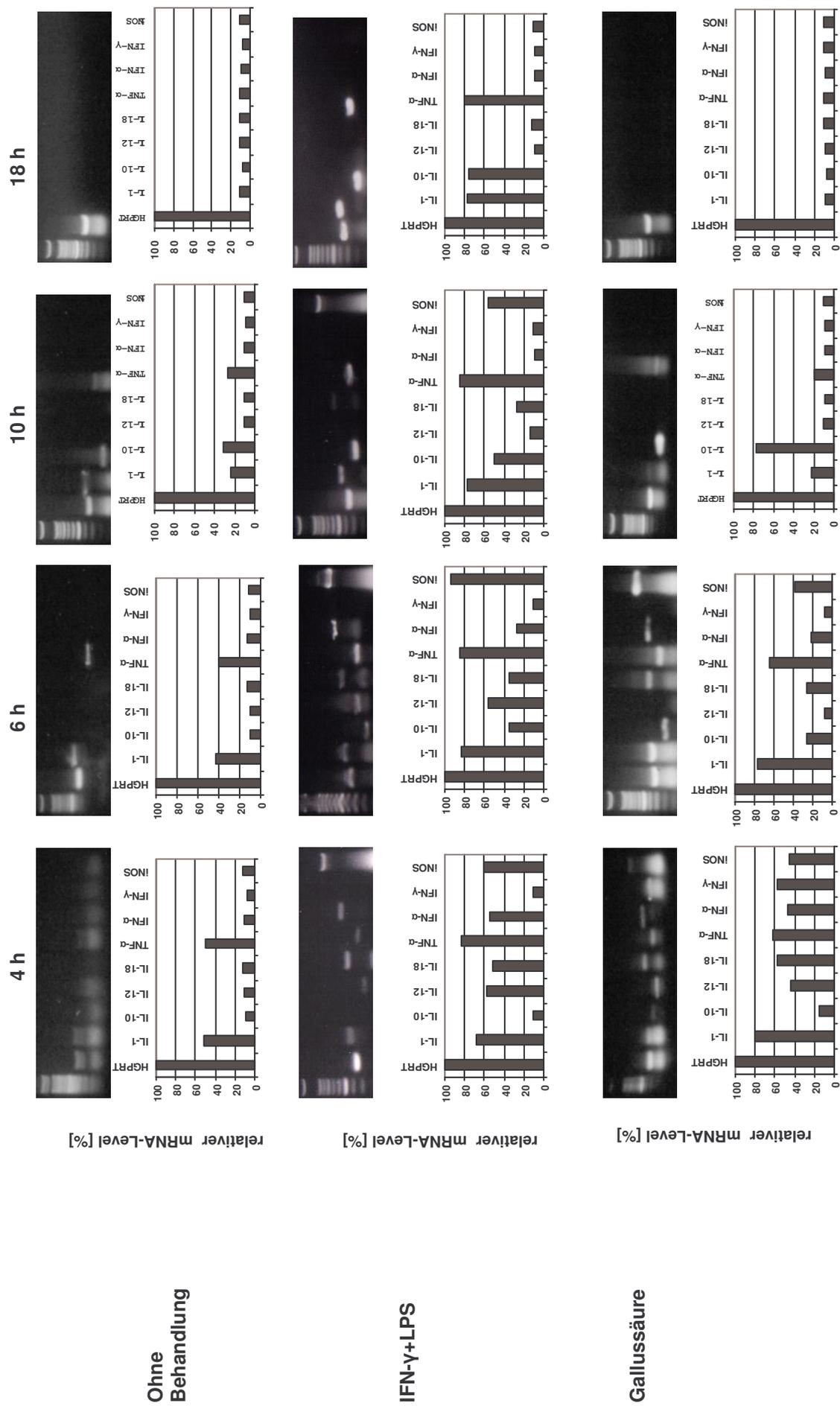


Abb. 8.1: Transkriptionsprofil *L. major*-infizierter RAW-Zellen zu verschiedenen Zeiten unbehandelt und nach Behandlungen mit IFN+LPS bzw. Gallussäure

## 8.2 Zytokingen-Transkriptionsprofile von *Leishmania major* und *L. donovani* – infizierten RAW 264.7-Zellen nach Stimulation mit Polyphenolen

Polyphenole aus strukturell unterschiedlichen Gruppen wurden in einer weiteren Versuchsreihe auf ihr immunmodulatorisches Potential in infizierten und nicht infizierten RAW-Zellen verglichen. Die Substanzen wurden in der Konzentration eingesetzt, die ihrem IC<sub>50</sub>-Wert für den antileishmaniellen Effekt auf Amastigote entspricht (Kap. 4; Kolodziej et al., 2001; Kiderlen et al., 2001).

Tab. 8.1: IC<sub>50</sub>-Werte der Testsubstanzen zur Verwendung im Experiment

	IC <sub>50</sub> [µg/ml]	IC <sub>50</sub> [µM]
Gallussäure	50,0	258
3-Galloyl-Shikimisäure	5,0	11,3
3,5-Digalloyl-Shikimisäure	1,0	1,9
Hexameres Proanthocyanidin	8,5	13,9
Catechin	16,1	55,5
Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG)	5,5	12,3
Corilagin	1,0	0,5

Da die für die Untersuchung der Transkription interessanteste Phase in den ersten Stunden nach Aktivierung verläuft (vgl. Kap. 8.1), wurde die Inkubation mit den Testsubstanzen nach 4 h abgebrochen und gesamt-RNA isoliert.

Die Kontrollen entsprachen den Erwartungen: Nicht infizierte Zellen zeigten ohne Behandlung keine Transkription von Zytokingenen oder iNOS. IFN-γ + LPS induzierten stark IL-1, IL-12, IL-18, TNF-α, IFN-α und die iNOS. In leishmanien-infizierten Zellen waren schon ohne Behandlung IL-1 und TNF-α schwach detektierbar, mit IFN-γ + LPS zeigte sich ein Transkriptionsprofil ähnlich dem des IFN-γ + LPS aktivierten Ansatzes.

Das Zytokingen-Transkriptionsprofil gallussäure-behandelter RAW-Zellen entsprach dem in Abb. 8.1 gezeigten nach 4 h Inkubation und ist in Kapitel 8.1 ausführlich beschrieben. Das Expressionsprofil von *L. donovani*-infizierten Zellen glich dem von *L. major*-infizierten. Es zeigte sich wiederum, dass eine Aktivierungsdauer von 4 h ausreichend ist, die frühe, im wesentlichen auf Transkriptionsniveau ablaufende Makrophagenantwort zu untersuchen.

Parallel wurden die mit Gallussäure als Modellsubstanz gewonnenen Ergebnisse auf andere Polyphenole ausgeweitet (Abb. 8.2 sowie 14.4 – 14.6): In nicht infizierten RAW 264.7-Zellen führte eine vierstündige Inkubation mit **3-Galloyl-Shikimisäure** lediglich zu einer verschwindend geringen Transkription der Gene für die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$ . Infizierte Zellen antworteten mit einer gesteigerten, aber immer noch moderaten Genexpression der genannten Zytokine sowie der iNOS. Da weitere Transkripte nicht zu detektieren waren, muss 3-Galloyl-Shikimisäure als schwacher Induktor angesehen werden. Anders verhielt sich das digalloylierte Derivat: Zwar war in nicht infizierten RAW-Zellen mit **3,5-Digalloyl-Shikimisäure** ebenfalls nur eine geringe Transkription der Gene für IL-1 und TNF- $\alpha$  zu beobachten (Abb. 8.2); dagegen fiel die Transkriptionsstärke dieser Zytokingene in infizierten Zellen deutlich stärker aus. Ebenfalls nur in infizierten Zellen kam es zur Transkription der Gene für iNOS sowie, allerdings recht schwach, für IL-12 und IL-18. Interferone waren in diesem Ansatz nicht nachweisbar (Kolodziej et al., 2005). In nicht infizierten Zellen induzierte das **hexamere Proanthocyanidin** nur die Transkription von IL-1 und TNF- $\alpha$ , letzteres allerdings auffallend stark. In infizierten Zellen fiel die Expression der beiden proinflammatorischen Zytokine stark aus, zusätzlich wurde die Transkription der Gene für IL-12, IL-18 und die iNOS induziert. Auch die Stärke dieser Transkriptionsinduktion war vergleichbar hoch (Kolodziej et al., 2005). Untersuchungen von Park et al. (2000) belegen eine starke iNOS- und TNF-Induktion durch Proanthocyanidine gegenüber Monomeren. Auch unsere Ergebnisse bezüglich der B-Typ-Proanthocyanidine auf Funktionsebene (Kolodziej et al., 2001 sowie Kap. 5) bestätigen dies durchaus.

Bei **Catechin** handelt es sich um einen sehr schwachen Induktor der zellulären Immunantwort. In nicht infizierten Zellen waren wiederum nur TNF- $\alpha$  und IL-1 schwach transkriptionell aktiv. Im Gegensatz zu anderen Substanzen änderte sich das auch in infizierten Zellen nicht. Lediglich eine sehr schwache iNOS-Aktivierung konnte nachgewiesen werden. IL-10, IL-12, IL-18 und Interferone wurden nicht transkribiert. Die RT-PCR-Untersuchungen bestätigen das in unserem Arbeitskreis auf Funktionsebene aufgezeigte sehr schwache Induktionsvermögen.

## Ergebnisse

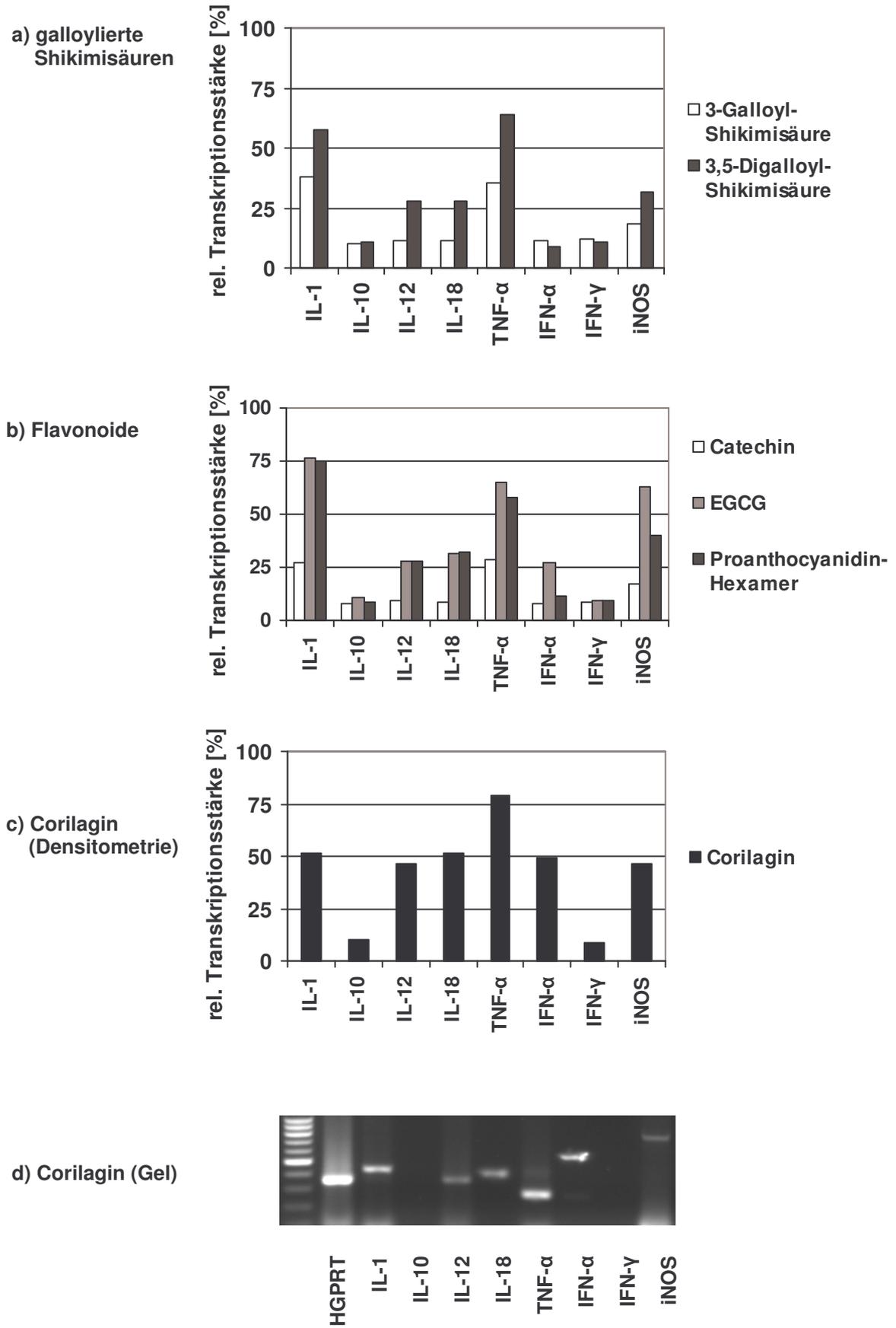


Abb. 8.2.: Transkriptionsprofil *L. donovani*-infizierter RAW 264.7-Zellen nach Behandlung mit Testsubstanzen; a-c: Densitometrie; d) Agarosegel nach RT-PCR

Der schwachen IL-1- und TNF- $\alpha$ -Transkription durch **EGCG** in nicht infizierten Zellen, von der auch Sakagami et al. (1995) und Miyamoto et al. (1997) berichten, stand in infizierten Zellen eine deutliche Aktivierung von IL-1, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  und der iNOS sowie auch IFN- $\alpha$  gegenüber. Im Gegensatz zum Catechin war das galloylierte Flavonoid unter diesen Bedingungen ein starker Induktor der Makrophagenantwort, sowohl bezüglich der proinflammatorischen Zytokine (IL-1 und TNF- $\alpha$ ) als auch der NK-Zell-Aktivatoren (IL-12, IL-18) und iNOS. Frühere Ergebnisse auf funktioneller Ebene und Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe finden hiermit auf molekularer Ebene Bestätigung, was TNF-artige Aktivität, NO-Sekretion sowie die Interferonaktivität anbetrifft (Kolodziej et al., 2001 sowie Kiderlen et al., 2001). IFN- $\gamma$  wurde dagegen nicht induziert.

Im Fall von **Corilagin** produzierten nicht infizierte Zellen neben dem internen Standard wiederum nur IL-1 und TNF- $\alpha$  mRNA. Leishmanieninfizierte RAW-Zellen wurden durch Corilagin ebenfalls zur Transkription von IL-12, IL-18, iNOS sowie darüberhinaus von IFN- $\alpha$  aktiviert (Kolodziej et al., 2005). Neben Gallussäure und EGCG ist das eine weitere Substanz dieser Studie, die die Expression von IFN- $\alpha$  induzierte. Dagegen war die Expression des IFN- $\gamma$ -Gens, ebenso wie bei EGCG, nicht nachzuweisen. Auch dieses Ergebnis auf Transkriptionsebene ist auf Funktionsebene aus Arbeiten mit der gleichen (Kolodziej et al., 2001) bzw. strukturell verwandten Substanzen (Miyamoto et al., 1993) abgesichert.

In der **Diskussion um gemeinsame strukturelle Prinzipien** lässt das Induktionsvermögen der getesteten Phenole den Schluss zu, dass die Galloylgruppe als immunaktivierendes Modul anzusehen ist. Es ist offenbar günstig, wenn möglichst viele Galloylgruppen in einem Molekül vereint sind, ohne dass sich dadurch ungünstige Strukturelemente häufen. Das Shikimisäure-Grundgerüst zeigte sich als ungünstiges Strukturelement, da die 3-Monogalloyl-Shikimisäure ein recht schwacher Immunmodulator war. Eine zweite Galloylgruppe scheint diesen Effekt überkompensieren zu können, denn 3,5-Digalloyl-Shikimisäure war ein wesentlich stärkerer Aktivator. Bezieht man Corilagin in die Betrachtung mit ein, haben wir ein noch galloylgruppenreicheres Beispiel vor uns. Die zur Verbrückung herangezogene Zucker-Einheit ist offenbar günstig zu bewerten, ist Corilagin doch immunmodulatorisch

hochaktiv. Es ist wahrscheinlich, dass diese besondere Strukturordnung auch die ausgeprägte Interferon-Induktion (vgl. Kolodziej et al., 2001 und Kap. 5) mitbedingt. Insgesamt fällt auf, dass zahlreiche Polyphenole aus verschiedenen Strukturklassen die Transkription von Zytokingenen bewirken, speziell eine Interferoninduktion aber nur bei bestimmten Vertretern erfolgt, was auf Transkriptionsebene für Gallussäure, EGCG und Corilagin gezeigt wurde (Kolodziej et al., 2005).

Gravierende Unterschiede zwischen Infektionen mit *L. major* und *L. donovani* traten nicht auf. Das steht in Einklang mit den Erfahrungen anderer Untersuchungen über die Transkription von Interleukinen, Interferonen oder iNOS in leishmanieninfizierten Phagozyten (Bogdan, 1997) und selbst anderen als protozoeren Makrophagenparasiten (Sacks und Sher, 1998). Dennoch ist die Bestätigung des grundsätzlichen Ablaufs der polyphenolinduzierten Transkriptionskaskade und iNOS-Aktivierung für einen CL- und einen VL-Erreger als wichtig einzustufen.

Eine gesonderte Rolle muss der **Transkription des IL-10-Gens** zugeordnet werden. Kernaussage der in Kap. 8.1 gemachten Untersuchung über die Kinetik der Zytokingentranskription war, dass das Gros der proinflammatorischen Zytokine (IL-1, TNF- $\alpha$ ) und auch iNOS nach ca. 4 h in Form ihrer mRNAs auftritt, ebenso weitere aktivierende Zytokine der zellulären Immunantwort (IL-12, IL-18, Interferone). Dies trifft sowohl auf die Aktivierung durch die Positivkontrolle IFN- $\gamma$  + LPS als auch für die Testsubstanzen zu. Eine weitere Erkenntnis zur Aktivierungskinetik war die Beendigung der frühen Aktivierungsphase durch das erst nach zehn Stunden transkribierte IL-10. Um hierzu eine allgemeine Aussage für die immunmodulatorische Aktivität der betrachteten Polyphenole treffen zu können, wurden nicht infizierte sowie Leishmanien-infizierte RAW 264.7-Zellen mit den Testsubstanzen in Konzentrationen ihrer IC<sub>50</sub>-Werte aktiviert und für 10 Stunden inkubiert. Nicht aktivierte sowie IFN- $\gamma$  + LPS-aktivierte Ansätze wurden als Kontrollen mitgeführt. Nach reverser Transkription wurde eine PCR für HGPRT (interner Standard) und IL-10 als Multiplex-Ansatz durchgeführt. Die Auswertung erfolgte densitometrisch unter Bezug auf HGPRT, dessen Intensität zu 100% definiert wurde.

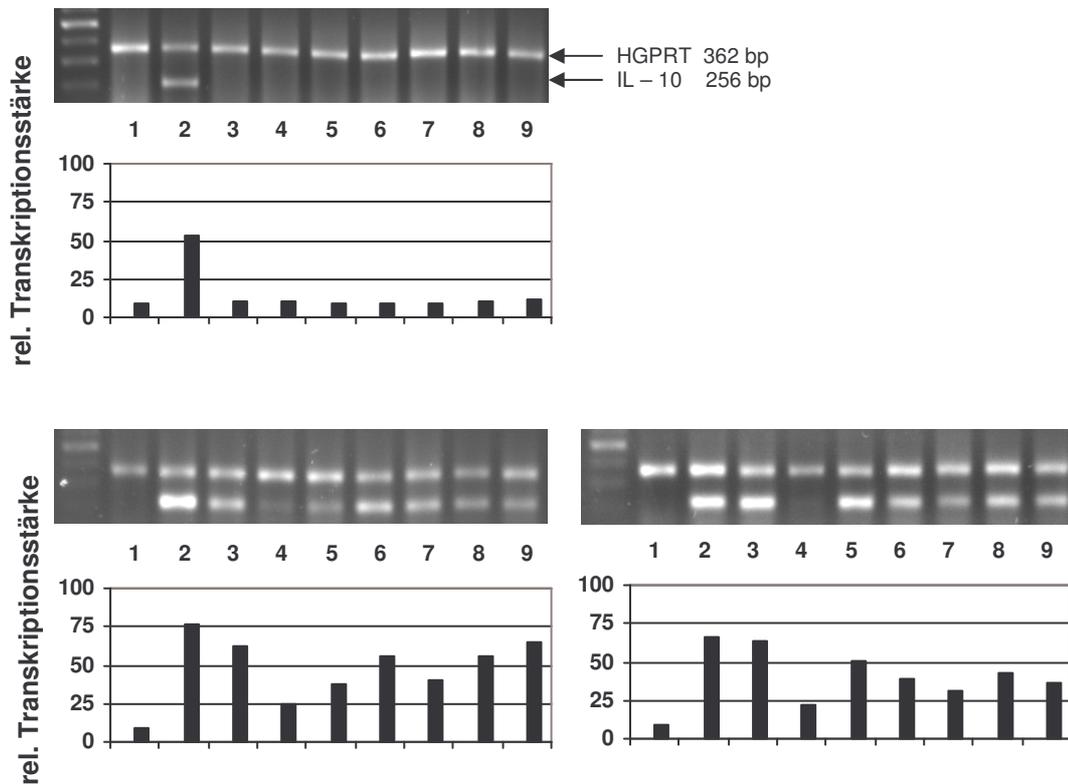


Abb. 8.3: IL-10-Transkription nach 10 h; oben: nicht infizierte RAW-zellen; unten links.: RAW-Zellen infiziert mit *L. major*; unten rechts: RAW-Zellen, infiziert mit *L. donovani*; Behandlung mit: 1 = ohne Behandlung; 2 = IFN- $\gamma$ +LPS; 3 = Gallussäure; 4 = 3-Galloyl-Shikimisäure; 5 = 3,5-Digalloyl-shikimisäure; 6 = Proanthocyanidin-Hexamer; 7 = Catechin; 8 = EGCG, 9 = Corilagin

Nicht infizierte Zellen transkribierten IL-10 nur nach Aktivierung durch IFN- $\gamma$  + LPS, wogegen unbehandelte Zellen sowie Inkubationen mit Polyphenolen nur die Standardbande aufwiesen (Abb. 8.3). Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da einerseits die Einleitung einer (verzögert auftretenden) IL-10-Induktion zu den bekannten Wirkungen von Interferonen auf Makrophagen gehört und andererseits IL-10 normalerweise nicht losgelöst von einer vorhergegangenen Immunantwort unter Beteiligung proinflammatorischer bzw. aktivierender Zytokine und iNOS in Erscheinung tritt (Appelberg, 1995; Kane und Mosser, 2001; Mocellin et al., 2003).

Mit Leishmanien infizierte RAW-Zellen produzierten, abgesehen von den nicht aktivierten Proben, allesamt IL-10 mRNA. Dabei fiel wiederum die Positivkontrolle am stärksten ins Gewicht. Die IL-10-Induktion durch Gallussäure war von den polyphenol-induzierten die stärkste. Es muss aber berücksichtigt werden, dass IL-10 mRNA in IFN- $\gamma$ +LPS – stimulierten Ansätzen

noch wesentlich länger nachweisbar ist als in gallussäure-behandelten (vgl. Kapitel 8.1). Dagegen hat sich 3-Galloyl-Shikimisäure als extrem schwacher IL-10-Induktor gezeigt, insbesondere im Vergleich zum 3,5-Digalloyl-Derivat. Es deutet sich dadurch an, dass schwache Induktoren der zellulären Immunantwort auch eine schwache Expression des abregulierenden Signals nach sich ziehen, was sich ebenfalls aus der gemeinsamen vernetzten Induktionskaskade erklärt. Schwieriger zu interpretieren sind die auf mittlerem Level ausgeprägten Expressionen der übrigen Polyphenole zwischen 30 und 50%, zumal sich unter ihnen starke Aktivatoren wie Proanthocyanidin-Hexamer, EGCG oder Corilagin neben dem eher schwachen Aktivator Catechin befanden. Es ist nicht auszuschließen, dass der Höhepunkt der IL-10-Expression zu einem anderen Zeitpunkt stattfindet.

Die Unterschiede zwischen Infektionen mit *L. major* und *L. donovani* sind auch hier zu vernachlässigen. Die gemeinsame starke IL-10-Transkriptionsrate in den Ansätzen der Positivkontrolle und Gallussäure-Behandlung sowie die verschwindend geringe IL-10-Induktion durch 3-Galloyl-Shikimisäure stehen im Vordergrund.

Insgesamt lässt sich aus den mittels RT-PCR gewonnenen Daten die Aussage treffen, dass die anfangs nur für Gallussäure getroffenen Überlegungen zur Transkriptionsinduktion auf Polyphenole als Stoffgruppe ausgeweitet werden können. Prinzipiell gleiche Aktivierungsgeschehen laufen bei Stimulation mit Polyphenolen aus verschiedenen Untergruppen ab, was sich für die Frühphase der Aktivierung und die spätere Abregulationsphase demonstrieren ließ. Für die Transkriptionsinduktion durch Polyphenole spielt der Zustand der Parasitierung eine wichtige Rolle, was für die Infektionen mit *L. major* und *L. donovani* abgesichert werden konnte.