

## 9 Diskussion

Ausgehend von den Erkenntnissen früherer Arbeiten über eine hohe antileishmanielle Aktivität von Polyphenolen und über die Eigenschaft dieser Substanzen, die Produktion von TNF bzw. IFN in Zellen des Monozyten- und Makrophagensystems zu induzieren, wurde in dieser Dissertation der Rolle der Immunmodulation bei der polyphenolinduzierten Leishmanienabwehr nachgegangen. Im Gegensatz zu den meisten leishmaniziden Naturstoffen wie etwa aus den Gruppen der Terpene, Alkaloide oder Naphthochinone (Chan-Bacab und Pena-Rogriguez, 2001; Rocha et al., 2005) sind zahlreiche phenolische Pflanzeninhaltsstoffe durch hohe antileishmanielle Aktivität gegenüber dem intrazellulären amastigoten Stadium bei gleichzeitig geringer Toxizität gegenüber den extrazellulären Promastigoten und den Wirtszellen charakterisiert. Außerdem war für viele dieser Verbindungen ein hohes Induktionsvermögen für TNF bzw. IFN bekannt (Kolodziej et al., 2001; Kiderlen et al., 2001). Diese Erkenntnisse lassen als Erklärung für die antileishmanielle Wirkung eine Aktivierung der zellulären Immunantwort plausibel erscheinen.

Auch im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich zahlreiche Polyphenole als antileishmaniell wirksam und immunmodulatorisch potent. Dass besonders Testsubstanzen mit niedrigen  $IC_{50}$ -Werten für die Wirkung gegenüber Amastigoten typischerweise starke Induktoren für TNF, IL-6 und häufig auch IFN sind, unterstützt unsere immunmodulatorische Arbeitshypothese ebenso wie die Induktion der Transkription von Zytokingenen und die Sekretion von IL-12 und IFN- $\alpha$ .

Vergleicht man die Ergebnisse aus den funktionalen Bio-Assays, den RT-PCR-Untersuchungen und den ELISAs für infizierte und nicht infizierte Zellen miteinander, fällt auf, dass Polyphenole in nicht infizierten Zellen nicht immunmodulierend wirken. Hier ließ sich zumeist geringfügig die Transkription von IL-1 und TNF- $\alpha$  induzieren, ebenso fiel die Aktivität von TNF, IL-6 und IFN, sofern überhaupt vorhanden, sehr schwach aus. Unter diesen Bedingungen war beispielsweise IL-12 weder als mRNA in der RT-PCR noch als Protein im ELISA nachweisbar. Das steht im Gegensatz zum als Positivkontrolle verwendeten Stimulus IFN- $\gamma$ +LPS, der zu einer starken Transkriptionsinduktion

von IL-1, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  und der iNOS führte und außerdem zu erheblichen Mengen an IL-12- und IFN- $\alpha$ -Protein sowie zu einer starken Aktivität von TNF, IL-6 und IFN.

Zur Erklärung trägt vor allem der Vergleich zwischen nicht infizierten und leishmanieninfizierten RAW 264.7-Zellen einerseits sowie IFN- $\gamma$  + LPS mit Polyphenolen als Stimulus andererseits bei:

Schon die **Infektion per se** führte zu einer Expression von IL-1 und TNF- $\alpha$ , allerdings nicht von weiteren Zytokinen oder der iNOS. Dass Makrophagen bereits auf Bestandteile von Mikroorganismen reagieren, liegt in ihren Eigenschaften als Phagozyten und Regulatorzellen begründet (Zidek et al., 1998; Unanue, 1998; Thäle und Kiderlen, 2005) und für mehrere definierte Oberflächenstrukturen von Leishmanien gut untersucht (Mirshahidi et al., 1998). Dass diese Aktivierung nicht zur Abwehr ausreicht, ist daraus ersichtlich, dass infizierte Zellen ohne weitere Stimuli nicht zur Eliminierung der Parasiten in der Lage sind. Leishmanien sind, anders als viele andere Makrophagenparasiten, dadurch im Vorteil, dass sie außer Oberflächenstrukturen, die vom Makrophagen erkannt werden, auch über immunsupprimierende Prinzipien verfügen (Chang et al., 1990; Sadick, 1992; Piedrafita et al., 1999; Rao et al., 1999). Zur antileishmaniellen Abwehr bedarf es einer weiteren Aktivierung, durch die letztendlich die Produktion von NO in Gang gesetzt wird (Ding et al., 1988; Roach et al., 1991; Mauel und Ransijn, 1997). Allerdings sind infizierte Zellen in einem voraktivierten „Alarm-Zustand“, aus dem heraus sie sich durch einen weiteren Stimulus schnell in zytotoxische Effektorzellen umwandeln.

Die **Behandlung mit IFN- $\gamma$  + LPS** führte schon in nicht infizierten Ansätzen zu einer Aktivierung der zellulären Immunantwort, die in infizierten Zellen noch stärker ausfiel. Dies traf auf die Induktion der Transkription von IL-1, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  und der iNOS, auf die Produktion des IL-12-Proteins und auf die Aktivität an TNF, IL-6 und IFN zu. Hinzu kam IFN- $\alpha$  als mRNA und Protein. Während die Aktivierung auf Transkriptionsebene innerhalb weniger Stunden angelaufen war und ca. 4 h nach der Stimulierung ihren Höhepunkt erreicht hatte, wurde nach 10 h durch das IL-10-Transkript die Abregulierung eingeleitet.

Durch **Polyphenole** ließ sich eine derartige **Aktivierung der zellulären Immunantwort** dagegen nur **in den infizierten Ansätzen** induzieren. So ließen sich innerhalb der ersten 4 h nach Behandlung mit den Testsubstanzen mittels RT-PCR die Transkription von IL-1, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  und der iNOS nachweisen. Ein gesondertes Augenmerk sei auf die Interferone IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  gerichtet, deren Transkription nach Behandlung mit Gallussäure (IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ ), Corilagin und EGCG (IFN- $\alpha$ ) nachgewiesen werden konnte. Ebenso lassen sich durch ELISA die Produktion von IL-12 und, wiederum bei einigen Vertretern, IFN- $\alpha$  zeigen. Die Überstände solcher Ansätze zeigen in funktionellen Bio-Assays hohe Aktivitäten an TNF und IL-6 sowie in bestimmten Fällen ebenfalls an IFN. Bezüglich der Kinetik der Zytokingentranskription lieferten die Stimuli IFN- $\gamma$  + LPS und die Polyphenole vergleichbare Ergebnisse. Während der Frühphase wurden diejenigen Zytokine transkribiert, die für eine Aktivierung der zellulären Immunantwort verantwortlich sind, so IL-1, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  und IL-12, dem als Schlüsselzytokin für die Abwehr intrazellulärer Makrophagenparasiten eine wegweisende Bedeutung zugeschrieben wird (Doherty und Coffmann, 1999; Bacellar et al., 2000). Hinzu kam während dieser Phase die mRNA der zur Produktion der toxischen NO-Spezies notwendigen iNOS (Adams et al., 1999). Auf Protein- und Funktionsebene waren diese Zytokine nach 18-24 h nachweisbar. Als abregulierendes Signal war IL-10 zu sehen, dessen Transkript 10 h nach dem induzierenden Stimulus auftrat. Außer für die Stimuli IFN- $\gamma$  + LPS und Gallussäure, für welche die Kinetik detailliert zu sechs Zeitpunkten zwischen 2 und 24 h vom Zeitpunkt der Behandlung an demonstriert worden war, wurde die durch IL-10 eingeleitete Beendigung der Aktivierungsphase 10 h nach Stimulierung auch für die galloylierten Shikimisäure-Derivate, das Proanthocyanidin-Hexamer, Corilagin, Catechin und EGCG gezeigt.

Während IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  allgemeine Entzündungs- und Abwehrmediatoren sind, bedarf es zur Abwehr von Leishmanien im intrazellulären Stadium IL-12. Wie Piedrafita et al. (1999) darlegen, wäre ein infizierter Makrophage durch Sezernieren dieses Zytokins in der Lage, NK-Zellen und T<sub>H1</sub>-Lymphozyten zur IFN- $\gamma$ -Ausschüttung zu aktivieren; dieses wiederum hätte im infizierten IL-12-sezernierenden Makrophagen zur iNOS-Induktion geführt. Somit erscheint die IL-12-Induktion durch eine Reihe

beispielhaft ausgewählter Polyphenole besonders interessant. Wie am Beispiel von *Leishmania major*-infizierten RAW-Zellen kinetisch gezeigt wurde, induziert Gallussäure innerhalb von ca. 4-6 Stunden IL-12 mRNA (Radtko et al., 2004). Innerhalb dieser Spanne vermögen dies auch 3-Monogalloyl- und 3,5-Digalloylshikimisäure, Proanthocyanidin-Hexamer, Catechin, EGCG und Corilagin (Kolodziej et al., 2005), ebenso konnte die Sezernierung von IL-12 als Protein im Überstand nach 24 Stunden nachgewiesen werden. Gleichzeitig mit der IL-12 mRNA trat stets die von IL-18 sowie in einzelnen Fällen (Corilagin, EGCG, Gallussäure) die von IFN- $\alpha$  auf (Vadiveloo et al., 2000; Hertzog et al., 2003; Gigliotti-Rothfuchs et al., 2004). Einen für die antileishmanielle Abwehr relevanten Einfluss außerhalb der Induktion von Zytokinen, die im wesentlichen Signalstoffe darstellen, üben die genannten Substanzen auch durch die Induktion der iNOS aus, dessen mRNA ebenfalls innerhalb von 4 h nachweisbar ist. Das beweist, dass als Ergebnis der Immunmodulation durch Polyphenole auch der direkt leishmanizide Zweig der Aktivierungskaskade angelaufen ist.

Die Diskussion der immunmodulierenden Eigenschaften von Polyphenolen im Hinblick auf die **Makrophagenaktivierung** führt in eine **Kontroverse**: Sehr viele immunpharmakologische Untersuchungen befassen sich nämlich mit der **inhibierenden Wirkung** dieser Stoffgruppe auf Prozesse der LPS-vermittelten Leukozytenaktivierung, als deren Kenngrößen die Produktion proinflammatorischer Zytokine und NO im Vordergrund stehen. So unterbinden Flavonoide die iNOS-Aktivierung (Abad et al., 2004; Cheon et al., 1999; Shen et al., 2002) in RAW 264.7 - Zellen. In Jurkat-T-Zellen inhibieren 3-Desoxyanthocyanidine die durch TNF- $\alpha$  in Gang gesetzte Stimulation, indem sie die NF- $\kappa$ B-Kaskade hemmen (Zorn et al., 2001). Besonders gründlich untersucht worden sind Gallussäure und EGCG: In LPS-voraktivierten Makrophagen hemmen sie die zelluläre Immunantwort auf Ebene der NF- $\kappa$ B-Freisetzung, der Transkription und Proteinsekretion proinflammatorischer Zytokine sowie der iNOS-Proteinproduktion und NO-Freisetzung (Lin und Lin, 1997; Chan et al., 1997; Yang et al., 1998). Andererseits schreiben Hu et al. (1992) und Sakagami et al. (1995) dem EGCG eine stimulierende Wirkung auf die IL-1-Produktion von mononukleären Zellen zu. Entsprechendes findet sich

bei Miyamoto et al. (1993) für hydrolysierbare Gerbstoffe; auch polyphenolhaltige Extrakte wie z.B. aus *Eleutherococcus senticosus* (Steinmann et al., 2001) *Phyllanthus tenellus* (Ignacio et al., 2001), *Embllica officinalis* (Ganju et al., 2003) *Cocos nucifera* (Mendonça-Filho et al., 2004) oder *Pteris ensiformis* (Wu et al., 2005) zeigen sich häufig eher leukozytenaktivierend als inhibitorisch. Dies bestätigen auch vorangegangene Arbeiten aus unserem Arbeitskreis. Polyphenolhaltige Extrakte von *Pelargonium sidoides*, denen in der Volksmedizin und Phytotherapie eine antiinfektionelle Wirkung zugeschrieben wird, sowie einige deraus isolierte Reinstoffe (Kolodziej und Kayser, 1998; Kolodziej et al., 1999, Kolodziej et al., 2003; Trun, 2004) wirken antibakteriell, zytoprotektiv, NO-induzierend bzw induktiv auf die Transkription von TNF- $\alpha$  und iNOS. Der zytoprotektive Effekt von Polyphenolen wird auch von Haslam (1996) am Beispiel der anti-HIV-Wirkung und von Goncalves et al. (2001) für die Wirkung gegen eine HSV-1-Infektion erwähnt. Polyphenole werden auch als ursächlich für die immunmodulatorischen Eigenschaften von Propolis angeführt, wobei das Spektrum an beschriebenen Wirkungen von entzündungshemmend bis immunstimulierend reicht und als Träger dieser Eigenschaften Flavonoide und Kaffeesäurederivate genannt werden (Neunaber, 1995; Orsolice et al., 2004; Park et al., 2004). Für die über Gallussäure, EGCG, Flavonoide und hydrolysierbare Gerbstoffe beschriebenen Kontroversen bezüglich immunsupprimierender und aktivierender Potenz lassen sich in der Literatur weitere Beispiele anführen, die nun im Hinblick auf die diskutierten Zusammenhänge zwischen Vorbehandlung der Zellen und Wirkungen der Phenole im neuen Licht erscheinen: Beispielsweise soll das Flavonoid Wogonin aus *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) die Expression von iNOS und TNF- $\alpha$  in RAW 264.7-Zellen nach Calixto et al. (2004) inhibieren, nach Chiu et al. (2002) aber aktivieren. Resveratrol kann die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Expression aktivierungsrelevanter Oberflächenstrukturen der humanen Monozyten-Linie THP-1 abhängig von den Versuchsbedingungen aktivieren oder inhibieren (Feng et al., 2004). Dass sich dieser scheinbare Widerspruch auf die unterschiedlichen Bedingungen zurückführen lässt, kann daraus abgeleitet werden, dass sich die inhibierenden Wirkungen von Polyphenolen auf die Inhibition der Aktivierung von (in aller Regel mit LPS) vorbehandelten

Zellen beziehen. Auch in unseren Experimenten wurde die LPS-bedingte NO-Produktion und die damit verbundene antileishmanielle Potenz von RAW-Zellen durch Gallussäure (Kap. 6) und andere Polyphenole (Kap. 7) signifikant gehemmt, in geringerem Ausmaß auch die durch IFN- $\gamma$  bzw. IFN- $\gamma$  + LPS. Dem widerspricht nicht, dass mit Leishmanien infizierte nicht vorbehandelte Zellen durch Polyphenole aktiviert werden. Das konnte auf funktioneller und biochemischer Ebene und auf Ebene der Transkription gezeigt werden (Kolodziej et al., 2003; Radtke et al., 2003; Radtke et al., 2004; Ercil et al.; 2005; Kolodziej et al., 2005). Damit lässt sich auch gut in Einklang bringen, dass EGCG in LPS-voraktivierten RAW 264.7-Zellen die TNF- $\alpha$ -Expression auf mRNA- und Proteinebene relativ zu LPS allein herabsetzt, in nicht voraktivierten Zellen aber TNF- $\alpha$ -Expression induziert (Yang et al., 1998).

Während sich also in der Literatur durchaus schon Hinweise auf eine immunaktivierende Potenz von Polyphenolen auf ruhende Zellen finden und auch der Einfluss einer Voraktivierung durch IFN- $\gamma$  bzw. LPS prinzipiell bekannt war, konnte in dieser Arbeit der Einfluss einer Infektion durch Leishmanien im Hinblick auf die Aktivierbarkeit durch Polyphenole besonders herausgestellt werden, so dass sich Ergebnisse aus früheren Untersuchungen und aus dieser Arbeit zur antileishmaniellen Wirkung von Polyphenolen besser durch die Aktivierung der Wirtszelle begründen lassen. So konnte am Beispiel von leishmanieninfizierten RAW-Zellen und Knochenmark-Makrophagen demonstriert werden, dass Gallussäure, galloylierte Shikimisäuren und hydrolysierbare Gerbstoffe (Kolodziej et al., 2001; Kiderlen et al., 2001) sowie Flavonoide und Proanthocyanidine (Kolodziej et al., 2001) in unterschiedlichem Maße TNF und Interferon induzieren, zur Produktion von NO führen und einen antileishmaniellen Effekt gegenüber Amastigoten von *Leishmania donovani* zeigen. Interessanterweise waren mit Gallussäure, EGCG und Corilagin wiederum Stoffe Gegenstand der Untersuchung, die von anderen Autoren in oben genannten Arbeiten als desaktivierend auf LPS-vorbehandelte Zellen bezeichnet werden. Einem Großteil der phenolischen Substanzen, die in einem antileishmaniellen Screening eine hohe Aktivität mit teilweise sehr niedrigen IC<sub>50</sub> –Werten gegenüber intrazellulären Amastigoten zeigte, konnte auch auf funktioneller Ebene eine hohe TNF-Aktivität und eine hohe IL-6-Aktivität

zugeschrieben werden, also Kennzeichen einer zellulären Immunität. Über antileishmanielle Aktivitäten mancher Flavonoide wird weiterhin in Arbeiten von Araujo (1998) und in Rocha et al. (2005) berichtet.

Bei der Diskussion von **Struktur-Wirkungs-Beziehungen** zur antileishmaniellen Aktivität und den Induktionsvermögen für TNF-, IL-6- und IFN-Aktivität fallen für die Untergruppen der Polyphenole verschiedene Strukturmerkmale als vorteilhaft auf. Die Aktivität der einfachen Phenole wuchs signifikant mit der Anzahl der Galloylgruppen; andererseits wirkten sich zusätzliche Galloylgruppen auf die Aktivität der galloylierten Flavonoidglykoside nicht förderlich aus. Unter den Depsiden waren die relativ niedermolekularen Vertreter Kaffeesäure und Rosmarinsäure besonders aktiv gegenüber intrazellulären Amastigoten, und diese induzierten auch am meisten TNF und IL-6. Unter den hydrolysierbaren Gerbstoffen waren diejenigen Vertreter die potentesten Induktoren von TNF, IL-6 und IFN, die eine Hexahydroxy-Diphenylgruppe tragen, und sie zeigten sich auch im antileishmaniellen Test durch sehr niedrige  $IC_{50}$  –Werte als besonders aktiv gegenüber dem intrazellulären Parasitenstadium. Dieselben gegebenen Strukturmerkmale induzieren also jeweils verschiedene Aktivitäten, die sich auf die antileishmanielle Potenz auswirken. Diskutiert werden muss aber auch die Induktion von TNF durch das jeweilige Polyphenol und die Induktion von beispielsweise IL-6 durch TNF in der Folge. Das darf insofern nicht vernachlässigt werden, als dass Zytokine ohnehin über Induktionsketten aktiviert werden. Eine bezüglich der Zytokininduktion besondere Stellung innerhalb der Polyphenole nehmen die galloylierten Flavonoidglykoside (Ercil et al., 2005) und die hydrolysierbaren Gerbstoffe (Kolodziej et al., 2001) ein. Über ihre antileishmanielle Potenz und ihr Induktionsvermögen für TNF und IL-6 hinaus sind sie durch Induktionsvermögen für Interferon charakterisiert. Mittels RT-PCR und ELISA konnte die IFN-Aktivität auf IFN- $\alpha$  zurückgeführt werden, was im Falle von Makrophagen als Produzenten auch der Erwartung am nächsten kommt.

Während die Aktivierbarkeit von Makrophagen durch z. B. IFN- $\gamma$  als Signalstoff des körpereigenen Abwehrsystems einleuchtet, ist fraglich, warum außer auf Zytokine Zellen des Immunsystems noch auf andere, dann oft **exogene Modulatoren** ansprechen, zu deren Erkennung für das Säuger-Immunsystem oftmals keine Veranlassung besteht (Hadden, 1993). Beispielsweise gehören zu den am längsten bekannten und in der experimentellen Immunologie am häufigsten verwendeten Stimulatoren pflanzliche Lektine wie Concanavalin A (ConA), Phytohämagglutinin (PHA) und „Pokeweed Mitogen“ (PWM) (Landy und Chessin, 1969); Auch bestimmte komplexe Kohlenhydrate aus Mikroorganismen und höheren Pflanzen sind als Immunstimulantien bekannt wie z. B. aus *Echinacea purpurea* und *E. pallida* (Bodinet et al., 2002) oder *Panax quinquefolius* (Assinewe et al., 2002). Mechanistisch gut untersucht ist hierzu das Angolan, ein 10 kDa-Polysaccharid aus den Wurzeln und der Zellkultur einer asiatischen Engelwurz-Art: Aus der Arbeit von Jeon et al. (2000) geht hervor, dass derartige Substanzen Makrophagen dadurch aktivieren und zur Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1 und der iNOS führen, dass sie sich gewissermaßen LPS-mimetisch verhalten und dem Immunsystem eine Infektion vortäuschen. Beim Säuger-Immunsystem ist der LPS-erkennende Rezeptorkomplex mit der NF-kB-Kaskade verbunden, wodurch sich auch die Aktivierbarkeit von TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und iNOS durch LPS erklärt (Wiese et al., 1999; Khan et al., 2002). Von einer Reihe weiterer Naturstoffe sind immunstimulierende Wirkungen nachgewiesen (Hadden, 1993; Ganju et al., 2003).

Bislang ist eine **analoge Beziehung zu Polyphenolen** aus der Literatur nicht bekannt. Weder sind polyphenolische Strukturen typisch für irgendeine bekannte Gruppe von Infektionserregern, noch gibt es bislang Kenntnisse über Rezeptoren für Polyphenole auf Makrophagen. Die Interaktion der Testsubstanzen mit der Zelloberfläche könnte aber auch indirekt sein, indem die Polyphenole, die ja über eine hohe Affinität zu Proteinen verfügen („Gerbstoffe“), mit Serumbestandteilen interagieren und Zellen somit nicht auf den niedermolekularen Pflanzeninhaltsstoff, sondern auf eine veränderte Polypeptid-Domäne reagieren. Im Hinblick auf die hohe Bindungskapazität von Serumalbumin für EGCG und Corilagin (Feldmann et al., 1999; Hatano et al.,

2003) wäre das plausibel. Dazu passen auch die in Kap. 6 und 7 beschriebenen Einflüsse des Mediumwechsels auf die immunmodulierende Wirkung von Polyphenolen auf infizierte Zellen.

Bei der Frage nach dem **Wirkprinzip** einer antileishmaniell aktiven Stoffgruppe mag zu Beginn die Frage stehen, ob eine selektiv parasitotoxische Wirkung vorliegt, oder ob der parasitierte Makrophage, der ja eine Immunzelle von zentraler Bedeutung ist, zur antileishmaniellen Abwehr aktiviert wird.

Die getesteten Polyphenole mit antileishmanieller Potenz gegenüber dem amastigoten Stadium zeigten ebenfalls die Eigenschaften von Immunmodulatoren in ähnlicher Weise wie IFN- $\gamma$  oder LPS; andererseits sind sie gegenüber dem promastigoten Stadium nahezu wirkungslos, auch die Zytotoxizität gegenüber der Wirtszelle ist vergleichsweise gering. Damit erscheint als Grundlage der antileishmaniellen Wirkung eine direkte Amastigoten-Toxizität unwahrscheinlich und belegt vielmehr die Aktivierung zellulärer Immunreaktionen unter Einbezug proinflammatorischer Zytokine und der iNOS.

Vor diesem Hintergrund erscheint in bestimmten Fällen ein Einbezug von pflanzlichen Zubereitungen und Phytopharmaka mit Polyphenolen als Hauptinhaltsstoffgruppe in einer antiinfektionellen Therapie durchaus vielversprechend. Die selektive Aktivierung infizierter Zellen ist hierbei von besonderer Bedeutung, da eine grundlose Stimulation des unspezifischen Immunsystems keinen Nutzen für den betreffenden Organismus hat und unter Umständen sogar schädlich sein kann. Diese Überlegungen können natürlich nicht für Infektionskrankheiten generell gelten; Zumindest bei der Betrachtung von Leishmanien als obligat intrazelluläre Makrophagenparasiten liegt aber die Stärkung der Immunantwort als Therapieansatz ebenso nahe wie die chemotherapeutische Behandlung, bei der die direkte Abtötung des Parasiten im Vordergrund steht.