

10 Zusammenfassung

Durch ein antileishmaniell Screening von Substanzen aus verschiedenen Gruppen und Stoffklassen konnte in unserem Arbeitskreis gezeigt werden, dass zahlreiche Polyphenole eine hohe Aktivität gegen das intrazelluläre Stadium von *Leishmania major* und *Leishmania donovani* aufweisen, gegenüber dem extrazellulären Stadium jedoch nahezu wirkungslos sind. Auch gegenüber der als Wirtszelle verwendeten murinen makrophagenähnlichen Zell-Linie RAW 264.7 war in den getesteten Konzentrationen keine nennenswerte Toxizität festzustellen. Mit Hilfe funktioneller immunologischer Assays war eine Aktivierung des infizierten Makrophagen durch die verwendeten Polyphenole als Wirkprinzip ausgemacht worden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Kenntnisse über die polyphenolinduzierte Modulation der Makrophagenabwehr gegenüber Leishmanien auf weitere Substanzen dieser Stoffgruppe und auf weitere Leishmanienspezies ausgeweitet werden. Die Fortsetzung der funktionellen Untersuchungen mit Hilfe von sensitiven Zell-Linien für die Zytokine TNF, IFN und IL-6 sowie der Einsatz molekularbiologischer Methoden wie der RT-PCR und des ELISA haben einen weiteren Beitrag zum Verständnis der Wirkung von Polyphenolen auf den mit Leishmanien infizierten Makrophagen geleistet.

Bestimmte einfache Phenole, Proanthocyanidine vom B-Typ und hydrolysierbare Gerbstoffe wurden erneut antileishmaniell getestet, hinzu kamen Vertreter der galloylierten Flavonoidglykoside und der Kaffeesäureester. Die antileishmanielle Aktivität gegenüber intrazellulären Amastigoten hat sich bestätigt, insbesondere die hydrolysierbaren Gerbstoffe wie Corilagin und Geraniin zeichneten sich durch sehr niedrige IC_{50} -Werte bei sehr geringer Zytotoxizität gegenüber den Wirtszellen aus. Unter den Kaffeesäureestern sind vor allem die monomere Kaffeesäure sowie die Salvianolsäuren K und L aktiv, bei den galloylierten Flavonoidglykosiden fallen durch Aktivitäten bei niedrigen Konzentrationen diejenigen Kämpferol- und Quercetinderivate auf, die nicht zusätzlich galloyliert sind. Die funktionellen Assays wiesen die genannten Vertreter als aktiv bezüglich des Induktionsvermögens für TNF

und IL-6 aus. Zusätzlich zeigten sich Gallussäure, die hydrolysierbaren Gerbstoffe, die galloylierten Flavonoidglykoside sowie (in sehr geringem Maße) einige Kaffeesäureester interferoninduzierend. Diese rein funktionell charakterisierte IFN-Aktivität wurde mit Hilfe eines ELISA auf IFN- α zurückgeführt. Die bisher genannten Untersuchungen wurden für sieben humanpathogene Leishmanienspezies durchgeführt, namentlich die altweltlichen *L. major*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. killicki*, und die neuweltlichen *L. amazonensis* und *L. guyanensis*. Dabei spielten Speziesunterschiede keine große Rolle, lediglich in einigen Fällen erreichten bei Infektion mit den südamerikanischen Arten die Testsubstanzen erst bei höheren Konzentrationen ihren IC₅₀-Wert, und wiederum in einigen Fällen induzierten dann die Substanzen höhere TNF- und IL-6-Aktivitäten. Die weiteren Untersuchungen wurden, sofern nicht anders genannt, mit *L. major* und *L. donovani* durchgeführt.

Anders als bei Verwendung von IFN- γ + LPS zur Positivkontrolle hing die Aktivierbarkeit der Wirtszellen durch Polyphenole von der Vorbehandlung und von Begleitumständen ab. So aktivierten die getesteten Polyphenole grundsätzlich nur ruhende Zellen, wogegen jegliche Interaktion mit LPS und IFN- γ , allein oder in Kombination, zu einer Verringerung der NO-Produktion gegenüber dem Einzelstimulus und einer Abnahme der antileishmaniellen Aktivität führte. Dabei waren in den ersten 3 Stunden nach Erstbehandlung Reihenfolge und genauer Zeitpunkt der zweiten Behandlung unerheblich. Gallussäure verringerte die LPS-bedingte NO-Produktion und antileishmanielle Aktivität sowohl, wenn sie vor, gleichzeitig oder nach LPS in das System gegeben wurde. Entsprechendes gilt für Kombinationen von Gallussäure mit IFN- γ sowie IFN- γ + LPS, wenngleich auch in geringerem Maße. Analoge Untersuchungen mit entsprechendem Ergebnis wurden mit 3-Galloyl-Shikimisäure, 3,5-Digalloyl-Shikimisäure, Proanthocyanidin-Hexamer, Corilagin, Catechin und EGCG erzielt. Bei einer kombinierten Behandlung, bei der der zweite Stimulus nach 24 h hinzugegeben wurde, war der Einfluss der Erstkomponente nicht mehr einflussgebend. Sowohl IFN- γ als auch LPS, allein oder in Kombination, als auch die genannten Polyphenole aktivierten den Makrophagen. Diese Erkenntnisse sind in dem Sinne von großer Bedeutung, als dass über die immunmodulierenden Aktivitäten von Polyphenolen sowohl Berichte über aktivierende als auch inhibierende Auswirkungen existieren.

Besonders interessant ist aber der Einfluss der Infektion, die für sich bereits eine geringfügige Aktivierung verursacht. Wiederum im Gegensatz zum Stimulus IFN- γ + LPS induzieren Polyphenole überhaupt erst in infizierten RAW-Zellen eine weiterreichende Immunreaktion. Das zeigt sich bereits anhand der funktionellen Assays, bei denen die getesteten Polyphenole in nicht infizierten RAW 264.7 – Zellen keine oder nur geringe Aktivitäten an TNF, IL-6 bzw. IFN induzierten, dagegen infizierte Zellen zu in vielen Fällen sehr hohen Aktivitäten stimulieren konnten.

Mit Hilfe der RT-PCR wurde exemplarisch die Beteiligung von für die zelluläre Immunität wesentlichen Zytokinen sowie iNOS auf Transkriptionsebene untersucht. Einen Überblick über die Kinetik der Induktionsphase lieferten Untersuchungen an mit *L. major* infizierten Zellen nach Stimulation mit IFN- γ + LPS einerseits und mit Gallussäure andererseits. Der Vergleich beider Stimuli lieferte erneut einen Beweis für die aktivierende Potenz lediglich auf infizierte Zellen im Falle des Polyphenols. In Gallussäure-behandelten infizierten RAW-Zellen war nach zwei Stunden die Transkription von IL-1 und TNF- α nachweisbar, nach 4-6 Stunden konnte auch die mRNA für IL-12, IL-18, IFN- α , IFN- γ und die iNOS nachgewiesen werden. Eine Veränderung der Situation zeigte sich nach 10 h durch das Auftreten der IL-10 mRNA, was aufgrund der inhibierenden Eigenschaften von IL-10 als Ende der Aktivierungsphase zu werten ist. Im Gegensatz zum gleichzeitigen Verschwinden der Transkripte von IL-12, IL-18 und den Interferonen hielt die Expressionsphase von IL-1, TNF- α , IL-10 und iNOS noch bis 18 h nach Stimulation an. Bis auf das makrophagen-untypische Transkript IFN- γ entsprach dieser Ablauf dem der Positivkontrolle mit IFN- γ + LPS als Stimulus.

Die RT-PCR-Untersuchungen wurden auf 3-Galloyl-Shikimisäure, 3,5-Digalloyl-Shikimisäure, Proanthocyanidin-Hexamer, Corilagin, Catechin und EGCG ausgeweitet und der Zeitpunkt, zu dem das Transkriptionsprofil betrachtet werden sollte, auf 4 h nach Behandlung fokussiert. Auch hier waren durch IFN- γ + LPS die RAW-Zellen grundsätzlich aktivierbar, durch die genannten Polyphenole jedoch nur Zellen mit Infektion durch *L. major* bzw. *L. donovani*. Das Transkriptionsprofil entsprach im wesentlichen dem, welches bereits an gallussäure-behandelten Zellen ausgemacht werden konnte; zunächst fiel aber auf, dass sich Vertreter, die sich bislang als relativ schwache Induktoren ausgezeichnet hatten, wie 3-Galloyl-

Shikimisäure oder Catechin, auch durch eine geringe Transkriptionsstärke ausgezeichneten und das für die antileishmanielle Immunabwehr wichtige IL-12 gar nicht auftrat, wogegen 3,5-Digalloylshikimisäure eine mittlere Stellung einnahm und das Proanthocyanidin-Hexamer, EGCG und Corilagin, schon aus den funktionellen Assays als induktionsstark bekannt, IL-1, TNF- α und, dies wiederum hervorzuheben, IL-12 stark aktivierten. Bei den mit EGCG und Corilagin behandelten Proben war darüber hinaus IFN- α mRNA nachweisbar. In allen Proben und quantitativ ebenfalls der funktionellen Situation entsprechend, konnte die Transkription von iNOS nachgewiesen werden. Ein gesonderter Ansatz zeigte den Abbruch der Transkriptions-Aktivierungsphase durch das Auftauchen von IL-10 mRNA. Damit entsprach insgesamt die mRNA-Ebene vollends der funktionellen Ebene. Besonders interessant ist das aber in Hinblick auf IL-12, das mittels ELISA in den Überständen infizierter Zellen nachgewiesen werden konnte, und zwar wiederum nach Behandlung mit IFN- γ + LPS in auffallend hohen Konzentrationen und unabhängig von einer Infektion sowie im Falle der Stimulation durch Polyphenole nur in infizierten Zellen. Auch bezüglich der IL-12-Induktion zeigten sich Corilagin, EGCG und das hexamere Proanthocyanidin als stark, wenngleich auch nur etwa halb so stark wie IFN- γ + LPS, Gallussäure und 3,5-Digalloylshikimisäure als moderat und 3-Galloyl-Shikimisäure als schwach.

Die Wirkungen der Polyphenole auf die RAW-Zellen ist also der von IFN- γ + LPS ähnlich. Während der Kontakt mit den Leishmanien und die Frühphase des Infektionsprozesses die Zelle in einen beginnenden Aktivierungszustand versetzt, der zumindest zur Expression von IL-1, IL-6 und TNF- α führt, die weitere Fortsetzung des Aktivierungsprozesses aber unterbunden wird, führt eine Stimulation von außen zu einer weiterreichenden Aktivierung. Innerhalb von ca. 2 - 6 h werden die mRNAs für IL-12 und das damit synergistisch wirkende IL-18 hergestellt und translatiert. IL-12 wird umgehend ausgeschieden und sammelt sich innerhalb von 18 - 24 h in detektierbaren Mengen im umgebenden Medium an. Der Kontakt mit IFN- γ + LPS oder manchen Polyphenolen induziert ebenfalls IFN- α , das die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine verstärkt. IL-12 hat in der systemischen Immunantwort vor allem die Aufgabe, NK-Zellen und T_{H1}-Lymphozyten zur Sekretion von IFN- γ zu aktivieren. Dieses wiederum ist der stärkste bekannte Induktor für die iNOS. Da auch eine Autostimulation durch TNF α die iNOS induzieren kann, ist in der vorliegenden Situation die iNOS-Aktivierung Lymphozyten-unabhängig und kann

auch in einer reinen Makrophagen-Population erfolgen. Mit der Aktivierung von iNOS und der Produktion von reaktiven Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen werden die intrazellulären Parasiten frühzeitig abgetötet. Eine stärkere Vermehrung der Amastigoten, die zum Sterben des Makrophagen, der Freisetzung von Leishmanien und der Fortsetzung der Infektion geführt hätte, wird dadurch verhindert.

Nach dieser Ergebnis- und Interpretationslage ist die Aktivierung des zellulären Immunsystems, insbesondere der Abwehrprozesse der infizierten Zelle selbst, als Wirkprinzip der antileishmaniellen Aktivität von Polyphenolen plausibel. Für die Relevanz selektiv toxischer Prozesse konnte dagegen kein Hinweis gefunden werden.