

## *Bedeutung regulatorischer Wechselwirkungen zwischen Eisenstoffwechsel und Stickstoff- monoxid Metabolismus für die Immunabwehr gegenüber Plasmodium falciparum*

G. Fritsche<sup>1</sup>, Clara Larcher<sup>2</sup>, H. Schennach<sup>3</sup>, G. Weiss<sup>1</sup>

### **Einleitung**

Malaria ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten der Welt. Etwa 40 Prozent der Weltbevölkerung leben in Malaria-Endemiegebieten und jedes Jahr sterben mehr als 2,5 Millionen Menschen an den Folgen dieser Erkrankung (11). Eisen ist essentiell für das Wachstum von allen Mikroorganismen. Dies gilt in besonderem Maße auch für die explosionsartige Vermehrung von Malaria-Plasmodien. Es ist schon länger bekannt, dass eisenbindende Substanzen das Wachstum der Malaria-Parasiten inhibieren können. Neben der Fähigkeit mancher Chelatoren, zusammen mit Eisen toxische Komplexe zu bilden, spielt vor allem der direkte Eisenentzug aus wichtigen Stoffwechselwegen (Mitochondrien) eine Rolle. Der bekannteste Eisenchelator, der auch im klinischen Einsatz bereits erfolgreich verwendet wurde (2), ist Desferrioxamine (=Desferal, DFO).

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kurzlebiges Radikal, das an einer Reihe von biologischen Prozessen beteiligt ist. Dazu zählen die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, die Hemmung der Plättchenaggregation, eine Rolle als Neurotransmitter sowie die zytotoxische Aktivität von Immuneffektorzellen (7, 8). Die Biosynthese von Stickstoffmonoxid erfolgt mit Hilfe der NO-Synthase (NOS), einem Enzym, das aus L-Arginin in mehreren aufeinanderfolgenden oxidativen Schritten L-Citrullin und NO produziert. Bis heute sind drei verschiedene Formen der NO-Synthase bekannt: NOS1 (=nNOS) in Neuronen und NOS3 (=eNOS) in Endothelzellen sowie NOS2 in Makrophagen. Letztere wird auch als induzierbare NO-Synthase (=iNOS) bezeichnet, da ihre Synthese durch Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 sowie durch Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert werden kann (4, 6). Außerdem führt eine niedrige intrazelluläre Eisen-Konzentration zu einer Up-Regulation der iNOS auf transkriptioneller Ebene, und umgekehrt (9). Die Wirkung von Eisenchelatoren wurde bisher hauptsächlich auf den direkten Eisenentzug der Plasmodien zurückgeführt, allerdings wird auch eine Modulation der Makrophagen-Funktion diskutiert. In vivo Daten haben gezeigt, dass die

<b>Methoden</b>	therapeutische Gabe von Desferrioxamine bei kindlicher zerebraler Malaria zu verkürzter Komadauer und rascherer Entfernung der Plasmodien aus der Zirkulation führt. Damit verbunden wurde ein Anstieg von Nitrit/Nitrat, den stabilen Endprodukten von NO, im Serum nachgewiesen (10). Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob diese Beobachtung auf die in vitro entdeckte transkriptionelle Regulation der iNOS durch Desferrioxamine zurückzuführen ist (9), oder ob der Effekt von DFO bei <i>P. falciparum</i> -Malaria unabhängig von der Beeinflussung der NO-Synthese ist und primär auf Limitierung der Eisenverfügbarkeit für die Parasiten beruht.
Zellkultur	Murine RAW 264.7-Makrophagen (American Type Culture Collection, Rockville, MD) wurden in RPMI 1640-Medium plus Hepes (25 mM), Natrium Bikarbonat (2 g/l) (Biochrom, Berlin), ergänzt durch 10% Hitze-inaktiviertes Humanserum (0 pos.), Penizillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Glutamin (2mM), kultiviert. Das Medium für die <i>P. falciparum</i> -Kulturen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. P. Krensner, Tübingen) enthielt zusätzlich Hypoxanthin (50 mg/l) sowie D-Glucose (2 g/l). Zur Bestimmung der Parasitämie wurden Ausstrichpräparate angefertigt, mit Methanol fixiert und mit 5%iger Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt) gefärbt. Bei einer Parasitämie von über 10% wurden frische, gewaschene Erythrozyten (0 pos.) zugegeben oder Subkulturen angelegt.
Ko-Kultivierung von RAW 264.7 / <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten	RAW-Zellen wurden in einer Dichte von 10 <sup>6</sup> /ml in 24-well-Platten ausgesät. Nach 4 Stunden wurden in 0,4 µm Zellkultureinsätzen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 10 <sup>6</sup> <i>P. falciparum</i> -infizierte Erythrozyten (1) in 0,5 ml Medium zugegeben. Daraufhin erfolgte die Stimulation der Makrophagen durch Zytokine (mulFN-g Life Technologies, Wien; LPS Sigma, München) und diverse Substanzen (NIL-1 von Alexis, Schweiz; FeCl <sub>3</sub> , Desferrioxamine, Superoxid-Dismutase von Sigma). Nach weiteren 24 Stunden wurden Ausstrichpräparate angefertigt und die Parasitämie bestimmt. In den Überständen wurden weiters mittels Griess-Reaktion (3) (Griess Reagens von Merck, Darmstadt) die Nitritkonzentrationen als Maß für die stattgefundene NO-Bildung bestimmt.
Northern Blot Analyse	RAW 264.7-Zellen wurden wie oben beschrieben ko-kultiviert (6-well-Platten, 4-fache Mengen an Zellen etc.), die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mittels RNA-Clean (AGS, Heidelberg). Nach Trennung von 10 µg RNA in einem 1% Agarose / 2.2M Formaldehyd-Gel, Blotting auf eine Duralon-UV-Membran (Stratagene, La Jolla, CA), UV-Crosslinken und Prähybridisierung für 6 Stunden wurden die Blots über Nacht mit einer 32P-markierten cDNA-Probe (freundlicherweise bereitgestellt von C. Nathan, New York) hybridisiert. Nach Waschen der Membran (2 x 10 Minuten, 2 x SSC) wurde mittels Autoradiographie ein Film belichtet.
Statistik	Die Berechnung von statistischen Unterschieden erfolgte mittels Student's t-test. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant gewertet.
<b>Ergebnisse</b>	Zuerst untersuchten wir den Einfluss von IFN-g auf das Plasmodien-Wachstum in Ko-Kulturen bestehend aus RAW 264.7 und <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten. Steigende Konzentrationen von IFN-g führten zu einer signifikanten Reduktion der Parasitämie bei gleichzeitigem Anstieg der Nitritkonzentrationen in den Zellkultur-Überständen, was eine gesteigerte NO-Synthese widerspiegelt (Tab. 1).  Danach untersuchten wir den Einfluss von Perturbationen des Eisenstoffwechsels auf das parasitäre Überleben. Alleinige Zugabe von Eisen oder Desferrioxamine führte im Vergleich zur Kontrolle weder zu einer deutlichen Änderung der Parasitämie in unserem Ko-Kultur-Modell, noch zu einem Anstieg der Nitritkonzentrationen in den Überständen. Stimulation der Makrophagen mit IFN-g und LPS bewirkte einen signifikanten Abfall der Parasitämie und eine deutliche Steigerung der NO-Produktion. Zugabe von Eisen vor Zytokin-Stimulation der Makrophagen führte zu einer Umkehr dieser Parasitämie-Reduktion sowie zu vergleichsweise reduzierten Nitritspiegeln, während Eisenchelation mit Desferrioxamine bei stimulierten RAW-Zellen die Parasitenkonzentration reduzierte und die NO-Synthese maximal stimulierte (Tab. 2). Um herauszufinden, ob diese Ergebnisse auf eine Modulation der NO-Bildung oder auf einen wachstumsfördernden Effekt von

Tabelle 1:

Effekt einer Stimulation der Makrophagen mit IFN-g auf die Parasitämie der ko-kultivierten *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten. Inkubation 24h. n=4. \*p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

	Kontrolle	IFN- $\gamma$ 1U/ml	IFN- $\gamma$ 10U/ml	IFN- $\gamma$ 100U/ml
Parasitämie (relativ zur Kontrolle)	100,0%	84,6%	75,0% *	52,1% *
Nitritspiegel im Überstand	0,7 $\mu$ M	0,7 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M	8,3 $\mu$ M *

Eisen zurückzuführen sind, untersuchten wir den Einfluss von NIL-1, einem Inhibitor der NO-Synthase, auf das parasitäre Überleben. Durch Zugabe von NIL-1 zu IFN-g / LPS-stimulierten Makrophagen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Parasitämie verglichen mit alleiniger IFN-g / LPS-Gabe, was für eine entscheidende Bedeutung von NO als Parasiten-toxisches Agens spricht.

Tabelle 2:

Einfluss von Eisenperturbationen auf das Plasmodienwachstum im Ko-Kultur-System. Inkubation 24 h. Eisen (100  $\mu$ M), Desferrioxamine (200  $\mu$ M), IFN-g (10U/ml), LPS (100 ng/ml), NIL-1 (600  $\mu$ M). Parasitämien relativ zur unbehandelten Kontrolle. n=6. \*p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle. #p<0,05 im Vergleich zu IFN-g/LPS.

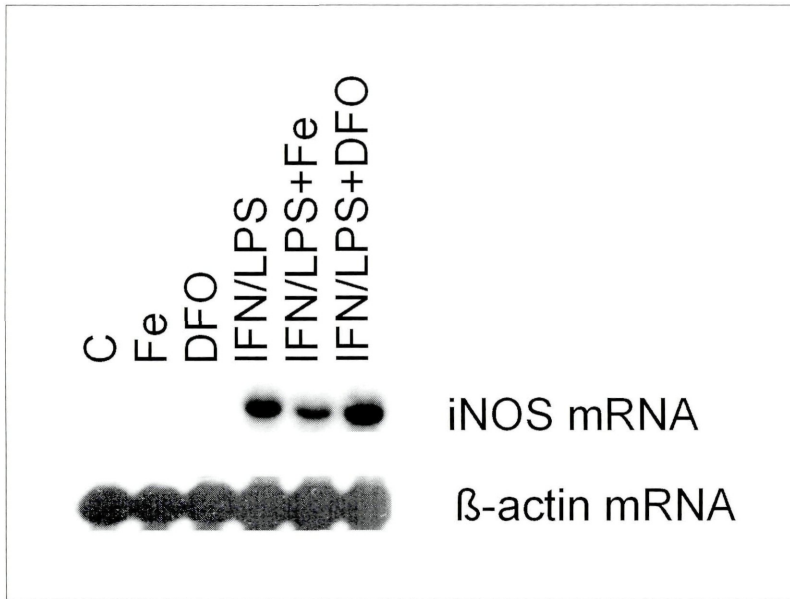
	Kontrolle	FeCl <sub>3</sub>	DFO	IFN/LPS	IFN/LPS +FeCl <sub>3</sub>	IFN/LPS +DFO	IFN/LPS +NIL-1	IFN/LPS +NIL-1 +FeCl <sub>3</sub>	IFN/LPS +NIL-1 +DFO
Parasitämie (rel. zur Kontrolle)	100,0%	107,4%	107,0%	66,4%*	99,0%#	54,7%*	96,1%#	100,0%#	95,0%#
Nitrit im Überstand	1,0 $\mu$ M#	1,4 $\mu$ M#	0,9 $\mu$ M#	17,8 $\mu$ M*	11,2 $\mu$ M*#	21,2 $\mu$ M*	3,9 $\mu$ M#	2,5 $\mu$ M#	3,8 $\mu$ M#

Weiters zeigte sich, dass weder Eisen noch DFO bei Ko-Kulturen, die mit IFN-g, LPS und NIL-1 stimuliert wurden, zu einer signifikanten Änderung der Parasitämie führten. Dies weist darauf hin, dass Änderungen des Eisenangebots das Parasitenwachstum über eine Modulation der iNOS-Expression in den Makrophagen beeinflussen. Dieser regulatorische Effekt von Eisen auf die induzierbare NO-Synthase zeigt sich auch in Northern Blots: Durch Stimulation der ko-kultivierten Makrophagen mittels IFN-g / LPS kommt es zu einem deutlichen Anstieg der iNOS-mRNA, welcher durch Eisen verringert, durch DFO hingegen noch weiter gesteigert wird (Abb. 1).

Weiters untersuchten wir, welchen Einfluss von den Zytokin-stimulierten Makrophagen gebildete Sauerstoffradikale auf das parasitäre Wachstum haben. Zugabe von Superoxid-Dismutase (SOD), einem Enzym, das O<sub>2</sub><sup>-</sup> Radikale in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umwandelt, führte zu einer teilweisen Aufhebung des Parasitämie-senkenden Effektes von IFN-g / LPS. Die Zugabe von Katalase, welche Wasserstoffperoxid abbaut, führte zu keiner Änderung der Parasitämie im Vergleich zu IFN-g / LPS behandelten Makrophagen. Durch kombinierte Gabe von NIL-1 und SOD und damit verbundener Blockade sowohl von NO als auch von O<sub>2</sub><sup>-</sup>, kam es zu einer völligen Aufhebung der Wirkung von IFN-g / LPS (Tab. 3).

## Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, dass Makrophagen nach Stimulation mit Interferon-g/LPS eine gesteigerte Plasmodien-Abtötung bewirken, wobei dieser Effekt durch Gabe eines NO-Synthase-Inhibitors (NIL-1) aufgehoben werden kann. Alleinige Gabe von DFO führte zu keiner signifikanten Senkung der Parasitämie, DFO in Verbindung mit Makrophagen-Stimulation entfaltete hingegen die stärkste antiplasmodielle Wirkung. Hierbei fanden sich auch hohe Nitritkonzentrationen in den Überständen. Unter Ausschaltung der iNOS hingegen lässt sich der DFO-Effekt wieder zum größten Teil aufheben. Dies sind deutliche Hinweise darauf, dass die Wirkung von DFO bei Malaria auf eine Modulation der NO-Synthase in aktivierten Makrophagen zurückzuführen ist. Northern Blots haben gezeigt, dass die iNOS-mRNA Expression durch



Eisen blockiert wird, während es unter DFO (durch den Eisenentzug) zu einer vermehrten NO-Synthase-Bildung kommt. Dies deckt sich mit früheren Untersuchungen die zeigen konnten, dass Eisen die iNOS-Aktivität transkriptionell reguliert (9).

Weiters wurde der Einfluss von Sauerstoffradikalen auf das parasitäre Überleben untersucht. Der Abbau von Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) zu Wasserstoffperoxyd ( $H_2O_2$ ) wird durch die Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert. Die Gabe von SOD zu aktivierten Makrophagen in den Ko-Kulturen führte zu deutlich erhöhten Parasitämien verglichen mit alleiniger Stimulation mittels IFN-g/LPS. Superoxidanionen leisten demzufolge einen Beitrag zur Parasiten-Abtötung, während das entstehende  $H_2O_2$  weniger toxisch zu sein scheint. Die Kombination von NIL-1 und SOD ergibt einen additiven Effekt, es finden sich dabei Parasitämien, die höher sind als die Kontrolle. Dies scheint ein Hinweis auf eine bedeutende Rolle von Peroxynitrit in der antiplasmodiellen Funktion von Makrophagen zu sein. Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), eine äußerst

Abbildung 1:

Modulation der iNOS mRNA-Expression in ko-kultivierten RAW 264.7-Zellen. Kontrolle, FeCl<sub>3</sub> 100  $\mu$ M, DFO 200  $\mu$ M, IFN-g 10U/ml, LPS 100ng/ml. Inkubation 24 h.

kurzlebige Verbindung, entsteht aus der Vereinigung von Superoxyd-Anionen und NO-Radikalen. Seine Funktion in der Abwehr von diversen Mikroorganismen, sowie in der Regulation von Gefäßtonus und Plättchenaggregation ist bekannt (5).

Unsere Beobachtungen belegen somit, dass für die Plasmodienabtötung durch Makrophagen/Hepatozyten sowohl NO als auch  $O_2^-$  benötigt wird, woraus das toxische Effektorprodukt Peroxynitrit gebildet wird.

Tabelle 3:

Einfluss von modulierenden Enzymen auf den Zytokin-vermittelten Parasitämie-Abfall. Inkubation 24 h. IFN-g (10U/ml), LPS (100 ng/ml), Superoxid-Dismutase (333 U/ml), Katalase (333 U/ml), NIL-1 (600  $\mu$ M). Parasitämien relativ zur unbehandelten Kontrolle. n=4. \*p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle. #p<0,05 im Vergleich zu IFN-g/LPS.

	Kontrolle	IFN/LPS	IFN/LPS +SOD	IFN/LPS +CAT	IFN/LPS +NIL-1	IFN/LPS +NIL-1 +SOD
Parasitämie (rel. zur Kontrolle)	100,0%	69,9%*	93,1%#	73,9%*	95,3%#	105,4%#

Inhibition nur eines der beiden Stoffwechselwege führt zu einer signifikant verminderten Parasitenclearance und Blockade sowohl der zytokininduzierten Stickstoffmonoxid- als auch der Superoxid-Bildung und stimuliert sogar das Parasitenwachstum.

Der Einfluss von Eisen und Desferrioxamine ist primär auf eine modulierende Wirkung auf die NO-Bildung zurückzuführen und reguliert dadurch die Bildung von Peroxynitrit.

## Zusammenfassung

Malaria ist eine der verbreitetsten Infektionskrankheiten der Welt. Malaria-Parasiten, speziell *P. falciparum* als die häufigste und gefährlichste Gattung, fordern jedes Jahr mehr als 2,5 Millionen Todesopfer. Obwohl eine Reihe von wirksamen Chemotherapeutika zur Verfügung steht, besteht trotzdem Bedarf nach immer neuen Medikamenten. Es hat sich gezeigt, dass sich der Eisenchelator Desferrioxamine (DFO) positiv auf den Malaria-Krankheitsverlauf auswirkt. Zugabe von DFO zu einer herkömmlichen Therapie mit Chinin bewirkt eine kürzere Dauer von Koma und Fieber, sowie eine beschleunigte Parasiten-Clearance. Der Hintergrund dieser Therapie mit Eisenchelatoren ist aber noch unklar. Das Ziel unserer Arbeit war es, herauszufinden, ob der günstige Effekt von DFO in vivo auf die Modulation von Immuneffektorfunktionen zurückzuführen ist, oder auf einer Limitierung der Eisenverfügbarkeit der Parasiten beruht.

Dazu bedienten wir uns eines Ko-Kultur-Modelles mit murinen Makrophagen und *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten. Wir konnten zeigen, dass Eisen und DFO die Bildung von NO durch

IFN- $\gamma$ /LPS-stimulierte Makrophagen modulieren. Zugabe von DFO führt zu einer gesteigerten NO-Synthese und einer entsprechenden Reduktion der Parasitämie. Dieser Effekt kann durch NIL-1, einem stereospezifischen Inhibitor der NO-Synthase, aufgehoben werden. Außer NO spielt auch das reaktive Sauerstoffradikal Superoxidanion eine Rolle in der Abtötung der Plasmodien. Elimination beider Systeme durch kombinierte Gabe von Superoxid-Dismutase und NIL-1 führte zu einer relativen Stimulation des Parasitenwachstums mit Parasitämien höher als die Kontrolle. Da NO und Superoxid zusammen Peroxynitrit bilden, dürfte dieses kurzlebige Radikal ein wichtiges Effektormolekül in der antiplasmodialen Wirkung von Zytokin-aktivierten Makrophagen darstellen, dessen Bildung wiederum durch Eisen beeinflusst wird.

**Schlüsselwörter** Malaria, Makrophagen, Stickstoffmonoxid, Eisen, Desferrioxamine.

**Summary** *Regulatory Interactions between Iron and Nitric Oxide Metabolism in Immune Defense against Plasmodium falciparum Malaria*

Malaria is one of the most widespread infectious diseases in the world. Malaria parasites, especially *Plasmodium falciparum*, which is the most dangerous and frequent species, are responsible for more than 2,5 million deaths per year worldwide. Although several chemotherapeutics are known, therapy sometimes is insufficient, so that there is a need for the development of new drugs. Recent data have suggested that administration of the iron chelator desferrioxamine (DFO) may be beneficial in acute malaria infection. Addition of DFO to a standard antimalarial therapy with quinine resulted in faster recovery from coma, shorter duration of fever and faster clearance of parasitaemia. However, the background of iron chelation therapy is poorly understood. Therefore we performed co-culture experiments with murine macrophages and *P. falciparum*-infected erythrocytes and assessed parasite viability in the presence of different substances and cytokines. We could show that administration of iron/DFO modulates the production of NO by IFN- $\gamma$ /LPS-stimulated macrophages. Addition of DFO leads to increased NO-formation and consequently induces a reduction of parasitemia. This effect can be inhibited by addition of NIL-1, a stereospecific inhibitor of NO-Synthase (iNOS). Besides NO-radicals, also reactive oxygen metabolites such as superoxide play a role in parasite killing. Elimination of these two pathways via combination of superoxide-dismutase and NIL-1 resulted in stimulation of parasite growth with parasitemias even higher than the control. Since NO and superoxide together form peroxynitrite, the later short living radical seems to be the major effector molecule in antiplasmodial activity by cytokine-activated macrophages.

**Key words** Malaria, macrophages, nitric oxide, iron, desferrioxamine.

### Literatur

1. BINH, V. Q., LUTY, A. J. F., KREMSNER, P. G. (1997): Differential effects of human serum and cells on the growth of *Plasmodium falciparum* adapted to serum-free in vitro culture conditions. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 57, 594-600.
2. GORDEUK, V. R. et al. (1992): Effect of iron chelation therapy on recovery from deep coma in children with cerebral malaria. *N. Engl. J. Med.* 327, 1473-1477.
3. GREEN, L. C. et al. (1982): Analysis of nitrate, nitrite, and 15N nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131-138.
4. MACMICKING, J., XIE, Q. W., NATHAN, C. (1997): Nitric oxide and macrophage function. *Ann. Rev. Immunology* 15, 323-350.

5. MAYER, B., SCHRAMMEL, A., KLATT, P., KOESLING, D., SCHMIDT, K. (1995): Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 270, 17355-17360.
6. NATHAN, C. (1992): Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB Journal* 6, 3051-3064.
7. SNYDER, S., BREDET, D.S. (1992): Stickstoffmonoxid – Regulator biologischer Signale. *Spektrum der Wissenschaft*, Juli 1992.
8. Stamler, J. S., Singel, D. J., Loscalzo, J. (1992): Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258, 1898-1902.
9. WEISS, G. et al. (1994): Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *J. Exp. Med.* 180, 969-976.
10. WEISS, G. et al. (1997): Modulatory potential of iron chelation therapy on nitric oxide formation in cerebral malaria. *J. Infect. Dis.* 175, 226-230.
11. WORLD HEALTH STATISTICS QUARTERLY (1992): World malaria situation 1990. Division of Control of Tropical Diseases. World Health Organization, Geneva. *World Health Stat. Q.* 45 (2-3), 257-266.

**Korrespondenzadresse** Dr. Gernot Fritsche  
Univ. Klinik f. Innere Medizin,  
Anichstraße 35  
A-6020 Innsbruck · Austria

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 2000

Band/Volume: [22](#)

Autor(en)/Author(s): Fritsche Gernot, Larcher C., Schennach H., Weiss G.

Artikel/Article: [Bedeutung regulatorischer Wechselwirkungen zwischen Eisenstoffwechsel und Stickstoffmonoxid Metabolismus für die Immunabwehr gegen über Plasmodium falciparum 69-74](#)