

**Isolierung und Charakterisierung antiinflammatorischer
Oxylipine aus Blattextrakten von *Urtica dioica* L.**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Sonja Klingelhöfer

Kiel
Juni 2001

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen / Glossar	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Heilpflanzen <i>Urtica dioica</i> und <i>Urtica urens</i>	1
1.2 Bedeutung der Entzündungsreaktion in der Pathogenese rheumatischer Erkrankungen.....	4
1.3 Therapie-Ansätze für Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises	5
1.3.1 Basistherapeutika	5
1.3.2 Immunsuppressiva.....	6
1.3.3 Biologicals.....	6
1.3.4 Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR).....	7
1.3.5 Phytopharmaka.....	7
1.4 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B als therapeutisches Target	8
1.5 Ziel der Arbeit.....	11
2 MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 Präparative und analytische Methoden.....	12
2.1.1 Herstellung von Brennesselblätter-Extrakten.....	12
2.1.1.1 Extrakte unterschiedlicher Polarität aus frischen Blättern	12
2.1.1.2 Isopropanolischer Extrakt aus Fertigarzneimittel (Ethanol-Isopropanol-Extrakt)	12
2.1.1.3 Isopropanol-Extrakt aus getrockneten Brennesselblättern (Droge).....	12
2.1.2 Fraktionierung von Brennesselblätter-Extrakt über präparative HPLC	13
2.1.2.1 Fraktionierung von 50 % ethanolischem Brennesselblätter-Extrakt (Fertigarzneimittel)	13
2.1.2.2 Fraktionierung des Ethanol-Isopropanol-Extraktes (2.1.1.2)	14
2.1.3 NMR-Analysen der unter 2.1.2.2 beschriebenen HPLC-Fractionen	14
2.1.4 Analytische HPLC von den unter 2.1.2.2 beschriebenen HPLC-Fractionen	15
2.1.4.1 Umkehrphase (RP-HPLC)	15
2.1.4.2 Normalphase (SP-HPLC)	15
2.1.4.3 Chiralphase (CP-HPLC)	15
2.2	Zellkultur
.....	16
2.2.1 Isolierung von primären peripheren Blutzellen.....	16
2.2.1.1 Isolierung von PBMC (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>) über Ficoll-Gradient	16
2.2.1.2 Abreicherung der Monocyten über Adhärenz	16
2.2.1.3 Anreicherung der Monocyten über magnetische <i>Beads</i>	16
2.2.2 Zellkultur-Bedingungen.....	17
2.2.2.1 Primäre Zellen.....	17
2.2.2.2 Zelllinien.....	18

2.2.3	<i>Bioassays</i>	18
2.2.3.1	Prinzip	18
2.2.3.2	<i>Bioassay</i> mit Monocyten-depletierten PBMC zur Bestimmung von IL-2 / IFN- γ	18
2.2.3.3	Jurkat- <i>Screening-Assay</i> (IL-2-Expression)	19
2.2.3.4	Interleukin-1 β / Tumor-Nekrose-Faktor- α -Assay (PBMC)	19
2.2.3.5	Gelatinase B-Assay (Monocyten)	20
2.2.3.6	Collagenase- und Stromelysin-Assay (Chondrocyten).....	20
2.2.4	Vitalitätstests.....	20
2.2.4.1	MTT-Test	20
2.2.4.2	AllamarBlue-Test.....	21
2.3	Immunologische Methoden	21
2.3.1	Immunoassays.....	21
2.3.2	Durchflußcytometrie.....	21
2.3.2.1	Meßprinzip	21
2.3.2.2	Nachweis der Reinheit isolierter Monocyten und Monocyten-depletierter PBMC	22
2.3.2.3	CD36-Fluoreszenz-Markierung von MonoMac6-Zellen.....	23
2.4	Proteinbiochemische und molekularbiologische Methoden	23
2.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA und RT-PCR.....	23
2.4.2	Gelelektrophorese	24
2.4.2.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.4.2.2	Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	24
2.4.3	Herstellung von Gesamtzellextrakten	24
2.4.4	Herstellung von Kernextrakten.....	25
2.4.5	Protein-Konzentrations-Bestimmung	26
2.4.6	Radioaktive Markierung der EMSA-Oligonukleotide	26
2.4.7	<i>Electro-Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	27
2.4.8	Entwicklung der EMSA-Röntgenfilme	28
3	ERGEBNISSE	29
3.1	<i>In-vitro</i> -Hemmung der T-zellulären Cytokin-Expression durch Brennesselblätter- Extrakt (Fertigarzneimittel) in primären PBMC und Jurkat-T-Zellen.....	29
3.1.1	Hemmung der Expression von T _H 1-Cytokinen in primären PBMC.....	29
3.1.2	Hemmung der Expression von IL-2 in Jurkat-T-Zellen.....	31
3.2	<i>Screening</i> nach antiinflammatorisch wirksamen Inhaltsstoffen von Brennessel- blätter-Extrakten.....	32
3.2.1	<i>Screening</i> nach wirksamen Extrakt-Fractionen durch den Jurkat-Assay	33
3.2.1.1	<i>Screening</i> unterschiedlich polarer Extrakte aus frischen Brennesselblättern durch den Jurkat-Assay	33
3.2.1.2	<i>Screening</i> unterschiedlich polarer Extrakte aus Blattdroge durch den Jurkat- Assay.....	34
3.2.1.2.1	HPLC-Fractionen des 50 % ethanolischen Brennesselblätter-Extraktes.....	34
3.2.1.2.2	Isopropanolischer Auszug des 50 % ethanolischen Brennesselblätter-Extraktes..	35
3.2.1.2.3	Subfraktionen aus Ethanol-Isopropanol-Extrakt.....	36
3.2.1.2.4	Isopropanolischer Brennesselblätter-Extrakt.....	36
3.2.1.2.5	Heptan-Fraktion aus alkalischer Hydrolyse des Isopropanol-Extraktes	37
3.2.2	Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen der über RP-HPLC isolierten wirksamen Fractionen aus Ethanol-Isopropanol-Extrakt.....	37
3.2.2.1	Identifizierung von Inhaltsstoffen wirksamer Fractionen durch ¹ H-NMR.....	37

3.2.2.2	Identifizierung von Inhaltsstoffen wirksamer Fraktionen durch RP-HPLC	40
3.2.2.3	Detektion von Positions- und optischen Isomeren von HOTE über SP- und CP-HPLC	41
3.2.3	Wirkung identifizierter Monosubstanzen im Jurkat-Assay.....	41
3.3	Wirkung von Brennesselblätter-Extrakten sowie Fettsäuren und Oxylipinen auf die <i>In-vitro</i> -Expression weiterer proinflammatorischer Faktoren	43
3.3.1	Einfluß auf die LPS-stimulierte IL-1 β - und TNF- α -Expression von PBMC ...	43
3.3.1.1	Suppression der Expression monocytärer Cytokine durch Brennesselblätter-Extrakte	43
3.3.1.2	Einfluß von Fettsäuren und Oxylipinen auf die Expression monocytärer Cytokine.....	46
3.3.2	Suppression der MMP-Expression von Monocyten und Chondrocyten	47
3.3.2.1	Hemmung der Gelatinase B-Expression von primären humanen Monocyten durch Isopropanol-Extrakt	47
3.3.2.2	Hemmung der MMP-Expression von primären humanen Chondrocyten durch 13-HOTE.....	48
3.4	Wirkung des isopropanolischen Brennesselblätter-Extraktes und 13-HOTE auf die Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren	49
3.4.1	Wirkung von 13-HOTE und isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B	50
3.4.1.1	Inhibitorischer Einfluß von Isopropanol-Extrakt auf die Aktivierung von NF- κ B in PBMC.....	50
3.4.1.2	Wirkung von Fettsäure-Derivaten und Isopropanol-Extrakt auf die Aktivierung von NF- κ B in Jurkat-T-Zellen	51
3.4.2	Wirkung von 13-HOTE und Isopropanol-Extrakt auf die Aktivierung des nukleären Rezeptors PPAR γ	53
3.4.2.1	Untersuchung der PPAR-Aktivierung über EMSA	54
3.4.2.1.1	Vergleich verschiedener PPAR-Bindungs-Oligonukleotide im EMSA	54
3.4.2.1.2	Vergleich der PPAR γ / RXR-DNA-Komplex-Bildung verschiedener Zelltypen im EMSA	56
3.4.2.1.3	Zeitabhängige Wirkung des Isopropanol-Extraktes auf die Aktivierung von PPAR γ	58
3.4.2.1.4	Kooperative Wirkung von 13-HOTE und 9-cis-RA auf die PPAR γ -Aktivierung	59
3.4.2.2	Induktion des PPAR γ -abhängigen CD36-Gens durch verschiedene PPAR-Liganden im Vergleich zu 13-HOTE	60
3.4.2.2.1	Induktion der CD36-Expression auf MonoMac6-Zellen durch 13-HOTE im Vergleich zu bekannten PPAR-Liganden	60
3.4.2.2.2	Kooperative Wirkung von 13-HOTE und 9-cis-RA bei der Induktion der CD36-Expression	63
3.4.2.2.2	Zeitabhängige Wirkung von isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt auf die CD36-Expression	64
4	DISKUSSION	66
4.1	50 % ethanolischer Brennesselblätter-Extrakt beeinflusst die <i>In-vitro</i> -Expression T _H -spezifischer Cytokine	66
4.2Die <i>In-vitro</i> -Inhibition der induzierbaren IL-2-Expression von Jurkat-T-Zellen ist ein reproduzierbarer und sensitiver Meßparameter für die Wirkung von Brennesselblätter-Extrakt.....	67
4.3	Lipophile Brennesselblätter-Extrakte haben eine größere Wirkstärke im Jurkat-Assay	67

4.4 Identifizierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Oxylipinen als IL-2-supprimierende Inhaltsstoffe lipophiler Brennesselblätter-Extrakte.....	68
4.5 13-HOTE inhibiert die LPS-induzierte IL-1 β - und TNF- α -Expression von PBMC.....	70
4.6 13-HOTE inhibiert <i>in vitro</i> die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)	71
4.7 Ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B der molekulare Angriffspunkt von Inhaltsstoffen aus Brennesselblätter-Extrakten, wie 13-HOTE ?.....	71
4.8	13-HOTE: Ein neuer PPAR γ -Ligand ?
.....	72
4.8.1 13-HOTE stimuliert die DNA-Bindungsaktivität von PPAR γ	73
4.8.2 13-HOTE stimuliert die Expression von CD36 auf MonoMac6-Zellen	74
4.9 Molekulare Wirkungsweise von Brennesselblatt-Inhaltsstoffen.....	76
4.10 Ausblick.....	79
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	80
6 TABELLENANHANG.....	82
7 LITERATUR.....	89

Abkürzungen

9-cis-RA	<i>9-cis-Retinoic acid</i> (9-cis-Retinsäure)
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGA	Bundesgesundheitsamt
Bidest	zweifach destilliertes Wasser
BSA	<i>Bovine Serum albumin</i> (Rinderserum-Albumin)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
ConA	Concanavalin A
COX	Cyclooxygenase
CP-HPLC	Chiralphase-HPLC
CREB	<i>cAMP Responsive Element-Binding Protein</i>
CRP	C-reaktives Protein
CyA	Cyclosporin A
DAB	Deutsches Arzneibuch
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
DMARD	<i>Disease Modifying Antirheumatic Drug</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen u. Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
ECD	Phycoerythrin-TexasRed-X
ED	Effektive Dosis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EU	Endotoxin Units
EGTA	Ethylenglycol-(aminoethylether)-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electro-Mobility Shift Assay</i>
ESCOF	<i>European Scientific Cooperative of Phytotherapy</i> (offizielles Organ der Europäischen Gemeinschaft)
F _c	Konstante Region von Immunglobulinen
FCS	<i>Fetal Calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FK506	Tacrolimus
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärts-Streulicht)
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HODE	Hydroxyoctadecadiensäure
HOTE	Hydroxyoctadecatriensäure
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
I κ B	NF- κ B-inhibitorisches Protein
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
MMP	Matrix-Metalloproteinase

mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MTT	3,(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazolium-Bromid
MTX	Methotrexat
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NF-AT	<i>Nuclear Factor of Activated T Cells</i>
NIK	<i>NF-κB-Inducing Kinase</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OA	Osteoarthritis (Arthrose)
oxLDL	<i>oxidized Low Density Lipoprotein</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PeCy5	Phycoerythrin-Cyanin-5.1
PG	Prostaglandin
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PHA	Phytohämagglutinin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	<i>Peroxisome-Proliferator Activated Receptor</i>
PPRE	<i>PPAR Responsive Element</i>
R	Korrelationsfaktor
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Reactive Oxygen Intermediates</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
RP	<i>Reversed Phase</i> (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-PCR</i>
RXR	<i>Retinoid-X Receptor</i>
SD	Standardabweichung
SP	<i>Straight-Phase</i> (Normalphase)
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
SSC	<i>Sideward Scatter</i> (Seitwärts-Streulicht)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TFA	Trifluoressigsäure
T _H	T-Helfer
TNF	Tumor-Necrose-Faktor
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
üNa	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VDR	Vitamin D ₃ -Rezeptor

Glossar

<i>Annealing</i>	Oligonukleotid-Hybridisierung
<i>Antisense</i>	zu der mRNA komplementär
<i>Assay</i>	Testsystem
<i>Biological</i>	Rekombianter Wirkstoff
<i>Buffy Coat</i>	Leukozyten-angereicherte Blutkonserve
CD(+Zahl)	<i>cluster of differentiation</i> (Nomenklatur zur Unterscheidung von Immunzellen aufgrund ihrer Oberflächenproteine, z.B. CD4: T-Helfer-Zellen)
DR-1-Element	<i>Direct Repeat-1-Element</i> (best. Responsives DNA-Element)
Droge	Getrocknete Pflanzenteile (z.B. Blatt, Wurzel usw.)
ED ₅₀	Dosis bei der eine halbmaximale Wirkung induziert wird
Fertigarzneimittel	Darreichungsform, galenische Formulierung des Wirkstoffs, (enthält Hilfsstoffe), hier für 50 % ethanolischen Brennnesselblätter-Extrakt (Rheuma-Hek [®]) verwendet
<i>5`-Flanking region</i>	5`-flankierender Bereich eines DNA-Abschnitts
IC ₅₀	Konzentration bei der eine halbmaximalen inhibitorischen Wirkung erzielt wird
K _D	Dissoziationskonstante des Rezeptor-Ligand-Komplexes
<i>Mean fluorescence intensity</i>	mittlere Fluoreszenz-Intensität
<i>Monolayer</i>	einschichtige Zellkultur
<i>Orphan-Rezeptor</i>	Protein der <i>Nuclear Receptor Superfamily</i> dessen natürlicher Ligand nicht bekannt ist
Pannus	von der Gelenkkapsel ausgehende Proliferation der Synovialis mit Invasion und Destruktion des Gelenkknorpels
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
<i>Primer</i>	Starter-Oligonukleotide
<i>Prodrug</i>	Wirkstoff-Vorläufermolekül
<i>Resonsive element</i>	Transkriptionsfaktor-bindendes DNA-Element im Promotor
Rheuma-Hek	Arzneimittel: Brennnesselblätter-Trockenextrakt, Strathmann AG (Hamburg)
<i>Sense</i>	der mRNA-entsprechend
Synovia	Gelenkschmiere (von der Synovialis gebildete Flüssigkeit)
Synovialis	Gelenkhaut
Synovitis	Entzündung der Gelenkhaut
Vitamin D ₃	hier für die aktive Form von Vitamin D ₃ verwendet: 1,25-dihydroxy-Cholecalciferol
<i>Well</i>	Probenvertiefung in Testplatte (ELISA- oder Zellkulturplatte)

1 Einleitung

1.1 Die Heilpflanzen *Urtica dioica* und *Urtica urens*

Die Gattung *Urtica* L. gehört zur Familie der Urticaceae, Ordnung Urticales. Sie umfaßt 35 Arten und ist besonders in der gemäßigten Zone von Europa, Asien und Nordafrika verbreitet. Sie wächst nahezu überall, bis in eine Höhe von 1500 m, bevorzugt auf stickstoffreichen Böden (Frank *et al.* 1998).



Abb. 1.1: *Urtica dioica* (aus: Thomé. Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz)

Für die Herstellung von Arzneimitteln werden zwei Arten verwendet. Die zweihäusige *Urtica dioica* L. (Große Brennnessel, Abb. 1.1) ist eine ausdauernde, bis 150 cm hoch

wachsende, mehrjährige krautige Pflanze. Sie hat eine vierkantige Sproßachse mit dekussierten, herzförmigen, dunkelgrünen Laubblättern mit gesägtem Rand, die mit kurzen borstenartigen Haaren sowie langen Brennhaaren besetzt sind. *Urtica urens* L. (Kleine Brennessel) gleicht der großen Brennessel im Aussehen, wird jedoch nur bis zu 60 cm hoch, hat kleinere eiförmige Blätter, keinen überwinternden Wurzelstock und ist einhäusig. Beide Brennesselarten blühen von Juni bis Oktober. Die Blüten beider Arten sind zu traubigen Blütenständen vereinigt. Die Einzelblüte ist grün, männlich wie weiblich vierzählig mit ebensovielen Staubblättern und einer pinselförmigen Narbe. Die Frucht ist eine kleine Nuß.

Urtica dioica zeichnet sich durch eine hohe Variabilität und Anpassungsfähigkeit an neue und rasch veränderliche Lebensräume aus, die wahrscheinlich auf ihrer Fähigkeit zur Hybridbildung beruht (polyploides "Unkraut").

Die Droge *Urtica folium* besteht aus den während der Blüte gesammelten und getrockneten Blättern von *U. dioica*, *U. urens* und deren Hybriden (BGA 1990). *Urtica folium* ist eine relativ gut untersuchte Pflanzendroge, aus der viele Substanzen des Primär- und Sekundärstoffwechsels isoliert und identifiziert werden konnten (Schilcher 1988, Lutomsky & Speichert 1983, Wegener 1999). Auffällig ist die dunkle Färbung der Blätter, die auf einen sehr hohen Chlorophyll-Gehalt zurückzuführen ist. Daneben wurden verschiedene Carotinoide (β -Carotin, Violaxanthin, Eloxanthin, Lycopin), Vitamine (C, K1 und B-Gruppe), Triterpene, Phytosterole (z.B. β -Sitosterol) und -glycoside, sowie aliphatische organische Säuren (Ameisen-, Essig-, Citronen-, Äpfelsäure) und Spurenelemente (Kupfer, Mangan, Aluminium, Cobalt, Zink) gefunden. Je nach Standort kann der Gehalt an Mineralstoffen (Kieselsäure, Kalium und Nitrat) in der Blattdroge bis zu 20 % betragen (Lutomsky & Speichert 1983, Schilcher 1988, Frank *et al.* 1998). Die Brennhaare enthalten biogene Amine (Cholin, Acetylcholin, Histamin, Serotonin, 5-Hydroxy-Tryptamin) (Lutomsky & Speichert 1983). Die vorherrschenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe sind Flavonoide, wie Kämpferol, Isorhamnetin, Quercetin, und Flavonoid-Rutoside und -Glycoside (Hegnauer 1990, Schomakers *et al.* 1995), sowie Phenolcarbonsäuren (Ferula-, p-Cumar-, Kaffee-, Chlorogen- und Kaffeoyläpfelsäure) und Cumarine (Scopoletin) (Chaurasia & Wichtl 1987, Lutomsky & Speichert 1983, Budzianowski 1991, Frank *et al.* 1998).

Über die Einzelwirkung der Blatinhaltsstoffe ist wenig bekannt, ferner variiert ihr Gehalt in Abhängigkeit von dem Pflanzenstandort, dem Erntezeitpunkt und dem Aufbereitungsverfahren der Blattdroge.

Neben den Blättern finden auch die unterirdischen Teile der Brennessel (*Urticae radix*) in Form von Extrakten klinische Anwendung in der Therapie von benigner Prostatahyperplasie (Frank *et al.* 1998).

Der Brennessel wurde als Heilpflanze im Laufe der Geschichte ein einzigartiges Wirkungsspektrum zugeschrieben. Schon in der Antike wurde das Kraut therapeutisch

eingesetzt. Der Grieche Dioskurides beschrieb die heilende Wirkung in der *de materia medica* (60 n. Chr.) als harntreibend, verdauungsregulierend, blutreinigend, hustenlindernd und blutungshemmend. Auch bei den römischen Naturforschern (Plinius der Ältere) hatte die Brennessel großes Ansehen und wurde von Ihnen u.a. bei Vergiftungen und Epilepsie sowie als blutstillendes Mittel verschrieben. Auf dieses Wissen griffen noch im Mittelalter Paracelsus und Hildegard von Bingen zurück (Madaus 1938).

Auch heute findet das Brennesselkraut als Teedroge oder Frischpflanzen-Preßsaft in der Volksmedizin aufgrund seiner diuretischen Wirkung Verwendung bei Rheuma, Gicht, Nieren- und Blasenerkrankungen sowie zur Blutreinigung. In der russischen Volksmedizin wird Brennesselblätter-Tee auch bei Diabetes und zur Erhöhung der Enzymproduktion der Bauchspeicheldrüse sowie bei Gallenwegs-Erkrankungen eingesetzt (Lutomsky & Speichert, 1983). In der afrikanischen Volksmedizin werden Brennesselblätter in Form von Schnupfpulver bei Nasenbluten sowie äußerlich bei Verbrennungen zur Wundheilung angewendet.

Auch in der Homöopathie gibt es diverse Anwendungsgebiete für die Blattdroge (Verbrennungen, Herpes-Infektionen, Dysmenorrhoe, Nierensteinleiden, Ekzeme, Hypersensibilität der Haut).

Für die meisten in der Literatur beschriebenen Wirkungen der unterschiedlich Drogen-Aufarbeitungen existiert kein klinischer Nachweis. Nur die entzündungshemmende / antirheumatische sowie die diuretische Wirkung sind gut dokumentiert. Die antirheumatischen Effekte von Brennesselblätter-Extrakten wurden in klinischen Studien bei annähernd 10.000 Patienten mit vorwiegend degenerativen Gelenkerkrankungen geprüft (Ramm & Hansen 1995, Ramm & Hansen 1997, Wolf F 1998). Die vorliegenden Daten belegen eine klinische Wirksamkeit im Sinne einer Schmerzabnahme und einer verbesserten Beweglichkeit.

Die Wirksamkeitsbelege wurden in sogenannten Positiv-Monographien sowohl von Sachverständigen der Aufbereitungskommission E des Bundesgesundheitsamtes als auch von der *European Scientific Cooperative on Phytotherapy* (dem offiziellen Organ der Europäischen Gemeinschaft) zusammengefaßt (BGA 1990, ESCOP 1997). Danach wurden die Indikationen "zur unterstützenden Behandlung rheumatischer Beschwerden" und "zur Durchspülung bei entzündlichen Erkrankungen der ableitenden Harnwege" festgelegt.

Die diuretische Wirkung von Brennesselblätter-Extrakten ist wahrscheinlich vor allem auf den hohen Mineralstoffgehalt der Blätter zurückzuführen. Darüber hinaus scheinen andere Inhaltsstoffe von Brennesselblättern sehr spezifisch in die Regulation von Entzündungsreaktionen bei rheumatischen Erkrankungen einzugreifen (siehe 1.3.5).

1.2 Bedeutung der Entzündungsreaktion in der Pathogenese rheumatischer Erkrankungen

Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises umfassen neben primären Gelenkerkrankungen auch systemische Erkrankungen des muskuloskelettären Systems, Erkrankungen der Wirbelsäule, Weichteil-Rheumatismus sowie Erkrankungen des Knochens und des Knorpels. Die primären Gelenkerkrankungen werden anhand der pathogenetischen Ursachen weiter unterteilt, hierbei sind vor allem die rheumatoide Arthritis (entzündliche Polyarthrit) und die Osteoarthritis (Arthrose) als häufigste Gelenkerkrankungen zu nennen. In allen Fällen ist eine fehlgeleitete Entzündungsreaktion an der Pathogenese beteiligt, auch wenn unterschiedliche Ursachen zugrundeliegen.

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine komplexe Autoimmunerkrankung, die durch eine chronische erosive Synovitis der Gelenke gekennzeichnet ist. Es wird angenommen, daß die Pathogenese durch ein Zusammenspiel von Infektionen, genetischer Prädisposition und Autoimmunität entsteht (Lanchbury & Pitzalis 1993, Alarcon 1995). Autoreaktiven T-Helfer (T_H)-Zellen, die ein gelenkassoziiertes Selbst-Antigen erkennen, scheint hierbei eine besondere Rolle zuzukommen (Goronzy & Weyland 1995, Panayi *et al.* 1992). $CD4^+$ T-Helfer-Zellen werden anhand der von ihnen sekretierten Cytokine in zwei Phänotypen (T_H1 , T_H2) unterschieden (Mosman & Coffman 1989). Das T_H2 -Cytokin-Spektrum besteht aus Interleukin (IL)-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und ist für die Vermittlung der humoralen Immunität wichtig (Snijdwint *et al.* 1993, Hsieh *et al.* 1992).

Entzündliche Immunreaktionen werden vor allem durch T_H1 -Zellen über die Produktion von IL-2 und Interferon- γ (IFN- γ) vermittelt. Diese Cytokine fördern die klonale Expansion der T-Zellen und aktivieren Monocyten (Espinoza-Delgado *et al.* 1995, Trinchieri 1993). Die aktivierten Monocyten differenzieren sich zu Makrophagen und setzen dann selbst weitere entzündungsfördernde Cytokine, IL-1 β , IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), frei. Diese Cytokine wiederum aktivieren das Endothel der lokalen Blutgefäße, so daß die Endothelzellen spezifische Adhäsionsmoleküle exprimieren und somit eine verstärkte transendotheliale Migration von Immunzellen zum Ort der Entzündung ermöglichen (Postigo *et al.* 1993). Die monocytären Cytokine IL-1 β und TNF- α aktivieren auch Chondrocyten und Synovialzellen, was in der Expression von Cyclooxygenase (COX)-2 und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) wie Collagenasen resultiert (Arner & Torella 1995, Knott *et al.* 1994). Die chronisch erhöhte Cytokin-Konzentration in der Synovia führt langfristig zu einer synovialen Hyperplasie (Pannus-Bildung).

Eine erhöhte Expression von MMPs vermittelt nicht nur die direkte Zerstörung des Gelenkknorpels, die entstehenden Knorpelbruchstücke aktivieren weiterhin auch verstärkt Makrophagen. Durch die Expression der COX-2 wird Prostaglandin (PG) E_2 freigesetzt.

PGE₂ vermittelt über einen vasodilatatorischen Effekt, Exsudation und die Sensibilisierung von Nozizeptoren Krankheitssymptome wie Schwellung, Rötung und Erwärmung des Gelenks und die damit einhergehenden Schmerzen (Mutschler *et al.* 2001).

Letzlich setzt demnach eine anhaltend erhöhte Cytokin-Expression im Gelenk eine ganze Kaskade von sich multiplizierenden pathogenetischen Prozessen in Gang. Daher ist eine Suppression der auslösenden proinflammatorischen Cytokine der zentrale Angriffspunkt für Therapieansätze rheumatischer Erkrankungen (siehe 1.3).

Im Falle der Osteoarthritis (OA) wird die monocytäre Cytokinfreisetzung durch Knorpelabrieb induziert, der meist aus der Abnutzung, Fehlbelastung oder Verletzung des Gelenks resultiert. Der Mechanismus der Monocyten-Aktivierung wird als "frustrane Phagocytose" bezeichnet. Im Verlauf der Chronifizierung beeinflussen später auch T-Zellen die Pathogenese. IL-1 β und TNF- α stimulieren analog der RA die Synthese von MMPs in Synovialfibroblasten und Chondrocyten und induzieren die Expression der COX-2 (Pelletier *et al.* 1997, Vignon *et al.* 1993).

Generell verläuft die Osteoarthritis aufgrund der geringeren und oft zeitlich begrenzten Cytokin-Ausschüttung weniger aggressiv als eine rheumatoide Arthritis, ferner ist die Erkrankung meist nicht systemisch.

1.3 Therapie-Ansätze für Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises

1.3.1 Basistherapeutika

Die allgemeine Tendenz in der Behandlung der RA ist eine frühzeitige aggressive Therapie mit Basistherapeutika, um die systemische Ausbreitung der Erkrankung einzuschränken (Kushner & Dawson 1992). Zu den Basistherapeutika oder auch DMARDs (*disease-modifying antirheumatic drugs*) zählen Methotrexat (MTX), Azathioprin, Goldsalze und Sulfasalazin. D-Penicillamin und Chloroquin werden aufgrund der mäßigen klinischen Erfolge nur noch selten eingesetzt.

Azathioprin und MTX sind sogenannte Antimetaboliten (Cytostatika). Azathioprin inhibiert als Purin- und Pyrimidin-Antagonist direkt die Synthese von DNA und RNA. MTX hingegen ist ein Folat-Antagonist, der durch Hemmung der Dihydroxyfolat-Reduktase in die Synthese von Purin-Nukleotiden eingreift (Auterhoff *et al.* 1991, Mutschler *et al.* 2001).

Der genaue Wirkmechanismus von Goldkomponenten ist nicht bekannt, es wurde jedoch eine Inhibition der Produktion von IL-1 β und TNF- α beschrieben (Bondeson & Sundler 1995). Als Angriffspunkt wird die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) diskutiert (siehe 1.4).

1.3.2 Immunsuppressiva

Zu den Immunsuppressiva zählen Glucocorticoide und cytotoxische Stoffe wie Cyclosporin A (CyA) und FK506 (Tacrolimus).

CyA und FK506 greifen in die Proliferation von T-Zellen ein, indem sie die Expression von IL-2 inhibieren. Es ist bekannt, daß diese Substanzen einen inhibitorischen Einfluß auf die Aktivierung Calcineurin-induzierter Transkriptionsfaktoren (NF-AT, NF-IL-2A) in T-Zellen ausüben und somit auch die Expression von IFN- γ inhibieren (Schreiber & Crabtree 1992). Neuere Daten deuten ebenfalls auf eine Inhibition der Aktivierung von NF- κ B hin (siehe 1.4). NF- κ B ist neben NF-AT, NF-IL-2A und AP-1 an der transkriptionellen Regulation des IL-2-Gens in T-Zellen beteiligt, spielt darüber hinaus aber auch eine zentrale Rolle bei der Expression von Entzündungsmediatoren in anderen Immunzellen (Baeuerle & Henkel 1994, Barnes & Karin 1997).

Glucocorticoide sind die wirksamsten entzündungshemmenden Wirkstoffe, die heute verfügbar sind. Die Wirkung von Glucocorticoiden beruht auf verschiedenen Mechanismen, die noch nicht vollständig geklärt sind (Lee *et al.* 1998). Am besten untersucht ist die Wechselwirkung des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) mit Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (siehe 1.4) und AP-1. Nach Liganden-Aktivierung des GR transloziert dieser in den Zellkern und inhibiert die transkriptionelle Aktivität der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren durch direkte Wechselwirkung beider Proteine (Auphan *et al.* 1995, Scheinman *et al.* 1995, Handel 1997).

Immunsuppressiva greifen generell auf Transkriptions-Ebene ein und regulieren die Expression von proinflammatorischen Genprodukten, wie Cytokinen, herunter.

1.3.3 *Biologicals*

Die ersten sogenannten *Biologicals* (gentechnisch hergestellte Wirkstoffe) mit einer Zulassung für die Indikation RA sind Etanercept (ein Fusionsprotein aus dem p75-TNF- α -Rezeptor und einem IgG-F_C-Teil) und Infliximab (chimärer anti-TNF- α -Antikörper) (Lovell *et al.* 2000, Feldmann *et al.* 1999, Harriman *et al.* 1999). Beide Wirkstoffe greifen auf Proteinebene in die Entzündungsreaktion ein, indem sie die vermehrt freigesetzten TNF- α -Proteine neutralisieren.

Weitere Anti-Cytokin-Therapien, wie z.B. ein rekombinant hergestellter IL-1 Rezeptor-Antagonist befinden sich zur Zeit noch in der klinischen Erprobungsphase (Bresnihan *et al.* 1998, Gabay & Arend 1998).

1.3.4 Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)

Die Wirkung der NSAR zielt auf eine Linderung der Krankheitssymptome durch Inhibition der Prostaglandin-Synthese ab (antiphlogistische und analgetische Wirkung). NSAR können das Fortschreiten einer entzündlichen Erkrankung jedoch nicht verhindern. PGE₂ ist das wichtigste proinflammatorische Prostaglandin und entsteht am Entzündungsort aus Arachidonsäure durch eine COX-vermittelte Reaktion.

Zu den NSAR zählen verschiedene Stoffklassen wie Arylpropionsäurederivate (Ibuprofen), Arylessigsäurederivate (Diclofenac), Indolessigsäurederivate (Indometacin), Oxicame (Piroxicam) und Acetylsalicylsäure. Alle NSAR haben einen gleichen Wirkmechanismus, die Hemmung der COX-Aktivität und eine Reduktion der damit einhergehenden Krankheitssymptome (Auterhoff *et al.* 1991, Mutschler *et al.* 2001).

1.3.5 Phytopharmaka

Neben den beschriebenen Therapieformen werden auch Phytopharmaka in der Therapie rheumatischer Erkrankungen eingesetzt. Hierzu zählen Extrakte aus Teufelskrallenwurzel (*Harpagophyti radix*), Weidenrinde (*Salicis cortex*) und Goldrutenkraut (*Solidaginis herba*) (Schilcher & Kammerer 2000). Ihr genauer Wirkmechanismus ist jedoch oft unbekannt.

Für die meisten Phytopharmaka wird lediglich ein antiphlogistischer Effekt durch Reduktion der Prostaglandinsynthese postuliert, so auch für Extrakte aus der afrikanischen Teufelskrallenwurzel (Eichler & Koch 1970). Bei einigen Pflanzenextrakten konnten die dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe bereits isoliert werden. Weidenrinde enthält einen Salicylalkohol und dessen Glycoside. Diese Inhaltsstoffe fungieren als *Prodrug*. Nach oraler Aufnahme werden sie durch Glycosid-Spaltung und Oxidation in den eigentlichen Wirkstoff Salicylsäure umgewandelt. Goldrutenkraut enthält verschiedene Kaffeesäurederivate und Flavonoide, denen eine Hemmung der PGE₂-Synthese zugeschrieben wird (Bader 1999).

Wie in Absatz 1.1 bereits beschrieben, werden auch Extrakte aus Brennesselblättern erfolgreich als Therapeutika in der antirheumatischen Therapie eingesetzt. Auch ihnen wird häufig eine antiphlogistische Wirkung zugeschrieben. *In vitro* konnte an RBL-1-Zellen (*leukemic basophilic granulocyte*, Ratte) eine verminderte Synthese von PGE₂ unter Einfluß eines Brennesselblätter-Extraktes (Rheuma-Hek®) gezeigt werden (Obertreis *et al.* 1996b). Auch Kaffeoylöpfelsäure, eine aus diesem Extrakt isolierte Phenolcarbonsäure war in diesem Testsystem hinsichtlich der COX-Hemmung aktiv.

Weiterführende *In-vitro*-Untersuchungen belegen jedoch, daß durch Brennesselblätter-Extrakt (Rheuma-Hek®) auch die Produktion der kausalen Entzündungsmediatoren, der proinflammatorischen Cytokine, beeinflußt wird. An humanen Vollblutkulturen wurde gezeigt, daß durch gleichzeitige Inkubation mit Brennesselblätter-Extrakt die Lipopolysaccharid

(LPS)-stimulierte Sekretion von IL-1 β und TNF- α herabgesetzt wird (Obertreis *et al.* 1996a). Die aus Brennesselblättern bisher als aktive Inhaltsstoffe identifizierten Phenolcarbonsäuren (Kaffeoyläpfelsäure, Kaffeesäure, Chlorogensäure) und Flavonoide (Quercetin, Rutin) beeinflussten die Cytokinsekretion jedoch nicht.

Auch LPS-stimulierte Vollblutkulturen von Probanden zeigten unter oraler Rheuma-Hek[®]-Therapie eine reduzierte Cytokinsynthese. Dabei korrelierte die Reduktion von IL-1 β und TNF- α mit der Dauer der Einnahme (Teucher *et al.* 1996).

Ein Hinweis auf den molekularen Angriffspunkt der antiinflammatorisch wirksamen Inhaltsstoffe von Brennesselblätter-Extrakten konnte mittels EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*) gewonnen werden. An verschiedenen TNF- α -stimulierten humanen Zelllinien wurde eine inhibitorische Wirkung von Brennesselblätter-Extrakt (Rheuma-Hek[®]) auf die DNA-Bindungsaffinität von NF- κ B nachgewiesen (Riehemann *et al.* 1999). Die Identität der Cytokin-supprimierenden Inhaltsstoffe blieb jedoch unbekannt.

1.4 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B als therapeutisches Target

Die transkriptionelle Aktivierung von NF- κ B ist ein Schlüsselereignis in der Regulation der Expression von Entzündungsmediatoren wie Cytokinen und stellt damit ein attraktives therapeutisches Target für neue antiinflammatorische und cytoprotektive Wirkstoffe dar.

NF- κ B wurde ursprünglich als gewebespezifischer Transkriptionsfaktor identifiziert, der in die Aktivierung der Genexpression der Immunglobulin- κ leichten Kette in reifen B-Zellen involviert ist (Sen & Baltimore 1986). NF- κ B ist jedoch ein ubiquitär verbreiteter Transkriptionsfaktor.

NF- κ B wird durch eine Vielzahl inflammatorischer Stimuli wie Cytokine, Phorbolester, T-Zell-Mitogene, bakterielles LPS oder verschiedene Stressoren, wie H₂O₂ und UV-Strahlung aktiviert. Die aktive Form von NF- κ B ist ein Heterodimer, das in der Regel aus den Untereinheiten p50 und p65 besteht, als weitere Untereinheiten kommen p52, c-Rel und RelB vor (Thanos & Maniatis 1995).

In unstimulierten Zellen liegt NF- κ B als inaktiver Komplex im Cytoplasma an seine inhibitorische Untereinheit I κ B gebunden vor (Blackwell & Christman 1997). Nach der Stimulation der Zellen wird NF- κ B schnell durch Dissoziation von I κ B aktiviert, wodurch eine nukleäre Lokalisierungssequenz des Heterodimers freigelegt wird, die die Translokation in den Zellkern vermittelt. Dort bindet NF- κ B an die regulatorischen Sequenzen seiner Zielgene und aktiviert deren Transkription (Baldwin 1996, Matthews & Hay 1995).

Die Schlüsselreaktion bei der Aktivierung von NF- κ B ist die Phosphorylierung und nachfolgende Ubiquitin-Markierung von I κ B, die einen schnellen Abbau des Inhibitors in den Proteosomen vermittelt (Regnier *et al.* 1997, DiDonato *et al.* 1997). Reaktive Sauerstoff-

Intermediate (ROIs) sind als *second messenger* an der Aktivierung beteiligt. Es wird angenommen, daß diese eine redox-sensitive Kinase aktivieren (Schulze-Osthoff *et al.* 1995). Kürzlich konnte die I κ B-phosphorylierende Kinase als ein aus mehreren Proteinen assoziierter I κ B-Kinase (IKK)-Komplex (Signalosom) identifiziert werden (Di Donato *et al.* 1997, Rothwarf *et al.* 1998, Cohen *et al.* 1998). Die Signaltransduktion oberhalb der IKK ist jedoch noch weitgehend ungeklärt und scheint zudem in Abhängigkeit des auslösenden Signals zu variieren (Scheidereit 1998) (siehe *Abb. 1.2*).

Zu den entscheidenden Genen, deren Expression NF- κ B auf diese Weise induziert, gehören inflammatorische und chemotaktische Cytokine (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8), Zell-Adhäsionsmoleküle (wie VCAM-1), Akut-Phase-Proteine (wie CRP) und proinflammatorische Enzyme (COX-2) (Baeuerle & Henkel 1994, Baeuerle & Baichwal 1997). Auch die Expression von knorpelabbauenden MMPs in Chondrocyten wird durch NF- κ B reguliert (Mengshol *et al.* 2000, Barchowsky *et al.* 2000).

Bei vielen inflammatorischen Erkrankungen ist die NF- κ B-Aktivität erhöht, was in einer Überexpression proinflammatorischer Genprodukte resultiert. Im Falle der RA kann NF- κ B im entzündeten Gelenk nicht nur in den infiltrierenden Immunzellen (Monocyten und T-Zellen) sondern auch in Synovialzellen, Chondrocyten und Endothelzellen detektiert werden (Handel *et al.* 1995, Marok *et al.* 1996, Fujisawa *et al.* 1996, Foxwell *et al.* 1998).

Für verschiedene antirheumatische Wirkstoffe konnte ein Einfluß auf die NF- κ B-Aktivierung nachgewiesen werden (Baeuerle & Baichwal 1997). Dies ist prinzipiell auf verschiedenen Ebenen möglich (*Abb. 1.2*):

I. Eingriff in die frühe Signaltransduktionskaskade:

In Abhängigkeit von dem auslösenden Stimulus, kann in die Signalweiterleitung eines spezifisch aktivierten Oberflächenrezeptors (IL-1R, TNF-R, CD14, CD28) eingegriffen werden. Andererseits kann die Bildung von H₂O₂ als *second messenger* inhibiert werden. Obwohl die Rolle von H₂O₂ als genereller *second messenger* heute kontrovers diskutiert wird, konnte für verschiedene Antioxidantien eine Inhibition der NF- κ B-Aktivierung nachgewiesen werden (Lee & Burckart 1998, Weber *et al.* 1994).

II. Inaktivierung des IKK-Komplexes:

Die Inaktivierung des IKK-Komplexes würde die Phosphorylierung von I κ B verhindern und somit eine hemmende Wirkung auf die Aktivierung von NF- κ B ausüben. Eine inhibitorische Wirkung auf die IKK-aktivierende Kinase NIK (*NF- κ B inducing kinase*) konnte sowohl für Kaurene (tetracyclische Diterpene) (Castrillo *et al.* 2001) als auch für 4-Hydroxy-Nonenal (Page *et al.* 1999) nachgewiesen werden. Ein direkter Einfluß auf IKK α oder IKK β ist für Myricetin und andere Flavonoide (Tsai *et al.* 1999) sowie Cyclopentenon-Prostaglandine vom A- und J-Typ beschrieben (Rossi *et al.* 2000).

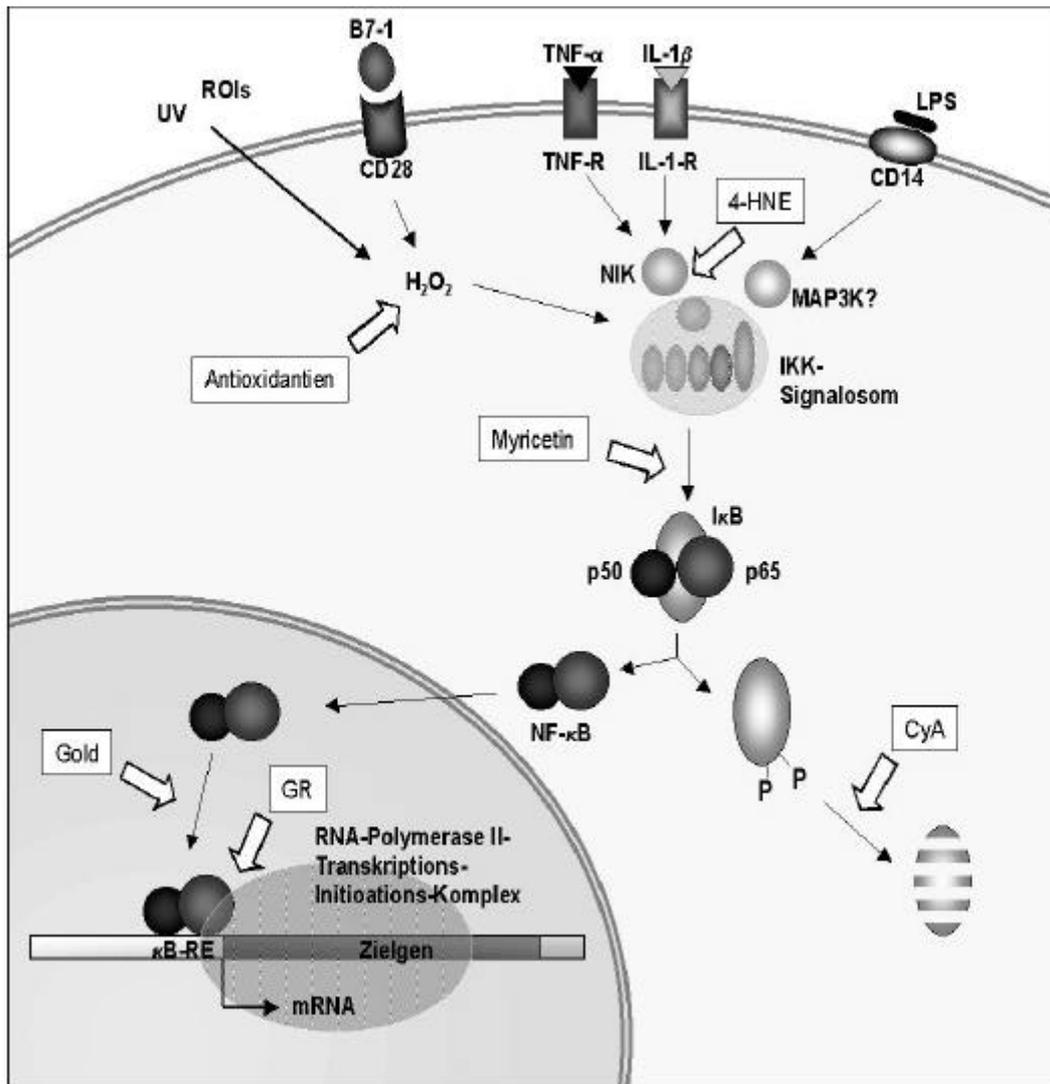


Abb. 1.2: Verschiedene Angriffspunkte von Wirkstoffen, die die Aktivität von NF-κB inhibieren. Abkürzungen: B7-1 (CD28-Ligand), CyA (Cyclosporin A), GR (Glucocorticoid-Rezeptor), 4-HNE (4-Hydroxy-Nonenal), IKK (IκB-Kinase), κB-RE (NF-κB *Responsive Element*), LPS (Lipopolysaccharid), MAP3K (Mitogen-aktivierte Protein-3-Kinase), NIK (NF-κB-induzierende Kinase), P (Phosphat-Rest), R (Rezeptor), ROIs (reaktive Sauerstoff-Intermediate).

III. Einfluß auf den IκB-Abbau:

Es ist beschrieben, daß eine Verhinderung der IκB-Degradation einen inhibitorischen Einfluß auf die Aktivierung von NF-κB ausübt. Neben synthetischen Peptid-Proteasomen-Inhibitoren wurde dieser Effekt für CyA und andere Proteinase-Inhibitoren nachgewiesen (Meyer *et al.* 1997).

Ferner wurde gezeigt, daß Glucocorticoide eine induktive Wirkung auf die Expression von IκBα ausüben (Scheinman *et al.* 1995).

IV. Transkriptionelle Aktivierung der Zielgene:

Goldsalze sollen durch einen Redox-Mechanismus direkt die DNA-Bindung von NF- κ B inhibieren, indem Goldionen die Cystein-Reste der Zink-Finger der DNA-Bindungsdomäne oxidieren (Yang *et al.* 1995).

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, daß durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem GR die Transaktivierungsdomäne von NF- κ B blockiert wird, der GR bindet hierbei nicht an ein GR-responsives Element (De Bosscher *et al.* 2000).

GR ist ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor und Mitglied der nukleären Rezeptor-Multigenfamilie, der auch Thyroid-Hormon-, Vitamin D₃- und Retinsäure-Rezeptoren sowie verschiedene *Orphan*-Rezeptoren angehören (Kastner *et al.* 1995, Mangelsdorf *et al.* 1995, Enmark & Gustafsson 1996).

Auch für den Vitamin D₃-Rezeptor (VDR) wurde eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivierung von NF- κ B nachgewiesen (D'Ambrosio *et al.* 1998). Eine dem GR-Mechanismus analoge Wirkung wurde auch für den *Orphan*-Rezeptor PPAR (*peroxisomal proliferater-activated receptor*) beschrieben (Delerive *et al.* 1999a), dessen natürliche Liganden erst vor wenigen Jahren identifiziert werden konnten (Spiegelman 1998, Wolf G 1998).

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Untersuchung von antiinflammatorisch wirksamen Inhaltsstoffen von Brennesselblättern. Hierbei sollte zunächst mit Hilfe eines Zellkultur-Tests die Wirkung verschiedener Brennesselblätter-Extrakte *in vitro* bewertet werden. Die Identifizierung einzelner wirksamer Blatt-Inhaltsstoffe ist die Voraussetzung für ein besseres Verständnis der Wirkung pharmazeutisch eingesetzter Brennesselblätter-Extrakte. Darauf aufbauend sollten hier auch die zugrundeliegenden molekularen Wirkmechanismen der identifizierten Inhaltsstoffe untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Präparative und analytische Methoden

2.1.1 Herstellung von Brennesselblätter-Extrakten

Einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Brennesselblätter-Extrakte und daraus isolierten Fraktionen gibt *Abb. 3.5*.

2.1.1.1 Extrakte unterschiedlicher Polarität aus frischen Blättern

Frische Brennesselblätter wurden geerntet (*Urtica dioica*, vor Blütezeit, max. 30 cm hoch) und direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Die gefrorenen Blätter wurden zu einem Pulver zermörsert. Die Extraktion von je 12 g dieses Pulvers erfolgte mit 150 ml Lösungsmittel (Wasser, 50 % Ethanol oder 2-Propanol) für 1,5 h bei 60 °C im Wasserbad.

Die Lösungen wurden über einen Faltenfilter und anschließend über einen 0,45 µm Cellulose-Acetat-Filter (Sartorius) filtriert und an einem Rotationsverdampfer eingedampft (Lagerung der Trockenextrakte bei -20 °C).

2.1.1.2 Isopropanolischer Extrakt aus Fertigarzneimittel (Ethanol-Isopropanol-Extrakt)

53,4 g Kapselinhalt von 50 % ethanolischem Brennesselblätter-Extrakt-Fertigarzneimittel (Rheuma-Hek[®], Strathmann AG) wurde in 640 ml Wasser (LiChrosolv, Merck) aufgenommen, in einem siedenden Wasserbad unter Rühren 5 min erhitzt und anschließend in einem Eisbad abgekühlt.

Der wässrige Auszug wurde bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wurde erneut in 640 ml Wasser resuspendiert, zentrifugiert und dekantiert. Der Rückstand wurde mit 2-Propanol (RotiSolv, Roth) zweimal extrahiert. Die isopropanolischen Phasen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt. (Ausbeute: ca. 1,6 % bezogen auf den Brennesselblätter-Extrakt ohne Hilfsstoffe).

2.1.1.3 Isopropanol-Extrakt aus getrockneten Brennesselblättern (Droge)

Extrakte im Technikums- und Produktionsmaßstab wurden bei der Firma Biokirch (Niederlassung Neuenburg) hergestellt.

Als Ausgangsstoff wurden getrocknete Brennesselblätter, sogenannte Blatt-Droge (Qualität nach DAB), eingesetzt. Die Extraktion mit 95 % 2-Propanol / 5 % Gereinigtem Wasser (Ph. Eur.) erfolgte unter Rühren innerhalb von 6 h bei RT. Das Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV) betrug 19 - 33 : 1.

Verseifung des Isopropanol-Extraktes:

Der Verseifung (alkalische Hydrolyse) ging die Herstellung eines Isopropanol-Extraktes im Technikums-Maßstab (7,5 kg Droge) voraus. 170 g getrockneter Isopropanol-Extrakt wurde mit 3 l ethanolischer Natronlauge (1 N) 1 h bei 60 °C in einem 10 l-Rundkolben gerührt. Nach dem Abkühlen wurden 0,5 l Bideest zugesetzt.

Anschließend wurde zweimal mit jeweils 2,5 l Heptan unter Rühren extrahiert. Wäßrige und Heptan-Phase wurden anschließend in einem Scheidetrichter separiert.

Die wäßrige Phase wurde mit 400 ml 10 % Salzsäure angesäuert und erneut zweimal mit Heptan extrahiert. Nach der Separation wurden die beiden letzten Heptan-Fractionen vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt. (Die Ausbeute betrug 30 g, was ca. 17,6 % des Ausgangs-Extraktes entsprach).

2.1.2 Fraktionierung von Brennesselblätter-Extrakt über präparative HPLC

Die Fraktionierungen an der präparativen HPLC (Besta) wurden von Herrn Dr. Wick (Strathmann Biotech) durchgeführt. Die Fraktionierung erfolgte analog der analytischen RP-HPLC an einer Kromasil C18-Säule (250 x 20 mm; Akzo Nobel) mit ansteigendem Acetonitril-Gradienten und 0,1 % TFA.

2.1.2.1 Fraktionierung von 50 % ethanolischem Brennesselblätter-Extrakt (Fertigarzneimittel)

2 g Kapselinhalt des Fertigarzneimittels (Rheuma-Hek[®]) wurde direkt in 50 % Methanol aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad sonifiziert. Anschließend wurde der Auszug über einen 0,45 µm Cellulose-Acetat-Filter (Sartorius) gegeben. Ein Aliquot des Filtrats wurde am Rotationsverdampfer einrotiert und ausgewogen.

Der Rest des Filtrats wurde anschließend über präparative HPLC aufgetrennt, hierzu wurde ein ansteigender Acetonitril-Gradient (40 - 100 %) mit 0,1 % TFA über 70 min eingesetzt.

Es wurden fünf Fraktionen isoliert (*Tabelle 2.1*), die zunächst an einem Rotationsverdampfer einrotiert und anschließend gefriergetrocknet wurden. Die Mengen-Anteile der Fraktionen wurden durch Auswaage bestimmt.

Tabelle 2.1: Isolierte Fraktionen des Brennesselblätter-Extraktes (präparative RP-HPLC).

	Fraktion	Ausbeute (mg)
A	0 - 32 min	1675
B	32 - 44 min	114
C	44 - 49 min	50
D	49 - 70 min	52
E	Acetonitril-Spülfraktion	6

2.1.2.2 Fraktionierung des Ethanol-Isopropanol-Extraktes (2.1.1.2)

Ausgangsstoff für die Fein-Fraktionierung war der in 2.1.1.2 beschriebene Isopropanol-Ethanol-Extrakt. Für den Auftrag wurde der Extrakt in Methanol durch Sonifizieren gelöst und anschließend durch einen 0,45 µm Cellulose-Acetat-Filter filtriert.

Zur Trennung wurde ein ansteigender Acetonitril-Gradient (60 – 100 %) mit 0,1 % TFA eingesetzt.

Die Fraktionen I – VII wurden nach dem HPLC-Profil bei 210 nm isoliert (Abb. 2.1). Sie wurden am Rotationverdampfer getrocknet und ihre relativen Anteile über Auswaage bestimmt:

I:	0,8 %	II:	6,0 %
III:	2,5 %	IV:	15,5 %
V:	8,4 %	VI:	9,4 %
VII:	2,5 %		

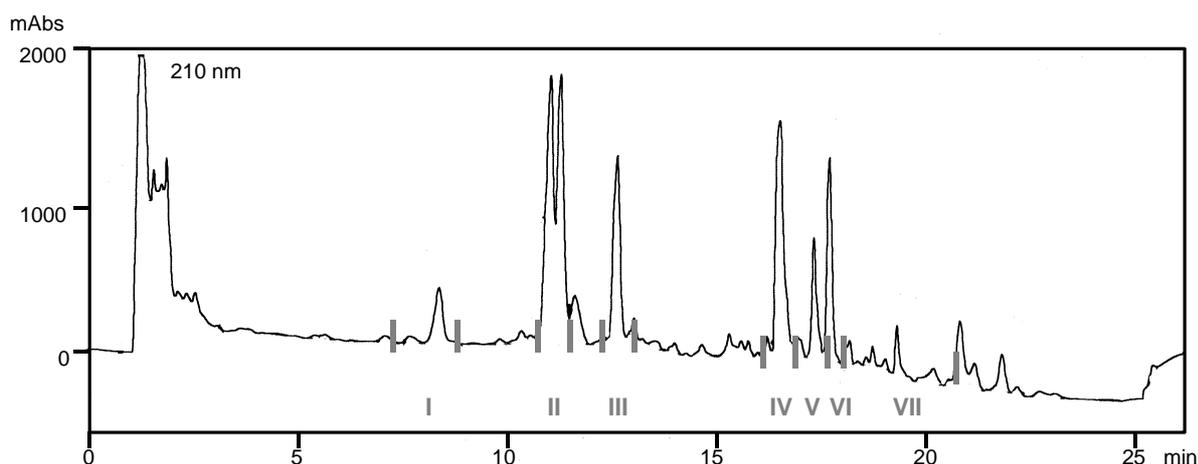


Abb. 2.1: HPLC-Profil des Isopropanol-Ethanol-Extraktes. Die Fraktionen I - VII wurden für Wirksamkeits-Untersuchungen analog des Chromatogramms bei 210 nm isoliert.

2.1.3 NMR-Analysen der unter 2.1.2.2 beschriebenen HPLC-Fraktionen

Die NMR-Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Sinnwell (Chemisches Institut, Universität Hamburg) durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde ein DRX 500 MHz Spektrometer (Bruker) bei 300 K eingesetzt.

Die Fraktionen II und IV, sowie die Referenzen Linolensäure und 13-HOTE wurden hierzu vorher in C₆D₆ (deutertes Benzol) gelöst und in ein 5 mm NMR-Proben-Röhrchen überführt.

2.1.4 Analytische HPLC von den unter 2.1.2.2 beschriebenen HPLC-Fraktionen

Die analytischen HPLC-Untersuchungen wurden an einer Shimadzu-Anlage mit einem Dioden-Array-Detektor gekoppelt durchgeführt.

2.1.4.1 Umkehrphase (RP-HPLC)

Die Auftrennung der isolierten HPLC-Fraktionen aus dem Fertigarzneimittel (2.1.2.2) erfolgte unter Verwendung einer Kromasil C18-Säule (250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße; Macherey-Nagel) mit einer entsprechenden C18-Vorsäule (Macherey-Nagel). Hierzu wurde ein ansteigender Acetonitril-Gradient (60 - 100 %, 0 - 40 min) mit 0,1 % TFA verwendet. Die Flußrate betrug 1 ml / min.

Als externe Referenzstandards wurden Linolen- und Linolsäure (Sigma) sowie die Oxylipine 13-HOTE und 13-HODE (Cayman) eingesetzt. Zur Detektion mehrfach ungesättigter freier Fettsäuren und deren Hydroxy-Derivate wurde die Absorption bei 205 und 235 nm detektiert. Fraktionen und Standard wurden in Methanol durch Sonifizieren gelöst und anschließend über einen 0,2 µm PTFE-Filter (Millipore) filtriert. Die Quantifizierung der Oxylipine und Fettsäuren erfolgte über den Vergleich mit externen Referenzstandards.

2.1.4.2 Normalphase (SP-HPLC)

Die Trennung verschiedener HOTE-Positionsisomere der Fraktion II (2.1.2.2) erfolgte unter Verwendung einer Zorbax Rx-SIL-Säule (250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße; Agilent) unter isokratischen Laufmittelbedingungen: n-Hexan / 2-Propanol / TFA (99 / 1 / 0,1). Die Flußrate betrug 1 ml / min. Zur Detektion der HOTE-Isomere wurde die Absorption bei 235 nm gemessen. Die relative Quantifizierung der HOTE-Positions-Isomere wurde anhand der Integration der Peakflächen durchgeführt, da der Absorptionskoeffizient für die Isomeren übereinstimmt.

2.1.4.3 Chiralphase (CP-HPLC)

Die Enantiomeren-Trennung der HOTE-Positionsisomere (Fraktionen aus analytischer SP-HPLC, 2.1.4.2) mittels CP-HPLC wurde an einer Chiracel OD-H (250 x 4,6 mm, 5 µm Porengröße; Daicel Chemical) unter isokratischen Bedingungen durchgeführt. Das Laufmittel bestand aus n-Hexan / 2-Propanol / TFA (95 / 5 / 0,1). Die Flußrate betrug 0,5 ml / min. Zur Detektion wurde die Absorption gemessen.

Da der Absorptionskoeffizient der Enantiomere identisch ist, wurde die relative Verteilung der optischen Isomere anhand der Peakflächen (Integral) bei 235 nm bestimmt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Isolierung von primären peripheren Blutzellen

2.2.1.1 Isolierung von PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) über Ficoll-Gradient

Die PBMC wurden aus Blutkonserven (*buffy coats*) isoliert. Die Isolierung erfolgte 24 h nach der Entnahme des peripheren Blutes gesunder Blut-Spender (Universitäts-Krankenhaus Hamburg-Eppendorf).

15 ml Ficoll (*Hypaque*, Sigma) wurden in ein konisches 50 ml Röhrchen (Greiner) gefüllt und mit 30 ml einer 1 : 2 mit PBS verdünnten Blutsuspension vorsichtig überschichtet. Die Phasentrennung erfolgte durch 20 min Zentrifugation bei 1000 g. Die Interphase zwischen Plasma und Ficoll wurde mit einer sterilen Pasteur-Pipette isoliert. Sie enthielt die PBMC, eine Mischung der mononukleären Blutzellen (Monocyten, B- und T-Lymphocyten, NK-Zellen). Um eine Verunreinigung durch Thrombocyten zu minimieren wurde die Fraktion durch Zentrifugation (10 min, 250 g) viermal in PBS gewaschen und die Reinheit mikroskopisch kontrolliert.

Die isolierten PBMC wurden in RPMI 1640 Medium (*Bio Whittaker*) supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) (*Life Technologies*) und 1 % Penicillin / Streptomycin (Biochrom) resuspendiert (Ausbeute: ca. 2 - 4 x 10⁸ Zellen).

2.2.1.2 Abreicherung der Monocyten über Adhärenz

Die Monocyten-Depletion erfolgte mittels Kunststoff-Adsorption der Monocyten an die Kulturflasche. Die über Ficoll-Gradient isolierten PBMC wurden in RPMI 1640 (serumfrei) resuspendiert und für 2 h in 225 cm² Kulturflaschen (Greiner) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Anschließend wurden die nicht-adhärenenten Zellen mit dem Kulturmedium heruntergespült und weiterverwendet. Der Rest-Anteil an Monocyten wurde mit Hilfe von Antikörper-Markierung des Monocyten-Markers CD14 und Messung im Durchflußcytometer bestimmt (2.3.2.1). Der Anteil an Monocyten war nach der Depletion < 5 %.

2.2.1.3 Anreicherung der Monocyten über magnetische *Beads*

Die negative Anreicherung von Monocyten aus PBMC erfolgte durch spezifische Entfernung der anderen Zell-Populationen mit Hilfe von Antikörper-gekoppelten magnetischen *Beads* (*Monocyte Negative Isolation Kit*, Dynal).

Für die Isolierung wurden 2 x 10⁸ Zellen (PBMC) eingesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 250 g) gewaschen und in 2 ml Rinderserumalbumin (BSA)-Puffer

(0,1 % BSA in PBS) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl *Blocking Reagent* und 200 µl Antikörper-Mix (Dyna) wurden die Zellen 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden in BSA-Puffer durch Zentrifugation gewaschen und anschließend in 9 ml BSA-Puffer resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurden 1 ml *Magnetbeads* zugegeben und für 30 min bei 4 °C auf einem Rotor inkubiert. Nach vorsichtiger Resuspendierung konnten mit Hilfe eines Magnet-Halters (Dyna) die an die Beads gekoppelten B- und T-Lymphocyten sowie NK-Zellen aus den PBMC entfernt werden.

Die Reinheit der isolierten Monocyten wurde mit Hilfe von Antikörper-Markierung des Monocyten-Markers CD14 und anschließender Messung im Durchflußcytometer bestimmt (2.3.2.1).

2.2.2 Zellkultur-Bedingungen

Alle verwendeten Zelllinien wurden maximal über 20 Passagen verwendet. Danach wurden neue Stammkulturen (in flüssigem Stickstoff gelagert) herangezogen. Die Zelllinien wurden stets in der exponentiellen Wachstumsphase gehalten.

Die Kultivierung aller Zelltypen erfolgte in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit.

Die Zellkulturmedien wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei Bio Whittaker bezogen. Die Endotoxin-Konzentration der Medien wurde vom Hersteller überprüft (< 1 EU / ml). FCS wurde chargenweise bei PAA bezogen (Endotoxin-Konzentration < 1 EU / ml). Jede Charge wurde bezüglich ihrer Wachstum-stimulierenden Eigenschaften für die betreffenden Zellen ausgetestet. Vor Gebrauch wurde das FCS 30 min bei 56 °C Hitze-inaktiviert und anschließend portioniert bei -20 °C gelagert.

2.2.2.1 Primäre Zellen

PBMC:

Über Ficoll-Gradient gereinigte PBMC wurden in RPMI 1640-Medium mit stabilem Glutamin, supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin, kultiviert.

Monocyten:

Aufgereinigte Monocyten (2.2.1.3) wurden in DMEM-Medium supplementiert mit 1 % ITS (Medium-Supplement: Insulin-Transferrin-Natrium-Selenit, Sigma) und 1 % Penicillin / Streptomycin serumfrei kultiviert.

Chondrocyten:

Humane Chondrocyten (PromoCell) wurden in Growth Medium (PromoCell) nach den Herstellerangaben kultiviert und mit Hilfe des *DetachKit* (PromoCell) passagiert.

2.2.2.2 Zelllinien

Jurkat-T-Zellen:

Jurkat-T-Zellen (*acute T cell leukemia*, ATCC) wachsen in Suspensionskultur und zeigen eine lymphoblastoide Morphologie (Weiss *et al.* 1984).

Sie wurden in RPMI 1640-Medium mit stabilem Glutamin, supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin, kultiviert.

MonoMac6:

MonoMac6-Zellen (DSMZ) wurden aus einem Patienten mit monocytärer Leukämie isoliert (Ziegler-Heitbrock *et al.* 1988). Die Zellen zeigen phänotypisch (CD14⁺) und funktionell (Phagozytose, ROI-Bildung) Eigenschaften reifer Monocyten. MonoMac6-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit stabilem Glutamin, supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin, kultiviert.

HT29:

HT29 (ECACC), eine Colon-Adenokarcinom-Zelllinie (Huet *et al.* 1987), wurde in McCoy's-Medium mit stabilem Glutamin (Life Technologies) und 10 % FCS ohne Antibiotika kultiviert.

2.2.3 Bioassays

2.2.3.1 Prinzip

Es wurden *In-vitro*-Testsysteme entwickelt, um den Einfluß von Brennesselblätter-Extrakten und Reinsubstanzen auf verschiedene Parameter einer Entzündungsreaktion zu untersuchen.

Hierzu wurden humane Zellen *in vitro* durch unterschiedliche Faktoren stimuliert, um eine Entzündung zu simulieren. Die Art der Stimulation wurde in Abhängigkeit von der Zelle und dem zu untersuchenden Parameter gewählt.

2.2.3.2 Bioassay mit Monocyten-depletierten PBMC zur Bestimmung von IL-2 / IFN- γ

PBMC, die aus *buffy coats* isoliert werden, zeigen einen erhöhten Anteil an Monocyten gegenüber dem peripheren Vollblut. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, daß sich mit PBMC-Kulturen, die sich durch eine nur schwach stimulierbare IL-2-Expression auszeichneten, nach Monocyten-Depletion (2.2.1.2) eine mit Vollblut-Kulturen vergleichbar hohe IL-2-Expression erzielen ließ (Daten nicht gezeigt). Auch die Probanden-spezifischen Schwankungen bezüglich der stimulierbaren IL-2-Expression wurden durch die Monocyten-Depletion geringer.

Die Monocyten-abgereicherten PBMC wurden in einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen / ml in einer 24-*well*-Platte ausplattiert, mit $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ Phytohämagglutinin (PHA-L, Sigma) stimuliert und gleichzeitig mit unterschiedlichen Konzentrationen des 50 % ethanolischen Brennesselblätter-Extraktes (Fertigarzneimittel) koinkubiert.

Eine Stammlösung des 50 % ethanolischen Extraktes wurde hergestellt, indem der Kapselinhalt direkt in Zellkultur-Medium sonifiziert und anschließend durch einen $0,2 \mu\text{m}$ Cellulose-Acetat-Filter (Schleicher & Schüll) sterilfiltriert wurde.

Nach 48 h wurden die zellfreien Überstände durch Zentrifugation (10 min, 440 g, RT) geerntet und bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Konzentration an sekretierten IL-2- und IFN- γ -Proteinen im Kulturüberstand wurden mittels spezifischer ELISA (2.3.1) bestimmt.

Für die Untersuchung der mRNA-Expression (2.4.1) wurden die Zellen für 12 h (analog den 48 h-Werten) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die RNA-Isolierung durch Zentrifugation (10 min, 180 g, RT) geerntet.

2.2.3.3 Jurkat-Screening-Assay (IL-2-Expression)

Zur Stimulation der IL-2-Expression in Jurkat-T-Zellen wurde $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ PHA-L und $0,8 \text{ ng} / \text{ml}$ PMA (Sigma) eingesetzt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen / ml 24 h in 24-*well*-Platten (Costar) kultiviert und dabei mit den zu testenden Substanzen koinkubiert.

Lipophile Brennesselblätter-Extrakte (2.1.1.2, 2.1.1.3), Extrakt-Fractionen (2.1.2.1, 2.1.2.2) sowie Reinsubstanzen (CyA, Vitamin D₃, HOTE, HODE, Linolen- und Linolsäure) wurden als konzentrierte ethanolische Stammlösungen in Zellkultur-Medium verdünnt, durch Sonifizieren gelöst und anschließend sterilfiltriert. Die maximale Ethanol-Konzentration betrug dabei 0,2 %; Ethanol-Kontrollen wurden stets mitgeführt.

Die zellfreien Überstände wurden nach 24 h durch Zentrifugation (10 min, 440 g, RT) geerntet und bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Konzentration an IL-2 wurde in den Proben mittels eines spezifischen ELISA ermittelt.

2.2.3.4 Interleukin-1 β / Tumor-Nekrose-Faktor- α -Assay (PBMC)

Ficoll-isolierte PBMC wurden in einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen / ml ausplattiert, mit $5 \text{ ng} / \text{ml}$ LPS (Lipopolysaccharid von *S. enteritides*, Sigma) stimuliert und gleichzeitig mit unterschiedlichen Testsubstanzen koinkubiert. Nach 8 h wurden die zellfreien Überstände durch Zentrifugation (10 min, 440 g, RT) geerntet und bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Konzentration an sekretierten IL-1 β - und TNF- α -Proteinen im Kulturüberstand wurden mittels spezifischer ELISA (2.3.1) bestimmt.

2.2.3.5 Gelatinase B-Assay (Monocyten)

Die Gelatinase B (MMP-9)-Expression primärer humaner Monocyten (2.2.1.3) wurde durch 0,1 µg / ml LPS oder 2 µg / ml ConA (Concanavalin A, Sigma) induziert. Hierzu wurden die Monocyten für 48 h serumfrei in einer Zelldichte von 4×10^6 Zellen / ml kultiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt koinkubiert. Die zellfreien Überstände wurden durch Zentrifugation (10 min, 440 g, RT) geerntet und bei -70 °C gelagert. Die Konzentration an MMP-9 wurde in den Proben mittels eines spezifischen ELISA (2.3.1) ermittelt.

2.2.3.6 Collagenase- und Stromelysin-Assay (Chondrocyten)

Die Collagenase-1 (MMP-1)- und Stromelysin-1 (MMP-3)-Expression primärer humaner Chondrocyten (2.2.2.5) wurde durch 100 ng / ml IL-1β (Strathmann Biotech) induziert. Hierzu wurden die Chondrocyten in konfluenter Kultur (24-well-Platte) für 48 h serumfrei kultiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an 13-HOTE koinkubiert. Die Zellkultur-Überstände wurden bei -70 °C gelagert. Die Konzentration an sekretierten MMP-1- und MMP-3-Enzymen im Kulturüberstand wurden mittels spezifischer ELISA (2.3.1) bestimmt.

2.2.4 Vitalitätstests

Um potentielle toxische Effekte der Testsubstanzen in den jeweiligen Assays zu erkennen, wurden alle Zellen in ihren unterschiedlichen Inkubationen parallel in 96-well-Platten kultiviert und kurz vor Ende der normalen Testdauer mit einem Farbstoff (MTT bzw. AllamarBlue) weiter inkubiert.

Das Prinzip beider Testsysteme beruht auf einem fluorimetrischen und / oder colorimetrischen Redox-Indikator, dessen Farbe (bzw. Fluoreszenz) sich in Folge einer chemischen Reduktion, die durch mitochondriale Enzymaktivität in lebenden Zellen vermittelt wird, verändert.

Diese Tests gelten als sensitiver und besser quantifizierbar als Farbstoff-Ausschluß-Tests, mit denen erst eine irreversible Zerstörung der Zellmembran detektiert wird (z.B. Propidium-Jodid- oder Trypan-Blau-Färbung).

2.2.4.1 MTT-Test

Zu jedem 96-well (200 µl Testansatz) wurden 50 µl einer MTT (3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazolium-Bromid, Sigma) - Lösung (2 mg / ml) zugegeben und bei 37 °C inkubiert (Ansatz in Quadruplikaten). Nach weiteren 4 h wurden die 96-well-Platten zentrifugiert, der zellfreie Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl DMSO (Sigma) aufgelöst. Die Vitalität wurde mittels eines ELISA-Readers (SLT) anhand der Absorption bei

570 nm bestimmt, die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Medium- bzw. Stimulationskontrolle berechnet.

2.2.4.2 AllamarBlue-Test

Zu jedem 96-well (200 µl Testansatz) wurden 20 µl der AllamarBlue-Lösung (Biosource) gegeben. Nach 4 h Inkubation (37 °C) wurden entweder die Absorption bei 590 nm in einem ELISA-Reader oder die Fluoreszenz bei 590 nm (Excitation: 530 nm) in einem Fluorimeter (Labsystems) detektiert. Als Null-Kontrolle (*Blank*) diente hierbei ein Inkubationsansatz ohne Zellen. Die Messung erfolgte in Triplikaten (oder Quadruplikaten). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Kontrolle (Medium- bzw. Stimulations-Kontrolle) berechnet.

2.3 Immunologische Methoden

2.3.1 Immunoassays

Es wurden kommerzielle ELISA der Hersteller Biosource (IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ), Amersham-Pharmacia (MMP-1, MMP-3) und R&D (MMP-9) eingesetzt. Die Immunoassays wurden entsprechend den Hersteller-Angaben durchgeführt.

2.3.2 Durchflußcytometrie

2.3.2.1 Meßprinzip

In einem Durchflußcytometer werden Zellsuspensionen mittels hydrodynamischer Focussierung so durch einen Laserstrahl (488 nm, Argon-Laser) geschossen, daß von jeder einzelnen Zelle ein Signal detektiert werden kann. Jede Zelle erzeugt Streulicht, das durch einen *Photomultiplier* verstärkt und in einen elektrischen Impuls umgewandelt wird. Hierbei ist das Vorwärts-Streulicht (*forward scatter, FSC*) proportional zur Größe einer Zelle und das Seitwärts-Streulicht (*sideward scatter, SSC*) ein Maß für die Granularität der Zelloberfläche. Zusätzlich kann jede Zelle mit unterschiedlichen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert werden, die gegen bestimmte Proteine auf der Zelloberfläche gerichtet sind. Der Einsatz von bis zu vier Fluorochromen (z.B. FITC, PE, ECD, PeCy5 für Coulter Epics-XL) ist durch den Einsatz von Bandfiltern möglich, die die jeweils anderen Wellenlängen "abschotten". Jedes Fluoreszenzsignal wird über einen eigene *Photomultiplier* verarbeitet. So kann anhand der Fluoreszenz nicht nur die Anzahl der Zellen bestimmt werden, die ein bestimmtes Protein auf der Oberfläche exprimieren, sondern über die mittlere Fluoreszenz-Intensität (*mean fluorescence intensity*) auch eine Aussage über die Expressionsstärke auf der einzelnen Zelle gemacht werden. In parallelen Proben mit unspezifischen Fluorochrom-

gekoppelten Antikörpern des gleichen Isotyps wird die unspezifische Bindung detektiert und die Fluoreszenz automatisch kompensiert.

2.3.2.2 Nachweis der Reinheit isolierter Monocyten und Monocyten-depletierter PBMC

Monocyten-depletierte PBMC (2.2.1.2) und gereinigte Monocyten (2.2.1.3) wurden in parallelen Ansätzen entweder mit PE-konjugiertem anti-CD14-Antikörper (Coulter) oder mit dem entsprechenden PE-konjugierten Isotyp (IgG1-PE, Coulter) markiert. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen in $100 \mu\text{l}$ 0,1 % BSA (in PBS) resuspendiert und in einem Kunststoff-Röhrchen (Sarstedt) mit $20 \mu\text{l}$ Antikörper-Lösung für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden jeweils $500 \mu\text{l}$ PBS zu den Proben gegeben, diese durchmischt und im Durchflußcytometer vermessen. *Abb. 2.2* zeigt beispielhaft die Anreicherung von Monocyten aus PBMC eines Probanden.

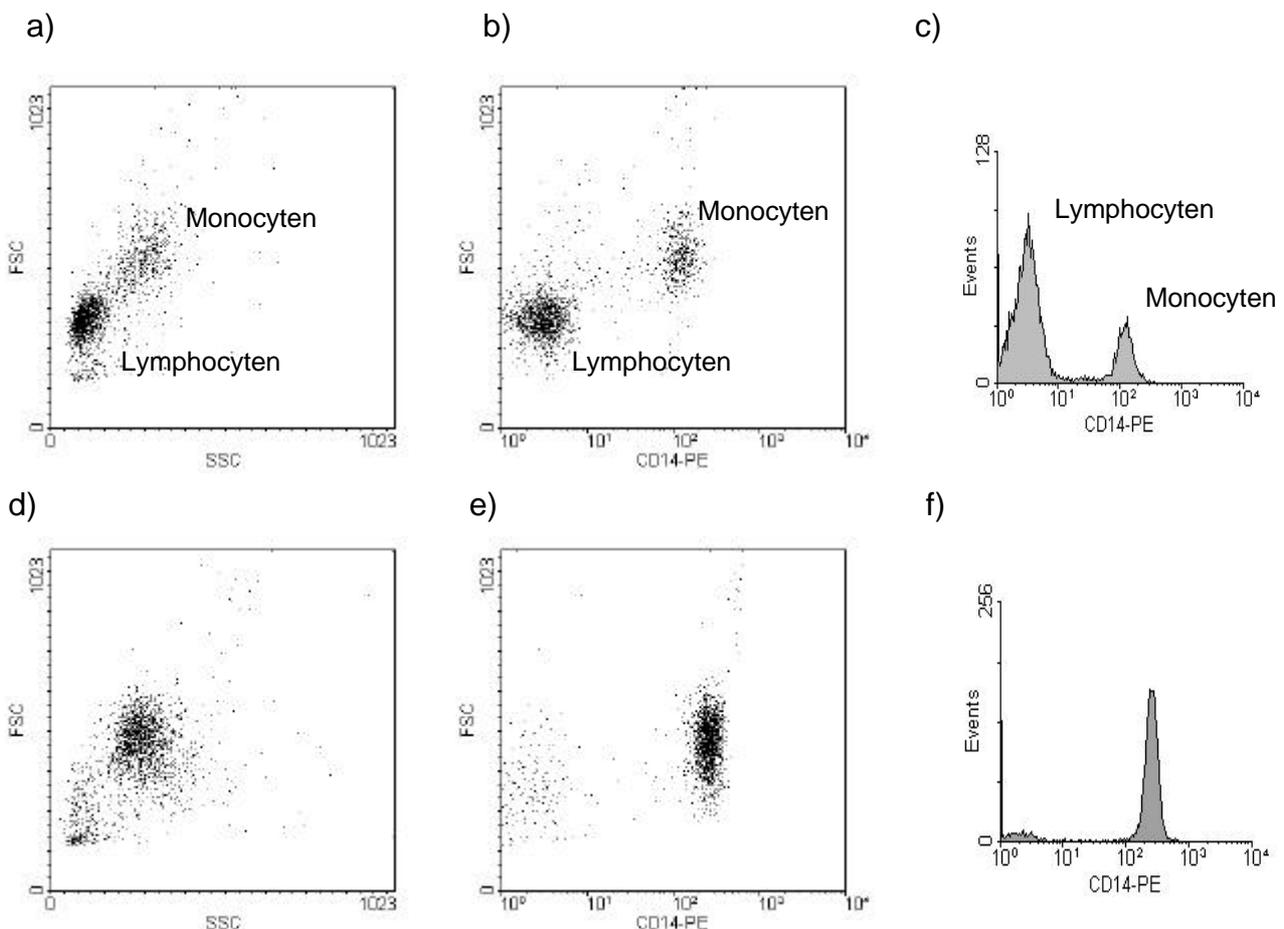


Abb. 2.2: Durchflußcytometer-Histogramme (Epics-XL, Coulter): a) – c) PBMC, d) – e) aufgereinigte Monocyten eines Probanden. Die Histogramme a) und d) zeigen die Zellen nach FSC und SSC aufgetrennt. Eine bessere Unterscheidung von Monocyten und Lymphocyten ist in b) und e) zu erkennen (Auftrennung nach FSC und Fluoreszenz). Anhand der eindimensionalen Darstellung (Histogramme c) und f)) wurden (nach Kompensation der Isotypkontrolle) die Monocyten-Anteile als 20 % (PBMC) und 85 % (gereinigte Monocyten) bestimmt.

2.3.2.3 CD36-Fluoreszenz-Markierung von MonoMac6-Zellen

Die MonoMac6-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen / ml 28 h bzw. 44 h kultiviert und dabei mit den zu testenden Substanzen koinkubiert.

Der Isopropanol-Extrakt sowie die Reinsubstanzen (15-d-PGJ₂, Ciglitazon, Wy14643, 13-HOTE, 13-HODE und 9-cis-RA [Cayman] sowie Linolen- und Linolsäure [Sigma]) wurden als konzentrierte ethanolische Stammlösungen in Zellkultur-Medium verdünnt, durch Sonifizieren gelöst und anschließend sterilfiltriert. (Die maximale Ethanol-Konzentration betrug dabei 0,2 %; Ethanol-Kontrollen wurden mitgeführt).

Nach der Inkubation wurden parallele Ansätze entweder mit anti-CD36-FITC Antikörper (Coulter) oder mit den entsprechend konjugierten Isotyp (IgG1-FITC, Coulter) markiert.

Hierfür wurden die Proben zentrifugiert (4 min, 250 g), das Zell-Pellet in 100 µl 0,1 % BSA (in PBS) resuspendiert und in einem Kunststoff-Röhrchen (Sarstedt) mit 20 µl der entsprechenden Antikörper für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 500 µl PBS hinzugeben, die Proben durchmischt und im Durchflußcytometer gemessen.

2.4 Proteinbiochemische und molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA und RT-PCR

Gesamt-RNA aus inkubierten PBMC (1×10^6 Zellen) wurde durch eine Guanidin-Isothiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode (Chomczynski *et al.*, 1987) mit 1 ml TRIzol (Gibco) extrahiert.

Die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA wurde mit 200 U SuperScript-II Reverse Transkriptase (Gibco), 500 ng oligo(dT)-Primern und 500 µM dNTP (Pharmacia) in einem Volumen von 40 µl durchgeführt (37 °C).

Für die RT-PCR wurde 1 µl cDNA, 2,5 U *Taq*-Polymerase (Pharmacia), 25 pmol der spezifischen Primer-Paare und 200 µM dNTP eingesetzt (100 µl Reaktions-Volumen).

Primer-Sequenzen:

Sense:

β-Aktin 5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3'

IL-2 5'-GAA TGG AAT TAA TAA TTA CAA GAA TCC C-3'

IFN-γ 5'-ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT TT-3'

Antisense:

β-Aktin 5'-CTA GAA GCA TTG CGG TGG ACG ATG GAG CG-3'

IL-2 5'-TGT TTC AGA TCC CTT TAG TTC CAG-3'

IFN-γ 5'-GAT GCT CTT CGA CCT CGA CCT CGA AAC AGC AT-3'

Um Kontamination mit genomischer DNA zu kontrollieren, flankierte jedes Primer-Paar eine intronische Sequenz, Amplifikate mit Introns wurden jedoch nie detektiert.

Für Aktin wurden 30 Zyklen für die cDNA-Amplifizierung gefahren (1 min 95 °C, 1 min 65 °C, 1 min 72 °C), für IL-2 und IFN- γ 35 Zyklen (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 1 min 72 °C).

2.4.2 Gelelektrophorese

2.4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die RT-PCR-Produkte wurden in einem 2 % Agarose-Gel in Gegenwart von Ethidium-Bromid (Gibco) elektrophoretisch gemeinsam mit einem Molekulargewichts-Marker (*100 bp Ladder*, Gibco) aufgetrennt und unter UV-Licht photographiert.

Amplifizierte PCR-Produkte wurden zur Identifizierung sequenziert.

2.4.2.2 Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

5x TBE-Puffer: 54 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure, 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0)
→ ad 1 l Bidest (Chemikalien von Roth)

4 % - Gele wurden hergestellt, indem 10,5 ml Polyacrylamid-Mix (Rotiphorese 30, Roth), 56,5 ml Bidest, 7,5 ml 5x TBE-Puffer, 0,5 ml 1 % APS-Lösung (Sigma) und 75 μ l TEMED (Sigma) gemischt und zwischen zwei Glasplatten (Ohrenplatte und normale Glasplatte) gegossen wurden.

Die EMSA-Proben (2.4.7) wurden ca. 2 h bei einer Spannung von 190 V aufgetrennt (Laufpuffer: 0,5x TBE-Puffer).

2.4.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Totex-Lyse-Puffer: 20 mM HEPES (pH 7,5) mit 400 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 20 % Glycerol, 1 % Nonidet P40, 5 mM DTT, 3 μ g / ml Leupeptin, 3 μ g / ml Aprotinin und 2 mM PMSF
(DTT und Proteinase-Inhibitoren wurden kurz vor Gebrauch zugesetzt;
alle Chemikalien von Sigma)

2,5 x 10⁶ Zellen wurden in 2,5 ml Volumen in 6-well-Platten kultiviert, mit unterschiedlichen Konzentrationen an isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt oder den Reinsubstanzen für 2 h bzw. 24 h inkubiert. Anschließend wurden die PBMC entweder mit 100 ng / ml LPS (von *S. enteritides*, Sigma), 5 μ g / ml PHA + 0,8 ng / ml PMA (Sigma) oder 100 ng / ml

TNF- α (Strathmann Biotech) und die Jurkat-T-Zellen mit 50 ng / ml PMA + 2 μ M Ionomycin (Sigma) für weitere 2 h stimuliert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen aus den *wells* herausgespült, und per Zentrifugation (4 min, 300 g, 4 °C) 1 x in eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 60 μ l Totex-Lyse-Puffer resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und dabei immer wieder gemischt. Anschließend wurden die Proben 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand (Gesamtzellextrakt) bei -80 °C gelagert.

(Da bei dieser Methode die Zellen quantitativ lysierten, wurden die Gesamtzellextrakte nicht auf gleiche Proteinmengen, sondern auf gleiche Ausgangs-Zellzahl eingestellt).

2.4.4 Herstellung von Kernextrakten

Puffer A (*low salt buffer*): 10 mM HEPES (pH 7,9) mit 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 μ g / ml Pepstatin A, 10 μ g / ml Aprotinin, 10 μ g / ml Leupeptin, 0,1 mM PMSF
(nach Avots)
(DTT und Proteinase-Inhibitoren wurden kurz vor Gebrauch zugesetzt; alle Chemikalien von Sigma)

Puffer B (*high salt buffer*): 20 mM HEPES (pH 7,9) mit 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 μ g / ml Pepstatin A, 10 μ g / ml Aprotinin, 10 μ g / ml Leupeptin, 0,1 mM PMSF
(nach Avots)
(DTT und Proteinase-Inhibitoren wurden kurz vor Gebrauch zugesetzt; alle Chemikalien von Sigma)

1 x 10⁷ Suspensions-Zellen (MonoMac6) wurden in 10 ml Volumen in Petrischalen (Falcon) mit unterschiedlichen Substanzen 24 h (bzw. 48 h und 72 h) inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen aus den Petrischalen herausgespült, durch Zentrifugation (5 min, 250 g) geerntet und in eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 800 μ l Puffer A resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert.

Die angeschwollenen Zellen wurden durch zehnmaliges Aufziehen mit einer 1 ml-Spritze durch eine abgestumpfte 21 G-Kanüle lysiert und anschließend 2 min bei 7000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Das Pellet (Kerne) wurde in 60 μ l Puffer B resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und dabei immer wieder durchmischt. Die Proben wurden 20 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand (Kernextrakte) bei -80 °C gelagert.

Adhärente Zellen (HT29) wurden in gleicher Zelldichte auf Petrischalen ausplattiert und wuchsen üNa zu konfluenten (*Monolayer*-) Kulturen an. Anschließend wurden die Zellen

(analog den Suspensionszellen) 24 h mit unterschiedlichen Substanzen inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Waschen der Kulturen mit PBS und 20 min Inkubation mit *non-enzymatic cell dissociation solution* (Sigma). Die Zellen wurden von den Petrischalen heruntergespült und analog den Suspensionszellen weiterbehandelt.

Die Kernextrakte wurden auf gleiche Proteinkonzentration eingestellt (2.4.5).

2.4.5 Protein-Konzentrations-Bestimmung

Ein Aliquot der Kernextrakte (2.4.4) wurde entsprechend den Hersteller-Angaben mit Bradford-Reagenz (BioRad) gemischt und die Absorption der Reaktionslösung bei 595 nm in einem Spektralphotometer bestimmt. Die Meßwerte wurden mit den Werten einer Standardkurve aus parallel gemessenen BSA-Proteinstandards korreliert und die Protein-Konzentrationen der Proben daraus ermittelt.

2.4.6 Radioaktive Markierung der EMSA-Oligonukleotide

Klenow-Puffer: 0,5 M Tris/HCl (pH 7,6) mit 0,1 M MgCl₂ und 0,1 M NaCl

dsOligonukleotide: NF-κB (Promega)
PPAR-I (PPAR-Konsensus-PPRE, Geneka)

ssOligonukleotide:

PPAR-II : 5'-GAG GCC TAG GAC AAA GGT CAT GAT ATC GCT AG-3' (*sense*)

PPAR-III: 5'-CAT TCT AGG TCA AAG GTC ATC CCC T-3' (*sense*)

(ssOligonukleotide, *sense* und komplementäres *antisense* Oligonukleotid, wurden von MWG synthetisiert)

Annealing-Ansatz: 50 µg ssOligonukleotid (5')
50 µg ssOligonukleotid (3')
100 µl Klenow-Puffer
→ ad 1 ml Bidest

Reaktions-Ansatz: 15,5 µl Bidest

6,0 µl 5x Exchange Reaction Buffer (Gibco)

1,5 µl dsOligonukleotid

5,0 µl (γ -³²P)-ATP (Amersham)

2,0 µl T4-Polynucleotid Kinase (10 U / ml, Gibco)

STE-Puffer: 10 mM Tris (pH 8,0) mit 1 mM EDTA und 100 mM NaCl

Einzelstrang (ss) -Oligonukleotide wurden vor der Markierung hybridisiert (*annealed*). Hierzu wurde der *Annealing*-Ansatz 5 min in einem Heizblock bei 95 °C erhitzt und anschließend bei RT langsam abgekühlt.

Alle Doppelstrang (ds) -Oligonukleotide wurden vor der radioaktiven Markierung auf eine Konzentration von 1,75 pmol / µl eingestellt. Für die Markierung wurde der Reaktions-Ansatz 30 min bei 37 °C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch (30 µl) mit 60 µl STE-Puffer verdünnt und über eine MicroSpin G25 (Amersham-Pharmacia) entsprechend den Hersteller-Angaben aufgereinigt.

2.4.7 *Electro-Mobility Shift Assay (EMSA)*

Mittels EMSA kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren (TF) an spezifische DNA-Sequenzen (*responsive elements*) aus den Promotoren ihrer Zielgene untersucht werden. Dabei können je nach Fragestellung entweder rekombinante Proteine (TFs) oder Zell- bzw. Kernextrakte analysiert werden.

Das als spezifische DNA-Sequenz eingesetzte dsOligonukleotid ist radioaktiv markiert, so daß die sich ausbildenden TF-DNA-Komplexe autoradiographisch detektiert werden können. Als Nachweis für eine spezifische Bindung von TFs an die DNA dient die Kompetition des markierten Oligonukleotids durch ein unmarkiertes Oligonukleotid (im Überschuß). Um die Identität von TF-DNA-Komplexen zu belegen wird den Proben ein anti-TF-spezifischer Antikörper zugegeben. TF-spezifische DNA-Komplexe werden dadurch im EMSA-Gel retardiert (*Band-Shift*).

5x Bindungspuffer: 20 mM HEPES (pH7,5) mit 50 mM KCL, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM DTT und 20 % Ficoll 400 mit etwas Bromphenolblau angefärbt (Chemikalien von Roth bzw. Sigma)

*Bindungsmix: * µl Bidest*

(nach Rao) 4 µl 5x Bindungspuffer
 2 µl Poly[dl-dC]-Lösung (1 µg/ml, Roche)
 2 µl BSA-Lösung (1 mg/ml in Bidest; Fraktion V, Sigma)
 ** µl markierte Oligonukleotide (2.4.6.1)

→ ergibt 16 µl Reaktionsvolumen pro Probe

* die Menge an Bidest war abhängig vom eingesetzten Oligonukleotid

** die Menge an Oligonukleotid war abhängig von der radioaktiven Markierung (es wurden 75000-100000 cpm eingesetzt)

Antikörper: NF-κB: anti-p50, anti-p65, anti-RelB, anti-cRel
 (Santa-Cruz) PPARγ: anti-PPARγ (*mouse / goat*)

Die Kern- bzw. Gesamtzellextrakte wurden auf Eis aufgetaut. Zu je 4 µl wurden 16 µl des radioaktiven Bindungsmix zugegeben (Mischen durch Triturieren, kurz anzentrifugiert) und 15 min bei RT inkubiert. In parallelen Ansätzen wurden zusätzlich 2 µl Antikörper-Lösung (*Shift*) oder unmarkiertes dsOligonukleotid im zehnfachen Überschuß (Kompetition) zugegeben.

Die Ansätze wurden über nicht-denaturierende PAGE (2.4.2.2) analysiert.

2.4.8 Entwicklung der EMSA-Röntgenfilme

Die EMSA-Gele (2.4.3.2) wurden mit *Whatman*-Papier von den Glasplatten abgenommen und mit Frischhaltefolie (*Seran*) abgedeckt. Anschließend wurden die Gele für ca. 1,5 h bei 80 °C Vakuum-getrocknet.

Die trockenen Gele wurden in eine Film-Kassette (Hypercassette, Amersham) mit *HE Intensifying Screen* (Kodak) geklebt, mit einem Röntgenfilm (BioMax MR, Kodak) bedeckt und dieser bei -80 °C für 2-3 h oder ³²P exponiert.

Für die Entwicklung der Filme wurde die Kassette zunächst auf RT erwärmt. Die Röntgenfilme wurden in einer Entwicklermaschine bei 34,7 °C entwickelt.

3 Ergebnisse

In Ergänzung zu allen nachfolgend dargestellten *In-vitro*-Untersuchungen wurden begleitende Vitalitätstests durchgeführt (MTT- oder AlamarBlue-Test), um potentielle toxische Effekte der Testsubstanzen zu erkennen. Die Ergebnisse dieser Vitalitätstests sind im Tabellenanhang (6) dargestellt.

3.1 *In-vitro*-Hemmung der T-zellulären Cytokin-Expression durch Brennesselblätter-Extrakt (Fertigarzneimittel) in primären PBMC und Jurkat-T-Zellen

3.1.1 Hemmung der Expression von T_H1 -Cytokinen in primären PBMC

Die Stimulation von (Monocyten-depletierten) PBMC mit PHA resultierte *in vitro* in einer Induktion der T-zellulären IL-2-Expression und anschließender Sekretion des Cytokins in das Zellkulturmedium. Durch Koinkubation der Zellen mit einem 50 % ethanolschen Brennesselblätter-Extrakt (Fertigarzneimittel) konnte eine dosisabhängige Abnahme der PHA-stimulierten IL-2-Produktion um bis zu $50 \pm 32 \%$ ($n = 10$) bei der höchsten Extrakt-Konzentration ($400 \mu\text{g} / \text{ml}$) erreicht werden (Abb. 3.1). Die PBMC-Kulturen verschiedener Probanden zeigten eine starke individuelle Variabilität bezüglich der PHA-induzierbaren IL-2-Produktion. Dennoch war der hemmende Effekt im Mittel (bereits ab einer Extrakt-Konzentration von $12,5 \mu\text{g} / \text{ml}$) signifikant gegenüber der PHA-Kontrolle nachzuweisen ($p < 0,01$).

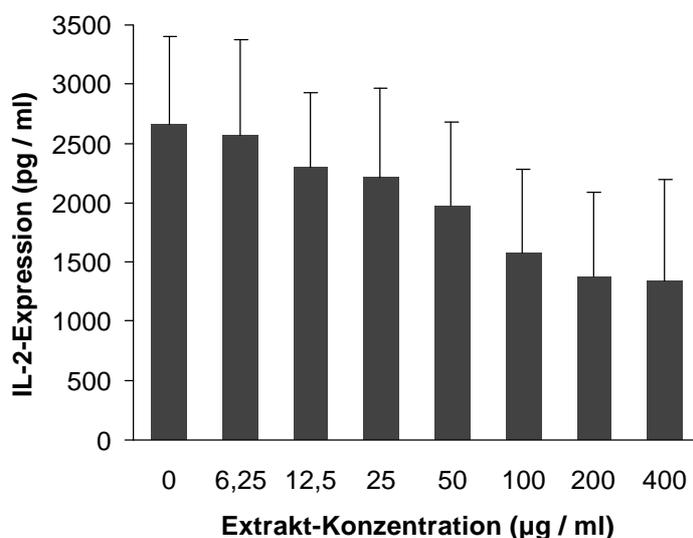


Abb. 3.1: Inhibitorische Wirkung eines 50 % ethanolschen Brennesselblätter-Extraktes (Fertigarzneimittel) auf die PHA-stimulierte IL-2-Expression von humanen PBMC ($n = 10$) nach 48 h Inkubation.

Die Konzentration von IL-2 wurde im zellfreien Überstand mittels eines spezifischen ELISA jeweils in Duplikaten bestimmt. (Daten: Mittelwert + SD).

Auch die Produktion von IFN- γ , des zweiten T_H1-spezifischen Cytokins, wurde durch Inkubation der PBMC mit PHA induziert. Durch Koinkubation mit Brennnesselblätter-Extrakt nahm die induzierbare IFN- γ -Produktion dosisabhängig um bis zu $77 \pm 14 \%$ ($n = 10$) ab (Abb. 3.2). Ohne Stimulation mit PHA war keine IL-2- oder IFN- γ -Expression der PBMC meßbar (Daten nicht gezeigt).

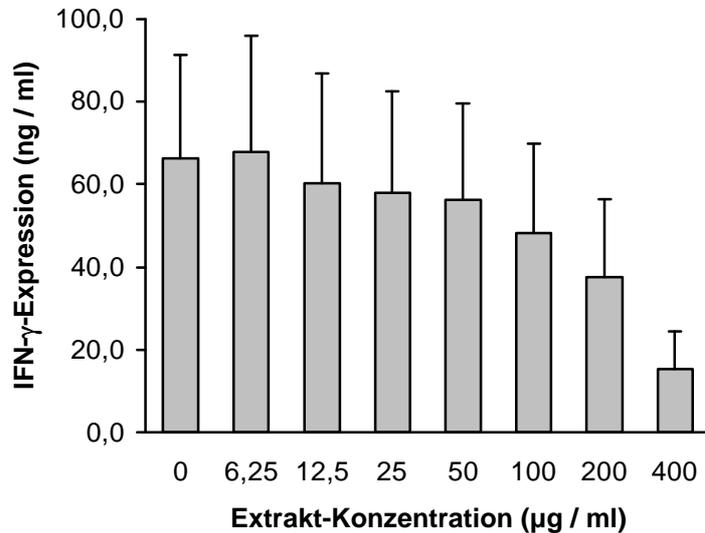


Abb. 3.2: Inhibitorische Wirkung eines 50 % ethanolischen Brennnesselblätter-Extraktes (Fertigarzneimittel) auf die PHA-stimulierte IFN- γ -Expression von humanen PBMC ($n = 10$) nach 48 h Inkubation. Die Konzentration von IFN- γ wurde im zellfreien Überstand mittels eines spezifischen ELISA jeweils in Duplikaten bestimmt. (Daten: Mittelwert + SD).

Die inhibitorische Wirkung des 50 % ethanolischen Extraktes (Fertigarzneimittel) auf die Expression von T_H1-Cytokinen konnten auch auf Transkriptionsebene mittels RT-PCR gezeigt werden (Abb. 3.3). Während die Menge an Aktin-mRNA-Transkripten nicht durch Inkubation der Zellen mit Extrakt beeinträchtigt wurde, sank die IL-2- und IFN- γ -mRNA-Expression dosisabhängig in Anwesenheit von Extrakt im Vergleich zur Stimulationskontrolle.

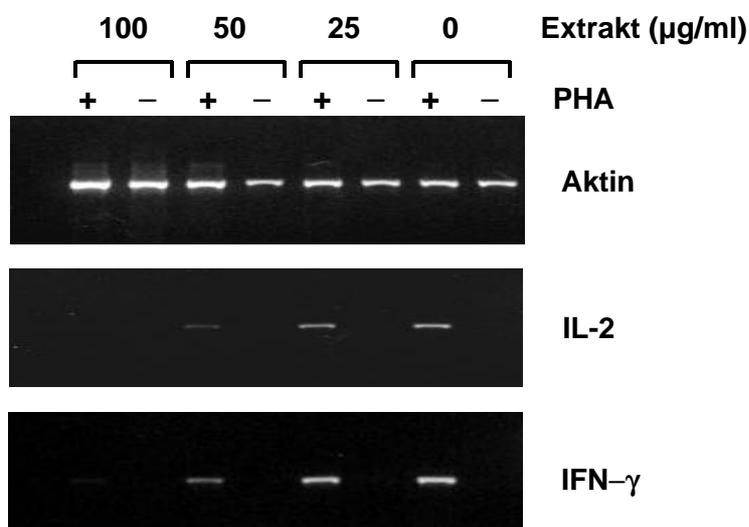


Abb. 3.3: Inhibitorische Wirkung des 50 % ethanolischen Extraktes (Fertigarzneimittel) auf die PHA-stimulierte IL-2- und IFN- γ -mRNA-Expression von humanen PBMC nach 12 h Inkubation (repräsentatives Ergebnis). IL-2- und IFN- γ -spezifische mRNA-Transkripte wurden unter Einfluß von Extrakt nur reduziert gebildet, wohingegen die Menge an Aktin-mRNA-Transkripten unbeeinflusst blieb. Parallel inkubierte unstimulierte Kontrollen (-) zeigten keine sichtbare IL-2- oder IFN- γ -mRNA-Amplifikation.

In parallel inkubierten Medium-Kontrollen mit und ohne Extrakt konnte keine sichtbare Amplifikation von IL-2- oder IFN γ -mRNA nachgewiesen werden. (MTT-Test: *Tabelle 6.1*).

Da es sich bei dem eingesetzten Extrakt um ein Fertigarzneimittel handelt, das aus galenischen Gründen Hilfsstoffe (Magnesium-Stearat, hochdispersives Siliciumdioxid und Calciumhydrogenphosphat) enthält, wurde ebenfalls ein putativer Einfluß dieser Stoffe auf PBMC geprüft. Es wurde jedoch kein Einfluß auf die PHA-stimulierte Cytokin-Expression beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Der wirksame Konzentrationsbereich des 50 % ethanolischen Extraktes, in Bezug auf die Inhibition der Expression der T_H1-Cytokine IL-2 und IFN- γ , lag zwischen 12,5 und 400 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Im Vergleich dazu konnten inhibierende Effekte dieses Extraktes auf die monocytäre Cytokin-Expression an humanem Vollblut erst bei zehnfach höherer Konzentration gezeigt werden (Obertreis *et al.*, 1996a). Die Hemmung der stimulierbaren Expression von T_H1-Cytokinen bot sich damit als empfindliches Target für ein Screening nach antiinflammatorischen Inhaltsstoffen in Brennesselblättern an.

3.1.2 Hemmung der Expression von IL-2 in Jurkat-T-Zellen

Ein Ziel der Arbeit war, ein sensitives reproduzierbares *In-vitro*-Testsystem (*Screening-Assay*) zu entwickeln, um antiinflammatorische Inhaltsstoffe aus Brennesselblätter-Extrakten zu identifizieren.

Aufgrund der beobachteten starken individuellen Schwankungsbreite der Cytokin-Expression humaner PBMC-Kulturen und der dadurch bedingten fehlenden Reproduzierbarkeit, war das Testsystem mit primären Zellen hierfür jedoch ungeeignet.

Zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation des IL-2-Gens wird häufig die humane T-Zelllinie Jurkat (*acute T cell leukemia*) eingesetzt (Weiss *et al.* 1984). Daher sollte hier geprüft werden, ob diese Zelllinie für einen *Screening-Assay* geeignet war.

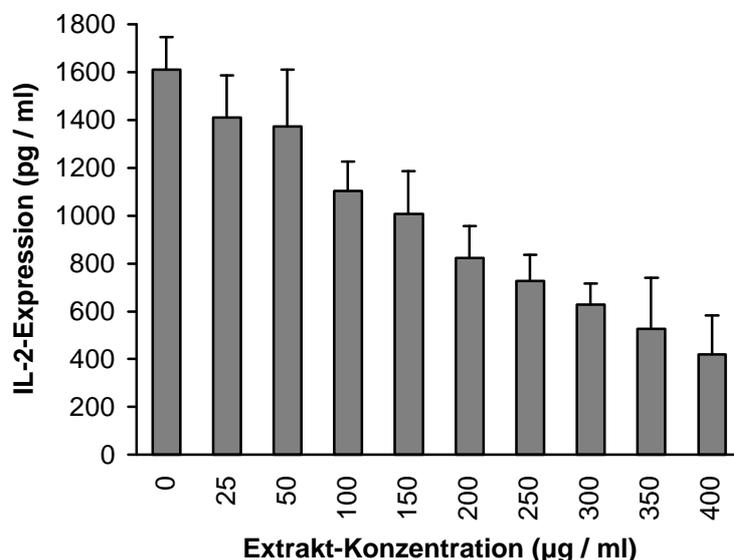


Abb. 3.4: Inhibitorische Wirkung des 50 % ethanolischen Brennesselblätter-Extraktes (Fertigarzneimittel) auf die PHA / PMA-stimulierte IL-2-Expression von Jurkat-T-Zellen nach 20 h Inkubation ($n = 8$). Für die Stimulation wurden 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ PHA und 0,8 ng / ml PMA eingesetzt.

Die Konzentration an IL-2 im Kulturüberstand wurde durch einen spezifischen ELISA ermittelt. (Daten: Mittelwert + SD; Korrelation: $R > 0,9$).

3.2.1 Screening nach wirksamen Extrakt-Fractionen durch den Jurkat-Assay

Die im Anschluß beschriebenen *Screening*-Untersuchungen wurden mit dem Jurkat-Testsystem (3.1.2) durchgeführt. Aufgrund der relativ guten Korrelation zwischen Dosis und Wirkung wurden die Untersuchungen in Duplikaten durchgeführt und wichtige Ergebnisse durch einen unabhängigen Versuchsansatz bestätigt. Die Expression von IL-2 wurde in Prozent umgerechnet, um die einzelnen Versuchsansätze miteinander vergleichen zu können (PHA / PMA-Stimulationskontrolle: 100 %). Als interne Kontrolle für die Integrität des Assays wurde in jedem Versuchsansatz der 50 % ethanolische Extrakt mitgetestet (Daten wurden hier nicht aufgeführt).

Das dargestellte Schaubild (*Abb. 3.5*) soll einen Überblick über die wichtigsten Extraktionen und Fraktionierungen im Rahmen dieser Arbeit geben.

3.2.1.1 Screening unterschiedlich polarer Extrakte aus frischen Brennesselblättern durch den Jurkat-Assay

Handelsübliche Wirkstoffe (Brennesselblätter-Extrakte) für Fertigarzneimittel werden durch 50 % ethanolischen oder wässrigen Auszug aus getrockneten Brennesselblättern (Droge) hergestellt. Um zu testen, welches Lösungsmittel die antiinflammatorischen Wirkstoffe aus Brennesselblättern am besten herauszulösen vermag, wurden frische Brennesselblätter mit drei verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Aufgrund der Polarität der Lösungsmittel wurden unterschiedliche Inhaltsstoffe aus den Blättern gelöst, dies war rein optisch durch die Färbung (Wasser: braun, 50 % Ethanol: gelblich-grün, 2-Propanol: dunkelgrün) der gewonnenen Extrakte erkennbar.

Die Wirkung der Extrakte im Jurkat-Assay ist vergleichend in *Tabelle 3.1* dargestellt. Der isopropanolische Extrakt zeigte eine deutliche dosisabhängige Hemmung der induzierten IL-2-Expression. Die Wirkung des 50 % ethanolischen Extraktes war schwächer, der wässrige Extrakt zeigt keine Wirkung.

Tabelle 3.1: Wirkung unterschiedlich polarer Extrakte aus frischen Brennesselblättern auf die PHA/PMA-induzierte IL-2-Expression von Jurkat-T-Zellen. Die Expression wurde im zellfreien Überstand über einen spezifischen ELISA bestimmt (Daten: Mittelwerte aus Duplikaten, repräsentatives Experiment).

Extrakt-Konzentration (µg / ml)	IL-2-Expression (%) unter Einfluß von		
	wässrigem Auszug	50 % ethanolischem Auszug	2-propanolischem Auszug
0	100	100	100
25	106	105	94
50	109	102	96
100	105	92	81
200	104	69	54
400	98	72	27

Der 50 % ethanolische Extrakt aus frischen Blättern hatte im Vergleich zu dem Fertigarzneimittel (50 % ethanolischer Extrakt aus Blattdroge) (Abb. 3.4) einen geringeren Einfluß auf die stimulierte IL-2-Expression. Dies kann auf den hohen Wasseranteil frischer Blätter zurückgeführt werden, der die Polarität des Auszugsmittels erhöht.

(AllamarBlue-Test: Tabelle 6.3).

3.2.1.2 Screening unterschiedlich polarer Extrakte aus Blattdroge durch den Jurkat-Assay

3.2.1.2.1 HPLC-Fractionen des 50 % ethanolischen Brennesselblätter-Extraktes

Die Untersuchungen an Extrakten aus frischen Brennesselblättern ergaben, daß die Polarität des Auszugsmittels einen Einfluß auf die IL-2-supprimierende Wirkung der Extrakte hat. Ferner deutete sich an, daß lipophilere Lösungsmittel (z.B. Isopropanol) effektiver als wässrige oder wässrig / ethanolische Auszugsmittel in Bezug auf die Wirkstoff-Anreicherung aus Blättern sind.

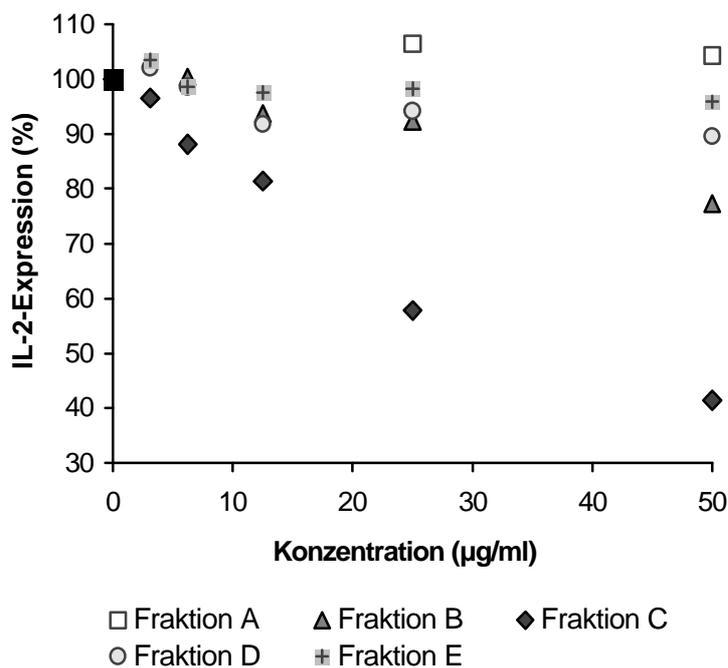


Abb. 3.6: Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehung unterschiedlich polarer Fraktionen aus dem 50 % ethanolischen Extrakt (Fertigarzneimittel) im Jurkat-Assay.

Für die Stimulation wurden 5 µg / ml PHA und 0,8 ng / ml PMA eingesetzt.

Die Proben wurden für 20 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Fraktionen koinkubiert.

Die IL-2-Konzentration wurde im Kulturüberstand durch einen spezifischen ELISA ermittelt und relativ zur Stimulationskontrolle dargestellt. (Daten: Mittelwert aus Duplikaten).

Durch präparative RP-HPLC wurden fünf zunehmend unpolarer werdende Fraktionen (A - E) des 50 % ethanolischen Extraktes (Fertigarzneimittel) über einen breiten Polaritätsbereich isoliert. Von diesen zeigt die "semi-lipophile" Fraktion C, die in etwa der Polarität von Isopropanol entspricht, die größte Wirkstärke im Jurkat-Screening-Assay (Abb. 3.6). Auch die Fraktion B zeigte bei einer Konzentration von 50 µg / ml eine leichte Hemmung der induzierten IL-2-Expression (um bis zu 23 %), bei 100 µg / ml traten jedoch bereits toxische

Effekte auf. Bei allen anderen dargestellten Konzentrationen der Fraktionen war kein Einfluß auf die zelluläre Vitalität im AllamarBlue-Test zu beobachten (Tabellenanhang, *Tabelle 6.4*). Die unpolaren Fraktionen D und E, die z.B. Phytosterole und Blattfarbstoffe enthielten, zeigten keinen Effekt auf die induzierte IL-2-Expression. Phenol-Carbonsäuren wie z.B. Kaffeoyl-Äpfelsäure waren in Fraktion A enthalten.

3.2.1.2.2 Isopropanolischer Auszug des 50 % ethanolischen Brennesselblätter-Extraktes

Um zu bestätigen, daß eine "semi-lipophile" Extraktion mit der antiinflammatorischen Wirkung von Extrakten korreliert, wurde ein isopropanolischer Auszug aus dem 50 % ethanolischen Extrakt (Fertigarzneimittel) hergestellt (Ethanol-Isopropanol-Extrakt) und dessen Wirkung im Jurkat-Assay überprüft.

Es konnte gezeigt werden, daß der isopropanolische Auszug mit einer Dosis-Reduktion im Jurkat-Assay einhergeht (*Abb. 3.7*). Der Wert für die halbmaximale Hemmung (IC_{50}) verschob sich von ca. 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (50 % ethanolischer Extrakt) auf ca. 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Ethanol-Isopropanol-Extrakt). Dieser Versuch belegt, daß die wirksamen Inhaltsstoffe in der Isopropanol-Fraktion angereichert werden.

(AllamarBlue-Test: *Tabelle 6.5*).

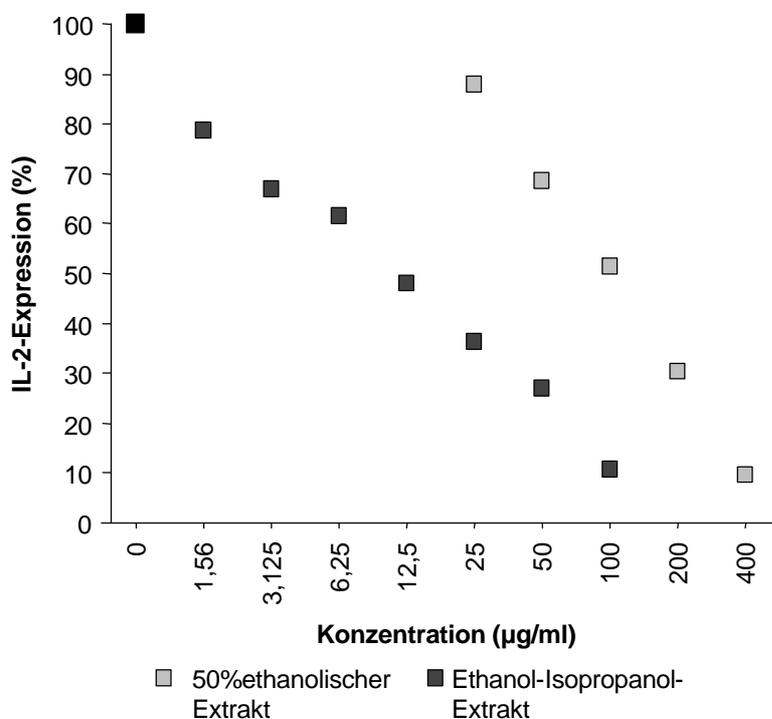


Abb. 3.7: Anreicherung der wirksamen Inhaltsstoffe aus 50 % ethanolischem Extrakt (Fertigarzneimittel) durch isopropanolischen Auszug (Jurkat-Assay).

Für die Stimulation wurden 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ PHA und 0,8 ng / ml PMA eingesetzt.

Die Proben wurden für 20 h mit den Extrakten koinkubiert, die IL-2-Konzentration wurde im Kulturüberstand mittels eines spezifischen ELISA ermittelt und relativ zur Stimulationskontrolle dargestellt. (Daten: Mittelwert aus Duplikaten).

3.2.1.2.3 Subfraktionen aus Ethanol-Isopropanol-Extrakt

Da der Ethanol-Isopropanol-Extrakt (3.2.1.2.2) die wirksamen Inhaltsstoffe angereichert enthielt, wurde diese Fraktion für die Identifizierung von Wirkstoffen aus Brennesselblätter-Extrakten eingesetzt. Sieben charakteristische Fraktionen wurden über präparative RP-HPLC anhand eines HPLC-Profiles (Abb. 2.1) isoliert und im Jurkat-Assay untersucht (Abb. 3.8). Die Fraktionen II, IV und VI hatten einen deutlichen inhibitorischen Einfluß auf die induzierte IL-2-Expression von Jurkat-T-Zellen, Fraktion III zeigte einen geringen Effekt. (AllamarBlue-Test: Tabelle 6.6).

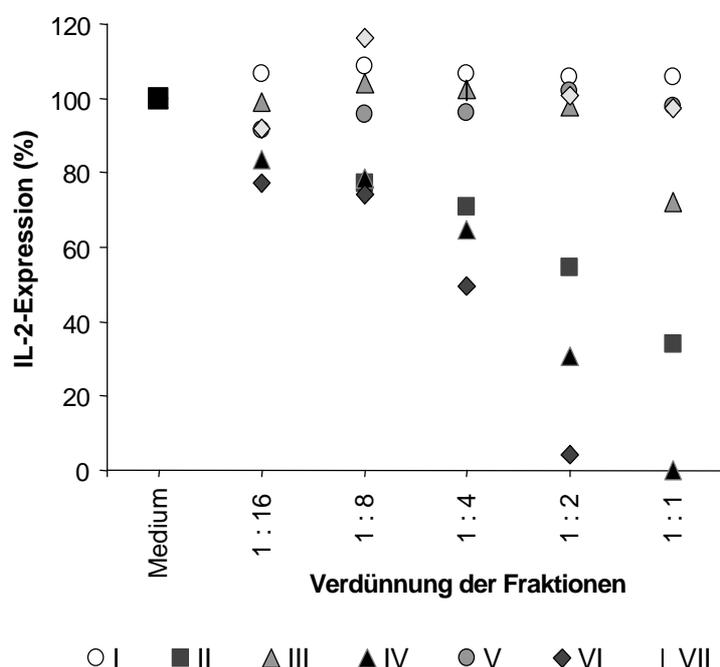


Abb. 3.8: Vergleich der Wirkung der HPLC-Fractionen I – VII aus dem Ethanol-Isopropanol-Extrakt (3.1.2.2) im Jurkat-Assay.

Von I – VII wurden Stammlösungen relativ zu deren Anteil am Extrakt hergestellt und analog verdünnt.

Für die Stimulation wurden 5 µg / ml PHA und 0,8 ng / ml PMA eingesetzt. Die Proben wurden für 20 h inkubiert.

Die IL-2-Konzentration wurde im Kulturüberstand mittels eines spezifischen ELISA ermittelt und relativ zur Stimulationskontrolle dargestellt. (Daten: Mittelwert aus Duplikaten).

3.2.1.2.4 Isopropanolischer Brennesselblätter-Extrakt

Analog zur Herstellung des 50 % ethanolischen Extraktes (Fertigarzneimittel) wurden Blatt-Droge direkt mit 2-Propanol extrahiert. Die RP-HPLC-Profile der Extrakte waren ähnlich, wobei die den wirksamen Fraktionen II, IV und VI zugeordneten Peaks im Isopropanol-Extrakt ca. fünf- (II und III) bis zehnfach (IV und VI) stärker ausgeprägt waren.

Die Wirkung beider Extrakte wurde im Jurkat-Assay überprüft (Abb. 3.7, 3.9). Die isopropanolische Extraktion ging mit einer Dosis-Reduktion einher, die IC₅₀-Werte lagen bei ca. 100 µg / ml (50 % ethanolischer Extrakt) bzw. ca. 40 µg / ml (Isopropanol-Extrakt).

(AllamarBlue-Test: Tabelle 6.7).

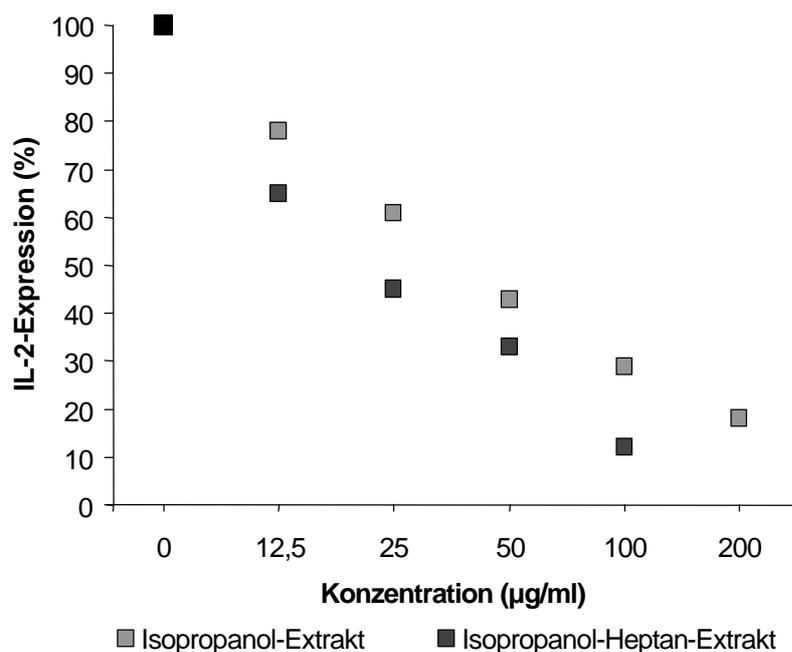


Abb. 3.9: Vergleich der IL-2-supprimierenden Wirkung des Isopropanol-Extraktes und des Isopropanol-Heptan-Extraktes im Jurkat-Assay.

Für die Stimulation wurden 5 µg / ml PHA und 0,8 ng / ml PMA eingesetzt. Die Proben wurden für 20 h inkubiert, die IL-2-Konzentration wurde im Kulturüberstand durch einen spezifischen ELISA ermittelt und relativ zur Stimulationskontrolle dargestellt. (Daten: Mittelwert aus Duplikaten).

3.2.1.2.5 Heptan-Fraktion aus alkalischer Hydrolyse des Isopropanol-Extraktes

Um die lipophilen Säuren des Isopropanol-Extraktes (3.2.1.2.4) von anderen unpolaren Inhaltsstoffen abzutrennen, wurden die Esterbindungen (z.B. Lipide) über alkalische Hydrolyse gespalten und anschließend eine Heptan-Extraktion durchgeführt. Ein Vergleich der Wirkung von Isopropanol-Extrakt und Heptan-Fraktion (Isopropanol-Heptan-Extrakt) im Jurkat-Assay ist in *Abb. 3.9* dargestellt. Hier zeigte sich, daß eine alkalische Hydrolyse mit Heptan-Extraktion mit einer Dosis-Reduktion im Jurkat-Assay einhergeht, der IC_{50} -Wert verschob sich von ca. 40 µg / ml (Isopropanol-Extrakt) auf ca. 20 µg / ml (Heptan-Fraktion). Dieser Versuch gab erste Hinweise auf die Identität der wirksamen Extrakt-Inhaltsstoffe (lipophile Säure). (AllamarBlue-Test: *Tabelle 6.7*).

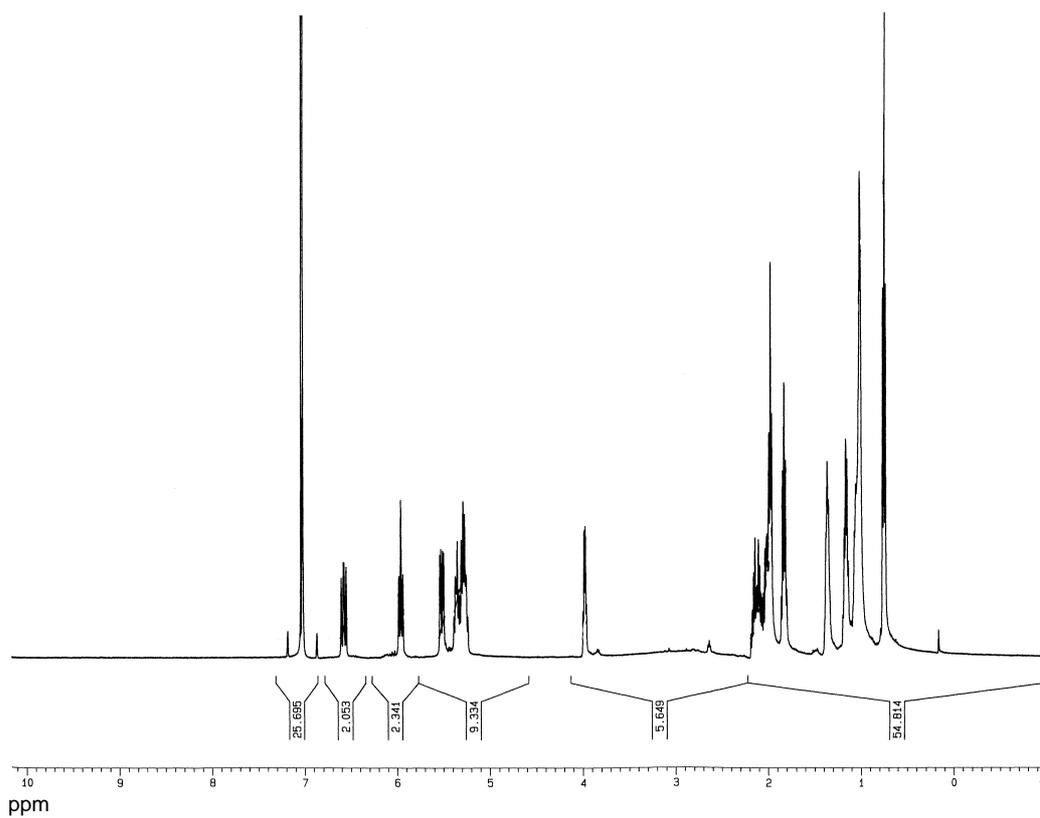
3.2.2 Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen der über RP-HPLC isolierten wirksamen Fraktionen aus Ethanol-Isopropanol-Extrakt

Ein Ziel dieser Arbeit war, wirksame Inhaltsstoffe soweit aufzureinigen, daß sie einer Strukturanalyse unterzogen werden konnten. Da die Reinheit einiger Fraktionen für eine NMR-Analyse nicht ausreichend war, wurden diese indirekt durch RP-HPLC nachgewiesen.

3.2.2.1 Identifizierung von Inhaltsstoffen wirksamer Fraktionen durch 1H -NMR

Die aktiven, über präparative RP-HPLC gewonnenen, Fraktionen II, III IV und VI (3.2.2.3) konnten im HPLC-Profil (210 nm) einzelnen Peaks zugeordnet werden. Sie wurden einer Strukturanalyse mit Hilfe von 1H -NMR-Spektroskopie (Herr Dr. Sinnwell, Universität Hamburg) unterworfen.

A



B

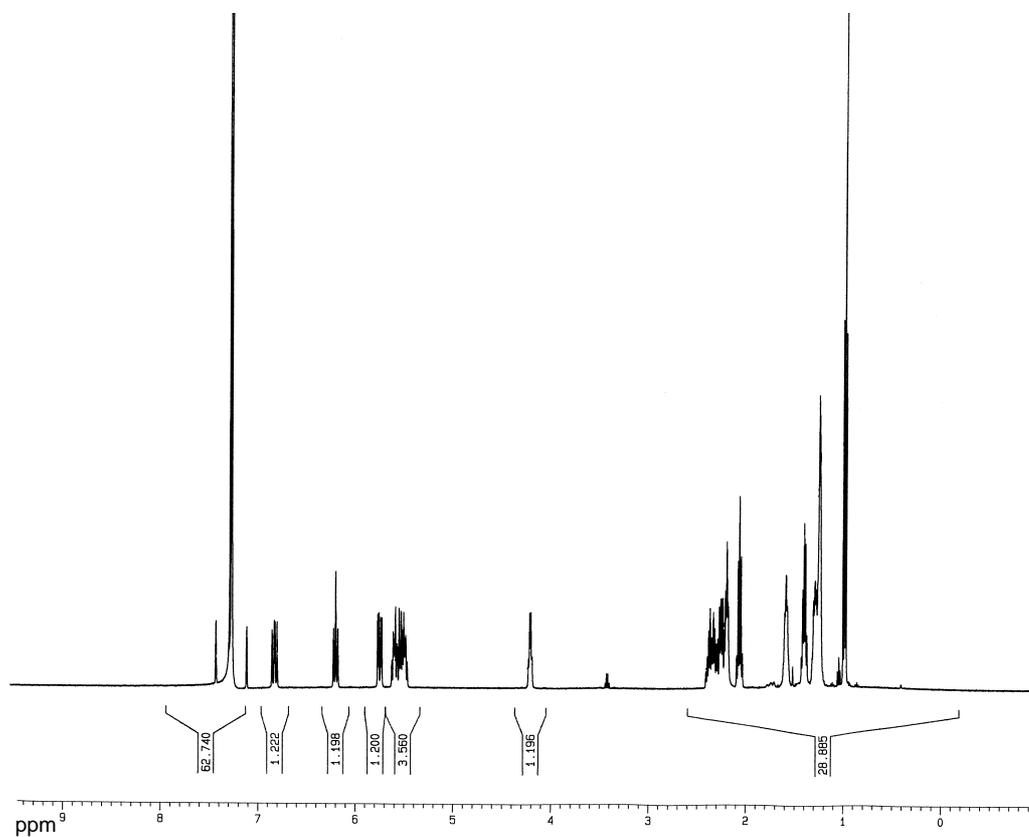


Abb. 3.10: Vergleich der ¹H-NMR-Spektren von Fraktion II (A) und 13-HOTE-Referenzstandard (B).

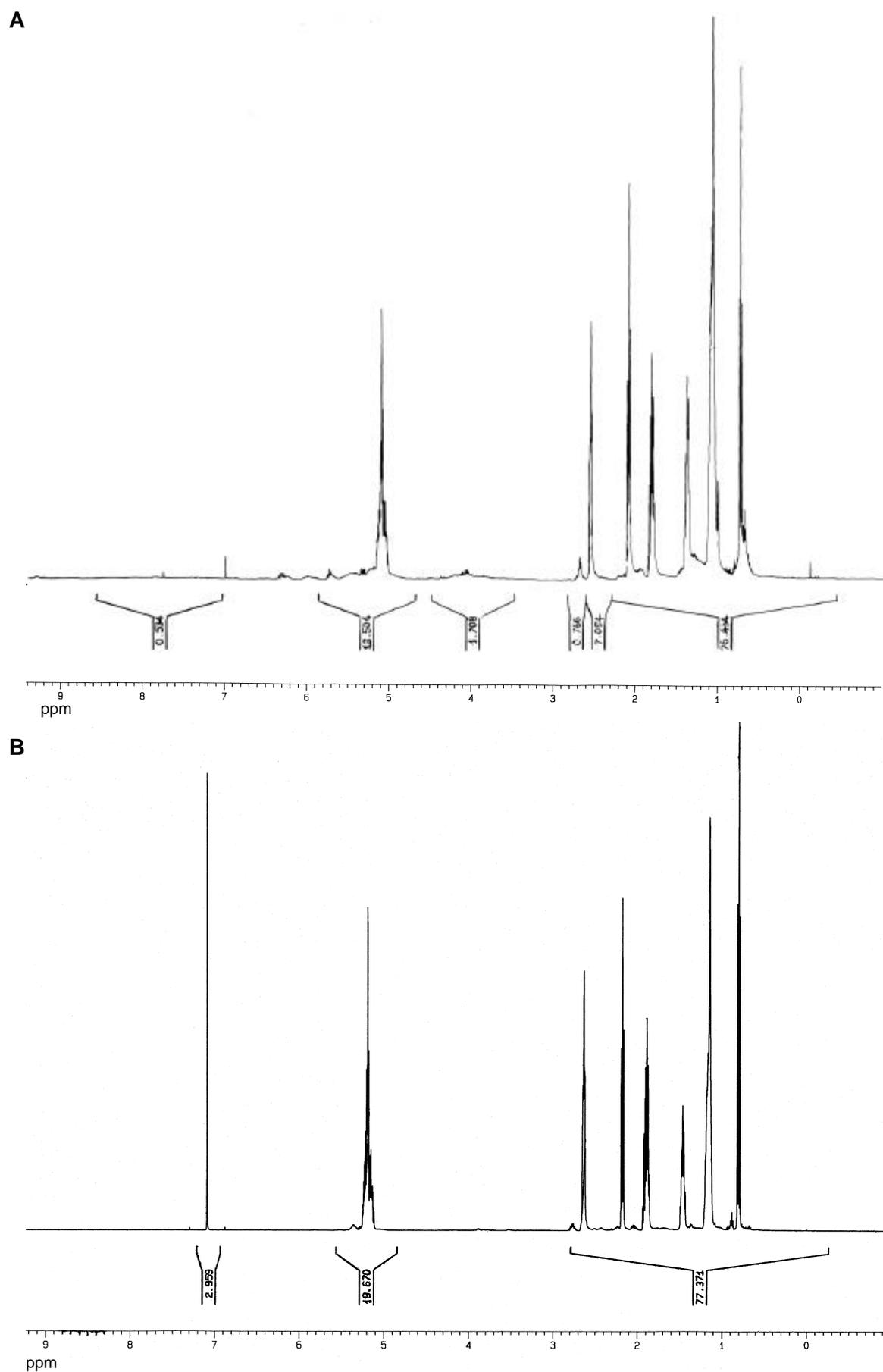


Abb. 3.11: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von Fraktion IV (A) und Linolensäure-Referenzstandard (B).

Von diesen Fraktionen lieferten II und IV verwertbare Spektren (III und VI waren wahrscheinlich durch Substanzen verunreinigt, die nicht bei 210 nm absorbieren).

Die Fraktionen II und IV konnten über $^1\text{H-NMR}$ als (α -) Linolensäure (Octadecatriensäure) und das korrespondierende Oxylin 13-Hydroxy-Octadecatriensäure (13-HOTE) identifiziert werden (Abb.3.10A, 3.11A). Die Identität wurden mit Hilfe der Spektren von Referenzstandards bestätigt (Abb. 3.10B, 3.11B).

3.2.2.2 Identifizierung von Inhaltsstoffen wirksamer Fraktionen durch RP-HPLC

Die Fraktionierung an der präparativen HPLC wurde anhand des HPLC-Profiles bei 210 nm durchgeführt, daher waren sowohl Linolensäure (Absorptionsmaximum: 205 nm) als auch ihr Hydroxy-Derivat HOTE (Absorptionsmaximum: 235 nm) gut detektierbar. Neben den NMR-Spektren bestätigten auch der Vergleich der Retentionsindices von synthetischen und natürlichen Stoffen in der HPLC die Identität der Verbindungen.

Die beiden anderen wirksamen Fraktionen III und VI wiesen in der HPLC ebenfalls Absorptionsmaxima bei 235 bzw. 205 nm auf. Per RP-HPLC wurde daher untersucht, ob es sich bei den beiden anderen isolierten Peaks um (α -) Linolensäure (Octadecadiensäure) und ihr Hydroxy-Derivat 13-HODE (13-Hydroxy-Octadecadiensäure) handelt. Dies konnte anhand identischer Retentionszeiten von natürlicher und synthetischer Substanz belegt werden.

Die hier identifizierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren und ihre Hydroxy-Derivate konnten in unterschiedlichen Konzentrationen in allen hier untersuchten Brennesselblätter-Extrakten nachgewiesen werden (Tabelle 3.3). Ein hoher prozentualer Anteil dieser Stoffe im Extrakt war dabei immer mit einer großen Wirkstärke im Jurkat-Assay gekoppelt.

Tabelle 3.3: Anteile von identifizierten freien Fettsäuren und Oxylipinen an Brennesselblätter-Extrakten und deren Aufarbeitungen. Die Mengen wurden über RP-HPLC mit Hilfe externer Referenzstandards (Linolensäure, Linolensäure und 13-HOTE) und Integration der Peakflächen bei 235 bzw. 205 nm ermittelt.

Brennesselblätter-Extrakte	HOTE-Anteil (%)	HODE-Anteil (%)	Linolensäure-Anteil (%)	Linolsäure-Anteil (%)
50 % EtOH-Extrakt (Fertigarzneimittel)	0,29	0,07	0,2	0,1
Ethanol-Isopropanol-Extrakt	4,78	1,76	35,6	13,2
Isopropanol-Extrakt	1,33	0,35	4,7	2,8
Isopropanol-Heptan-Extrakt	1,25	0,15	36,4	14,3

3.2.2.3 Detektion von Positions- und optischen Isomeren von HOTE über SP- und CP-HPLC

Der zur Fraktion II zugehörige Peak hatte mehrere "Schultern" (mit gleichem Absorptionsspektrum), die mit der RP-Phase nicht vollständig zu trennen waren. Daher wurden diese RP-Fractionen isoliert und mit Hilfe einer Normal (SP)-Phase weiter aufgetrennt. Anhand von Referenzstandards konnten neben 13-HOTE auch 9-, 12- und 16-HOTE als Positionsisomere identifiziert werden (*Tabelle 3.4*).

Da Hydroxy-Fettsäuren sowohl enzymatisch als auch autoxidativ entstehen können, wurden die verschiedenen Peaks der Positionsisomere auf der Normalphase isoliert und über eine Chiralphase in ihre optischen Isomere aufgetrennt. Es zeigte sich, daß die 9- und 13-Isomeren vorwiegend in der S-Form vorliegen, wohingegen 12- und 16- als racemisches Gemisch (1 : 1) vorlagen (*Tabelle 3.4*). Dies deckt sich mit der Literatur, da in den Blättern Höherer Pflanzen sowohl 9- als auch 13-Lipoxygenasen (LOX) vorkommen (Kohlmann *et al.* 1999, Rusterucci, C *et al.* 1999, Hamberg 1999).

Die identifizierten Oxylipine sind nicht nur durch Autoxidation bei der Herstellung der Droge entstanden, sondern lagen bereits vor der Trocknung der Brennesselblätter vor. Dies konnte durch den analytischen Nachweis der Oxilipine in frischen Blättern belegt werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.4: Anteile der verschiedenen Positionsisomere an der HOTE-Fraktion aus Isopropanol-Extrakt. Die Mengen-Anteile wurden relativ zueinander durch Integration der Peakflächen bei 235 nm ermittelt.

Positionsisomer	Anteil (%)	R : S-Verhältnis
13-HOTE	54,6	14 : 86
9-HOTE	23,9	20 : 80
16-HOTE	10,2	48 : 52
12-HOTE	11,4	48 : 52

3.2.3 Wirkung identifizierter Monosubstanzen im Jurkat-Assay

Zur Absicherung der Daten aus den *Screening*-Versuchen wurde die Wirkung der verfügbaren chemischen Reinsubstanzen im Jurkat-Assay überprüft. Sowohl α -Linolensäure (C18:3 [n-3]) als auch α -Linolsäure (C18:2 [n-6]) hatten einen dosisabhängigen hemmenden Einfluß auf die stimulierte IL-2-Expression von Jurkat-T-Zellen, wobei Linolensäure stärker wirksam war (*Abb. 3.12*). Auch 13-HOTE und 9-HODE inhibierten die PHA / PMA-stimulierte IL-2-Expression dosisabhängig (*Abb. 3.13*). Die wirksamen Konzentrationen der Monosubstanzen stimmten mit denen der über RP-HPLC isolierten Fraktionen überein.

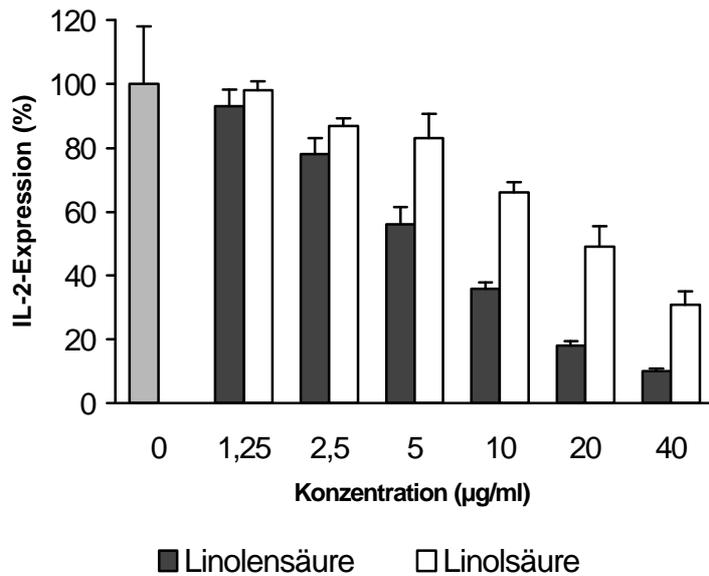


Abb. 3.12: Inhibitorische Wirkung von Linolsäure und Linolensäure auf die PHA / PMA-stimulierte IL-2-Expression von Jurkat-T-Zellen nach 20 h Inkubation (n = 3).

Für die Stimulation wurden 5 µg / ml PHA und 0,8 ng / ml PMA eingesetzt.

Die Konzentration an IL-2 im Kulturüberstand wurde mittels eines spezifischen ELISA ermittelt. (Daten: Mittelwert + SD).

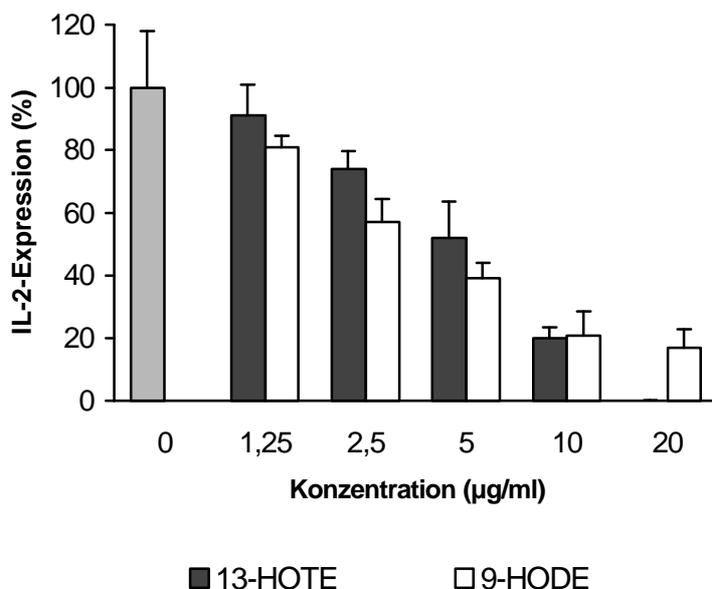


Abb. 3.13: Inhibitorische Wirkung von 13-HOTE und 9-HODE auf die PHA / PMA-stimulierte IL-2-Expression von Jurkat-T-Zellen nach 20 h Inkubation (n = 3).

Für die Stimulation wurden 5 µg / ml PHA und 0,8 ng / ml PMA eingesetzt.

Die Konzentration an IL-2 im Kulturüberstand wurde durch einen spezifischen ELISA ermittelt. (Daten: Mittelwert + SD).

Es sind verschiedene Wirkstoffe bekannt, die die IL-2-Expression hemmen, Immunsuppressiva wie CyA, FK506 und Glucocorticoide (siehe 1.3) sowie Vitamin D₃ (Alroy *et al.* 1995, D'Ambrosia *et al.* 1998). Um die Wirkungen der Fettsäuren und Oxylipine besser einordnen zu können, wurden daher CyA und Vitamin D₃ vergleichend im Jurkat-Assay getestet. CyA hemmte im Jurkat-Assay die PHA / PMA-induzierte IL-2-Expression in sehr geringer Konzentration, eine maximale Hemmung wurde bereits mit 100 ng / ml erreicht. Im Gegensatz dazu war die Wirkung von Vitamin D₃ vergleichbar mit der der Fettsäuren und Oxylipine (Tabelle 3.2). Die halbmaximale Hemmkonzentration (IC₅₀) von Linolsäure betrug ca. 20 µg / ml und lag damit etwas höher im Vergleich zur Wirkung von Linolensäure, 13-HOTE und 9-HODE (Tabelle 3.2). (AllamarBlue-Test: Tabelle 6.8 und 6.9).

Tabelle 3.2: Vergleich der inhibitorischen Wirkung von 13-HOTE, 9-HODE, Linolsäure, Linolensäure, CyA und Vitamin D₃ auf die PHA / PMA-stimulierte IL-2-Expression von Jurkat-T-Zellen nach 20 h Inkubation (n = 3). Für die Stimulation wurden 5 µg / ml PHA und 0,8 ng / ml PMA eingesetzt. Die Konzentrationen an IL-2 im Kulturüberstand wurden durch einen spezifischen ELISA ermittelt. Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC₅₀) abgelesen.

Testsubstanz	IC ₅₀ (µg / ml)	IC ₅₀ (µM)
Linolensäure	6,5	23
Linolsäure	20	71
13-HOTE	5	17
9-HODE	3,5	12
Vitamin D ₃	4,5	12
CyA	0,007	0,006

3.3 Wirkung von Brennesselblätter-Extrakten sowie Fettsäuren und Oxylipinen auf die *In-vitro*-Expression weiterer proinflammatorischer Faktoren

3.3.1 Einfluß auf die LPS-stimulierte IL-1β- und TNF-α-Expression von PBMC

Nachdem mit Hilfe des Jurkat-Screening-Assays sowohl die Extraktion von Brennesselblättern optimiert, als auch einzelne wirksame Inhaltsstoffe identifiziert werden konnten, sollte die antiinflammatorische Wirkung des Isopropanol-Extraktes sowie der identifizierten Oxylipine und Fettsäuren durch weitere Zellkultur-Experimente bestätigt werden. Hierzu wurde zunächst der Einfluß auf die induzierte Expression der monocytären Cytokine IL-1β und TNF-α untersucht.

Die Expression von IL-1β und TNF-α kann *in vitro* durch die gleichen Stimuli induziert werden (bakterielle Endotoxine, Cytokine, Phorbolster). Alle folgenden Untersuchungen wurden mit einer LPS-Stimulation in einer Konzentration von 5 ng / ml und einer Inkubationsdauer von 8 h durchgeführt (maximale Cytokin-Expression mit 10 ng / ml LPS). Nach 8 h Stimulation waren die Konzentrationen beider Cytokine im zellfreien Kulturüberstand vergleichbar gut meßbar.

3.3.1.1 Suppression der Expression monocytärer Cytokine durch Brennesselblätter-Extrakte

Die Wirkung des Isopropanol-Extraktes sowie des Isopropanol-Heptan-Extraktes (2.1.1.3) wurde vergleichend an PBMC (n = 4) untersucht. Beide Extrakte hemmten die LPS-induzierte IL-1β-Expression dosisabhängig (Abb. 3.14, 3.15). Die inhibitorische Wirkung der Heptan-Fraktion zeichnete sich durch eine Dosis-Reduktion im Vergleich zum Isopropanol-

Extrakt aus. Der Wert für die halbmaximale Hemmung (IC_{50}) lag bei ca. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Isopropanol-Extrakt) bzw. ca. 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Isopropanol-Heptan-Extrakt).

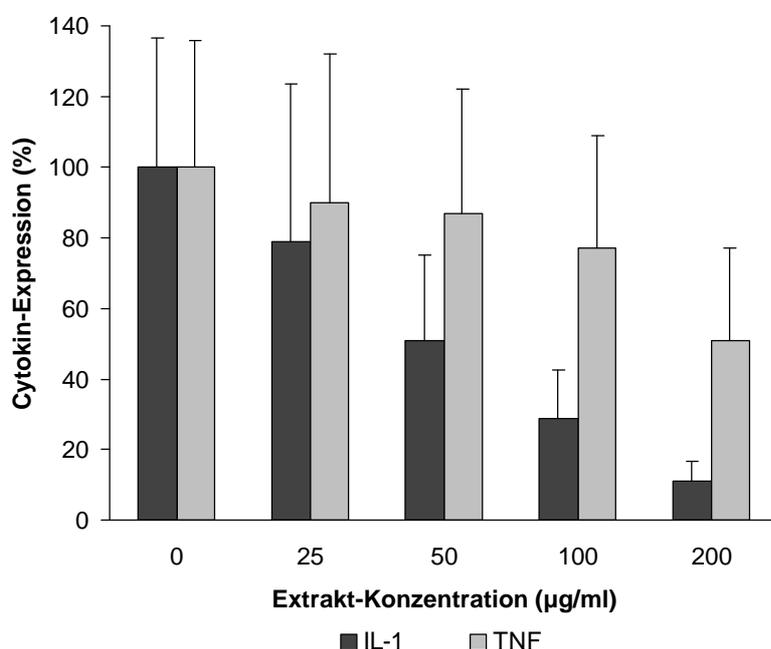


Abb. 3.14: Inhibitorische Wirkung von isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt auf die LPS-induzierte IL-1 β - und TNF- α -Expression von PBMC ($n = 4$). Für die Stimulation wurden 5 ng / ml LPS eingesetzt. Die Proben wurden für 8 h mit den Extrakten koinkubiert. Die Cytokin-Konzentration wurde im Kulturüberstand mittels spezifischer ELISA (in Duplikaten) ermittelt und relativ zur Stimulationskontrolle dargestellt (Daten: Mittelwert + SD).

Auch in Bezug auf eine Inhibition der IL-1 β -Expression ging demnach eine Anreicherung von Oxylipinen und freien Fettsäuren (hier durch alkalische Hydrolyse und anschließende Heptan-Extraktion) mit einer Verstärkung der Wirkung einher.

Die Expression von TNF- α wurde durch Inkubation mit Isopropanol-Extrakt dosisabhängig um maximal $50 \pm 25 \%$ (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Extrakt) inhibiert (Abb. 3.14).

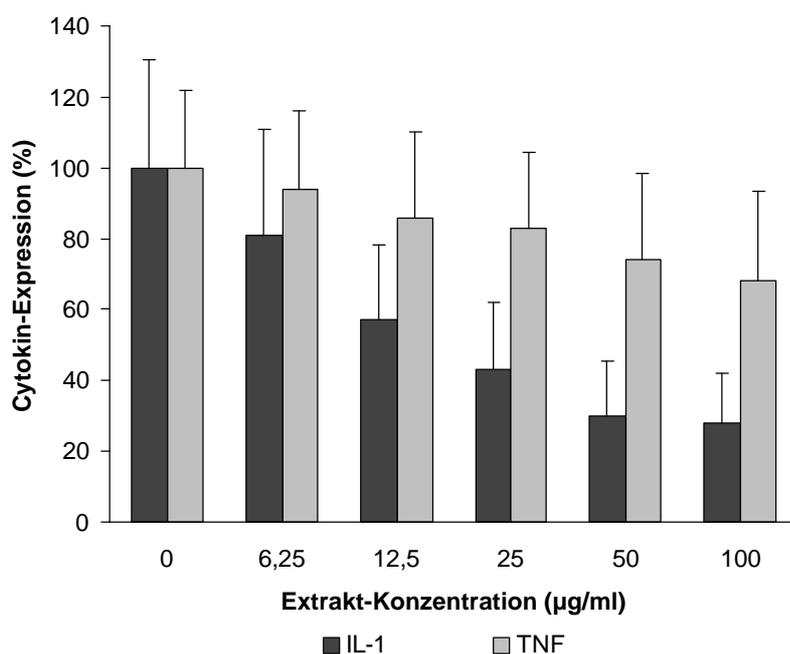


Abb. 3.15: Inhibitorische Wirkung von Isopropanol-Heptan-Extrakt auf die LPS-induzierte IL-1 β - und TNF- α -Expression von PBMC ($n = 4$). Für die Stimulation wurden 5 ng / ml LPS eingesetzt. Die Proben wurden für 8 h mit den Extrakten koinkubiert. Die Cytokin-Konzentration wurde im Kulturüberstand mittels spezifischer ELISA (in Duplikaten) ermittelt und relativ zur Stimulationskontrolle dargestellt (Daten: Mittelwert + SD).

Auch der Isopropanol-Heptan-Extrakt zeigt nur einen geringen Einfluß auf die LPS-stimulierte TNF- α -Expression von PBMC (Abb. 3.15). Daß die Effekte auf die induzierte TNF- α -Expression insgesamt geringer ausfielen (im Vergleich zu IL-1 β), könnte dadurch erklärt werden, daß ein relativ großer Anteil an TNF- α -mRNA-Transkripten bereits in unstimulierten Zellen vorhanden ist.

(AllamarBlue-Test: Tabelle 6.10 und 6.11).

Aus methodischen Gründen war es nicht möglich, den 50 % ethanolischen Extrakt (Fertigarzneimittel) in diesem Testsystem im direkten Vergleich zu untersuchen. Der Extrakt enthielt Komponenten, die in Abwesenheit von LPS eine Stimulation der monocytären Cytokine bewirkte. Durch eine extern durchgeführte LAL (*Limulus-Amöbocyte-Antigen-Test*)-Analyse konnten Endotoxin-Kontaminationen im niedrigen pg/ml-Bereich im Extrakt detektiert werden, die *in vitro* die Ursache für die beschriebenen Effekte sein könnten. In der Literatur ist die Wirkung eines 50 % ethanolischen Extraktes auf die Expression monocytärer Cytokine an einem Vollblut-Assay beschrieben (LPS-induzierte IL-1 β - und TNF- α -Expression). Die wirksame Extrakt-Konzentration liegt hier im Bereich von 0,5 - 5 mg/ml (Obertreis *et al.* 1996a).

Der Ethanol-Isopropanol-Extrakt hatte einen starken inhibitorischen Effekt auf die induzierte monocytäre Cytokin-Expression. Die IC₅₀-Werte lagen bei ca. 35 μ g/ml (IL-1 β) bzw. 60 μ g/ml (TNF- α) (Abb. 3.16). Die Anreicherung der Fettsäuren und Oxylipine korrelierte auch bei PBMC mit einer verstärkten supprimierenden Wirkung auf die induzierte Cytokin-Expression.

(AllamarBlue-Test: Tabelle 6.12).

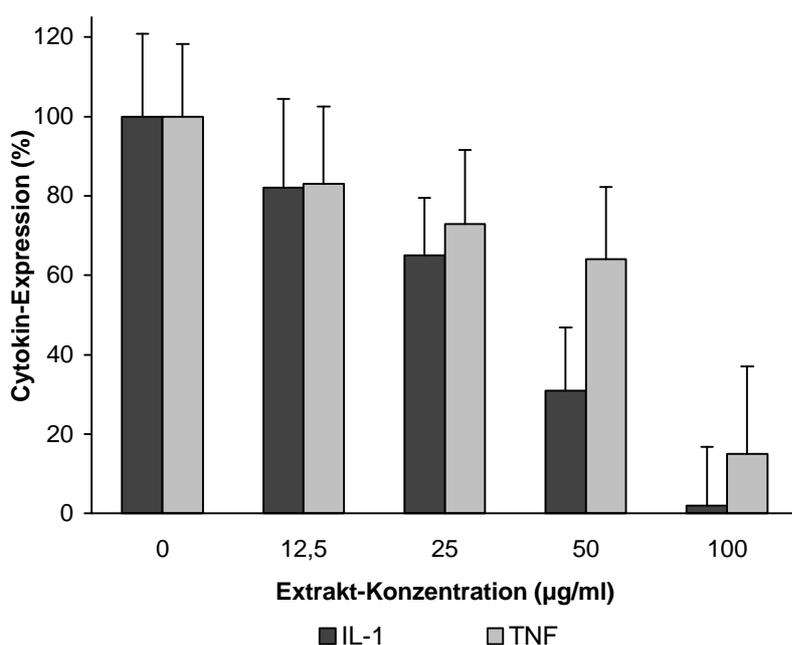


Abb. 3.16: Inhibitorische Wirkung des Ethanol-Isopropanol-Extraktes auf die LPS-induzierte IL-1 β - und TNF- α -Expression von PBMC (n = 5).

Für die Stimulation wurden 5 ng/ml LPS eingesetzt. Die Proben wurden für 8 h mit den Extrakten koinkubiert. Die Cytokin-Konzentrationen wurden im Kulturüberstand mittels spezifischer ELISA (in Duplikaten) ermittelt und relativ zur Stimulationskontrolle dargestellt (Daten: Mittelwert + SD).

3.3.1.2 Einfluß von Fettsäuren und Oxylipinen auf die Expression monocytärer Cytokine

Auch die mittels Jurkat-Assay identifizierten wirksamen Inhaltsstoffe von Brennesselblätter-Extrakten, Linolensäure, Linolsäure, HOTE und HODE, wurden auf ihren Einfluß auf die monocytäre Cytokin-Expression hin untersucht.

Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linol- und Linolensäure hatten in Konzentrationen bis zu 40 µg / ml keine eindeutige Wirkung auf die LPS-stimulierte Cytokin-Expression von PBMC (n = 5), das Oxylipin 13-HODE hatte einen leichten kostimulatorischen Effekt auf die induzierte IL-1β-Expression von PBMC (Daten nicht gezeigt).

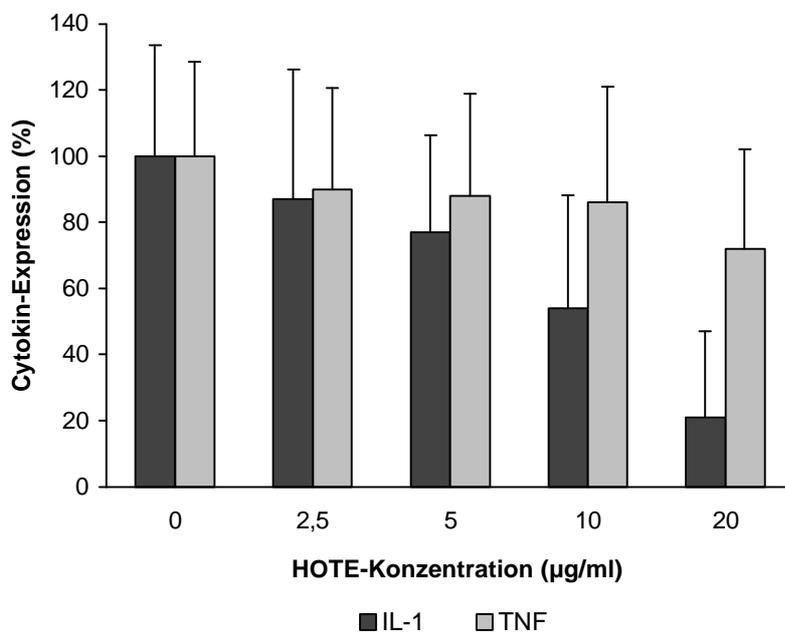


Abb. 3.17: Inhibitorische Wirkung der isolierten HOTE-Fraktion aus Brennesselblätter-Extrakt auf die LPS-stimulierte IL-1β- und TNF-α-Expression von PBMC nach 8 h Inkubation (n = 5). Für die Stimulation wurden 5 ng / ml LPS eingesetzt. Die Konzentration an Cytokinen im Kulturüberstand wurde mittels spezifischer ELISA in Dublikaten ermittelt. (Daten: Mittelwert + SD).

Sowohl die aus Brennesselblätter-Extrakt isolierte 13-HOTE-Fraktion als auch der synthetische 13-(S)-HOTE-Referenzstandard zeigten einen deutlichen dosis-abhängigen inhibitorischen Effekt auf die stimulierte IL-1β-Expression von PBMC (n = 5) bei Konzentrationen bis zu 20 µg / ml (Abb. 3.17, 3.18). Der Effekt auf die induzierte TNF-α-Expression (Abb. 3.17, 3.18) fiel analog zu den Brennesselblätter-Extrakten (3.3.1.1) geringer aus. (AllamarBlue-Test: Tabelle 6.13 – 6.15).

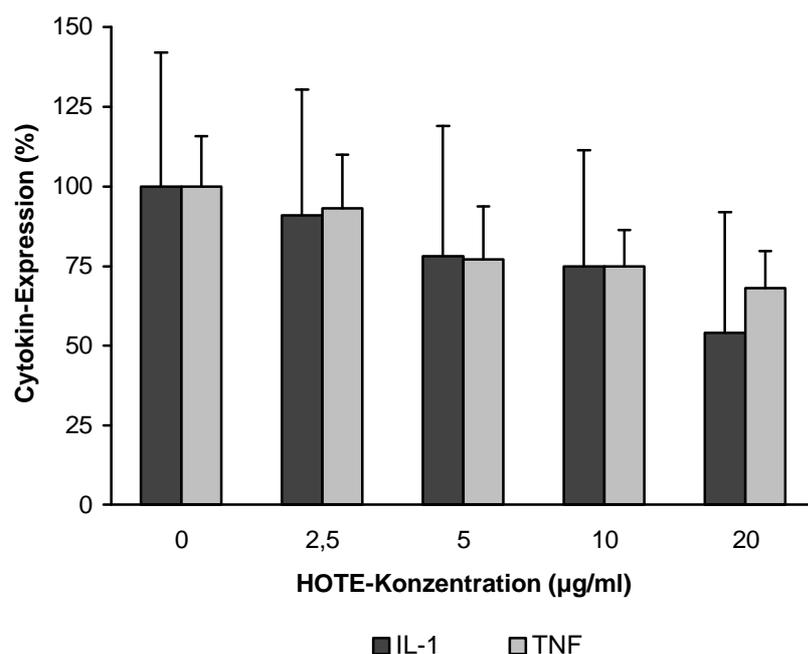


Abb. 3.18: Inhibitorische Wirkung von 13-S-HOTE auf die LPS-stimulierte IL-1 β - und TNF- α -Expression von PBMC nach 8 h Inkubation (n = 5). Für die Stimulation wurden 5 ng / ml LPS eingesetzt. Die Konzentration an Cytokinen im Kulturüberstand wurde mittels spezifischer ELISA in Dublikaten ermittelt. (Daten: Mittelwert + SD).

3.3.2 Suppression der MMP-Expression von Monocyten und Chondrocyten

Neben der Expression von Cytokinen werden auch andere proinflammatorische Faktoren während einer Entzündung auf Transkriptions-Ebene reguliert. Hierzu zählen verschiedene MMPs (Matrix-Metallo-Proteinasen), wie Collagenase-1 (MMP-1), Stromelysin-1 (MMP-3) oder auch Gelatinase B (MMP-9) (Martel-Pelletier *et al.* 1994, Arner & Tororella 1995, Berenbaum 2000). Während alle drei genannten Enzyme von Chondrocyten exprimiert werden, wird Gelatinase B auch von Monocyten gebildet (Ricca *et al.* 2000).

3.3.2.1 Hemmung der Gelatinase B-Expression von primären humanen Monocyten durch Isopropanol-Extrakt

Der Einfluß des Isopropanol-Extraktes (2.1.1.3) auf die MMP-9-Expression wurde an isolierten primären humanen Monocyten untersucht. Im Rahmen von Vorversuchen wurde die zeit- und dosisabhängige Stimulation der MMP-9-Expression sowohl mit LPS als auch mit dem Pflanzenlektin ConA getestet (Daten nicht gezeigt). Für die Stimulation der Monocyten wurde eine Konzentration von 2 μ g / ml ConA bzw. 0,1 μ g / ml LPS eingesetzt. Die Expression wurde nach 48 h im zellfreien Überstand über einen MMP-9-spezifischen ELISA bestimmt. Die inhibitorische Wirkung des Isopropanol-Extraktes auf die induzierte MMP-9-Expression primärer Monocyten (n = 4) ist in *Abb. 3.19* dargestellt. Sowohl unter LPS- als auch unter ConA-Stimulation war durch Koinkubation mit dem Extrakt eine dosisabhängige Inhibition der MMP-9-Expression zu beobachten. Auch die etwas

schwächere, unter basalen Kulturbedingungen induzierte, MMP-9-Expression wurde durch den Extrakt gehemmt. Mit 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Extrakt wurden vergleichbare MMP-9-Konzentrationen wie bei gleichzeitiger Stimulation mit LPS oder ConA gemessen (Daten nicht gezeigt).

(AllamarBlue-Test: *Tabelle 6.18*).

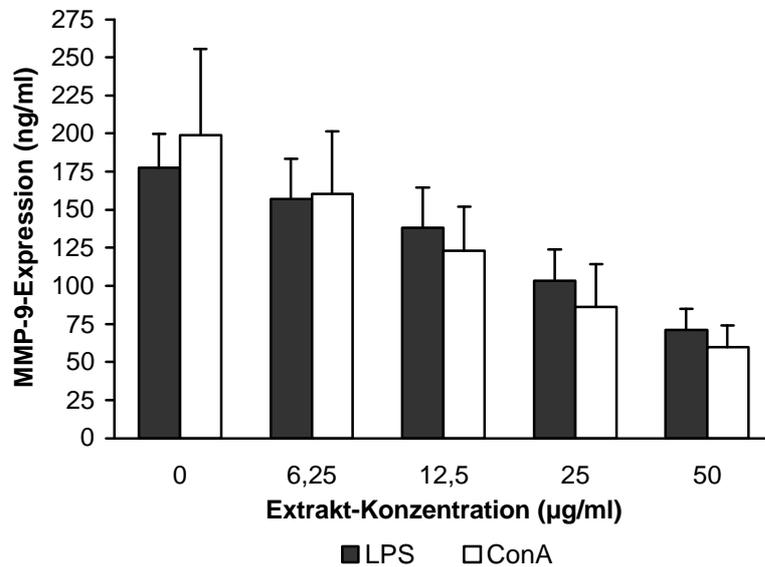


Abb. 3.19: Inhibitorische Wirkung von isopropanolischem Brennnesselblätter-Extrakt auf die LPS- und ConA-stimulierte MMP-9-Expression von primären humanen Monocyten nach 48 h Inkubation ($n = 4$).

Für die Stimulation wurden 0,1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ LPS bzw. 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ConA eingesetzt. Die Konzentration an MMP-9 im Kulturüberstand wurde durch einen spezifischen ELISA ermittelt. (Daten: Mittelwert + SD).

3.3.2.2 Hemmung der MMP-Expression von primären humanen Chondrocyten durch 13-HOTE

Die pathologisch erhöhte Expression von MMP-1 und MMP-3 führt bei der rheumatoiden Arthritis zu einer fortschreitenden Zerstörung des Gelenkknorpels. Die Expression dieser Enzyme wird v.a. durch monocytäre Cytokine induziert (Vincenti *et al.* 1998, Mengshol *et al.* 2000, Barchowsky *et al.* 2000). Daher sollte hier untersucht werden, ob das Oxylin 13-HOTE einen Einfluß auf die Cytokin-induzierte MMP-Expression von Chondrocyten hat.

Primäre humane Chondrocyten wurden mit 100 ng / ml IL-1 β für 48 h stimuliert und gleichzeitig mit 13-HOTE inkubiert. Dabei wurde vergleichend die Wirkung der aus Brennnesselblätter-Extrakt isolierten 13-HOTE-Fraktion und der synthetischen Reinsubstanz 13-(S)-HOTE untersucht. Beide Testsubstanzen inhibierten die stimulierte MMP-1- und MMP-3-Expression dosisabhängig (*Abb. 3.20A und B*). Die isolierte 13-HOTE-Fraktion war in etwas niedrigeren Konzentrationen aktiv, was auf ca. 14 % Anteil von 13-R-HOTE in der HOTE-Fraktion zurückzuführen sein könnte.

(AllamarBlue-Test: *Tabelle 6.19*).

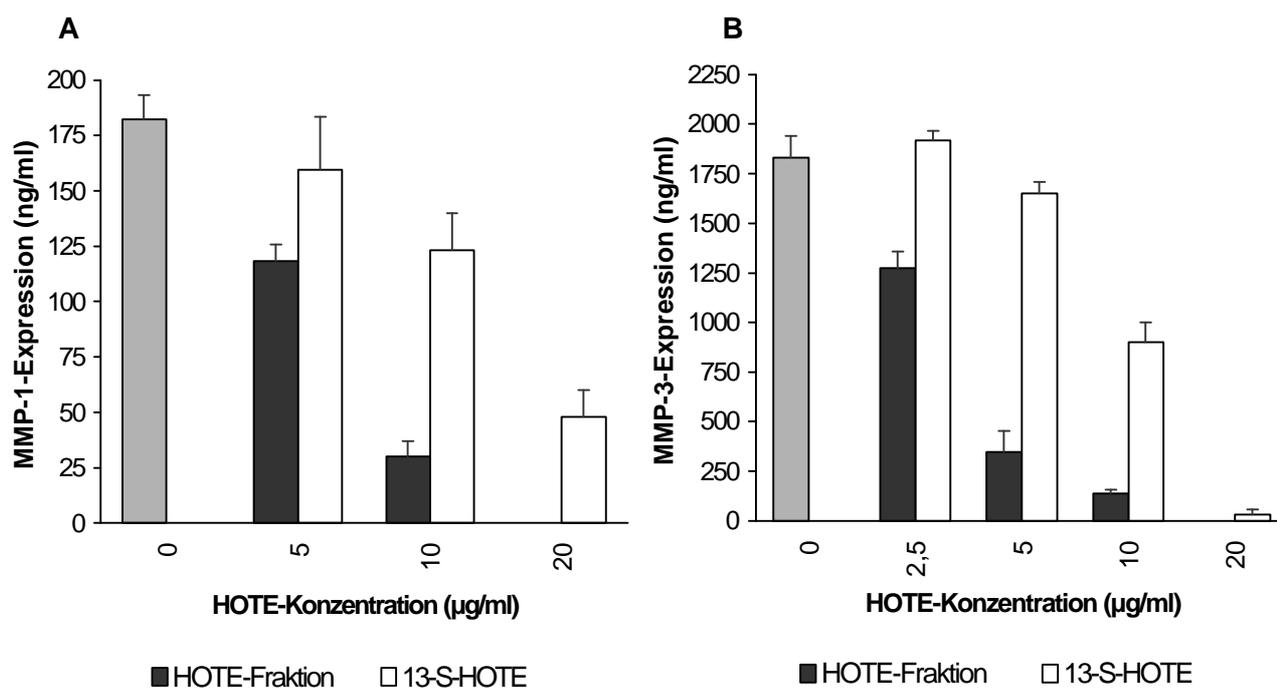


Abb. 3.20: Inhibitorische Wirkung von HOTE auf die IL-1 β -induzierte MMP-1- (A) und MMP-3- (B) Expression primärer humaner Chondrocyten nach 48 h Inkubation (n = 4). Für die Stimulation wurde 100 ng / ml IL-1 β eingesetzt. Untersucht wurden sowohl die aus isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt isolierte 13-HOTE-Fraktion als auch die synthetische Reinsubstanz 13-S-HOTE. Die Konzentrationen von MMP-1 und MMP-3 im Kulturüberstand wurden durch spezifische ELISA bestimmt. (Daten: Repräsentatives Ergebnis von Chondrocyten eines Probanden in Quadruplikaten; Mittelwert + SD).

3.4 Wirkung des isopropanolischen Brennesselblätter-Extraktes und 13-HOTE auf die Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen, die durch proinflammatorische Stimuli induziert werden. Hierzu zählen auch die Cytokin-Gene IL-2, TNF- α und IL-1 β sowie die MMP-1-, MMP-3- und MMP-9-Gene (Baeuerle & Henkel 1994, Baeuerle & Baichwal 1997, Mengshol *et al.* 2000, Barchowsky *et al.* 2000).

Untersuchungen von Riehemann *et al.* (1999) mit 50 % ethanolischem Brennesselblätter-Extrakt weisen darauf hin, daß die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung an der antiinflammatorischen Wirkung von Brennesselblätter-Extrakten beteiligt ist. Bei ihren EMSA-Untersuchungen konnte mit Extrakt-Konzentrationen von 2,5 bis 10 mg / ml ein hemmender Einfluß auf die Aktivierung von NF- κ B in verschiedenen Zelllinien beobachtet werden.

Daher sollte in dieser Arbeit der Einfluß des isopropanolischen Brennesselblätter-Extraktes sowie 13-HOTE auf die Aktivierung von NF- κ B untersucht werden.

3.4.1 Wirkung von 13-HOTE und isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

3.4.1.1 Inhibitorischer Einfluß von Isopropanol-Extrakt auf die Aktivierung von NF- κ B in PBMC

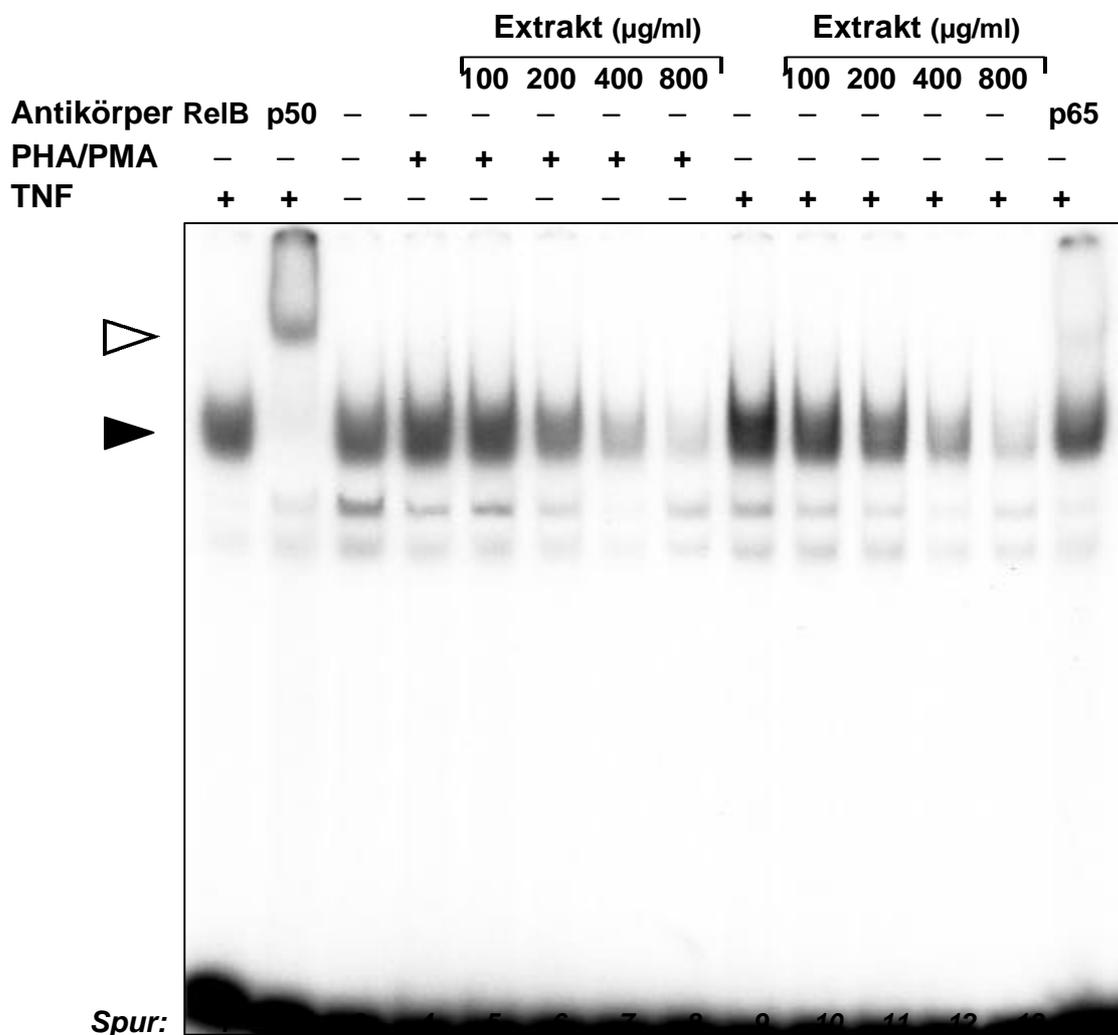


Abb. 3.21: Inhibition der NF- κ B-DNA-Bindung durch isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt. PBMC wurden für 2 h mit den angegebenen Extrakt-Konzentrationen inkubiert und mit 5 μ g / ml PHA und 5 ng / ml PMA oder mit 100 ng / ml TNF- α stimuliert. Nach 2 h wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und durch EMSA analysiert. Den Haupt-NF- κ B-DNA-Komplex zeigt die gefüllte Pfeilspitze an. Zur Überprüfung der Identität und Zusammensetzung des NF- κ B-DNA-Komplexes wurden TNF- α -behandelte Zellextrakte mit Antikörpern gegen die NF- κ B-Untereinheiten p50, p65 und RelB inkubiert. Die leere Pfeilspitze deutet auf den durch anti-p50 komplett retardierten NF- κ B-DNA-Komplex hin.

PBMC-Kulturen wurden für 2 h mit verschiedenen Extrakt-Konzentrationen inkubiert und anschließend weitere 2 h stimuliert. Es wurden Zellextrakte hergestellt und in Bezug auf

DNA-Bindung an ein ^{32}P -markiertes NF- κB -spezifisches Oligonukleotid in einer nicht-denaturierenden PAGE analysiert.

Im EMSA waren verschiedene spezifische DNA-Komplexe zu sehen (*Abb. 3.21*). NF- κB -Komplexe können sich als unterschiedliche Homo- und Heterodimere konstituieren. Zur Identifizierung der Untereinheiten des vorherrschenden NF- κB -DNA-Komplexes wurden einzelne Zellextrakte (TNF α -Stimulationskontrollen) mit Antikörpern gegen die NF- κB -Untereinheiten p50, p65, c-Rel und RelB vor dem Auftrag auf das PAGE inkubiert. Der Haupt-NF- κB -DNA-Komplex wurde mit anti-p50-Antikörper komplett im EMSA-Gel retardiert (*Spur 2*). Die Ausbildung des DNA-Komplexes wurde ebenfalls teilweise durch anti-p65-Antikörper reduziert (*Spur 14*). Antikörper gegen RelB (*Spur 1*) sowie gegen c-Rel (nicht gezeigt) hatten keinen Einfluß auf die Ausbildung des DNA-Komplexes. Dies deutete darauf hin, daß es sich bei dem Haupt-Komplex wirklich um das p50 / p65-Heterodimer handelte.

Auch ohne Stimulation der Zellen bildete sich der NF- κB -DNA-Komplex aus (*Spur 3*), jedoch nahm die Menge an Komplexen nach Stimulation mit PHA / PMA (*Spur 4*) oder TNF- α (*Spur 9*) zu. Eine Präinkubation der Zellen mit Isopropanol-Extrakt inhibierte die Bindungsaktivität von NF- κB an die DNA dosisabhängig (*Spuren 5-8 und 10-13*). Der gleiche Effekt war zu beobachten, wenn die Zellen mit LPS stimuliert wurden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt ist auffällig, daß die im EMSA sichtbar wirksamen Konzentrationen an Isopropanol-Extrakt relativ hoch waren. Zwar waren diese zehnfach niedriger als bei vergleichbaren Untersuchungen mit 50 % ethanolischem Extrakt (Riehemann *et al.* 1999), aber dennoch höher als die Konzentrationen, die in dem vorangehend beschriebenen Cytokin-Bioassay wirksam waren, obwohl auch hier PBMC untersucht wurden (*Abb. 3.14*).

(AllamarBlue-Test: *Tabelle 6.16*).

3.4.1.2 Wirkung von Fettsäure-Derivaten und Isopropanol-Extrakt auf die Aktivierung von NF- κB in Jurkat-T-Zellen

Auch an Zellextrakten von Jurkat-T-Zellen wurde der Effekt einer Präinkubation mit Isopropanol-Extrakt auf die Aktivierung von NF- κB im EMSA untersucht. Ferner wurde der Einfluß des darin identifizierten Oxylipins 13-HOTE geprüft. Als Positiv-Kontrollen wurden Cyclopentenon-Prostaglandine (PGA $_1$, 15-d-PGJ $_2$) eingesetzt. Ferner wurde die im Extrakt enthaltene α -Linolensäure mitgetestet.

Eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivierung von NF- κB ist sowohl für Cyclopentenon-Prostaglandine (Rossi *et al.* 2000) als auch für Arachidonsäure und γ -Linolensäure (Stuhlmeier *et al.* 1997) beschrieben.

Die Jurkat-T-Zellen wurden für 2 h mit den oben genannten Testsubstanzen inkubiert und anschließend für weitere 3 h mit PMA / Ionomycin stimuliert. Auch ohne Stimulation war der NF- κ B-DNA-Komplex im EMSA-Gel detektierbar (*Abb. 3.22: Spur 14*), durch die Stimulation wurde dessen Ausbildung jedoch deutlich verstärkt (*Spur 1*).

Der spezifische NF- κ B-DNA-Komplex konnte mit Hilfe von Antikörpern als p50 / p65-Heterodimer identifiziert werden, anti-p50 retardierte den Komplex komplett (Daten nicht gezeigt) und anti-p65 *shiftete* die Bande im Gel partiell (*Spur 2*). Dies wurde ebenfalls von Riehemann *et al.* (1999) beobachtet.

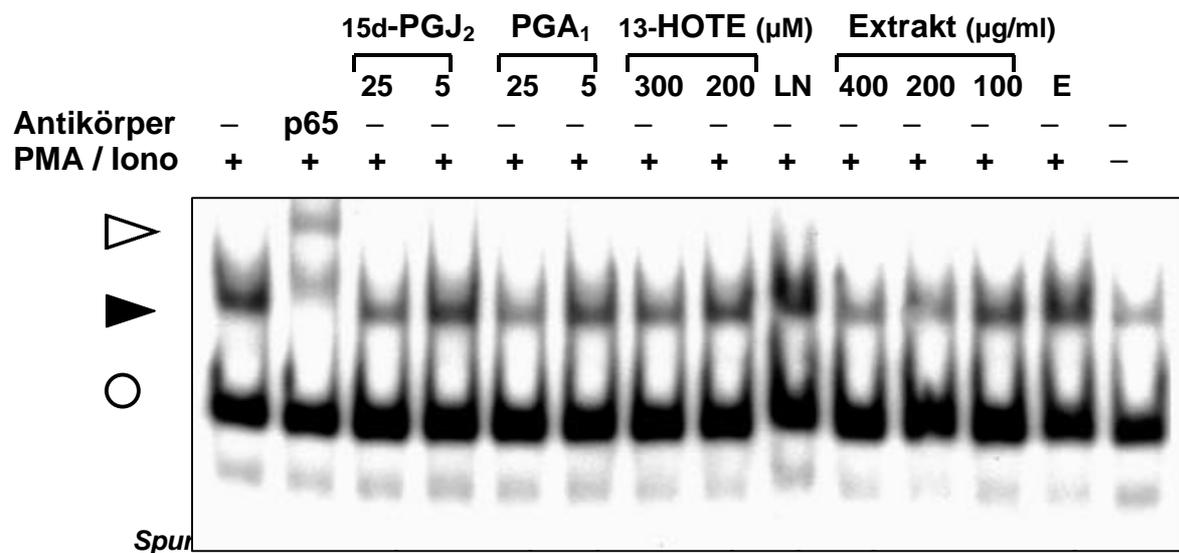


Abb. 3.22: Inhibition der NF- κ B-DNA-Bindung durch isopropanolischen Brennnesselblätter-Extrakt und 13-HOTE. Jurkat-T-Zellen wurden für 2 h mit den Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und anschließend mit 50 ng / ml PMA und 2 μ M Ionomycin stimuliert. Nach 3 h wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und durch EMSA analysiert. Der NF- κ B-DNA-Komplex wird durch die gefüllte Pfeilspitze angezeigt, der schneller migrierende unspezifische DNA-Komplex ist durch einen Kreis markiert. Die leere Pfeilspitze deutet auf den durch anti-p65 retardierten NF- κ B-DNA-Komplex hin. Als Kontrollen wurden die Cyclopentenon-Prostaglandine PGA₁ und 15-d-PGJ₂ (in den angegebenen μM-Konzentrationen), sowie das Extrakt-Lösungsmittel Ethanol (0,2 %, entsprechend der höchsten Extrakt-Konzentration) und Linolensäure (LN, 100 μM) im EMSA mitgetestet. (Nur ein Teilbereich des Autoradiogramms wurde hier gezeigt).

Neben dem NF- κ B-DNA-Komplex war bei den Jurkat-Zellextrakten auch ein schneller migrierender unspezifischer DNA-Komplex im EMSA-Gel sichtbar, der unter den verschiedenen Präinkubationen der Zellen unbeeinflusst blieb. Dieser Komplex diente als interne Kontrolle für Protein-Menge und Integrität der Zellextrakte.

Die inhibierende Wirkung von PGA₁ und 15-d-PGJ₂ auf die Ausbildung des NF- κ B-DNA-Komplexes war bei einer Prostaglandin-Konzentration von 25 μM nachweisbar (*Spuren 3*

und 5), mit 5 μM hingegen war der Effekt nicht mehr deutlich sichtbar (*Spuren 4 und 6*). 100 μM α -Linolensäure zeigte hier keinen inhibitorischen Effekt auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κB (*Spur 9*).

Die Inkubation der Zellen mit Extrakt oder 13-HOTE inhibierte die Bindungsaktivität von NF- κB an die DNA dosisabhängig (*Spuren 7, 8 und 9-12*). Der in den Extrakt-Proben enthaltene Ethanol-Anteil hatte keinen Einfluß auf die Ausbildung des NF- κB -DNA-Komplexes (*Spur 13*). Die maximale Hemmung der NF- κB -DNA-Bindung bei Inkubation der Zellen mit 400 μg / ml Isopropanol-Extrakt oder 300 μM 13-HOTE war vergleichbar stark wie der inhibitorische Effekt der Prostaglandine (25 μM).

Insgesamt fiel auf, daß die wirksamen Dosierungen in diesem Assay relativ hoch waren, dies gilt insbesondere für 13-HOTE (300 μM entsprechen ca. 90 μg / ml). Analog ist dieser Effekt jedoch auch bei den mitgetesteten Positiv-Kontrollen zu beobachten. Cyclopentenon-Prostaglandine sind sehr potente antiinflammatorische Wirkstoffe, die normalerweise in Konzentrationen 1 - 10 μM aktiv sind (Jiang *et al.* 1998, Yang *et al.* 2000). Im Vergleich dazu waren in dem hier verwendeten EMSA ebenfalls höhere Konzentration (25 μM) erforderlich, um die Aktivierung von NF- κB negativ zu beeinflussen.

(AllamarBlue-Test: *Tabelle 6.17*).

3.4.2 Wirkung von 13-HOTE und Isopropanol-Extrakt auf die Aktivierung des nukleären Rezeptors PPAR γ

Ein negativer Einfluß auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κB kann auf unterschiedlichen Ebenen der Stimulations-vermittelten Signaltransduktion greifen.

Die Daten von Riehemann *et al.* (1999), die mit 50 % ethanolischem Brennesselblätter-Extrakt (Fertigarzneimittel) erhoben wurden, weisen darauf hin, daß der proteolytische Abbau von I κB durch den Extrakt negativ beeinflusst wird.

Die inhibierende Wirkung von Glucocorticoiden auf die Aktivierung von NF- κB ist relativ gut untersucht, sie greifen zugleich auf mehreren Ebenen ein, so wird u.a. auch eine direkte Wechselwirkung zwischen GR und NF- κB postuliert. Eine ähnliche Wirkung wird für andere nukleäre Rezeptoren wie den VDR diskutiert.

Vor wenigen Jahren wurden natürliche Liganden des Orphan-Rezeptors PPAR γ identifiziert, hierzu zählen Fettsäure-Derivate wie 15-d-PGJ₂. Die antiinflammatorische Wirkung einer Liganden-vermittelten Aktivierung von PPAR γ wurde vielfach beschrieben (Ricote *et al.* 1998a, Jiang *et al.* 1998, Yang *et al.* 1999), der genaue Mechanismus ist jedoch bis heute nicht vollständig geklärt.

Hier sollte untersucht werden, ob die antiinflammatorische Wirkung des Isopropanol-Extraktes möglicherweise auf eine PPAR γ -Aktivierung zurückzuführen ist. Dazu wurde Extrakt bzw. 13-HOTE im Vergleich zu bekannten PPAR-Liganden über EMSA analysiert.

3.4.2.1 Untersuchung der PPAR-Aktivierung über EMSA

3.4.2.1.1 Vergleich verschiedener PPAR-Bindungs-Oligonukleotide im EMSA

Ein kommerzielles PPAR-Consensus-Oligonukleotid ist zwar als Sonde verfügbar, jedoch besteht das PPAR-*Response-Element* (PPRE) aus einer sogenannten DR1-Sequenz, an die viele Orphan-Rezeptoren binden. Da die Expression von PPAR γ im Vergleich zu anderen Faktoren relativ gering ist, werden PPAR-spezifische von anderen Protein-DNA-Komplexen im Gel leicht überdeckt (Palmer *et al.* 1995, Galli *et al.* 2001). In Literaturdaten werden PPAR-EMSA in der Regel mit rekombinantem PPAR-Protein (Mukherjee *et al.* 1997, Palmer *et al.* 1998, Yu *et al.* 1998) oder mit Extrakten aus transfizierten Zellen durchgeführt, die ein PPAR- oder RXR-Expressions-Plasmid (Galli *et al.* 2001, Ijpenberg *et al.* 1997) tragen. PPAR γ bindet, wie verschiedene andere nukleäre Rezeptoren, als obligates Heterodimer mit dem RXR-Rezeptor an das DR-1-Element.

Neben dem Konsensus-Oligo wurde hier als zweite Sonde (*PPAR II*, 2.4.6) die PPRE-Sequenz des Acyl-CoA-Oxidase-Gens eingesetzt (Mukherjee *et al.* 1997). Juge-Aubry *et al.* (1997) haben beschrieben, daß die Bindung von PPAR γ an diese PPRE stärker ist, als die von PPAR α oder PPAR β/δ .

Dem 5' flankierenden Bereich (*Flanking Region*) scheint bei der Festlegung der Spezifität des DR-1-Elements für die Bindung von verschiedenen nukleären Rezeptoren eine entscheidende Rolle zuzukommen (Palmer *et al.* 1995). Als dritte Sonde (*PPAR III*, 2.4.6) wurde daher ein Oligonukleotid eingesetzt, das sich aus einer Konsensus-5' *Flanking Region* und dem DR-1-Element des PPREs des Malat-Enzyms (*malic enzyme*) zusammensetzt (Ijpenberg *et al.* 1997).

Um die Sensitivität des EMSA zu erhöhen, wurden nicht die gleichen Zellen wie in den vorangegangenen Untersuchungen eingesetzt, sondern es wurden Zelllinien ausgewählt, in denen eine relativ hohe PPAR-Expression zu erwarten war.

Die Zellen (HT29 und MonoMac6) wurden mit verschiedenen Testsubstanzen inkubiert, anschließend wurden Kernextrakte hergestellt und deren Proteinkonzentration ermittelt. Analoge Mengen an Kernprotein wurden dann auf ihre Bindung an die ³²P-markierten PPAR-spezifischen Oligonukleotide in einem nicht-denaturierenden PAGE analysiert.

Die Expression von PPAR γ wurde in der Literatur sowohl in primären Monozyten / Makrophagen (Ricote *et al.* 1998a, Jiang *et al.* 1998, Huang *et al.* 1999) als auch im Monozyten-Zelllinien (Ricote *et al.* 1998b, Pelton *et al.* 1999, Shu *et al.* 2000) beschrieben.

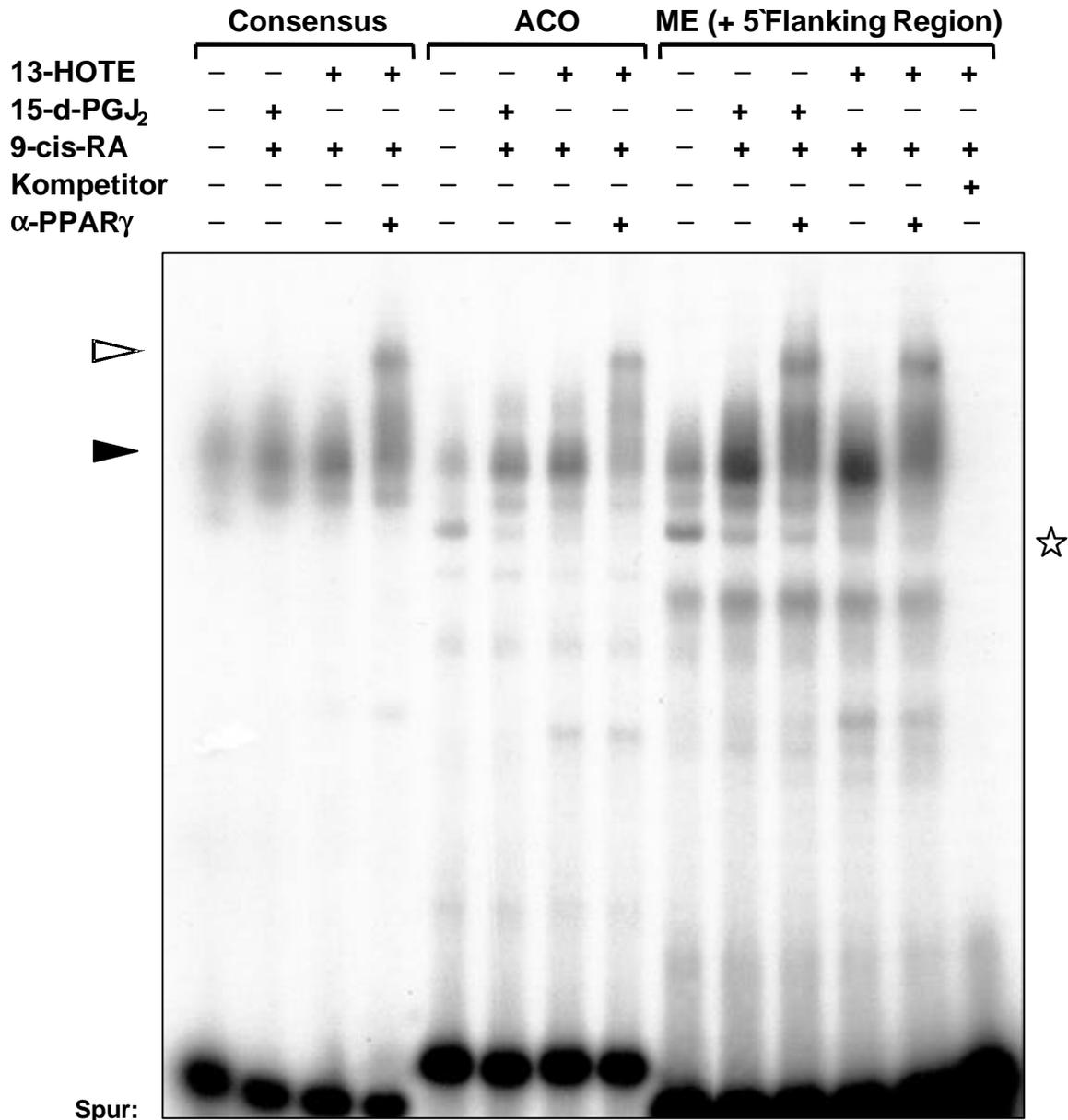


Abb. 3.23: Induktion der PPAR γ /RXR-DNA-Bindung durch 13-HOTE. MonoMac6-Zellen wurden mit Medium (Negativ-Kontrolle), 10 μ M 15-d-PGJ₂ + 0,5 μ M 9-cis-RA (Positiv-Kontrolle) bzw. 100 μ M 13-HOTE + 0,5 μ M 9-cis-RA inkubiert. Nach 24 h wurden Kernextrakte hergestellt und gleiche Mengen an Kernprotein durch EMSA analysiert, hierbei wurden drei verschiedene radioaktive Oligonukleotide verglichen. Der PPAR γ /RXR-DNA-Komplex wird durch die gefüllte Pfeilspitze angezeigt. Zur Überprüfung der Identität des DNA-Komplexes wurden 13-HOTE- (oder auch 15-d-PGJ₂-) behandelte Zellextrakte mit anti-PPAR γ -spezifischem Antikörper inkubiert. Die leere Pfeilspitze deutet auf den durch anti-PPAR γ teilweise retardierten DNA-Komplex hin. Der Stern markiert einen DNA-Komplex mit einem anderen putativen RXR-Heterodimer.

Zunächst wurden daher die verschiedenen markierten DR-1-Oligonukleotide an Kernextrakten der Monocyten-Zelllinie MonoMac6 vergleichend im PPAR γ -EMSA untersucht. Im EMSA-Gel von MonoMac6-Zellen, die mit 13-HOTE bzw. 15-d-PGJ₂ in Kombination mit 9-cis-RA (9-cis-Retinsäure) (zur Aktivierung des RXR-Bindungspartners von PPAR) vorbehandelt wurden, waren verschiedene Protein-DNA-Komplexe sichtbar (Abb. 3.23). Die stärksten Banden im Gel waren mit der Sonde *PPAR III* (2.4.6) detektierbar, jedoch waren hier auch verschiedene mehr oder weniger konstitutive Neben-Banden sichtbar. Das Verschwinden der Komplexe unter Konkurrenz mit nicht markiertem dsOligonukleotid zeigte, daß diese spezifisch für die eingesetzte Sonde waren (*Spur 14*).

Der PPAR γ /RXR-DNA-Komplex konnte durch die Zugabe von spezifischem Antikörper zu den Kernextrakten identifiziert werden, da der Komplex mit anti-PPAR γ im EMSA-Gel retardiert wurde. Ein solcher *Band-Shift* war mit den Kernextrakten aus Zellen zu beobachten, die zuvor mit 15-d-PGJ₂ (*Spur 11*) inkubiert wurden. Analog dazu konnte mit Kernextrakten unter Einfluß von 13-HOTE ein *Gel-Shift* bei allen eingesetzten Oligonukleotiden gezeigt werden (*Spur 4, 8 und 13*).

Ferner war der Komplex unter Medium (*Spur 1, 5 und 9*) weniger stark ausgeprägt als bei Extrakten aus Zellen, die mit 15-d-PGJ₂ (*Spur 2, 6 und 10*) oder 13-HOTE (*Spur 3, 7 und 12*) inkubiert worden waren. Dies deutet auf eine spezifische Aktivierung der PPAR γ -Komplexbildung nicht nur durch 15-d-PGJ₂ sondern auch durch 13-HOTE hin. Dabei lösten 100 μ M 13-HOTE eine vergleichbar starke Wirkung wie 10 μ M 15-d-PGJ₂ aus.

Auffällig war die Existenz eines im EMSA-Gel schneller migrierenden DNA-Komplexes, der in der Medium-Kontrolle (*Spur 1, 5 und 9*) jeweils am stärksten ausgeprägt war und bei vorangehender Inkubation der Zellen mit 13-HOTE bzw. 15-d-PGJ₂ in Kombination mit 9-cis-RA schwächer ausgeprägt war (*Spur 5 und 9*), hierbei könnte es sich um ein PPAR-unabhängiges RXR-Heterodimer handeln.

3.4.2.1.2 Vergleich der PPAR γ /RXR-DNA-Komplex-Bildung verschiedener Zelltypen im EMSA

Eine besonders hohe PPAR γ -Expression wurde neben Adipocyten auch in Colon-Zellen nachgewiesen, dies gilt sowohl für primäre Colon-Zellen (Fajas *et al.* 1997) als auch für die Colonkarzinom-Zelllinie HT-29 (Lefebvre *et al.* 1999, Su *et al.* 1999).

In einem weiteren Versuch sollten PPAR γ /RXR-DNA-Komplexe in Kernextrakten von MonoMac6- und HT29-Zellen verglichen werden. Hierzu wurde das dritte markierte Oligonukleotid (*PPAR III*) als DNA-Bindungspartner eingesetzt.

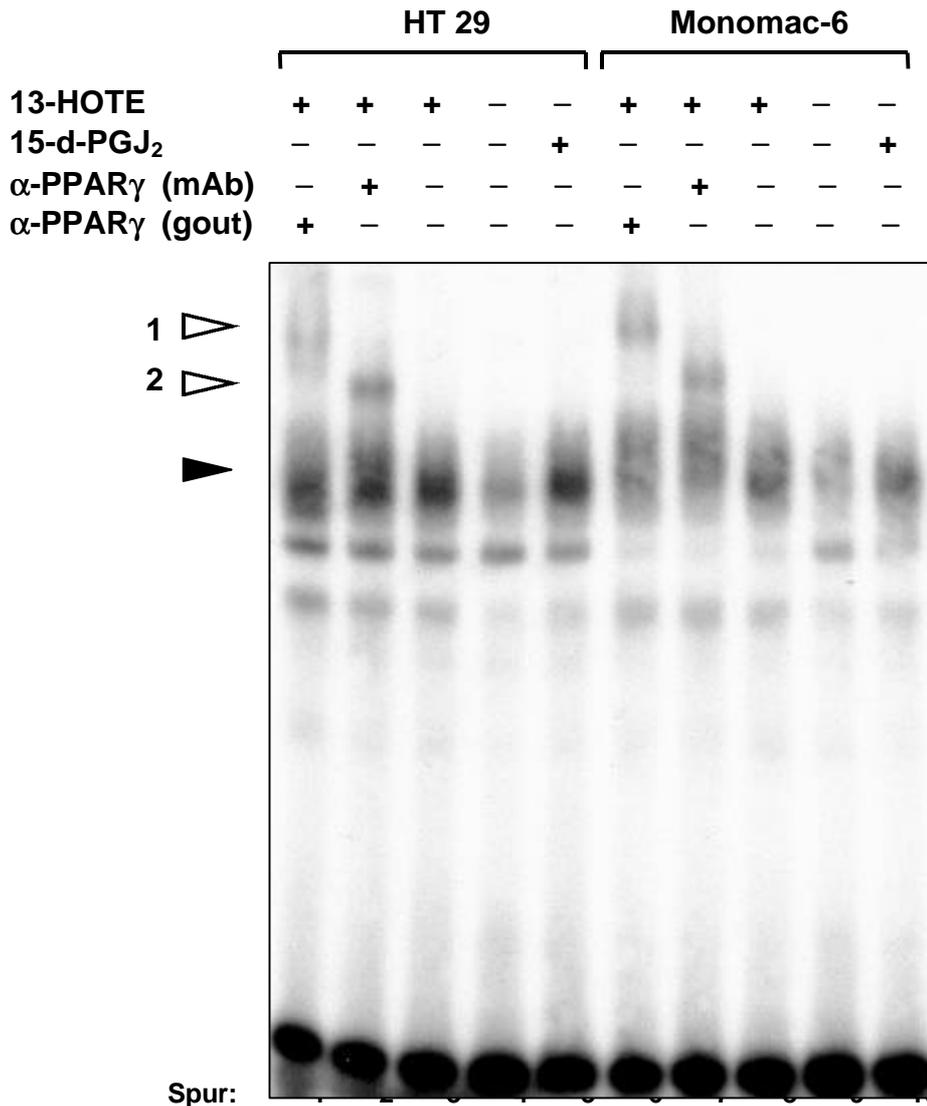


Abb. 3.24: Induktion der PPAR_γ/RXR-DNA-Bindung durch 13-HOTE in HT29- und MonoMac6-Zellen. Die Zellen wurden mit Medium (Negativ-Kontrolle), 10 μM 15-d-PGJ₂ (Positiv-Kontrolle) bzw. 100 μM 13-HOTE inkubiert. Nach 24 h wurden Kernextrakte hergestellt und gleiche Mengen an Kernprotein durch EMSA analysiert, hierbei wurde das dritte radioaktive Oligonukleotide (PPRE-Sequenz des ME mit Konsensus-5' *Flanking Region*) verwendet. Der PPAR_γ/RXR-DNA-Komplex wird durch die gefüllte Pfeilspitze angezeigt. Zur Überprüfung der Identität des DNA-Komplexes wurden Kernextrakte 13-HOTE-behandelter Zellen mit zwei unterschiedlichen anti-PPAR_γ-spezifischen Antikörper (mAb, gout) inkubiert. Die leeren Pfeilspitzen deuten auf die durch anti-PPAR_γ retardierten DNA-Komplexe hin.

Auf der Höhe, in der der PPAR_γ/RXR-DNA-Komplex von MonoMac6-Kernextrakten im EMSA-Gel migrierte, waren auch in den HT29-Proben Komplexe sichtbar (Abb. 3.24). Für Kernextrakte aus HT29-Zellen ergab sich hinsichtlich der Aktivierung von PPAR_γ ein vergleichbares Bild wie bei MonoMac6-Zellen. Nur mit Medium inkubierte Zellen zeigten nur eine schwache Ausbildung des DNA-Komplexes (*Spuren 4 und 9*), wohingegen die Inkubation der Zellen sowohl mit 15-d-PGJ₂ (*Spuren 5 und 10*) als auch mit 13-HOTE

(Spuren 3 und 8) die DNA-Bindung an das markierte Oligonukleotid um ein Vielfaches verstärkte.

Durch Zugabe von zwei unterschiedlichen anti-PPAR γ -Antikörpern zu den Kernextrakten 13-HOTE-vorbehandelter Zellen, konnte die Bande jeweils partiell *geschiftet* werden (Spuren 1,2 und 6,7).

3.4.2.1.3 Zeitabhängige Wirkung des Isopropanol-Extraktes auf die Aktivierung von PPAR γ

Um zu klären, ob die Konzentrationen an putativen PPAR-Liganden im Isopropanol-Extrakt für eine Aktivierung der DNA-Bindung von PPAR γ überhaupt ausreichend sind, wurde auch Kernextrakte von Brennesselblätter-Extrakt-inkubierten Zellen über EMSA analysiert.

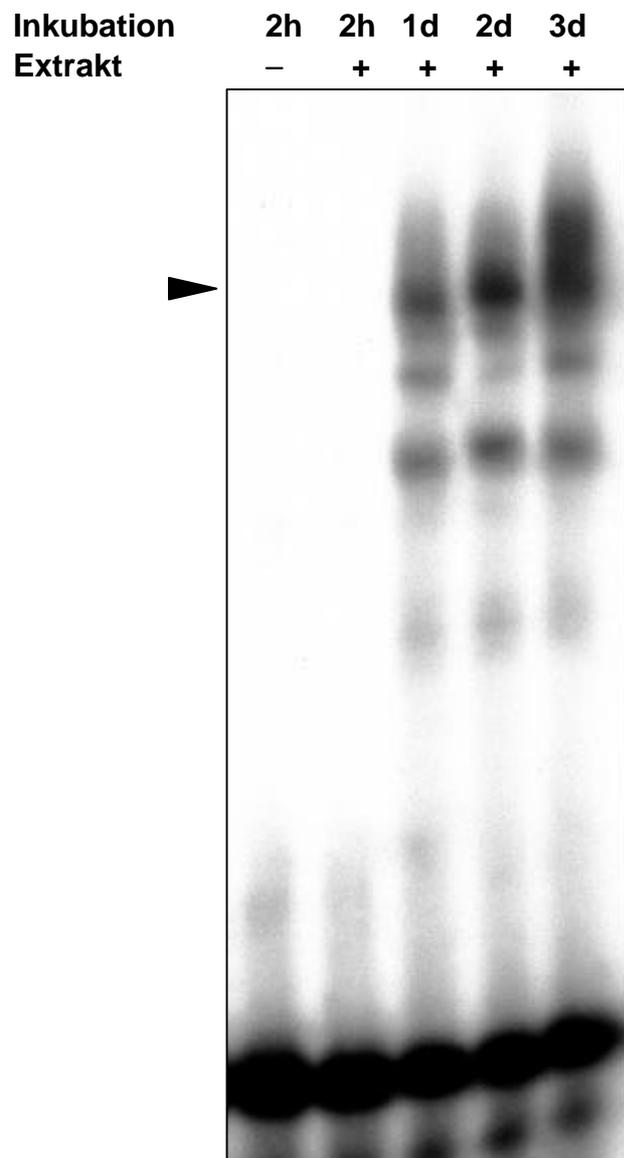


Abb. 3.25: Induktion der PPAR γ /RXR-DNA-Bindung von MonoMac6-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt.

Die Zellen wurden mit 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Extrakt inkubiert oder in Medium gehalten (Negativ-Kontrolle).

Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden Kernextrakte hergestellt und gleiche Mengen an Kernprotein durch EMSA analysiert, hierbei wurde das dritte radioaktive Oligonukleotid (PPAR III: PPRE-Sequenz des *malic enzyme* mit Konsensus-5' *Flanking Region*) verwendet.

Der PPAR γ /RXR-DNA-Komplex wird durch die Pfeilspitze angezeigt.

Mittels einer zeitabhängigen Inkubationsreihe konnte beobachtet werden, daß sich die PPAR γ -DNA-Bindung von MonoMac6-Zellen unter Einfluß von 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Isopropanol-Extrakt mit zunehmender Inkubationsdauer verstärkte (Abb. 3.25). Dies spricht für eine Akkumulierung von PPAR γ -Liganden in den Zellen durch die Stimulation mit Extrakt.

Bei Kernextrakten von 24 h mit Isopropanol-Extrakt inkubierten HT29-Zellen konnte ebenfalls eine verstärkte Ausbildung des PPAR γ / RXR-DNA-Komplexes gezeigt werden (Abb. 3.26). Mit 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Extrakt war im EMSA-Gel eine vergleichbar starke Komplexbildung wie mit 100 μM 13-HOTE oder 10 μM Ciglitazon, einem synthetischen PPAR γ -Agonisten, zu beobachten. Die Restlösemittel-Menge aus der 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Isopropanol-Extrakt-Probe hatte keinen Einfluß auf die Komplexbildung, wie eine Ethanol-Kontrolle (0,2%) zeigte.

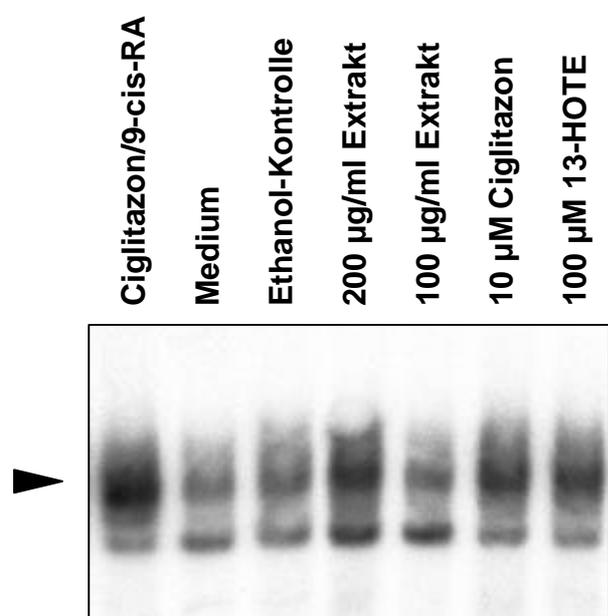


Abb. 3.26: Induktion der PPAR γ / RXR-DNA-Bindung in HT29-Zellen.

Die Zellen wurden mit 13-HOTE, Ciglitazon (\pm 0,5 μM 9-cisRA), isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt oder 0,1 % Ethanol (entsprechend der Menge in 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Brennesselblätter-Extrakt) inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen parallel nur mit Medium gehalten.

Nach 24 h wurden Kernextrakte hergestellt und gleiche Mengen an Kernprotein durch EMSA analysiert, hierbei wurde das erste radioaktive Oligonukleotid (PPAR I) verwendet.

Der PPAR γ / RXR-DNA-Komplex wird durch die Pfeilspitze angezeigt.

3.4.2.1.4 Kooperative Wirkung von 13-HOTE und 9-cis-RA auf die PPAR-Aktivierung

In der Literatur wurde beschrieben, daß die Aktivierung des RXR-Rezeptors durch 9-cis-RA die DNA-Bindungsaktivität von PPAR verstärkt (Kliwer *et al.* 1992, Issemann *et al.* 1993).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich dieser additive Effekt auch bezüglich der durch 13-HOTE induzierten PPAR γ / RXR-DNA-Komplexe von MonoMac6- und HT29-Zellen im EMSA nachweisen läßt.

Tatsächlich konnte in Kernextrakten eine stärker ausgeprägte DNA-Bindung von PPAR γ / RXR-Komplexen unter gleichzeitigem Einfluß von 15-d-PGJ $_2$ oder 13-HOTE und 9-cis-RA deutlich beobachtet werden (Abb. 3.27). Ein additiver Effekt von 9-cis-RA und

Ciglitazon (als PPAR γ -Ligand) konnte auch an Kernextrakten aus HT29-Zellen gezeigt werden (Abb. 3.26).

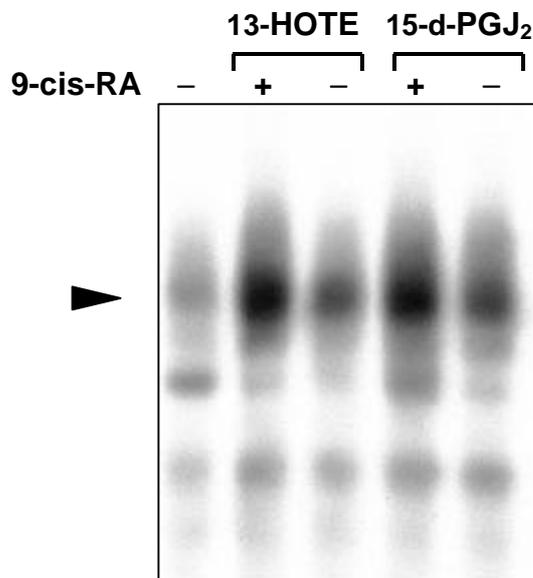


Abb. 3.27: Induktion der PPAR γ /RXR-DNA-Bindung: additiver Effekt von 9-cis-RA.

MonoMac6-Zellen wurden mit 100 μ M 13-HOTE oder 10 μ M 15-d-PGJ $_2$ \pm 0,5 μ M 9-cisRA inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen parallel nur mit Medium gehalten. Nach 24 h wurden Kernextrakte hergestellt und gleiche Mengen an Kernprotein durch EMSA analysiert, hierbei wurde das dritte radioaktive Oligonukleotid (*PPAR III*) verwendet.

Der PPAR γ /RXR-DNA-Komplex wird durch die Pfeilspitze angezeigt.

3.4.2.2 Induktion des PPAR γ -abhängigen CD36-Gens durch verschiedene PPAR-Liganden im Vergleich zu 13-HOTE

Die vorangehenden EMSA-Untersuchungen legten nahe, daß das Oxylipin 13-HOTE ein PPAR γ -Ligand ist und daß ferner von 13-HOTE eine ca. zehnfach höhere Konzentration im Vergleich zu 15-d-PGJ $_2$ für die Aktivierung von PPAR γ /RXR-DNA-Komplexen nötig ist.

CD36 (*macrophage type B scavenger receptor*) ist ein Rezeptor-Protein auf der Oberfläche von Monocyten, Makrophagen, Thrombocyten, Endothelzellen und Adipocyten mit einer Vielzahl bekannter Liganden (Yesner *et al.* 1996, Dhaliwal & Steinbrecher 1999). Am besten untersucht ist die CD36-vermittelte Aufnahme von oxLDL in Monocyten. Inhaltstoffe der oxLDL regulieren durch Stimulation der CD36-Expression die ox-LDL-Aufnahme in die Zelle hoch, dieser Effekt wird durch PPAR γ vermittelt (Han *et al.* 2000).

Mittels der Quantifizierung der Expression von CD36 auf der Oberfläche von mit PPAR-Liganden inkubierten MonoMac6-Zellen, sollte eine Einschätzung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von 13-HOTE getroffen werden.

3.4.2.2.1 Induktion der CD36-Expression auf MonoMac6-Zellen durch 13-HOTE im Vergleich zu bekannten PPAR-Liganden

MonoMac6-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen bekannter PPAR-Liganden bzw. 13-HOTE inkubiert. Die Expression von CD36 wurde nach 28 h auf der Zelloberfläche

mittels eines Fluorochrom-markierten Antikörpers und Messung in einem Durchflußcytometer nachgewiesen.

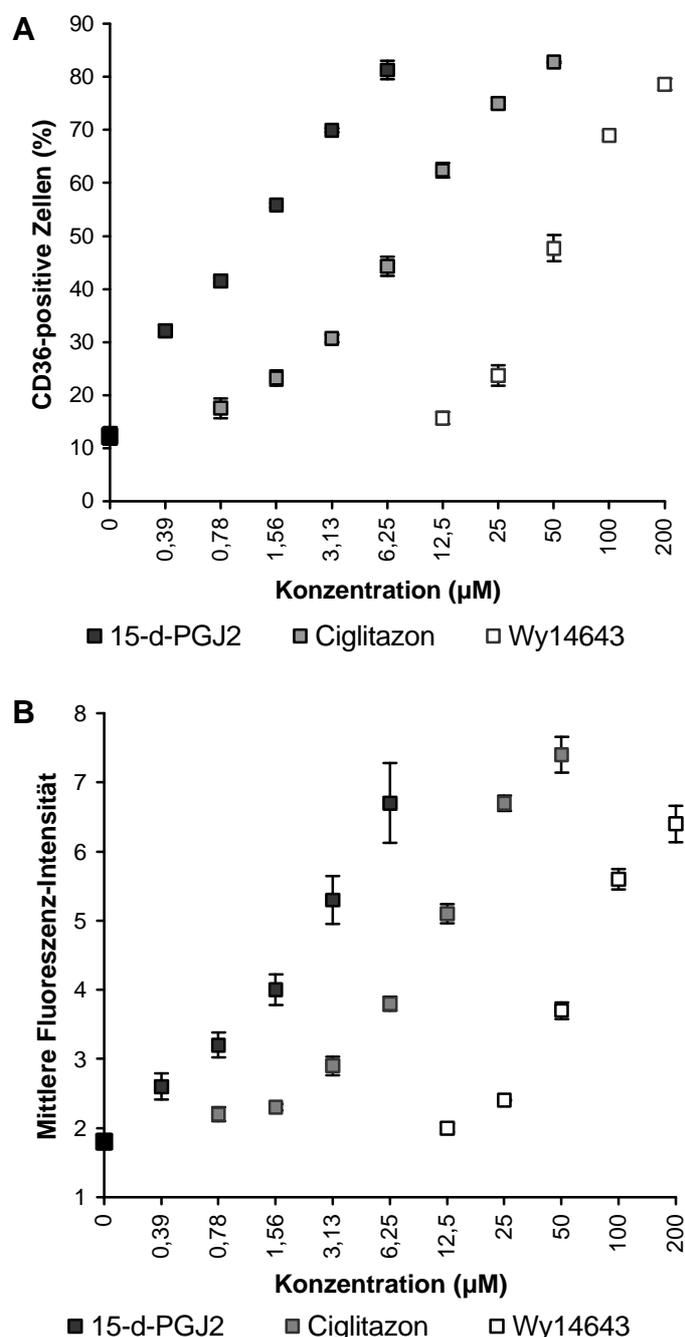


Abb. 3.28: Induktion der CD36-Expression von MonoMac6-Zellen durch PPAR-Liganden.

Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an 15-d-PGJ₂, Ciglitazon oder WY14643 behandelt (n = 3). Nach 28 h wurden parallele Proben entweder mit FITC-markiertem anti-CD36- oder einer entsprechenden Isotyp-Antikörper 30 min inkubiert und anschließend die Fluoreszenz der Zellen durchflußcytometrisch bestimmt. Dabei wurde die unspezifische Fluoreszenz mit Hilfe der Isotyp-Kontrolle kompensiert (Daten: Mittelwert \pm SD).

A. Darstellung der prozentualen Anzahl CD36-positiver Zellen unter Einfluß der verschiedenen Behandlungen.

B. Darstellung der mittleren (grünen) Fluoreszenz-Intensität der Zellen.

Die stärkste Wirkung wurde mit 15-d-PGJ₂ erzielt. Die halbmaximale Induktion (ED₅₀) bezogen auf die Anzahl CD36-positiver Zellen betrug ca. 0,8 μM (Abb. 3.28A).

Ciglitazon (ED₅₀ ca. 7,5 μM) war in ca. 10-fach höherer Konzentration vergleichbar aktiv. Das als synthetischer PPAR α -Ligand beschriebene Fibrat WY14643 war ebenfalls in der Lage, eine CD36-Expression zu induzieren, jedoch wiederum in höheren Konzentrationen (ED₅₀ ca. 50 μM). Bei Betrachtung der mittleren Fluoreszenz-Intensität der CD36-Markierung ergab sich ein vergleichbares Bild (Abb. 3.28B). Dies bedeutet, daß die PPAR-Liganden nicht nur

die Anzahl der CD36-positiven Zellen positiv beeinflusst, sondern auch die Menge an CD36-Protein auf jeder positiven Zelle (maximal 4-fach) steigert. (AllamarBlue-Test: *Tabelle 6.20*).

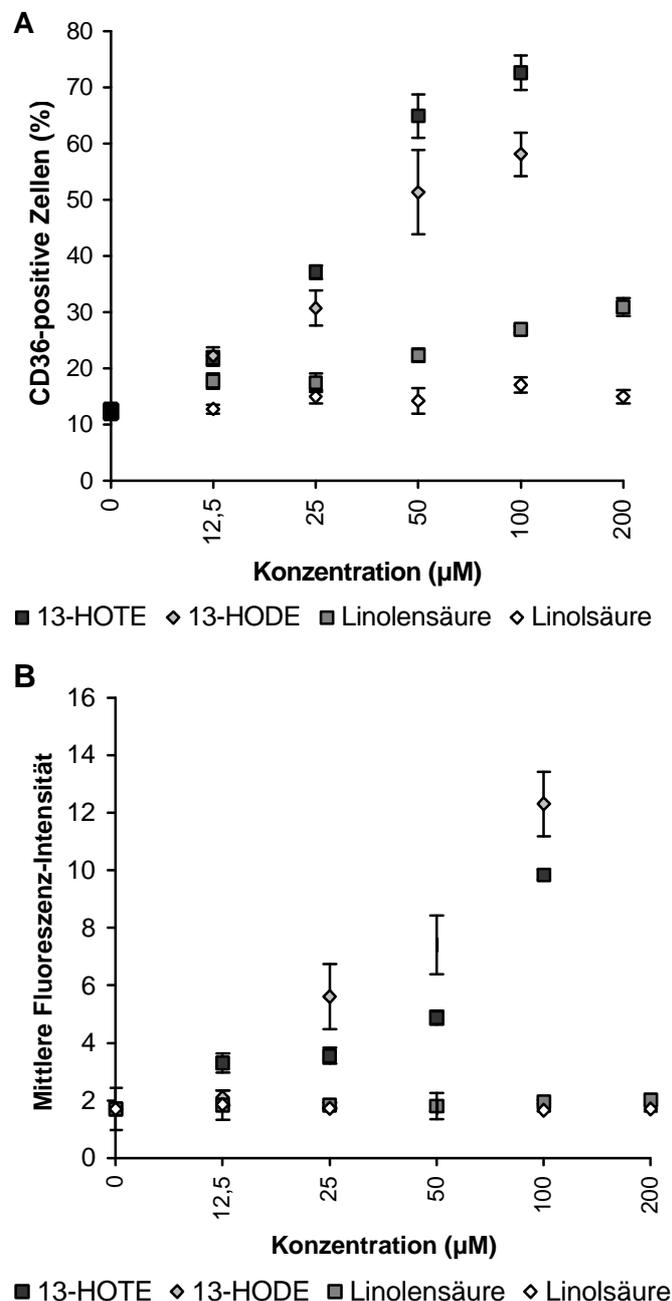


Abb. 3.29: Einfluß verschiedener Inhaltsstoffe von Brennesselblätter-Extrakt auf die CD36-Expression von MonoMac6-Zellen.

Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von 13-HOTE, 13-HODE, Linolen- und Linolsäure inkubiert ($n = 3$). Nach 28 h wurden parallele Proben entweder mit FITC-markiertem anti-CD36- oder einem entsprechenden Isotyp-Antikörper 30 min inkubiert und anschließend die Fluoreszenz der Zellen durchflußcytometrisch bestimmt. Dabei wurde die unspezifische Fluoreszenz mit Hilfe der Isotyp-Kontrolle kompensiert (Daten: Mittelwert \pm SD).

A. Darstellung der Anzahl CD36-positiver Zellen unter den verschiedenen Behandlungen.

B. Darstellung der mittleren grünen Fluoreszenz-Intensität der Zellen.

Im Vergleich dazu wurden auch Inhaltsstoffe des isopropanolischen Brennesselblätter-Extraktes auf eine potentielle induzierende Wirkung auf die CD36-Expression von MonoMac6-Zellen untersucht. Unter Einfluß von 13-HOTE konnte eine vergleichbar starke Expression von CD36 wie unter den oben beschriebenen PPAR-Liganden erzielt werden. Dies galt sowohl für die Anzahl der positiven Zellen als auch für die mittlere Fluoreszenz-Intensität der Zellen (*Abb. 3.29*). Im Bezug auf die Wirkstärke war 13-HOTE mit einer ED_{50} von ca. 35 μ M dabei zwischen Ciglitazon und Wy14643 einzuordnen. Der Effekt war

ebenfalls vergleichbar mit der Induktion der CD36-Expression durch 13-HODE (ED_{50} ca. 50 μ M). Dieses (in geringeren Mengen im Brennesselblätter-Extrakt enthaltene) Oxylinpin wurde bereits als PPAR γ -Ligand beschrieben (Nagy *et al.* 1998), seine induktiven Effekte auf die CD36-Expression sind ebenfalls bekannt (Tontonoz *et al.* 1998).

Unter Einfluß von Linolensäure steigt die Anzahl der CD36-positiven Zellen nur geringfügig bis auf maximal 30 % an (bei Inkubation der Zellen mit 200 μ M Linolensäure). Linolensäure hat keinen Einfluß auf die CD36-Expression von MonoMac6-Zellen.

(AllamarBlue-Test: *Tabelle 6.21*).

3.4.2.2 Kooperative Wirkung von 13-HOTE und 9-cis-RA bei der Induktion der CD36-Expression

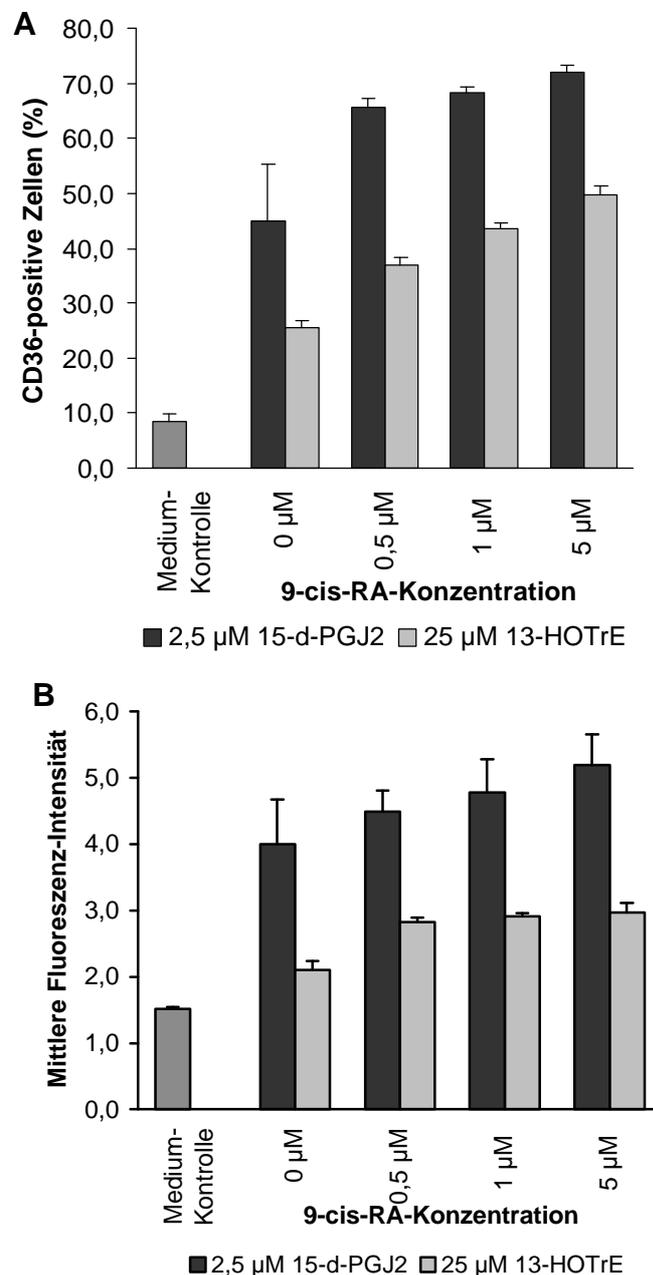


Abb. 3.30: Additiver Einfluß von 9-cis-RA auf die Induktion der CD36-Expression von MonoMac6-Zellen durch 13-HOTE oder 15-d-PGJ₂.

Die Zellen wurden mit 25 μ M 13-HOTE bzw. 2,5 μ M 15-d-PGJ₂ in Kombination mit variierenden Konzentrationen von 9-cis RA oder nur mit Medium (Negativ-Kontrolle) inkubiert (n = 3).

Nach 28 h wurden parallele Proben entweder mit FITC-markiertem anti-CD36- oder einer entsprechenden Isotyp-Antikörper 30 min inkubiert und anschließend die Fluoreszenz der Zellen durchflußcytometrisch bestimmt. Dabei wurde die unspezifische Fluoreszenz mit Hilfe der Isotyp-Kontrolle kompensiert (Daten: Mittelwert + SD).

A. Darstellung der Anzahl CD36-positiver Zellen unter den verschiedenen Behandlungen.

B. Darstellung der mittleren grünen Fluoreszenz-Intensität der Zellen.

Da die CD36-Expression über eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen induziert werden kann (König *et al.* 1995, Armesilla *et al.* 1996), sollte hier untersucht werden, ob die hier dargestellte Induktion der CD36-Expression durch 13-HOTE hauptsächlich über eine PPAR-Aktivierung vermittelt wurde. Bei einer maßgeblichen Regulation über PPAR wäre zu erwarten, daß eine gleichzeitige Gabe von RXR-Ligand einen additiven Effekt auf die CD36-Expression hat.

MonoMac-6-Zellen wurden mit einer suboptimalen Dosierung an 13-HOTE (25 µM) bzw. 15-d-PGJ₂ (2,5 µM) in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen 9-cis-RA 28 h inkubiert und der Effekt auf die CD36-Expression anschließend durchflußcytometrisch analysiert. Sowohl unter Inkubation mit 13-HOTE als auch unter Einfluß der Kontrolle (15-d-PGJ₂) stieg die CD36-Expression mit zunehmender Konzentration von 9-cis-RA an (*Abb. 3.30*). Dieser additive Effekt war sowohl im Hinblick auf die Anzahl der CD36-positiven Zellen als auch etwas schwächer bezüglich der mittleren Fluoreszenz-Intensität zu beobachten.

(AllamarBlue-Test: *Tabelle 6.22*).

3.4.2.2.2 Zeitabhängige Wirkung von isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt auf die CD36-Expression

Auch unter Einfluß des Isopropanol-Extraktes konnte nach 28 h Inkubation eine deutliche Induktion der CD36-Expression von MonoMac6-Zellen beobachtet werden. Die Anzahl der CD36-positiven Zellen wurde von 10 % auf maximal 50 % erhöht. Die mittlere Fluoreszenz-Intensität war jedoch nur geringfügig gegenüber der Mediumkontrolle erhöht (*Abb. 3.31*).

Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 44 h konnte auch unter Inkubation der Zellen mit Extrakt eine vergleichbare Expression wie nach 28 h Inkubation mit den untersuchten PPAR γ -Liganden erzielt werden. Auch diese Ergebnis spricht dafür, daß in Brennesselblätter-Extrakt enthaltene PPAR-Liganden gezielt in den Zellen akkumuliert werden und somit Liganden-Konzentrationen in der Zelle erreicht werden, die PPAR-abhängige Gene aktivieren können.

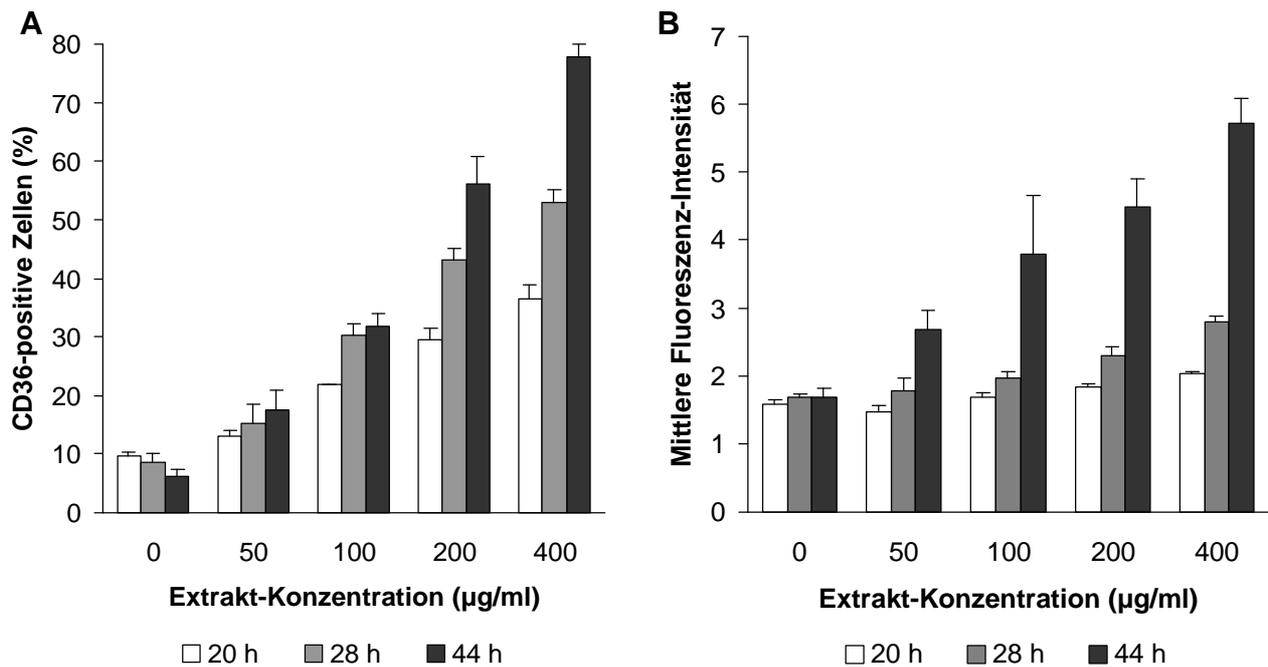


Abb. 3.31: Induktion der CD36-Expression von MonoMac6-Zellen durch isopropanolischen Brennesselblätter-Extrakt: Zeitabhängigkeit.

Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen Brennesselblätter-Extrakt für 28 h inkubiert (n = 3). Parallele Proben wurden entweder mit FITC-markiertem anti-CD36- oder einer entsprechenden Isotyp-Antikörper 30 min inkubiert und anschließend die Fluoreszenz der Zellen durchflußcytometrisch bestimmt. Dabei wurde die unspezifische Fluoreszenz mit Hilfe der Isotyp-Kontrolle kompensiert (Daten: Mittelwert + SD).

A. Darstellung der prozentualen Anzahl CD36-positiver Zellen unter den verschiedene Behandlungen.

B. Darstellung der mittleren (grünen) Fluoreszenz-Intensität der Zellen.

4 Diskussion

Die Pathogenese rheumatischer Erkrankungen wie RA und OA resultiert aus fehlgeleiteten Entzündungsreaktionen, die durch aktivierte Immunzellen aufrecht erhalten werden. Die chronisch erhöhte Sekretion proinflammatorischer Cytokine im betroffenen Gelenk spielt dabei eine zentrale Rolle (siehe 1.2). Die therapeutische Relevanz einer Suppression der Cytokine für die Rheumatherapie spiegelt sich in der Verwendung immunsuppressiver Arzneistoffe wie CyA, FK506 und Glucocorticoiden wider (siehe 1.3.2).

Extrakte aus Brennesselblättern finden in Deutschland in der Therapie rheumatischer Erkrankungen seit vielen Jahren Anwendung. Obwohl die klinische Wirksamkeit gut dokumentiert ist und Positiv-Monographien von BGA und ESCOP vorliegen, ist über den genauen Wirkmechanismus, ebenso wie über die wirksamen Inhaltsstoffe, von Brennessel-Präparaten noch wenig bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war, wirksame Inhaltsstoffe aus Brennesselblättern zu identifizieren und hinsichtlich der antiinflammatorischen Wirkung *in vitro* zu charakterisieren.

4.1 50 % ethanolischer Brennesselblätter-Extrakt beeinflusst die *In-vitro*-Expression T_H-spezifischer Cytokine

T_H1-Zellen sind an der Initiation von T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie der RA beteiligt, da sie körpereigene Antigene als fremd erkennen (siehe 1.2). Ferner spielen T_H1-Zellen als Effektorzellen bei der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion bei allen rheumatischen Erkrankungen eine entscheidende Rolle (Panayi *et al.* 1992, Espinoza-Delgado *et al.* 1995). Über die Ausschüttung ihrer spezifischen Cytokine (IL-2 und IFN- γ) aktivieren sie Monocyten, die wiederum eine ganze Kaskade entzündlicher Reaktionen im Gelenk in Gang setzen (siehe 1.2).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die PHA-stimulierte Produktion T_H1-spezifischer Cytokine in Monocyten-depletierten PBMC durch Inkubation mit 50 % ethanolischen Brennesselblätter-Extrakt (Fertigarzneimittel) inhibiert wird. Diese Cytokin-Suppression scheint zumindest partiell auf Transkriptionsebene zu erfolgen, da mittels RT-PCR gezeigt werden konnte, daß auch die Menge an IL-2- und IFN- γ -spezifischen mRNA-Transkripten unter Einfluß des Extraktes reduziert wird (*Abb. 3.3*).

Im Gegensatz zu der inhibitorischen Wirkung auf die Expression von IL-2 und IFN- γ wird die Produktion des T_H2-spezifischen Cytokins IL-4 unter Einfluß des 50 % ethanolischen Extraktes stimuliert (Klingelhöfer *et al.* 1999).

Die beiden T_H-Zell-Populationen werden über ihre antagonistischen Cytokin-Muster kreuzreguliert (Seder & Paul 1994). Als eine mögliche Therapie von Autoimmunerkrankungen wie der RA wurde daher auch die Gabe von IL-4 (zur Induktion eines T_H2-Shifts) diskutiert (Roecken *et al.* 1996). Ferner wurde beschrieben, daß die antiinflammatorische Wirkung von Vitamin D₃ auf einem T_H2-Shift beruht (D'Ambrosio *et al.* 1998).

Die hier gezeigten Daten sprechen dafür, daß Inhaltsstoffe aus Brennesselblättern die Differenzierung der T_H-Populationen ebenfalls in Richtung T_H2 modifizieren könnten.

4.2 Die *In-vitro*-Inhibition der induzierbaren IL-2-Expression von Jurkat-T-Zellen ist ein reproduzierbarer und sensitiver Meßparameter für die Wirkung von Brennesselblätter-Extrakt

Ein Ziel der Arbeit sollte die Etablierung eines *In-vitro*-Testsystems für die Bewertung der antiinflammatorische Wirkung von Brennessel-Inhaltsstoffen sein. Anhand der in 4.1 beschriebenen Ergebnisse wird deutlich, daß die Expressionsstärken von IL-2- oder IFN- γ -Proteinen gut meßbare Parameter der Wirkung von Brennesselblätter-Extrakt auf Immunzellen darstellen und daher als *Screening*-Parameter geeignet sind. Aufgrund der starken Schwankungen der absoluten Cytokin-Expression von isolierten PBMC einzelner Probanden, wurde anstelle der primären Zellen eine T-Zelllinie für den *Screening*-Assay eingesetzt.

Durch Inkubation der Zellen mit 50 % ethanolischem Brennesselblätter-Extrakt (Fertigarzneimittel) wurde die PHA / PMA-stimulierte IL-2-Expression der Jurkat-T-Zellen dosisabhängig um maximal 74 ± 10 % ($n = 8$) inhibiert (Abb. 3.4). Die Korrelation von Dosis und Wirkung war mit $R > 0,9$ sehr gut und bereits bei einer Extrakt-Konzentration von 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ war die Verminderung der IL-2-Expression signifikant nachweisbar. Somit konnte durch den Einsatz der Jurkat-T-Zelllinie die Messung der stimulierbaren IL-2-Expression als sensitiver und reproduzierbarer Nachweis der *In-vitro*-Wirkung von Brennesselblätter-Extrakt etabliert werden.

4.3 Lipophile Brennesselblätter-Extrakte haben eine größere Wirkstärke im Jurkat-Assay

Analog zu 50 % ethanolischem Extrakt (Fertigarzneimittel) wurden im Rahmen der Arbeit verschiedene Brennesselblätter-Extrakt-Varianten sowie Fraktionen daraus auf ihre antiinflammatorische Wirkung *in vitro* überprüft (siehe Abb. 3.5).

Durch den Vergleich unterschiedlich polarer Extraktionen frischer Brennesselblätter konnte hier gezeigt werden, daß das Auszugsmittel nicht nur die quantitative Zusammensetzung der Extrakte bestimmt, sondern damit auch deren antiinflammatorische Wirkung beeinflusst (Tabelle 3.1). Isopropanol reichert als lipophileres Extraktionsmittel effektiver IL-2-supprimierende Wirkstoffe aus den Blättern an als wässrige oder wässrig / ethanolische Auszugsmittel. Dies zeigt auch die Untersuchung eines isopropanolischen Extraktes aus Blattdroge, der im Vergleich zu 50 % ethanolischem Extrakt (Fertigarzneimittel) im Jurkat-Assay in geringeren Konzentrationen wirksam ist (Abb. 3.7, 3.9). Ferner kann durch einen isopropanolischen Auszug aus dem Fertigarzneimittel (Ethanol-Isopropanol-Extrakt) eine Dosisreduktion im Jurkat-Assay erreicht werden (Abb. 3.7).

Die vergleichende Untersuchung fünf unterschiedlich polarer, über präparative RP-HPLC isolierter Fraktionen aus 50 % ethanolischem Extrakt ergab, daß die "semilipophile Fraktion" die beste Dosis-Wirkung hinsichtlich der IL-2-Suppression zeigte (Abb. 3.6).

Die hier dargestellten *In-vitro*-Ergebnisse weisen erstmals darauf hin, daß "semilipophile" (z.B. isopropanolische) Extraktionsverfahren am besten für eine Anreicherung antiinflammatorischer Inhaltsstoffe aus Brennesselblätter geeignet sind. Die bisher als Arzneimittel eingesetzten Brennesselblatt-Aufarbeitungen werden hingegen durch wässrige oder 50 % ethanolische Extraktion hergestellt.

4.4 Identifizierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Oxylipinen als IL-2-supprimierende Inhaltsstoffe lipophiler Brennesselblätter-Extrakte

Die vergleichende Untersuchung verschiedener Extrakt-Varianten im Jurkat-Assay war der erste Schritt der Anreicherung einzelner wirksamer Inhaltsstoffe. Aus Ethanol-Isopropanol-Extrakt wurden mittels präparativer RP-HPLC Fraktionen gewonnen und deren Wirksamkeit im Jurkat-Assay überprüft. In Fraktionen, die eine inhibierende Wirkung auf die IL-2-Expression zeigten, konnten über ¹H-NMR bzw. RP-HPLC α -Linolensäure und deren Hydroxy-Derivat 13-HOTE (Abb. 3.10, 3.11) bzw. Linolensäure und 13-HODE identifiziert werden (3.2.2.2).

Durch eine weitere Auftrennung der HOTE-Fraktion über SP-HPLC konnte gezeigt werden, daß neben dem 13-HOTE auch die Positionsisomere 9-, 12 und 16-HOTE vorkamen (Tabelle 3.4). Hydroxy-Fettsäuren können entweder durch Autoxidation oder gezielt durch eine Lipoxygenase (LOX)-abhängige Reaktion entstehen. Da die Brennesselblätter bei der Herstellung der Blattdroge an der Luft getrocknet werden, wäre eine rein autoxidative Synthese von HOTE denkbar. Kohlmann *et al.* (1999) konnten zeigen, daß unter physiologischen Bedingungen im Hafer-Blatt nach Jasmonsäure-Stimulation nur die

Positionsisomere 13-HOTE und 9-HOTE (im Verhältnis 10 : 1) gebildet werden. Bei der Autoxidation von Linolensäure entstehen alle vier Positionsisomere (9-, 12-, 13- und 16-HOTE), vorwiegend jedoch 12-HOTE (Kohlmann *et al.* 1999). Kohlmann *et al.* konnten ferner nachweisen, daß diese Positionsisomere als racemisches Gemisch der R- und S-Enantiomere vorliegen.

Die Analyse der HOTE-Fraktion aus Brennesselblätter-Extrakt in SP- und CP-HPLC zeigte, daß vorrangig 13- und 9-HOTE im Extrakt vorkommen und daß diese beiden Positionsisomere im Gegensatz zu 12- und 16-HOTE vorwiegend in der S-Form vorliegen (Tabelle 3.4). Dies deutet darauf hin, daß autoxidative Prozesse bei der HOTE- Synthese nur eine untergeordnete Rolle spielen und daß die vorherrschenden Positionsisomere 13- und 9-HOTE durch eine LOX-katalysierte Reaktion in Brennesselblättern entstehen.

Neben der HPLC-Fraktionierung lipophiler Extrakte wurde auch die alkalische Verseifung als Methode eingesetzt, um Fettsäuren und Oxylipine gezielt von anderen lipophilen Inhaltsstoffen wie z.B. Phytosterolen abzutrennen. Die stark mit Fettsäuren angereicherte Heptan-Fraktion zeigte wie erwartet ebenfalls eine starke IL-2-supprimierende Wirkung im Jurkat-Assay (Abb. 3.9).

Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, daß die inhibitorische Wirkung auf die IL-2-Expression aller im Jurkat-Assay untersuchten Fraktionen mit ihrem Gehalt an Fettsäuren und Oxylipinen korreliert. Diese Ergebnisse legen nahe, daß diese Stoffgruppe einen bedeutenden Anteil an der gezeigten *In-vitro*-Wirkung von Brennesselblätter-Extrakt auf die T-zelluläre Cytokin-Expression hat.

Dies wird durch den Nachweis der Wirkung der synthetischen Monosubstanzen (Linolensäure, 13-HOTE, Linolsäure und 9-HODE) im Jurkat-Assay bestätigt (Abb. 3.12, 3.13). Ein Vergleich der IC₅₀-Werte zeigt, daß der wirksame Konzentrationsbereich der synthetischen Fettsäure-Derivate im Jurkat-Assay vergleichbar mit dem antiinflammatorischen Wirkstoff Vitamin D₃ ist (Tabelle 3.2). Mit pharmakologisch relevanten Dosierungen von Vitamin D₃ konnte eine immunmodulatorische Wirksamkeit in experimentellen Modellen von Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden (Lemire *et al.* 1991, Mathieu *et al.* 1992). Die Hemmung der IL-2-Expression aktivierter T-Zellen wurde bereits vielfach beschrieben und gilt als Haupt-Wirkung von Vitamin D₃ (Bhalla *et al.* 1984, Lemire *et al.* 1985, Rigby *et al.* 1987).

Die ähnliche Wirkstärke im Vergleich zu Vitamin D₃ deutet daher darauf hin, daß die identifizierten Fettsäurederivate auch *in vivo* einen Anteil an der antirheumatischen Wirksamkeit von Brennesselblätter-Extrakten haben könnten.

Neben der vergleichbaren Dosis-Wirkung von Fettsäure-Derivaten und Vitamin D₃ im Jurkat-Assay weist der zu Vitamin D₃ analoge IL-4-induzierende Effekt des Brennesselblätter-

Extraktes (Klingelhöfer *et al.* 1999) zudem auf Parallelen im Wirkmechanismus von Extrakt-Inhaltsstoffen und Vitamin D₃ hin.

4.5 13-HOTE inhibiert die LPS-induzierte IL-1 β - und TNF- α -Expression von PBMC

Eine Vielzahl von Entzündungsparametern sind für die Pathogenese rheumatischer Erkrankungen von Bedeutung. Daher wurden die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten IL-2-supprimierenden Inhaltsstoffe von Brennesselblättern *in vitro* weiter charakterisiert.

Die monocytären Cytokine IL-1 β und TNF- α nehmen bei der Vermittlung von Entzündungsreaktionen eine zentrale Rolle ein (siehe 1.2). Die therapeutische Relevanz einer Suppression dieser beiden Cytokine für die Pathogenese rheumatischer Erkrankungen wird durch die klinische Wirksamkeit selektiver TNF- α - oder IL-1-Antagonisten deutlich (Lovell *et al.* 2000, Feldmann *et al.* 1999, Harriman *et al.* 1999, Bresnihan *et al.* 1998, Gabay & Arend 1998).

Eine Inhibition der monocytären Cytokin-Produktion wurde bereits von Obertreis *et al.* (1996a) für 50 % ethanolischen Brennesselblätter-Extrakt (Fertigarzneimittel) *in vitro* an LPS-stimulierten Vollblutkulturen gezeigt. Darin wird eine dosisabhängige Abnahme der IL-1 β - (IC₅₀ = 1,25 mg / ml) und TNF- α -Produktion (IC₅₀ = 5 mg / ml) beschrieben.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fettsäure- und Oxylipin- angereicherten Extrakte (siehe *Tabelle 3.2*) haben eine deutliche inhibitorische Wirkung auf die LPS-stimulierte monocytäre Cytokin-Expression von PBMC. Diese Extrakte sind in geringeren Konzentrationen im Vergleich zu den Vollblut-Untersuchungen von Obertreis *et al.* wirksam, dies wird vor allem anhand der IL-1 β -Inhibition (IC₅₀: 20 - 50 μ g / ml) deutlich (*Abb. 3.14 - 3.16*).

Analog zu den Ergebnissen von Obertreis *et al.* (1996a) wurde auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet, daß die inhibitorische Wirkung von Brennesselblätter-Extrakten auf die TNF- α -Expression geringer ist als auf die IL-1 β -Expression. Dies könnte durch relativ hohe Spiegel an TNF- α -mRNA-Transkripten in unstimulierten Zellen erklärt werden. Findet die Inhibition auf Ebene der Transkription des TNF- α -Gens statt, würde folglich die Translation der schon vorhandenen Transkripte nicht beeinflusst werden.

Von den getesteten Monosubstanzen hat 13-HOTE einen deutlichen inhibitorischen Einfluß auf die LPS-induzierte IL-1 β -Expression von PBMC (*Abb. 3.17, 3.18*). Die Dosis-Wirkung der aus Brennesselblätter-Extrakt isolierten HOTE-Fraktion und synthetischem 13-(S)-HOTE ist vergleichbar. Analog zu den Extrakten fällt die inhibitorische Wirkung auf die induzierbare TNF- α -Expression geringer aus.

4.6 13-HOTE inhibiert *in vitro* die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

MMPs bilden eine Familie Zink-abhängiger Endopeptidasen, die eine wichtige physiologische Rolle beim *Turnover* der extrazellulären Matrix spielen (Dean *et al.* 1989, Martel-Pelletier *et al.* 1994). Im Falle der OA und RA resultiert die entzündungsvermittelte längerfristige Überproduktion dieser Enzyme (v.a. MMP-1, MMP-3 und MMP-9) in einer pathophysiologischen Zerstörung der Collagen-Matrix des Gelenkknorpels (Martel-Pelletier *et al.* 1994, Freemont *et al.* 1997, Saito *et al.* 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß isopropanolischer Brennesselblätter-Extrakt *in vitro* eine starke inhibitorische Wirkung auf die ConA- und LPS-stimulierbare MMP-9-Expression primärer Monocyten hat (Abb. 3.19). Ferner konnte ein hemmender Einfluß von 13-HOTE auf die IL-1 β -stimulierte MMP-1- und MMP-3-Expression primärer Chondrocyten nachgewiesen werden (Abb. 3.20). Eine sehr empfindliche inhibitorische Wirkung von Isopropanol-Extrakt und 13-HOTE auf die MMP-Expression von Chondrocyten konnte auch von Schulze-Tanzil *et al.* (2001) durch Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestätigt werden.

Somit konnte gezeigt werden, daß die Expression proinflammatorischer Genprodukte *in vitro* nicht nur in Immunzellen sondern auch in Knorpelzellen durch Inkubation mit Brennesselblätter-Extrakt supprimiert wird.

4.7 Ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B der molekulare Angriffspunkt von Inhaltsstoffen aus Brennesselblätter-Extrakten, wie 13-HOTE ?

Nicht nur für Brennesselblätter-Extrakt sondern auch für die Monosubstanz 13-HOTE konnte ein inhibitorischer Einfluß auf die Expression verschiedener Cytokine und MMPs in unterschiedlichen Zelltypen gezeigt werden. Daher besteht die Möglichkeit, daß ein gemeinsamer Faktor in der Regulation dieser Gene der Angriffspunkt dieses Oxylipins ist.

Einen Hinweis auf den molekularen Mechanismus von Inhaltsstoffen aus Brennesselblättern geben die EMSA-Untersuchungen von Riehemann *et al.* (1999), die eine inhibitorische Wirkung von 50 % ethanolischem Brennesselblätter-Extrakt auf die Aktivierung von NF- κ B zeigen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten EMSA-Untersuchungen mit isopropanolischem Extrakt bestätigen die hemmende Wirkung von Brennesselblätter-Extrakt auf die Aktivierung von NF- κ B. Sowohl an primären PBMC als auch an Jurkat-T-Zellen konnte die dosisabhängige Inhibition der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B mit 100 - 800 μ g / ml Isopropanol-Extrakt nachgewiesen werden (Abb. 3.21, 3.22). Da bei den Untersuchungen

mit 50 % ethanolischem Brennesselblätter-Extrakt 2,5-10 mg / ml eingesetzt wurden (Riehemann *et al.* 1999), zeigt sich somit eine analoge Dosis-Reduktion durch lipophile Extraktion der Brennesselblätter, wie sie hier bereits in Bezug auf die Cytokin-supprimierende Wirkung gezeigt werden konnte. Dies deutet darauf hin, daß Fettsäurederivate auch in die Inhibition der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B involviert sind. Dennoch sind die im NF- κ B-EMSA wirksamen Konzentrationen von isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt im Vergleich zu den hier gezeigten Cytokin- und MMP-Daten relativ hoch. Dies ist auch für die Monosubstanzen zu beobachten. Unter Einfluß von 13-HOTE ist ein inhibitorischer Einfluß auf die NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität erst ab einer Konzentration von 200 μ M nachzuweisen (*Abb. 3.22*). Jedoch ist die wirksame Konzentration der hier als Positiv-Kontrollen verwendeten PGs (PGA₁ und 15-d-PGJ₂) mit 25 μ M ebenfalls sehr hoch. In der Literatur wurden Effekte von 15-d-PGJ₂ auf die Expression proinflammatorischer Cytokine bereits in Konzentrationen von 1-10 μ M sowohl in T-Zellen (Jiang *et al.* 1998) als auch in Monocyten (Yang *et al.* 2000) beschrieben. Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen im NF- κ B-EMSA deuten daher darauf hin, daß die Cytokin-supprimierende Wirkung von Isopropanol-Extrakt, 13-HOTE und Cyclopentenon-PGs nicht allein durch die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung vermittelt wird.

4.8 13-HOTE: Ein neuer PPAR γ -Ligand ?

Die Funktion des nukleären Orphan-Rezeptors PPAR γ wurde aufgrund seiner vorherrschenden Expression in Adipocyten zunächst als zentraler Regulator des Fettstoffwechsels und der Adipocyten-Differenzierung identifiziert (Kliwer *et al.* 1994, Tontonoz *et al.* 1994). Als PPAR γ -Liganden wurden bisher Eicosanoide (15-d-PGJ₂, 8-HETE [Hydroxyeicosatetraensäure], 13-HODE) und synthetische antidiabetische Thiazolidindione (Ciglitazon, Troglitazon) beschrieben (Kliwer *et al.* 1995, Forman *et al.* 1995, Tontonoz *et al.* 1994, Lehmann *et al.* 1995).

Die Bindung des Liganden aktiviert PPAR γ durch die Induktion eines Konformationswechsels (Schoonjans *et al.* 1996). Anschließend bindet der aktivierte PPAR γ als obligates Heterodimer mit dem *Retinoid X-Rezeptor* (RXR) an sein spezifisches *Response-Element* (PPRE) im Promotor seiner Zielgene (Schoonjans *et al.* 1996, Spiegelman 1998, Wolf G.1998). Die Transkription einer Vielzahl von Genen, die in den Fettstoffwechsel involviert sind, wird auf diese Weise induziert (Juge-Aubry *et al.* 1997, Ijpenberg *et al.* 1997).

Neben dieser positiven Genregulation wurde in der Literatur auch eine PPRE-unabhängige Repression proinflammatorischer Gene durch PPAR γ , in Analogie zu anderen nukleären Rezeptoren wie GR oder VDR, beschrieben.

4.8.1 13-HOTE stimuliert die DNA-Bindungsaktivität von PPAR γ

In dieser Arbeit sollte eine mögliche Aktivierung von PPAR γ in Kernextrakten von 13-HOTE-inkubierten Zellen mittels EMSA untersucht werden. Hierbei wurden die Zelllinien MonoMac6 und HT29-Zellen verwendet. In der Literatur wurde eine PPAR γ -Expression sowohl in primären Monocyten / Makrophagen (Ricote *et al.* 1998a, Jiang *et al.* 1998, Huang *et al.* 1999) als auch in Monocyten-Zelllinien (Ricote *et al.* 1998b, Pelton *et al.* 1999, Shu *et al.* 1999) beschrieben. Hier wurde die Zelllinie MonoMac6 verwendet, die als einzige Monocyten-Zelllinie Merkmale reifer Monocyten zeigt (Ziegler-Heitbrock 1988). Die Colonkarzinom-Zelllinie HT-29 wurde aus methodischen Gründen ausgewählt, da in diesen Zellen analog zu primären Colon-Zellen (Fajas *et al.* 1997) eine besonders hohe PPAR γ -Expression in der Literatur beschrieben wurde (Lefebvre *et al.* 1999, Su *et al.* 1999).

Im EMSA wurden zusätzlich zu einem kommerziell verfügbaren PPAR-Bindungs-Oligonukleotid (Konsensus-PPRE) zwei weitere Oligonukleotide eingesetzt, um die Ausbildung von PPAR γ /RXR-DNA-Komplexen zu untersuchen. Mit allen drei Oligonukleotiden konnte eine spezifische PPAR γ /RXR-DNA-Bindungsaktivität in Kernextrakten 13-HOTE / 9-cis-RA-inkubierter MonoMac6-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.23). Wie erwartet, ist die stärkste Ausprägung von PPAR γ /RXR-DNA-Komplexen im EMSA mit dem nach Ijpenberg *et al.* (1997) synthetisierten Oligonukleotid zu beobachten (2.4.6, PPAR III). Der PPRE-Sequenz des Malat-Enzym-Promotors, wurde darin eine spezielle 5'-Flanking-Region vorangestellt, die eine bessere Bindung von PPAR γ gewährleisten soll (Juge-Aubry *et al.* 1997).

Die DNA-Bindungsdomäne von Transkriptionsfaktoren der nukleären Rezeptor-Familie hat eine stark konservierte Struktur (Mangelsdorf *et al.* 1995). PPREs enthalten ein sogenanntes DR-1-Element (hexameres *Direct Repeat* mit einem trennenden Basenpaar), an das auch die Orphan-Rezeptoren RXR, ARP-1 (*apolipoprotein regulatory protein-1*), HNF-4 (*hepatocyte nuclear factor-4*), COUP-TF (*chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor*) sowie PPAR α und PPAR β/δ binden (Mangelsdorf *et al.* 1995, Chen & Privalsky 1995). Es wurde ferner beschrieben, daß diese verschiedenen Orphan-Rezeptoren *in vivo* um die Bindung an DR-1-Elemente kompetieren (Miyata *et al.* 1993, Hertz *et al.* 1995, Yu *et al.* 1998, Galli *et al.* 2001). Dies erschwert den Nachweis einer spezifischen DNA-Bindung von PPAR γ mittels EMSA. Die in der Literatur beschriebenen PPAR-EMSA-Untersuchungen verwenden daher anstelle von Kernextrakten meist isolierte PPAR und RXR-Proteine (Murkherjee *et al.* 1997, Palmer *et al.* 1998, Yu *et al.* 1998).

In dieser Arbeit wurde die PPAR γ -Aktivierung unter "physiologischen" Bedingungen nachgewiesen. Hierbei wurde die Spezifität des durch 13-HOTE induzierten DNA-Komplexes im EMSA durch einen mit anti-PPAR γ -Antikörper erzeugten *Gelshift* eindeutig belegt. Die

Induktion von PPAR γ /RXR-DNA-Komplexen durch 13-HOTE (und 15-d-PGJ $_2$) unter Verwendung aller drei Oligonukleotide weist deutlich darauf hin, daß diese Aktivierung auch *in vivo* zu beobachten ist, d.h. PPAR γ nicht durch andere DR-1-bindende Rezeptoren kompetiert wird.

Die Ausbildung von PPAR γ /RXR-DNA-Komplexen in Kernextrakten 13-HOTE-präinkubierter Zellen konnte auch ohne den RXR-Liganden 9-cis-RA sowohl für MonoMac6- als auch HT29-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.24). Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit 9-cis-RA führte jedoch zu einer Steigerung der PPAR γ /RXR-DNA-Bindungsaktivität von Kernextrakten aus diesen Zellen, im Vergleich zu 13-HOTE allein (Abb. 3.27). Dieser additive Effekt konnte ebenfalls für 15-d-PGJ $_2$ und Ciglitazon gezeigt werden (Abb. 3.26, 3.27).

Die Konzentration von HOTE in isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt beträgt ca. 1,3 % (Tabelle 3.3). Um mit dem isopropanolischen Brennesselblätter-Extrakt in den EMSA-Untersuchungen analoge HOTE-Konzentration (100 μ M) zu erreichen, müßten daher ca. 2250 μ g / ml Extrakt eingesetzt werden. Dennoch ist auch unter Einfluß von 100 μ g / ml isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt in Kernextrakten von MonoMac6-Zellen eine deutliche Aktivierung von PPAR γ nachzuweisen (Abb. 3.25). Dies könnte darauf hindeuten, daß weitere noch unbekannte Inhaltsstoffe als PPAR γ -Ligand fungieren. Ferner besteht die Möglichkeit, daß die Zellen wirksame Extrakt-Inhaltsstoffe (HOTE) akkumulieren und mit einer zeitlichen Verzögerung ebenfalls wirksame Konzentrationen an PPAR γ -Agonisten in der Zelle erreicht werden. Hierfür spricht, daß die Ausbildung von PPAR γ /RXR-DNA-Komplexen mit der Extrakt-Inkubationsdauer der MonoMac6-Zellen zunimmt.

4.8.2 13-HOTE stimuliert die Expression von CD36 auf MonoMac6-Zellen

CD36 (*macrophage type B scavenger receptor, thrombospondin-1 receptor*) ist ein multifunktionelles Protein, das auf einer Vielzahl von Zellen wie Monocyten, Makrophagen, Endothelzellen und Thrombocyten exprimiert (Dhaliwal & Steinbrecher 1999) und dessen Expression positiv durch PPAR γ reguliert wird (Tontonoz *et al* 1998, Nagy *et al.* 1998, Moore *et al.* 2001). Huang *et al.* (1999) zeigten, daß verschiedene PPAR γ -Liganden, wie 13-HODE, 15-HETE, 15-d-PGJ $_2$ und Troglitazon, die CD36-Expression in murinen Makrophagen induzieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fähigkeit von 13-HOTE, eine CD36-Expression in MonoMac6-Zellen zu induzieren, mit der Wirkung verschiedener bekannten PPAR γ - (Ciglitazon, 15-d-PGJ $_2$, 13-HODE) und PPAR α -Liganden (Wy14643, Linolen- und Linolsäure) verglichen (Abb. 3.28, 3.29). Mittels durchflußcytometrischer Bestimmung von CD36-Proteinen auf der Zelloberfläche konnten die Testsubstanzen entsprechend ihrer

Dosiswirkung wie folgt in eine Reihe mit abnehmender Wirkung eingeordnet werden: 15-d-PGJ₂ > Ciglitazon > 13-HOTE > 13-HODE > Wy14643 > Linolensäure (Linolensäure zeigte keine Wirkung).

Die stärkste Dosis-Wirkung (sowohl in Bezug auf die Induktion CD36-positiver Zellen als auch auf die Steigerung der Expressionsrate in diesen Zellen) wurde mit 15-d-PGJ₂ erzielt (ED₅₀ ca. 0,8 µM) (Abb. 3.28). Der synthetische PPAR_γ-Agonist Ciglitazon war in ca. 10-fach höherer Konzentration wirksam. Dies steht im Einklang mit Literaturdaten (Jiang *et al.* 1998), ist jedoch erstaunlich, da die K_D-Werte für Thiazolidindione (30 – 700 nM) geringer sind als für 15-d-PGJ₂ (2 µM) (Forman *et al.* 1995, Lehmann *et al.* 1995, Kliewer *et al.* 1995).

Auch wenn die hier gezeigte Dosiswirkung von 13-HOTE (ED₅₀ ca. 35 µM) geringer als die von 15-d-PGJ₂ und Ciglitazon ist, so ist diese jedoch vergleichbar mit der Wirkung von 13-HODE (ED₅₀ ca. 50 µM). Eine physiologische Rolle von 13-HODE als PPAR_γ-Ligand wurde bereits in der Literatur beschrieben (Nagy *et al.* 1998). 13-HODE liegt in veresterter Form in oxLDL vor. Nach CD36-vermittelter Internalisierung der oxLDL stimuliert das von einer Lipase freigesetzte Oxylin die CD36-Expression (Tontonoz *et al.* 1998, Han *et al.* 2000).

Auch WY14643 war in den hier dargestellten Untersuchungen in der Lage, eine CD36-Expression auf MonoMac-6-Zellen zu induzieren. Fibrate wie Wy14643 werden in der Literatur als synthetische PPAR_α-Liganden beschrieben (Kliewer *et al.* 1994, Lehmann *et al.* 1995, Devchand *et al.* 1996). Sowohl die Tatsache, daß bisher kein Einfluß von PPAR_α auf die CD36-Expression beschrieben wurde als auch der Vergleich mit den hier gezeigten Linol- und Linolensäure-Daten, weist eher darauf hin, daß Wy14643 in höheren Konzentrationen auch PPAR_γ aktivieren könnte.

Es konnte hier gezeigt werden, daß auch Linolensäure eine schwach induktive Wirkung (in hohen Konzentrationen) auf die CD36-Expression von MonoMac6-Zellen hat (Abb. 3.29). Interessanterweise konnten Huang *et al.* (1999) zeigen, daß die Expression der 12/15-LOX in murinen Makrophagen eine Rolle für die Synthese endogener PPAR_γ-Liganden spielt. Bei gleichzeitiger Expression der 12/15-LOX, war eine PPAR_γ-Aktivierung durch Arachidonsäure zu beobachten. Dieser Effekt konnte durch Gabe eines LOX-Inhibitors aufgehoben werden. In Säugerzellen stellen Arachidonsäure und Linolensäure die Haupt-Substrate für die 12/15-LOX dar, aus diesen entstehen 12- und 15-HETE bzw. 13-HODE (Heydeck *et al.* 1998). Auch IL-4 vermittelt die CD36-Expression in humanen Monocyten durch die gleichzeitige Induktion der Expression von 15-LOX und PPAR_γ (Huang *et al.* 1999). Es ist daher denkbar, daß die hier beschriebene CD36-induzierende Wirkung von Linolensäure auf einer LOX-vermittelten Bildung von 13-HOTE in MonoMac6-Zellen beruht.

Eine additive Wirkung von PPAR_γ- und RXR-Liganden bei der Induktion der CD36-Expression wurde von Nagy *et al.* (1998) beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt

werden, daß durch die zusätzliche Gabe von 9-cis-RA die CD36-induzierende Wirkung von 13-HOTE, analog zu 15-d-PGJ₂, verstärkt wird (Abb. 3.30).

Die hier beschriebenen CD36-Daten deuten gemeinsam mit den EMSA-Ergebnissen darauf hin, daß 13-HOTE ein PPAR γ -Ligand ist. Dennoch besteht auch die Möglichkeit, daß 13-HOTE erst nach Aufnahme in die Zelle in seine aktive Form umgewandelt wird, d.h. eine Art *Prodrug* darstellt.

In Bezug auf die Steigerung der CD36-Expression durch isopropanolischen Brennesselblätter-Extrakt ist analog zu den EMSA-Untersuchungen eine Zeitabhängigkeit der Wirkung zu beobachten (Abb. 3.31). Durch längere Inkubation (44 h anstelle von 28 h) werden auch unter Einfluß des isopropanolischen Brennesselblätter-Extraktes wirksame Konzentrationen PPAR γ -aktivierender Inhaltsstoffe in den Zellen erreicht. Einen Hinweis darauf, daß dieser Effekt auch unter physiologischen Bedingungen (*in vivo*) von Bedeutung sein könnte, geben pharmakologische Untersuchungen mit 50 % ethanolischem Brennesselblätter-Extrakt (Teucher *et al.* 1996). Darin wurde ein zunehmender Einfluß auf die stimulierbare Cytokin-Expression von peripheren Blut-Monocyten in zeitlicher Abhängigkeit von der Therapie mit Brennesselblätter-Extrakt beobachtet.

Möglicherweise hat die Steigerung der CD36-Expression selbst einen Einfluß auf die vermehrte Aufnahme putativer PPAR γ -Liganden in die Zelle. Das zu CD36 homologe Protein in der Ratte ist FAT (*fatty acid translocase*). CD36 und FAT wurden als Transportproteine für langkettige Fettsäuren beschrieben (Abumrad *et al.* 1999, Kerkhoff *et al.* 2001).

4.9 Molekulare Wirkungsweise von Brennesselblatt-Inhaltsstoffen

In den letzten Jahren wurde in der Literatur vermehrt über eine PPRE-unabhängige Aktivität von PPAR γ v.a. in Immunzellen berichtet. In Makrophagen konnte gezeigt werden, daß eine PPAR γ -Aktivierung mit 15-d-PGJ₂ die Expression von iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), MMP-9 und SR-A (*scavenger receptor A*) inhibiert (Ricote *et al.* 1998a). Jiang *et al.* (1998) wiesen einen Cytokin-supprimierenden Effekt von PPAR γ -Agonisten in Monocyten nach. Auch in T-Zellen wurde die Expression von PPAR γ beschrieben (Yang *et al.* 1999). Es konnte gezeigt werden, daß eine PPAR γ -Aktivierung in T-Zellen die IL-2-Expression inhibiert und somit die Proliferationsrate reduziert (Clark *et al.* 2000). Bordij *et al.* (2000) wiesen erstmals eine PPAR γ -Expression in Chondrocyten nach und konnten zeigen, daß durch IL-1 induzierte Effekte (Verringerung der Proteoglycansynthese und Stimulation der NO-Produktion) durch gleichzeitige Gabe von 15-d-PGJ₂ oder Troglitazon aufgehoben wurden.

Die Repression proinflammatorischer Gene durch PPAR γ wird mittels Antagonisierung der transkriptionellen Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Proteinen vermittelt (Ricote *et al.* 1998a). Ähnliche

Wirkungen wurden bereits für andere nukleäre Rezeptoren wie GR oder VDR beschrieben (DeBosscher *et al.* 2000, Towers *et al.* 1999). Da die antiinflammatorische Wirkung von PPAR γ unabhängig von einem PPRE im Promotor des Zielgens ist, wurde sie zunächst allgemein als "Transrepression" bezeichnet. Der genaue molekulare Mechanismus dieser "Transrepression" anderer Transkriptionsfaktoren durch PPAR wird zur Zeit noch kontrovers diskutiert.

Zum einen wird eine Konkurrenz um limitierende Coaktivator-Proteine der basalen Transkriptionsmaschinerie, wie CBP (*CREB binding protein*) und p300 beschrieben (Kamei *et al.* 1996, Li *et al.* 2000). Delerive *et al.* (1999b) postulierten hingegen analog zum GR, daß die Repression von AP-1 und NF- κ B durch eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung mit PPAR / RXR vermittelt wird und daß diese Wechselwirkung in der Inhibition der Transaktivierungsfunktion dieser proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren resultiert. Hiermit steht im Einklang, daß auch für den T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor NF-AT eine physikalische Interaktion mit PPAR γ nachgewiesen werden konnte (Yang *et al.* 1999).

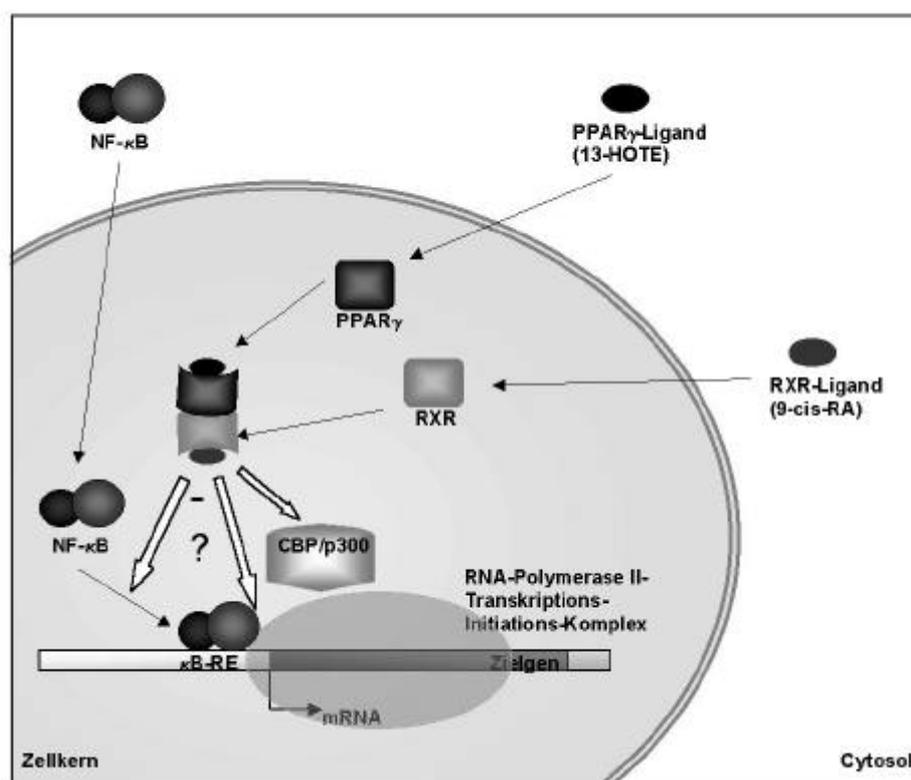


Abb. 4.1: Mögliche Angriffspunkte der HOTE-aktivierten PPAR γ -Transrepressionsfunktion. Die nukleären Rezeptoren PPAR γ und RXR werden durch Bindung ihrer Liganden aktiviert und bilden ein Heterodimer. Das PPAR γ /RXR - Heterodimer inhibiert die Aktivität proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B. Mögliche Mechanismen sind: eine Inhibition der NF- κ B-DNA-Bindung, die Repression der Transaktivierungsfunktion von NF- κ B oder eine Konkurrenz um limitierte Coaktivatorproteine (CBP / p300).

Auch wenn der genaue molekulare Mechanismus der "Transrepression" umstritten ist, wird durch die Literaturdaten deutlich, daß der Liganden-aktivierte PPAR γ die transkriptionelle Aktivität verschiedener proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren reprimiert. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß 13-HOTE (direkt oder indirekt) PPAR γ aktiviert, beruht die antiinflammatorische Wirkung von 13-HOTE wahrscheinlich nicht allein auf der hier gezeigten Inhibition der Aktivität von NF- κ B. In Abhängigkeit des Zelltyps und der gewählten *In-vitro*-Stimulation könnte die Suppression der Cytokin- und MMP-Expression auch über eine Inhibition von NF-AT, AP-1 oder STAT-Proteinen vermittelt werden.

Auch unter Einfluß des isopropanolischen Brennesselblätter-Extraktes konnte eine Aktivierung von PPAR γ nachgewiesen werden. An dieser Aktivierung sind jedoch aufgrund der wirksamen Extrakt-Konzentration neben 13-HOTE wahrscheinlich auch andere wirksame Inhaltsstoffe beteiligt. Bei gleichzeitiger Inkubation von Monomac-6-Zellen mit dem RXR-Liganden 9-cis-RA konnte hier sowohl im EMSA als auch bezüglich der Induktion der CD36-Expression ein additiver Effekt mit 13-HOTE beobachtet werden. Da die RXR-Aktivierung mit 9-cis-RA bisher nur *in vitro* nachgewiesen wurde, gilt RXR noch heute als Orphan-Rezeptor. Interessanterweise wurde verschiedenen Phytol-Derivaten eine Funktion als RXR-Ligand zugeschrieben (Kitareewan *et al.* 1996, Lemotte *et al.* 1996). Es besteht daher die Möglichkeit, daß ein bisher noch unbekannter RXR-Ligand in Brennesselblättern als additiv wirkender Faktor durch das isopropanolische Extraktionsverfahren angereichert wurde. Ferner könnten bisher noch nicht in Brennesselblättern nachgewiesene andere Oxylipine zu der Wirkung des Brennesselblätter-Extraktes beitragen.

Der relativ hohe Gehalt an unveresterter Linolensäure in den Brennesselblättern scheint für die antiinflammatorische Wirkung von Brennesselblätter-Extrakt ebenfalls relevant zu sein. Auch Linolensäure konnte im Jurkat-Assay als IL-2-supprimierender Extrakt-Inhaltsstoff identifiziert werden. Neben einer direkten Wirkung von Linolensäure könnte hierbei zum Tragen kommen, daß durch Stimulation der Zellen auch eine gesteigerte LOX-Expression induziert wird. Somit könnte die Synthese von 13-HOTE in den Zellen selbst erfolgen. Linolensäure zeigte jedoch nur eine schwache Wirkung auf die PPAR γ -vermittelte Induktion der CD36-Expression in MonoMac6-Zellen. Dies deutet darauf hin, daß die hier gezeigte IL-2-supprimierende Wirkung von Linolensäure in Jurkat-T-Zellen über einen zusätzlichen PPAR γ -unabhängigen Mechanismus vermittelt wird.

Die unveresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolen- und Linolsäure wurden in der Literatur als PPAR α -Liganden beschrieben (Yu *et al.* 1998, Kliewer *et al.* 1999). Für PPAR α wurde eine antiinflammatorische Wirkung in Endothelzellen und glatten Muskelzellen nachgewiesen (Staels *et al.* 1998, Delerive *et al.* 1999a, Delerive *et al.* 1999b). Auch wenn die PPAR α -Expression bisher noch nicht in T-Zellen beschrieben wurde, wäre eine PPAR α -

vermittelte Repression proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren ein möglicher Wirkmechanismus der beiden mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Neben Fettsäurederivaten könnten auch ubiquitär in Pflanzenblättern vorkommende Antioxidantien an der antiinflammatorischen Wirkung von Brennesselblätter-Extrakten teilhaben, wie etwa durch eine Inhibition der Phosphorylierung von I κ B oder einer Beseitigung von ROIs als proinflammatorischem Signal.

4.10 Ausblick

Die Standardtherapie der RA mit Basistherapeutika, Immunsuppressiva und begleitender Schmerztherapie (NSAR) ist generell mit starken Nebenwirkungen verbunden (Auterhoff *et al.* 1991, Kushner & Dawson 1992, Bolten 1999). Trotz innovativer Therapie-Ansätze im Hinblick auf immunologische Targets, besteht ein großer Bedarf an neuen gut verträglichen Antirheumatika, die kausal in die Pathogenese eingreifen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte 13-HOTE als maßgeblicher antiinflammatorischer Inhaltsstoff von Brennesselblättern identifiziert werden. Durch die Identifizierung von 13-HOTE als "Wirkstoff" wird erstmals eine Optimierung der Herstellungsverfahren von Brennesselblätter-Extrakten, sowie eine Qualitätsbewertung der Ausgangsdroge möglich. Es deutet sich ferner an, daß neben 13-HOTE weitere bisher nicht untersuchte Oxylipine aus Brennesselblättern für die Entwicklung von Antirheumatika interessante Wirkstoffe darstellen könnten.

Synthetische PPAR γ -Liganden wirken als sogenannte "Insulin-Sensitizer" und werden bereits erfolgreich bei Patienten mit Typ-II-Diabetes therapeutisch eingesetzt (Spiegelmann 1998, Olefsky 2000). Aus der Volksheilkunde ist die Anwendung von Brennesselblätter-Aufarbeitungen bei Diabetes bekannt. Mittels der Identifizierung von 13-HOTE als natürlichem PPAR γ -Liganden, kann erstmals auch ein kausaler Zusammenhang zwischen dem molekularen Angriffspunkt von Brennesselblätter-Extrakten und der antidiabetischen Anwendung hergestellt werden. Die Identifizierung von 13-HOTE als wirksamer Inhaltsstoff von Brennesselblätter-Extrakten liefert somit Ansatzpunkte für eine breitere Anwendung dieses Phytotherapeutikums, über den rheumatischen Formenkreis hinaus.

5 Zusammenfassung

Blätterextrakte aus *Urtica dioica* und *Urtica urens* werden als Phytopharmaka bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises erfolgreich eingesetzt. Die antirheumatisch wirksamen Inhaltsstoffe und deren molekularen Wirkmechanismen wurden bisher jedoch noch nicht systematisch untersucht.

In dieser Arbeit konnte *in vitro* erstmals eine Inhibition der T-Helfer-spezifischen proinflammatorischen Cytokine Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ unter Einfluß eines kommerziellen 50 % ethanolischen Brennesselblätter-Extraktes gezeigt werden. Es konnte nachgewiesen werden, daß diese Inhibition wesentlich auf Transkriptionsebene erfolgt.

Unter Verwendung der humanen T-Helfer-Zelllinie Jurkat wurde ein sensibles und reproduzierbares *In-vitro*-Testsystem etabliert, in dem die Senkung der induzierten Produktion von IL-2 den Meßparameter für die antiinflammatorische Wirkung darstellte. Durch die systematische Untersuchung verschiedener Brennesselblätter-Extraktvarianten konnte gezeigt werden, daß "semilipophile" Lösungsmittel wie Isopropanol, am besten geeignet sind, IL-2-supprimierende Inhaltsstoffe aus Brennesselblättern anzureichern.

Durch weitere Fraktionierung der *in vitro* wirksameren Extraktvarianten wurden Monosubstanzen mit IL-2-supprimierender Wirkung isoliert. Diese Substanzen konnten nachfolgend als die unveresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolen- und Linolsäure sowie deren Hydroxy-Derivate identifiziert werden.

Neben T-Zell-Cytokinen wie IL-2 spielen insbesondere die monocytären Cytokine IL-1 β und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung rheumatischer Entzündungsreaktionen. Daher wurde eine potentielle inhibierende Wirkung der identifizierten Monosubstanzen und der verschiedener Extraktvarianten auf die IL-1 β - und TNF- α -Expression in humanen Mononukleären Zellen des Peripheren Blutes (PBMC) *in vitro* untersucht. Interessanterweise konnte beobachtet werden, daß sowohl die IL-2-supprimierende Monosubstanz 13-HOTE als auch die „semilipophilen“-Extraktvarianten zusätzlich eine Inhibition der Lipopolysaccharid-stimulierten IL-1 β - und TNF- α -Expression von PBMC bewirkten.

Weiterhin konnte *in vitro* an Primärkulturen humaner Chondrozyten durch ELISA-Messungen eine reduzierte Produktion der in Knorpelzellen exprimierten proinflammatorischen Metalloproteinasen 1 und 3 durch das Oxylipin 13-HOTE nachgewiesen werden.

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse erstmals auf eine wichtige antiinflammatorische Wirkung der Oxylipine aus Brennesselblätter-Extrakten, in den für die rheumatische Entzündung wesentlichen Zelltypen, hin.

In der Vergangenheit wurde bereits mit *Electro-Mobility Shift Assays* (EMSA) der proinflammatorisch wirkende Transkriptionsfaktor NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) als möglicher

molekularer Angriffspunkt von Brennesselblatt-Inhaltsstoffen beschrieben. Die Inhibition der DNA-Bindung von NF- κ B konnte hier sowohl mit dem Oxylipin 13-HOTE als auch mit einem „semilipophilen“ isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt bestätigt werden, der im Vergleich mit dem als Fertigarzneimittel verwendeten 50 % ethanolschen Extrakt zudem in geringeren Konzentrationen wirksam war.

In dieser Arbeit wurde der nukleäre Rezeptor PPAR γ als ein weiteres molekulares Zielprotein der Brennesselblatt-Inhaltsstoffe identifiziert. Die hier dargestellten EMSA-Daten belegten eindeutig, daß die DNA-Bindungsaktivität dieses Transkriptionsfaktors, der im Gegensatz zu NF- κ B proinflammatorische Gene supprimieren kann, *in vitro* durch 13-HOTE und den isopropanolischen Brennesselblätter-Extrakt verstärkt wird. Funktionell konnte dies durch den Nachweis der unter Einfluß von 13-HOTE erzielten Expressionssteigerung des PPAR γ -abhängigen Gens CD36 in der Monocyten-Zelllinie MonoMac6 bestätigt werden.

In der Vergangenheit wurde gezeigt, daß die antiinflammatorische Wirkung von PPAR γ hauptsächlich auf einer Inhibierung der Transaktivierungsfunktion anderer Transkriptionsfaktoren beruht. Als ein Zielprotein dieser Repression wurde neben anderen Transkriptionsfaktoren NF- κ B identifiziert. Die antiinflammatorische Wirkung von 13-HOTE und isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt könnte somit durch die Repression der Transaktivierungsfunktion von NF- κ B (u.a. proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren) mittels einer Liganden-Aktivierung von PPAR γ erfolgen.

6 Tabellenanhang

Tabelle 6.1: MTT-Test von PHA-stimulierten und unstimulierten humanen PBMC (n = 10). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Medium- bzw. PHA-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert ± SD).

Extrakt-Konzentration (µg / ml)	Vitalität unstimulierter PBMC (%)	Vitalität PHA-stimulierter PBMC (%)
0,00	100 ± 19,8	100 ± 16,9
6,25	103 ± 16,5	100 ± 19,0
12,50	100 ± 15,5	100 ± 18,6
25,00	103 ± 18,7	99 ± 18,9
50,00	105 ± 18,0	100 ± 19,0
100,00	109 ± 18,6	102 ± 19,3
200,00	111 ± 19,6	102 ± 18,7
400,00	103 ± 16,7	99 ± 16,8

Tabelle 6.2: AllamarBlue-Test von PHA/PMA-stimulierten Jurkat-T-Zellen (n = 4), die mit einem herkömmlichen Pharmazeutischen Brennesselblätter-Extrakt inkubiert wurden. Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert ± SD).

Extrakt-Konzentration (µg / ml)	Vitalität Jurkat-T-Zellen (%)
0	100 ± 5,4
25	96 ± 4,0
50	98 ± 5,0
100	95 ± 3,8
150	100 ± 6,9
200	101 ± 2,5
250	106 ± 4,1
300	107 ± 4,1
350	103 ± 4,6
400	101 ± 3,3

Tabelle 6.3: AllamarBlue-Test von PHA/PMA-stimulierten Jurkat-T-Zellen (n = 3), die mit unterschiedlich polaren Auszügen aus frischen Brennesselblättern koinkubiert wurden. Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert ± SD).

Extrakt-Konzentration (µg / ml)	Vitalität Jurkat-T-Zellen (%)		
	Wäßriger Auszug	50 % ethanolischer Auszug	2-propanolischer Auszug
0	100 ± 1,9	100 ± 1,9	100 ± 1,9
25	112 ± 1,2	106 ± 1,1	97 ± 1,7
50	123 ± 0,3	98 ± 0,7	100 ± 7,2
100	122 ± 4,9	109 ± 2,9	110 ± 3,3
200	117 ± 5,9	112 ± 3,0	110 ± 8,2
400	130 ± 1,2	115 ± 2,7	89 ± 5,9

Tabelle 6.4: AllamarBlue-Test von PHA/PMA-stimulierten Jurkat-T-Zellen (n = 4), die mit unterschiedlich polaren Fraktionen aus einem herkömmlichen pharmazeutischen Brennesselblätter-Extrakt inkubiert wurden. Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert ± SD).

Konzentration (µg/ml)	Vitalität Jurkat-T-Zellen (%)				
	Fraktion A	Fraktion B	Fraktion C	Fraktion D	Fraktion E
0,00	100 ± 1,6	100 ± 1,6	100 ± 1,6	100 ± 1,6	100 ± 1,6
6,25	–	99 ± 0,6	105 ± 0,8	103 ± 1,6	103 ± 1,3
12,50	–	103 ± 1,1	99 ± 1,8	96 ± 0,7	100 ± 1,7
25,00	93 ± 0,7	96 ± 1,5	105 ± 0,8	105 ± 2,1	99 ± 0,6
50,00	97 ± 0,6	90 ± 2,2	96 ± 1,5	94 ± 0,9	100 ± 1,6
100,00	97 ± 1,2	(36 ± 5,9)	–	–	–

Tabelle 6.5: AllamarBlue-Test von PHA/PMA-stimulierten Jurkat-T-Zellen (n = 4), die mit unterschiedlich Konzentrationen des herkömmlichen pharmazeutischen Brennesselblätter-Extraktes bzw. eines isopropanolischen Auszugs daraus inkubiert wurden. Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert ± SD).

Konzentration (µg/ml)	Vitalität Jurkat-T-Zellen (%)	
	Extrakt	Lipophiler Auszug
0,00	100 ± 5,8	100 ± 5,5
1,56	–	101 ± 6,9
3,13	–	92 ± 4,6
6,25	–	97 ± 12,3
12,50	–	101 ± 4,3
25,00	90 ± 9,9	99 ± 5,5
50,00	101 ± 15,8	89 ± 9,6
100,00	101 ± 6,2	–
200,00	100 ± 12,6	–
400,00	100 ± 1,8	–

Tabelle 6.6: AllamarBlue-Test von PHA/PMA-stimulierten Jurkat-T-Zellen (n = 4), die mit unterschiedlichen HPLC-Fractionen des isopropanolischen Auszugs eines herkömmlichen pharmazeutischen Brennesselblätter-Extraktes inkubiert wurden. Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert ± SD).

Verdünnung	Vitalität Jurkat-T-Zellen (%)						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Kontrolle	100 ± 2,6	100 ± 1,9	100 ± 1,4	100 ± 2,7	100 ± 2,6	100 ± 1,5	100 ± 3,0
1 : 16	99 ± 1,0	108 ± 1,4	99 ± 1,1	114 ± 2,8	106 ± 1,1	102 ± 0,5	101 ± 1,1
1 : 8	100 ± 2,7	104 ± 1,3	107 ± 6,2	108 ± 4,5	104 ± 1,5	103 ± 3,0	99 ± 0,7
1 : 4	102 ± 3,2	103 ± 1,5	99 ± 3,8	102 ± 0,7	97 ± 2,2	96 ± 1,6	102 ± 2,9
1 : 2	100 ± 1,7	105 ± 3,9	103 ± 2,4	101 ± 3,3	96 ± 2,0	87 ± 4,8	103 ± 1,6
1 : 1	104 ± 4,1	99 ± 1,2	101 ± 1,4	91 ± 3,6	101 ± 3,1	(6 ± 4,8)	100 ± 2,9

Tabelle 6.7: AllamarBlue-Test von PHA/PMA-stimulierten Jurkat-T-Zellen (n = 4), die mit isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt oder der Heptan-Fraktion nach alkalischer Hydrolyse inkubiert wurden. Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert ± SD).

Konzentration (µg/ml)	Vitalität Jurkat-T-Zellen (%)	
	2-propanolischer Extrakt	Heptan-Fraktion
0,00	100 ± 8,0	100 ± 6,2
1,56	–	95 ± 8,3
3,13	103 ± 7,1	92 ± 8,5
6,25	95 ± 5,8	90 ± 4,2
12,50	90 ± 12,9	100 ± 20,4
25,00	96 ± 14,0	98 ± 13,2
50,00	91 ± 11,8	100 ± 5,1
100,00	88 ± 3,8	102 ± 7,5
200,00	97 ± 5,7	–

Tabelle 6.8: AllamarBlue-Test von PHA/PMA-stimulierten Jurkat-T-Zellen (n = 4), die mit verschiedenen synthetischen Reinsubstanzen inkubiert wurden. Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert ± SD).

Konzentration (µg/ml)	Vitalität Jurkat-T-Zellen (%)				
	Linolensäure	Linolsäure	13-HOTE	9-HODE	Vitamin D ₃
0,00	100 ± 15,7	100 ± 15,9	100 ± 3,7	100 ± 3,7	100 ± 6,6
1,25	110 ± 18,5	96 ± 4,5	105 ± 8,8	122 ± 12,9	102 ± 5,9
2,50	102 ± 6,3	103 ± 5,1	115 ± 5,7	114 ± 3,5	98 ± 5,7
5,00	110 ± 9,0	105 ± 1,8	119 ± 9,1	110 ± 13,1	97 ± 2,3
10,00	104 ± 4,6	110 ± 1,7	102 ± 8,0	101 ± 3,6	92 ± 3,2
20,00	93 ± 4,8	97 ± 14,9	93 ± 2,4	92 ± 3,1	92 ± 6,9
40,00	96 ± 1,2	96 ± 6,3	–	–	100 ± 11,6

Tabelle 6.9: AllamarBlue-Test von PHA/PMA-stimulierten Jurkat-T-Zellen (n = 4), die mit Cyclosporin A (Cy A) inkubiert wurden. Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert ± Standardabweichung).

Cy A-Konzentration (ng / ml)	Vitalität Jurkat-T-Zellen (%)
0	100 ± 7,2
10	105 ± 2,0
33	107 ± 7,9
100	101 ± 3,7
333	106 ± 6,2
1000	98 ± 9,2

Tabelle 6.10: AllamarBlue-Test von LPS-stimulierten PBMC-Kulturen (von 3 Probanden), die mit isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt inkubiert wurden (Messung in Quadruplikaten). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert ± SD).

Konzentration (µg/ml)	Vitalität PBMC (%)		
	Proband 1	Proband 2	Proband 3
0,00	100 ± 1,6	100 ± 2,0	100 ± 4,1
12,50	102 ± 0,5	103 ± 1,2	103 ± 0,8
25,00	105 ± 0,5	103 ± 1,8	99 ± 4,0
50,00	104 ± 0,6	102 ± 0,5	97 ± 4,8
100,00	103 ± 0,5	104 ± 1,5	98 ± 6,6
200,00	101 ± 1,5	103 ± 1,9	107 ± 1,2

Tabelle 6.11: AllamarBlue-Test von LPS-stimulierten PBMC-Kulturen (von 3 Probanden), die mit der Heptan-Fraktion aus alkalischer Hydrolyse inkubiert wurden (Messung in Quadruplikaten). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert \pm SD).

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Vitalität PBMC (%)		
	Proband 1	Proband 2	Proband 3
0,00	100 \pm 3,3	100 \pm 5,6	100 \pm 6,0
6,25	98 \pm 4,0	109 \pm 2,0	95 \pm 4,1
12,50	97 \pm 3,8	110 \pm 5,2	108 \pm 7,2
25,00	91 \pm 6,0	109 \pm 5,8	103 \pm 4,5
50,00	104 \pm 3,8	113 \pm 3,2	104 \pm 4,9
100,00	104 \pm 3,4	108 \pm 3,4	105 \pm 7,7

Tabelle 6.12: AllamarBlue-Test von LPS-stimulierten PBMC-Kulturen (von 3 Probanden), die mit isopropanolischen Auszug aus herkömmlichem pharmazeutischen Brennesselblätter-Extrakt inkubiert wurden (Messung in Quadruplikaten). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert \pm SD).

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Vitalität PBMC (%)		
	Proband 1	Proband 2	Proband 3
0,00	100 \pm 3,3	100 \pm 4,2	100 \pm 4,3
6,25	98 \pm 7,9	92 \pm 2,4	97 \pm 1,2
12,50	101 \pm 3,6	94 \pm 1,1	99 \pm 1,3
25,00	105 \pm 4,0	96 \pm 4,0	102 \pm 2,7
50,00	106 \pm 5,9	99 \pm 5,1	107 \pm 4,5
100,00	103 \pm 9,4	106 \pm 0,6	104 \pm 3,9

Tabelle 6.13: AllamarBlue-Test von LPS-stimulierten PBMC-Kulturen (von 3 Probanden), die mit Linolsäure inkubiert wurden (Messung in Quadruplikaten). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert \pm SD).

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Vitalität PBMC (%)		
	Proband 1	Proband 2	Proband 3
0,0	100 \pm 1,5	100 \pm 2,6	100 \pm 3,4
2,5	103 \pm 4,4	97 \pm 4,5	100 \pm 1,9
5,0	105 \pm 4,6	99 \pm 1,1	103 \pm 3,6
10,0	104 \pm 2,2	103 \pm 0,9	106 \pm 3,8
20,0	112 \pm 6,0	103 \pm 3,5	109 \pm 1,7
40,0	113 \pm 6,4	105 \pm 2,2	108 \pm 2,2

Tabelle 6.14: AllamarBlue-Test von LPS-stimulierten PBMC-Kulturen (von 3 Probanden), die mit Linolensäure inkubiert wurden (Messung in Quadruplikaten). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert \pm SD).

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Vitalität PBMC (%)		
	Proband 1	Proband 2	Proband 3
0,0	100 \pm 6,4	100 \pm 4,1	100 \pm 2,9
2,5	108 \pm 4,1	96 \pm 3,1	102 \pm 4,8
5,0	108 \pm 9,4	99 \pm 3,0	101 \pm 4,8
10,0	108 \pm 6,6	99 \pm 3,0	103 \pm 6,4
20,0	119 \pm 1,9	101 \pm 2,0	109 \pm 3,8
40,0	113 \pm 11,2	105 \pm 4,1	110 \pm 7,2

Tabelle 6.15: AllamarBlue-Test von LPS-stimulierten PBMC-Kulturen (von 3 Probanden), die mit 13-HOTE inkubiert wurden (Messung in Quadruplikaten). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Stimulations-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert \pm SD).

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Vitalität PBMC (%)		
	Proband 1	Proband 2	Proband 3
0,0	100 \pm 4,4	100 \pm 5,1	100 \pm 3,9
2,5	98 \pm 6,4	102 \pm 6,1	97 \pm 4,8
5,0	105 \pm 4,8	103 \pm 4,3	99 \pm 5,9
10,0	104 \pm 3,6	104 \pm 8,1	98 \pm 2,3
20,0	106 \pm 6,2	102 \pm 4,6	104 \pm 6,9
40,0	102 \pm 5,4	100 \pm 3,2	96 \pm 5,7

Tabelle 6.16: AllamarBlue-Test von PBMC-Kulturen nach 4 h. Die Zellen wurden nach 2 h mit unterschiedlichen Stimuli koinkubiert (fluorimetrische Messung, Triplikate). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur jeweiligen Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert \pm SD).

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Vitalität PBMC (%)			
	Medium	LPS	TNF	PHA / PMA
0	100 \pm 7,5	100 \pm 13,3	100 \pm 6,5	100 \pm 19,2
100	78 \pm 15,8	94 \pm 10,9	91 \pm 22,5	87 \pm 7,3
200	92 \pm 7,0	97 \pm 6,5	88 \pm 7,0	89 \pm 0,7
400	113 \pm 0,2	160 \pm 48,4	150 \pm 26,3	151 \pm 34,6
800	154 \pm 10,1	194 \pm 2,1	183 \pm 7,8	179 \pm 9,2

Tabelle 6.17: AllamarBlue-Test von Jurkat-T-Zellen nach 5 h. Die Zellen wurden nach 3 h mit und ohne PMA / Ionomycin stimuliert (fluorimetrische Messung, Triplikate). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur jeweiligen Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert \pm SD).

Probe	Konzentration	Vitalität Jurkat (%)
Medium	–	100 \pm 13,1
15d-PGJ2	25 μM	131 \pm 9,8
	5 μM	105 \pm 7,4
PGA1	25 μM	97 \pm 20,0
	5 μM	85 \pm 9,2
13-HOTE	300 μM	184 \pm 16,6
	200 μM	156 \pm 33,3
LN	100 μM	149 \pm 10,1
Isopropanol-Extrakt	400 $\mu\text{g/ml}$	164 \pm 51,1
	200 $\mu\text{g/ml}$	120 \pm 6,0
	100 $\mu\text{g/ml}$	98 \pm 2,5

Tabelle 6.18: AllamarBlue-Test von primären Monocyten nach 48 h Inkubation (Mittelwert von 3 Probanden). Die Zellen mit isopropanolischem Brennnesselblätter-Extrakt inkubiert und gleichzeitig stimuliert (LPS / ConA) bzw. basal ohne Stimulation belassen (fluorimetrische Messung in Triplikaten). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur jeweiligen Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert \pm SD).

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Vitalität PBMC (%)		
	Medium	LPS	ConA
0,00	100 \pm 2,0	100 \pm 2,3	100 \pm 2,2
3,13	99 \pm 1,9	100 \pm 1,7	100 \pm 1,1
6,25	97 \pm 1,4	99 \pm 1,7	99 \pm 1,0
12,50	100 \pm 1,7	99 \pm 1,2	100 \pm 1,2
25,00	100 \pm 1,4	100 \pm 1,7	101 \pm 0,7
50,00	99 \pm 1,6	101 \pm 1,3	101 \pm 0,8

Tabelle 6.19: AllamarBlue-Test von primären Chondrocyten eines Probanden nach 48 h Inkubation (n = 3). Die Zellen wurden entweder mit der isolierten HOTE-Fraktion oder mit der synthetischen Reinsubstanz 13-S-HOTE inkubiert und gleichzeitig mit IL-1 β stimuliert. Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur jeweiligen Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert \pm SD).

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Vitalität PBMC (%)	
	13-S-HOTE	HOTE-Fraktion
0,0	100 \pm 2,0	100 \pm 2,0
2,5	106 \pm 3,0	104 \pm 3,0
5,0	106 \pm 6,0	101 \pm 1,8
10,0	103 \pm 1,6	88 \pm 3,0
20,0	91 \pm 3,0	–

Tabelle 6.20: AllamarBlue-Test von MonoMac6-Zellen, die mit unterschiedlichen PPAR-Liganden 28 h inkubiert wurden (n = 3). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur jeweiligen Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert \pm SD).

Konzentration (μM)	Vitalität MonoMac6 (%)		
	15-d-PGJ ₂	Ciglitazon	WY14643
0,00	100 \pm 3,2	100 \pm 9,7	100 \pm 9,7
0,39	98 \pm 4,5	–	–
0,78	90 \pm 6,7	88 \pm 4,8	–
1,56	91 \pm 1,7	100 \pm 10,0	–
3,13	95 \pm 7,1	105 \pm 18,0	–
6,25	97 \pm 5,4	107 \pm 15,8	–
12,50	95 \pm 7,2	94 \pm 9,8	117 \pm 11,7
25,00	102 \pm 4,0	105 \pm 7,0	124 \pm 9,5
50,00	–	88 \pm 11,8	128 \pm 5,3
100,00	–	–	143 \pm 4,6
200,00	–	–	101 \pm 6,6

Tabelle 6.21: AllamarBlue-Test von MonoMac6-Zellen, die mit Inhaltsstoffen des isopropanolischen Brennesselblätter-Extraktes über 28 h inkubiert wurden (n = 3). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur jeweiligen Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert \pm SD).

Konzentration (μM)	Vitalität MonoMac6 (%)			
	13-HOTE	13-HODE	Linolensäure	Linolsäure
0,00	100 \pm 0,4	100 \pm 3,4	100 \pm 13,2	100 \pm 6,3
12,50	102 \pm 1,3	99 \pm 2,6	103 \pm 8,6	105 \pm 6,3
25,00	104 \pm 1,1	102 \pm 5,1	104 \pm 7,4	112 \pm 4,6
50,00	110 \pm 0,5	106 \pm 3,4	120 \pm 10,3	113 \pm 1,9
100,00	125 \pm 0,4	115 \pm 6,3	113 \pm 7,0	105 \pm 6,6
200,00	–	–	120 \pm 13,1	104 \pm 6,0

Tabelle 6.22: AllamarBlue-Test von MonoMac6-Zellen, die 13-HOTE bzw. 15-d-PGJ₂ in Kombination mit 9-cisRA über 28 h inkubiert wurden (n = 3). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Medium-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert ± SD).

	Vitalität MonoMac6 (%)	
	13-HOTE	15-d-PGJ ₂
Medium-Kontrolle	100 ± 1,9	100 ± 1,9
+ 0,1 µM 9-cis RA	100 ± 4,6	99 ± 5,4
+ 0,5 µM 9-cis RA	95 ± 1,5	109 ± 2,0
+ 1 µM 9-cis RA	93 ± 2,3	101 ± 4,9
+ 5 µM 9-cis RA	95 ± 4,8	105 ± 2,1

Tabelle 6.23: AllamarBlue-Test von MonoMac6-Zellen, die mit isopropanolischem Brennesselblätter-Extrakt über 44 h inkubiert wurden (n = 3). Die Vitalität wurde in Prozent relativ zur Medium-Kontrolle ermittelt (Daten: Mittelwert ± SD).

Extrakt-Konzentration (µg/ml)	Vitalität MonoMac6 (%)
0	100 ± 0,4
50	99 ± 0,5
100	98 ± 0,6
200	100 ± 0,9
400	102 ± 1,3

7 Literatur

Abumrad, N, Coburn, C, Ibrahimi, A (1999): Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim Biophys Acta* **1441**: 4-13.

Alarcon, GS (1995): Epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin N Am* **21**: 859-69.

Alroy I, Towers, TL, Freedman, LP (1995): Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NF-ATp/AP-1 complex formation by nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol* **15**: 5789-99.

D'Ambrosio, D, Cippitelli, M, Coccolo, M, Mazzeo, D, DiLuca, P, Lang, R, Sinigaglia, F, Panina-Brdignon, P (1998): Inhibition of IL-12 production by 1,25 Dihydroxyvitamin D₃. *J Clin Invest* **101** 252-62

Armesilla, AL, Calvo, D, Vega, MA (1996): Structural and functional characterization of the human CD36 gene promoter: identification of a proximal PEBP2/CBF site. *J Biol Chem* **271**: 7781-7.

Arner, EC and Tororella, MD (1995): Signal transduction through chondrocyte integrin receptors induces matrix metalloproteinase synthesis and synergize with interleukin-1. *Arthritis Rheum* **9**: 1304-14.

Auphan N, DiDonato, JA, Rosette C, Helmberg, A, Karin, M (1995): Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of Ikappa B synthesis. *Science* **270**: 232-3.

Auterhoff, H, Knabe, J, Höltje, HD (1991): Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. *WVG Stuttgart* (12. Aufl.).

Bader, G (1999): Goldrute – eine Quelle für urologische Phytopharmaka. *Dsch Apoth Ztg* **18**: 1857-8.

Baeuerle, PA, Henkel, T (1994): Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**: 141-79.

Baeuerle, PA, Baichwal, VR (1997): NF-kappa B as a frequent target for immuno-suppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol* **65**: 111-37.

Baldwin, AS (1996): The NF-κB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**: 649-81.

Barchowsky, A, Frlita, D, Vincenti, MP (2000): Integration of the NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine* **12**: 1469-79.

Barnes, PJ, Karin, M (1997): Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New Engl J Med* **336**: 1066-71.

Berenbaum, F (2000): Proinflammatory cytokines, prostaglandins, and the chondrocyte: mechanisms of intracellular activation. *Joint Bone Spine* **67**: 561-4.

BGA (1990): Monographie: *Urticae herba*, Brennesselkraut; *Urticae folium*, Brennesselblätter. *Bundesanzeiger* **164**: 1.

Bhalla, AK, Amento, EP, Serog, B, Glimcher, LH (1984): 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits antigen-induced T cell activation. *J Immunol* **133**: 1748.

Blackwell, TS, Christman, JW (1997): The role of nuclear factor-IκB in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **17**: 3-9.

- Bolten, WW** (2000): Unterschätzte NSA-Nebenwirkungen im distalen Intestinum. *Z Rheumatol* **59**: 370-2.
- Bondeson, J, Sundler, R** (1995): Auranofin inhibits the induction of interleukin-1-beta and TNF-alpha mRNA in macrophages. *Biochem Pharmacol* **27**: 1753-9.
- Bordij, K, Grillasca, J, Gouze, J, Magdalou, JM, Schohn, H, Keller, J, Bianchi, A, Dauca, M, Netter, P, Terlain, B** (2000): Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and γ and retinoid Z rezeptor in cartilage. *J Biol Chem* **275**: 12243-50.
- Breshnihan, B, Alvara-Gracia, JM, Cobby, M** (1998): Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human IL-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* **41**: 2196-9.
- Budzianowski, J** (1991): Caffeic acid esters from *urtica dioica* and *urtica urens*. *Planta Med* **57**: 507.
- Castrillo, A, de Las Heras, B, Hortelano, S, Rodriguez, B, Villar, A, Bosca, L** (2001): Inhibition of the nuclear factor kappa B (NF-kappa B) pathway by tetracyclic kaurene diterpenes in macrophages. Specific effects on NF-kappa B-inducing kinase activity and on the coordinate activation of ERK and p38 MAPK. *J Biol Chem* **276**: 15854-15860.
- Chaurasia, N, Wichtl, M** (1987): Sterol and sterol glycosides from *Urtica dioica*. *J Nat Prod* **50**: 881.
- Chen, H, Privalsky, ML** (1995): Cooperative formation of high-order oligomers by retinoid X receptors: an unexpected mode of DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 422-6.
- Chomczynski, P, Sacchi, N** (1987): Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 53-8.
- Clark, RB, Bishop-Bailey, D, Estrada-Hernandez, T, Hia, T, Puddington, L, Padula, SJ** (2000): The nuclear receptor PPAR γ and immunoregulation: PPAR γ mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol* **164**: 1364-71.
- Cohen, L, Henzel, WJ, Baeuerle, PA** (1998): IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex. *Nature* **395**: 292-6.
- Dean, DD, Martel-Pelletier, Pelletier, JP, Howell, DS, Woessner, JF** (1989): Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* **84**: 678-85.
- De Boscher, K, Berghe, W, Vermeulen, L, Plaisance, S, Boone, E, Haegeman, G** (2000): Glucocorticoids repress NF- κ B-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3919-24.
- Deliver, P, de Boscher, K, Besnard, S, Berghe, WV, Peters, JM, Gonzalez, F, Fruchart, J, Tedgui, A, Haegeman, G, Staels, B** (1999a): Peroxisome proliferator-activated receptor α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with the transcription factors NF- κ B and AP-1. *J Biol Chem* **274**: 32048-54.
- Deliver, P, Martin-Nizard, F, Chinetti, G, Trottein, F, Fruchart, J, Tedgui, A, Najib, J, Duriez, P, Staels, B** (1999b): Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* **85**: 394-402.
- Devchand, PR, Keller, H, Peters, JM, Vazquez, M, Gonzalez, FJ, Wahli, W** (1996): The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. *Nature* **384**: 23-4.
- Dhaliwal, BS, Steinbrecher, UP** (1999): Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta* **286**: 191-205.

- DiDonato, JA, Hayakawa, M, Rothwarf, D, Zandi, E, Karin, M** (1997): A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* **388**: 519-21.
- Eichler, O, Koch, C** (1970): Antiphlogistic, analgesic and spasmolytic effect of harpagoside, a glycoside from the root of *Harpagophytum procumbens* DC. *Arzneimittelforschung* **20**: 107-9.
- Enmark, E, Gustafsson, J** (1996): Orphan nuclear receptors- the first eight years. *Mol Endocrinol* **10**: 1293-307.
- ESCOPE** (1997): European Scientific Cooperative on Phytotherapy: *Urtica folium/herba* – Nettle leaf/herb. *ESCOPE* 7/97.
- Espinoza-Delgado, Bosco, MC, Musso, T, Gusella, GL, Longo, DL and Varesio, L** (1995): Interleukin-2 and human monocyte activation. *J Leukoc Biol* **57**: 13-19.
- Fajas, L, Auboeuf, D, Raspe, E, Schoonjans, K, Lefebvre, AM, Saladin, R, Najib, J, Lavilles, M, Fruchart, JC, Deeb, S, Vidal-Puig, A, Flier, J, Briggs, MR, Staels, B, Vidal, H, Auwerx, J** (1997): The organization, promoter analysis and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem* **272**: 18779-89.
- Feldmann, M, Bondeson, J, Brennan, FM, Foxwell, MJ, Maini, RV** (1999). The rationale for the current boom in anti-TNF-alpha treatment. Is there an effective means to define therapeutic targets for drugs that provide all the benefits of anti-TNF-alpha and minimise hazards ?. *Ann Rheum Dis* **58**: 127-31.
- Forman BM, Tontonoz, P, Chen, J, Brun, RP, Spiegelman, BM, Evans, RM** (1995): 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* **83**: 803-12.
- Foxwell, B, Browne, K, Bondeson, J, Clarke, C, de Martin, R, Brennan, F, Feldmann, M** (1998): Efficient adenoviral infection with I κ B α reveals that macrophage tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis is NF- κ B dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8211-15.
- Frank, B, Bohn, I, Uehleke, B** (1998): *Urtica*. In: Blaschek, W, Hänsel, R, Keller, K.: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, 3. Folgeband, Drogen L-Z. *Springer Verlag, Berlin*. 5. Aufl.: 710-36.
- Freemont, AJ, Hampson, V, Tilman, R, Goupille, P, Taiwo, Y, Hoyland, JA** (1997): Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by Chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *An Rheum Dis* **56**: 542-9.
- Fujisawa, K, Aono, H, Hasunuma, T, Yamamoto, K, Mita, S, Nishioka, K** (1996): Activation of transcription factor NF- κ B in human synovial cells in response to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* **39**: 197-203.
- Gabay, C, Arend, WP** (1998): Treatment of rheumatoid arthritis with IL-1 inhibitors. *Springer Semin Immunopathol* **20**: 229-46.
- Galli, A, Pinaire, J, Fischer, M, Dorris, R, Crabbs, DW** (2001): The transcriptional and DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor α is inhibited by ethanol metabolism. *J Biol Chem* **276**: 68-75.
- Goronzy, JJ, Weyland, CM** (1995): T and B cell-dependent pathways in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* **7**: 214-21.
- Hamberg, M** (1999): An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato. *Lipids* **34**: 1131-42.
- Han, J, Hajjar, DP, Tauras, JM, Feng, J, Gotto, AM, Nicholson, AC** (2000): Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 2 decrease expression of CD36, the B-type scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J Biol Chem* **275**: 1241-1246.

- Handel, ML** (1997): Transcription factors AP-1 and NF- κ B: Where steroids meet the gold standard of anti-rheumatic drugs. *Inflamm Res* **46**: 282-6.
- Handel, ML, McMorro, LB, Gravalles, EM** (1995): Nuclear factor-kappa B in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65. *Arthritis Rheum* **38**: 1762-70.
- Harriman, G, Harper, LK, Schaible, TF** (1999): Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNF-alpha treatment. *Ann Rheum Dis* **58**: 161-4.
- Hegnauer, R** (1990): Chemotaxonomie der Pflanzen. *Birkhäuser Verlag, Basel* 1990, Band 9.
- Hertz, R, Bishara-Shieban, J, Bar-Tana, J** (1995): Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. *J Biol Chem* **270**: 13470-5.
- Heydeck, D, Thomas, L, Schnurr, K, Trebus, F, Thierfelder, WE, Ihle, JN, Kuhn, H** (1998): Interleukin-4 and -13 induce upregulation of murine macrophage 12/15-lipoxygenase activity: evidence for the involvement of transcription factor STAT6. *Blood* **92**: 2503-10.
- Hsieh, CS, Heimberger, AB, Gold, JS, O'Garra, A, Murphy, KM** (1992): Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6065-9.
- Huang, JT, Welch, JS, Ricote, M, Blinder, CJ, Willson, TM, Kelly, C, Witzum, JL, Funk, CD, Conrad, D, Glass, CK** (1999): Interleukin-4-dependent production of PPAR- γ ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* **400**: 378-82.
- Huet, C, Sahuquillo-Merino, C, Coudrier, E, Louvard, D** (1987): Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. *J Cell Biol* **105**: 345-57.
- Issemann, I, Prince, RA, Tugwood, JD, Green, S** (1993): The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. *Biochimie* **75**: 251-6.
- Jiang, C, Ting, AT, Seed, B** (1998): PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391**: 82-86.
- Juge-Aubry, C, Pernin, A, Favez, T, Burger, AG, Wahli, W, Meier, CA, Desvergnès, B** (1997): DNA binding properties of peroxisome proliferator receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. *J Biol Chem* **272**: 25252-9.
- Ijpenberg, A, Jeannin, E, Wahli, W, Desvergne, B** (1997): Polarity and specific sequence requirements of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)/Retinoid X Receptor heterodimer binding to DNA. *J Biol Chem* **272**: 20108-17.
- Kamei, Y, Xu, L, Heinzl, T, Torchia, J, Kurokawa, R, Gloss, B, Lin, SC, Heyman, RA, Rose, DW, Glass, CK, Rosenfeld, MG** (1996): A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**: 403-14.
- Kastner, P, Mark, M, Chambon P** (1995): Nonsteroid nuclear receptors: What are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* **83**: 859-69.
- Kerkhoff, C, Sorg, C, Tandon, NN, Nacken, W** (2001): Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells. *Biochemistry* **40**: 241-8.
- Kitareewan, S, Burka, LT, Tomer, KB, Parker, CE, Deterding, LJ, Stevens, RD, Forman, BM, Mais, DE, Heyman, RA, McMorris, T, Weinberger, C** (1996): Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. *Mol Biol Cell* **7**: 1153-66.

- Kliwer, SA, Umesono, K, Noonan, DJ, Heyman, RA, Evans, RM** (1992): Convergence of 9-cis retinoic acid and proliferator signaling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**: 771-4.
- Kliwer, SA, Forman, BM, Blumberg, B, Ong, ES, Borgmeyer, U, Mangelsdorf, DJ, Umesono, K, Evans, RM** (1994): Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7355-9.
- Kliwer, SA, Lenhard, JM, Willson, TM, Patel, I, Morris, DC, Lehmann, JM** (1995): A prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**: 813-9.
- Kliwer, SA, Lehmann, JM, Wilson, TM** (1999): Orphan nuclear receptors: Shifting endocrinology into reverse. *Science* **284**: 757-60.
- Klingelhofer, S, Obertreis, B, Quast, S, Behnke, B** (1999): Antirheumatic effect of IDS 23, a stinging nettle leaf extract, on in vitro expression of T helper cytokines. *J Rheumatol* **26**: 2517-2522.
- Knott, I, Dieu, M, Burton, M, Houbion, A, Remacle, J and Raes, M** (1994). Induction of cyclooxygenase by interleukin-1-comparative study between human synovial cells and chondrocytes. *Genes Dev* **9**: 1598-1607.
- Koenig, H, Pfisterer, L, Corcoran, L, Wirth, T** (1995): Identification of CD36 as the first gene dependent on the B cell differentiation factor Oct-2, characterization, and tissue distribution of human Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) isoforms PPAR γ 2 versus PPAR γ 1 and activation with Retinoid X Receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem* **272**: 8071-6.
- Kohlmann, M, Bachmann, A, Weichert, H, Kolbe, A, Balkenhohl, T, Wasternack, C, Feussner, I** (1999): Formation of lipoxygenase-pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonate treatment. *Eur J Biochem* **260**: 885-95.
- Kushner, I, Dawson, NV** (1992): Changing perspectives in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **19**: 1831-4.
- Lanchbury, JS, Pitzalis, C** (1993): Cellular immune mechanisms in rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Curr Opin Immunol* **5**: 918-25.
- Lee, J, Burckart, GJ** (1998): Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* **38**: 981-93.
- Lefebvre, M, Paulweber, B, Fajas, L, Woods, J, McCrary, C, Colombel, JF, Najib, J, Fruchart, JC, Datz, C, Vidal, H, Desreumaux, P, Auwerx, J** (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol* **162**: 331-40.
- Lehmann JM, Moore, LB, Smith-Oliver, TA, Wilkison, WO, Willson, TM, Kliwer, SA** (1995): An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma). *J Biol Chem* **270**: 12953-6.
- Lemire, JM, Adams JS, Kermani-Arab, V, Bakke, AC, Sakai, R, Jordan, SC** (1985): The Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J Immunol* **134**: 3032.
- Lemotte, PK, Keidel, S, Apfel, CM** (1996): Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand. *Eur J Biochem* **236**: 328-33.
- Li, M, Pascual, G, Glass, CK** (2000): Peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* **20**: 4699-707.
- Lovell, DJ, Giannini, EH, Reiff, A, Cawkwell, GD, Silverman, ED, Nocoton, JJ, Stein, LD, Gedella, A, Ilowite, ND,T, Wallace, CA, Whitmore, J, Finck, BK** (2000): Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **342**: 763-9.

- Lutomski, J, Speichert, H** (1983): Die Brennessel in Heilkunde und Ernährung. *Pharm. Unserer Zeit* **12**: 181.
- Madaus, G** (1938): Lehrbuch der biologischen Heilmittel. *Olms Verlag, Heidelberg* 1997, Band **3**: 2746-54
- Mangelsdorf, DJ, Thummel, C, Beato, M, Herrlich, P, Schütz, G, Umesono, K, Blumberg, B, Kastner, P, Mark, M, Chambon, P, Evans, RM** (1995): The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**: 835-9.
- Marok, R, Winyard, PG, Coumbe, A, Kus, ML, Gaffney, K, Blades, S, Mapp, PI, Morris, CJ, Blake, DR, Kaltschmidt, C, Baeuerle, PA** (1996): Activation of the transcription factor nuclear factor- κ B in human inflamed synovial tissue. *Arthritis Rheum* **39**: 583-91.
- Martel-Pelletier, J, McCollum, R, Fujimoto, N, Obata, K, Cloutier, JM, Pelletier, JP** (1994): Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* **70**: 807-15.
- Mathieu, C, Laureys, J, Sobis, H, Vandeputte, M, Waer, M, Bouillon, R** (1992): 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ prevents insulinitis in NOD mice. *Diabetes* **41**: 1491-5.
- Matthews, JR, Hay, RT** (1995): Regulation of the DNA binding activity of NF- κ B. *Int J Biochem Cell Biol* **27**: 865-79.
- Mengshol, JA, Vincenti, MP, Coon, CI, Barchowsky, A, Brinckerhoff, CE** (2000): Interleukin-1 induction of collagenase 3 (Matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* **43**: 801-11.
- Meyer, S, Kohler, NG, Joly, A** (1997): Cyclosporin A is an uncompetitive inhibitor of proteasome activity and prevents NF- κ B activation. *FEBS Lett* **413**: 354-8.
- Miyata, KS, Zhang, B, Marcus, SL, Capone, JP, Rachubinski, RA** (1993): Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) binds to peroxisome proliferator-responsive element and antagonizes peroxisome proliferator mediated signaling. *J Biol Chem* **268**: 19169-72.
- Moore, KJ, Rosen, ED, Fitzgerald, ML, Randow, F, Andersson, LP, Altshuler, D, Milstone, DS, Mortensen, RM, Spiegelman, BM, Freeman, MW** (2001): The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nature Medicine* **7**: 41-7.
- Mosmann, TR, Coffman, RL** (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**: 145-73.
- Mukherjee, R, Jow, L, Croston, GE, Paterniti, JR** (1997): Identification, characterization, and tissue distribution of human Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) isoforms PPAR- γ 2 versus PPAR- γ 1 and activation with Retinoid X Receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem* **272**: 8071-6.
- Mutschler, E, Geisslinger, G, Kroemer, HK, Schäfer-Kortling, M** (2001): Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. *WVG, Stuttgart*. 8. Aufl.
- Nagy, L, Tontonoz, P, Alvarez, JGA, Chen, H, Evans, RM** (1998): Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR- γ . *Cell* **93**: 229-40.
- Obertreis, B, Ruttkowski, T, Teucher, T, Behnke, B, Schmitz, H** (1996a): Ex vivo in vitro inhibition of lipopolysaccharide stimulated tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β secretion in human whole blood by *extractum urticae dioicae foliorum*. *Arzneim-Forsch/ Drug Res* **46**: 389-94.
- Obertreis, B, Giller, K, Teucher, T, Behnke, B, Schmitz, H** (1996b): Antiphlogistische Effekte von *Extractum Urticae dioicae foliorum* im Vergleich zu Kaffeoylätfelsäure. *Arzneim-Forsch/ Drug Res* **46**: 52-6.

- Olefsky, JM** (2000): Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Clin Invest* **106**: 467-72.
- Page, S, Fischer, C, Baumgartner, B, Haas, M, Kreusel, U, Loidl, G, Hayn, M, Ziegler-Heitbrock, HWL, Neumeier, D, Brand, K** (1999): 4-Hydroxynonenal prevents NF κ B activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting I κ B phosphorylation and subsequent proteolysis. *J Biol Chem* **274**: 11611-8.
- Palmer, CNA, Hsu, M, Griffin, KJ, Johnson, EF** (1995): Novel sequence determinants on peroxisome proliferator signalling. *J Biol Chem* **270**: 16114-21.
- Palmer, CNA, Hsu, M, Griffin, KJ, Raucy, JL, Johnson, EF** (1998): Peroxisome proliferator-activated receptor- α expression in human liver. *Mol Pharmacol* **53**: 14-22.
- Panayi, GS, Lanchbury, JS, Kingsley, GH** (1992): The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **35**: 729-35.
- Pelletier, JP, Martel-Pelletier, J, Howell, DS** (1997): Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopmann, WJ, editor. *Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology*. 13th ed. Baltimore: Williams & Wilkins 1969-84.
- Pelton, PD, Zhou, L, Demarest, KT, Burris, TP** (1999): PPARgamma activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **261**: 456-8.
- Postigo, AA, Garcia-Vicuna, R, Laffon, A Sanchez-Madrid, F** (1993): The role of adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* **16**: 69-76.
- Ramm S, Hansen C** (1995): Brennesselblätter-Extrakt bei rheumatischen Beschwerden. *Dtsch Apoth Ztg* **135**: 3-8.
- Ramm S, Hansen C** (1997): Brennesselblätter-Extrakt: Wirksamkeit und Verträglichkeit bei Arthrose und rheumatoider Arthritis. In: Chrubasik S, Wink M: *Rheumatherapie mit Phytopharmaka*. Hippokrates Verlag Stuttgart, 97-106
- Regnier, CH, Song, HY, Gao, X, Goeddel, DV, Cao, Z, Rothe, M** (1997). Identification and characterization of an I κ B kinase. *Cell* **90**: 373-83.
- Ricca, A, Biroccio, A, Del Bufalo, D, Mackay, AR, Santoni, A, Cippitelli, M** (2000): bcl-2 over-expression enhances NF- κ B activity and induces mmp-9 transcription in human MCF7 breast-cancer cells. *Int J Cancer* **86**: 188-96.
- Ricote, M, Li, AC, Wilson, TM, Kelly, CJ, Glass, CK** (1998a): The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**: 79-82.
- Ricote, M, Huang, J, Fajas, L, Li, A, Welch, J, Najib, J, Witztum, JL, Auwerx, J, Palinski, W, Glass, CK** (1998b): Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7614-19.
- Riehemann, K, Behnke, B, Schulze-Osthoff, K** (1999): Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF- κ B. *FEBS Lett* **442**: 89-94.
- Rigby, WFC, Denome, S, Fanger, MW** (1987): Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Clin Invest* **79**: 1659.
- Roecken, M, Racke, M, Shevach, EM** (1996): IL-4 induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. *Immunol Today* **17**: 225-31.

- Rossi, A, Kaphahi, P, Natoli, G, Takahashi, T, Chen, Y, Karin, M, Santoro, MG (2000): Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* **403**: 103-108.
- Rothwarf, D, Zandi, E, Natoli, G, Karin, M (1998): IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature* **395**: 297-300.
- Rusterucci, C, Montillet, J, Agnel, J, Battesti, C, Alonso, B, Knoll, A, Bessoule, J, Etienne, P, Suty, L, Blein, J, Triantaphylides, C (1999): Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J Biol Chem* **274**: 36446-55.
- Saito, S, Katoh, M, Masumoto, S, Masuho, Y (1998): Involvement of MMP-1 and MMP-3 in collagen degradation induced by IL-1 in rabbit cartilage explant culture. *Life Sci* **62**: 359-65.
- Scheidereit, C (1998): Docking I κ B kinases. *Nature* **395**: 225-6.
- Scheinman, RI, Cogswell, PC, Lofquist, AK, Baldwin, AS (1995): Role of transcriptional activation of I κ B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* **270**: 283-6.
- Schilcher, H (1988): Urtica-Arten – Die Brennessel. *Zeitschrift für Phytotherapie* **9**: 160-4.
- Schilcher, H, Kammerer, S (2000): Leitfaden Phytotherapie. Urban & Fischer Verlag, München. 1. Aufl.
- Schomakers, J, Bollbach, FD, Hagels, H (1995): Brennesselkraut. Phytochemische und anatomische Unterscheidung der Herba-Drogen Urtica dioica und U. urens. *Dtsch Apoth Ztg* **135**: 578-82.
- Schoonjans, K, Staels, B, Auwerx, J (1996): Role of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* **37**: 907-25.
- Schreiber, SL, Crabtree, GR (1992): The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* **13**: 136-42.
- Schulze-Osthoff, K, Los, M, Bauerle, PA (1995): Redox signalling by transcription factors NF-kappa B and AP-1 in lymphocytes. *Biochem Pharmacol* **50**: 735-41.
- Schulze-Tanzil, G, de Souza, P, Behnke, B, Klingelhofer, S, Shakibaei, M (2001): Effects of Hox alpha[®], a new stinging nettle leaf extract, on in vitro expression of matrix metalloproteinase in human articular chondrocytes.(Manuskript eingereicht).
- Sen, R, Baltimore, D (1986): Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**: 705-15.
- Seder, RA, Paul, WE (1994): Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD14+ T cells. *Annu Rev Immunol* **12**: 635-73.
- Shu, H, Wong, B, Zhou, G, Li, Y, Berger, J, Woods, JW, Wright, SD, Cai, TQ (2000): Activation of PPAR α or γ reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 345-9.
- Snijdewint, FGM, Kalinski, EA, Wierenge, JD, Bos, JD, Kapsenberg, ML (1993): Prostaglandine E₂ differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol* **150**: 5321-9.
- Spiegelman, BM (1998): PPAR γ in Monocyte: less pain, any gain? *Cell* **93**: 153-5.
- Staels, B, Koenig, W, Habib, A, Merval, R, Lebret, M, Pineda-Torra, I, Delerive, P, Fadel, A, Chinetti, G, Fruchart, JC, Najib, J, Maclouf, J, Tedgui, A (1998): Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature* **393**: 790-3.

- Stuhlmeier, KM, Kao, JJ, Bach, FH** (1997): Arachidonic acid influences proinflammatory gene induction by stabilizing the Inhibitor- κ B/Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) complex, thus suppressing the nuclear translocation of NF- κ B. *J Biol Chem* **272**: 24679-83.
- Su, CG, Wen, X, Bailey, ST, Jiang, W, Rangwala, SM, Keilbaugh, SA, Flanigan, A, Murthy, S, Lazar, MA, Wu, GD** (1999): A novel therapy for colitis utilizing PPAR γ ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* **104**: 383-9.
- Teucher, T, Obertreis, B, Rutkowski, T, Schmitz, H** (1996): Zytokin-Sekretion im Vollblut gesunder Probanden nach oraler Einnahme eines *Urtica dioica* L.-Blattextraktes. *Arzneim-Forsch/Drug Res* **46**: 906-10.
- Thanos, D, Maniatis, T** (1995): NF- κ B: a lesson in family values. *Cell* **80**: 529-32.
- Tontonoz, P, Hu, E, Graves, RA, Budavari, AI, Spiegelman BM** (1994): mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* **8**: 1224-34.
- Tontonoz, P, Nagy, L, Alvarez, JG, Thomazy, VA, Evans, RM** (1998): PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93**: 241-52.
- Towers, TL, Staeva, TP, Freedman, LP** (1999): A two-hit mechanism for Vitamin D3 mediated transcriptional repression of the granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor gene: Vitamin D receptor Competes for DNA binding with NFAT1 and Stabilizes c-Jun. *Mol cell Biol* **19**: 4191-9.
- Trinchieri, G** (1993): Interleukin-12 and its role in the generation of T_H1 cells. *Immunol Today* **14**: 335-38.
- Tsai, S, Liang, Y, Lin-Shiau, S, Lin, J** (1999): Suppression of TNF-alpha mediated NF κ B activity by myricetin and other flavonoids through downregulating the activity of IKK in ECV304 cells. *J Cell Biochem* **74**: 606-15.
- Vignon, E, Balblanc, JC, Mathieu, P, Louisot, P, Richard, M** (1993): Metalloprotease activity, phospholipase A2 activity and cytokine concentration in osteoarthritis. *Cartilage* **1**: 115-120.
- Vincenti, MP, Coon, CI, Brinckerhoff, CE** (1998): Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1beta-stimulated synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* **41**: 1987-94.
- Weber, C, Erl, W, Pietsch, A, Ströbel, M, Löm, HWL Ziegler-Heitbrock, Weber, PC** (1994): Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor- κ B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arterioscler Thromb* **14**: 1665-73.
- Wegener, T** (1999): Aktualisiertes wissenschaftliches Erkenntnismaterial zu *Urtica herba* (Brennesselkraut) und *Urtica folium* (Brennesselblätter). *Cooperation Phytopharmaka*.
- Weiss, A, Wiskocil, RL, Stobo, JD** (1984): The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL-2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol* **133**: 123-8.
- Wolf, F** (1998): Gonarthrose, Brennesselblätter-Extrakt IDS 23 in der Langzeitanwendung. *Der Kassenarzt* **44**: 52-4.
- Wolf, G** (1998): Fatty acids bind directly to and activate peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Nutrition Reviews* **56**: 61-3.
- Yang, JP, Merin, JP, Nakano, T, Kato, T, Kitade, Y, Okamoto, T** (1995): Inhibition of the DNA-binding activity of NF- κ B by gold compounds in vitro. *FEBS Lett* **361**: 89-96.

Yang, XY, Wang, LH, Chen, T, Hodge, DR, Resau, JH, DaSilva, L, Farrar, WL (2000): Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonists. *J Biol Chem* **275**: 4541-4.

Yesner LM, Huh, HY, Pearce, SF, Silverstein, RL (1996): Regulation of monocyte CD36 and Thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Artheroscler Thromb, Vasc Biol* **16**: 1019-25.

Yu, GS, Lu, YC, Gulick, T (1998): Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase I β gene promoters by fatty acid enzyme substrate. *J Biol Chem* **273**: 32901-9.

Ziegler-Heitbrock, HW, Thiel, E, Futterer, A, Herzog, V, Wirtz, A, Riethmuller, G (1988): Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer* **41**: 456-61.

Publikationen

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Klingelhoef, S, Obertreis, B, Quast, S, Behnke, B (1999): Antirheumatic effect of IDS 23, a stinging nettle leaf extract, on in vitro expression of T helper cytokines. *J Rheumatol* **26** 2517-2522.

Wiedow, O, Klingelhöfer, S, Rieck, A, Wick, R, Steffens, H, Behnke, B (2000): Lipophile Brennesselextrakte, Verfahren zu deren Herstellung und ihre Verwendung. Deutsche Patentanmeldung 10029562.2 (eingereicht)

Schulze-Tanzil, G, de Souza, P, Behnke, B, Klingelhoef, S, Shakibaei, M (2001): Effects of Hox alpha[®], a new stinging nettle leaf extract, on in vitro expression of matrix metalloproteinase in human articular chondrocytes. (Manuskript eingereicht).

Danksagung

Diese Arbeit wurde bei der Strathmann AG in Hamburg erstellt. Mein Dank gilt daher der Geschäftsführung für die Ermöglichung und Unterstützung der Arbeit. Herrn Dr. B. Behnke danke ich für die vielseitige und interessante Themenstellung, seine Unterstützung sowie sein stetes Interesse am Fortschritt dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Soll und Herrn Prof. Dr. W. Blaschek für die freundliche Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Herrn Dr. R. Wick und Frau Dr. A. Rieck danke ich für die Einweisung in die RP-HPLC, die Hilfe bei der Herstellung von Brennesselblätter-Extrakten und ihre Unterstützung bei analytischen Problemen. Mein Dank gilt auch Herrn H. Steffens (Biokirch GmbH, Neuenburg) für die Bereitstellung von Extrakten im Produktionsmaßstab. Bei Herrn PD Dr. I. Feußner vom IPK-Gatersleben bedanke ich mich für die Einarbeitung in die SP- und CP-HPLC.

Herrn Prof. Dr. K. Schulze-Osthoff (Universität Münster) danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Labor und seine Unterstützung bei den EMSA-Experimenten. Daneben möchte ich mich bei Herrn C. Stroh für die praktische Anleitung bei der Durchführung der EMSAs bedanken. Ferner danke ich Frau B. Hartung für die Hilfe bei der Herstellung hunderter Kern- und Gesamtzell-Extrakte, sowie Frau S. Strieben für die mindestens ebenso geduldige Unterstützung bei der Durchführung der Bioassays. Frau Dr. J. Broer danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft bei immunologischen Fragestellungen.

Frau Dr. T. Stadie, Herrn Dr. T. May, Frau Dr. K. Sohr sowie Frau Dr. C. Bleeker gebührt mein besonderer Dank für ihre konstruktiven Vorschläge bei der Korrektur dieser Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Kolleginnen und Kollegen für ihr Verständnis, ihre Hilfsbereitschaft, ihre Aufmunterungen und das gute Arbeitsklima.

Für jede weitere Form der Unterstützung bedanke ich mich besonders bei Martin und meiner Familie.

