

**Charakterisierung pflanzlicher Glucocorticoidrezeptor-
Modulatoren und ihrer Wirkungen auf den epithelialen
Natriumkanal (ENaC)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von

Dana Kuntzsch

aus Berlin

Mai 2013

Diese Arbeit wurde von August 2009 bis Mai 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke in der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, angefertigt.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke, Charité-Universitätsmedizin Berlin
2. Prof. Dr. Matthias F. Melzig, Freie Universität Berlin

Disputation: 17. Oktober 2013

- *Gelebt für die Familie* -

I.S.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe mit Wirkung auf den Glucocorticoidrezeptor	1
1.1.1	Glucocorticoide	1
1.1.2	Wirkung von Glucocorticoiden durch den Glucocorticoidrezeptor	1
1.1.3	Therapeutischer Einsatz und Nebenwirkung von Glucocorticoiden	3
1.1.4	Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe als GR-Liganden	5
1.1.4.1	Endiandrin A aus der Pflanze <i>Endiandra anthropophagorum</i> DOMIN	6
1.1.4.2	Ginsenosid Rg ₁ aus der Pflanze <i>Panax ginseng</i> C.A.MEY	8
1.1.4.3	Saikosaponin D aus der Pflanze <i>Bupleurum falcatum</i> L.	11
1.2	Epithelialer Natriumkanal (ENaC).....	13
1.2.1	Molekularer Aufbau des ENaCs	15
1.2.2	Regulation des ENaCs auf transkriptioneller Ebene	17
1.2.3	Regulation des ENaCs	18
1.2.3.1	Nedd4-2 und Sgk-1	19
1.2.3.2	Nedd4-2 und GILZ	20
1.2.4	Gestörte ENaC-Funktion bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	22
1.2.4.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	22
1.2.4.2	ENaC und chronisch entzündliche Darmerkrankung	23
1.3	Zielstellung der Arbeit	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.1.1	Pflanzenmaterial	26
2.1.1.1	Herkunft	26
2.1.1.1.1	<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Sichelblättriges-Hasenohr), Apiaceae	26
2.1.1.1.2	<i>Bupleurum chinensis</i> DC. (chin. Hasenohr), Apiaceae	27
2.1.1.1.3	<i>Endiandra anthropophagorum</i> DOMIN, Lauraceae	27
2.1.1.2	Phytochemisches Labor	27
2.1.1.2.1	Geräte	27
2.1.1.2.2	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.1.2.3	Laborchemikalien	28
2.1.1.2.4	Referenzsubstanzen	28
2.1.2	Eukaryotische Zellkultur	29
2.1.2.1	Zelllinie HT-29/B6-GR	29
2.1.2.2	Zellkultur Labor	29
2.1.2.2.1	Geräte	29
2.1.2.2.2	Verbrauchsmaterialien	30
2.1.2.2.3	Reagenzien	31
2.1.2.2.3.5	Laborchemikalien und andere Reagenzien	31

Inhaltsverzeichnis

2.1.2.2.3.6	Inhibitoren.....	33
2.1.2.2.3.7	Zytokine.....	33
2.1.2.2.3.8	Verwendete Kits.....	33
2.1.2.2.3.9	Antikörper.....	34
2.1.2.2.3.10	Sonden für Real-Time PCR.....	34
2.1.2.3	Verwendete Software.....	35
2.1.2.4	Lösungen.....	35
2.2	Methoden.....	38
2.2.1	Phytochemische Methoden.....	38
2.2.1.1	Extraktherstellung.....	38
2.2.1.2	Dünnschichtchromatographie und Hochleistungsdünnschicht- chromatographie.....	42
2.2.2	Zellkultur.....	43
2.2.2.1	Zellkultur-Epithelmodell.....	43
2.2.2.2	Kryo-Konservierung.....	44
2.2.2.3	Zugabe von Reagenzien zu eukaryotischen Zellen.....	44
2.2.2.4	Zytotoxizitätstest.....	45
2.2.2.5	Transiente Transfektion mittels Lipofektion und Reportergen-Assay.....	47
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	48
2.2.3.1	Gesamt-RNA Isolation.....	48
2.2.3.1.1	Tierisches Gewebe.....	48
2.2.3.1.2	Kultivierte Epithelzellen.....	49
2.2.3.2	Reverse Transkription und Real-time PCR.....	49
2.2.4	Proteinchemische Methoden.....	51
2.2.4.1	Gewinnung der Zelllysate.....	51
2.2.4.2	Proteinbestimmung.....	52
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	53
2.2.4.4	Western Blot.....	53
2.2.5	Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	54
2.2.6	Elektrophysiologische Methoden in Ussing-Kammern.....	55
2.2.6.1	Elektrophysiologische Messung an humaner Kolonzelllinie HT-29/B6-GR.....	56
2.2.6.2	Elektrophysiologische Messung an distalem und proximalem Rattenkolon.....	57
2.2.7	Statistische Analysen.....	58
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und ihre Wirkung auf den Glucocorticoidrezeptor.....	59
3.1.1	Endiandrin A.....	59
3.1.1.1	Bestimmung der Zytotoxizität von Endiandrin A in humanen Kolonzellen.....	60
3.1.1.2	Charakterisierung von Glucocorticoidrezeptor-Transaktivierung durch Endiandrin A in humanen Kolonzellen.....	61

Inhaltsverzeichnis

3.1.1.3	Der Effekt von Endiandrin A auf den ENaC-vermittelten Na ⁺ -Transport in humanen Kolonzellen.....	62
3.1.1.4	Regulation des Glucocorticoid-induzierten ENaC durch Endiandrin A im distalen Rattengewebe unter entzündlichen Bedingungen	64
3.1.1.5	Regulation des Glucocorticoid-induzierten ENaC durch Endiandrin A unter entzündlichen Bedingungen in humanen Kolonepithelzellen	68
3.1.1.6	Charakterisierung von Glucocorticoidrezeptor-Transaktivierung durch Endiandrin A unter hormonellen und entzündlichen Konditionen.....	71
3.1.1.7	Regulation von Glucocorticoidrezeptor-Proteinexpression und mRNA-Level durch Endiandrin A	72
3.1.1.8	Rolle der JNK MAP-Kinase und zelluläre Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors	76
3.1.1.9	Rolle der p38 und ERK MAP-Kinase	83
3.1.1.10	Rolle der Serum-und Glucocorticoid-induzierbaren Kinase-(Sgk-)1.....	88
3.1.1.11	Regulation des ENaCs unter zusätzlicher Butyrat-Stimulation	91
3.1.1.12	Charakterisierung der Auswirkung einer GC-Dosisreduktion auf den epithelialen Na ⁺ -Transport unter entzündlichen Bedingungen und unter dem Einfluss von Endiandrin A	94
3.1.2	Endiandra-Extrakt	96
3.1.2.1	Regulation des Glucocorticoid-induzierten ENaC durch den Endiandra-Extrakt im proximalen Rattengewebe unter entzündlichen Bedingungen	96
3.1.2.2	Regulation des Glucocorticoid-induzierten ENaC durch Endiandra-Extrakt in humanen Kolonzellen unter entzündlichen Bedingungen	97
3.1.3	Ginsenosid Rg ₁	99
3.1.4	Saikosaponin D.....	101
3.2	Phytochemische Untersuchung von Bupleurum-Extrakten.....	104
3.2.1	Dünnschichtchromatographie von Bupleurum-Extrakten und Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden	104
4	Diskussion	108
4.1	Aktueller Stellenwert von pflanzlichen Glucocorticoidrezeptor-Modulatoren in der Therapie von entzündlichen Erkrankungen	108
4.1.1	Lignane der australischen Pflanze <i>Endiandra anthropophagrum</i> DOMIN als Glucocorticoidrezeptor-Modulatoren	111
4.1.1.1	Beeinflussung des intestinalen epithelialen Na ⁺ -Kanals durch Inhaltsstoffe der <i>Endiandra anthropophagorum</i> DOMIN	115
4.1.1.1.1	Rolle der JNK im Endiandrin A-abhängigen Signalweg.....	118
4.1.1.1.2	Rolle der p38 und ERK im Endiandrin A-abhängigen Signalweg	120
4.1.1.1.3	Rolle der Sgk-1 im Endiandrin A-abhängigen Signalweg	122
4.1.2	Inhaltsstoffe aus <i>Panax ginseng</i> C.A.MEY und <i>Bupleurum falcatum</i> L. als Glucocorticoidrezeptor-Liganden.....	125
4.1.3	Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit pflanzlich angewandeter Medizin	127
4.2	Diskussion der phytochemischen Untersuchung von Bupleurum-Spezies.....	130

Inhaltsverzeichnis

5	Zusammenfassung.....	134
6	Summary	136
7	Literatur.....	138
7.1	Verwendete Bücher.....	156
8	Abkürzungsverzeichnis	157
9	Anhang.....	160

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Glucocorticoide	2
Abb. 1.2:	<i>Endiandra anthropophagorum</i> DOMIN	7
Abb. 1.3:	<i>Panax ginseng</i> C.A.MEY	10
Abb. 1.4:	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	13
Abb. 1.5:	Ausschüttung des Mineralocorticoids Aldosteron durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems	14
Abb. 1.6:	Der epitheliale Natriumkanal (ENaC).....	16
Abb. 1.7:	Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC)	21
Abb. 2.1:	Frisches und getrocknetes- bzw. gemahlene Pflanzenmaterial der <i>Bupleurum falcatum</i> L. des Botanischen Gartens der Universität Bonn.....	38
Abb. 2.2:	Droge der <i>Bupleurum chinensis</i> DC.	38
Abb. 2.3:	Extraktion nach Tian et al. [168]	39
Abb. 2.4:	Extraktion nach der japanischen Pharmakopöe.....	40
Abb. 2.5:	Extraktion nach Zhao et al. [169].....	40
Abb. 2.6:	Extraktion nach dem Arzneibuch der chinesischen Medizin	41
Abb. 2.7:	Extraktion nach Yen et al. [170].....	41
Abb. 2.8:	HT-29/B6-GR-Zellen kultiviert auf PCF-Filter in einer Zellkulturschale	44
Abb. 2.9:	Schema für den Ablauf des Kristallviolett-Assays.....	46
Abb. 2.10:	Kristallviolett-Assay	47
Abb. 2.11:	Schema des Reportergen-Assays mit dem pGRE-Luc Reporterplasmid	48
Abb. 2.12:	Isolierung der RNA	49
Abb. 2.13:	Pipettierschema der Proteinbestimmung	52
Abb. 2.14:	Ussing-Kammer Aufbau (modifiziert nach Li et al. 2004 [176])	56
Abb. 3.1:	Zytotoxizität von Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen	60
Abb. 3.2 :	Der Effekt von Endiandrin A auf die GR-Transaktivierung in HT-29/B6-GR-Zellen	62
Abb. 3.3:	Die ENaC-abhängige Na ⁺ -Resorption unter dem Einfluss von Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen.....	63
Abb. 3.4 :	Die Expression der ENaC-Untereinheiten in Endiandrin A-behandelten HT-29/B6-GR-Zellen	64
Abb. 3.5:	Der GC-induzierte ENaC-vermittelte Na ⁺ -Transport unter dem Einfluss von TNF- α und Endiandrin A in murinen distalen Kolongeweben.....	66
Abb. 3.6:	Expression der ENaC-Untereinheiten im Endiandrin A-behandelten distalem Kolon der Ratte	67
Abb. 3.7:	Induktion des ENaC-vermittelten Na ⁺ -Transportes unter Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A Behandlung in HT-29/B6-GR-Zellen.....	69
Abb. 3.8:	Die Expression der ENaC-Untereinheiten unter dem Einfluss von Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen.....	70
Abb. 3.9:	Reportergen-Analysen in HT-29/B6-GR-Zellen	72
Abb. 3.10:	Veränderungen des GR- und pGR-Proteinlevels unter dem Einfluss von Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen.....	73
Abb. 3.11:	Die Expression des GR unter dem Einfluss von Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen	76
Abb. 3.12:	Die Induktion des ENaC-vermittelten Na ⁺ -Transportes unter Inhibition der JNK-MAPK und dem Einfluss von Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen.....	77

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.13: Die Wirkung von Endiandrin A auf die TNF- α -induzierte Aktivierung des JNK-Signalweges in HT-29/B6-GR-Zellen.....	78
Abb. 3.14: Die Wirkung von Endiandrin A auf die TNF- α - und Dexamethason-induzierte Aktivierung des JNK-Signalweges in HT-29/B6-GR-Zellen	79
Abb. 3.15: Einfluss von Endiandrin A auf die GR-Translokation, dargestellt mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie in HT-29/B6-GR-Zellen.....	81
Abb. 3.16: Einfluss von Endiandrin A auf die GR-Translokation, dargestellt mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie in HT-29/B6-GR-Zellen.....	82
Abb. 3.17: Die ENaC-abhängige Na ⁺ -Resorption und die Expression der γ -ENaC-Untereinheit unter dem Einfluss von p38- und ERK-Inhibitoren in HT-29/B6-GR-Zellen.....	84
Abb. 3.18: Analyse der GR-Gesamtproteinexpression unter p38-Inhibition und des Western Blots zur Charakterisierung der MAPK-Aktivierung in HT-29/B6-GR-Zellen.....	85
Abb. 3.19: Die Wirkung von Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A auf den p38- und ERK-Signalweg in HT-29/B6-GR-Zellen	87
Abb. 3.20: Induktion der Sgk-Promotoraktivität und Expression der Sgk-1 mRNA in HT-29/B6-GR-Zellen	89
Abb. 3.21: Die Expression der Sgk-1 mRNA unter Inhibitoren-Einfluss, sowie die Expression der GILZ mRNA in HT-29/B6-GR-Zellen	91
Abb. 3.22: Der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom unter dem Einfluss von Butyrat, Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen.....	92
Abb. 3.23: Die Expression der ENaC-Untereinheiten unter dem Einfluss von Butyrat, Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen.....	93
Abb. 3.24: Der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom unter dem Einfluss von Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen.....	95
Abb. 3.25: Der GC-induzierte ENaC-vermittelte Na ⁺ -Transport unter dem Einfluss von TNF- α und Endiandra-Extrakt an murinen proximalen Kolongeweben	97
Abb. 3.26: Induktion der ENaC-vermittelten Na ⁺ -Resorption unter Dexamethason, TNF- α und Endiandra-Extrakt, bzw. DMSO-Behandlung in HT-29/B6-GR-Zellen	99
Abb. 3.27: Der Einfluss von Ginsenosid Rg ₁ HT-29/B6-GR-Zellen	101
Abb. 3.28: Der Einfluss von Saikosaponin D in HT-29/B6-GR-Zellen	103
Abb. 3.29: Vergleich von verschiedenen Extraktions- und Trennverfahren von dem Pflanzenmaterial der <i>Bupleurum falcatum</i> L.	105
Abb. 3.30: Vergleich von <i>Bupleurum falcatum</i> L. und <i>Bupleurum chinensis</i> DC.	107
Abb. 4.1: Pflanzliche GR-Liganden.....	113
Abb. 4.2: Modellierung einer Steroid-Bindung von Endiandrin A und B	114
Abb. 4.3: Pflanzliche JNK-Inhibitoren	119
Abb. 4.4: Schema zu den Effekten von Endiandrin A auf die ENaC-abhängige Na ⁺ -Resorption.....	124

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	<i>Panax ginseng</i> C.A.MEY Verteilung der Ginsenoside im Ginseng.....	9
Tab. 1.2:	<i>Panax ginseng</i> C.A.MEY Beschriebene Wirkungen des Ginsengs und einzelner Inhaltsstoffe (modifiziert nach Sticher et al. 2007)	10
Tab. 1.3:	<i>Bupleurum falcatum</i> L. Chinesische Tee-Rezeptur.....	12
Tab. 2.1:	Temperaturverlauf einer Real-Time PCR	50

1 Einleitung

1.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe mit Wirkung auf den Glucocorticoidrezeptor

1.1.1 Glucocorticoide

Glucocorticoide (GC) besitzen eine lebensnotwendige Bedeutung für den menschlichen Organismus. Sie werden aus dem Vorläufermolekül Cholesterin durch eine Abfolge von enzymatischen Reaktionen in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde synthetisiert. Gemeinsam mit dem Hypothalamus und der Hypophyse stellt die Nebennierenrinde ein organübergreifendes Regelsystem, das hypothalamo-hypophyseal-adrenales System, dar, das die Biosynthese der GC steuert [1]. Der Hypothalamus sezerniert im zirkadianen und pulsatischen Rhythmus das Corticotropin-releasing-Hormon (CRH) in die Hypophyse, woraufhin das Adrenocorticotropin (ACTH) zunächst synthetisiert, dann in die Blutbahn ausgeschüttet wird. Über den Blutstrom gelangt das ACTH in die Zona fasciculata der Nebennierenrinde, wo die Bildung des Cortisols, des physiologisch wichtigsten Glucocorticoids, stimuliert wird [2, 3]. Die ausgeprägte zirkadiane Rhythmik verursacht eine maximale Cortisol-Konzentration am Morgen und einen Tiefpunkt gegen Mitternacht. Freigesetztes Cortisol inhibiert durch eine negative Rückkopplung die Synthese und Sekretion des CRH und ACTH, wodurch das Regelsystem in einem konstanten Gleichgewicht gehalten wird. In der Blutbahn zirkulierendes, freies GC wird entweder an Transcortin, ein Corticosteroid-bindendes Transportprotein, gebunden oder in der Leber inaktiviert und über den Urin ausgeschieden [3]. Darüber hinaus kann es jedoch durch Stresssituationen, beispielsweise ausgelöst durch Infektionen oder psychische Belastung, zur Entgleisung des Systems und einem erheblichen Anstieg von Glucocorticoiden im Serum kommen (Abb. 1. 1) [4]. Die Auswirkungen von Glucocorticoiden auf den menschlichen Organismus werden in den folgenden Absätzen erläutert.

1.1.2 Wirkung von Glucocorticoiden durch den Glucocorticoidrezeptor

Seit Ende des 19. Jahrhunderts ist die physiologische und lebensnotwendige Funktion der Nebennieren und der dort synthetisierten wichtigen Botenstoffe bekannt. Beginnend mit der Isolierung des Cortisols (1936) konnte die Funktion der Glucocorticoide immer weiter im Detail aufgeklärt werden [5].

Glucocorticoide beteiligen sich an einer Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen im Körper. Vor allem aber durch ihr Eingreifen in die Regulierung des Kohlenhydratstoffwechsels, insbesondere der Gluconeogenese, und zusätzlicher kardiovaskulärer und zentralnervöser Effekte, ermöglichen sie dem Organismus, schnell auf Umweltveränderungen zu reagieren [6]. Zumeist stimulieren GC hierbei die Transkriptionsrate von GC-abhängigen Genen, um so eine Veränderung der Stoffwechselprozesse zu bewirken. Darüber hinaus besitzen GC äußerst ausgeprägte immunsuppressive und entzündungshemmende Eigenschaften [7]. Im Allgemeinen wird die Wirkung der Glucocorticoide durch Bindung an einen ubiquitär exprimierten, intrazellulären Hormonrezeptor, den Glucocorticoidrezeptor (GR), vermittelt. Zusätzlich besitzen GC auch eine Affinität zum Mineralocorticoidrezeptor (MR), jedoch wird dieser Rezeptor in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf eine Glucocorticoidbindung nicht im Fokus stehen [7-9].

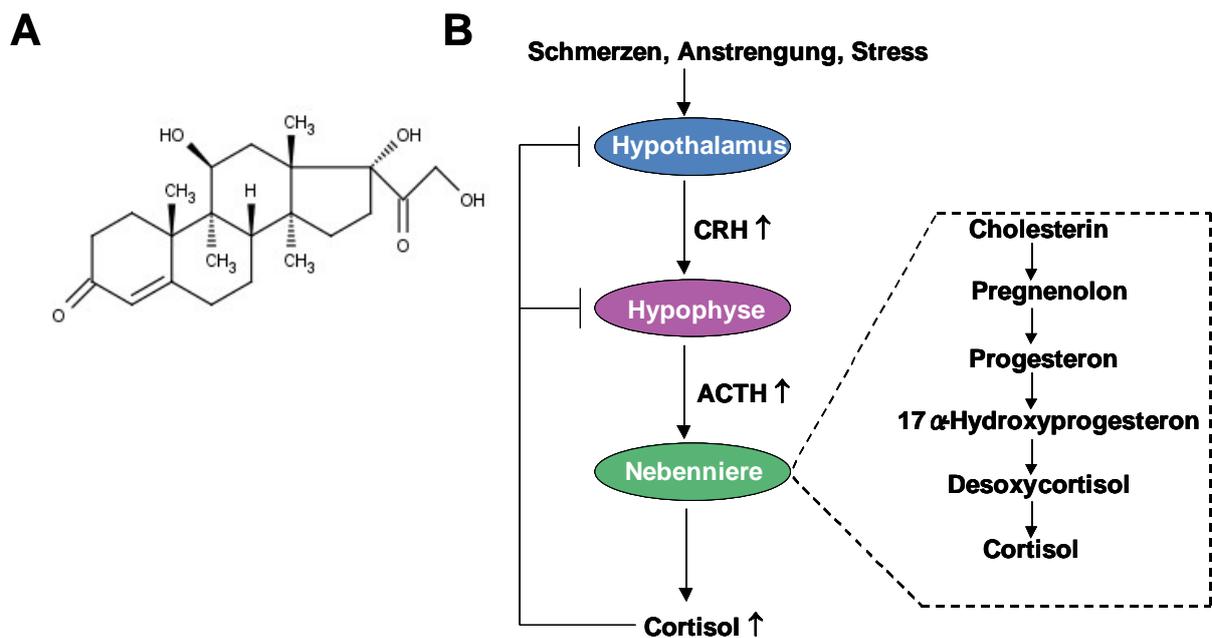


Abb. 1.1: Glucocorticoide

(A) Cortisol.

(B) Darstellung der hypothalamo-hypophyse-adrenalen Achse und der Bildung des Cortisols aus Cholesterin in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde.

Der GR wird vom Gen *NR3C1* codiert und gehört zu der Superfamilie nukleärer Hormonrezeptoren, zu welchen auch der MR oder der Östrogenrezeptoren (ER) gezählt werden und welche als Liganden-induzierte Transkriptionsfaktoren wirken [10]. Nach erfolgter Transkription und Translation des *NR3C1* Gens, können zwei unterschiedliche Isoformen, GR- α und

GR- β , hervorgebracht werden, die sich ausschließlich im C-terminalen Anteil des Moleküls unterscheiden [11]. Diese molekulare Veränderung bewirkt, dass der GR- α als klassischer GR fungiert und damit die Glucocorticoideffekte vermittelt, hingegen der GR- β nicht fähig ist, GC zu binden und sogar als Liganden-unabhängiger negativer Regulator von Glucocorticoideffekten auftritt [9]. Der GR- α befindet sich in seinem inaktiven Zustand im Zytosol, gebunden an Hitzeschockproteine (Hsp), u. a. Hsp-90, sog. Chaperonen, behilflich bei der korrekten individuellen GR-Proteinfaltung [12]. Ein GC, das infolge seiner lipophilen Struktur ungehindert die Zellmembran passieren kann, bindet am GR und löst damit verschiedene Aktivierungskaskaden aus. Der aktivierte Glucocorticoidrezeptor kann einerseits in den Zellkern translozieren, an GR-bindenden Domänen im Genom binden und, wie oben bereits erwähnt, eine Steigerung der Transkriptionsrate von Zielgenen (Transaktivierung) auslösen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine hormonelle Stimulation durch GC vorwiegend eine Phosphorylierung am GR-Ser²¹¹ bewirkt und dieses mit einer gesteigerten GR-Transaktivierung assoziiert ist [13]. Daneben können GC auch eine Inhibierung der Transkription von Genen (Transrepression) induzieren. Dies ist ein molekularer Mechanismus, der vor allem bei immunmodulierenden und antientzündlichen Prozessen stattfindet. Bei einem therapeutischen Einsatz von GC ist die Transrepression in vielen Fällen gewünscht, wohingegen die therapiebegleitende Transaktivierung interessanterweise zumeist als unerwünschte Nebenwirkung auftritt.

1.1.3 Therapeutischer Einsatz und Nebenwirkung von Glucocorticoiden

Erstmals wurden Glucocorticoide 1948 bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Die rheumatoide Arthritis ist eine chronisch entzündliche Gelenkerkrankung, die durch eine übermäßige Immunreaktion im Knorpel- und Gelenkgewebe gekennzeichnet ist. Die hochpotenten entzündungshemmenden GC zeigten eine schnelle Verbesserung der Erkrankung und ebneten mit dieser Beobachtung den breiten Einsatz von GC bei Behandlungen vieler chronisch- und akut-entzündlicher Krankheiten [14].

Der antiinflammatorische Effekt von Glucocorticoiden ist durch die GC-ausgelöste Transrepression zu erklären. Anfänglich bindet hierbei der aktivierte GR- α zumeist einen anderen vorliegenden aktivierenden Transkriptionsfaktor, wie den Nuclear-factor κ -B (NF- κ B). Bedingt durch diese Wechselwirkung wird der Transkriptionsfaktor fortführend in seiner weiteren Aktivität gehemmt. Im Falle des NF- κ B wird die Interaktion mit den DNA-Bindungsdomänen verhindert, wodurch die Expression entzündlicher Faktoren, u. a. Zytokine

(Interleukin-2 (IL-2), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)) sowie Enzyme (Phospholipasen, Cyclooxygenasen), blockiert wird. Des Weiteren konnten Glucocorticoidwechselwirkungen mit den Transkriptionsfaktoren Aktivatorprotein 1 (AP-1), cAMP-responsive element binding protein (CREB) oder auch signal transducers and activators of transcription (STAT) gezeigt werden. Als Folge der Wechselwirkung kommt es zu einer Beeinträchtigung der Gentranskription und daraufhin häufig zu einer schnellen Verbesserung des jeweiligen untersuchten Entzündungsprozesses [15-18].

Die anfängliche Euphorie, ein Mittel gegen sämtliche Entzündungen gefunden zu haben, legte sich jedoch sehr schnell wieder. Es zeigte sich, dass bei einer Langzeittherapie mit GC schwerwiegende Nebenwirkungen auftraten. Auch heutzutage werden GC immer noch sehr häufig angewandt, dabei oft in einer Langzeittherapie, beispielsweise werden sie eingesetzt bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, jedoch nur nach sorgfältiger Nutzen-Risiko-Abschätzung. Durch die Gabe exogener GC werden zusätzlich zu den erwünschten entzündungshemmenden Wirkungen insbesondere metabolische Funktionen des Organismus beeinträchtigt. Der Organismus reagiert dabei auf die GC, u. a. mit der Transaktivierung von GC-sensitiven Zielgenen. Hierbei hat sich meist nach erfolgter GR-Aktivierung ein Homodimer aus zwei GR- α -Molekülen gebildet, das an den GC-spezifischen Bindungsstellen im Genom, den sogenannten GC responsive elements (GRE), bindet und somit die gesteigerte Transkription einleitet [19]. Unter physiologischen Bedingungen steht dies im konstanten Gleichgewicht. Bei einer zusätzlichen und ständigen Gabe von GC, wie bei einer Langzeittherapie, findet durch den Stimulus ein ständiger Eingriff in den Stoffwechsel statt, was im Auftreten von Nebenwirkungen resultiert. Häufig auftretende Nebenwirkungen einer GC-Therapie sind Abbau von Muskulatur und Fettgewebe, sowie eine Umverteilung von Fettgewebe, aber auch Störungen im Elektrolyt-Haushalt, Hemmung des Knochenaufbaus, Ausbildung von Diabetes mellitus (Steroiddiabetes) und eine erhöhte Infektanfälligkeit aufgrund der GC-induzierten Immunsuppression [19-21].

Demnach ist die Suche nach GR-Agonisten, die einerseits die gewünschte Wirkung, andererseits keine weiteren Nebeneffekte aufweisen, seit längerem ein großes Forschungsvorhaben. Neue chemisch-definierte GC zeigen zwar selektive Eigenschaften, aber unter Langzeitanwendung treten teilweise immer noch, wenn auch geringer ausgeprägt, die bekannten Nebenwirkungen auf [19-27]. Daher wird mittlerweile auch nach pflanzlichen Alternativen, wie sekundären Pflanzeninhaltsstoffen gesucht, die GR-modulierende

Eigenschaften aufweisen, um möglicherweise eine günstigere Wirkungs-Nebenwirkungs-Relation zu erzielen.

1.1.4 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe als GR-Liganden

Als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe werden eine große Anzahl von unterschiedlichen Verbindungen beschrieben, die ausschließlich im sekundären Stoffwechsel von Pflanzen gebildet werden. Sie dienen den Pflanzen dabei in vielfältigen Funktionen, unter anderem als Farb- oder Duftstoffe, als Abwehrstoffe gegen Schädlinge, Krankheiten oder Parasiten, oder auch als Regulatoren des Pflanzenwachstums. Über viele sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe ist noch relativ wenig bekannt wie z.B. zu ihrer Wirkungsweise auf den menschlichen Organismus.

Beispielhaft für das derzeitige Interesse an ihnen und die davon angestoßene intensive Erforschung seien hier die Phytoöstrogene genannt. In der alternativen Medizin haben diese vor allem in den letzten Jahren einen großen Bekanntheitsgrad erlangt. Oft werden sie als pflanzliche Alternative zu chemischen-definierten Östrogenen bei Störungen des weiblichen Hormonhaushaltes, wie bei dem Prämenstruellen Syndrom (PMS) oder bei Wechseljahresbeschwerden aufgrund ihres günstigen Nutzen-Risiko-Verhältnisses eingesetzt. Neben Inhaltsstoffen aus der Sojabohne (*Glycine max* (L.) Merr.) und der Wurzel der Traubensilberkerze (*Cimicifuga racemosa* L.), werden auch den Inhaltsstoffen aus den Früchten des Mönchspfeffers (*Vitex agnus-castus* L.) östrogenartige Wirkungen nachgesagt [28]. Interessanterweise weisen diese Inhaltsstoffe meist keine steroidartige Struktur auf, sondern gehören chemisch häufig den Flavonoiden oder Lignan an. Doch während die Forschung zu den pflanzlichen Östrogenrezeptor-Modulatoren relativ weit vorangekommen ist, befindet sie sich bei anderen Steroidrezeptoren noch in den Anfängen. Die Suche nach pflanzlichen GR-Agonisten, die einen entzündungshemmenden Effekt aufweisen, ohne dabei die bekannten Nebenwirkungen von chemisch-definierten GC wie Dexamethason vor allem in einer erforderlichen steroidal Langzeittherapie zu entwickeln, hat erst kürzlich begonnen. Einerseits wird weltweit in Kultur- bzw. Heilpflanzen, denen eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben wird, andererseits in großen Hochdurchsatz-Screenings (High-Throughput-Screening; HTS) nach potentiellen GR-Liganden gesucht.

In den letzten 10 Jahren zeigten Inhaltsstoffe aus *Endiandra anthropophagorum* DOMIN, *Panax ginseng* C.A.MEY und *Bupleurum falcatum* L. GR-bindende Eigenschaften [29-32]. In den folgenden Abschnitten werden die drei Pflanzen und die dazugehörigen Inhaltsstoffe das

Endiandrin A aus *Endiandra anthropophagorum* DOMIN, das Ginsenosid Rg₁ aus *Panax ginseng* C.A.MEY und das Saikosaponin D aus *Bupleurum falcatum* L. im Näheren betrachtet.

1.1.4.1 Endiandrin A aus der Pflanze *Endiandra anthropophagorum* DOMIN

Endiandra anthropophagorum DOMIN (benannt 1928), ein Pflanzenvertreter aus der Familie der Lauraceae (Lorbeergewächse), ist ein immergrüner Baum, der ausschließlich in den australischen Regenwäldern nördlich des Bundesstaates Queensland in 40 bis 200 m Höhe verbreitet ist. Die Zweige der Pflanze sind entweder stielrund oder gerillt, bei jungen Zweigen flaumig behaart, später dann unbehaart. Die Laubblätter sind ganzrandig, lanzettförmig bis elliptisch, bis zu 16 cm lang und 6.5 cm breit. Die cremig-grün gefärbten, nicht duftenden Blüten sind in axillär stehenden Blütenständen zusammengefasst. Blütezeit ist im März, Juli, Dezember und Januar. Nach erfolgter Bestäubung tritt die Frucht als eine kugelförmige, blassrosa- bis gelblich-gefärbte Beere mit einer Größe bis zu 6.5 × 6.4 cm auf (DOMIN 1928) (Abb. 1.2).

Nur sehr wenig ist über eine traditionelle Anwendung der australischen Buschpflanze *E. anthropophagorum* DOMIN bekannt. Der botanische Gattungsname *Endiandra* leitet sich ab von den griechischen Wörtern *endeia* = Mangel oder Fehlen und *andros* = Mann, was auf ein Fehlen von 6 äußeren Staubblättern hinweist. Anfang des 20. Jahrhunderts beobachtete der tschechische Botaniker Karel Domin bei seinem Forschungsaufenthalt in Australien, wie die Ureinwohner Australiens, die Aboriginies, die Frucht dieser Pflanze aßen. Daher das artspezifische Epitheton (Hayland 1989). Später beschrieb Domin die australische Buschpflanze in seinem Werk *Bibliotheca botanica* 89 (1928).

Bei der phytochemischen Untersuchung des Wurzelextraktes der *E. anthropophagorum* DOMIN sind Lignane, u. a. die Naturstoffe Nectandrin B und (-)-Nordihydroguajaretsäure, beschrieben worden. Diese beiden bekannten Inhaltsstoffe wurden auch in anderen Pflanzenvertretern, wie *Myristica fragans* HOUTT (Muskatnuss, Myristicaceae) oder *Larrea tridentata* COVILLE (Kreosotbusch, Zygophyllaceae), beschrieben [33, 34]. Des Weiteren wurden andere, noch unbekannte Pflanzeninhaltsstoffe wie Endiandrin A und Endiandrin B, beide strukturell den Cyclobutan-Lignanen zuzuordnen, charakterisiert. Obwohl Endiandrin A und Endiandrin B vom chemischen Aufbau her grundsätzlich eine gleiche Konstitution aufweisen (C₂₀H₂₄O₄), unterscheiden sie sich dennoch in ihrer stereochemischen Struktur voneinander (Abb. 1.2).

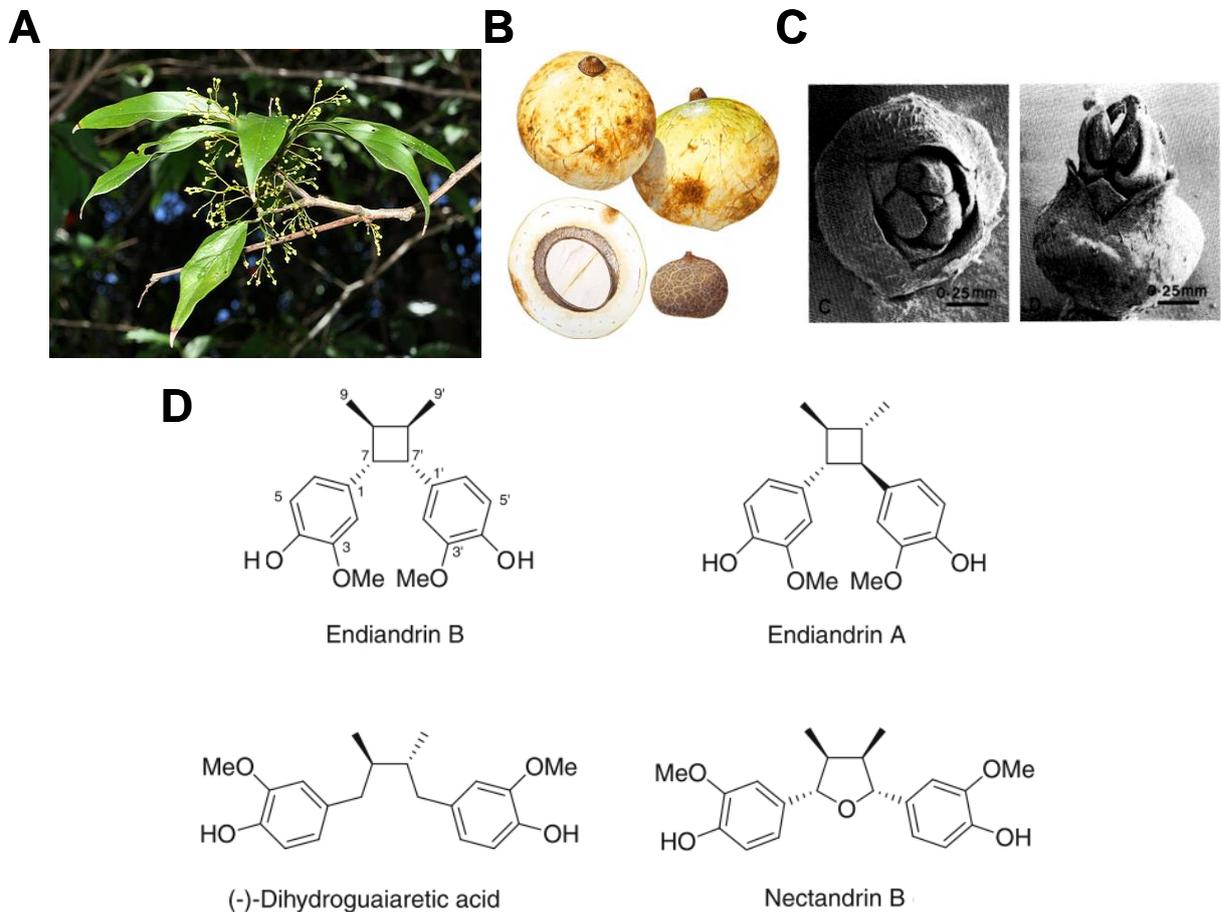


Abb. 1.2: *Endiandra anthrophagorum* DOMIN

- (A) Blütenstand und Blätter (Abbildung entnommen von florafnq.wordpress.com).
 (B) Frucht (Abbildung entnommen vom Factsheet *E. anthrophagorum* DOMIN, Herausgeber W.T.Cooper).
 (C) Blüte (Abbildung entnommen aus Aust. Syst. Bot., 1989,2, 135-367).
 (D) Endiandra-Lignane (Abbildung entnommen aus Davis et al. 2009).

In einem Screening einer australischen Arbeitsgruppe auf Pflanzeninhaltsstoffe, die am GR binden können, wurde Endiandrin A als pflanzlicher GR-Ligand beschrieben [30]. Hingegen wurde Endiandrin B zusammen mit weiteren Endiandra-Lignanen nur als zytotoxisches Lignan gegenüber der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 charakterisiert [35]. Zu der GR-Bindungsaffinität von Endiandrin B ist derzeit noch nichts bekannt. Davis und seine Arbeitsgruppe zeigten, dass vor allem der Cyclobutanring in den Endiandra-Lignanen für die GR-Bindung bedeutungsvoll ist. Auch vorhandene Hydroxylgruppen am C-4/C-4' erhöhen die GR-Bindungsaffinität. Eine verminderte Bindung am GR wurde festgestellt, wenn die

Hydroxygruppen am C-4/C-4' methyliert oder acetyliert waren [30]. Demnach weisen möglicherweise vor allem die Cyclobutan-Lignane Endiandrin A und Endiandrin B GR-modulierende Eigenschaften auf, wie an der Darmzelllinie HT-29/B6-GR hier gezeigt.

1.1.4.2 Ginsenosid Rg₁ aus der Pflanze *Panax ginseng* C.A.MEY

Panax ginseng C.A.MEY (benannt 1843), aus der Familie der Araliaceae (Araliengewächse), ist eine krautige Staude, die ursprünglich vor allem in den schattigen Wald- und Gebirgsregionen Ostasiens vorkam. Wegen der großen Nachfrage nach der Ginseng-Pflanze wird sie jedoch heute auch weltweit kultiviert. An den kahlen Blattstängeln des Ginsengs stehen die langgestielten, gefingerten Laubblätter, meistens 3 bis 5 Blätter, an endständigen Wirteln zusammen. Die elliptisch bis länglich-elliptisch geformten Blätter sind bis zu 12 cm lang und 5 cm breit, wobei der Spreitenrand eine gesägte Form aufweist und die Blattunterseite behaart ist. Als Blütenstand tritt eine endständige Dolde auf, die 30 bis 50 weiß-grüne Blüten besitzt, die von Juni bis Juli blühen. Werden die Blüten bestäubt und befruchtet, entwickeln sich tiefrot-gefärbte, kugelige, 5 × 7 mm große Steinfrüchte (Wagner et al. 1993, Sticher et al. 2007) (Abb. 1.3).

Die traditionelle Anwendung des Ginsengs reicht bis zu 2000 Jahre zurück, und bis heute ist die Droge Ginseng Radix, die Wurzel der Pflanze, eines der bekanntesten und am häufigsten eingesetzten Heilmittel der traditionellen chinesischen und koreanischen Medizin. Ginseng wird als „Allheilmittel“ gesehen; eine Bedeutung, die sich in dem botanischen Gattungsnamen *Panax* wiederfinden lässt. Das Wort *Panax* leitet sich ab von der griechischen, allheilenden Göttin Panakeia, neben Hygeia (Göttin der Gesundheit) die zweite Tochter des Äskulaps (Gott der Heilkunst) [36]. Aus dem Chinesischen stammt das botanische Epitheton *ginseng*, was soviel bedeutet wie „Menschenwurzel“. Der spindelförmige Wurzelstock des Ginsengs kann bis zu 20 cm lang und 2 cm dick werden, weist oft ein oder mehrere starke Verzweigungen auf und ähnelt gelegentlich der Menschengestalt. Nach 4 bis 6 Jahren kann die Wurzel erstmalig geerntet und weiterverarbeitet werden. Als wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe der Droge wurden vor allem die Ginsenoside beschrieben, welche strukturell den Triterpensaponinen zuzuordnen sind. Ginseng enthält mehr als 30 verschiedene Ginsenoside, die in verschiedene Gruppen und Untergruppen eingeteilt wurden (Ginsenosid Ra bis Rh, geordnet nach Polarität) und größtenteils vor allem in den Haarwurzeln und in den Blättern der Pflanze vertreten sind [37] (Tab. 1.1).

	% Gehalt								Gesamt
	Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	Rd	
Blätter	1.078	1.524	-	-	0.184	0.736	0.553	1.113	5.188
Blattstiele	0.327	0.141	-	-	-	0.190	-	0.107	0.765
Stängel	0.292	0.070	-	-	-	-	0.397	-	0.759
Hauptwurzel	0.379	0.153	0.092	0.023	0.342	0.190	0.131	0.038	1.348
Seitenwurzeln	0.406	0.668	0.203	0.090	0.850	0.738	0.434	0.143	3.532
Wurzelhaare	0.376	1.512	0.150	0.249	1.351	1.349	0.780	0.381	6.148

Tab. 1.1: *Panax ginseng* C.A.MEY Verteilung der Ginsenoside im Ginseng
(nach Sticher et al. 1980).

Die vielseitig beschriebenen positiven Wirkungen auf den Körper und das breite Anwendungsspektrum des Ginsengs sind wohl hauptsächlich auf die Gesamtheit aller vorhandenen Inhaltsstoffe zurückzuführen (Tab. 1.2). Dennoch zeigte insbesondere das isolierte Ginsenosid Rg₁, der ein in der Pflanze mit am häufigsten vorkommende und am besten untersuchte Saponinvertreter, in verschiedenen Studien positive Effekte auf Diabetes mellitus, Krebs, Morbus Alzheimer und kardiovaskuläre Erkrankungen [38-40]. Häufig wird dabei dem Inhaltsstoff vor allem eine hemmende Wirkung auf pro-inflammatorische Signalwege zugeschrieben, was eine Verbesserung des jeweiligen Krankheitsbildes bewirkt. So wurde beispielsweise von Wu und seiner Arbeitsgruppe gezeigt, dass Ginsenosid Rg₁ durch Lipopolysaccharide (LPS)-induzierte Entzündungsvorgänge, wie die Aktivierung von NFκB, von Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAPKs) und von NO, an der murinen Mikrogliazelllinie N9 inhibiert [41]. Ginsenosid Rg₁ weist aufgrund seines C₃₀-Steroidgerüsts strukturelle Ähnlichkeit zu physiologischen Steroiden, vor allem zu Corticosteroiden, auf (Abb. 1.3). Einige Studien belegen, dass die Inhibition von Entzündungssignalwegen ebenfalls auf eine Bindung an den GR zurückzuführen ist [29, 31, 42]. Es wurden Bindungen des Saponins Rg₁ an den Steroidrezeptor in FT02B Zellen, einer Hepatomazelllinie aus der Ratte, nachgewiesen [29, 42]. In vivo Untersuchungen zeigten ebenso, dass Ginsenosid Rg₁ genauso effektiv wie das synthetische GC Dexamethason sowohl akute als auch chronische Entzündung blockieren kann.

Hauptwirkungen

- Wirkung als allgemeines Tonikum
- Wirkung auf Immun- und Kreislaufsystem
- Wirkung auf Fett- und Alkoholmetabolismus
- Blutzuckersenkende Wirkung
- Wirkung auf Hypophyse und Nebennierenrinde
- Tumorhemmende Wirkung

Aktivitäten

Verantwortliche Inhaltsstoffe

Hemmung der Thrombozytenaggregation	Ro, Rg ₁ , Rg ₂ , Polyacetylene
Antioxidative Wirkung	Rg ₁ , Rb, Rc
Neuroprotektive Wirkung	Saponingemisch, Rb ₁ , Rg ₁ , Rg ₃
Immunmodulierende Effekte	Rg ₁ , Polysaccharide

Tab. 1.2: *Panax ginseng* C.A.MEY Beschriebene Wirkungen des Ginsengs und einzelner Inhaltsstoffe (modifiziert nach Sticher et al. 2007)

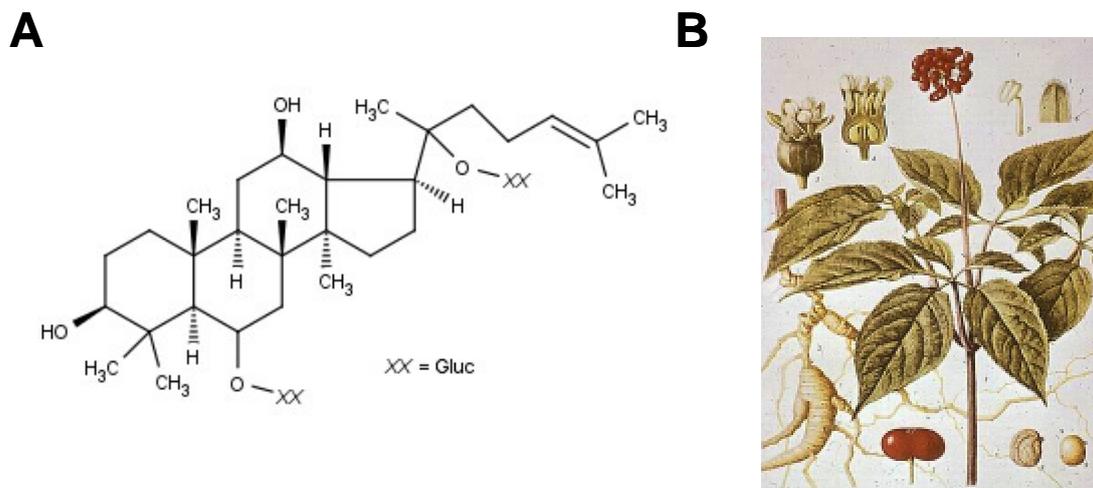


Abb. 1.3: *Panax ginseng* C.A.MEY

(A) Ginsenosid Rg₁.

(B) Pflanze (Abbildung entnommen von Aurica.de).

Interessanterweise entstanden bei einer systemischen Behandlung mit Ginsenosid Rg₁ sogar weniger Nebenwirkungen als bei einer Behandlung mit Dexamethason [31]. Die Reduzierung der unerwünschten Wirkungen wird auf den hinzukommenden Bindungseffekt an den Östrogenrezeptor zurückgeführt [31, 43-45].

1.1.4.3 Saikosaponin D aus der Pflanze *Bupleurum falcatum* L.

Bupleurum falcatum L. (benannt 1735), ein Pflanzenvertreter aus der Familie der Apiaceae (Doldenblütler), ist eine mehrjährige, krautige Pflanze, die ursprünglich ausschließlich auf der nördlichen Hemisphäre von Europa über den Kaukasus bis hin nach Ostasien beheimatet war [46]. Die Pflanze kann bis zu 150 cm hoch wachsen, wobei die Blattstängel teilweise verholzt sein können. Der botanische Epitheton *falcatum* (sichelförmig) verweist auf die oftmals sichelförmig gebogenen Laubblätter. Die Blätter zeigen eine 5- bis 7-nervige Struktur und eine ganzrandige, elliptisch bis lanzettliche Form. Dabei sind sie bis zu 10 cm lang und 1 cm breit. Die gelben Blüten des sichelförmigen Hasenohrs sind in gipfelständigen und zusammengesetzten Dolden, meist 3- bis 12-strahlig, vereint. Blütezeit ist von Juni bis September. Bei erfolgter Befruchtung entstehen bis zu 4 mm große, ei- bis kugelförmige Doppelachänen (Pan et al. 2006) (Abb. 1.4).

Ähnlich wie Ginseng hat das sichelförmige Hasenohr eine lange Anwendungstradition, vor allem in den ostasiatischen Ländern wie Japan, Korea und China. Bereits vor 2000 Jahren wurde die Heildroge Bupleuri Radix in China bei fiebrigen oder entzündlichen Erkrankungen, aber auch bei Malaria oder menopausalen Beschwerden eingesetzt (Pan et al. 2006). Auch heute ist die Bupleurum-Wurzel ein Hauptbestandteil in vielen der klassischen Tee-Rezepturen der traditionellen asiatischen Medizin (Tab. 1.3). Die mittlerweile weltweite Bekanntheit und aber auch die Anerkennung der traditionellen Medizin, ergänzend oder auch ersetzend zu den schulmedizinischen Behandlungsweisen, steigerte die Nachfrage nach der Droge und erforderte die Kultivierung der Pflanze. Das sichelförmige Hasenohr wird momentan großflächig in China, Japan, Korea, aber auch in einigen Teilen Europas angebaut (Pan et al. 2006). Die Ernte der Wurzel findet erstmalig 1 bis 2 Jahre nach Aussaat statt. In der Wurzel, bestehend aus einer bis zu 20 cm langen Hauptwurzel mit einigen Nebenwurzeln und Wurzelhaaren, finden sich die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe, die Saikosaponine [47, 48]. Interessanterweise wurde beobachtet, dass die Droge Bupleuri Radix sich in Qualität, Morphologie und auch in Gesamtheit der wirksamkeitsbestimmenden Saikosaponine und demnach in ihrer Wirkungsweise unterscheidet, je nach Kultivierungsland (Pan et al. 2006).

Chinesische Rezeptur	
Xiao Chai H Tang (Kleiner Bupleurum-Dekot)	
Radix Bupleuri (Hasenohr-Wurzel)	24,0
Tuber Pinelliae (Pinellien-Knolle)	24,0
Radix Scutellariae (Baikal-Helmkraut-Wurzel)	9,0
Radix Ginseng (Ginseng-Wurzel)	9,0
Fructus Jujubae (chin. Dattelbaum-Früchte)	12 Stück
Radix Glycyrrhizae (Süßholz-Wurzel)	9,0
Rhizoma Zingiberis viridis (Ingwer- Wurzelstock)	9,0

Tab. 1.3: *Bupleurum falcatum* L. Chinesische Tee-Rezeptur (modifiziert nach Bensky u. Barolet 1989).

Als Stammpflanze der Droge wird *Bupleurum falcatum* L. s. l. (lat. sensu lato; im weiteren Sinne) genannt. Diese Stammpflanze umfasst u. a. auch die beschriebenen Species *B. chinensis* DC. (Kultivierung in China, „Chai hu“ und auch dort in der Chinesischen Pharmakopöe benannt), *B. falcatum* L. s.l. (Kultivierung in Japan, „Saiko“ und auch dort in der Japanischen Pharmakopöe benannt) und *B. falcatum* L. s. str. (lat. sensu stricto; im engeren Sinne, eine ausschließlich europäische Art). Mittlerweile klären Untersuchungen zur Charakterisierung von somatischen Chromosomen die Zugehörigkeit der jeweiligen Spezies auf [49, 50].

Die wirksamkeitsbestimmenden Saikosaponine sind strukturell den Triterpensaponinen zuzuordnen. Bereits 1916 berichtete Ezawa und seine Arbeitsgruppe die Präsenz der Saponine in der Gattung *Bupleurum* (Pan et al. 2006). Seit etwa Anfang der 1960er werden die Saikosaponine umfangreich erforscht und vielfältige Wirkungen sind seither beschrieben worden. Neben Leberschützender [51, 52], beruhigender [53], antibakterieller [54, 55], immunmodulierender [56, 57] und antiallergischer Wirkung [58] werden den Saikosaponinen auch zahlreiche entzündungshemmende Eigenschaften zugeschrieben [59, 60]. Abgesehen von den häufig genannten Saikosaponinen A und C ist Saikosaponin D eines der bekanntesten und am besten untersuchten *Bupleurum*-Saikosaponine (Abb. 1.4). Viele Studien beschreiben die hepatoprotektive und antiinflammatorische Wirkung des Saikosaponins D, was auch die langjährige, traditionelle Anwendung der Droge bei Entzündungen und Lebererkrankungen bestätigt [32, 61, 62]. Darüber hinaus wurde erst kürzlich eine angenommene Bindungsaffinität des Saikosaponins D zum GR untersucht. In einer Studie von Hattori und seiner Arbeitsgruppe wurde neben der Verbesserung einer Nephritis durch Saireito, einer

bekanntesten TCM-Rezeptur, die auch die Droge Bupleuri Radix beinhaltet, eine GR-bindende Eigenschaft für Saikosaponin D aufgedeckt [32].

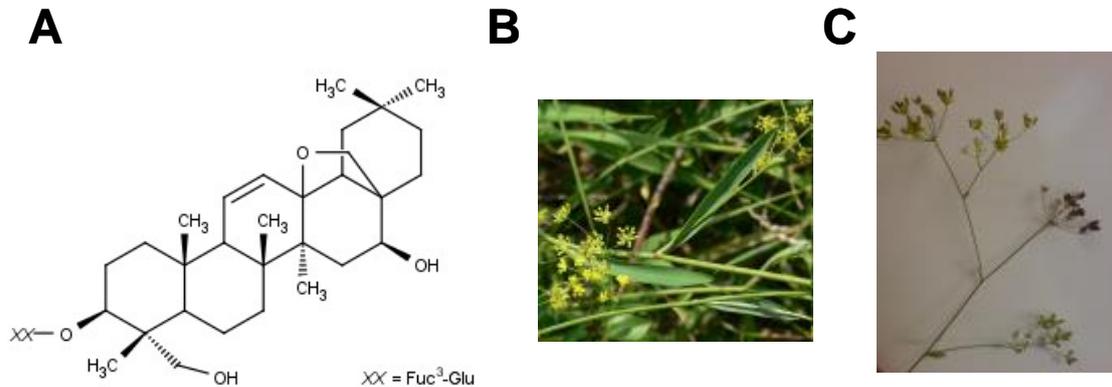


Abb. 1.4: *Bupleurum falcatum* L.

(A) Saikosaponin D.

(B) Pflanze (Abbildung entnommen von imagines-plantarum.de).

(C) Früchte (Fotografie einer zugesandten Pflanzenprobe, Botanischer Garten Wien).

Die beschriebene Affinität zum GR könnte hierbei durch die strukturelle Ähnlichkeit des Saikosaponins D zu physiologischen Steroiden begründet sein. Denn ebenso wie Ginsenosid Rg₁ besitzt Saikosaponin D ein C₃₀-Steroidgerüst (Abb. 1.4). Zusätzlich konnte für Saikosaponin D von Wang und seiner Arbeitsgruppe eine phytoöstrogene Wirkung nachgewiesen werden [63].

1.2 Epithelialer Natriumkanal (ENaC)

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) ist ein spannungsunabhängiger, Amilorid-sensitiver Ionenkanal, der in der apikalen Zellmembran verschiedener zur Na⁺-Resorption befähigter Epithelien exprimiert wird. In Aldosteron-sensitiven Epithelzellen, u. a. vorzufinden in den distalen Abschnitten des Nephrons und des Kolons sowie in der Lunge, übernimmt der Kanal eine essentielle Funktion zur allgemeinen Aufrechterhaltung der Na⁺- und K⁺-Homöostase und trägt damit zur Regulation des Blutdruckes und Blutvolumens bei [64, 65]. Für den Organismus ist es lebensnotwendig die osmotische Homöostase und die Wasser-Homöostase zu regulieren und im Gleichgewicht zu halten, da dies eine Voraussetzung für eine Vielzahl von zellulären Prozessen ist. Das für die kurzfristige Regulation wichtigste Organ stellt hierbei die Niere dar. Neben ihrer Funktion als Ausscheidungsorgan fungiert die Niere auch als Regulationsorgan im Elektrolyt- und Wasserhaushalt. Die Aufrechterhaltung der Homöostase

steht unter hormoneller Steuerung, die wiederum durch Blutvolumen und Blutdruck reguliert wird [66].

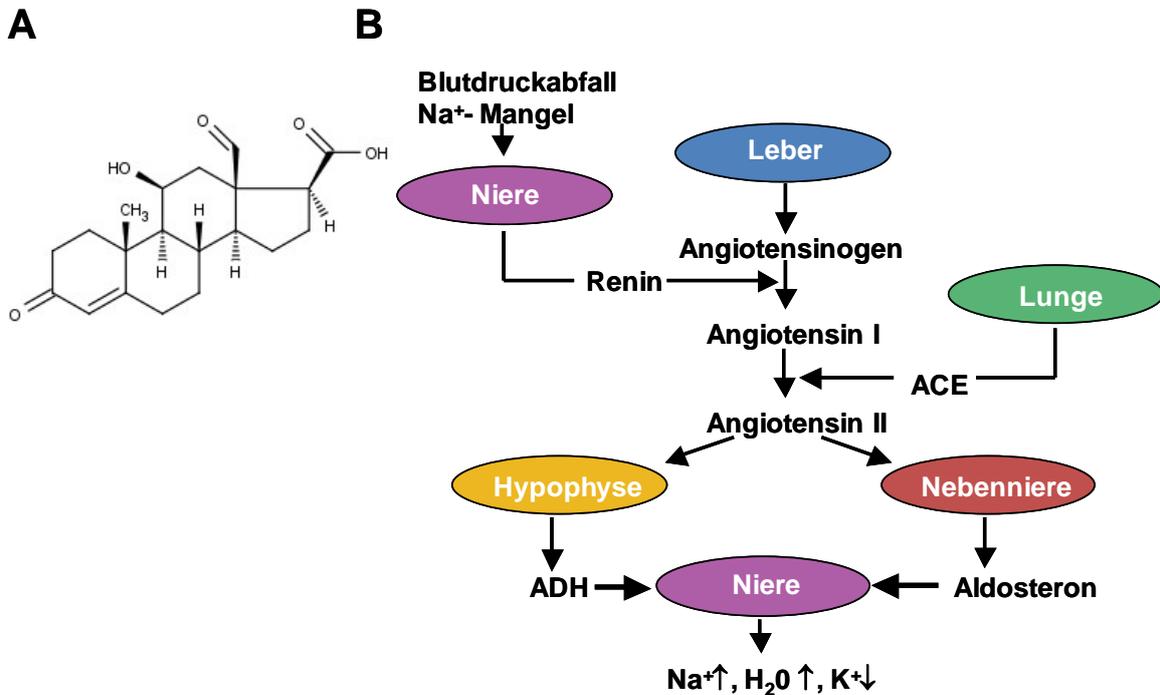


Abb. 1.5: Ausschüttung des Mineralocorticoids Aldosteron durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

(A) Aldosteron.

(B) Signalkaskade des RAAS. Fällt der Blutdruck oder die Na⁺-Konzentration im Körper wird von der Niere Renin ausgeschüttet, das Angiotensinogen in Angiotensin I spaltet. Dieses wird durch das in der Lunge synthetisierte Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) in Angiotensin II umgewandelt. Das stark vasokonstriktive-wirkende Angiotensin II löst in der Niere die Ausschüttung des MC Aldosteron und in der Hypophyse die des Hormons ADH (Aldosteron) aus. Das Aldosteron und das ADH verursachen in der Niere eine Na⁺- und H₂O-Rückresorption und eine K⁺-Sekretion.

Hierbei spielt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine entscheidende Rolle. Am Ende dieser Signalkaskade ist, abgesehen von dem antidiuretischen Hormon (ADH) aus der Hypophyse und einer generellen Vasokonstriktion der Blutgefäße durch das Gewebshormon Angiotensin II, die Natriumretention in verschiedenen Geweben ein ausschlaggebender Faktor für die Erhöhung des Blutvolumens bzw. des Blutdruckes (Abb. 1.5). Dabei wird der elektrogene Na⁺-Transport durch das MC Aldosteron gesteuert [67]. Durch die Aktivierung des RAA-Systems wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde Aldosteron gebildet und ausgeschüttet. Dieses induziert in Aldosteron-sensitiven Epithelzellen die vermehrte Expression des ENaC und den vermehrten Einbau in die apikale

Zellmembran [65, 66]. Bedingt durch die zunehmende Anzahl an Natriumkanälen wird im distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere Na^+ aus dem Lumen ins Blut reabsorbiert. Zugleich wird durch Aldosteron die Na^+ -Resorption in distalen Abschnitten des Kolons moduliert. Infolge der Einwirkung des Aldosterons sind anschließend in den Fäzes nur ungefähr 5 mM der durch die Nahrung zugeführten Natriumkonzentration vorzufinden [68, 69]. Daneben werden durch Aldosteron auch K^+ -Kanäle und die Na^+/K^+ -ATPase reguliert, die ebenfalls an der Na^+ -Resorption beteiligt sind [69]. Der transzelluläre Na^+ -Transport wird mittels der induzierten Kanäle und der Ionenpumpe gewährleistet. Es strömt zunächst Na^+ passiv aus dem Lumen durch den ENaC in die Epithelzelle ein. Auf der gegenüberliegenden Zellseite verläuft der Na^+ -Transport in den extrazellulären Raum als aktiver Prozess unter Verbrauch metabolischer Energie durch die Na^+/K^+ -ATPase. Gleichzeitig wird durch die ausgelöste Depolarisation der apikalen Membran der Epithelzelle K^+ über Aldosteron-induzierte Kanäle, wie den ROMK (Renal Outer Medullary Potassium Channel) oder den BK (Big Potassium Channel), in das Lumen sezerniert [70, 71] (Abb. 1.6).

1.2.1 Molekularer Aufbau des ENaCs

Der funktionell komplette Kanal besteht aus den drei Untereinheiten α -, β - und γ -ENaC, wobei dieser hetero-multimere Komplex vorwiegend bei Na^+ -resorbierenden Epithelzellen vorzufinden ist [72]. Zusätzlich wurde eine δ -ENaC-Untereinheit im Menschen identifiziert, die in verschiedenen epithelialen und nicht-epithelialen Geweben exprimiert wird. So wurde für die δ -ENaC-Untereinheit beispielsweise ein Vorkommen im Auge, in der Lunge und im Nervensystem beschrieben [73-75]. Dabei kann die δ -Untereinheit die sonst vorhandene α -Untereinheit ersetzen und der vorliegende ENaC besteht dann aus einem β -, γ - und δ -Komplex [75]. Überdies wurde ebenfalls ein funktioneller ENaC bestehend aus vier Untereinheiten, α -, β -, γ - und δ -ENaC im Auge charakterisiert [74]. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit Na^+ -resorbierenden intestinalen Epithelzellen gearbeitet worden ist, wird im weiteren Text auf eine Erwähnung der δ -ENaC-Untereinheit verzichtet.

Interessanterweise herrscht nach wie vor Unschlüssigkeit bei der stöchiometrischen Zusammensetzung des Natriumkanals. So wurde noch vor einigen Jahren eine Stöchiometrie von 2:1:1 (α_2, β, γ) oder sogar eine Zusammensetzung des Kanals von 3:3:3 ($\alpha_3, \beta_3, \gamma_3$) vermutet [76, 77]. Jedoch gilt heutzutage als wahrscheinlich, dass der funktionelle ENaC als ein Heterotrimer (α, β, γ) vorliegt, wobei eine 30-40%ige Homologie in den Aminosäuresequenzen der Untereinheiten auftritt [72].

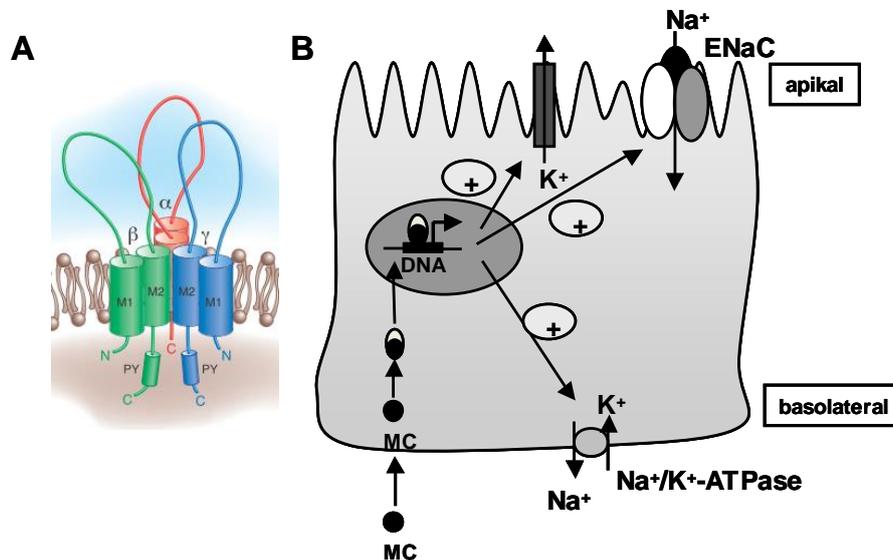


Abb. 1.6 Der epitheliale Natriumkanal (ENaC)

(A) Modell des epithelialen Natriumkanals.

Der ENaC ist ein heterotrimerer Komplex aus den ENaC-Untereinheiten α , β und γ . Die Struktur basiert auf einer Röntgenstrukturanalyse des verwandten Ionenkanals ASIC-1. Jede Untereinheit besitzt zwei Transmembrandomänen, zwei zytoplasmatische Domänen (je ein A- und C-Terminus) und einen großen extrazellulären Loop (Abbildung entnommen aus Bhalla et al. 2008).

(B) Induktion von Na^+ - und K^+ -Transport beteiligten Kanälen durch Aldosteron.

Das MC Aldosteron gelangt durch die Zellmembran, aktiviert den MR, der daraufhin in den Zellkern transloziert. Dort wird die Expression des ENaC, der Na^+/K^+ -ATPase und von K^+ -Kanälen induziert, welche gemeinsam an der Regulierung der Na^+ - und K^+ -Homöostase beteiligt sind.

Für die Aufklärung der Stöchiometrie des Kanals lieferten neueste Röntgenstrukturanalysen den entscheidenden Hinweis; der mit dem ENaC eng verwandte Ionenkanal ASIC-1 (Acid-sensing Ion Channel 1) zeigte eine heterotrimere Struktur, worauf die Vermutung der entsprechenden Stöchiometrie des ENaC basiert [78]. Die Untereinheiten weisen strukturell jeweils zwei Transmembrandomänen, einen zytoplasmatischen vorliegenden Amino (N)- sowie ein Carboxyl (C)-Terminus und einen großen extrazellulären Schleife auf [72, 79]. Neben zusätzlich hoch konservierten Sequenzmotiven besitzen alle drei ENaC-Untereinheiten ebenfalls eine konservierte Prolin-reiche Domäne (PY-Motiv) im C-terminalen Bereich. Hier kommt es zur Interaktion mit der Ubiquitinligase Nedd4-2, die am Abbau des ENaCs beteiligt ist [79].

Die drei Untereinheiten des funktionellen Natriumkanals sind lebensnotwendig. Mit Hilfe von Knockout-Mäusen wurde gezeigt, dass sowohl Mäuse mit einem Knockout der α -Untereinheit als auch mit einem Fehlen der β - oder γ -Untereinheit innerhalb weniger Stunden nach

der Geburt (Fehlen des α -ENaCs verursacht eine defekte Lungenfunktion) bzw. innerhalb von 48 Stunden verstarben (Fehlen des β - oder γ -ENaCs bewirkt eine Störungen der Elektrolyt-Homöostase und eine gestörte Lungenfunktion) [80-82]. Bei epithelialen Na^+ -Kanälen, die nur aus α -ENaC-Untereinheiten bestanden, war ein nur sehr schwacher Na^+ -Transport zu verzeichnen. Hingegen ist beobachtet worden, dass die Na^+ -Resorption maximal wird, wenn der Kanal sich aus allen drei Untereinheiten, α -, β - und γ -ENaC, zusammensetzt [83]. Die Regulation der einzelnen Untereinheiten ist gewebespezifisch und wird, neben der Regulation des ENaCs im allgemeinen, im Folgenden genauer erläutert.

1.2.2 Regulation des ENaCs auf transkriptioneller Ebene

Die Untereinheiten des humanen epithelialen Natriumkanals, α , β und γ , werden jeweils durch ein eigenes Gen kodiert. Dabei befinden sich die Gene der β - und γ -ENaC-Untereinheiten (SCNN1B und SCNN1G) auf dem Chromosom 16p12 in unmittelbarer Nähe zueinander. Die hier festgestellte Entfernung entspricht höchstens 400 kb, was darauf schließen lässt, dass die zwei Untereinheiten das Resultat einer Genduplikation sind [84, 85]. Das Gen für α -ENaC (SCNN1A) liegt auf dem Chromosom 12p13 [86]. Eine erhöhte Genexpression von α -, β - und γ -ENaC wird vor allem durch das MC Aldosteron über eine Aktivierung des MR induziert (Abb. 1.7). Jedoch ist die Expressionsteigerung einzelner Untereinheiten durch Aldosteron höchst organspezifisch. So wird in distalen Abschnitten der Niere unter Einfluss von Aldosteron speziell die Transkription der α -Untereinheit induziert. Hingegen führt Aldosteron im distalen Kolon zu einem Anstieg der β - und γ -ENaC-Untereinheiten, währenddessen der α -ENaC grundlegend vorhanden ist [87-89]. Daneben können auch GC sowohl in der Niere als auch im Kolon die Expression der ENaC-Untereinheiten steigern [87, 89-91]. Es wird vermutet, dass GC und MC über bestimmte Sequenzen im Genom, sogenannte hormone responsive elements (HRE), die Expression steuern können [90, 92]. Andererseits können GC ebenfalls am MR binden. Unter physiologischen Bedingungen verhindert dies jedoch ein Enzym, die 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 2 (11 β -HSD 2), das die Umwandlung von Cortisol zu Cortison katalysiert. Infolgedessen kann Cortisol nicht mehr am MR binden. Allerdings kann es unter pathologischen Bedingungen dennoch zur Aktivierung des MR kommen und Aldosteron-spezifische Effekte können dann durch GC ausgelöst werden. Zu nennen sind Erkrankungen,

die beispielsweise einen vermehrten Anstieg an GC bewirken, wie das Cushing-Syndrom oder ein Fehlen der 11β -HSD 2.

Die transkriptionelle Regulierung des ENaC im Kolon kann, außer durch MC oder GC, ebenso durch die kurzkettige Fettsäure (SCFA) Butyrat, ein Abbauprodukt von Darmbakterien, gesteuert werden. Das Kolon ist mit einer Vielzahl von anaeroben Bakterien besiedelt. Die wohl am häufigsten anzutreffenden Darmbakterien sind Vertreter der Bacteroides, Bifidobacteria, Eubacteria oder Clostridien. Ihnen ist gemein, dass sie beeindruckend starke saccharolytische Eigenschaften aufweisen. Die mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate werden durch die Anaerobier zu verschiedenen Gasen (H_2 , CO_2 und CH_4) und den SCFA umgesetzt. Bei dem chemischen Prozess der Fermentation entstehen vorrangig die SCFA Essig-, Propion- und Buttersäure. Essig- und Propionsäure werden schnell vom Darm resorbiert, über das Pfortadersystem transportiert und dem Organismus anderweitig als Energielieferanten zur Verfügung gestellt [93]. Buttersäure hingegen verbleibt im Kolon und dient dort den Epithelzellen als Energielieferant. Darüber hinaus vermag Butyrat die Proliferation der Kolonozyten zu regulieren und besitzt ausgeprägte anti-entzündliche und anti-apoptotische Eigenschaften [94-96]. Ebenso ist Butyrat an der Regulation der Na^+ - und Wasserresorption im Kolon beteiligt. Neben der Induktion des Na^+/H^+ -Antiporters 3 (NHE3), der überwiegend in den proximalen Abschnitten des Kolons für den elektroneutralen Na^+ -Transport verantwortlich ist, zeigt Butyrat einen Effekt auf den ENaC in den distalen Abschnitten des Kolons [97-99]. Es konnte hierbei beispielsweise dargestellt werden, dass Butyrat eine gesteigerte Aktivität des γ -ENaC-Promotors auslöst, die in einer erhöhten Genexpression dieser Untereinheit resultierte. Interessanterweise kann Butyrat dabei zwar die Gesamtanzahl der ENaC-Moleküle im Zytoplasma erhöhen, jedoch ist das Vorliegen von Corticosteroiden erforderlich, um einen Einbau in die apikale Membran und somit eine ENaC-abhängige Na^+ -Resorption zu bewirken [99].

1.2.3 Regulation des ENaCs

Da der ENaC ein konstitutiv aktiver Kanal mit einer hohen Öffnungswahrscheinlichkeit ist, wird die Anzahl der in der apikalen Membran lokalisierten und zur Na^+ -Resorption befähigten Kanäle durch verschiedene Regulationsmechanismen streng kontrolliert [100]. Nach einer Stimulation mit MC, GC oder Butyrat werden die induzierten ENaC-Untereinheiten am endoplasmatischen Retikulum gebildet und am Golgi-Apparat zu funktionsfähigen Kanälen prozessiert. Allerdings wurde berichtet, dass weniger als 20% dieser Kanäle direkt die

apikale Membran erreichen, um dort eingebaut und ihrer Funktion gerecht zu werden. Ein nicht unbedeutender Anteil der neusynthetisierten Untereinheiten wird kurz nach ihrer Synthese schnell wieder degradiert. Sie weisen deshalb eine Halbwertszeit von nur ungefähr 2 Stunden auf [101, 102]. Zudem wurde beschrieben, dass die funktionsfähigen Kanäle zunächst in subapikalen Vesikeln gespeichert und bei einem Stimulus unter Exozytose schnell in die Membran eingebaut werden. Für die rapide Insertion des ENaCs wurde in diesem Zusammenhang bereits cAMP als Stimulanz charakterisiert, jedoch wird diese cAMP-Hypothese von einigen bestritten [65, 103, 104]. Dessen ungeachtet ist der exakte Mechanismus des beobachteten schnellen Anstiegs des ENaC-abhängigen Na⁺-Transports durch MC- oder GC-Behandlung ungeklärt, da die Transkription der Untereinheiten eher den späten Regulierungsphasen zuzuordnen ist. Einen weiteren Ansatz bietet in diesem Zusammenhang die Involvierung der ENaC-Ubiquitinierung.

1.2.3.1 Nedd4-2 und Sgk-1

Ein funktionstüchtiger, in der Zellmembran lokalisierter ENaC besitzt eine Halbwertszeit von ungefähr 30 Minuten, wobei einige Arbeitsgruppen auch von wesentlich längeren Halbwertszeiten, nämlich 24 Stunden berichten [102, 105, 106]. Um die Internalisierung des Kanals ins Zellinnere einzuleiten und somit die apikale Aufenthaltsdauer des ENaCs zu regulieren, findet eine Ubiquitinierung der ENaC-Untereinheiten statt. Die Ubiquitinligase Nedd4-2 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4-2) bindet hierbei an der bereits beschriebenen Prolin-reichen Domäne des C-terminalen Bereiches (PY-Motiv) und leitet somit eine Endozytose des ENaCs ein [79, 106]. Der genaue endozytotische Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Beschrieben ist aber, dass es sich um Clathrin-vermittelte Endozytose unter der Beteiligung von Epsin handelt. In der Folge wird der ENaC entweder lysosomal oder proteosomal abgebaut oder kann sogar recycelt werden kann [72, 107, 108]. Die Ligase Nedd4-2 ist ein Substrat der serum-und glucocorticoid-induced kinase 1 (Sgk-1) und ist abhängig von einem regulatorischen cAMP-induzierten Signalweg [109]. Sowohl cAMP als auch Sgk-1 hemmen die Ubiquitin-Ligase u. a. durch Phosphorylierung des Ser-327 und Ser-221 [79, 109]. Dadurch verlängert sich der Aufenthalt des ENaCs in der apikalen Membran und folglich ist eine erhöhte Na⁺-Resorption zu verzeichnen.

In diesem Zusammenhang wurde das Krankheitsbild des Liddle-Syndroms beschrieben, das auf eine Genmutation des PY-Motivs auf den C-Terminus zurückzuführen ist. Die Ligase

Nedd4-2 kann hierbei nicht die Ubiquitinierung des ENaCs einleiten. Demzufolge kommt es zu einer verstärkten Na⁺-Resorption und zu einer daraus resultierenden Hypertonie [66].

Die Sgk-1 besitzt eine ausgeprägte regulierende Funktion im Hinblick auf den intrazellulären ENaC-Transport. Über einen PI3K-abhängigen Signalweg wird Sgk-1 durch die PDK1/2 (Phosphoinositide-dependent kinase 1/2) aktiviert [110]. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Kinase nur minimal aktiv vor, jedoch kann innerhalb kürzester Zeit (15-30 Minuten) durch GC-oder MC-Stimulation eine Steigerung der Sgk-1-Expression erfolgen [111, 112]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Aldosteron die Genexpression des kleinen G-Proteins KRas-2A steigert und dies einen Anstieg der ENaC-vermittelten Na⁺-Resorption induziert [113-115]. Dabei kann KRas-2A im weiteren Signalweg die PI3K aktivieren, die ihrerseits dann über PDK1/2 Sgk-1 stimuliert [116]. Wie bereits erwähnt, kann die Kinase weiterführend durch Inhibition der Ligase Nedd4-2 die Ubiquitinierung des ENaCs hemmen. Andererseits kann die Nedd4-2 ebenso Sgk-1 inaktivieren, so dass über eine negative Rückkopplung diese Wechselwirkung im Gleichgewicht steht [117]. Die Aktivierung der Sgk-1 gehört zu den frühen Regulierungsphasen und könnte folglich u. a. die schnelle Induktion des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports durch MC oder GC bewirken. Außerdem wird dem Protein GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper) eine Involvierung in die unmittelbare Verstärkung der Na⁺-Resorption zugeschrieben (Abb. 1.7).

1.2.3.2 Nedd4-2 und GILZ

Ebenso wie Sgk-1 stellt GILZ ein frühes Corticosteroid-induziertes Protein dar [118, 119]. Zunächst wurde GILZ als Transkriptionsfaktor in Immunzellen charakterisiert, jedoch wurden für das Protein später ENaC-regulierende Eigenschaften identifiziert [120, 121].

Die Bindung von Nedd4-2 am PY-Motiv des ENaCs kann durch vorangegangene Phosphorylierungen unterstützt werden. Hierbei bewirkt beispielsweise die MAPK ERK (extracellular signal-regulated kinase) eine Phosphorylierung am C-Terminus der β - und γ -ENaC-Untereinheiten, um so die Bindung von Nedd4-2 zu erleichtern und den Internalisierungsprozess einzuleiten [122]. Wird durch Aldosteron die Expression von GILZ induziert, weist das Protein einen inhibitorischen Effekt auf die Signalkaskade der ERK-Aktivierung auf und kann somit die Ubiquitinierung des ENaCs hemmen [121, 123]. Zusätzlich übt GILZ einen stabilisierenden Effekt auf die Sgk-1 Kinase aus, da diese eine sehr kurze Halbwertszeit von nur ungefähr 30 Minuten besitzt [124]. Folglich wird dadurch die Aktivität der Sgk-1 wesentlich verlängert [125] (Abb. 1.7).

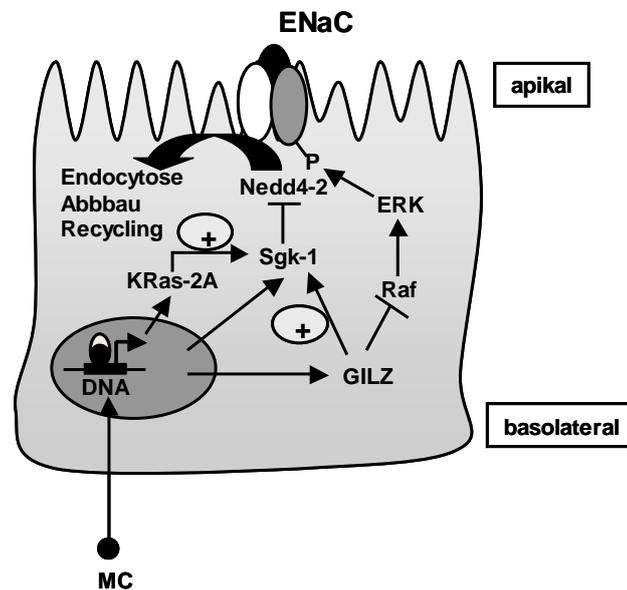


Abb. 1.7: Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC)

Die Aufenthaltsdauer des ENaCs in der apikalen Zellmembran wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Die ENaC-Internalisierung wird durch Ubiquitinierung eingeleitet. Dabei bindet die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 an den PY-Motiven im C-Terminus der ENaC-Untereinheiten und veranlasst so die Endozytose und nachfolgend den Abbau bzw. das Recycling des Kanals. Die Bindung von Nedd4-2 kann durch eine ERK-induzierte Phosphorylierung am C-terminalen Bereich der β - und γ -ENaC-Untereinheiten erleichtert werden. Aldosteron-Behandlung bewirkt die Expression von Sgk-1, KRas-2A und GILZ. GILZ hemmt Raf-Proteine, die als Aktivatoren des ERK-Signalwegs eine wichtige Rolle spielen. Über den KRas-2A-abhängigen Signalweg wird die Sgk-1 aktiviert, welche die Ligase Nedd4-2 hemmen kann. GILZ kann zudem die Sgk-1 stabilisieren und somit deren Aktivität verstärken. Durch Sgk-1 und GILZ wird der Abbau des ENaC reduziert und es kommt folglich zu einer gesteigerten Na^+ -Reabsorption.

Es wurde in dem Zusammenhang die Theorie eines ENaC-regulierenden Komplexes (ERC) aufgestellt. Hiernach sind die hemmenden Regulatoren, Nedd4-2 und Raf-1 (der Aktivator der ERK-Signalkaskade), an den apikal lokalisierten ENaC assoziiert und können auf diesem Weg die charakterisierten inhibitorischen Effekte auslösen. Durch die Aldosteron-induzierte Expression von Sgk-1 und GILZ kann der ENaC-vermittelte Na^+ -Transport aktiviert werden, indem Sgk-1 und GILZ ebenfalls an den ENaC-regulierenden Komplex binden und damit die Wirkungen der negativen Regulatoren aufheben. Als weiteres regulatorisches Protein wird CNK3 (connector enhancer of kinase suppressor of Ras 3) erwähnt, welches ebenso durch Aldosteron induzierbar und gleichfalls mit Sgk-1 und GILZ am ERC assoziiert ist [121, 126].

1.2.4 Gestörte ENaC-Funktion bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

1.2.4.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) mit den Hauptformen Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind chronisch rezidivierende Entzündungen des Gastrointestinaltraktes. Beide Erkrankungsbilder zeigen hierbei spezifische klinische und immunologische Charakteristika. Beim Morbus Crohn handelt es sich um diskontinuierliche, transmurale Entzündungen des gesamten Gastrointestinaltraktes, wobei eine Lokalisationshäufigkeit im terminalen Ileum (Krummdarm, unterer Teil des Dünndarms) beobachtet worden ist. Oftmals treten bei Patienten mit MC extraintestinale Manifestationen auf wie beispielsweise Arthritis, Osteoporose oder Hautveränderungen (Erythema nodosa). Die Colitis ulcerosa hingegen ist durch eine sich kontinuierlich von anal nach oral ausbreitende Erkrankung der Kolonschleimhaut gekennzeichnet. Gegensätzlich zum MC betrifft die Entzündung hier nur die oberflächlichen Darmwandschichten. Beide Erkrankungen weisen anfänglich oft dieselben Symptome auf wie Durchfall, Abgeschlagenheit, Fieber oder eine Leukozytose [127, 128]. Letztendlich kann die Diagnose MC oder CU erst durch weitere labormedizinische, endoskopische und histologische Untersuchungen gestellt werden.

Für das Entstehen einer CED werden sowohl Fehlregulationen des Immunsystems, genetische Prädispositionen, sowie auch Umweltfaktoren verantwortlich gemacht. Die genaue Ätiologie ist bis heute jedoch noch ungeklärt. Auffällig ist, dass die Wahrscheinlichkeit an einer CED zu erkranken, seit der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts, vor allem in den westlichen Industrienationen, stetig gestiegen ist [129]. Viele Umwelteinflüsse, wie Ernährung, Rauchen, Stress, aber auch Medikamente, scheinen die Entstehung der CED zu beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) die Pathogenese einer CU beschleunigen können. Eine Behandlung mit NSAIDs führte in IL-10 Knockout-Mäusen zu einer schnelleren Colitis-Entstehung, die mit einer massiven Anreicherung von Makrophagen und IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen in der Lamina propria einherging [130]. So wurde zum einen die These einer vorhandenen Dysregulationen des Immunsystems, aber auch die des Einwirkens von Umweltfaktoren bei der Entwicklung einer CED gestützt.

Drei genetische Polymorphismen der nuclear oligomerization domain 2 (NOD2) sind bekannt, wovon alle drei bei ungefähr 18-20% europäischer MC-Patienten auftreten [129]. Das NOD2 Gen ist auf Chromosom 16 lokalisiert und wird zu den Crohn-assoziierten Genen

gezählt. Es handelt sich bei NOD2 um einen intrazellulären Rezeptor, welcher in der Zellmembran von Immunzellen sowie auch von intestinalen Epithelzellen (IEC), wie den Panethzellen, vorliegt [131-133]. Der Rezeptor erkennt bakterielles Muramyl-Dipeptid (MDP), ein Zellwandpolymer, das in fast allen Bakterienspezies vorkommt [134, 135]. Durch Aktivierung des Rezeptors werden entzündlichen Signalwege, wie der von NF κ B oder auch der MAPKs, stimuliert [133, 136]. In IEC konnte gezeigt werden, dass NOD2 durch Bindung von MDP die Bildung von Defensinen (körpereigene Abwehrstoffe gegen Bakterien oder Pilze) anregt [137, 138]. Vorhandene Polymorphismen des NOD2 könnten zunächst vermuten lassen, dass es bei CED zu einer verminderten Entzündung (NOD2-induzierte inflammatorische Signalwege unterbleiben) kommen müsste. Doch Fehlen des Rezeptors begünstigt höchstwahrscheinlich das Eindringen von Mikroorganismen in die Epithelzelle und ihrer Persistenz. Dadurch wird in der Folge eine starke Immunantwort ausgelöst, die einen massiven Anstieg an pro-inflammatorischen Zytokinen verursacht und zu einer Entwicklung der CED führen kann [139]. Bei CED sind vor allem Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 nachgewiesen worden. Zusätzlich kommen bei dem Krankheitsbild des MC vermehrt noch das IFN- γ und IL-12 (beide überwiegend der Th₁-Immunantwort zuzuzählen) und bei der CU IL-5 und IL-13 (beide insbesondere der Th₂-Immunantwort zuzuordnen) vor [140-144].

Die Hochregulierung von entzündlichen Prozessen führt im Darm zu dramatischen Barrierestörungen [145, 146]. So konnte im MC nachgewiesen werden, dass TNF- α und IFN- γ die Tight junction (TJ)-Proteine Occludin, Claudin 5 und 8 [147-150] sowie auch das Protein ZO-1 (zonula occludens protein 1, ein Protein, welches die TJ in seiner Stabilität unterstützt) [151] herunterregulieren. Infolgedessen wird die intestinale Barriere geschädigt. In der CU wurde daneben eine IL-13-induzierte Apoptose und eine Hochregulierung der TJ-Proteine Claudin-1 und -2 festgestellt [152-154]. Die Zerstörung der epithelialen Barriere hat zur Folge, dass zum einen beispielsweise weitere Mikroorganismen in die Darmzelle gelangen können und daher abermals Entzündungsprozesse ausgelöst werden. Zum anderen strömen Elektrolyte und Wasser passiv aus der Epithelzelle ins Lumen aus, was zu Diarrhöen, wie sie bei den CED auftreten, führen kann.

1.2.4.2 ENaC und chronisch entzündliche Darmerkrankung

Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen treten als Leitsymptom Diarrhöen auf. Dabei werden CED-assoziierte Diarrhöen nicht generell nur auf die vorliegende gestörte Barriere- und Immunfunktion zurückgeführt, sondern resultieren vielmehr auch auf

beeinträchtigten epithelialen Transportmechanismen. So konnte gezeigt werden, dass sowohl der elektroneutrale als auch der elektrogene Na^+ -Transport in allen Formen der CED herunterreguliert ist [155]. Im entzündeten proximalen Kolon wird die Na^+/H^+ -Antiporter 3 (NHE3)-vermittelte Na^+ -Resorption durch pro-inflammatorische Zytokine, maßgeblich $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$, inhibiert [156, 157]. Ebenso beeinflussen vorherrschende inflammatorische Bedingungen die elektrogene Natrium- und Wasserresorption in distalen Kolonabschnitten [158, 159]. Der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom, welcher als ein Maß für den ENaC-vermittelten Na^+ -Transport gilt, zeigte sich in Biopsien CED-erkrankter Patienten stark erniedrigt [159]. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass die Aldosteron-induzierte Regulation des ENaCs im entzündeten Darmgewebe gestört ist [158, 159]. In diesem Zusammenhang wurde das Zytokin $\text{TNF-}\alpha$, aber genauso $\text{IL-1}\beta$, identifiziert, die beide die Expression der β - und γ -ENaC-Untereinheit hemmen und somit die Na^+ -Resorption in distalen Kolon entscheidend beeinflussen [160-163].

In der Therapie der CED haben sich GC seit langem bewährt. Sie zeigen, wie bereits erwähnt, ausgeprägte anti-entzündliche und immunsuppressive Eigenschaften und verbessern mit ihrem Wirkungsprinzip das Krankheitsbild der CED. Interessant war jedoch auch noch eine andere Beobachtung, welche in einer medikamentösen GC-Therapie gemacht wurde. So ließen bei Patienten innerhalb kürzester Zeit nach Behandlung mit GC vorhandene Diarrhöen nach und der Elektrolyt- und Wasserhaushalt konnte weitestgehend stabilisiert werden [164]. Der vollständige Mechanismus hinter dieser Beobachtung ist noch nicht in seiner ganzen Komplexität aufgeklärt. Es wird wohl ein Teil auf die entzündungshemmende Wirkung der GC zurückzuführen sein. Des Weiteren konnte bereits *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass ein vorhandener Synergismus zwischen dem synthetischen GC Dexamethason und dem pro-inflammatorischen Zytokin $\text{TNF-}\alpha$ den ENaC-vermittelten Na^+ -Transport induziert. Dabei bewirkt $\text{TNF-}\alpha$ eine verlängerte GR mRNA Halbwertszeit, übt demgemäß einen stabilisierenden Effekt auf die GR mRNA aus, wodurch wiederum eine erhöhte GR-Transaktivierung zu verzeichnen war. Folglich nahm die Expression der β - und γ -ENaC-Untereinheiten und letztendlich ebenso die ENaC-vermittelte Na^+ -Resorption zu [165]. Da aber einige weitere Signalwege (über Nedd4-2, Sgk-1 oder GILZ) in der ENaC-Regulierung involviert sind, sind zusätzliche Mechanismen, die den pro-absorptiven Effekt der GC erklären, zumindest denkbar.

1.3 Zielstellung der Arbeit

In der medikamentösen Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zeichnen sich Glucocorticoide durch ihre beeindruckenden anti-entzündlichen und immunsuppressiven Eigenschaften aus. Zusätzlich verringern sie die in dem Krankheitsbild häufig auftretenden Diarrhöen, indem GC synergistisch mit dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- α die ENaC-vermittelte Na⁺-Resorption verbessern. Die Behandlung mit GC muss allerdings unter einer generellen Nutzen-Risiko-Abschätzung erfolgen. Insbesondere in einer Langzeittherapie, wie sie bei vielen chronischen Erkrankungen nötig ist, treten schwerwiegende Nebenwirkung auf. Das Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe zu charakterisieren, die einen GR-modulierenden Effekt aufweisen. Es sollte sowohl in vitro als auch in vivo untersucht werden, inwieweit pflanzliche GR-Modulatoren einen GC-gesteuerten Signalweg beeinflussen können. Hierbei sollte der Schwerpunkt der Betrachtung auf den GC-induzierten ENaC-vermittelten Na⁺-Transport im distalen Kolon unter entzündlichen Bedingungen gelegt werden.

An humanen Kolonkarzinomzellen und murinen Kolongeweben wurden elektrophysiologische Messungen in Ussing-Kammern durchgeführt, die zur Aufklärung der ENaC-Aktivität beitragen sollten. Des Weiteren wurden proteinbiochemische und molekularbiologische Methoden, wie Western Blotting, Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie sowie Real-time (RT)-PCR und Reporter-gen-Assays, angewandt, um zugrunde liegende regulatorische Signalwege zu ermitteln.

In der alternativ angewandten Medizin werden häufig Extrakte von Heilpflanzen eingesetzt. Extrakte definieren sich nach dem Europäischen Arzneibuch als „Zubereitungen von flüssiger, halbfester oder fester Beschaffenheit, die aus üblicherweise getrockneten pflanzlichen Drogen oder tierischem Material hergestellt werden“. Dabei stellt das Extraktionsverfahren einen entscheidenden Faktor dar, um die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe zu isolieren und anzureichern. In einem zweiten, kleinen Randprojekt sollten beschriebene Extraktionsverfahren für die *Bupleurum species* miteinander verglichen werden, um möglichst einen hohen Gehalt an wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen, den Saikosaponinen, zu erzielen. Dabei sollte zunächst der Schwerpunkt auf den qualitativen Nachweis der Saikosaponine gelegt werden. Es wurden verschiedene Extraktionen und qualitative Nachweismethoden mittels der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Das untersuchte Pflanzenmaterial der *Bupleurum falcatum* L. wurde von den Botanischen Gärten der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Das Pflanzenmaterial der *Bupleurum chinensis* DC. wurde von der Zieten Apotheke, Großbeerenstraße 11, 10963 Berlin, zur Verfügung gestellt. Die Droge Bupleuri Radix entsprach dem Arzneibuch der chinesischen Medizin. Das Pflanzenmaterial der *Endiandra anthropophagorum* DOMIN und die isolierte Substanz Endiandrin A wurde von Kooperationspartnern aus Australien zur Verfügung gestellt. Die Herbarbelege der gesammelten Pflanzen werden von den entsprechenden Kooperationsinstituten aufbewahrt.

Kooperierende Universitäten:

Dr. Wolfram Lobin,

Ansprechpartner: Josef Manner,

Botanische Gärten der Universität Bonn

Dr. Rohan Davis

Eskitis Institute for Cell & Molecular Therapies,

Brisbane Innovation Park campus,

Nathan, Griffith University,

QLD 4111, Australia

2.1.1.1 Herkunft

2.1.1.1.1 *Bupleurum falcatum* L. (Sichelblättriges-Hasenohr), Apiaceae

Das Pflanzenmaterial wurde im Ahrtal, Burg Ahre oberhalb Altenahr in Rheinland-Pfalz, Deutschland, von Giefer et al. (11/1995) gesammelt und von B. M. Möselers bestimmt. Die abgegebene Pflanze wurde im Frühjahr 2007 aus Samen hervorgezogen und später auf ein Beet, Standort sonnig, der Boden schwer (Pseudogley), gepflanzt.

2.1.1.1.2 *Bupleurum chinensis* DC. (chin. Hasenohr), Apiaceae

Das Pflanzenmaterial stammt aus China und wurde von Phytax GmbH, Wagistraße 23, 89052 Schlieren, Schweiz, nach der Pharmakopöe der Chinesischen Volkrepublik China und/oder weiterer relevanter Literatur der traditionellen chinesischen Medizin bzw. der Europäischen Pharmakopöe auf, u. a. Aflatoxine, Pestizide und Schwermetalle geprüft (Analysezertifikat liegt vor).

2.1.1.1.3 *Endiandra anthropophagorum* DOMIN, Lauraceae

Das Pflanzenmaterial wurde im Juni 1996 im staatlichen Wald (State Forest 143, Mt. Lewis) von Queensland, Australien gesammelt. Der Herbarbeleg (AQ603481) befindet sich im Herbarium von Queensland in Brisbane, Australien.

2.1.1.2 Phytochemisches Labor

2.1.1.2.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Analysenlampe CabUVIS	Desaga GmbH, Wiesloch
CAMAG Linomat IV	CAMAG, Berlin
Digitalkamera Canon Powershot G5	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
DigiDoc-Aufsatz mit UV-Filter	Sarstedt, Nümbrecht
DC-Zerstäuber	Carl Roth, Karlsruhe
Feinwaage R 200 D	Sartorius, Göttingen
IKA-Universalmühle M20	IKA-Werke GmbH, Staufen
Rotationsverdampfer Rotavapor R	Büchi Labortechnik GmbH, Essen
Trockenschrank	Heraeus, Hanau bei Frankfurt
Ultraschallbad	Branson Ultrasonics Corporation, Conneticut, USA
Wasserbad	Störk-Tronic, Stuttgart

Material und Methoden

2.1.1.2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
DC-Platten	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Alugram® Nano-Sil G/UV ₂₅₄ , Kieselgel 60 Schichtdicke 0,2 mm, 20 × 20 cm	
Falconröhrchen (15ml, 50ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Filterpapier	Macherey-Nagel GmbH, Düren
HPTLC-Platten	Macherey-Nagel GmbH, Düren
HPTLC-Fertigplatte Nano-Sil-20/UV ₂₅₄ Kieselgel 60, Schichtdicke 2,0 mm, 10 × 20 cm	
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Szintillationsröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Stabpipetten	Becton Dickinson; Franklin Lakes, USA

2.1.1.2.3 Laborchemikalien

Laborchemikalien	Hersteller
Acteon	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dichlormethan	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
p-Dimethylaminobenzaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Pyridin	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe

2.1.1.2.4 Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen	Hersteller
Saikosaponin A (SsA)	Phytolab, Vestenbergsgreuth
Saikosaponin C (SsC)	Phytolab, Vestenbergsgreuth
Saikosaponin D (SsD)	Phytolab, Vestenbergsgreuth

2.1.2 Eukaryotische Zellkultur

2.1.2.1 Zelllinie HT-29/B6-GR

Für die Untersuchung der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe auf ihre GR-bindenden Eigenschaften und ihren Einfluss auf die Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC) im menschlichen Kolon wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6-GR genutzt, die im Institut für Klinische Physiologie der Charité etabliert worden ist [166]. Ursprünglich stammt diese von der humanen Kolonzelllinie HT-29 ab. Durch Elimination der im Kultivierungsmedium vorhandenen Glukose wurde der Subklon HT-29/B6 gewonnen [167]. Die Zellen der HT-29/B6-Zelllinie besitzen funktionelle Eigenschaften, die denen des nativen Kolonepithels sehr ähnlich sind. Es werden polarisierte Monolayer ausgebildet, die sowohl zur Mukusproduktion, als auch zur Bildung eines Bürstensaums befähigt sind. Darüber hinaus entwickeln sie einen transepithelialen Widerstand (TER), der auf die Bildung von Tight junctions zurückzuführen ist. Durch eine stabile Transfektion mit dem humanen Glucocorticoidrezeptor (GR), konnte man letztendlich ebenfalls Steroid-abhängige Signalwege, wie den ENaC-vermittelten Na⁺-Transport, untersuchen [166].

2.1.2.2 Zellkultur Labor

2.1.2.2.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Acrylamid-Gelelektrophorese-Kammer Mini Protean 3 System	Bio-Rad, Hercules, USA
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer Mini Sub Cell GT	Bio-Rad, Hercules, USA
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau bei Frankfurt
CCD-Kamera Lumineszenzbild-Analysator LAS1000	Fujifilm, Tokyo, Japan
Cryostat Leica CM 1900	Leica, Wetzlar
Feinwaage R 200 D	Sartorius, Göttingen
Heizblock Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Magnetrührer IKA-Combimag	Janke & Kunkei KG, Staufen i. Breisgau
Mikroskope:	
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Zeiss, Jena

Material und Methoden

Gerätebezeichnung	Hersteller
LSM 510 META Lichtmikroskop CK2	Olympus, Tokyo, Japan
Mikrotiterplattenlesegerät Spectra Classic	Tecan, Grödig, Österreich
Mikrotiterplattenluminometer Centro LB 960	Berthold, Bad Wildbach
Netzgerät Power Pac 200	Bio-Rad, Hercules, USA
Real-Time PCR-Cycler 7500 Fast	Applied Biosystems, Mannheim
Schüttelinkubator Aerotron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Spektrophotometer Nano Drop 1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Sterilwerkbank	
Thermocycler 2720	Applied Biosystems, Mannheim
Ussing-Kammer	Institut f. Klin. Phys., Charité, CBF Berlin
Voltage-Clamp-Apparaturen CVC6/8	Fiebig, Berlin
Western Blot Transfer-Kammer Mini Transblot Cell-System	Bio-Rad, Hercules, USA
Widerstandsmessgerät	Institut f. Klin. Phys., Charité, CBF Berlin
Wippe WT-12	Biometra, Göttingen
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge Z233 MK	Hermle, Wehingen
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau bei Frankfurt
Mikrotiterplatten-Zentrifuge LMC-3000	Biosan, Riga, Lettland

2.1.2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kanüle 0,45 × 10 mm/Spritze 1 ml	Becton Dickinson, Madrid, Spanien
Mikrotiterplatten:	
96-well, weiß	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-well, klar	Sarstedt, Mümbrecht
Objektträger SuperFrost Plus	Menzen Gläser, Braunschweig
PCR-Reaktionsgefäße (8-strip, 0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktionsplatten (MicroAmp Fast Optical 96-well)	Applied Biosystems, Mannheim

Material und Methoden

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
PCR-Schutzfolien für Reaktionsplatten (MicroAmp Optical Adhesive Film)	Applied Biosystems, Mannheim
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Transfer-Membran PVDF	Perkin Elmer, Zaventem, Belgien
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Rührspatel 120 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter DynaGard (0,2 µm)	Spectrum Laboratories, Breda, Holland
Stabpipetten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Zellkulturfilter Millicell PCF 3 µm	Millipore, Schwalbach
Zellkulturflaschen:	
25 cm ²	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
75 cm ²	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Zellkulturlochplatten (6-, 12-, 24-, 96-Loch)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturschalen (Ø 10 ml)	Nunc, Roskilde, Dänemark

2.1.2.2.3 Reagenzien

2.1.2.2.3.5 Laborchemikalien und andere Reagenzien

Laborchemikalien und andere Reagenzien	Hersteller
Acrylamid 30% (37,5 : 1 Mono/bisacrylamid)	Merck, Darmstadt
Antibiotika:	
G 418	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
APS	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden
BSA (Albumin Fraktion V)	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAPI	Roche, Mannheim
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim

Material und Methoden

Laborchemikalien und andere Reagenzien	Hersteller
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Hormonfreies Fetales Kälberserum (hf FKS)	Biochrom AG, Berlin
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
Hepes	Serva, Heidelberg
H ₂ O (DNase-, RNase-frei)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Längenstandard: Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PeqGOLD RNAPure	PEQLAB, Erlangen
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Ribonuklease Inhibitor RNase Out	Invitrogen, Karlsruhe
Sab simplex	Parke-Davis, Berlin
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Mannheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Tris (1 M, pH 8,8)	Serva, Heidelberg
Tris (0,5 M, pH 6,8)	Biorad, Hercules, USA
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim

Material und Methoden

2.1.2.2.3.6 Inhibitoren

Inhibitoren		Hersteller
Amilorid	ENaC-Blocker	Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete w/o EDTA	Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Leupeptin	Cystein/Serin-Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumvanadat	Tyrosinphosphatase-Inhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim
PMSF	Serin-Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim
RU-486	GR-Antagonist	Sigma-Aldrich, Steinheim
SB202190	p38 MAPK-Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt
SP600125	JNK MAPK-Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt
U0126	MEK1/2 MAPK-Inhibitor	Cell Signaling, Frankfurt a. M.

2.1.2.2.3.7 Zytokine

Zytokine (rekombinant human, rh)	Hersteller
rhIFN- γ	TEBU, Offenbach
rhTNF- α	TEBU, Offenbach

2.1.2.2.3.8 Verwendete Kits

Verwendete Kits	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Bonn
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
High-Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Mannheim
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim
In Vitro Toxicology Assay Kit, XTT based	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipofectamine Plus (Transfektionskit)	Invitrogen, Karlsruhe
LumiLight ^{Plus} Western Blotting Kits	Roche, Mannheim

Material und Methoden

2.1.2.2.3.9 Antikörper

Antikörper	Molekulares Gewicht (kDa)	Spezies	Verdünnung	Hersteller
• β -Aktin	42	mouse	1:10000	Sigma Aldrich, Steinheim
• GR (H300)	95	rabbit	1:200	Santa Cruz, Heidelberg
• p-GR (Ser-211)	95	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
• p38	43	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
• p-p38 (Thr180/Tyr182)	43	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
• p-MAPKAPK (Thr334)	49	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
• JNK	46, 54	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
• p-JNK (Thr183/Tyr185)	46, 54	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
• ERK 1/2	42, 44	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
• p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	42, 44	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
• AlexaFluor [®] 488 goat anti-rabbit IgG		goat	1:500	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2.2.3.10 Sonden für Real-Time PCR

Gen	Assay Bezeichnung human	Assay Bezeichnung Ratte	Hersteller
α -ENaC	HS00168906_m1	RN00580652_m1	Applied Biosystems, Mannheim
β -ENaC	HS00165722_m1	RN00561892_m1	Applied Biosystems, Mannheim
γ -ENaC	HS00168918_m1	RN00566891_m1	Applied Biosystems, Mannheim
GILZ	HS00608272_m1		Applied Biosystems, Mannheim
GR- α	HS00230818_m1		Applied Biosystems, Mannheim
SGK-1	HS00178612_m1		Applied Biosystems, Mannheim

2.1.2.3 Verwendete Software

Verwendete Software	Herkunft
Auswertung von Luminometer-Mikrotiterplattendaten Mikrowin Version 4.36	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath
Auswertung von Mikrotiterplattendaten Easywin Fitting Version V6.0a	Tecan, Grödig, Österreich
Erstellung von Grafiken XACT Version 6.00	97 SciLab GmbH, Leipzig
Konfokale Laser-Scanning- Mikroskopie LSM510 Version 3.2 SP2	Zeiss, Jena
Real-time PCR Software SDS Sequence Detection Software 7500 Fast Version 1.4.0.25	Applied Biosystems
Software zur densitometrischen Auswertung AIDA Advanced Image Data Analyzer Version 3.21.001	Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland

2.1.2.4 Lösungen

Lösungen

Elektrophysiologische Messung:

- Ringerlösung (#111):
140 mM Na⁺; 123.8 mM Cl⁻; 5.4 mM K⁺; 1.2 mM Ca²⁺; 1.2 mM Mg²⁺; 2.4 mM HPO₄²⁻; 0.6 mM H₂PO₄⁻; 21 mM HCO₃⁻; 10 mM D (+)-Glukose; 2.5 mM Glutamin; 10 mM D (+)-Mannose; 0.5 mM b-OH-Butyrat, als Antibiotika Piperacillin (50 mg/l) und Imipenem (4 mg/l)
- Amilorid-Stammlösung (10⁻³ M):
0,133 g in 500 ml Ringerlösung (#111)

Immunfluoreszenzfärbung:

- Blockierlösung:
1.0% Goat-Serum in PBS+Ca²⁺/Mg²⁺

Lösungen

Proteinisolation:

- Lysepuffer zur Analyse

• des Glucocorticoidrezeptors:

20 mM Hepes (pH 7.6), 1.6 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 25% Glycerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 0.5 µg/ml Pepstatin A, 1x Complete w/o EDTA, 2.5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β-Glycerolphosphat, 1 mM Natriumvanadat, 1 µg/ml Leupeptin, 1 mM EGTA, H₂O_{bidest}

• der MAP-Kinasen:

20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β-Glycerolphosphat, 1 µg/ml Leupeptin, 1 mM Natriumvanadat, 1 mM PMSF, H₂O_{bidest}

Proteinbestimmung:

- BCA-Mastermix (190 µL/Probe):

Volumen (µl)/Probe; 4 µl Lösung A und 196 µl Lösung B

SDS-PAGE und Western Blotting:

- 25% APS:

500 mg APS aufgelöst in 2 ml H₂O_{bidest}

- Elektrophorese- Laufpuffer:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% SDS, H₂O_{bidest}

-5x Laemmli-Puffer:

125 mM Tris (pH 6.8), 10 % SDS, 50% Glycerol, 500 mM DTT, 0.001% Bromphenolblau, H₂O_{bidest}

-10x TBS:

10 mM Tris (pH 7.3), 137 mM NaCl, H₂O_{bidest}

- TBS-T:

500 ml 10x TBS und 5 ml Tween20 auf 5l H₂O_{bidest}

- Transfer-Puffer:

20% Methanol, 192 mM Glycin, 25 mM Tris, H₂O_{bidest}

- Sammelgel:

5.1% Acrylamid, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.05% TEMED, H₂O_{bidest}

- Trenngel:

8.5% Acrylamid, 470 mM Tris (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.05% TEMED, H₂O_{bidest}

RT-PCR:

- RT-PCR Master Mix für 2 µg RNA:

Volumen (µl)/Probe; 2 µl 10x RT-Puffer, 0.8 µl 25x dNTPs, 2 µl 10x Random Hexamer Primers, 0.5 µl RNase Out, 1 µl Reverse Transkriptase, H₂O_{bidest}

Lösungen

qRT-PCR:

- qRT-PCR Mix für 2µg RNA: Volumen (µl)/Probe; 7µl steriles H₂O_{bidest},
1 µl Sonde, 10 µl 2xMaster PCR Mix

Zellkultur:

- GR-2-Medium: RPMI-1640, 10% FKS,
5% Penicillin/Streptomycin, 500IU G418
- hormonfreies GR-2-Medium: RPMI-1640, 10% hormonfrei FKS,
5% Penicillin/Streptomycin, 500IU G418
- Kryo-Medium: RPMI-1640, 10% FKS,
5% Penicillin/Streptomycin, 7.5% DMSO

Zytotoxizitätsassay:

- Fixierlösung: 1.0% Glutaraldehyd in PBS+Ca²⁺/Mg²⁺
 - Färbelösung: 0.05% Kristallviolett in PBS+Ca²⁺/Mg²⁺
-

2.2 Methoden

2.2.1 Phytochemische Methoden

2.2.1.1 Extraktherstellung

Das von Herrn Manner (Universität Bonn, Botanischer Garten) identifizierte Pflanzenmaterial der *B. falcatum* L. wurde zunächst gereinigt, anschließend wurden die Wurzeln bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet und danach zu Pulver vermahlen. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Mühle während der Zerkleinerung nicht zu stark erhitzt, um Auswirkung auf das Drogenmaterial zu verhindern.



Abb. 2.1: Frisches und getrocknetes- bzw. gemahlene Pflanzenmaterial der *Bupleurum falcatum* L. des Botanischen Gartens der Universität Bonn

Die Droge der *B. chinensis* DC. wurde ebenfalls vor Extraktherstellung gemahlen.



Abb. 2.2: Droge der *Bupleurum chinensis* DC.

Zur Extraktion der Drogen wurden fünf unterschiedliche Methoden herangezogen, die sich in den verwendeten Extraktionsmitteln, der Extraktionsdauer und den weiteren Behandlungen unterschieden.

1.) Extraktion nach Tian et al. [168]

Es wurden von jeder Droge 0.3 g zunächst durch ein Sieb (Siebporengröße 0.335 mm) und anschließend in 20 ml 0.5% Pyridin-Methanol gegeben, wobei die Extraktionslösung Pyridin-Methanol die Degradation von Saikosaponin A und D verhindern soll [47]. Zur Extraktion wurde die Droge in einem mit Rückflusskühler versehenen Rundkolben für 30 Minuten auf ein 80 °C heißes Wasserbad unter Rückfluss erhitzt. Diese Prozedur wurde zwei Mal wiederholt. Die abgekühlte Lösung wurde in ein Papierfilter gegeben, das dabei erhaltene Filtrat am Rotationsverdampfer unter Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde anschließend mit 3 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt. Diese Suspension wurde auf einer C_{18} Festphasenextraktionskartusche gegeben und zuerst mit 10 ml 30% Methanol dann mit 20 ml 80% Methanol eluiert. Das erhaltene Eluat, bestehend aus der 80% Methanolfraktion, wurde unter Vakuum eingengt und der Rückstand in 2 ml Methanol gelöst. Vor dem Gebrauch wurde der Extrakt mit einem 0.45 μm Filter sterilfiltriert.

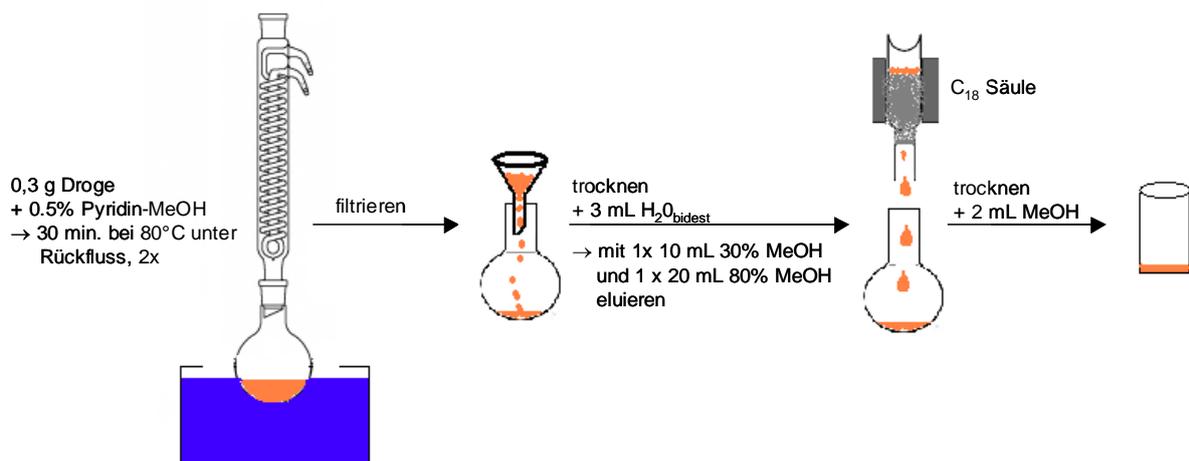


Abb. 2.3: Extraktion nach Tian et al. [168]

2.) Extraktion nach der japanischen Pharmakopöe (2006)

Bei dieser Methode wurden 2 g gepulverte Droge in einem Rundkolben, versetzt mit 10 ml Methanol, unter Rückfluss für 15 Minuten gekocht. Der erhaltende abgekühlte Extrakt anschließend über einen Papierfilter filtriert.

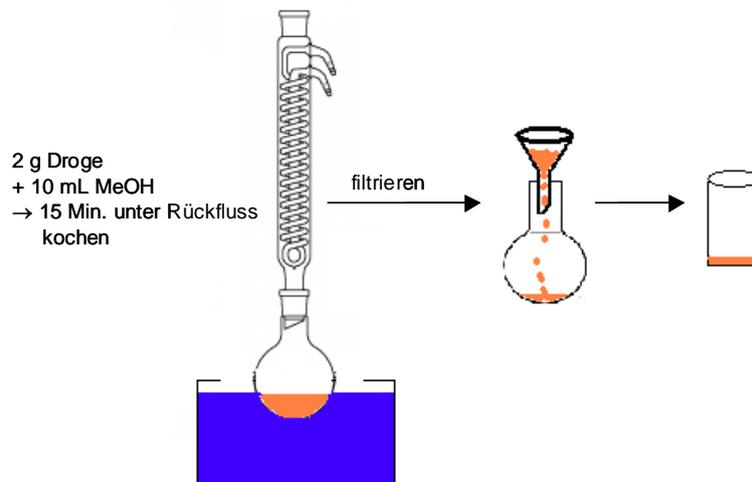


Abb. 2.4: Extraktion nach der japanischen Pharmakopöe

3.) Extraktion nach Zhao et al. [169]

Es wurden 2 g gepulverte Droge in einem Rundkolben in 10 ml 80% Ethanol unter Rückfluss für 60 Minuten erhitzt. Dies wurde vier Mal hintereinander wiederholt. Die abgekühlte Lösung wurde über einem Papierfilter filtriert.

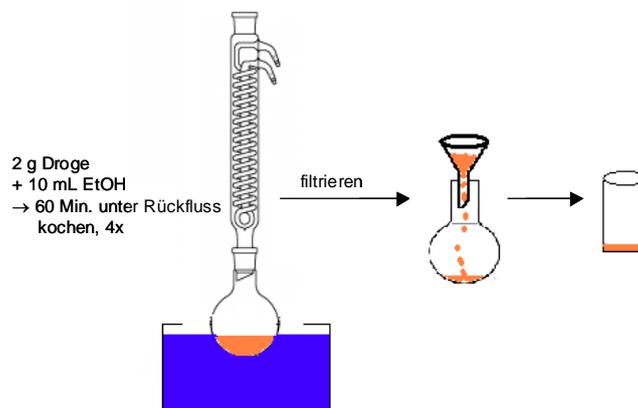


Abb. 2.5: Extraktion nach Zhao et al. [169]

4.) Extraktion nach dem Arzneibuch der chinesischen Medizin (2009)

Hierbei wurden 0.5 g gepulverte Droge mit 20 ml Methanol versetzt und für 10 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt durch einen Papierfilter filtriert und auf 5 ml im Rotationsverdampfer unter Vakuum eingengt.

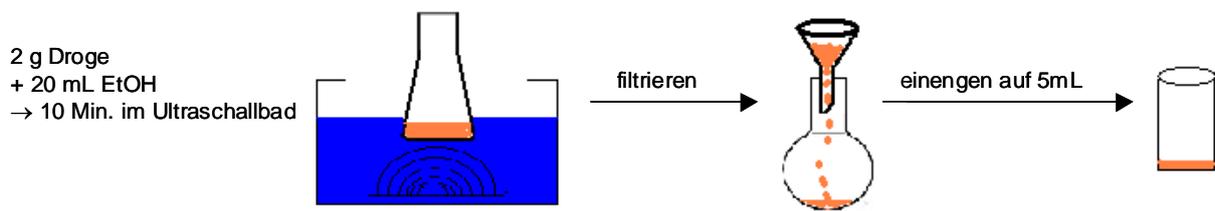


Abb. 2.6: Extraktion nach dem Arzneibuch der chinesischen Medizin

5.) Extraktion nach Yen et al. [170]

Zur Extraktion wurden 1.25 g gepulverte Droge in einem mit Rückflusskühler versehenen Rundkolben in 25 ml Methanol für 60 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Der abgekühlte Extrakt wurde erst zentrifugiert, dann mit einem Papierfilter filtriert, das dabei gewonnene Filtrat am Rotationsverdampfer unter Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde anschließend in 10 ml Methanol gelöst.

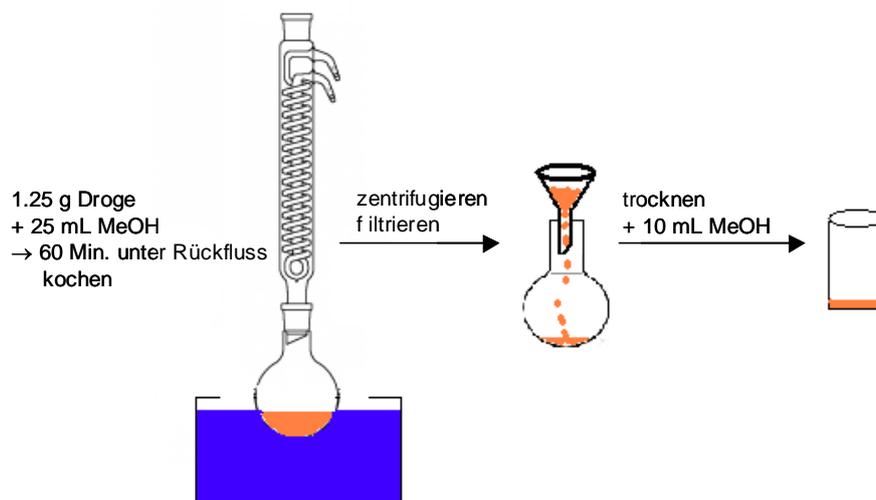


Abb. 2.7: Extraktion nach Yen et al. [170]

Alle gewonnenen Extrakte wurden bis zu ihrem Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.1.2 Dünnschichtchromatographie und Hochleistungsdünnschichtchromatographie

Zur qualitativen Analyse der Extrakte und zum Vergleich der unterschiedlichen angewandten Extraktionsverfahren wurden die qualitative Dünnschichtchromatographie (DC) bzw. Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) herangezogen.

Es wurden drei verschiedene vorgeschlagene Trennverfahren angewandt, die sich vor allem in der mobilen Phase unterschieden (unterschiedliche Fließmittel (FM)). Benutzt wurden Kieselgelplatten, die mit einem Fluoreszenzindikator versehen sind. Dabei wurden die zu untersuchenden Extrakte bzw. Referenzsubstanzen bandenförmig (2 µl - 5 µl Spots) auf die Kieselgelplatte aufgetragen und in einer Kammer mit einer Laufstrecke von 8 - 10 cm mit Kammersättigung chromatographiert.

Ausgewertet wurde das erhaltende Chromatogramm im Tageslicht und nach der Detektion mit ethanolisch-schwefelsaurer p-Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB)-Reagenz, wobei die Eigenfluoreszenz bei $\lambda = 365$ nm ermittelt wurde.

Dünnschichtchromatographie

Stationäre Phase:	- Alugram® Nano-Sil G/UV ₂₅₄ , Kieselgel 60 Schichtdicke 0,2 mm, 20 × 20 cm - HPTLC-Fertigplatte Nano-Sil-20/UV ₂₅₄ Kieselgel 60, Schichtdicke 2,0 mm, 10 × 20 cm
Mobile Phase:	- Dichlormethan:Ethylacetat:Methanol:H ₂ O _{bidest} (FM 1) (30:40:15:3, nach Tian et al. [168]) - Chloroform:Methanol:H ₂ O _{bidest} (FM 2) (30:10:1, nach Jap. Pharmakopöe) - Ethylacetat: Ethanol:H ₂ O _{bidest} (FM 3) (8:2:1, nach AB der chinesische Medizin und Yen et al. [170])
Trennstrecke:	8 – 10 cm
Aufgetragenes Volumen:	2 – 5 µl
Detektionsmittel:	ethanolisch-schwefelsaurer DMAB-Reagenz Besprühen der Kieselgelplatte mit der Reagenz (2 g DMAB + 25 ml konz. Schwefelsäure + 75 ml EtOH), erhitzen bei 105°C

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Zellkultur-Epithelmodell

Als Zellkultur-Epithelmodell wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6-GR genutzt. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte im *GR-2*-Kulturmedium bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit. Vor Gebrauch wurden alle Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Für das wöchentliche Passagieren von Zellen wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen wurden zweifach mit sterilen PBS^{-Mg/Ca} gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bis zu ihrer Ablösung mit 1,5 ml (25 cm² Gewebeflaschen) bzw. 3 ml (75 cm² Gewebeflaschen) Trypsin-EDTA inkubiert. Für eine neue Aussaat in Zellkulturflaschen wurden Verdünnungen von 1:3.5 bis 1:7 genutzt.

Um Transporteigenschaften der Zellen charakterisieren zu können, wurden die HT-29/B6-GR-Zellen auf der apikalen Seite eines PCF-Filters (Porengröße 3 µm) in einer durchschnittlichen Zellkonzentration von $7 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ausgesät. Es befanden sich jeweils drei Filter in einer unbeschichteten Zellkulturschale (∅ 6 cm), wobei die Zellen, aufgrund der durchlässigen Filtermembran, sowohl zu den 0.6 ml apikal zugesetzten *GR-2*-Medium als auch zu den 10 ml basolateral vorhandenen Kulturmedium Kontakt hatten. Üblicherweise wurde das Medium erstmalig 24 Stunden nach Aussaat und dann in einem 48 Stunden-Rhythmus gewechselt. Hierbei wurde beachtet, dass zunächst das äußere, dann das innere Kulturmedium abgesaugt bzw. anschließend erst das innere, dann das äußere Medium ersetzt worden ist. Nach durchschnittlich 7 Tagen betrug der TER $\sim 400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und die konfluenten Monolayer konnten für Experimente verwendet werden. Es wurden HT-29/B6-GR-Zellen der Passagen 7 bis 12 für die Experimente benutzt. Die adhärennten Monolayer wurden 24 Stunden vor einem Versuch in hormonfreiem *GR-2*-Kulturmedium kultiviert.



Abb. 2.8: HT-29/B6-GR-Zellen kultiviert auf PCF-Filter in einer Zellkulturschale

2.2.2.2 Kryo-Konservierung

HT-29/B6-GR-Zellen, mit denen nicht gearbeitet wurde, wurden für den weiteren, späteren Bedarf in flüssigem Stickstoff bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Für die Kryo-Konservierung wurde eine große Zellkulturflasche (75 cm^2) konfluent-adhärenter HT-29/B6-GR Zellen mit Trypsin-EDTA inkubiert, wie bereits unter 2.2.2. beschrieben. Durch Zugabe von 30 ml GR-2-Kulturmedium wurde eine Zellsuspension hergestellt, die anschließend in einem 50 ml-Falcon überführt und bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert worden ist. Das erhaltende Zellpellet wurde mit 12 ml eiskaltem *Kryo-Medium* resuspendiert, danach in Kryoröhrchen abgefüllt; zunächst über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Freezing Container, später bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Für das Auftauen von Kryokulturen wurden die Röhrchen schnell auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt und in einer mit vorlegtem, warmem Kulturmedium gefüllten Zellkulturflasche ausgesät. Ein Medienwechsel erfolgte nach 24 Stunden, um möglicherweise vorhandene Reste des DMSO zu beseitigen.

2.2.2.3 Zugabe von Reagenzien zu eukaryotischen Zellen

Die Stimulationsexperimente wurden mit konfluenten Monolayern der HT-29/B6-GR-Zellen durchgeführt. Vor Zugabe der Reagenzien wurden die Versuchsmedien in Falcongefäßen angesetzt. Anschließend wurde das Medium der Filterkulturen abgesaugt und das Stimulationsmedium erst apikal, dann basolateral zugegeben, wie bereits unter 2.2.2.1. erwähnt, so dass in der Regel beidseitig stimuliert worden ist.

Anders bei einer Inkubation mit einem Inhibitor (MAP-Kinasen-Inhibitoren, bzw. GR-Antagonisten); hierbei kam es zunächst zu einer Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor;

wobei dieser apikal und basolateral zugegeben wurde. Weitere Stimulanzen wurden dann anschließend zum Kulturmedium zugesetzt.

2.2.2.4 Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizität der untersuchten Substanzen wurde mit Hilfe des Kristallviolett-Assays bestimmt, welcher von Gilles et al. erstmalig beschrieben worden ist [171]. Dafür wurden zunächst konfluent-adhärenente HT-29/B6-GR-Zellen mit Trypsin-EDTA behandelt, wie bereits unter 2.2.2.1. beschrieben. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von $4 \cdot 10^4$ Zellen/Well in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und unter bereits erwähnten Kulturbedingungen für 24 Stunden inkubiert. Das Kulturmedium wurde am nächsten Tag durch die jeweiligen in Medium angesetzten Substanzen in einem Volumen von 100 µl pro Well ersetzt und die 96-Well-Mikrotiterplatte für weitere 24 Stunden inkubiert; dabei wurden die Substanzen pro Versuch in 3 Ansätzen getestet. Die Wells am Rand wurden mit Kulturmedium befüllt (siehe Pipettierschema, Abb. 2.10). Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in einer 1 % Glutaraldehydlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach Entfernen der Fixierlösung und Waschen mit $\text{PBS}^{+\text{Mg}/\text{Ca}}$ erfolgte zunächst eine 15-minütige Trocknungsphase an deren Anschluss die Zellen mit einer 0.05%-tigen Kristallviolettlösung für 15 Minuten gefärbt wurden. Die Farblösung wurde abgekippt, die Wells der Mikrotiterplatte wurden unter laufendem Leitungswasser gewaschen und anschließend für weitere 15 Minuten getrocknet. Gebundenes Kristallviolett wurde mit einer 10%-tigen Essigsäurelösung herausgelöst. Die optische Dichte wurde nach 10 Minuten bei 595 nm gemessen. Nach folgender Berechnung wurde das Zellüberleben ermittelt:

$$\text{prozentuales Zellüberleben (\%)} = \frac{\text{optischeDichteSubst.}}{\text{optischeDichteKontr.}} \times 100$$

Folgende Abbildung zeigt einen schematischen Ablauf der Methode.

Material und Methoden

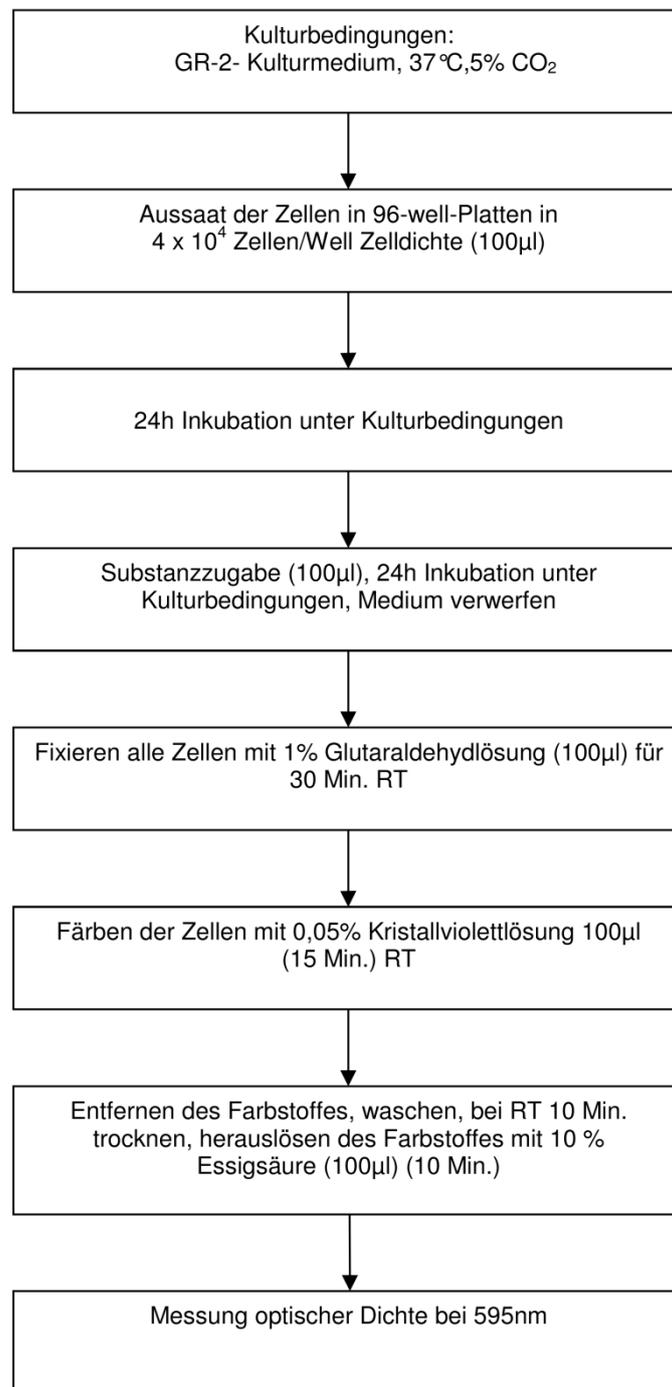


Abb. 2.9: Schema für den Ablauf des Kristallviolett-Assays

Nachstehende Abbildung zeigt ein Pipettierschema der Methode und HT-29/B6-GR Zellen nach dem Färbeprozess mit Kristallviolett.

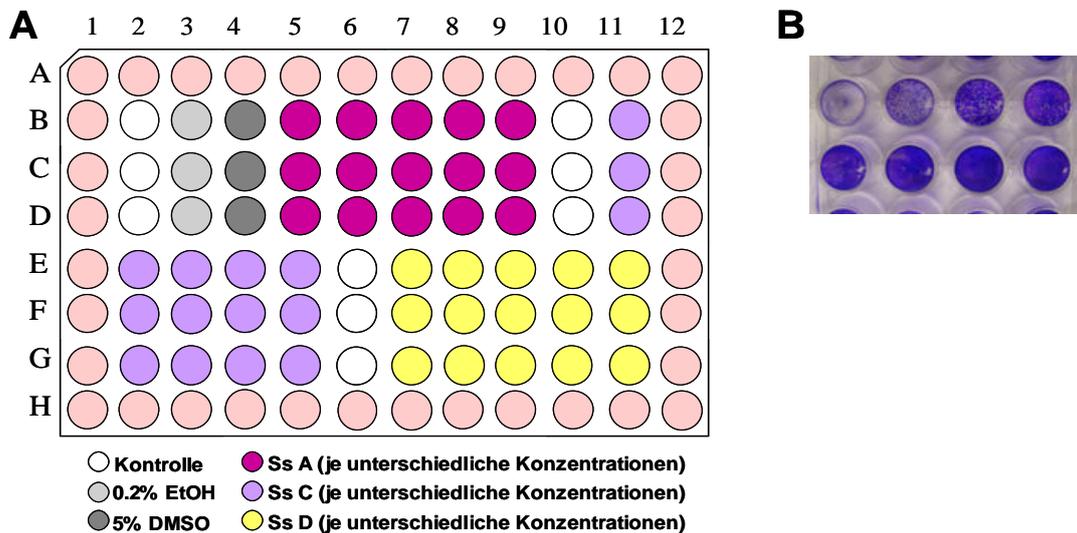


Abb. 2.10: Kristallviolett-Assay

(A) Pipettierschema. (B) Anfärbung von HT-29/B6-GR-Zellen mit Kristallviolett.

2.2.2.5 Transiente Transfektion mittels Lipofektion und Reporter-gen-Assay

Eine durch GC-induzierte Transaktivierung wurde mit Hilfe des Luciferase-Genreporter-Assays untersucht. Hierfür wurden in einem Luciferase-Reporterplasmid spezifische GC-abhängige Promotorsequenzen subkloniert. Durch Bindung des GCs kommt es zur Transkription des Luciferasegens. Das Enzym Luciferase katalysiert die oxidative Umsetzung von Luciferin zu Oxiluciferin unter detektierbarer Lichtfreisetzung. Die gemessene Lichtemission stellt ein Maß für die Induzierung des Luciferasegens dar und steht demnach für die durch GC-ausgelöste Aktivität der Promotorsequenz. In dieser Arbeit wurden zum einen das GRE-, und zum anderen das sgk-short-Reporterkonstrukt charakterisiert. Es wurden konfluent adhärenzte HT-29/B6-GR-Zellen trypsiniert, wie bereits erwähnt in 2.2.2.1, und in einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/Well in einer 6-Well-Multiwellplatte unter hormonfreien Bedingungen (hormonfreies GR-2-Kulturmedium) ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen unter Verwendung des Lipofectamine Plus-Kits nach Herstellerangaben transfiziert. Für die Experimente wurden 1 μ g Reporter-gen-DNA pGRE-Luc, pMMTV-Luc oder psgk-short-Luc, kodiert durch die Firefly (*Photinus pyralis*)-Luciferase, und 50 ng des Ko-Reportergens pGL4.70, kodiert durch die Renilla (*Renilla reniformis*)-Luciferase,

eingesetzt. Das Ko-Reportergen diente dabei als Kontrollkonstrukt zur Normalisierung der Transfektionseffizienz. Nach der Lipofektion wurden die transfizierten Zellen 24 Stunden inkubiert und anschließend unter Verwendung des Dual-Luciferase Reporter Assay Kits nach Herstellerangaben weiterverarbeitet.

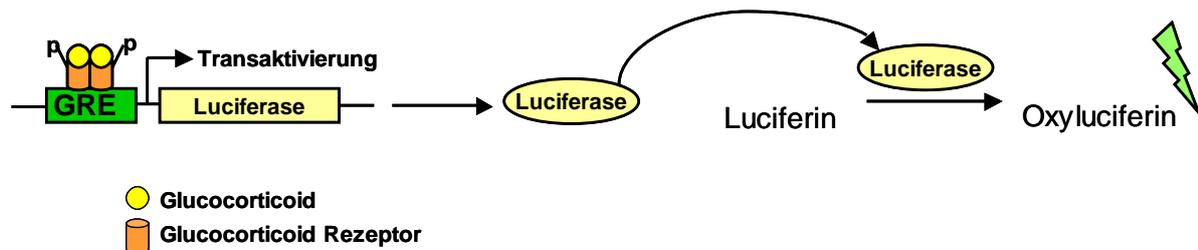


Abb. 2.11: Schema des Reporterassays mit dem pGRE-Luc Reporterplasmid

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Gesamt-RNA Isolation

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Rattengewebe oder HT-29/B6-GR-Zellen basierte auf der 1986 beschriebenen Methode von Chomczynski et al. [172].

2.2.3.1.1 Tierisches Gewebe

Das Rattengewebe wurde nach dem Versuchsende und Ausbau aus den Ussing-Kammern in flüssigem Stickstoff gekühlt. Zur RNA-Isolierung wurde ein Rattengewebestück mit 1 ml PeqGOLD RNAPure[®] versetzt. Das Gewebe wurde mit einem Homogenisator weiter zerkleinert und danach für 5 Minuten in einem Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und das Reaktionsgefäß für 15 Sekunden geschüttelt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (12000g, 4 °C für 10 Minuten). Hinterher wurde die obere, wässrige Phase abgenommen, diese in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Isopropanol zugefügt. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Probe zunächst zentrifugiert (12000g, 4 °C für 10 Minuten), der Überstand darauffolgend entfernt und das RNA-Pellet zweifach mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das RNA-Pellet getrocknet und in 23 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.3.1.2 Kultivierte Epithelzellen

Auf Filter gewachsene HT-29/B6-GR-Zellen wurden nach dem Versuchsende mit 500 μl PeqGOLD RNAPure[®] versetzt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Filter gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden der Probe mit 100 μl Chloroform hinzugefügt, das Reaktionsgefäß für 15 Sekunden geschüttelt und für 15 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (12000g, 4 °C für 10 Minuten); dabei wurde hinterher die obere, wässrige Phase abgenommen, diese in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und 250 μl Isopropanol zugefügt. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Probe erst zentrifugiert (12000g, 4 °C für 10 Minuten), dann der Überstand entfernt und das RNA-Pellet zweifach mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde getrocknet und in 23 μl RNase-freiem Wasser gelöst. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

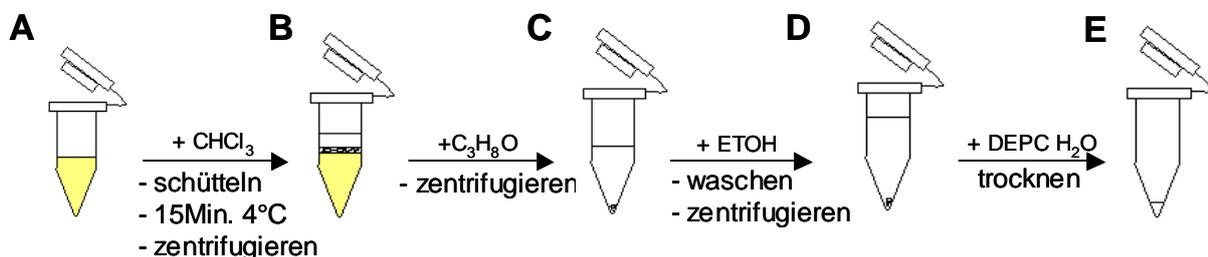


Abb. 2.12: Isolierung der RNA

- (A) Extraktion der RNA von HT-29/B6-GR-Zellen.
- (B) Trennung in wässriger und organischer Phase.
- (C) Ausfällung der RNA. (D) Waschen des RNA-Pellets.
- (E) Trocknung und Resuspension der RNA in DEPC- H_2O .

2.2.3.2 Reverse Transkription und Real-time PCR

Die unter 2.2.3.1. erhaltene mRNA wurde mit Hilfe des High-Capacity cDNA Archive Kits nach Herstellerangaben durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Es wurden hierfür jeweils 2 μg der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Die RNA Konzentration wurde mit photometrischer Messung am NanoDrop[®] 1000 Photometer bestimmt. Zu der in RNase-freiem Wasser, gelösten RNA wurden 6.3 μl angesetzter RT-MasterMix, wie in 2.1.2.4. beschrieben, gegeben. Anschließend erfolgte die reverse Transkription; dabei wurden die

Proben 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Transkription wurden die cDNA-Proben bis zu ihrem weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Die Real-time PCR wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet, da sie eine gebräuchliche Methode darstellt, um Änderungen von Genexpressionen charakterisieren zu können. Hierbei wird eine vorhandene cDNA mit spezifischen Primern für das zu analysierende Gen vermehrt, bei gleichzeitiger Quantifizierung der vervielfältigten DNA durch 6-Carboxyfluorescein (FAM)-gekoppelte Sonden. Das Gen der GAPDH diente als endogene Kontrolle, da es unter verschiedensten Versuchsbedingungen zu keinen Änderungen in der mRNA-Expression kommt. Es wurden 2 µl der durch reverse Transkription gewonnenen cDNA zu einem 18 µl angesetzten *qRT-PCR*-Mastermix in eine PCR-Reaktionsplatte pipettiert. Die Proben-Platte wurde dann für einige Sekunden zentrifugiert (800g) und anschließend in einem 7500 Fast Real-Time PCR Cycler nach Herstellerangaben entwickelt. Als Negativkontrollen wurden sowohl H₂O_{bidest.} als auch angesetzter *qRT-PCR*-Mastermix ohne zugesetzte cDNA mitgeführt. Für die quantitative Auswertung wurde die Expression des GAPDH Gens mit der des zu analysierenden Gens relativiert; dafür wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode nach Livak herangezogen [173].

Folgende Bedingungen galten für den Temperaturverlauf der Real-Time PCR:

Temperaturverlauf Real-Time PCR		
	Temperatur	Dauer [hh:mm:ss]
1 Schritt	95 °C	00:10:00
45 Zyklen	95 °C	00:00:15
	60 °C	00:01:00

Tab. 2.1: Temperaturverlauf einer Real-Time PCR

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Gewinnung der Zelllysate

Für die Isolierung des Gesamtproteins wurden abhängig von den Proteinen, die untersucht werden sollten, unterschiedliche Protokolle herangezogen. Es wurden dabei immer konfluent-adhärenente auf Filter gewachsene HT-29/B6-GR-Zellen für die Zelllysatherstellung benutzt.

Protokoll für die Analyse des Glucocorticoidrezeptors

Zur Analyse des Glucocorticoidrezeptors wurden die HT-29/B6-GR-Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn hormonfrei gesetzt (hormonfreies *GR-2-Medium*) und darauffolgend für 3 Stunden mit den Stimulanzen inkubiert. Zunächst wurden die Filter zweifach mit eiskaltem $\text{PBS}^{+\text{Mg}/\text{Ca}}$ gewaschen. Darauffolgend wurden je 60 μl /Filter *GR*-Lysepuffer, bereits beschrieben in 2.1.2.4., auf die Filter gegeben. Die Zellen wurden von den Filtern heruntergeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und dabei resuspendiert. Zur Verbesserung der Lyseeffizienz wurden die Proben kurz in flüssigem Stickstoff eingefroren, dann bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und 7-fach durch eine Insulinspritze gezogen, anschließend für 5 Minuten auf Eis stehen gelassen und hinterher zentrifugiert (14000g, 4 °C für 15 Minuten). Das Pellet wurde verworfen, das gewonnene Zelllysate in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und dieses bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C aufbewahrt.

Protokoll für die Analyse der MAP-Kinasen

Für die Analyse der MAP-Kinasen (p38, p42/p44 ERK und JNK) wurden die HT-29/B6-GR-Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn hormonfrei gesetzt (hormonfreies *GR-2-Medium*) und darauffolgend mit den Stimulanzen inkubiert. Zunächst wurden die Filter zweifach mit eiskaltem $\text{PBS}^{+\text{Mg}/\text{Ca}}$ gewaschen. Darauffolgend wurden je 250 μl /Filter *MAPK*-Lysepuffer, bereits beschrieben in 2.1.2.4., auf die Filter gegeben. Die Zellen wurden von den Filtern heruntergeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und dabei resuspendiert. Zur Verbesserung der Lyseeffizienz wurden die Proben 7-fach durch eine Insulinspritze gezogen. Anschließend für 5 Minuten auf Eis stehen gelassen und hinterher zentrifugiert (14000g, 4 °C für 15 Minuten). Das Pellet wurde verworfen, das gewonnene Zelllysate in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und dieses bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.4.2 Proteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach einer kolorimetrischen Methode basierend auf der Biuret-Reaktion und einer Färbereaktion mit der Bicinchoninsäure. Hierbei reduzieren zunächst die in den Proben enthaltenen Proteine im alkalischen Milieu zweiwertige Cu^{2+} - zu einwertigen Cu^+ -Ionen, die dann mit der Bicinchoninsäure einen wasserlöslichen, magentaroten Chelatkomplex bilden, dessen Absorptionsmaximum bei 565 nm analysiert werden kann. Die BCA-Methode wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. In einer angemessenen Verdünnung wurden 10 µl der zu analysierenden Proben als Duplikate, sowie einer BSA-Eichreihe, in den Konzentrationen 0, 0.2, 0.8 und 1.2 mg/ml, in einer 96-Well-Multiwellplatte pipettiert. Zu den Lösungen wurden jeweils 190 µl des angesetzten BCA-Mastermixes, bereits beschrieben in 2.1.2.4., hinzugefügt und die Platte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Später wurde die Absorption der Proben bzw. der Eichreihe UV-spektralphotometrisch bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration der zu analysierenden Proben mittels der erstellten Eichgerade bestimmt. Die Verdünnung der Proben wurden so ausgewählt, dass die gemessene Absorption im linearen Bereich der Eichgeraden (0.2 – 0.9) lag.

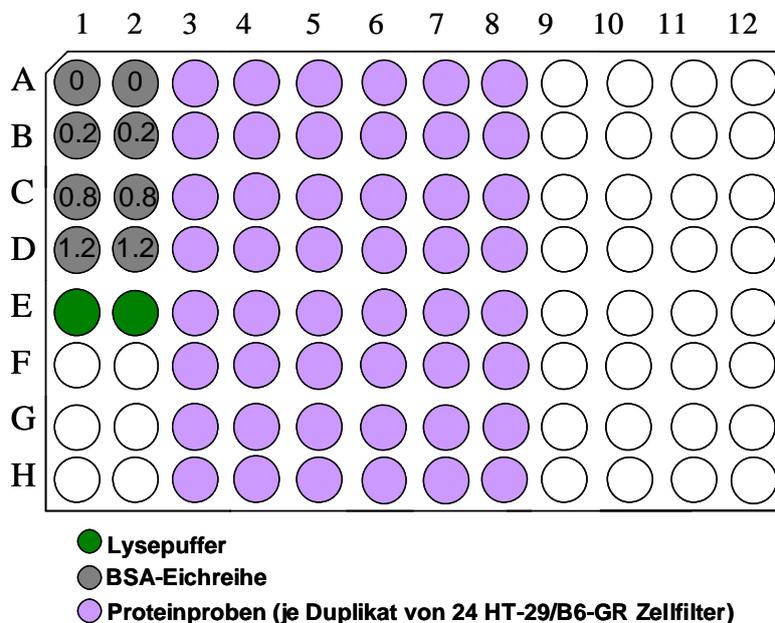


Abb. 2.13: Pipettierschema der Proteinbestimmung

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE, die erstmalig von Lämmli 1970 als Methode eingeführt wurde, diente zur Auftrennung von Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel nach ihrem Molekulargewicht [174]. Dabei bewirkt das in dem Lämmli-Puffer, erwähnt in 2.1.2.4., enthaltende SDS eine Denaturierung der vorhandenen Proteine. Zudem ist SDS eine stark anionisch geladene Substanz, die mit vorhandenen Proteinen einen negativ geladenen Komplex bildet, wodurch die Eigenpolaritäten der Proteine vernachlässigbar werden. Der anionisch geladene SDS-Protein-Komplex ermöglicht die Auftrennung nach der Größe der Proteine nach Anlegung einer Spannung.

Die Proteinkonzentrationen wurden zunächst mittels der bereits erwähnten Methode in 2.2.4.2. ermittelt und die Proben so eingestellt, dass die Proteingesamtmenge 15 µg betrug. Die Proben wurden anschließend mit Lämmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Es wurden SDS-Polyacrylamid-Gele, die aus einem Sammel- und einem Trenngel (erwähnt 2.1.2.4.) bestehen, vorbereitet und mit 15 µg Gesamtprotein der Probe, sowie 6 µl eines Größenmarkers, der die Abschätzung der Größe der Proteine erlaubt, beladen. Für die Gelelektrophorese wurden die Elektrophoresekammern, Biorad Mini-Protean Elektrophorese System nach Herstellerangaben, mit Elektrophorese-Puffer, beschrieben in 2.1.2.4., befüllt und eine Spannung von 100 V für ungefähr 1.5 Stunden angelegt.

2.2.4.4 Western Blot

Um die mit der SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine mit Hilfe der Western Blot Technik zu detektieren, wurden diese im Nassblot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Die PVDF-Membranen wurden vor ihrer Benutzung für die Elektrophorese zunächst in Ethanol, darauffolgend in Transfer-Puffer, beschrieben in 2.1.2.4., vorinkubiert. Für die Elektrophorese wurde das Biorad Mini Transblot Cell System nach Herstellerangaben genutzt, wobei sich die Blot-Apparatur wie folgend, ausgehend von der Kathode, zusammensetzte: Kathode(-), Halterung, Schwamm, 1x Whatman-Filter, SDS-Polyacrylamid-Gel, PVDF-Membran, 1x Whatman-Filter, Schwamm, Halterung, Anode (+). Nachdem man die Halterung zusammengebaut hatte, setzte man diese in die Blot-Apparatur ein, befüllte diese mit Transfer-Puffer und blottete bei angelegter Spannung von 100 V für 1 Stunde unter Kühlung.

Nach erfolgtem Membran-Transfer wurden unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert, indem die PVDF-Membranen für mindestens 1 Stunde mit einer angesetzten Blockierlösung

(TBS-T, 2.1.2.4., versetzt mit 5% BSA und 0.02% Natriumazid) bei Raumtemperatur geschüttelt worden sind. Die spezifischen 1. Antikörper gegen die zu analysierenden Proteine wurden in TBS-T mit 5% BSA und 0.02% Natriumazid in einer vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen angesetzt, erwähnt in 2.1.2.2.3.5.. Nach Absättigung der Bindungsstellen wurden die Membranen mit den 1. Antikörpern unter konstantem Schütteln bei 4 °C über Nacht inkubiert. Weiterführend wurden die Membranen am nächsten Tag 3x für je 10 Minuten zunächst mit TBS-T gewaschen und anschließend unter Verwendung des LumiLight^{Plus} Kits nach Herstellerangaben mit einem Peroxidase-gekoppelten 2. Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachdem die Membranen hinterher erneut 3x für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen worden sind, wurden die Chemilumineszenz-Signale auf den Membranen mittels dem LumiLight Plus Western blotting kit und einer CCD-Kamera detektiert. Densitometrisch ausgewertet wurde mit Hilfe des AIDA Programms. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Für die Auswertung des GR wurde nur das funktionell wirkende GR- α in Betracht gezogen; es wird im Ergebnisteil als totales GR Protein beschrieben. Für die densitometrische Auswertung der GR-Expression wurden die Proben zu Dexamethason normalisiert, da unter Kontrollbedingungen die GR-Expression zu niedrig war.

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Expression und Lokalisation des GRs in HT-29/B6-GR-Zellen wurde durch Immunfluoreszenzfärbung visualisiert.

Für die Färbung wurden zunächst HT-29/B6-GR-Zellen auf Deckgläschen in einer 24-Well-Multiwellplatte in einer durchschnittlichen Zellkonzentration von $7 \cdot 10^5$ Zellen/Well ausgesät; dabei befand sich ein Deckgläschen pro Well. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im GR-2-Kulturmedium bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit für 7 Tage. Vor Versuchsbeginn wurden die auf den Deckgläschen adhärent gewachsenen Zellen für 24 Stunden hormonfrei gesetzt (hormonfreies GR-2-Medium) und am nächsten Tag für 3 Stunden mit den Stimulanzien inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS^{+Mg/Ca} gewaschen und mit Methanol (200 μ l/Well) für 10 Minuten bei -20 °C fixiert. Nach erneutem 2-maligen Waschen mit PBS^{+Mg/Ca} wurden die Zellen mit 0.5% Triton X-100 (200 μ l/Well) für 7 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS^{+Mg/Ca} gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Zellen darauffolgend für 30 Minuten mit einer Blockierlösung, erwähnt in 2.1.2.4., bei Raumtemperatur behandelt. Die darauffolgende Inkubation mit dem 1. Antikörper (GR-Antikörper, 1:50 in Blockierlösung,

100µl/Well) erfolgte bei Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde, anschließend wurden die Deckgläschen 3-fach mit Blockierlösung gewaschen und für 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten 2. Antikörper (Alexa Fluor® anti-Rabbit⁴⁸⁸, 1:500 in Blockierlösung, 100µl/Well) inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen gewaschen (3x mit Blockierlösung) und für 10 Minuten mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4,6-Diamidin-2-Phenylindol, 1:5000 in PBS^{+Mg/Ca}) bei Raumtemperatur behandelt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI lagert sich im Zellkern in die DNA ein, wodurch sich die nukleare Translokation des GRs besser darstellen lässt. Die Deckgläschen wurden anschließend 3-fach mit PBS^{+Mg/Ca} gewaschen. Mit einer Pinzette wurden die angefärbten Deckgläschen nacheinander aus der 24-Well-Multiwellplatte entnommen; dabei jedes einzelne kurz mit H₂O_{bidest} und mit Ethanol abgespült. Die Deckgläschen wurden auf einem Objektträger mit ProTaqMountFlour (50 µl/Deckgläschen) eingedeckt und abschließend ließ man sie bei Raumtemperatur im Dunkeln aushärten.

Die Ergebnisse wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) dokumentiert. Es wurden sowohl die Einstellung des 40 × 1.3 Oil Plan-Neofluar-Objektivs als auch die Einstellung des 63 × 1.3 Oil Plan-Apochromat-Objektivs für die Bild Darstellung genutzt. Für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpers Alexa Fluor® anti-Rabbit⁴⁸⁸ wurde der Argon-Laser (488nm) verwendet; die dabei emittierte Fluoreszenzstrahlung mit einem 505-550 nm Bandpass-Filter festgestellt. Der DAPI-Fluoreszenzfarbstoff wurde mit einer UV-Laserdiode bei 405 nm angeregt; die hierbei ausgestrahlte Fluoreszenz mit einem 420-480 nm Bandpass-Filter detektiert.

2.2.6 Elektrophysiologische Methoden in Ussing-Kammern

Die Transporteigenschaften von Epithelien wurden mit Hilfe der von Ussing und Zerahn entwickelten Ussing-Technik charakterisiert [175]. Es wurden epitheliale Zellkulturen oder Rattengewebe in die Ussing-Kammer eingespannt und elektrophysiologische Epitheleigenschaften wie der Kurzschlussstrom gemessen. Durch das Einspannen der Gewebe entstehen jeweils zwei voneinander getrennte Ussing-Kammerhälften, so dass ein Molekültransport ausschließlich durch das eingespannte Epithel stattfindet. Während des gesamten Versuches werden die 10 ml je Ussing-Kammerseite hinzugefügte #111-Ringerlösung auf 37 °C temperiert und mit Carbogengas (95% O₂ und 5% CO₂) begast. Die ausströmenden Gasperlen führen einerseits zu einer konstanten Zirkulation der #111-Ringerlösung in den Ussing-Kammerhälften, andererseits wird so der pH-Wert auf 7,4

eingestellt. Zwei vorhandene Elektrodenpaare, welche aus Agar-Brücken bestehen und deren Enden sich zum einen in einer gesättigten 3M Kaliumchlorid (KCl) und zum anderen in den Ussing-Kammerhälften befinden, bilden ein stromleitendes System. Ein zu dem Epithel sehr nahe eingesetztes Elektrodenpaar misst entstehende Potentialdifferenzen mittels eines angeschlossenen Voltmeters. Das andere Paar befindet an den Enden der Kammerhälften, größtmöglich entfernt vom Epithel und ist an einer Gleichstromquelle, sowie einem Amperemeter angeschlossen. Vorhandene Ionentransporte eines eingespannten Epithels induzieren eine messbare Potentialdifferenz. Diese wird mit einem extern angelegten Stromfluss auf Null gesetzt, wobei die dabei aufgebrachte Stromstärke Kurzschlussstrom (I_{sc}), gemessen in $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$, bzw. $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, genannt wird. Die Abb. 2.14 zeigt den schematischen Aufbau der Ussing-Kammer.

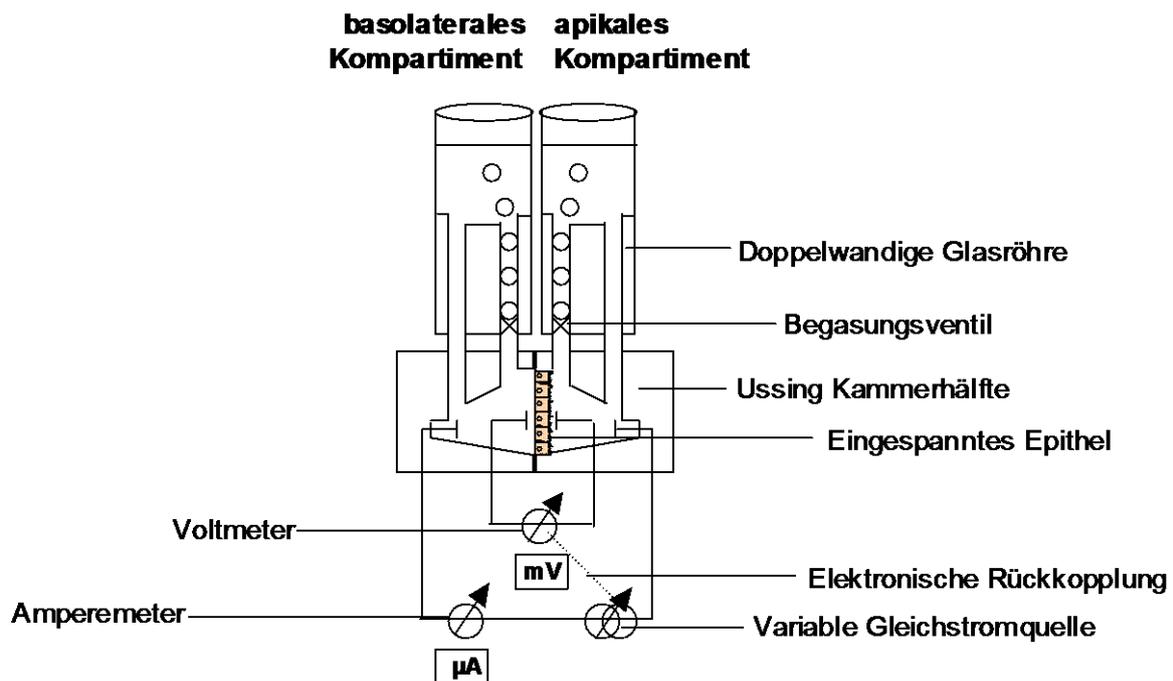


Abb. 2.14: Ussing-Kammer Aufbau (modifiziert nach Li et al. 2004 [176])

2.2.6.1 Elektrophysiologische Messung an humaner Kolonzelllinie HT-29/B6-GR

HT-29/B6-GR-Zellen wurden auf Filtern ausgesät und für 7 Tage unter bereits genannten Kulturbedingungen inkubiert. Die konfluent gewachsenen Monolayer wurden für Untersuchungen der ENaC-abhängigen Na^+ -Resorption genutzt. Je nach Versuchsanordnung

wurden die Zellen individuell mit Stimulanzen behandelt. Anschließend wurde der gesamte Zellfiltereinsatz in die Ussing-Kammer eingebaut. Durch Dichtungsringe in den Kammern wurde sowohl ein abgrenzbarer apikaler als auch ein abgrenzbarer basolateraler Zellbereich hergestellt, der von beiden Seiten mit der #111-Ringerlösung, beschrieben in 2.1.2.4., in Kontakt stand. Die Zellfläche betrug dabei 0.6 cm^2 . Es wurden je 10 ml $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmter #111-Ringerlösung auf der apikalen bzw. basolateralen Kammerhälfte zugegeben. Nach einer ca. 20-minütigen Äquilibrationsphase wurde Amilorid apikal in einer Konzentration von 10^{-4} M zugegeben und mit der Messung für weitere 10 Minuten fortgeföhren. Messdaten, wie der Kurzschlussstrom, die Spannungs- bzw. Widerstandsparameter, wurden alle 10 Sekunden erfasst. Abschließend wurden die Zellfilter aus den Kammern ausgebaut und entweder verworfen oder für weitere Methoden, wie RNA-Isolation, benutzt.

2.2.6.2 Elektrophysiologische Messung an distalem und proximalem Rattenkolon

Für elektrophysiologische Messungen am nativen Gewebe wurden männliche Albino-Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250-300g verwendet. Die Tiere wurden durch CO_2 -Inhalation getötet. Nach Entnahme des Kolons wurde dieser vom Kot befreit und „total gestrippt“; dabei wurden sowohl die Serosa, als auch die Muskelschichten des Kolons entfernt. Das Gewebe, welches nur noch aus Epithel, Lamina Propria und der äußeren Schicht der Muskularis mucosae bestand, wurde durch Aufspannen über Nadeln auf der einen Hälfte der Gewebekammer fixiert und mit der anderen Kammerhälfte fest geschlossen. Es entstand dadurch einerseits ein abgrenzbarer basolateraler, wie auch ein abgrenzbarer apikaler, zu der #111-Ringerlösung in Kontakt-stehender, Gewebebereich mit einer Fläche von 0.54 cm^2 . Es wurden je 9 ml $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmter #111-Ringerlösung auf der basolateralen bzw. apikalen Kammerhälfte zugegeben. Nach einer 30-minütigen Äquilibrationsphase, wurde beidseitig 1 ml hormonfreies, für 20 Minuten hitzeinaktiviertes, FKS zur Absättigung der Glasoberflächen hinzugegeben. Um mögliche Schaumbildung durch das FKS zu verhindern, wurde zusätzlich beidseitig $10 \mu\text{l}$ Sab simplex® (Wirkstoff Simeticon) zugefügt und erneut für 30 Minuten äquilibriert. Wurde Rattengewebe in der Versuchsanordnung mit $\text{TNF-}\alpha$ inkubiert, kam es anschließend zunächst zu einer 1-stündigen Vorbehandlung mit $\text{IFN-}\gamma$ (1000 IU/ml), welches basolateral dazu pipettiert wurde. Das Zytokin $\text{IFN-}\gamma$ erhöht hierbei die Sensitivität des Gewebes gegenüber $\text{TNF-}\alpha$ durch eine Induktion der Expression von $\text{TNF-}\alpha$ -Rezeptoren [177]. Die Gewebepreparate wurden danach für 14 Stunden je nach Versuchsanordnung mit Dexamethason ($1 \mu\text{M}$), $\text{TNF-}\alpha$ (10.000 IU/ml), Endiandrin A ($20 \mu\text{M}$) oder Endiandra-Extrakt

inkubiert. Das Zytokin TNF- α wurde ausschließlich basolateral, alle weiteren Stimulanzen beidseitig zugegeben. Hierbei ist zu erwähnen, dass in der Zellkultur eine geringere Konzentration an TNF- α (500 IU/ml) benutzt worden ist. Durch die 200-fache Erhöhung der TNF- α -Konzentration sollte der Effekt auf den ENaC-vermittelten Na⁺-Transport innerhalb der Versuchsdauer induziert werden, da das native Rattengewebe nur eine begrenzte Lebensdauer von ca. 14 Stunden besitzt. Die Stimulation wurde durch die apikale Zugabe von Amilorid (10⁻⁴ M) beendet; dabei wurde anschließend die Messung aber noch 10 Minuten fortgeführt. Messdaten, wie der Kurzschlussstrom, die Spannungs- bzw. Widerstandsparameter, wurden in den ersten 2 Stunden alle 10 Sekunden, dann bei der Inkubation alle 600 Sekunden und nach 14 Stunden wieder alle 10 Sekunden aufgezeichnet. Abschließend wurden die Rattengewebe aus den Kammern ausgebaut und für weitere Methoden, wie RNA-Isolation, zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrem Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.2.7 Statistische Analysen

Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt; dabei jedes Mal in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Angabe des mittleren Standardfehlers (s.e.m.) dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde ein ungepaarter, zweiseitiger Student's T-Test mit ungleicher Varianz herangezogen. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde zusätzlich die Bonferroni-Holm-Korrektur angewendet. Unterschiede wurden als statistisch signifikant erachtet, wenn $P < 0.05$ betrug.

3 Ergebnisse

3.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und ihre Wirkung auf den Glucocorticoidrezeptor

Glucocorticoide (GC) besitzen aufgrund ihrer anti-entzündlichen, immunsuppressiven und pro-absorptiven Wirkung einen hohen Stellenwert in der medikamentösen Therapie von chronischen entzündlichen Erkrankungen. Im Folgenden werden Ergebnisse zu Untersuchungen von charakterisierten pflanzlichen Glucocorticoidrezeptor (GR)-Liganden dargestellt. Unter Verwendung der humanen Kolonzelllinie HT-29/B6-GR (2.1.2.1.) und distaler Kolonpräparaten von Ratten wurden die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe Endiandrin A (End A), Ginsenosid Rg₁ (GinRg1) und Saikosaponin D (Ssd) auf ihre GR-Wirkung hin und im Speziellen ihr jeweiliger Effekt auf den GC-abhängigen ENaC-vermittelten Na⁺-Transport im Kolon analysiert. Die benutzte HT-29/B6-GR Zelllinie erwies sich in der Hinsicht als optimal für die Analyse, da sie stabil mit dem GR transfiziert werden konnte und sich somit hervorragend für die Untersuchung von möglichen GR-Liganden eignete [166].

3.1.1 Endiandrin A

Untersuchung der Regulation des ENaC-vermittelten Na⁺-Transportes durch Endiandrin A

Bei dem Naturstoff Endiandrin A handelt es sich um ein Cyclobutan-Lignan, das aus der australischen Pflanze *E. anthropophagorum* DOMIN isoliert worden ist. In einem löslichen GR-Bindungsassay zeigte Endiandrin A eine deutliche GR-Bindungsaffinität auf [30]. Inwieweit diese auch in einem in vitro bzw. in vivo System vorliegt, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Endiandrin A verfügt über eine chemische Struktur, die zunächst keine GR-bindende Eigenschaft vermutet lässt. Eine anzunehmende GR-Wirkung von Endiandrin A wurde an der humanen Kolonzelllinie HT-29/B6-GR (2.1.2.1.) analysiert. Dabei ist zunächst charakterisiert worden, ob der Naturstoff zytotoxisch auf Zellen wirkt. Fortführend wurde untersucht, ob Endiandrin A fähig ist den GR zu aktivieren und infolge dessen die GC-induzierbare elektrogener Na⁺-Resorption beeinflussen kann. Zudem ist ermittelt worden, in welchem Maß Endiandrin A den bereits beschriebenen Synergismus von dem GC Dexamethason und dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- α , den ENaC-vermittelten Na⁺-Transport zu stimulieren, moduliert [165]. Für die Darstellung des Einflusses von Endiandrin A auf die GC-induzierbare

elektrogene Na^+ -Resorption unter entzündlichen Bedingungen wurden distale Kolonabschnitte der Ratte, sowie für zugrunde liegende Signalwege die HT-29/B6-GR-Zellen, verwendet.

3.1.1.1 Bestimmung der Zytotoxizität von Endiandrin A in humanen Kolonzellen

Zytotoxizität beschreibt die Fähigkeit von Substanzen, Zellen in einem gewissen Maß zu schädigen. Da Endiandrin A ein erst kürzlich beschriebener Naturstoff und noch wenig über ein mögliches zytotoxisches Potential bekannt ist, wurde dessen Zytotoxizität bestimmt. Vor allem bei kaum charakterisierten Substanzen wird mit Hilfe von Zytotoxizitätstest ausgeschlossen, dass die aufgedeckten Effekte durch eine Induzierung von apoptotischen Signalwegen verursacht werden. Für die Bestimmung der Zytotoxizität von Endiandrin A ist der Kristallviolett-Assay, ein kolorimetrisches Verfahren, verwendet worden. Der Kristallviolett-Assay gibt die nach einer Behandlung mit der getesteten Substanz überlebende Zellmasse an und wurde erstmalig von Gillies et al. beschrieben [171]. Die Zytotoxizität verschiedener Konzentrationen von Endiandrin A (1, 10, 20, 50 und 100 μM), sowie die der Lösungsmittelkontrolle (0.2% DMSO) und der Positivkontrolle (5% DMSO) wurden, über einen Stimulationszeitraum von 24 Stunden, an HT-29/B6-GR-Zellen ermittelt.

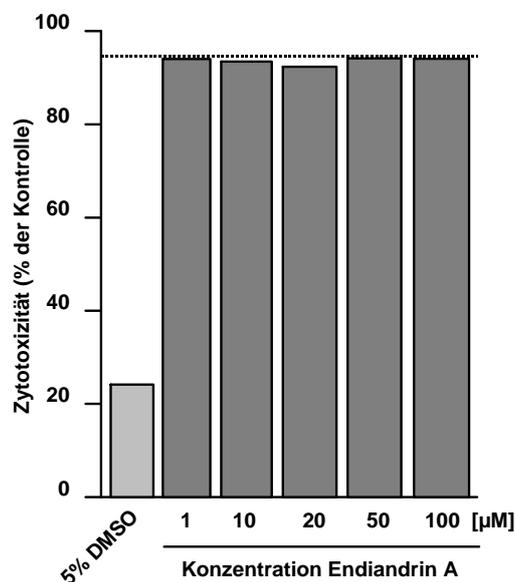


Abb. 3.1: Zytotoxizität von Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen

Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 4×10^4 Zellen/Well in einer 96-Well-Mikrotiterplatte in hormonfreiem(hf) Medium ausgesät. Die Zellen wurden am folgenden Tag mit verschiedenen Konzentrationen an Endiandrin A (1, 10, 20, 50, 100 μM), sowie einer Positivkontrolle 5% DMSO stimuliert. Die Ergebnisse sind als $\text{MW} \pm \text{s.e.m.}$ in % zur unbehandelten Kontrolle (100% gesetzt) angegeben, $n=9$, s.e.m. war jeweils kleiner als 5%.

Abb. 3.1 zeigt, dass Endiandrin A kein zytotoxisches Potential gegenüber der Zelllinie HT-29/B6-GR besitzt. So nimmt in keiner Konzentration des Endiandrin A die Zellmasse mehr als 8% ab. Bei der Lösungsmittelkontrolle (0.2% DMSO) ist eine überlebende Zellmasse von 95% ermittelt worden (Daten nicht aufgeführt). Nach 24-stündiger Behandlung mit Endiandrin A lebten noch 94% (1 μM), 93% (5 μM), 92% (20 μM), 94% (50 μM) und 94% (100 μM) der Zellen. Dagegen war bei 5% DMSO eine starke Zytotoxizität (24% überlebende Zellmasse) zu beobachten.

Somit konnte festgestellt werden, dass das Cyclobutan-Lignan Endiandrin A in Konzentrationen zwischen 1 – 100 μM nicht zytotoxisch auf die verwendeten HT-29/B6-GR-Zellen wirkt und demnach sich bis hierher keine weiteren Hindernisse für die Analyse eines GR-modulierenden Effektes ergeben haben.

3.1.1.2 Charakterisierung von Glucocorticoidrezeptor-Transaktivierung durch Endiandrin A in humanen Kolonzellen

Durch eine Bindung an den GR allein, ist formal noch keine steroidale Wirkung nachgewiesen. Unzweifelhaft zeigte Endiandrin A eine Bindungsaffinität zum GR auf, jedoch ob Endiandrin A in der Lage ist, den GR auch zu aktivieren, sollte in den nachfolgenden Experimenten untersucht werden.

In seinem inaktiven Zustand ist der GR gebunden an Chaperone (den Hitzeschockproteinen) und liegt im Zytosol vor. Durch Ligandenbindung dissoziieren die Chaperone ab und der Rezeptor-Liganden-Komplex kann in den Zellkern translozieren. Dort bindet der Komplex als Transkriptionsfaktor an spezifische DNA-Sequenzen im Genom, den Glucocorticoid responsive elements (GRE), wodurch die Expression GR-sensitiver Zielgene eingeleitet wird. Um den Einfluss von Endiandrin A auf eine GR-Transaktivierung zu untersuchen, wurden die HT-29/B6-GR-Zellen transient mit einem pGRE-Luc Reporterplasmid transfiziert. In diesem Fall steht die Expression des Enzyms Luciferase unter der Kontrolle einer GRE-Promotorsequenz. Um die Transfektionseffizienz normalisieren zu können, wurde gleichzeitig ein Ko-Reporterplasmid (Renilla-Luciferase) benutzt. Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Endiandrin A (1, 10, 20 und 100 μM) bzw. darüber hinaus mit dem GC Dexamethason (1 μM) als Positivkontrolle inkubiert.

Entgegen der Erwartung zeigte sich, dass Endiandrin A in den aufgeführten Konzentrationen keine Aktivierung der GRE-Promotorsequenz auslösen kann. Sowohl in den niedrigen Konzentrationen (1 μM), als auch der sehr hohen angesetzten Konzentration von 100 μM , kam

es zu keiner signifikanten, ermittelbaren Steigerung der GRE-abhängigen Luciferase-Expression. Im Gegenteil, es war sogar unter Inkubation mit 100 μM Endiandrin A eine generelle Reduktion der Luciferaseaktivität, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, zu verzeichnen. Daher wurde eine Konzentration von 20 μM Endiandrin A für alle weiteren Experimente benutzt. Unter Behandlung mit Dexamethason fand dagegen eine starke Induktion der Luciferase Expression ($1869 \pm 122\%$) statt. Demzufolge kann man aufgrund dieser Ergebnisse davon ausgehen, dass Endiandrin A nicht fähig ist, eine GR-Transaktivierung in HT-29/B6-GR-Zellen zu bewirken.

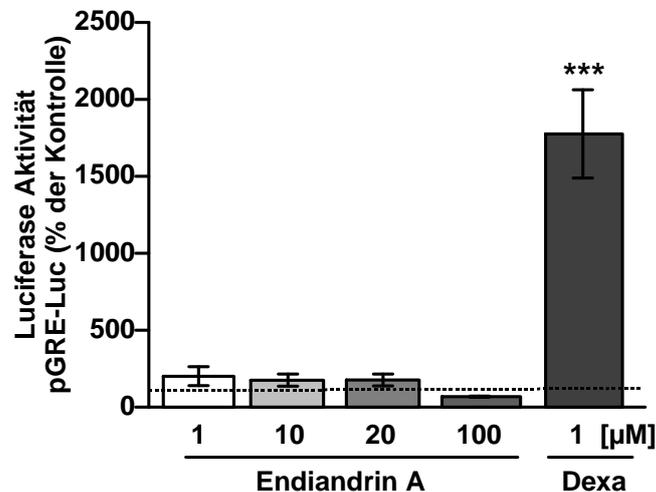


Abb. 3.2 : Der Effekt von Endiandrin A auf die GR-Transaktivierung in HT-29/B6-GR-Zellen

HT-29/B6-GR-Zellen wurden mit dem pGRE-Luc transfiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Endiandrin A (1, 10, 20, 100 μM) sowie der Positivkontrolle Dexamethason (Dexa) 1 μM für 24 Stunden inkubiert. Ergebnisse wurden auf die Kontrolle normalisiert und sind als relative Luciferase-Aktivität dargestellt. Angegeben sind MW \pm s.e.m., n=4-6, ***P<0.001 zur unbehandelten Kontrolle.

3.1.1.3 Der Effekt von Endiandrin A auf den ENaC-vermittelten Na^+ -Transport in humanen Kolonzellen

Der elektrogene Na^+ -Transport wird im Kolon durch den epithelialen Natriumkanal (ENaC) geregelt. Nach erfolgreicher stabiler Transfektion mit dem GR, konnte die GC-induzierbare ENaC-vermittelte Na^+ -Resorption ebenso an der HT-29/B6-GR-Zelllinie charakterisiert werden. Nun konnte im Abschnitt 3.1.1.2. bereits dargelegt werden, dass Endiandrin A zwar keine GR-Transaktivierung induzieren kann, jedoch sollte im Folgenden geklärt werden, inwieweit Endiandrin A ein physiologisches GR-abhängiges System beeinflussen kann.

Dazu ist untersucht worden, ob Endiandrin A eine Steigerung des ENaC-vermittelten Na^+ -Transportes bewirken kann. Dafür wurden HT-29/B6-GR-Zellen in Filtern ausgesät, so dass sie nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen konfluente Monolayer ausbildeten, an denen der Effekt von Endiandrin A ermittelt werden konnte. Nachdem die Zellen für weitere 24 Stunden unter hormonfreien Bedingungen (Kulturmedium mit Aktivkohle-behandeltem fetalem Kälberserum (FKS)) gehalten worden sind, wurden sie für 24 Stunden bzw. 48 Stunden mit 20 μM Endiandrin A inkubiert. Zur Analyse der ENaC-vermittelten Na^+ -Resorption wurden die Filter in die Ussing-Kammern eingespannt und der ENaC-vermittelte Na^+ -Transport anhand der Differenz des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms (ΔI_{sc}) vor und nach Zugabe des ENaC-Blockers Amilorid (10^{-4} M) festgestellt.

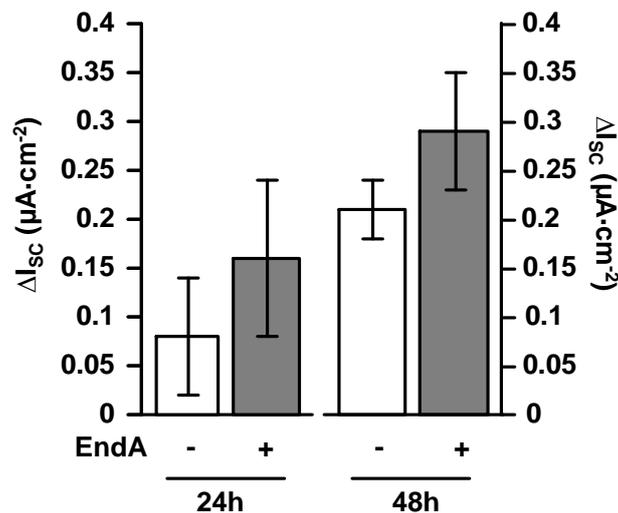


Abb. 3.3: Die ENaC-abhängige Na^+ -Resorption unter dem Einfluss von Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Endiandrin A (20 μM) für 24 oder 48 Stunden inkubiert. Der ENaC-vermittelte Na^+ -Transport wurde mittels Zugabe von Amilorid (10^{-4} M) bestimmt. Ergebnisse sind als MW \pm s.e.m. angegeben, n=6-12.

Die Ussing-Versuche offenbarten, dass Endiandrin A nach 24 ($0.16 \pm 0.08 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) bzw. 48 Stunden ($0.29 \pm 0.09 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) keine Steigerung des ΔI_{sc} induzieren konnte. Es wurden lediglich Tendenzen festgestellt, die jedoch zu beiden Zeitpunkten keine statistische Signifikanz aufwiesen.

Nach den Ussing-Experimenten wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert um mittels Real-time PCR mögliche Veränderung auf mRNA ENaC-Level zu erfassen. Hierbei wurde nur die 24-stündige Behandlung mit Endiandrin A betrachtet. Bei der Auswertung zeigte sich keine

Veränderung der α -ENaC-Untereinheit unter Endiandrin A Inkubation. Interessanterweise wurde jedoch durch Endiandrin A die Expression der β -ENaC-Untereinheit stimuliert (2.7 ± 0.5 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle). Hingegen zeigte die Expression der γ -ENaC zwar eine Tendenz einer Steigerung, die allerdings keine Signifikanz erreichte. Demnach beeinflusst Endiandrin A nicht den ENaC-vermittelten Na^+ -Transport in HT-29/B6-GR-Zellen, kann jedoch in geringem, aber dennoch statistisch signifikantem Maß, das Expressionslevel der β -ENaC-Untereinheit induzieren.

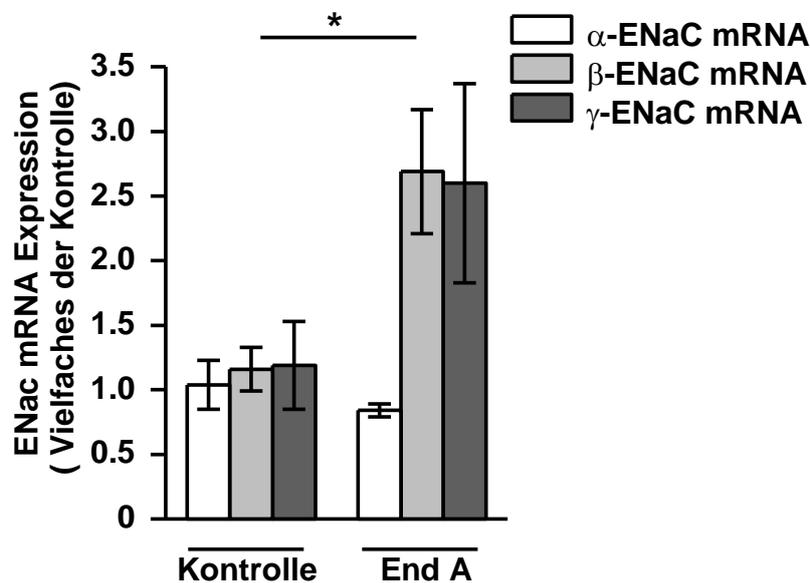


Abb. 3.4 : Die Expression der ENaC-Untereinheiten in Endiandrin A-behandelten HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden mit Endiandrin A (20 μM) behandelt. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels Real-time PCR unter Verwendung von spezifischen Primern für die α -, β - und γ -ENaC-Untereinheit analysiert. Die Expression der ENaC mRNA wurde als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle nach der Normalisierung mit GAPDH berechnet. Ergebnisse sind als $\text{MW} \pm \text{s.e.m.}$ angegeben, $n=4-6$, $**P<0.01$ zur unbehandelten Kontrolle.

3.1.1.4 Regulation des Glucocorticoid-induzierten ENaC durch Endiandrin A im distalen Rattengewebe unter entzündlichen Bedingungen

Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen leiden oftmals unter starken Diarrhöen, die häufig auf verschiedene Dysregulationen, u. a. Zytokin-induzierte Barriere- und Elektrolyttransportstörungen, zurückzuführen sind. Eine medikamentöse Therapie mit GC ruft neben anti-entzündlichen Wirkungen, ebenso pro-absorptive Effekte hervor [164].

Es konnte hier dargestellt werden, dass durch einen Synergismus zwischen dem GC Dexamethason und dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- α der Na⁺-Transport im Kolon wiederhergestellt und somit dem starken Na⁺- und Wasserverlust entgegengewirkt wird [165]. Endiandrin A offenbarte in den vorhergehenden Erläuterungen keine signifikante Wirkung auf den GR. Andererseits zeigte sich in Analysen der Gesamt-RNA, dass Endiandrin A fähig ist, die β -ENaC-Untereinheit in einem gewissen Maß zu regulieren. Inwieweit Endiandrin A den beschriebenen Synergismus zwischen Dexamethason und TNF- α mit seinem Wirkpotential beeinflussen kann, sollte nun an nativen Rattenkolonpräparaten untersucht werden. Dafür wurde total gestriptes, distales Kolongewebe in die Ussing-Kammern eingespannt und der Effekt von Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A auf die ENaC-vermittelte Na⁺-Resorption untersucht. Über ein Stimulationszeitraum von 14 Stunden wirkten Dexamethason (1 μ M, basolateral und apikal), TNF- α (10.000 IU/ml, basolateral) und Endiandrin A (20 μ M, basolateral und apikal) auf das Gewebe ein. Wurden die Kolonpräparate mit TNF- α , in alleiniger Zugabe oder in Kombination mit den anderen Stimulanzien, behandelt, erfolgte zunächst eine 1-stündigen Vorinkubation mit dem Zytokin IFN- γ (1000 IU/ml), um die Expression von TNF- α -Rezeptoren anzuregen [177]. Der Versuch wurde durch apikale Zugabe des ENaC-Blockers Amilorid (10^{-4} M) beendet und der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport anhand der Differenz des Kurzschlussstroms (ΔI_{SC}) vor und nach Zugabe von Amilorid bestimmt. Die Ergebnisse, dargestellt in Abb. 3.5 A, zeigen wie erwartet einen deutlichen Anstieg des Amilorid-sensitiven ΔI_{SC} nach der Inkubation mit dem GC Dexamethason ($16.6 \pm 0.8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport konnte ebenso erwartungsgemäß durch die zusätzliche Stimulation mit TNF- α intensiviert werden ($20.1 \pm 0.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Erstaunlicherweise erzeugte aber die Inkubation mit Endiandrin A eine weitere Steigerung des ΔI_{SC} ($22.7 \pm 1.0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Im unbehandelten Rattenkolon sowie unter alleiniger Behandlung mit TNF- α bzw. Endiandrin A konnte keine Induktion des Kurzschlussstroms verzeichnet werden. Überdies war keine Steigerung bei der Ko-Inkubation mit Dexamethason und Endiandrin A zu beobachten. Die Darstellung in Abb. 3.5 B zeigt einen beispielhaften Zeitverlauf des Kurzschlussstroms eines repräsentativen Experimentes in der Ko-Stimulation Dexamethason mit TNF- α und unter zusätzlicher Endiandrin A Behandlung.

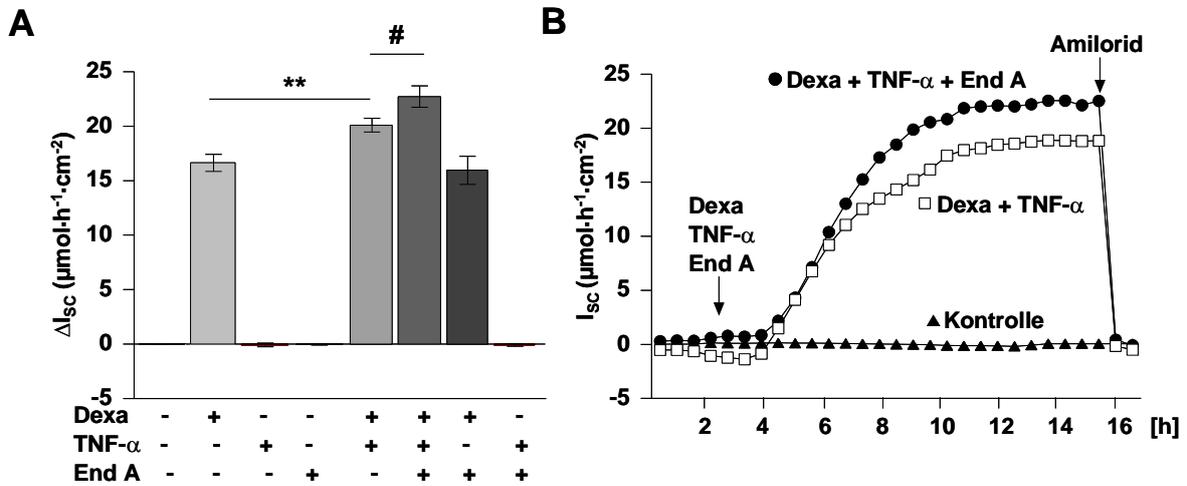


Abb. 3.5: Der GC-induzierte ENaC-vermittelte Na^+ -Transport unter dem Einfluss von TNF- α und Endiandrin A in murinen distalen Kolongeweben

(A) Distales Rattenkolongewebe wurde in die Ussing-Kammer eingespannt, für 1 Stunde vorinkubiert mit IFN- γ (1000 IU/ml) und anschließend für 14 Stunden mit Dexamethason (1 μM), TNF- α (10.000 IU/ml) und Endiandrin A (20 μM) behandelt. Der ENaC-vermittelte Na^+ -Transport wurde mittels Zugabe von Amilorid (10^{-4} M) bestimmt. Ergebnisse sind als MW \pm s.e.m. angegeben, n=4-18, **P<0.01 zur Dexamethason-Behandlung, #P<0.05 zur Behandlung von Dexamethason mit TNF- α .

(B) Exemplarischer Zeitverlauf des Kurzschlussstroms I_{sc} .

Um den synergistischen Effekt von Endiandrin A erklären zu können, wurden Veränderungen im Expressionsmuster der ENaC-Untereinheiten mittels Real-time PCR genauer untersucht. Hierfür sind nach Beendigung des Versuches die Rattenkolonpräparate aus den Kammern ausgebaut und für die Isolierung der Gesamt-RNA aufgearbeitet worden. Die Expression von der α -ENaC-Untereinheit zeigte keine signifikanten Veränderungen (Abb. 3.6 A). Hingegen wurde das mRNA Level der β -ENaC-Untereinheit von 118 ± 55 -fach nach Dexamethason auf 267 ± 25 -fach zusammen mit TNF- α , und abermals auf 427 ± 57 -fach nach zusätzlicher Endiandrin A-Behandlung gesteigert. Keine statistische Signifikanz war bei der Ko-Inkubation von Dexamethason und Endiandrin A (356 ± 107 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle) gegenüber Dexamethason alleine zu ermitteln.

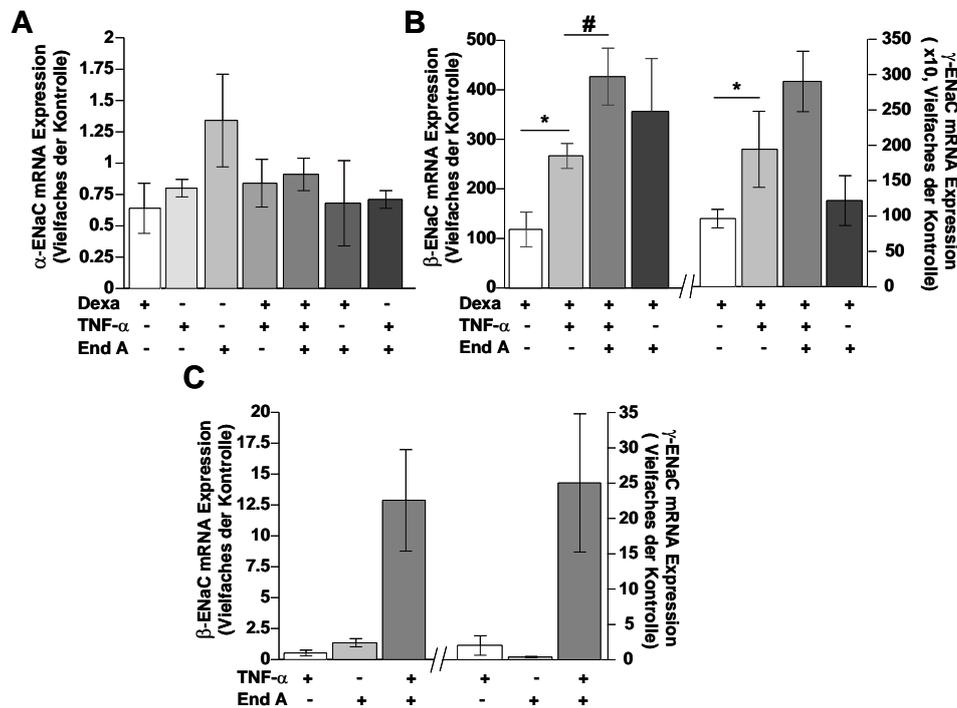


Abb. 3.6: Expression der ENaC-Untereinheiten im Endiandrin A-behandelten distalem Kolon der Ratte

Distales Rattengolngewebe wurde, wie bereits in Abb. 3. 5 beschrieben, stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde nach dem Experiment isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels Real-time PCR unter Verwendung von spezifischen Primern für die α -, β - und γ -ENaC-Untereinheit analysiert. Die Expression der ENaC mRNA wurde als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle nach der Normalisierung mit GAPDH berechnet.

(A) Die Expression der α -ENaC-Untereinheit, gezeigt MW \pm s.e.m. angegeben, n=3-7.

(B) Die Expression der β - und γ -ENaC-Untereinheit, MW \pm s.e.m. angegeben, n=3-6, *P<0.05 zur Dexamethason-Behandlung, #P<0.05 zur Behandlung von Dexamethason mit TNF- α .

(C) Die Expression der β - und γ -ENaC-Untereinheit, MW \pm s.e.m. angegeben, n=2-5.

Die Analyse des Expressionsniveaus der γ -ENaC-Untereinheit offenbarte unter Dexamethason eine 946 ± 131 -fache Steigerung gegenüber der unbehandelten Kontrolle, wobei die Steigerung mit TNF- α intensiviert werden konnte (1944 ± 538 -fach für Dexamethason kombiniert mit TNF- α gegenüber der unbehandelten Kontrolle). Bei zusätzlicher Endiandrin A Behandlung zeigte sich eine Tendenz zum Anstieg gegenüber Dexamethason kombiniert mit TNF- α , die jedoch nicht signifikant war (2903 ± 427 -fach für Dexamethason zusammen mit TNF- α und Endiandrin A gegenüber der unbehandelten Kontrolle) (Abb. 3.6 B). Abermals konnte in der Ko-Inkubation Dexamethason und Endiandrin A keine Steigerung festgestellt werden (1217 ± 352 -fach für Dexamethason zusammen mit Endiandrin A gegenüber der unbehandelten Kontrolle) (Abb. 3.6 B). Interessant bei der Auswertung war überdies, dass

die Ergebnisse der Real-time PCR eine Tendenz zu einem gesteigerten Expressionsniveau der β - und γ -ENaC-Untereinheit unter TNF- α kombiniert mit Endiandrin A-Behandlung aufwiesen. Beide Stimulanzen in alleiniger Gabe verstärkten die Expression nicht (Abb. 3.5 C). Da jedoch die Steigerung nicht signifikant war, wurde dies im Folgenden nicht weiter im Detail betrachtet.

Somit vermag Endiandrin A zwar alleine den GR nicht zu modulieren, andererseits stärkt es aber den Synergismus zwischen Dexamethason und TNF- α in einem Ausmaß, welcher letztendlich erst über eine signifikante Steigerung der β -ENaC-Untereinheit eine zusätzliche Induktion des elektrogenen Na⁺-Transports im distalen Rattenkolon bewirkt.

3.1.1.5 Regulation des Glucocorticoid-induzierten ENaC durch Endiandrin A unter entzündlichen Bedingungen in humanen Kolonepithelzellen

Um die festgestellte Intensivierung des Synergismus zwischen Dexamethason und TNF- α durch Endiandrin A genauer charakterisieren zu können, wurden für weitere, detaillierter Untersuchungen die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6-GR verwendet. Wie bereits beschrieben eignet sich dieses Zellmodell hervorragend, GR-abhängige Signalwege, wie den ENaC-vermittelten Na⁺-Transport im Kolon, ausführlich analysieren zu können. Für die Ermittlung des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms wurden HT-29/B6-GR-Zellen in Filtern ausgesät. Nach einer 7-tägigen Wachstumsphase und 24-stündigen Kultivierung unter hormonfreien Bedingungen (Kulturmedium mit Aktivkohle-behandeltem fetalem Kälberserum (FKS)), wurden die Zellen für 24 Stunden mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) behandelt. Zur Analyse der ENaC-vermittelten Na⁺-Resorption wurden die Filter in die Ussing-Kammern eingespannt und der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport wurde anhand der Differenz des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms (ΔI_{SC}) vor und nach Zugabe des ENaC-Blockers Amilorid (10⁻⁴ M) festgestellt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.7 dargestellt und zeigen, dass Endiandrin A auch in der Zelllinie HT-29/B6-GR den Synergismus zwischen Dexamethason und TNF- α stärkt und eine Steigerung des ΔI_{SC} induziert. Der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport wurde von $0.8 \pm 0.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ unter der Ko-Inkubation Dexamethason und TNF- α auf $1.7 \pm 0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ durch die zusätzliche Endiandrin A-Stimulation verstärkt. Die Behandlungen mit Dexamethason alleine erzeugten nach 24 Stunden eine geringe Induktion des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms ($0.25 \pm 0.03 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Weitere Kombinationen mit Dexamethason und Endiandrin A oder die Inkubation mit TNF- α und Endiandrin A erzeugten keine signifikanten Steigerungen des ΔI_{SC} .

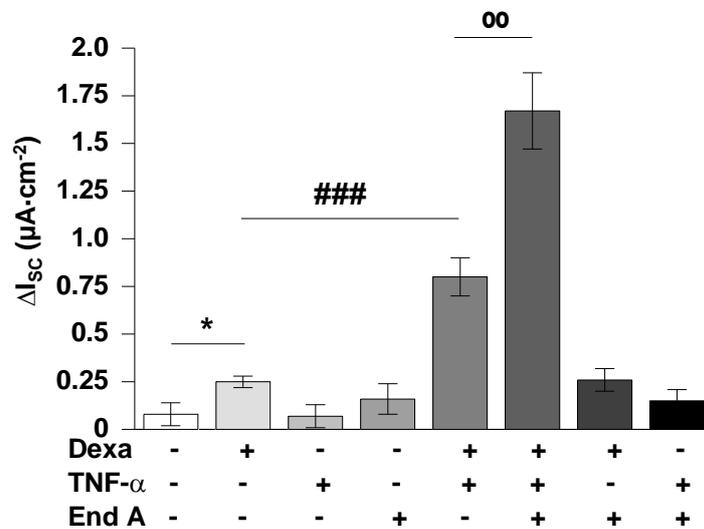


Abb. 3.7: Induktion des ENaC-vermittelten Na⁺-Transportes unter Dexamethason, TNF-α und Endiandrin A Behandlung in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Dexamethason (1 μM), TNF-α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μM) für 24 Stunden inkubiert. Der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport wurde mittels Zugabe von Amilorid (10⁻⁴ M) bestimmt. Ergebnisse sind als MW ± s.e.m. angegeben, n=6-15, *P<0.05 verglichen mit unbehandelter Kontrolle, ###P<0.001 verglichen mit Dexamethason-Inkubation, °°P<0.01 verglichen mit TNF-α-Stimulation.

Nach den Ussing-Experimenten wurde die Gesamt-RNA der Filter isoliert und mittels Real-time PCR auf Veränderungen des Expressionslevels der ENaC-Untereinheiten hin untersucht. Es wurden unter keiner alleinigen Zugabe oder Kombination der Stimulanzien Veränderungen in der α-ENaC-Untereinheit festgestellt (Abb. 3.8). Hingegen zeigte sich ein Anstieg in der β-Untereinheit von 85 ± 19-fach für Dexamethason zusammen mit TNF-α und auf 263 ± 38-fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach zusätzlicher Endiandrin A-Behandlung. Ebenso offenbarte die Analyse des Expressionsniveaus der γ-ENaC-Untereinheit eine Induktion unter Endiandrin A Stimulation von 487 ± 123-fach auf 1114 ± 233-fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die Stimulation mit Dexamethason löste sowohl eine signifikante Steigerung der β-Untereinheit (8 ± 0.4-fach), als auch der γ-ENaC-Untereinheit (72 ± 14-fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle) aus.

Ergebnisse

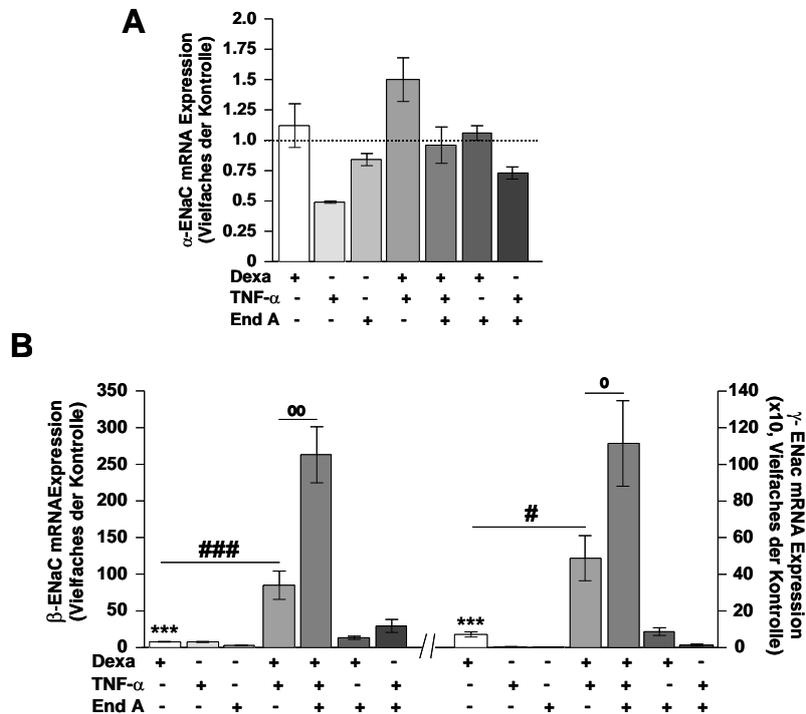


Abb. 3.8: Die Expression der ENaC-Untereinheiten unter dem Einfluss von Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen

Die HT-29/B6-GR-Zellen wurden, wie bereits in Abb. 3. 7 beschrieben, stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde nach dem Experiment isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels Real-time PCR unter Verwendung von spezifischen Primern für die α -, β - und γ -ENaC-Untereinheit analysiert. Die Expression der ENaC mRNA wurde als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle nach der Normalisierung mit GAPDH berechnet.

(A) Die Expression der α -ENaC-Untereinheit, MW \pm s.e.m. angegeben, n=2-4.

(B) Die Expression der β - und γ -ENaC-Untereinheit, MW \pm s.e.m. angegeben, n=4-13, ***P<0.01 zur unbehandelten Kontrolle, #P<0.05 und ###P<0.001 zur Behandlung von Dexamethason, °P<0.05 und °°P<0.01 zur Behandlung von Dexamethason mit TNF- α .

Verglichen mit den Real-time PCR-Ergebnissen der Rattenkolonpräparaten war abermals interessant, dass eine gewisse Tendenz zu einem erhöhten Expressionsniveau der β - und γ -ENaC-Untereinheit unter TNF- α kombiniert mit Endiandrin A-Behandlung aufzufinden war. Da sich abermals keine Signifikanz ergab, wurde auch dies nicht weiter betrachtet. Unter alleiniger Zugabe verstärkten beide Stimulanzen die Expression nicht.

Die Ergebnisse bestätigen, dass Endiandrin A den beschriebenen Synergismus von Dexamethason und TNF- α ebenfalls in einem Kolonzellkulturmodell intensivieren kann. Dies ging einher mit einer Heraufregulierung der Expression von β - und γ -ENaC-Untereinheit, was in der Folge einen Anstieg des GC-induzierten ENaC-vermittelten Na⁺-Transports unter entzündlichen Bedingungen bewirkte. Die Analyse der Involvierung von verschiedenen

Signalwegen, die die Induktion der ENaC-vermittelten Na^+ -Resorption durch Endiandrin A erklären, wird in den folgenden Abschnitten dargestellt.

3.1.1.6 Charakterisierung von Glucocorticoidrezeptor-Transaktivierung durch Endiandrin A unter hormonellen und entzündlichen Konditionen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Endiandrin A per se keine GR-Transaktivierung in HT-29/B6-GR-Zellen hervorruft (Abb. 3.2). Andererseits wurde unter Dexamethason- und $\text{TNF-}\alpha$ -Stimulation eine verstärkte Aktivierung von GR-sensitiven Promotorregionen, den sogenannten Glucocorticoid responsive elements (GRE), beobachtet [165]. Inwieweit Endiandrin A die Transaktivierung des GR unter hormonellen und entzündlichen Bedingungen intensivieren kann, sollte nun im Detail analysiert werden. Hierfür wurden HT-29/B6-GR-Zellen mit einem pGRE-Luc Reporterplasmid transfiziert (in 3.1.1.2 beschrieben). Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit Dexamethason ($1 \mu\text{M}$), $\text{TNF-}\alpha$ (500 IU/ml) und Endiandrin A ($20 \mu\text{M}$) inkubiert. Die Ergebnisse des Reporter-Assays demonstrieren einen erwarteten Anstieg in der Luciferase-Expression unter $\text{TNF-}\alpha$ -Stimulation zusätzlich zu einer Dexamethason-Behandlung ($136 \pm 10\%$ gegenüber Dexamethason 100% gesetzt). Überraschenderweise konnte die Induktion der Luciferase durch Endiandrin A nochmals verstärkt werden ($178 \pm 9\%$ gegenüber Dexamethason 100% gesetzt). Ebenfalls wurde in der Kombination Dexamethason und Endiandrin A ein erhöhte Luciferase-Aktivität festgestellt ($115 \pm 5\%$ gegenüber Dexamethason 100% gesetzt). Andere Behandlungen mit $\text{TNF-}\alpha$ und/oder Endiandrin A zeigten keine verstärkte Luciferase-Expression und wurden in der Darstellung vernachlässigt (Abb. 3. 9 A). Demnach kann Endiandrin A alleine keine GR-Transaktivierung bewirken, jedoch vermag es offenbar eine GC-ausgelöste GR-Transaktivierung zu verstärken.

Um diese These zu bekräftigen, wurde ein weiterer Reporter-Gen-Assay verwendet. Mittels des eingesetzten pMMTV-Luc-Plasmids, können Hormon Responsive Elements (HRE)-kontrollierte Transaktivierungen untersucht werden. Dabei stellen die HREs Bindungsstellen für viele nukleäre Hormonrezeptoren dar, wie u. a. den Glucocorticoidrezeptor (GR) und den Mineralocorticoidrezeptor (MR). Werden die Promotorregionen der HRE durch Bindung eines Liganden im Plasmid aktiviert, kommt es, genauso wie im pGRE-Luc-Assay, zur verstärkten Expression der Luciferase. Die HT-29/B6-GR-Zellen wurden mit dem pMMTV-Luc Reporter- und Ko-Reporterplasmid (Renilla-Luciferase) transfiziert und anschließend für 24 Stunden mit Dexamethason ($1 \mu\text{M}$) und/oder Endiandrin A ($20 \mu\text{M}$) stimuliert. Auch hier zeigen die

Analysen, dass Endiandrin A eine GC-induzierte Transaktivierung intensivieren kann. Eine Endiandrin A-Behandlung bewirkte eine Luciferase-Expression von $162 \pm 21\%$ gegenüber Dexamethason (auf 100% gesetzt, Abb. 3.9 B).

Anhand der Ergebnisse ist anzunehmen, dass Endiandrin A den Synergismus von Dexamethason und $\text{TNF-}\alpha$ unterstützt, indem es eine erhöhte Aktivität der GR-sensitiven Promotorregionen und dadurch die gesteigerte Expression der β - bzw. γ -ENaC-Untereinheiten bedingt.

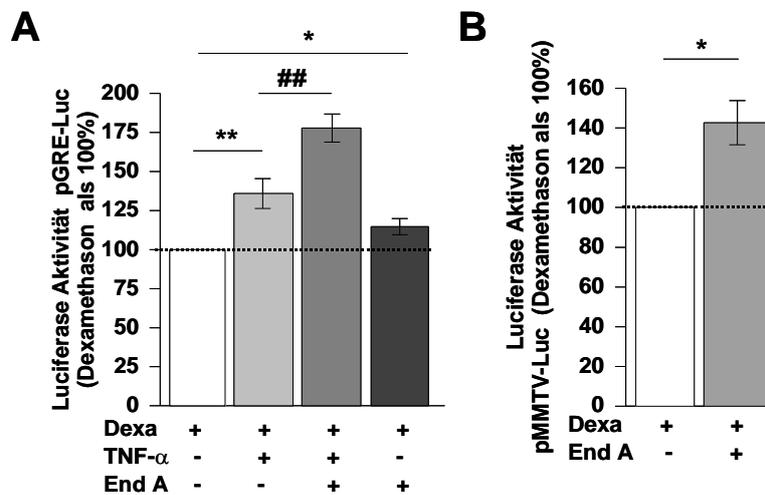


Abb. 3.9: Reporteragen-Analysen in HT-29/B6-GR-Zellen

Der Effekt von Endiandrin A auf die Transaktivierung von Hormonrezeptoren in HT-29/B6-GR-Zellen.

HT-29/B6-GR-Zellen wurden mit dem pGRE-Luc (A) oder pMMTV-Luc (B) transfiziert.

Ergebnisse wurden zur Dexamethason-Stimulation normalisiert und sind als relative Luciferase-Aktivität gezeigt. (A) Die Zellen wurden mit Dexamethason (1 μM), $\text{TNF-}\alpha$ (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μM) für 24 Stunden inkubiert. Angegeben sind $\text{MW} \pm \text{s.e.m.}$, $n=6-14$, $*P<0.05$; $**P<0.01$ zur Behandlung mit Dexamethason, $###P<0.01$ verglichen mit Dexamethason zusammen mit $\text{TNF-}\alpha$ -Stimulation.

(B) Die Zellen wurden mit Dexamethason (1 μM) und Endiandrin A (20 μM) für 24 Stunden inkubiert. Angegeben sind $\text{MW} \pm \text{s.e.m.}$, $n=6$, $*P<0.05$ zur Behandlung mit Dexamethason.

3.1.1.7 Regulation von Glucocorticoidrezeptor-Proteinexpression und mRNA-Level durch Endiandrin A

Die durch Endiandrin A-induzierte Aktivitätserhöhung der GC-sensitiven Promotorsequenzen könnte zum einen auf verschiedene Veränderungen in der GR-Expression zurückzuführen sein, zum anderen würde ein erhöhtes Phosphorylierungspotential des GR und damit eine induzierte Translokation ebenso die GRE-abhängige Transaktivierung

erklären. Vorausgegangene Studien konnten bereits zeigen, dass TNF- α eine Steigerung der GR-Proteinexpression durch eine verlängerte GR mRNA-Halbwertszeit bedingt [165]. Es sollte nun in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, in welchem Maß Endiandrin A das Expressionslevel und Transaktivierungspotential des GR zusätzlich beeinflussen kann.

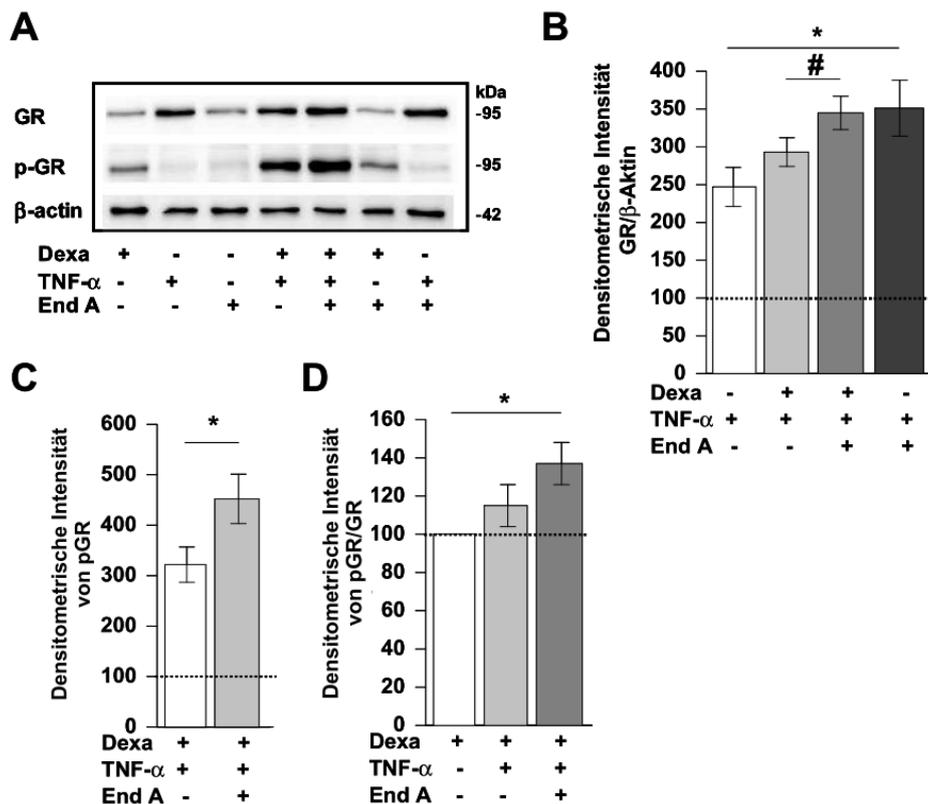


Abb. 3.10: Veränderungen des GR- und pGR-Proteinlevels unter dem Einfluss von Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 3 Stunden mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) behandelt. Nachfolgend wurde das Gesamtzelllysat präpariert.

(A) Western Blot-Analyse der GR- und pGR-Proteinexpression. Humanes β -Aktin diente als Ladekontrolle.

(B) Densitometrische Auswertung des GR-Gesamtlevels normiert auf Dexamethason. Ergebnisse gezeigt als MW \pm s.e.m., n=5, *P<0.05 zur Behandlung mit TNF- α , #P<0.05 verglichen mit Dexamethason zusammen mit TNF- α -Stimulation.

(C) Densitometrische Auswertung des pGR-Proteinlevels normiert auf Dexamethason. Ergebnisse gezeigt als MW \pm s.e.m., n=5, *P<0.05 zur Behandlung mit Dexamethason zusammen mit TNF- α -Stimulation.

(D) Densitometrische Auswertung des pGR-Proteinlevels normiert auf GR-Gesamtlevel. Ergebnisse gezeigt als MW \pm s.e.m., n=5, *P<0.05 zur Behandlung mit Dexamethason zusammen mit TNF- α -Stimulation.

Hierfür wurde nach 3-stündiger erfolgter Stimulation mit Dexamethason (1 μ M) und/oder TNF- α (500 IU/ml) und/oder Endiandrin A (20 μ M) das Gesamtzelllysat der HT-29/B6-GR-Zellen hergestellt. Anschließend wurden Veränderungen in der GR-Gesamtproteinexpression und im GR-Phosphorylierungsstatus analysiert.

Die Western Blot-Analyse zeigte den erwarteten Anstieg des GR-Gesamtproteinlevels bei der Stimulation mit TNF- α ($247 \pm 26\%$ gegenüber Dexamethason). Bemerkenswerterweise konnte die GR-Proteinexpression zusätzlich unter Endiandrin A-Behandlung gesteigert werden ($351 \pm 37\%$ gegenüber Dexamethason). Ebenfalls war eine erhöhte GR-Proteinexpression feststellbar, wenn die Zellen mit Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A inkubiert wurden ($345 \pm 22\%$ gegenüber Dexamethason), währenddessen die Behandlung TNF- α mit Dexamethason allein keine Veränderung des GR-Levels verglichen mit TNF- α hervorriefen (Abb. 3.10 B). Darüber hinaus wurden keine Änderung bei der Stimulation mit Endiandrin A allein oder kombiniert mit Dexamethason ermittelt (Abb. 3.10 A).

Die Arbeitsgruppe von Wang et al. offenbarte, dass die Phosphorylierung am Ser-211 des humanen GR mit der GR-Transaktivierung korreliert [13]. Folgende Untersuchungen waren nun darauf ausgerichtet, den Phosphorylierungsgrad des Ser-211-GR zu bestimmen, da zum einen eine erhöhte Aktivität der GRE-Promotorregion und zum anderen eine Steigerung des GR-Gesamtproteinlevels unter Endiandrin A Inkubation ermittelt worden ist. Die Abbildung 3. 10 A demonstriert eine erwartete Induktion der Ser-211-GR-Phosphorylierung durch Stimulation mit Dexamethason. Interessanterweise konnte eine Intensivierung des p-GR-Levels festgestellt werden, wenn die Zellen mit Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A behandelt wurden ($452 \pm 49\%$ gegenüber Dexamethason) verglichen mit der Ko-Inkubation Dexamethason und TNF- α ($322 \pm 35\%$ gegenüber Dexamethason, Abb. 3.10 C). Es kam zu keiner statistisch signifikanten Veränderung des GR-Phosphorylierungslevels unter Endiandrin A allein oder kombiniert mit Dexamethason Behandlung (densitometrische Daten nicht aufgeführt).

In den bereits publizierten Daten zu den Untersuchungen des Synergismus zwischen Dexamethason und TNF- α , ließen sich keine Veränderung des Verhältnisses phosphorylierter GR und GR-Gesamtlevel nachweisen. Dies führte zu dem Ergebnis, dass TNF- α zwar die Gesamt-GR-Proteinexpression beeinflussen kann, es aber dadurch nicht zwangsläufig zu der vermuteten Induktion des Transaktivierungspotentials kommt [165]. Die Untersuchung des Western Blots in dieser Arbeit demonstrierte dies ebenso. Doch andererseits zeigten

vorliegende densitometrische Analysen eine Induktion des Verhältnisses auf, wenn zusätzlich Endiandrin A im Stimulationsmedium vorhanden war ($137 \pm 11\%$ gegenüber Dexamethason). Andere Kombinationen von Stimulanzen wurden nicht signifikant getestet (Abb. 3.10 D).

Die Expression der GR mRNA kann durch TNF- α verstärkt werden, wodurch demgemäß der GR-Gesamtproteingehalt steigt [165]. Ob Endiandrin A ebenso eine Erhöhung im GR mRNA-Level bewirkt, bzw. die Wirkung von TNF- α in der Hinsicht unterstützen kann, sollte folgend aufgeklärt werden. Dafür wurde die RNA von 3-stündig stimulierten HT-29/B6-GR-Zellen mit Dexamethason ($1 \mu\text{M}$) und/oder TNF- α (500 IU/ml) und/oder Endiandrin A ($20 \mu\text{M}$) isoliert und die GR mRNA-Expression mittels Real-time PCR untersucht.

Die Analyse des GR-Expressionsniveaus offenbarte eine erwartete Steigerung unter TNF- α (2.8 ± 0.2 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle), wobei die Induktion nicht mit Dexamethason intensiviert werden konnte (2.8 ± 0.2 -fach für Dexamethason kombiniert mit TNF- α gegenüber der unbehandelten Kontrolle). Allerdings konnte eine zusätzliche Inkubation mit Endiandrin A den durch TNF- α -induzierten Anstieg in der GR mRNA-Expression nochmals, zwar in geringem, aber signifikant getestetem Maß, verstärken (3.5 ± 0.1 -fach für Dexamethason kombiniert mit TNF- α und Endiandrin A, 3.6 ± 0.3 -fach für TNF- α und Endiandrin A gegenüber der unbehandelten Kontrolle, Abb. 3.11). Die Inkubation mit Endiandrin A allein oder kombiniert mit Dexamethason zeigte keine signifikanten Veränderungen auf (Daten nicht mit aufgeführt).

Somit zeigen die Ergebnisse auf, dass Endiandrin A die Dexamethason-induzierte Aktivierung des GR unter entzündlichen Bedingungen potenziert. Es konnte in dem Zusammenhang ein Synergismus mit TNF- α charakterisiert werden, welcher zum einen einen Anstieg des GR mRNA-Levels und zum anderen eine Erhöhung der GR-Proteinexpression begründet.

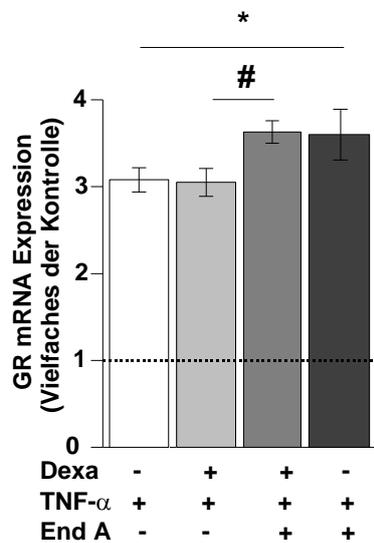


Abb. 3.11: Die Expression des GR unter dem Einfluss von Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 3 Stunden mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) behandelt. Die Gesamt-RNA wurde nach dem Experiment isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels Real-time PCR unter Verwendung von dem spezifischen Primer für den GR analysiert. Die Expression der GR mRNA wurde als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle nach der Normalisierung mit GAPDH berechnet. Ergebnisse sind als MW \pm s.e.m. angegeben, n=7-8, *P<0.05 verglichen mit TNF- α -Stimulation, #P<0.05 verglichen mit Dexamethason- und TNF- α -Behandlung.

3.1.1.8 Rolle der JNK MAP-Kinase und zelluläre Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors

Der c-Jun N-terminale Kinase- (JNK) Signalweg gehört zu einem von drei charakterisierten mitogen-activated protein Kinase (MAPK)-Signaltransduktionswegen, welche hauptsächlich essentiell regulatorische Funktionen in der Zelle besitzen. Bezüglich der vorliegenden Arbeit kann die JNK-MAPK nicht direkt mit der Regulation des intestinalen ENaC in Zusammenhang gebracht werden, jedoch beschreiben einige Studien einen störenden Einfluss der JNK auf die GR-Transaktivierung [178, 179]. Ob Endiandrin A möglicherweise einen Einfluss auf den JNK-Signalweg besitzt, wurde nachfolgend analysiert. Die HT-29/B6-GR-Zellen wurden zunächst in Filtern ausgesät. Nach einer 7-tägigen Wachstumsphase und 24-stündigen Kultivierung unter hormonfreien Bedingungen (Kulturmedium mit Aktivkohle-behandeltem FKS), wurden die Zellen für 1 Stunden mit dem JNK-Inhibitor SP600125 vorinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) behandelt. Zur Analyse der ENaC-vermittelten Na⁺-Resorption wurden die Filter in

die Ussing-Kammern eingespannt und der ENaC-vermittelte Na^+ -Transport anhand der Differenz des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms (ΔI_{SC}) vor und nach Zugabe des ENaC-Blockers Amilorid (10^{-4} M) ermittelt.

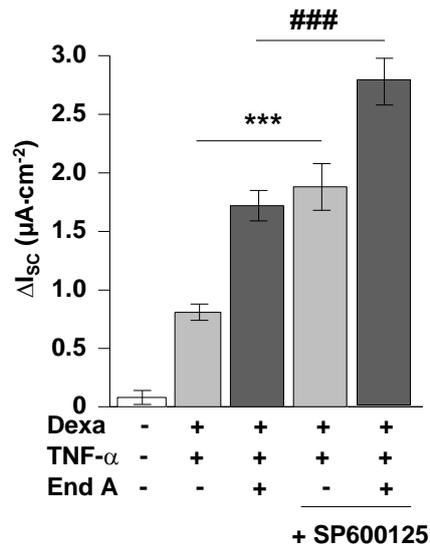


Abb. 3.12: Die Induktion des ENaC-vermittelten Na^+ -Transportes unter Inhibition der JNK-MAPK und dem Einfluss von Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen zunächst 1 Stunde mit SP600125 (10 μM) vorinkubiert und anschließend mit Dexamethason (1 μM), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μM) für 24 Stunden behandelt. Der ENaC-vermittelte Na^+ -Transport wurde mittels Zugabe von Amilorid (10^{-4} M) bestimmt. Ergebnisse sind als MW \pm s.e.m. angegeben, n=10, ***P<0.001 verglichen mit Dexamethason und TNF- α -Stimulation, ###P<0.001 verglichen mit Dexamethason-, TNF- α - und Endiandrin A-Behandlung.

Die Abbildung 3. 12 zeigt, dass die Inhibition der JNK eine Erhöhung des ΔI_{SC} induziert, sowohl unter der Ko-Inkubation mit Dexamethason und TNF- α , als auch unter einer zusätzlichen Gabe von Endiandrin A. Der ENaC-vermittelte Na^+ -Transport wird von $0.8 \pm 0.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ unter der Ko-Inkubation Dexamethason und TNF- α auf $1.9 \pm 0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ verstärkt. Ebenso war eine Intensivierung des Kurzschlussstromes von $1.7 \pm 0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $2.8 \pm 0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ feststellbar, wenn die Zellen gleichzeitig mit Endiandrin A stimuliert worden sind (Abb. 3.12). Weitere Kombinationen mit dem JNK-Inhibitor, Dexamethason und/oder TNF- α und/oder Endiandrin A wurden in der Untersuchung vernachlässigt.

Die JNK kann durch verschiedene zelluläre Stressestimuli, wie beispielsweise auch TNF- α , aktiviert werden [180]. In dem Zusammenhang sollte nun untersucht werden, inwieweit

Endiandrin A die Aktivierung der JNK modulieren kann, da die Steigerung des ΔI_{SC} unter SP600125, Dexamethason und TNF- α auffallend stark dem ΔI_{SC} in der Behandlung Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A ähnelt (Abb. 3.12). Hierfür wurde nach unterschiedlichen Stimulationszeitpunkten mit TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) das Gesamtzelllysate der HT-29/B6-GR-Zellen hergestellt. Anschließend ist der JNK-Phosphorylierungsstatus mittels Western Blot und nachfolgender densitometrischer Auswertung analysiert worden. Die Western Blot-Analysen zeigen unter Endiandrin A Behandlung eine gewisse Tendenz zur Phosphorylierung von JNK, welche jedoch nicht signifikant war und demnach vernachlässigt wurde (Abb. 3.13).

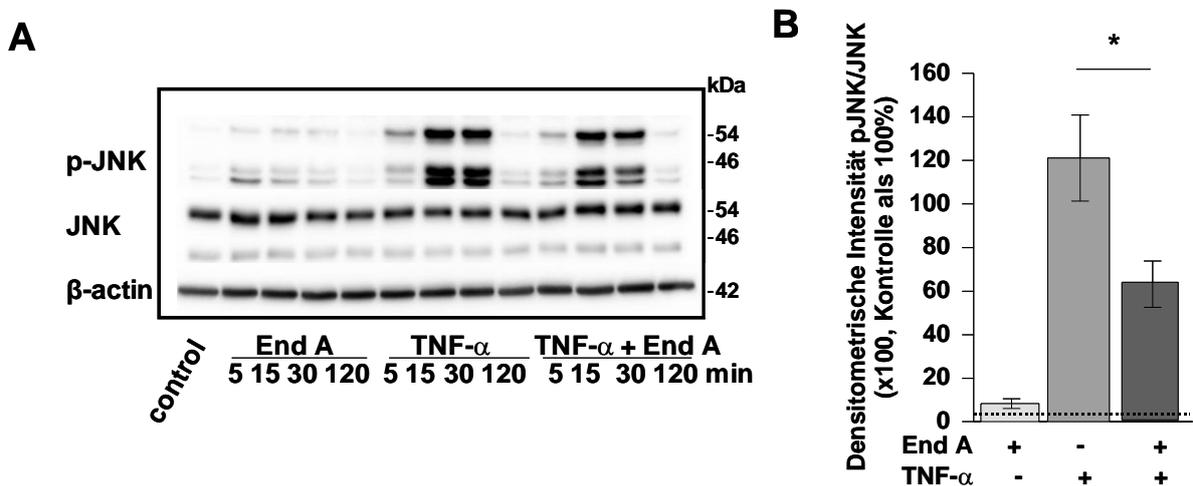


Abb. 3.13: Die Wirkung von Endiandrin A auf die TNF- α -induzierte Aktivierung des JNK-Signalweges in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) behandelt. Nachfolgend wurde das Gesamtzelllysate präpariert.

(A) Western Blot-Analyse der JNK- und pJNK-Proteinexpression. Humanes β -Aktin diente als Ladekontrolle.

(B) Densitometrische Auswertung des pJNK-Levels normiert auf die JNK-Gesamtexpression. Ergebnisse gezeigt als MW \pm s.e.m., n=5, *P<0.05 zur Behandlung mit TNF- α .

Andererseits konnte die densitometrische Analyse offenbaren, dass nach einer 15-minütigen Stimulation Endiandrin A die TNF- α -abhängige Aktivierung der JNK von $12113 \pm 1979\%$ auf $6320 \pm 1036\%$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle inhibieren kann (Abb. 3.13).

Des Weiteren war es interessant zu untersuchen, inwieweit die zusätzliche Inkubation mit Dexamethason die Aktivierung der JNK beeinflusst. Dafür wurden die Zellen neben TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) ebenso mit Dexamethason (1 μ M) behandelt.

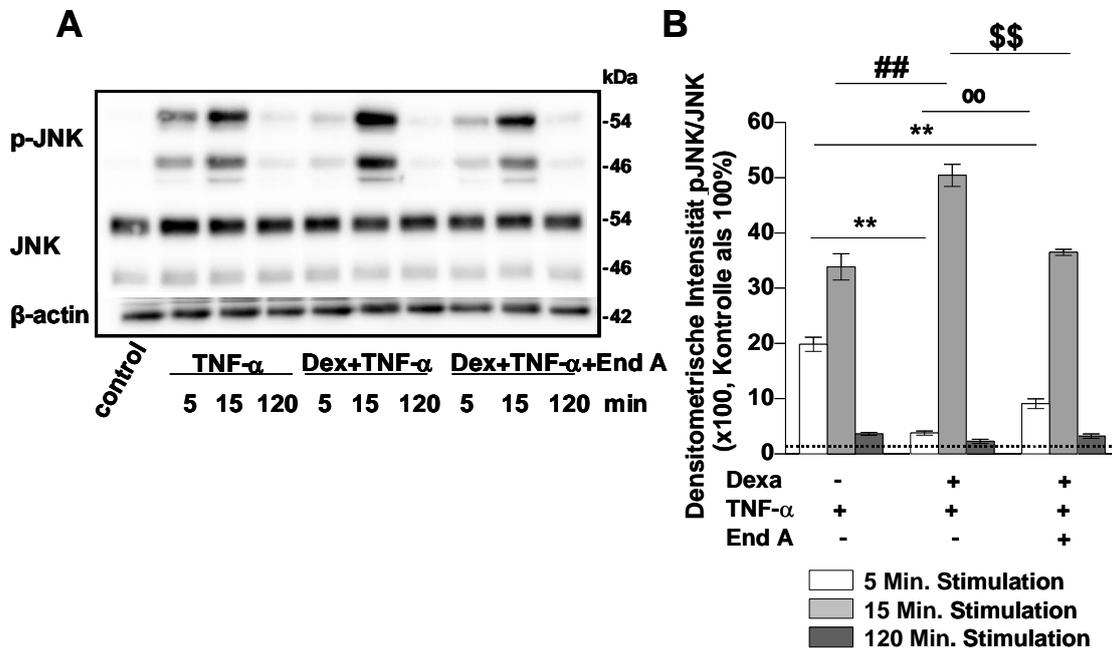


Abb. 3.14: Die Wirkung von Endiandrin A auf die TNF- α - und Dexamethason-induzierte Aktivierung des JNK-Signalweges in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) behandelt. Nachfolgend wurde das Gesamtzelllysat hergestellt.

(A) Western Blot-Analyse der JNK- und pJNK-Proteinexpression. Humanes β -Aktin diente als Ladekontrolle.

(B) Densitometrische Auswertung des pJNK-Levels normiert auf die JNK-Gesamtexpression. Ergebnisse gezeigt als MW \pm s.e.m., n=4, **P<0.01 zur 5-minütigen Behandlung mit TNF- α , ##P<0.01 zur 15-minütigen Inkubation mit TNF- α , °P<0.01 zur 5-minütigen Inkubation mit Dexamethason und TNF- α , \$\$P<0.01 zur 15-minütigen Behandlung mit Dexamethason und TNF- α .

Nach 5-minütiger Stimulation konnte die TNF- α -induzierte JNK-Aktivierung durch Dexamethason und ebenso durch zusätzlich verabreichtes Endiandrin A inhibiert werden. Dabei zeigten die densitometrischen Analysen auf, dass die Blockade des JNK-Signalweges unter Endiandrin A weniger intensiv ausfiel ($906 \pm 87\%$) als bei der Behandlung mit Dexamethason und TNF- α (von $1984 \pm 128\%$ für TNF- α auf $376 \pm 37\%$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle für Dexamethason gemeinsam mit TNF- α). Andererseits bewirkte die Inkubation mit Dexamethason und TNF- α nach 15 Minuten eine gesteigerte JNK-Phosphorylierung von $3384 \pm 239\%$ für TNF- α allein auf $5041 \pm 200\%$. Diese Intensivierung wurde durch eine gleichzeitige Inkubation mit Endiandrin A gehemmt ($3648 \pm 56\%$ gegenüber der

unbehandelten Kontrolle). Zudem zeigen die Daten auf, dass Endiandrin A keine signifikanten Veränderungen nach 120 Minuten bewirkte (Abb. 3.14 A und B).

Infolgedessen weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Endiandrin A die durch TNF- α -, bzw. Dexamethason-getriggerte Anregung des JNK-Signalweges beeinflussen kann. Dies könnte ebenfalls die verstärkte GR-Transaktivierung, zusätzlich zu der festgestellten Erhöhung der GR-Gesamtproteinexpression, begründen. Um die Vermutung einer erhöhten GR-Translokation zu bestätigen, wurden zusätzlich Immunfluoreszenzfärbungen des GR und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopien zur Charakterisierung der zellulären Lokalisation des GR durchgeführt.

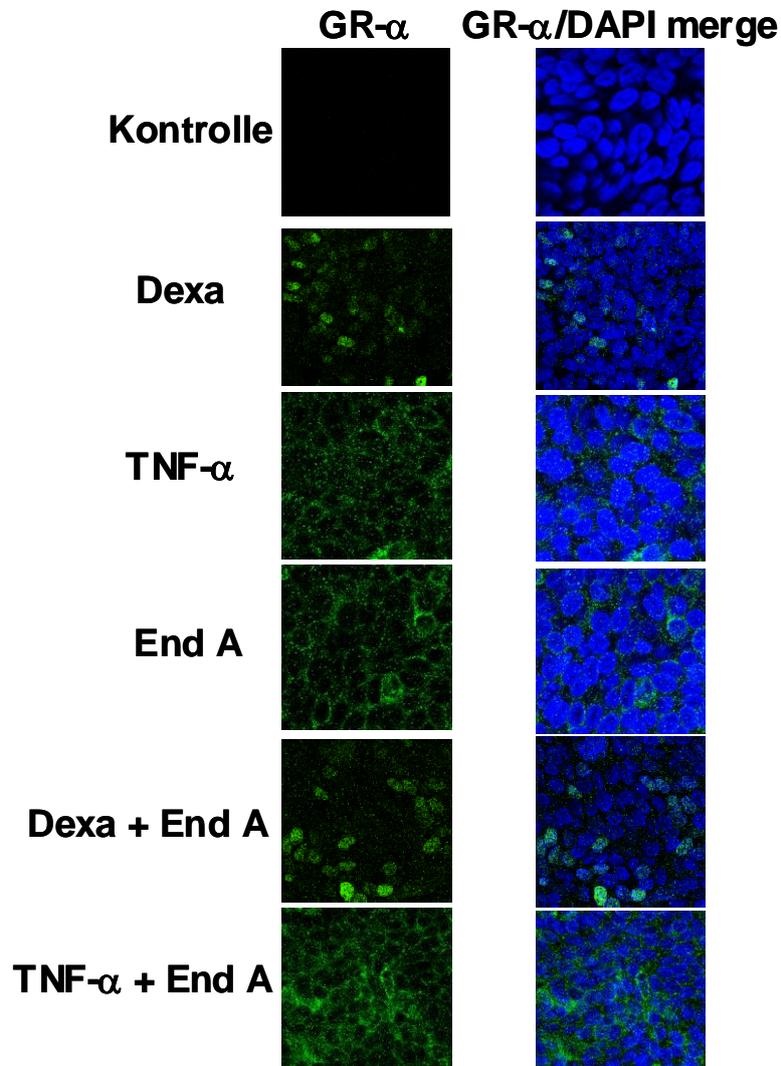


Abb. 3.15: Einfluss von Endiandrin A auf die GR-Translokation, dargestellt mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie in HT-29/B6-GR-Zellen

HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) inkubiert. Nachfolgend wurde eine Immunfluoreszenz für den GR (grün) durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

Die HT-29/B6-GR-Zellen wurden zunächst in Filtern ausgesät. Nach einer 7-tägigen Wachstumsphase und 24-stündigen Kultivierung unter hormonfreien Bedingungen (Kulturmedium mit Aktivkohle-behandeltem FKS), wurden die Zellen für 3 Stunden mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) stimuliert und anschließend einer Immunfluoreszenzfärbung für den GR unterzogen.

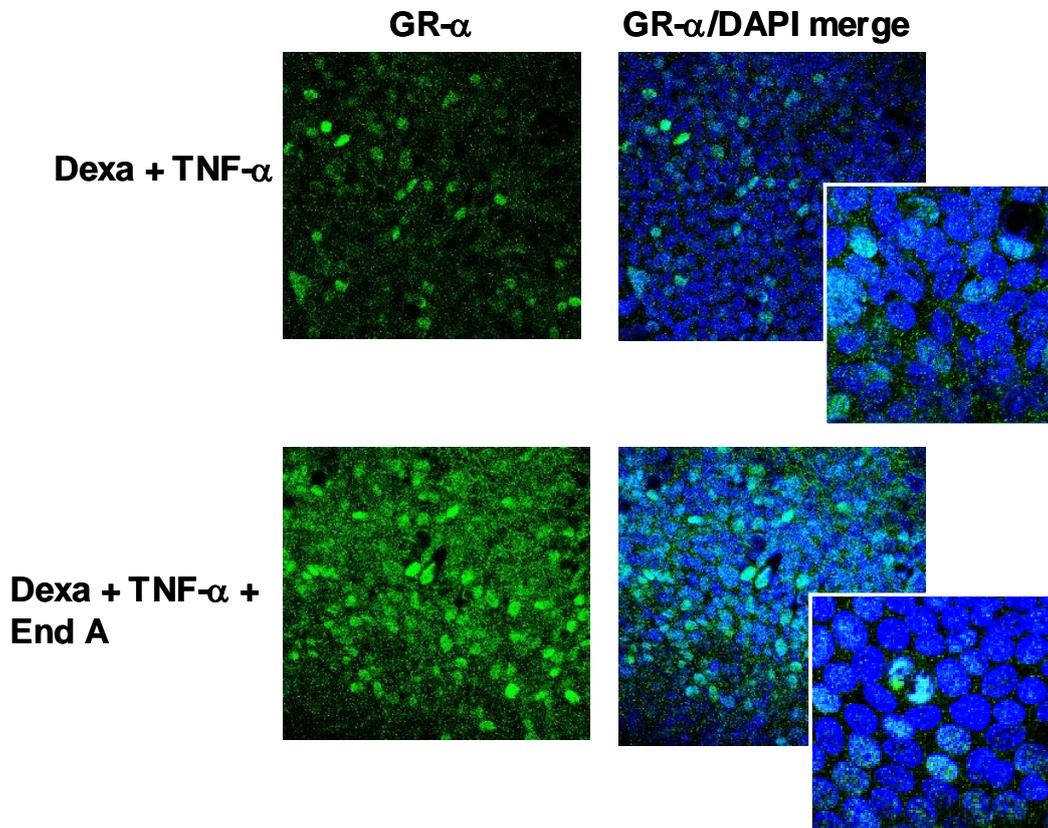


Abb. 3.16: Einfluss von Endiandrin A auf die GR-Translokation, dargestellt mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie in HT-29/B6-GR-Zellen

HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Dexamethason (1 μM), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μM) inkubiert. Nachfolgend wurde eine Immunfluoreszenz für den GR (grün) durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

In der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie wurde eine erwartete nukleäre GR-Translokation in der Behandlung mit Dexamethason sichtbar, die eine leichte Tendenz zur Erhöhung zeigte, wenn zusätzlich Endiandrin A im Stimulationsmedium war. Interessanterweise konnte sowohl in der Stimulation mit TNF- α als auch in der Endiandrin A und in der Ko-Inkubation der beiden Stimulanzen ein verstärktes, zytoplasmatisches GR-Signal beobachtet werden (Abb. 3.15). Das verstärkte nukleäre GR-Signal unter Dexamethason konnte durch gleichzeitige Gabe von TNF- α abermals, erwartungsgemäß den vorangegangenen Studien entsprechend, gesteigert werden [165]. Viel überraschender dagegen war, dass ein noch intensiveres nukleäres GR-Signal vorzufinden war, wenn die Zellen mit der 3er-Kombination von Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A behandelt wurden (Abb. 3.16).

3.1.1.9 Rolle der p38 und ERK MAP-Kinase

Im Gegensatz zu der JNK sind für die beiden anderen hier charakterisierten MAP-Kinasen, p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38) und extracelluar-signal regulated kinase (ERK), direkte Regulierungsmechanismen für den epithelialen Natriumkanal nachgewiesen. So zeigten Studien, dass p38 eher einen stimulatorischen, ERK hingegen einen inhibitorischen Einfluss auf den ENaC-abhängigen Na⁺-Transport besitzt [122, 181, 182]. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Inhibitoren für p38 (SB201290) und ERK (U0126) eingesetzt, um aufzuklären, inwieweit die p38- bzw. ERK-Aktivierung eine Rolle in der Endiandrin A-induzierten Steigerung der Na⁺-Resorption spielt. Wie bereits in 3.1.1.8. in ähnlicher Weise beschrieben worden ist, wurden die HT-29/B6-GR-Zellen zunächst mit den MAPK-Inhibitoren, dann mit den Stimulanzien behandelt und anschließend wurde in Ussing-Experimenten der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport quantifiziert. Es konnte zuvor gezeigt, dass der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom sowie die Expression der γ -ENaC-Untereinheit unter Dexamethason und TNF- α Behandlung durch eine Inhibierung der p38 vermindert werden [165]. Wie in der Abb. 3.16 ersichtlich ist, konnte dies nochmals bestätigt werden. Zusätzlich offenbart die Darstellung eine Abschwächung des ΔI_{SC} und des γ -ENaC mRNA-Levels unter der gleichzeitigen Stimulation mit Endiandrin A. Der Kurzschlussstrom vermindert sich von $1.7 \pm 0.2 \mu A/cm^2$ auf $0.6 \pm 0.1 \mu A/cm^2$ und die γ -ENaC mRNA Expression von 880 ± 93 -fach auf 437 ± 100 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.17). Dies lässt vermuten, dass die p38 MAPK auch in die Endiandrin A-getriggerten ENaC-Aktivierung involviert ist. Die Analyse der GR-Gesamtproteinexpression zeigte zudem ebenfalls eine gewisse Abhängigkeit des GR-Levels von der p38-Aktivität. Nicht nur die unter TNF- α erhöhten GR-Proteinlevel wurden durch p38-Inhibierung erwartungsgemäß reduziert, sondern es konnte auch die erhöhte GR-Gesamtproteinexpression unter dem bereits charakterisierten Synergismus zwischen Endiandrin A und TNF- α herabgesetzt werden (Abb. 3.18. A und B). Die p38 gehört zu den Kinasen, welche durch externe Stressesstimuli, u. a. auch TNF- α , aktiviert werden kann. Folgend sollte geklärt werden, ob Endiandrin A fähig ist die p38 anzuregen bzw. ob möglicherweise ein Synergismus mit TNF- α bezüglich einer p38-Induzierung vorhanden ist. In Kurzzeitstimulationen wurden die konfluent gewachsenen HT-29/B6-GR-Zellen mit Endiandrin A und TNF- α inkubiert und anschließend das Gesamtzelllysats auf MAPK-Aktivität hin untersucht. Wie in Abb. 3.18 C dargestellt ist, kann Endiandrin A die p38 nach 15 Minuten erhöhen, allerdings nicht im gleichen Maß wie TNF- α

Ergebnisse

($440 \pm 40\%$ für Endiandrin A gegenüber der unbehandelten Kontrolle). Darüber hinaus offenbart die Darstellung ebenfalls eine geringfügig verlängerte, aber nichtsdestotrotz signifikant, p38-Aktivierung nach 120 Minuten bei gleichzeitiger Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ und Endiandrin A ($335 \pm 56\%$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle).

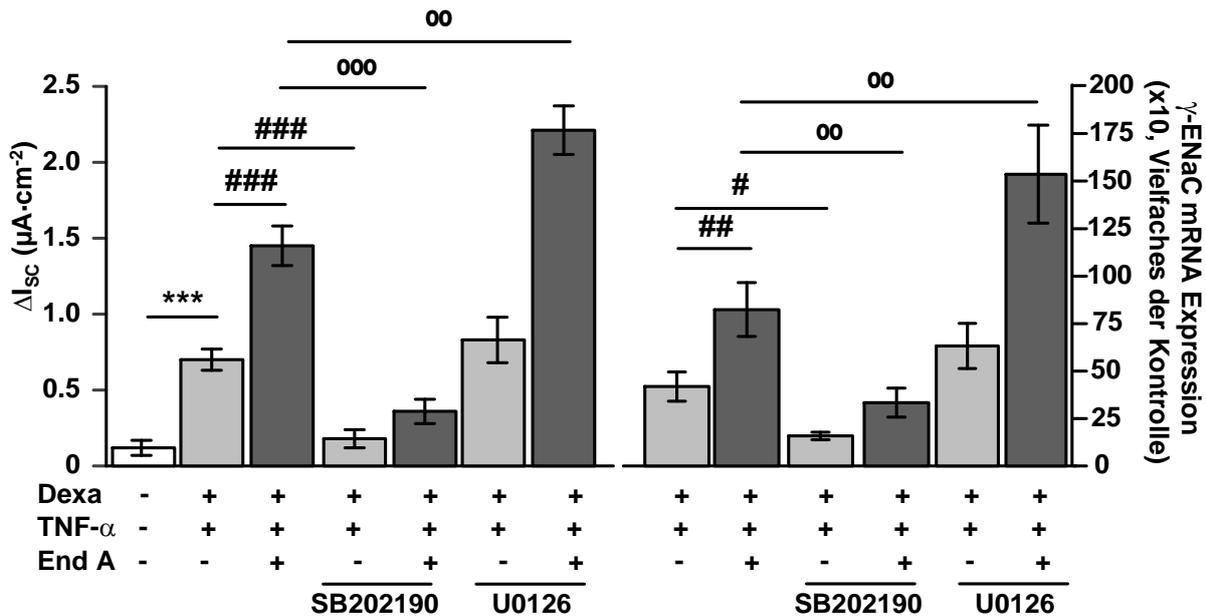


Abb. 3.17: Die ENaC-abhängige Na^+ -Resorption und die Expression der γ -ENaC-Untereinheit unter dem Einfluss von p38- und ERK-Inhibitoren in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen zunächst 1 Stunde mit SB202190 und U0126 ($10 \mu\text{M}$) vorinkubiert und anschließend mit Dexamethason ($1 \mu\text{M}$), $\text{TNF-}\alpha$ (500 IU/ml) und Endiandrin A ($20 \mu\text{M}$) für 24 Stunden behandelt. Der ENaC-vermittelte Na^+ -Transport wurde mittels Zugabe von Amilorid (10^{-4} M) bestimmt. Die Expression der γ -ENaC mRNA wurde mittels Real-time PCR unter Verwendung des spezifischen Primers bestimmt und als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle nach der Normalisierung mit GAPDH berechnet. Die Ergebnisse sind angegeben als $\text{MW} \pm \text{s.e.m.}$, $n=8-11$ bzw. $n=5-8$, $***P<0.001$ verglichen mit Dexamethason allein, $\#P<0.05$, $\##P<0.01$, $\###P<0.001$ verglichen mit Dexamethason zusammen mit $\text{TNF-}\alpha$, $^{\circ}P<0.01$, $^{\circ\circ}P<0.001$ verglichen mit Dexamethason-, $\text{TNF-}\alpha$ - und Endiandrin A-Behandlung.

Zudem sollte untersucht werden, ob ebenfalls eine verlängerte p38-Aktivität unter Dexamethason und $\text{TNF-}\alpha$, bzw. Endiandrin A festgestellt werden kann. Die Zellen wurden für 120 Minuten mit den Stimulanzien behandelt und das Gesamtzelllysate anschließend analysiert. Die Abb. 3.19 zeigt, dass keine Veränderung des p38-Phosphorylierungsstatus nach 120 Minuten unter der Kombination Dexamethason und $\text{TNF-}\alpha$ induziert wurde. Hingegen fand

sich eine verlängerte p38-Aktivität unter zusätzlicher Endiandrin A-Gabe ($526 \pm 40\%$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle, Abb. 3.19 A und C).

Nachfolgend wurde analysiert, ob Endiandrin A die MAP-Kinase ERK aktivieren kann und inwieweit eine Inhibition von ERK Auswirkungen auf den ENaC-vermittelten Na^+ -Transport hat. In publizierten Daten zeigte sich kein Einfluss auf den Amilorid-sensitiven Kurzschlussstrom und ebenfalls auch nicht auf die γ -ENaC mRNA-Expression, wenn die Zellen mit dem ERK-Inhibitor U0126 und Dexamethason zusammen mit $\text{TNF-}\alpha$ behandelt wurden, was in dieser Studie abermals bestätigt werden konnte [165] (Abb. 3.17).

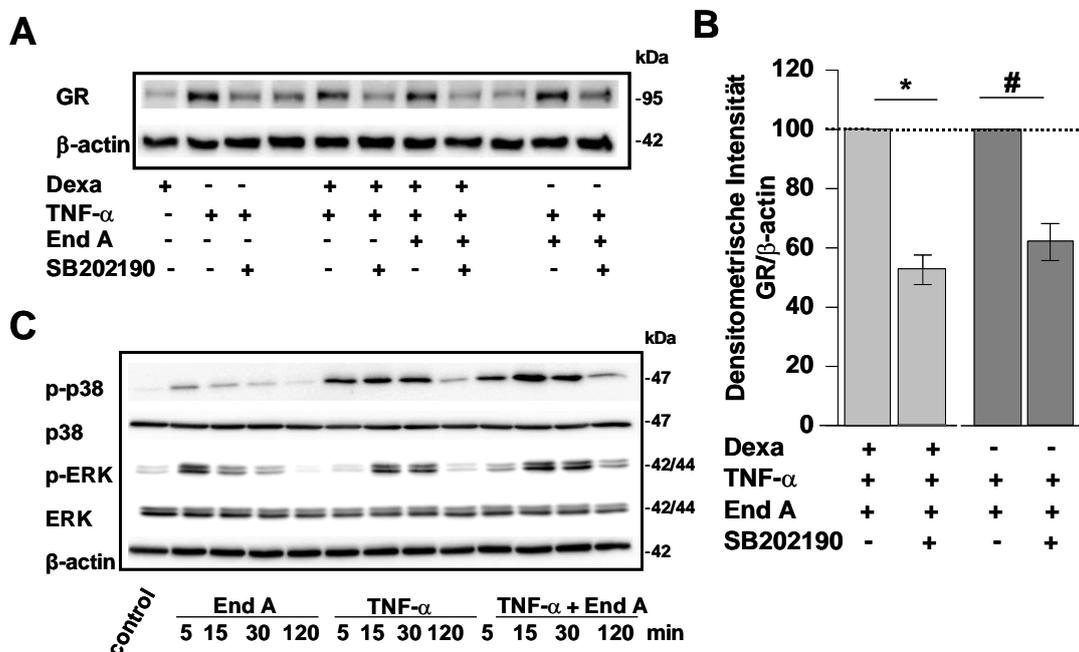


Abb. 3.18: Analyse der GR-Gesamtproteinexpression unter p38-Inhibition und des Western Blots zur Charakterisierung der MAPK-Aktivierung in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. **(A)** Die Zellen wurden zunächst 1 Stunde mit SB202190 (10 μM) vorinkubiert und anschließend für 3 Stunden mit Dexamethason (1 μM), $\text{TNF-}\alpha$ (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μM) behandelt. Das Gesamtzelllysate wurde präpariert und die GR-Gesamtproteinexpression mittels Western Blot-Analyse analysiert. Humanes β -Aktin diente als Ladekontrolle. **(B)** Densitometrische Auswertung des GR-Gesamtlevels normiert auf Dexamethason. Ergebnisse gezeigt als $\text{MW} \pm \text{s.e.m.}$, $n=6-7$, $*P<0.05$ zur Behandlung Dexamethason zusammen mit $\text{TNF-}\alpha$ und Endiandrin A, $\#P<0.05$ verglichen mit $\text{TNF-}\alpha$ - und Endiandrin A-Stimulation.

(C) Die Zellen wurden mit $\text{TNF-}\alpha$ (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μM) behandelt. Das Gesamtzelllysate wurde präpariert. Die Darstellung zeigt die Western Blot-Analyse der MAPK- und pMAPK-Proteinexpression. Humanes β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Andererseits zeigen die Ergebnisse unter einer zusätzlichen Stimulation mit Endiandrin A und einer Inhibierung der MAP-Kinase ERK einen starken Anstieg im ΔI_{SC} , sowie in der β -ENaC (Daten nicht aufgeführt) und der γ -ENaC mRNA-Expression. Die ENaC-vermittelte Na^+ -Resorption intensivierte sich von $1.7 \pm 0.2 \mu A/cm^2$ auf $3.0 \pm 0.4 \mu A/cm^2$ und bei der γ -mRNA-Expression konnte eine Erhöhung von 880 ± 93 -fach auf 1655 ± 104 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 3. 17). Densitometrische Analysen von Western Blots offenbarten eine schnelle und starke, aber keine verlängerte ERK-Aktivierung unter alleiniger Endiandrin A-Inkubation (Abb. 3. 18 C). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Dexamethason eine TNF- α -induzierte ERK-Aktivierung nach 5 Minuten inhibieren kann. Eine zusätzliche Behandlung mit Endiandrin A verstärkte dagegen die ERK-Phosphorylierung (Abb. 3. 19 A und C). Die Resultate deuten auf eine verlängerte Aktivierung der p38 hin, wobei dies anscheinend durch einen weiteren Synergismus zwischen TNF- α und Endiandrin A zustande kommt. Überdies konnte eine Endiandrin A-ausgelöste ERK-Induzierung festgestellt werden. Diese Beobachtung könnte möglicherweise der Grund dafür sein, dass Endiandrin A alleine keinen Einfluss auf den ENaC-vermittelten Na^+ -Transport besitzt, da ERK bereits in vorangegangenen Studien als inhibitorischer ENaC-Regulator charakterisiert worden ist.

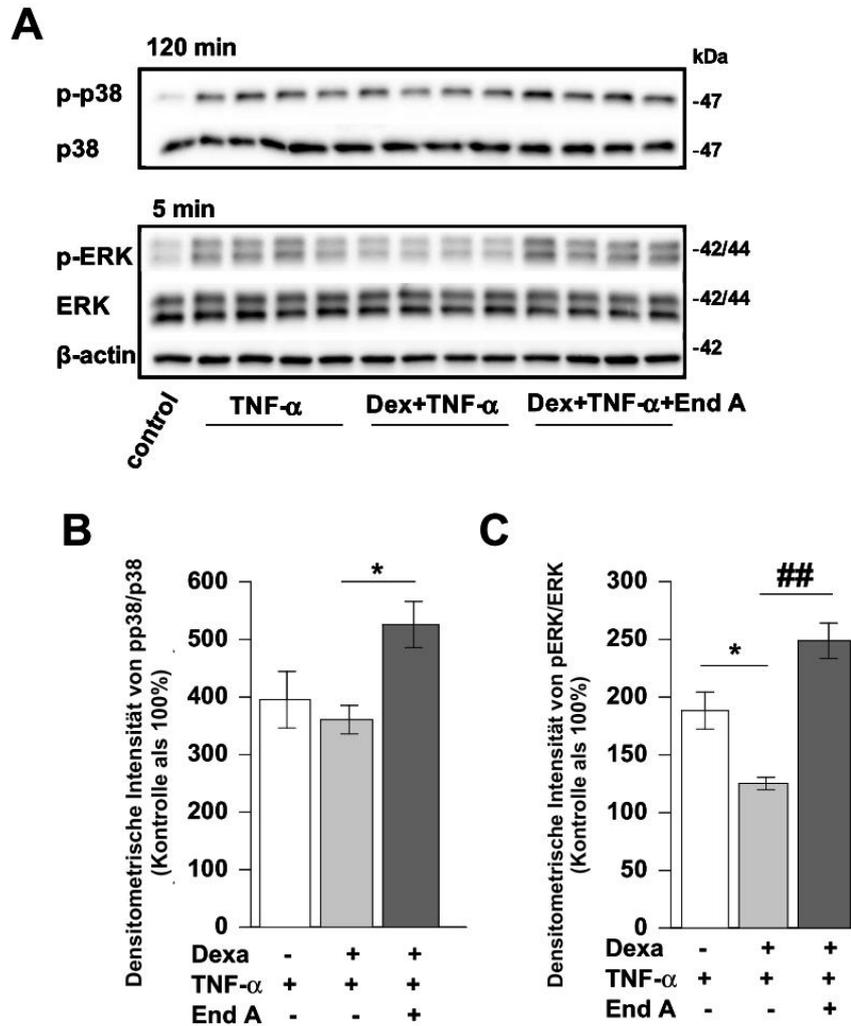


Abb. 3.19: Die Wirkung von Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A auf den p38- und ERK-Signalweg in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) behandelt. Nachfolgend wurde das Gesamtzelllysat hergestellt.

(A) Western Blot-Analyse der p38/pp38- (120 Minuten Stimulation) und ERK/pERK (5 Minuten Stimulation)-Proteinexpression. Humanes β -Aktin diente als Ladekontrolle.

(B) Densitometrische Auswertung des pp38-Levels normiert auf die p38-Gesamtexpression. Ergebnisse gezeigt als MW \pm s.e.m., n=4, *P<0.05 zur Behandlung mit Dexamethason und TNF- α .

(C) Densitometrische Auswertung des pERK-Levels normiert auf die ERK-Gesamtexpression. Ergebnisse gezeigt als MW \pm s.e.m., n=4, *P<0.05 zur Behandlung mit TNF- α , ##P<0.01 zur Behandlung mit Dexamethason und TNF- α .

3.1.1.10 Rolle der Serum- und Glucocorticoid-induzierbaren Kinase-(Sgk-1)

Die Sgk-1 gehört wohl mit zu den wichtigsten Mediatoren der MC- und GC-induzierten ENaC-abhängigen Na⁺-Resorption. Insbesondere konnte der Sgk-1 ein regulierender Einfluss auf die Ubiquitinligase Nedd4-2, welche den ENaC negativ steuert, nachgewiesen werden [183-185]. In der vorliegenden Studie war es demnach besonders interessant, ob Sgk-1 in den Synergismus zwischen Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A involviert ist. Zunächst sollte analysiert werden, inwieweit die Stimulanzen Auswirkung auf die Aktivität eines sgk-Promotors besitzen. Dies wurde mittels Reporter-Gen-Assay untersucht. Die Zellen wurden transient mit einem psgk-short-Luc Reporterplasmid transfiziert, wobei die Luciferase-Expression unter der Kontrolle einer sgk-Promotorsequenz steht. Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) inkubiert. Wie erwartet, konnte unter GC-Gabe eine vermehrte Aktivität des sgk-Promotors festgestellt werden (682 \pm 34% gegenüber der unbehandelten Kontrolle). Eine gleichzeitige Inkubation mit TNF- α verstärkte den Dexamethason-Effekt (941 \pm 62%). Diese Steigerung konnte überraschenderweise abermals durch Endiandrin A-Gabe intensiviert werden (1180 \pm 70% gegenüber der unbehandelten Kontrolle, Abb. 3. 20). Die alleinige Gabe von TNF- α und/oder Endiandrin A bzw. die Kombination von Dexamethason und Endiandrin A verursachten keine oder eine nicht weiter erhöhte Luciferase-Expression (Daten nicht aufgeführt).

Um die Funktionalität der gesteigerten sgk-Promotoraktivität zu bekräftigen, wurden mittels Real-time PCR Veränderungen im Expressionslevel der Sgk-1 analysiert. Dafür sind die Zellen nach einer 7-tägigen Wachstumsphase und 24-stündigen Kultivierung unter hormonfreien Bedingungen in Filtern für 24 Stunden mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) behandelt worden. Anschließend wurde die Gesamt-RNA der Filter isoliert. Unter der alleinigen Gabe von Dexamethason bzw. von TNF- α konnte jeweils eine gesteigerte Expression der Sgk-1 mRNA ermittelt werden, die sich unter Kombination der beiden Stimulanzen abermals potenzierte. Wie in der Abbildung 3. 20 erkennbar ist, zeigte sich erneut ein Anstieg im Sgk-1 mRNA-Level von 20 \pm 1-fach für Dexamethason zusammen mit TNF- α auf 31 \pm 2-fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach zusätzlicher Endiandrin A-Inkubation. Bei der Kombination von GC und Endiandrin A offenbarte sich eine Tendenz zur gesteigerten Sgk-1 mRNA-Expression verglichen mit Dexamethason allein, die jedoch keine Signifikanz erreichte und daher nicht weiter untersucht worden ist.

Hingegen enthüllten die Real-time PCR-Analysen eine überraschende Intensivierung unter der Inkubation TNF- α zusammen mit Endiandrin A von 4 ± 0.4 -fach für TNF- α auf 6 ± 0.5 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3. 20).

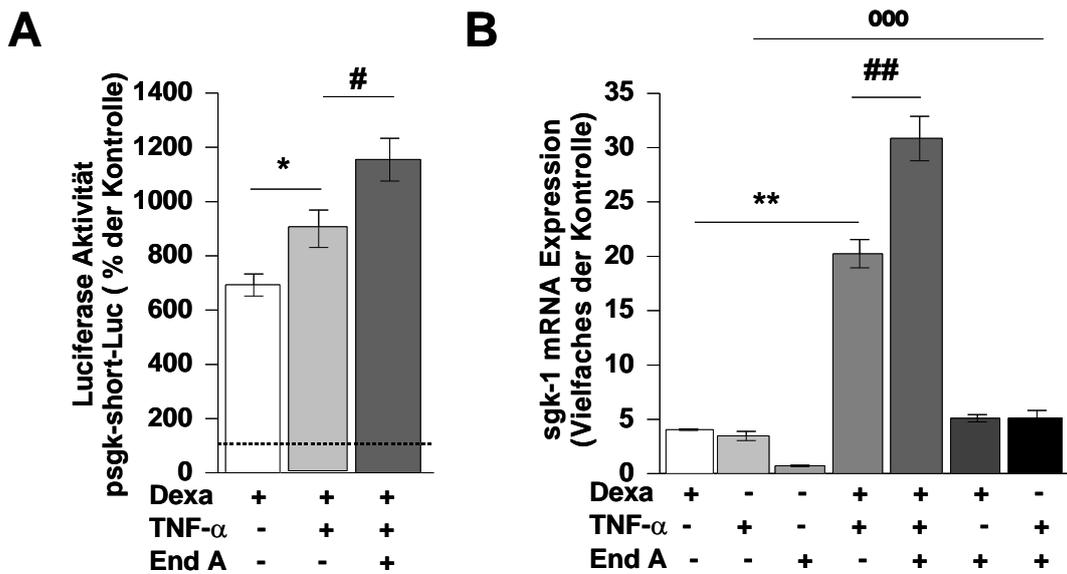


Abb. 3.20: Induktion der Sgk-Promotoraktivität und Expression der Sgk-1 mRNA in HT-29/B6-GR-Zellen

(A) HT-29/B6-GR-Zellen wurden mit dem psgk-short-Luc transfiziert und mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) für 24 Stunden inkubiert. Ergebnisse wurden zur unbehandelten Kontrolle normalisiert und sind als relative Luciferase-Aktivität aufgezeigt. Angegeben sind MW \pm s.e.m., n=6-13, *P<0.05 zur Behandlung mit Dexamethason, #P<0.05 verglichen mit Dexamethason zusammen mit TNF- α -Stimulation. (B) Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt und anschließend mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) für 24 Stunden behandelt. Die Expression der Sgk-1 mRNA wurde mittels Real-time PCR unter Verwendung des spezifischen Primers bestimmt und als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle nach der Normalisierung mit GAPDH berechnet. Die Ergebnisse sind angegeben als MW \pm s.e.m., n=5-8, **P<0.01 verglichen mit Dexamethason allein, ###P<0.01 verglichen mit Dexamethason- und TNF- α -Behandlung, °°°P<0.001 verglichen mit TNF- α -Behandlung.

In Studien ist belegt worden, dass der Sgk-1-Promotor GR-Bindungsdomänen, sogenannte GRE, aufweist und folglich die Sgk-1 als GC-sensitive Kinase gelten kann [184]. Ebenso wurden die p38 und ERK MAPK identifiziert die Sgk-1 Expression beeinflussen zu können [186-188]. Im Folgenden wurden spezifische Blocker für den GR (RU486), die p38 (SB201290) und ERK (U0126) benutzt um mögliche induzierte Signalwege genauer zu analysieren, die die beobachtete gesteigerte Sgk-1-Expression unter Dexamethason,

TNF- α und Endiandrin A erklären könnten. Dazu wurde den Zellen vor der eigentlichen 24-stündigen Stimulanzien-Inkubation die Inhibitoren für 1 Stunde ins Kulturmedium zugegeben. Abschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels Real-Time PCR untersucht. Eine Inhibition des GR und der p38 MAP-Kinase induzierte einen starken Abfall des Sgk-1 mRNA-Levels, der sich in beiden Stimulanzien-Kombinationen nicht unterschied. Dagegen zeigte die Blockade des ERK-Signalweges zwar eine Abnahme der Sgk-1-Expression, die jedoch signifikant geringer ausfiel, wenn die Zellen neben Dexamethason und TNF- α mit Endiandrin A inkubiert wurden (Abb. 3. 21 A). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Endiandrin A durch sein Einwirken auf den GR, sowie auf die p38 und ERK MAPK die Expression der Sgk-1 beeinflussen kann. Darüber hinaus kann aufgrund der Analysen angenommen werden, dass die Sgk-1 eine entscheidende Rolle im Synergismus zwischen Dexamethason und TNF- α bzw. Endiandrin A spielt.

In neueren Untersuchungen wird die Sgk-1 häufig nur im Zusammenhang mit einem weiteren regulierenden Protein, dem GC-induced leucine zipper (GILZ), aufgezeigt. Beide sollen gemeinsam in einem ENaC-regulierenden Komplex vereint sein und die Funktion des ENaC steuern [121, 126]. Um zu untersuchen, ob GILZ in dem vorliegenden untersuchten Modell ebenfalls einen Einfluss ausübt, wurde die Gesamt-RNA von stimulierten HT-29/B6-GR-Zellen isoliert und die Expression der GILZ mRNA ermittelt. In der Darstellung 3. 21 B wird sichtbar, dass TNF- α -Behandlung die durch Dexamethason nur schwache, nicht signifikante Induktion der GILZ-Expression auf das 3.2 ± 0.3 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle verstärken kann. Eine zusätzliche Behandlung mit Endiandrin A zeigte keinen Unterschied zu der Kombination aus Dexamethason und TNF- α (3.2 ± 0.4 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle) auf (Abb. 3. 21 B). Andere alleinigen Gaben der Stimulanzien oder ihren Kombinationen zeigten keine signifikanten Erhöhungen der GILZ-Expression (Daten nicht aufgeführt). Demnach scheint GILZ zwar in dem Synergismus zwischen Dexamethason und TNF- α eine geringfügige Rolle zu spielen, in dem zwischen Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A konnte jedoch kein Einfluss festgestellt werden. Es wird daher im Folgenden nicht weiter auf GILZ im Zusammenhang mit Endiandrin A eingegangen.

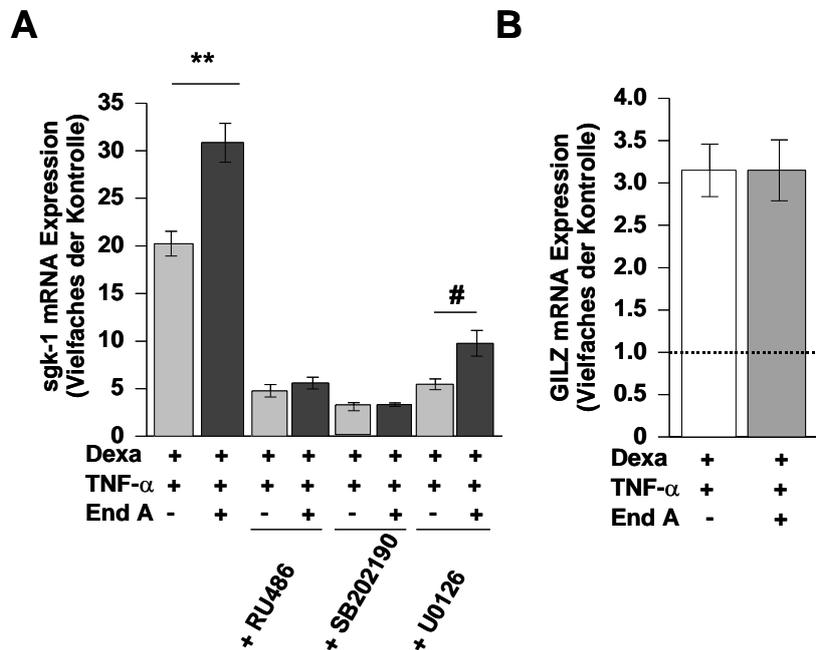


Abb. 3.21: Die Expression der Sgk-1 mRNA unter Inhibitoren-Einfluss, sowie die Expression der GILZ mRNA in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt, (A) 1 Stunde mit den Inhibitoren (10 μ M) inkubiert und (A und B) anschließend mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μ M) für 24 Stunden behandelt. Die Expression der mRNA wurde mittels Real-time PCR unter Verwendung des spezifischen Primers bestimmt und als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle nach der Normalisierung mit GAPDH berechnet. Die Ergebnisse sind angegeben als MW \pm s.e.m., (A) n=5-8 bzw. (B) n=5, **P<0.001 verglichen mit Dexamethason und TNF- α -Behandlung, #P<0.05 verglichen mit Dexamethason-, TNF- α - und U0126-Behandlung.

3.1.1.11 Regulation des ENaCs unter zusätzlicher Butyrat-Stimulation

Die kurzkettige Fettsäure Butyrat, ein Metabolit unserer Darmbakterien, liegt im physiologischen Darmmilieu in signifikanter Konzentration vor und kann u. a. den intestinalen epithelialen Natriumkanal auf transkriptioneller Ebene regulieren [98, 99]. Daher war es interessant zu untersuchen, ob Butyrat den ermittelten Synergismus zwischen Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A beeinflussen kann. Die HT-29/B6-GR-Zellen wurden hierfür, wie bereits in 3. 1. 1. 5 beschrieben, mit den bekannten Stimulanzen bzw. zusätzlich noch mit Butyrat (2 mM) inkubiert. Anschließend wurde der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom in der Ussing-Kammer ermittelt. Die in Studien beobachtete Butyrat-induzierte Stimulation des ENaC-vermittelten Na⁺-Transportes, der jedoch von der Anwesenheit eines Steroids abhängt, konnte in der vorliegenden Arbeit abermals bestätigt werden [99]. Die Abbildung 3.22

Ergebnisse

zeigt, dass Butyrat alleine keine Steigerung des ΔI_{SC} hervorruft. In Kombination mit Dexamethason erhöhte sich die ENaC-vermittelte Na^+ -Resorption dagegen auf $0.8 \pm 0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Befand sich zudem $\text{TNF-}\alpha$ im Kulturmedium konnte nur eine Tendenz zur Zunahme des Kurzschlussstromes ermittelt werden, die jedoch aufgrund geringer n-Zahlen keine Signifikanz erreichte. Unter Endiandrin A Behandlung intensivierte sich der ΔI_{SC} auf $3.3 \pm 0.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Die Inkubation mit Butyrat, $\text{TNF-}\alpha$ und/oder Endiandrin A, bzw. Dexamethason und Endiandrin wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

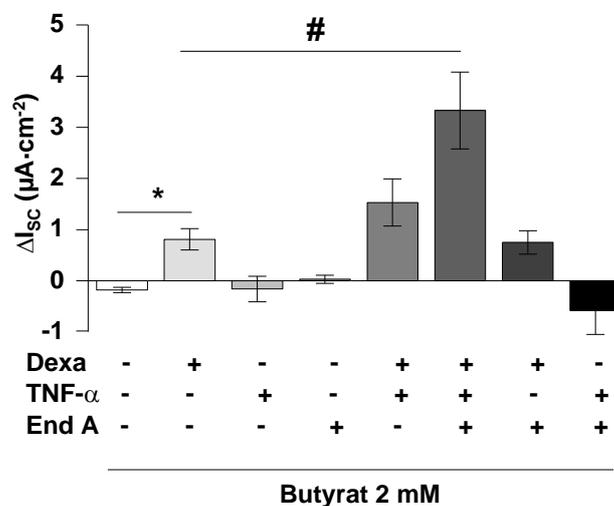


Abb. 3.22: Der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom unter dem Einfluss von Butyrat, Dexamethason, $\text{TNF-}\alpha$ und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern-gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Butyrat (2 mM), Dexamethason (1 μM), $\text{TNF-}\alpha$ (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μM) für 24 Stunden inkubiert. Der ENaC-vermittelte Na^+ -Transport wurde mittels Zugabe von Amilorid (10^{-4} M) bestimmt. Ergebnisse sind als MW \pm s.e.m. angegeben, n=3-6, *P<0.05 verglichen mit Butyrat alleine, #P<0.05 verglichen mit Butyrat zusammen mit Dexamethason.

Um Veränderungen des Expressionsniveaus der im Kolon bedeutenden β - und γ -ENaC-Untereinheiten zu analysieren, wurde nach den Ussing-Experimenten die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und mittels Real-time PCR untersucht. Butyrat induzierte die erwartete Steigerung der β -Untereinheit von 71 ± 19 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle, die nicht durch Dexamethason bzw. Dexamethason plus $\text{TNF-}\alpha$ gesteigert werden konnte. Indes erzeugte die zusätzliche Gabe von Endiandrin A zu Butyrat, Dexamethason und $\text{TNF-}\alpha$ eine signifikante Erhöhung der β -ENaC mRNA auf 157 ± 32 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Weitere Kombinationen mit Butyrat und den Stimulanzen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede auf (Abb. 3. 23).

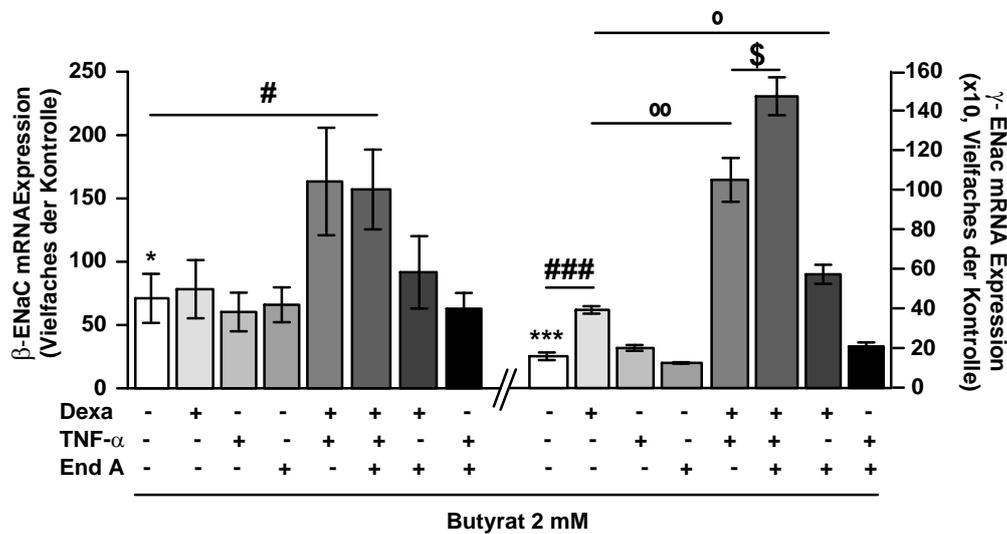


Abb. 3.23: Die Expression der ENaC-Untereinheiten unter dem Einfluss von Butyrat, Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen

Die HT-29/B6-GR-Zellen wurden, wie bereits in 3. 20 beschrieben, stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde nach dem Experiment isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels Real-time PCR unter Verwendung von spezifischen Primern für die β - und γ -ENaC-Untereinheit analysiert. Die Expression der ENaC mRNA wurde als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle nach der Normalisierung mit GAPDH berechnet. Die Ergebnisse sind als $MW \pm s.e.m.$ angegeben, $n=5-6$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ zur unbehandelten Kontrolle, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ zur Behandlung mit Butyrat, ° $P < 0.05$ und °° $P < 0.01$ zur Butyrat zusammen mit Dexamethason-Stimulation, \$ $P < 0.05$ zur Inkubation von Butyrat, Dexamethason mit TNF- α .

Gegensätzlich erwies sich die Analyse der γ -ENaC-Untereinheit. Ebenso führte die alleinige Gabe von Butyrat zu dem erwarteten Anstieg der γ -ENaC mRNA, der nun aber durch Dexamethason intensiviert wurde (von 161 ± 19 -fach auf 395 ± 19 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle). Zugleich offenbarte die Analyse des Expressionsniveaus der γ -ENaC-Untereinheit eine Induktion auf 1053 ± 111 -fach unter zusätzlicher TNF- α -Inkubation. Wurde gleichzeitig Endiandrin A ins Kulturmedium gegeben, zeigte sich eine erneute Steigerung der γ -ENaC-Untereinheit (1467 ± 96 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle). Die Kombination von Butyrat, Dexamethason und Endiandrin A erzeugte ein γ -ENaC mRNA-Expressionslevel von 576 ± 48 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3. 23). Die Daten weisen darauf hin, dass die kurzkettige Fettsäure Butyrat den Synergismus zwischen Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A stärkt, indem Butyrat die Transkription der β - und γ -ENaC-Untereinheiten stimuliert, was folglich zu der beobachteten Zunahme des ENaC-vermittelten Na^+ -Transportes führt.

Begründet durch den geringen Probenumfang konnte zwar die erwartete Butyrat-induzierte Intensivierung der ENaC-vermittelten Na⁺-Resorption durch Dexamethason und TNF- α nicht statistisch nachgewiesen werden, nichtsdestotrotz fand sich aber eine Zunahme der γ -ENaC-Untereinheit auf transkriptioneller Ebene.

3.1.1.12 Charakterisierung der Auswirkung einer GC-Dosisreduktion auf den epithelialen Na⁺-Transport unter entzündlichen Bedingungen und unter dem Einfluss von Endiandrin A

Da Glucocorticoide vor allem in einer verordneten Langzeittherapie schwerwiegende Nebenwirkungen aufweisen, sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden, wie sich eine Dosisreduktion des Dexamethasons auf die ermittelten Synergismen auswirkt. Dafür wurden die HT-29/B6-GR-Zellen für 24 Stunden, neben TNF- α und Endiandrin A in den bekannten Konzentrationen, mit einer 100-fach geringeren Dexamethason-Stärke (10 nM) behandelt. Anschließend wurden zur Quantifizierung des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstromes Ussing-Experimente durchgeführt. Die Abbildung 3. 24 A offenbart, dass die Reduktion der Dosis von Dexamethason in jeder Hinsicht eine Minderung des ΔI_{SC} verursacht. Im Gegensatz zu einer 24-stündigen Inkubation mit 1 μ M Dexamethason konnten 10 nM keine Steigerung des ENaC-vermittelten Na⁺-Transportes induzieren. Es wird deutlich, dass der Synergismus zwischen Dexamethason und TNF- α signifikant beeinträchtigt wird. Wird dem Kulturmedium Endiandrin A zugesetzt, kommt es zwar interessanterweise zu einer leichten Erniedrigung von ΔI_{SC} , die jedoch nicht signifikant ausfiel. Dabei zeigt sich, dass der hier gemessene Kurzschlussstrom immer noch stärker ausgeprägt ist, als bei der Behandlung der Zellen mit 1 μ M Dexamethason zusammen mit TNF- α ($0.7 \pm 0.1 \mu A/cm^2$ Ko-Inkubation 1 μ M Dexamethason und TNF- α , $1.1 \pm 0.2 \mu A/cm^2$ für 10 nM Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A, Abb. 3. 24 A). Trotz einer 100-fachen Steroid-Dosisreduktion kann der Synergismus zwischen Dexamethason, TNF- α und Endiandrin A anscheinend in seiner Intensität erhalten werden. Endiandrin A vermag demnach möglicherweise die Steroiddosis-Reduktion durch sein Eingreifen in die verschiedenen von uns ermittelten Signalwege zu überspielen und es resultiert ein ähnlicher Effekt wie beim Einsatz einer 100-fach stärkeren Steroidkonzentration. Gerade auch im Hinblick auf eine spätere Arzneistoffformulierung sollte eine neue Substanz in ihrer Pharmakodynamik und -kinetik charakterisiert sein. Da diese umfangreichen Untersuchungen über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen würden, wurde hier

Ergebnisse

zunächst nur analysiert, von welcher Gewebeseite (basolateral oder apikal) Endiandrin A das ENaC-System beeinflusst. Die HT-29/B6-GR-Zellen wurden mit den Stimulanzen über 24 Stunden inkubiert und der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom bestimmt. Es wurde hierbei Endiandrin A wie üblich beidseitig, ausschließlich apikal oder basolateral ins Kulturmedium zugegeben. Die Analysen der Ussing-Experimente deckten auf, dass Endiandrin A von der basolateralen Seite aus auf die Zellen wirkt (Abb. 3. 24 B). Demnach könnte für Endiandrin A eine Prodrug-Arzneistoffformulierung von Bedeutung sein, ähnlich wie bei der Arzneistoffklasse der Protonenpumpenhemmer, u. a. Omeprazol.

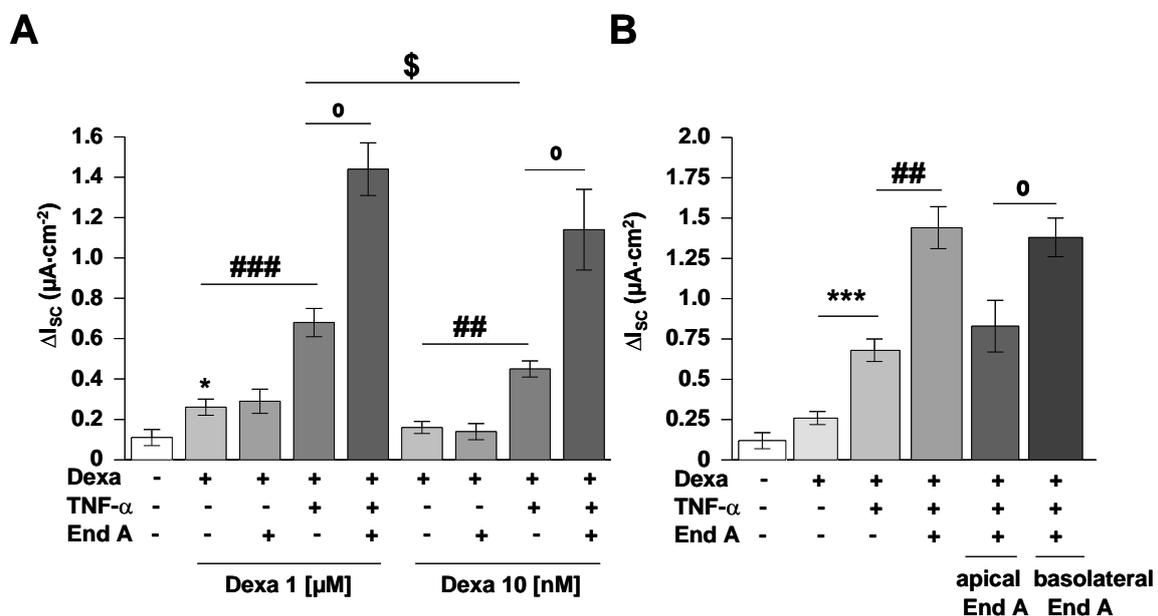


Abb. 3.24: Der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom unter dem Einfluss von Dexamethason, TNF-α und Endiandrin A in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport wurde mittels Zugabe von Amilorid (10⁻⁴ M) bestimmt. (A) Die Zellen wurden mit Dexamethason (1 μM, 10 nM), TNF-α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μM) für 24 Stunden inkubiert. Ergebnisse sind als MW ± s.e.m. angegeben, n=3-6, *P<0.05 verglichen mit unbehandelter Kontrolle, ##P<0.01, ###P<0.001 verglichen mit Dexamethason Inkubation, °P<0.05 verglichen zur Dexamethason- und TNF-α-Behandlung, §P<0.05 verglichen mit 10 nM Dexamethason und TNF-α. (B) Die Zellen wurden mit Dexamethason (1 μM), TNF-α (500 IU/ml) und Endiandrin A (20 μM, beidseitig, nur apikal oder basolateral) für 24 Stunden inkubiert. Ergebnisse sind als MW ± s.e.m. angegeben, n=9-10, ***P<0.001 verglichen mit Dexamethason allein, ##P<0.01 verglichen mit Dexamethason gemeinsam mit TNF-α, °P<0.05 verglichen zur Dexamethason-, TNF-α- und apikalen Endiandrin A-Inkubation

3.1.2 Endiandra-Extrakt

Untersuchung der Regulation des ENaC-vermittelten Na⁺-Transportes durch den Wurzelextrakt der *Endiandra anthropogorum* DOMIN

In der angewandten Phytopharmazie werden keine Reinsubstanzen, sondern beispielsweise die Extrakte einer Heilpflanze eingesetzt. Im Gegensatz zu isolierten Substanzen bestimmen hier nicht einzelne, sondern die Gesamtheit aller vorhandenen Inhaltsstoffe einer Pflanze die Wirksamkeit eines Phytotherapeutikums. Endiandrin A stellt demnach nur eine Reinsubstanz dar, die definitionsgemäß nicht zu den Phytopharmaka gezählt werden kann. Bislang wurde der Wurzelextrakt der *E. anthropogorum* DOMIN noch in keiner Studie detailliert untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollte nun geklärt werden, ob neben der Reinsubstanz Endiandrin A, ebenso der Extrakt einen phytopharmazeutischen Effekt auf den intestinalen ENaC-vermittelten Na⁺-Transport besitzt. Ähnlich dem Endiandrin A, wurden zum einen natives Rattengewebe und zum anderen die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6-GR benutzt, um die Beeinflussbarkeit der GC-induzierbaren elektrogenen Na⁺-Resorption unter entzündlichen Bedingungen genauer zu betrachten.

3.1.2.1 Regulation des Glucocorticoid-induzierten ENaC durch den Endiandra-Extrakt im proximalen Rattengewebe unter entzündlichen Bedingungen

Es wurde die gleiche Experimentieranordnung wie in 3. 1. 1. 4 angewandt, um zu analysieren, inwieweit der Endiandra-Extrakt den beschriebenen Synergismus zwischen Dexamethason und TNF- α mit seinem Wirkpotential beeinflussen kann [165]. Abweichend vom bisherigen Design wurden lediglich anstatt der distalen proximale murine Kolonpräparate verwendet (und zwar aus Gründen des Zeitmanagements in diesen Versuchen, da die Präparation sehr viel schneller realisierbar ist). Als Stimulanzen wurden Dexamethason (1 μ M, basolateral und apikal), TNF- α (10.000 IU/ml, basolateral) und der Extrakt (10 μ g/ml, basolateral und apikal) eingesetzt. Der Versuch wurde nach 14-stündiger Inkubation durch apikaler Zugabe des ENaC-Blockers Amilorid (10^{-4} M) beendet und der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport anhand der Differenz des Kurzschlussstroms (ΔI_{SC}) vor und nach Zugabe von Amilorid bestimmt. Die Darstellung 3. 25 zeigt den erwarteten Anstieg des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms nach der Inkubation mit Dexamethason ($12.6 \pm 2.7 \mu A/cm^2$). Der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport konnte erwartungsgemäß durch die zusätzliche Behandlung mit TNF- α verstärkt werden ($22.6 \pm 1.3 \mu A/cm^2$). Die Inkubation mit dem Endiandra-Extrakt zeigte nur eine gewisse Tendenz zur abermaligen Zunahme des ΔI_{SC}

($25.5 \pm 2.0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) auf, welche jedoch aufgrund der geringen Probenanzahl keine statistische Signifikanz erreichte. Im unbehandelten Rattenkolon sowie unter alleiniger Behandlung mit Endiandra-Extrakt wurde der Kurzschlussstrom nicht beeinflusst (Daten nicht aufgezeigt, Abb. 3. 25).

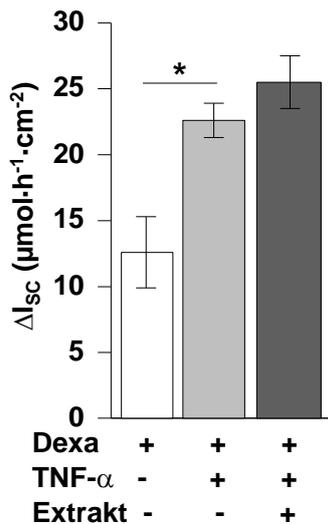


Abb. 3.25: Der GC-induzierte ENaC-vermittelte Na^+ -Transport unter dem Einfluss von $\text{TNF-}\alpha$ und Endiandra-Extrakt an murinen proximalen Kolongeweben

Proximales Rattenkolongewebe wurde in die Ussing-Kammer eingespannt, für 1 Stunde vorinkubiert mit $\text{IFN-}\gamma$ (1000 IU/ml) und anschließend für 14 Stunden mit Dexamethason (1 μM), $\text{TNF-}\alpha$ (10.000 IU/ml) und Endiandra-Extrakt (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt. Der ENaC-vermittelte Na^+ -Transport wurde mittels Zugabe von Amilorid (10^{-4} M) bestimmt. Ergebnisse sind als $\text{MW} \pm \text{s.e.m.}$ angegeben, $n=5-7$, $*P<0.05$ zur Dexamethason-Behandlung.

3.1.2.2 Regulation des Glucocorticoid-induzierten ENaC durch Endiandra-Extrakt in humanen Kolonzellen unter entzündlichen Bedingungen

Der denkbare Effekt des Endiandra-Extraktes, welcher im Rattengewebe allerdings die Signifikanz verfehlte, sollte nun zusätzlich im intestinalen Zellkulturmodell untersucht werden. Hierfür wurden die ausgesäten Filter der HT-29/B6-GR-Zellen, wie beschrieben in 3. 1. 1. 5, für 24 Stunden mit Dexamethason (1 μM), $\text{TNF-}\alpha$ (500 IU/ml) und unterschiedlichen Extraktkonzentrationen behandelt. In Ussing-Experimenten wurde die ENaC-vermittelten Na^+ -Resorption anhand der Differenz des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms (ΔI_{sc}) vor und nach Zugabe des ENaC-Blockers Amilorid (10^{-4} M) festgestellt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3. 26 A abgebildet und offenbaren, dass der Extrakt in der Zelllinie HT-29/B6-GR konzentrationsabhängig den Synergismus zwischen Dexamethason und $\text{TNF-}\alpha$ stärkt und

eine Steigerung des ΔI_{SC} induziert. Der ENaC-vermittelte Na^+ -Transport wird von $1.4 \pm 0.2 \mu A/cm^2$ unter der Ko-Inkubation Dexamethason und TNF- α auf $2.2 \pm 0.2 \mu A/cm^2$ durch eine zusätzliche 10 $\mu g/ml$ Extrakt-Stimulation intensiviert. Die Behandlungen mit geringeren Extrakt-Konzentrationen erzeugten keine signifikante Erhöhung des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms (Abb. 3. 26 A). Auffällig erschien hier zum ersten Mal die Erhöhung des ΔI_{SC} bei gesteigerter DMSO-Konzentration. Um eine DMSO-induzierte ENaC-Aktivierung auszuschließen, wurden die Zellen mit DMSO inkubiert und der Amilorid-sensitiven Kurzschlussstrom mittels Ussing-Experimenten nach 24-stündiger Behandlung bestimmt. Das verwendete Lösungsmittel DMSO konnte eine unbedeutende, nicht signifikante Erhöhung des ΔI_{SC} verursachen, die jedoch in keinem Verhältnis zum Extrakt- bzw. zur Endiandrin A-induzierten Steigerung steht (Abb. 3. 26 B). Ebenso zeigten Real-time PCR-Ergebnisse auf, dass das Einsetzen von DMSO zur Dexamethason und TNF- α Behandlung keinen Effekt auf die Steigerung der mRNA-Expression von der β - und γ -ENaC-Untereinheit hat (Daten nicht aufgeführt). Die Ergebnisse der Zellkultur-Experimente belegen, dass der Extrakt der *E. anthropophagorum* DOMIN anscheinend, ebenso wie Endiandrin A, pharmakologische Effekte auf den intestinalen ENaC ausübt und somit den elektrogenen Na^+ -Transport kann.

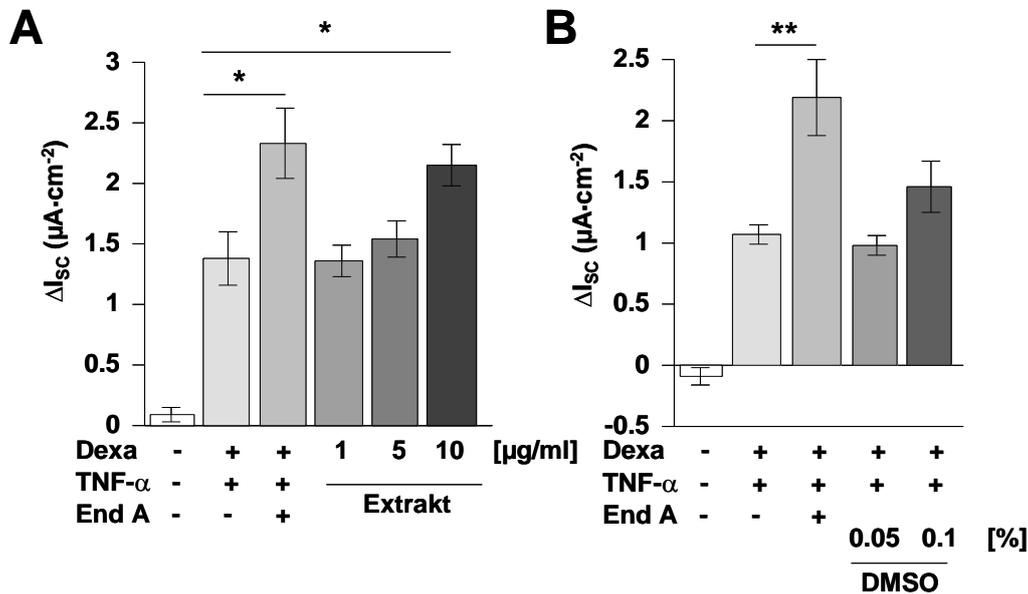


Abb. 3.26: Induktion der ENaC-vermittelten Na^+ -Resorption unter Dexamethason, $\text{TNF-}\alpha$ und Endiandra-Extrakt, bzw. DMSO-Behandlung in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. (A) Anschließend wurden die Zellen mit Dexamethason (1 μM), $\text{TNF-}\alpha$ (500 IU/ml), Endiandrin A (20 μM) und Extrakt für 24 Stunden inkubiert. Der ENaC-vermittelte Na^+ -Transport wurde mittels Zugabe von Amilorid (10^{-4} M) bestimmt. Ergebnisse sind als MW \pm s.e.m. angegeben, $n=8-11$, * $P<0.05$ verglichen mit Dexamethason- und $\text{TNF-}\alpha$ -Stimulation.

(B) Die Zellen wurden mit Dexamethason (1 μM), $\text{TNF-}\alpha$ (500 IU/ml), Endiandrin A (20 μM) und DMSO für 24 Stunden inkubiert. Der ENaC-vermittelte Na^+ -Transport wurde mittels Zugabe von Amilorid (10^{-4} M) bestimmt. Ergebnisse sind als MW \pm s.e.m. angegeben, $n=3-8$, ** $P<0.01$ verglichen mit Dexamethason- und $\text{TNF-}\alpha$ -Stimulation.

3.1.3 Ginsenosid Rg_1

Untersuchung der Regulation des ENaC-vermittelten Na^+ -Transportes durch Ginsenosid Rg_1

Ginseng (*Panax ginseng* C.A.MEY, Araliaceae) wird als Heilpflanze seit vielen Jahren in der traditionellen angewandten Medizin eingesetzt. Die beschriebenen Wirkungen reichen dabei beispielhaft von anti-karzinogenen, -diabetogenen bis hin zu -inflammatorischen [38, 40]. Dabei wird oft einem Inhaltsstoff, dem Ginsenosid Rg_1 , die Hauptwirkung zugeschrieben. In einigen Studien ist auch Ginsenosid Rg_1 ebenso wie Endiandrin A als GR-Ligand charakterisiert worden [29, 31, 42]. Es sollte nun in der vorliegenden Arbeit analysiert werden, ob Ginsenosid Rg_1 Einfluss auf ein GC-abhängiges System, im Speziellen auf die GC-induzierbare elektrogene Na^+ -Resorption hat. Hierfür wurde an der humanen Kolonzelllinie

HT-29/B6-GR mittels Ussing-Experimenten untersucht, inwieweit Ginsenosid Rg₁ den ENaC selbständig aktivieren bzw. den bereits beschriebenen Synergismus von Dexamethason und TNF- α unterstützen kann [165]. Es wurden konfluente und hormonfrei-gesetzte HT-29/B6-GR-Zellen für 24 Stunden mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Ginsenosid Rg₁ (15 μ M) behandelt. Die eingesetzte Konzentration von 15 μ M Ginsenosid Rg₁ sind mit der vorangegangenen Studie von Lee et al. begründet [42]. Die Filter wurden in Ussing-Kammern eingespannt und der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport wurde, anhand der Differenz des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms (ΔI_{SC}) vor und nach Zugabe des ENaC-Blockers Amilorid (10⁻⁴ M) festgestellt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.27 dargestellt und dienen jedoch aufgrund einer geringen Probenanzahl nur als Vorversuch. Sie deuten aber dennoch schon darauf hin, dass Ginsenosid Rg₁ in der Zelllinie HT-29/B6-GR allein keine Steigerung des ΔI_{SC} induziert. Ebenfalls wurde der Synergismus zwischen Dexamethason und TNF- α nicht verstärkt, sondern der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom scheint eher durch Ginsenosid Rg₁ gehemmt werden (allerdings war keine statistische Signifikanz feststellbar). Hingegen zeigte die Inkubation mit Endiandrin A, welche als Positivkontrolle dient, den erwarteten Anstieg des ΔI_{SC} verglichen mit der Ko-Inkubation Dexamethason und TNF- α . Zur weiteren Analyse eines Ginsenosid Rg₁-Effektes wurden zum einen pGRE-Luc Reporter-Gen-Assays und zum anderen β - und γ -ENaC mRNA-Untersuchungen mittels Real-time PCR durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen abermals auf, dass Ginsenosid Rg₁ keinen Effekt auf eine GR-Transaktivierung hat sowie keine Steigerung der durch den Synergismus zwischen Dexamethason- und TNF- α -induzierten mRNA-Expression von β - und γ -ENaC-Untereinheit bewirkt (Daten nicht aufgeführt).

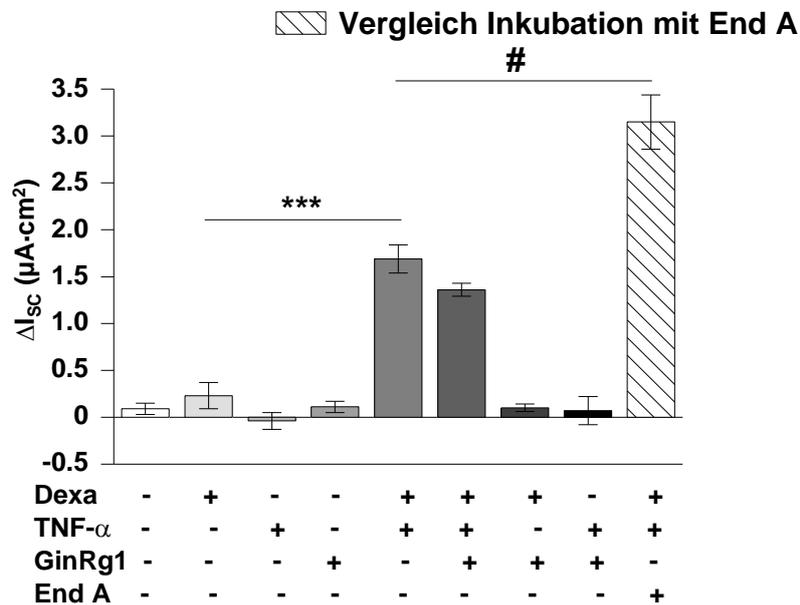


Abb. 3.27: Der Einfluss von Ginsenosid Rg₁ HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml), Ginsenosid Rg₁ (GinRg1) und als Positivkontrolle mit Endiandrin A (20 μ M) für 24 Stunden inkubiert. Der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport wurde mittels Zugabe von Amilorid (10⁻⁴ M) bestimmt. Ergebnisse sind als MW \pm s.e.m. angegeben, n=3-6, ***P<0.001 verglichen mit Dexamethason-Stimulation, #P<0.05 verglichen mit Dexamethason- und TNF- α - Behandlung.

Die Vorversuche in der vorliegenden Arbeit deuten daraufhin, dass Ginsenosid Rg₁ entgegen den Hoffnungen keine GR-modulierende Eigenschaften in HT-29/B6-GR-Zellen aufzeigt. Des Weiteren wirkt Ginsenosid Rg₁ anscheinend nicht auf die GC-induzierbare elektrogene Na⁺-Resorption unter entzündlichen Bedingungen.

3.1.4 Saikosaponin D

Untersuchung der Regulation des ENaC-vermittelten Na⁺-Transportes durch Saikosaponin D

Die Pflanzengattung *Bupleurum* (Apiaceae) wird ebenso wie Ginseng seit langer Zeit traditionell in der asiatischen Medizin angewendet. In vielen angemischten Teerezepturen sind Bupleurum-Wurzeln ein Hauptbestandteil, denen vor allem eine reinigende und entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben wird [51, 59]. Das Saikosaponin D, welches zu den wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen gezählt wird, weist GR-bindende Eigenschaft auf [32]. Es war demnach interessant zu untersuchen, ob Saikosaponin D den GC-modulierenden intestinalen, elektrogenen Na⁺-Transport durch den ENaC steuern kann.

Ähnlich den Versuchsanordnungen in 3. 1. 3, wurde an der Zelllinie HT-29/B6-GR analysiert, ob Saikosaponin D in der Lage ist, den ENaC zu aktivieren bzw. Einfluss auf den bereits beschriebenen Synergismus von Dexamethason und TNF- α besitzt [165]. Der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom wurde mittels Ussing-Experimenten nach einer 24-stündigen Behandlung mit Dexamethason (1 μ M), TNF- α (500 IU/ml) und Saikosaponin D (1 μ M) ermittelt. Die Konzentration von 1 μ M Saikosaponin D wurde gewählt, da bei höheren Konzentrationen leichte zytotoxische Eigenschaften beobachtet wurden (Daten nicht aufgeführt). Ebenso wie im Abschnitt des Ginsenosid Rg₁ (3. 1. 1. 4) wird daraufhingewiesen, dass es sich hier aufgrund einer geringeren Probenanzahl nur um einen Vorversuch handelt. In der Abbildung 3.28 A wird aber dennoch deutlich, dass Saikosaponin D sowohl in alleiniger Zugabe, als auch in der Kombination mit Dexamethason und TNF- α , keinen Anstieg des ΔI_{SC} zu induzieren vermag (Abb. 3.28 A). Interessanterweise konnte bei einer längeren Inkubation ein inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit Dexamethason (1 μ M) und Saikosaponin D (1 μ M) behandelt. Anschließend ist der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom in der Ussing-Kammer ermittelt worden. Die Daten offenbaren ein Verminderung des ΔI_{SC} von $0.40 \pm 0.05 \mu A/cm^2$ unter Dexamethason auf $0.26 \pm 0.04 \mu A/cm^2$ bei der Behandlung mit Dexamethason und Saikosaponin D (Abb. 3. 28 B). Demgegenüber konnte durch zusätzliche 48-stündige Endiandrin A-Stimulation der induzierte-Dexamethason Kurzschlussstrom erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Mittels pGRE-Luc Reporter-Gen-Assays wurde nochmals experimentell bestätigt, dass Saikosaponin D keinen Effekt auf eine GR-Transaktivierung hat (Daten nicht aufgeführt). Durch diese aufgeführten Ergebnisse konnte eine GR-aktivierende Eigenschaft von Saikosaponin D und eine Beeinflussung des Synergismus von Dexamethason und TNF- α durch Saikosaponin D in HT-29/B6-GR-Zellen ausgeschlossen werden. Saikosaponin D scheint sogar den induzierten Dexamethason-Effekt nach längerer Behandlungsdauer zu inhibieren.

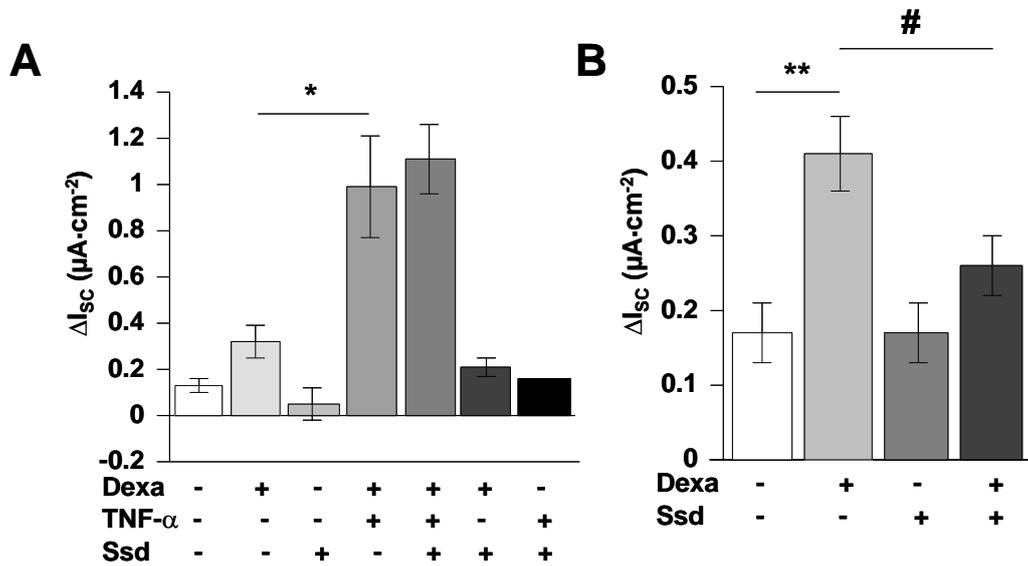


Abb. 3.28: Der Einfluss von Saikosaponin D in HT-29/B6-GR-Zellen

Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 Stunden hormonfrei (hf) gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Dexamethason (1 μM), TNF-α (500 IU/ml), Saikosaponin D (Ssd) (1 μM) für 24 (A) oder 48 (B) Stunden inkubiert. Der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport wurde mittels Zugabe von Amilorid (10⁻⁴ M) bestimmt. Ergebnisse sind als MW ± s.e.m. angegeben, (A) n=2-6, *P<0.05 verglichen mit Dexamethason- und TNF-α-Behandlung, (B) n=6-10, **P<0.01 verglichen mit unbehandelter Kontrolle, #P<0.05 verglichen mit Dexamethason-Stimulation.

3.2 Phytochemische Untersuchung von Bupleurum-Extrakten

Als kleines Teilprojekt wurden in der vorliegenden Arbeit Bupleurum-Extrakte phytochemisch untersucht. Die Gattung *Bupleurum sp.*, zugehörig der Pflanzenfamilie Apiaceae (Doldenblütler), ist hauptsächlich auf der nördlichen Hemisphäre vertreten und besitzt, wie bereits berichtet, seit Jahrhunderten ein breites Anwendungsspektrum in der traditionellen asiatischen Medizin. Vor allem die Arten *B. falcatum* L. und *B. chinensis* DC. werden häufig für therapeutische Maßnahmen eingesetzt, wobei sich die Auswahl der Art je nach angewandter Therapierichtung (koreanisch bzw. chinesisch) richtet. In Europa ist ebenso eine Spezies, die *B. falcatum* L. s. str., beheimatet. Die Charakterisierung der einzelnen Spezies wird heutzutage mittels Gensequenzierung durchgeführt [49, 50]. Nichtsdestotrotz sollte in der vorliegenden Arbeit erforscht werden, mit welchem der verschiedenen beschriebenen Extraktionsverfahren die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe, die Saikosaponine, am besten isoliert werden und somit für weitere chemische Untersuchungen zur Verfügung stehen könnten. Außerdem war interessant zu analysieren, wie sich beispielsweise die europäischen oder die chinesischen Bupleurum-Arten in Hinblick auf ihre Wirkstoffkonzentrationen unterscheiden. Mittels chromatographischer Verfahren wurden verschiedene Extrakte und Extraktionsmethoden miteinander verglichen. Die Ergebnisse dazu sind im Folgenden dargestellt.

3.2.1 Dünnschichtchromatographie von Bupleurum-Extrakten und Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden

In der Literatur sind einige Extraktionsmethoden für die Isolierung der wirksamkeitsbestimmenden Bupleurum-Saikosaponine beschrieben. Es wurden für diese Arbeit fünf verschiedene Verfahren herangezogen, die bereits im Abschnitt 2. 2. 1. 1. erläutert worden sind. Im Allgemeinen unterscheiden sich die Methoden im Extraktionsmittel und in der Extraktionsdauer. Als Drogenmaterial wurden zum einen als Vertreter der europäischen *B. falcatum* L. Spezies ein von der Universität Bonn beigesteuertes Pflanzenmaterial, zum anderen bereits von einer Apotheke abgefüllte Wurzeln der *B. chinensis* DC. (entsprach dem europäischen Arzneibuch) verwendet. Nachdem die Extrakte hergestellt worden sind, sind sie zur qualitativen Analyse der Extrakte und zum Vergleich der unterschiedlichen angewandten Extraktionsverfahren auf Kieselgelplatten aufgetragen worden. Anschließend wurden drei verschiedene Trennverfahren angewandt, die sich im gebrauchten Fließmittel

(FM) unterschieden. Die Abbildung 3. 29 behandelt Drogenmaterial der *B. falcatum* L.: Es ist erkennbar, dass sowohl die unterschiedlichen angewandten Extraktionsverfahren als auch die eingesetzten Fließmittel unterschiedliche Ergebnisse hervorbringen.

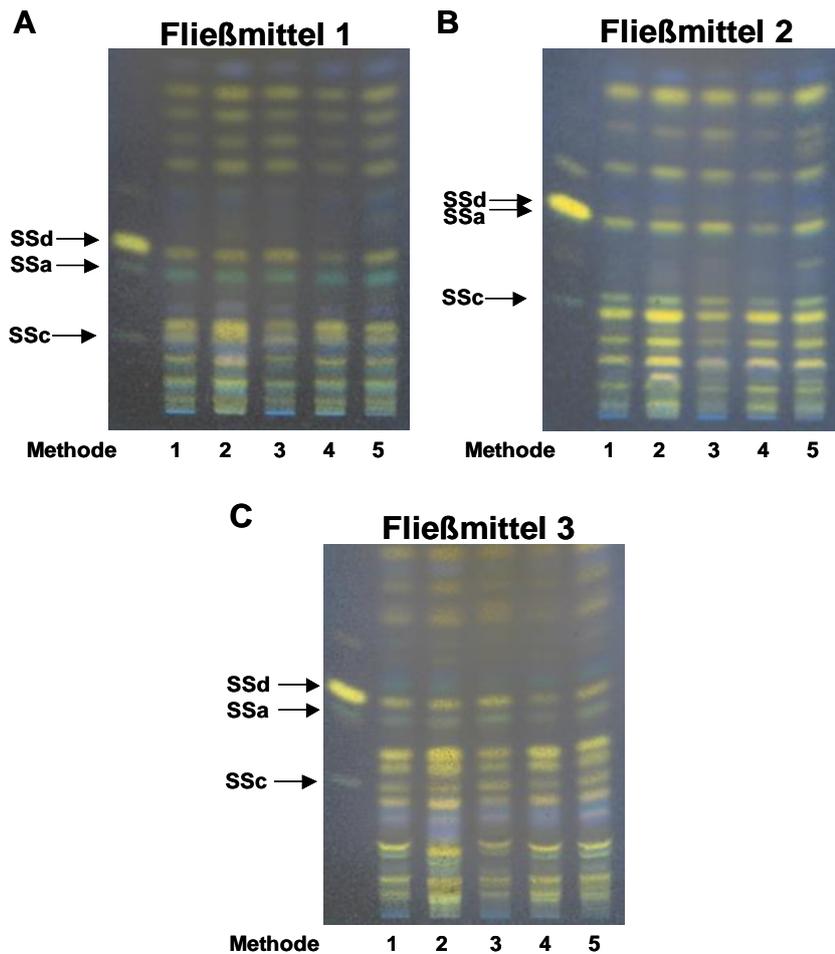


Abb. 3.29: Vergleich von verschiedenen Extraktions- und Trennverfahren von dem Pflanzenmaterial der *Bupleurum falcatum* L.

Es wurden jeweils als Referenzsubstanzen Saikosaponin A (SSa), C (SSc) und D (SSd) benutzt. Die Droge *B. falcatum* L. wurde mittels 5 verschiedener Extraktionsverfahren extrahiert (Methode 1 bis 5). Anschließend sind die Extrakte gemeinsam mit den Referenzsubstanzen auf Kieselplatten aufgetragen worden. Die Platten wurden unter Kammer sättigung entwickelt. Das Detektionsmittel war ethanolisch-schwefelsaure DMAB-Lösung. Die Platten sind auf 105 °C erhitzt worden.

(A) FM 1 nach Tian et al. 2009 [168].

(B) FM 2 nach Japn. Pharmakopöe.

(C) FM 3 nach dem AB der chinesischen Medizin und Yen et al 1991 [170].

Das FM 2 (Chloroform:Methanol:H₂O_{bidest}, 30:10:1, Abb. 3. 29 B) erwies sich für die Trennung der bedeutenden Inhaltsstoffe als nicht optimal. Es zeigt sich, dass die Saikosaponine A und D unter diesen Umständen nicht genügend voneinander getrennt werden konnten. Wurden die Kieselgelplatten mit dem FM 1 und 3 behandelt, wurde bei beiden eine gute Auftrennung der Inhaltsstoffe erzielt. Insgesamt erschien jedoch das FM 3 (Ethylacetat: Ethanol:H₂O_{bidest}, 8:2:1, Abb. 3. 29 C) als das geeignetste, da die polaren Stoffe besser aufgetrennt wurden. Das FM 1 unterscheidet sich vom FM 3 in seiner Polarität. Es ist aufgrund der eingesetzten Lösungsmittel (Dichlormethan:Ethylacetat:Methanol:H₂O_{bidest}, 30:40:15:3, Abb. 3. 29 A) unpolarer und kann demnach nur eine unvollständigere Trennung der polaren Stoffe erzeugen. Beim Vergleich der verschiedenen Extraktionsmethoden deuten die aufgezeigten Kieselplatten daraufhin, dass die Methoden 1 und 4 im Vergleich zu den drei weiteren Verfahren offenbar ein schwächeres Extraktionspotential besitzen, da einige Banden optisch schwächer erschienen. Um den Gehalt der Saikosaponine in den verschiedenen Extrakten nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ analysieren zu können, müssten nachfolgend weitere chromatographische Bestimmungsmethoden eingesetzt werden. Zusammenfassend lässt sich über die Abb. 3. 29 sagen, dass sich für die Isolierung der Bupleurum-Inhaltsstoffe aus der *B. falcatum* L. die Methoden 2, 3 und 5 bzw. für ein anschließendes Trennverfahren der isolierten Inhaltsstoffe das FM 3 am besten eignen.

Abschließend wurde der qualitative Gehalt an Saikosaponinen von *B. chinensis* DC. untersucht. In der Literatur ist beschrieben, dass die asiatischen Bupleurum-Spezies den höchsten Gehalt an wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen aufweisen. Nachfolgend wurden *B. chinensis* DC. und die europäische Art *B. falcatum* L. miteinander verglichen. Mittels der Methode 4, die den geringsten Zeitaufwand darstellte, wurde die Droge *B. chinensis* DC. extrahiert. Der Extrakt wurde auf die Kieselgelplatte aufgebracht, wo sich zusätzlich die Referenzsubstanzen (Saikosaponin A, C und D) und die Extrakte der *B. falcatum* L. befanden. Die Platte wurde mit dem FM 3 entwickelt.

Obwohl nur die Methode 4 angewandt worden ist, war interessanterweise ein qualitativ höherer Gehalt an Saikosaponin D aus der *B. chinensis* DC. feststellbar. Wie bereits erwähnt, scheint das Extraktionsverfahren nach dem chinesischen Arzneibuch für die Isolierung von Saikosaponinen, insbesondere dem bedeutenden Saikosaponin D, aus *B. falcatum* L. eher ungeeignet. Dennoch wird im Vergleich ersichtlich, dass *B. chinensis* DC. erheblich höhere Konzentrationen an Saikosaponinen aufweist.

Ergebnisse

Außerdem scheinen polare Inhaltsstoffe, die in der europäischen *B. falcatum* L. vorhanden sind, nicht in der chinesischen Spezies vertreten zu sein (Abb. 3. 30). Mit dem Ergebnis der höheren Konzentrationen wirksamkeitsbestimmender Substanzen, könnte der generelle Einsatz asiatischen Gattungen in der traditionellen Medizin begründet werden.

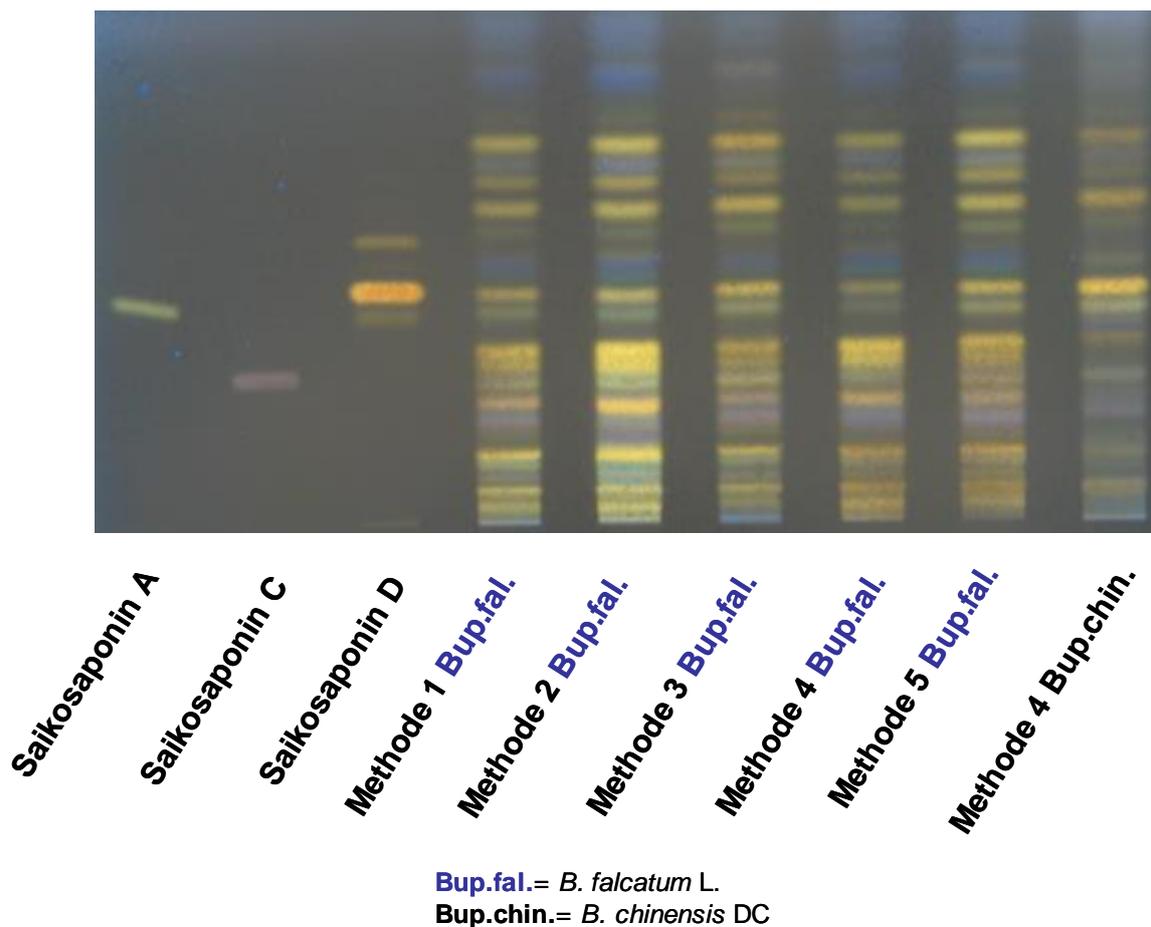


Abb. 3.30: Vergleich von *Bupleurum falcatum* L. und *Bupleurum chinensis* DC.

Es wurden jeweils als Referenzsubstanzen Saikosaponin A (SSa), C (SSc) und D (SSd) benutzt. Die Droge *B. falcatum* L. wurde mittels 5 verschiedenen Extraktionsverfahren extrahiert (Methode 1 bis 5). Die Droge *B. chinensis* DC. wurde mittels der Extraktionsmethode 4 extrahiert (Methode 4). Anschließend sind die Extrakte gemeinsam mit den Referenzsubstanzen auf Kieselfplatten aufgetragen worden. Die Platten wurden mit dem FM 3 nach dem AB der chinesischen Medizin und Yen et al 1991 und unter Kammer-sättigung entwickelt. Das Detektionsmittel war ethanologisch-schwefelsaure DMAB-Lösung. Die Platte ist auf 105 °C erhitzt worden.

4 Diskussion

4.1 Aktueller Stellenwert von pflanzlichen Glucocorticoidrezeptor-Modulatoren in der Therapie von entzündlichen Erkrankungen

Eine Entzündung ist eine natürliche Abwehrreaktion des Immunsystems auf innere bzw. äußere Reize mit der Funktion, die auf das Gewebe einfallende Störung zu vernichten und verursachte Gewebsschädigungen zu beheben. Unter physiologischen Bedingungen kann eine Entzündungen relativ schnell abklingen. Jedoch können ebenso, wenn die entzündlichen Herde nicht vollständig ausheilen, chronische Formen entstehen. Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass einige Erkrankungen durch chronisch-entzündliche Prozesse eingeleitet werden, wobei das Krankheitsbild des Asthma bronchiale oder der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) beispielhaft zu erwähnen sind. In der westlichen Medizin werden Entzündungen mit verschiedenen Wirkstoffklassen behandelt. Hierbei steht die Symptombekämpfung, vor allem die Schmerz- und Entzündungsunterdrückung, im Vordergrund. Gleichzeitig dient die schulmedizinische Therapie aber auch dem Wohlbefinden eines jeden Patienten, denn das Leiden im jeweiligen Krankheitsbild wird oft erträglicher gemacht. Als anti-entzündliche bzw. immunsupprimierende Wirkstoffe werden hauptsächlich Klassen der nicht-steroidalen Antiphlogistika (z.B. Metamizol oder Acetylsalicylsäure), Glucocorticoide (GC) (z.B. Dexamethason oder Beclometason) und monoklonale Antikörper (z.B. Infliximab oder Rituximab) eingesetzt [189]. Häufig wird allerdings beobachtet, dass eine schulmedizinisch-angesetzte Therapie nicht den gewollten oder erhofften Therapieerfolg bewirkt.

Interessant ist, dass einige der entzündlichen Erkrankungen in der Häufigkeit erst seit Mitte des 20. Jahrhunderts in Erscheinung traten, wovon die CEDs nur ein Beispiel sind [190]. In dem Zusammenhang konnte mittlerweile in vielen Studien gezeigt werden, dass zusätzlich oft Umweltfaktoren, medikamentöse Vorbehandlungen, Begleiterkrankungen und genetische Prädispositionen eine Rolle bei der Entstehung entzündlicher Erkrankungen spielen. Zunehmend ist zu beobachten, dass Mediziner ganzheitlich an eine Krankheit herangehen. Anders als in der Schulmedizin sollen in der Komplementärmedizin, auch Alternativmedizin genannt, die eigenen Selbstheilungskräfte aktiviert und die Ursachen der Erkrankung bekämpft werden. Vielerorts werden heutzutage beide Therapierichtungen miteinander kombiniert, um

die Entzündung im Körper zu heilen und gleichzeitig das Leiden des Patienten minimal zu halten, was vor allem in akut-entzündlichen Schüben im Vordergrund steht. Häufig ist bei chronisch-verlaufenden Formen eine medikamentöse Langzeittherapie nötig. Es können daher im Laufe der Therapiedauer schwerwiegende Nebenwirkungen von schulmedizinischen Wirkstoffen auftreten. In der Forschung wird nun seit einigen Jahren das Ziel verfolgt spezifische Medikamente zu entwickeln, welche einerseits die Entzündung wirkungsvoll bekämpfen und andererseits keine oder nur minimale Nebenwirkungen besitzen. Neben der Suche nach neuen synthetischen Wirkstoffen ist schon länger insbesondere das Interesse an der Naturheilkunde gewachsen. Viele Studien behandeln bekannte und weniger bekannte Heilpflanzen bzw. deren Inhaltsstoffe, welche die Stoffklasse der Entzündungshemmer ersetzen könnten [191-193]. Zum Beispiel offenbarte sich Curcumin, ein Polyphenol aus der Pflanze *Curcuma longa* L. (Papaveraceae, Mohngewächse), als effektives Antiphlogistikum. An verschiedenen Zelllinien, u. a. Mono Mac 6 (eine humane Makrophagen-Zelllinie) und ML-1a (eine humane Myelomzelllinie), konnte die Aktivität des NF κ B-Signalweges durch Curcumin gehemmt werden. Zudem verursachte Curcumin eine Inhibition von TNF- α und weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen [194, 195]. Diese anti-inflammatorischen Effekte und ebenso ein geringes Nebenwirkungspotential begründen mittlerweile den möglichen Einsatz von Curcumin bei entzündlichen Erkrankungen, wie den CED sowie auch bei bestimmten Krebsleiden [196-199].

Andererseits werden in den letzten Jahren auch immer häufiger Glucocorticoidrezeptor (GR)-Modulatoren erforscht, wobei in der vorliegenden Arbeit im Folgenden ausschließlich auf die pflanzlichen eingegangen wird. Der GR-Signalweg kann eine entscheidende Rolle in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen spielen. Die Zielsetzung der Forschung besteht darin, GR-Modulatoren zu charakterisieren, welche den GR binden und folglich die entzündlichen Signalwege beeinflussen könnten. Dabei sollten die GR-Liganden jedoch keine oder nur geringe transaktivierende Wirkungen aufweisen, da diese hauptsächlich für die Entstehung GC-assoziiertes Nebenwirkungen verantwortlich sind. In der Literatur sind zwei verschiedene Forschungsansätze zu finden. Zum einen beschreiben Studien pflanzliche GR-Liganden ohne eine mögliche Wirkung der Pflanzenstoffe auf den GR-Signalweg aufzuzeigen. Zum anderen werden einige Inhaltsstoffe auch genauer in verschiedenen in vitro- bzw. in vivo-Systemen charakterisiert. In HeLa-Zellen (eine humane epitheliale Zervixkarzinomzelllinie) konnte Sanguinarin, ein Alkaloid vorkommend beispielsweise im Schöllkraut *Chelidonium majus* L., den GR binden und anti-entzündliche Eigenschaften offenbaren.

Dabei wurde weder eine GR- noch eine NF κ B-induzierte Transkription ausgelöst [200]. Die Betulinsäure, eine Triterpencarbonsäure, häufig vorzufinden in Rinden der Familien Platanacea (Planatengewächse) oder Betulaceae (Birkengewächse) bzw. in *Diospyros leucomelas* Poir. (Ebenaceae, Ebenholzgewächse), erwies sich als potenter GR-Modulator, konnte chronische Hautentzündungen verbessern und Carrageen- oder Serotonin-induzierte murine Pfotenödeme inhibieren [201, 202]. Doch da sowohl Sanguinarin, als auch Betulinsäure teilweise zytotoxische, apoptotische und anti-karzinogene Wirkungen hervorrufen können, wurden in der vorgelegten Arbeit beide Stoffe für weitere Analysen vernachlässigt [203, 204]. In einigen Studien konnten nachgewiesen werden, dass Inhaltsstoffe aus den asiatisch-traditionell-verwendeten Heilpflanzen Ginseng und Hasenohr (*Bupleurum*) ebenso GR-induzierte Effekte bewirkten. In einem späteren Abschnitt werden die Pflanzen und deren Inhaltsstoffe nochmals im Detail erläutert (siehe Abschnitt 4.1.2.). Sundaicumon A und B, polyprenylierte Acylphloroglucin-Derivate aus *Calophyllum sundaicum* P.F.Stev (Clusiaceae, Balsamapfelgewächse), sowie Ellipticin, ein Alkaloid aus *Ochrosia moorei* F.Muell. (Apocyanaceae, Hundsgiftgewächse) zeigten eine GR-Bindungsaffinität auf, welche mit einem löslichen GR-Bindungsassay ermittelt worden ist. In Bezug auf den GR wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch für beide Stoffe keine weiteren Forschungsergebnisse veröffentlicht, was zum einen an der nur sehr schwachen Bindung der Sundaicumone und zum anderen an der bekannten inhibierenden Wirkung des Ellipticines auf die DNA-Topoisomerase II liegen könnte [205, 206]. Ebenfalls ist der noch wenig charakterisierte Pflanzeninhaltsstoff Endiandrin A als GR-Ligand beschrieben worden, jedoch sind gegenwärtig keine zusätzlichen GR-induzierten Wirkungen bekannt [30].

Es wird ersichtlich, dass die Forschung in der Thematik der pflanzlichen GR-Modulatoren noch in den Anfängen ist. Einige der charakterisierten Pflanzen scheinen zwar eine lange Anwendungstradition in der anti-entzündlichen Therapie zu besitzen, eine GR-Wirkung ist dennoch nur teilweise aufgeklärt. Andere Pflanzen und deren Inhaltsstoffe sind neu entdeckt und wenig bis gar nichts ist bekannt bezüglich einer Beeinflussung des GR-Signalwegs. In der vorliegenden Arbeit stand neben Ginsenosid Rg₁ aus dem Ginseng und Saikosaponin D aus dem Hasenohr, vor allem das Endiandrin A im Fokus. Angesichts ihrer GR-Bindungsaffinität und teilweise bewirkten GR-Effekte wurde erforscht, inwieweit sie einen GC-induzierten Signalweg, den intestinalen epithelien Na⁺-Kanal (ENaC)-vermittelten Na⁺-Transport, steuern können.

4.1.1 Lignane der australischen Pflanze *Endiandra anthropophagum* DOMIN als Glucocorticoidrezeptor-Modulatoren

Endiandra anthropophagum DOMIN ist eine ausschließlich in Australien beheimatete Pflanze. Sie wird der Familie der Lauraceae, bzw. der Gattung *Endiandra* zugeordnet. Interessant ist, dass mehr als ein Drittel der bekannten *Endiandra*-Arten in Australien, neben dem Süd-Ostasiatischen- und West-Pazifischen-Raum, zu finden sind (Maberley 1997). Die Pflanze *Endiandra anthropophagum* DOMIN fiel in einem Hochdurchsatz-Screening (High-Throughput-Screening; HTS) nach potentiellen GR-Liganden auf. Neben bekannten Naturstoffen, wie Nectandrin B und (-)-Nordihydroguajaretsäure, wurden neue Inhaltsstoffe, das Endiandrin A und B, im Wurzelextrakt der Pflanze gefunden und charakterisiert. Strukturell sind Endiandrin A und B den Cyclobutan-Lignanen zuzuordnen. Die Stoffklasse der Lignane zeichnet sich durch eine dimere Phenylpropanoide-Struktur aus. Viele Studien beschreiben für Lignane östrogene bzw. anti-östrogene Wirkung, die den Einsatz in der phytoöstrogenen Therapie, u. a. bei Wechseljahres-Beschwerden, begründen [207]. Lein, *Linum usitatissimum* L. (Linaceae, Leingewächse), und Sesam, *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae, Sesamgewächse) werden nicht nur in der Nahrungsmittelindustrie, sondern genauso in der Alternativmedizin genutzt und wären hier nur beispielhaft zu erwähnen. So wurde an den humanen Chorionkarzinom-Zelllinien Jeg 3 und BeWo gezeigt, dass der Extrakt des Leins deutlich den Östrogen- und Progesteronhaushalt beeinflusst [208, 209]. Ebenso offenbarten Inhaltsstoffe aus Sesamsamen, insbesondere Sesamin und Sesamol, östrogene und anti-östrogene Eigenschaften [210]. Daneben werden Lignane auch als anti-entzündliche Wirkstoffe dargestellt. In RAW 264.7 Zellen, eine murine Makrophagen-Zelllinie, wurden inflammatorische Signalwege durch Inhaltsstoffe aus der Schwarznessel, *Perilla frutescens* (L.) BRITTON (Lamiaceae, Lippenblütler), und dem chinesischen Eidechschwanz, *Saururus chinensis* (LOUR.) BAILL. (Saururaceae, Eidechschwanzgewächse), inhibiert [211, 212]. Ein Lignan, welches GR-bindende Eigenschaft aufweist, wurde allerdings erst kürzlich publiziert.

Endiandrin A wird aufgrund seiner Bindungsaffinität zum GR als pflanzlicher GR-Ligand dargestellt [30]. Nichtsdestotrotz wurde jedoch bislang noch nicht untersucht, ob Endiandrin A den Rezeptor in vitro bzw. in vivo aktivieren kann. In der vorliegenden Studie wurde nun die GR-Funktionalität von Endiandrin A ermittelt. Es stellte sich heraus, dass Endiandrin A den GR nicht nur binden, sondern auch die ENaC-Funktion in der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6-GR, sowie im Rattenkolon beeinflussen kann. Die Effekte

von Endiandrin A auf die Regulation des ENaCs und die bei der Regulation involvierten Signalwege sind in der Abbildung 4. 3 veranschaulicht. Zudem wurde ein Wurzelextrakt der *E. anthropophagorum* DOMIN untersucht und es zeigte sich, dass auch dieser in HT-29/B6-GR-Zellen die ENaC-Funktion moduliert.

Nach Aktivierung des GRs kann sich zunächst ein GR-Dimer ausbilden, welcher anschließend in den Zellkern transloziert und dort an spezifische DNA-Sequenzen, den Glucocorticoid responsive elements (GRE), bindet. Die Bindung an den GRE hat zur Folge, dass zum einen Transaktivierungen und zum anderen Transrepressionen von Zielgenen induziert werden können [213, 214]. Neue GR-Modulatoren sollten neben einem gewünschten anti-inflammatorischen Effekt keine transkriptionellen Wirkungen aufweisen, da diese vor allem die Nebenwirkungen einer GC-Langzeittherapie bewirken [215]. Wie bereits erwähnt, sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nur einige wenige pflanzliche GR-Modulatoren beschrieben. Bei der Zusammenstellung der Liganden fällt auf, dass die meisten eine steroidartige Struktur aufweisen, wodurch ihr Effekt auf den GR begründet werden könnte. In der Abb. 4. 1 sind einige pflanzliche Inhaltsstoffe dargestellt. Neben Ginsenosid Rg₁ (Gin-Rg₁, Abb. 4. 1A) und Saikosaponin D (SsD, Abb. 4. 1B), welche in einem späteren Abschnitt vorgestellt werden, weist ebenso Avicin D (Abb. 4. 1C) ein Steroid-Grundgerüst auf [31, 32, 42, 216]. Avicin D, ein pflanzliches Triterpenoid aus der australischen Pflanze *Acacia victoriae* BENTH. (Fabaceae, Hülsenfrüchtler), offenbarte an verschiedenen humanen Karzinomzelllinien GR-modulierende Eigenschaften [216]. Allerdings besitzt Avicin D dazu apoptotische Effekte und eine permeabilisierende Wirkung auf Zellmembranen, was einen Therapieeinsatz möglicherweise erschweren wird [217, 218]. Wie ersichtlich in der Abbildung 4. 1 wird, scheint Endiandrin A hingegen ein spezieller GR-Ligand zu sein, da es eine eher untypische Struktur aufweist (Abb. 4. 1D).

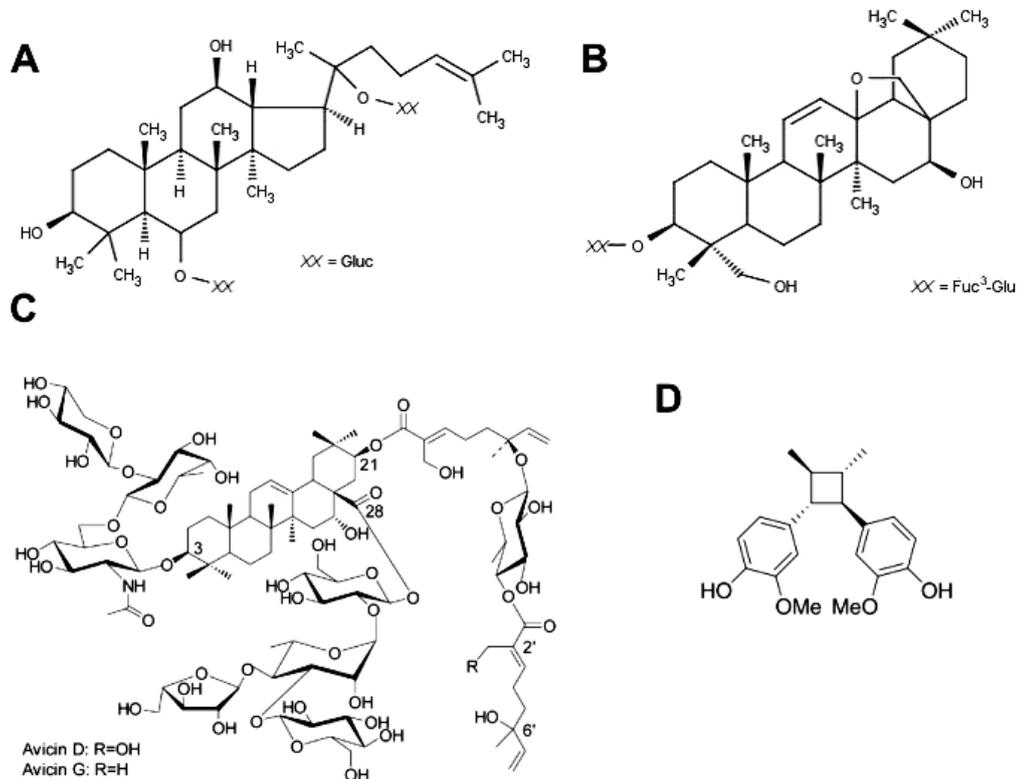
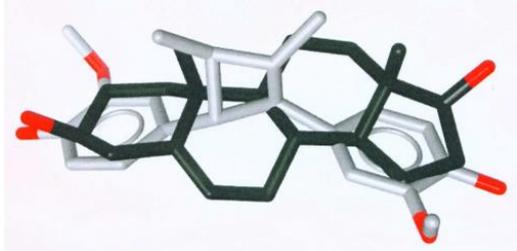


Abb. 4.1: Pflanzliche GR-Liganden

- (A) Ginsenosid Rg₁.
- (B) Saikosaponin D.
- (C) Avicin D und G (entnommen aus Gutterman et al. 2005).
- (D) Endiandrin A (entnommen aus Davis et al. 2009)

In Modellierungsstudien zu der Bindungsaffinität (diente in der vorliegenden Arbeit nur als Vorversuch und ist nicht extra aufgeführt) von Endiandrin A zu einem Steroid-Rezeptor konnte jedoch tatsächlich eine Ligandenbindung festgestellt werden (Abb. 4. 2). Endiandrin A weist mehrere stereogene Zentren auf und kann auf Grund dessen eine Bindung mit dem Rezeptor eingehen. Interessant ist, dass Endiandrin B, strukturell nur in der Stereochemie zum Endiandrin A verschieden, eine geringere Bindung zum Steroidrezeptor demonstrierte (Abb. 1.2 und 4.2). In der Naturwissenschaft gibt es einige Beispiele (z.B. Glucose/Galactose oder der Fall des Thalidomids), wo Stereoisomere, welche zwar eine gleiche Konstitution, aber eine unterschiedliche räumliche Atomanordnung aufweisen, nur deshalb verschiedene Wirkungen besitzen können. Endiandrin B wurde wegen der Beobachtung einer geringeren Bindung am Steroid-Rezeptor in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.



Endiandrin A



Endiandrin B

Abb. 4.2: Modellierung einer Steroid-Bindung von Endiandrin A und B
gemeinsam mit Prof. Dr. Wolber am Computer generierte 3D-Struktur, nur beispielhaft aufgezeigt und nicht weiter erwähnt in der vorliegenden Arbeit.

Es ist bekannt, dass die Funktion des GRs durch Phosphorylierungen moduliert wird [13, 219]. Diesbezüglich zeigten Studien zum humanen GR eine Korrelation zwischen GR-Transaktivierung und einer Ser-211-Phosphorylation. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Phosphorylierung an der Position Ser-211 die nukleäre Translokation des GRs und somit die Transkription von GR-abhängigen Zielgenen induziert. Eine andere Modulation wurde beispielsweise gefunden, wenn der GR an der Position Ser-203 phosphoryliert wurde. Dann lag der Rezeptor nämlich vorwiegend im Zytosol vor [13]. In der vorliegenden Arbeit induziert Endiandrin A die GR-gesteuerte Transkription lediglich in einem geringen Maße (nur 7% des Maximaleffektes von Dexamethason). Andererseits löst es aber eine Phosphorylierung des Ser-211-GR aus. Diese Beobachtung erschien zunächst kontrovers, jedoch vermuteten Wang und seine Arbeitsgruppe, dass die Ser-211-Phosphorylierung die Struktur des GRs modifizieren könnte, um infolgedessen die Transaktivierung zu fördern [13]. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass Endiandrin A den GR ko-aktivieren und dabei gleichzeitig GC-induzierte Effekte intensivieren kann. Es zeigte sich, dass Endiandrin A sowohl die GC-induzierte Proteinexpression des aktivierten Ser-211-GR als auch die GC-induzierte Aktivierung eines GRE steigert, was folglich auf eine erhöhte Transaktivierung schließen lässt. Naturstoffe zeigen oft nicht dieselben Auswirkungen, bzw. nicht dieselbe Stärke der Auswirkungen, auf ein physiologisches System wie synthetische oder körpereigene Stoffe. Allein die Publikation von Davis und seiner Arbeitsgruppe bezüglich der Charakterisierung von Endiandrin A weist schon daraufhin, dass Endiandrin A theoretisch 1000-mal höher eingesetzt werden müsste als ein synthetisches GC, um dennoch den GR

binden und vielleicht auch GR-induzierte Wirkungen auslösen zu können. So Dexamethason als Referenzsubstanz bei einer Konzentration von ca. 2 nM, Endiandrin A aber erst bei ca. 1 μ M einen GR-bindenden Effekt auf [30]. Andererseits ist es äußerst bemerkenswert, dass der GR dennoch durch einen Pflanzeninhaltsstoff so beeinflusst wird, dass GC in ihrer Wirkung unterstützt werden und dadurch eine höhere Wirksamkeit resultiert. In dem Zusammenhang demonstrierte Endiandrin A ebenso die Fähigkeit, einen GC-gesteuerten Signalweg zu modulieren. Das pflanzliche Cyclobutan-Lignan ist imstande, durch transkriptionelle Heraufregulierung der β -, bzw. γ -ENaC-Untereinheit, den GC-induzierbaren ENaC-vermittelten Na^+ -Transport zu steigern. Somit zeigt diese Arbeit erstmalig, dass ein Lignan nicht nur den GR binden, sondern ihn auch steuern und basierend darauf ein GR-sensitives physiologisches System regulieren kann.

4.1.1.1 Beeinflussung des intestinalen epithelialen Na^+ -Kanals durch Inhaltsstoffe der *Endiandra anthropogorum* DOMIN

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) ist maßgeblich am intestinalen Elektrolyt-Transport beteiligt. Eine ENaC-Dysregulation wird vor allem in dem Krankheitsbild der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gefunden. Der erhebliche Elektrolytverlust ist hierbei hauptsächlich auf Zytokin-induzierte pathologische Signalwege, welche den ENaC-vermittelten Na^+ -Transport inhibieren, zurückzuführen [160, 220]. Mit Hilfe einer medikamentösen GC-Therapie zeigt sich jedoch eine Verbesserung der Symptome, wobei GC und $\text{TNF-}\alpha$ in dem Fall gemeinsam eine erhöhte ENaC-Aktivität durch Heraufregulierung der β - und γ -ENaC-Untereinheiten bewirken [159, 164, 165]. Dieser Effekt wird durch Inhaltsstoffe aus der australischen Pflanze *E. anthropogorum* DOMIN verstärkt. In der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6-GR unterstützen die pflanzlichen Inhaltsstoffe den Synergismus von GC und $\text{TNF-}\alpha$, was anhand der elektrophysiologischen Messungen in den Ussing-Kammern ermittelt worden ist. Überdies zeigte im Speziellen der Inhaltsstoff Endiandrin A an nativen Rattengewebe einen fördernden Effekt. Bei Aufklärung der hier zugrunde liegenden molekularen Mechanismen offenbarte sich, dass Inhaltsstoffe der Pflanze eine zusätzlich gesteigerte Expression der β - und γ -ENaC-Untereinheit induzieren. In der Hinsicht schaffen die Endiandra-Wirkstoffe einen völlig neuen Denkansatz in der ENaC-Forschung, denn in vielen Studien mit Pflanzeninhaltsstoffen wird eher ein hemmender Einfluss auf den Kanal erhofft. Das hängt vor allem damit zusammen, dass es viele Untersuchungen zu Erkrankungen wie Bluthochdruck oder Mukoviszidose mit einer gestörten

ENaC-Regulation gibt. Die Krankheitsbilder weisen oftmals eine pathologisch erhöhte Na⁺-Konzentration im Blut auf, welche mit schulmedizinischen Arzneistoffen, beispielsweise Aldosteron-Antagonisten, eingesetzt in der Bluthochdruck-Therapie, sowie in der Zukunft ebenso mit pflanzlichen Alternativen behandelt werden könnten. Der Extrakt des Stachelbeerbaumes, *Phyllanthus acidus* (L.) SKEELS. (Phyllanthaceae), zeigte in der Zellkultur und an nativen murinen Tracheengewebe die Charakteristik auf, Ionenkanäle wie den ENaC zu beeinflussen und könnte infolgedessen eine mögliche pflanzliche Alternative bei der Behandlung von Lungenerkrankungen sein [221]. Knoblauch, *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae, Amarillidgewächse), wird seit langem nicht nur als Gewürz, sondern auch als antithrombotisch- und antibakteriell-wirkende Heilpflanze geschätzt [222]. Zudem demonstrierte erst kürzlich eine Publikation, dass der Extrakt des Knoblauchs und der wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoff Allicin den ENaC in ENaC-exprimierenden Eizellen inhibieren können, was wiederum den blutdrucksenkenden Effekt von Knoblauch erklären könnte [223]. Das Flavonoid Quercetin kann ebenso die ENaC-Aktivität reduzieren und eine anti-hypertensive Wirkung an Salz-sensitiven Dahl-Ratten demonstrieren [224].

Wird in den aufgeführten Erkrankungen ein blockierender Effekt gewünscht, so sollte andersherum bei einigen Darmkrankheiten eher ein stimulierender Effekt auf den ENaC angestrebt werden. Bei Durchfallerkrankungen konnte nämlich gezeigt werden, dass β - und γ -ENaC-Untereinheiten inhibiert sind und der Kanal nicht seiner physiologischen Aufgabe nachgehen kann [160, 162]. Auf Grund der beobachteten Induktion des intestinalen GC-abhängigen ENaC-vermittelten Na⁺-Transports, könnten sich die Pflanzeninhaltsstoffe der *E. anthropophagorum* DOMIN für eine Therapie von entzündlichen Durchfallerkrankungen eignen. Hierfür ist von entscheidender Bedeutung, dass die Inhaltsstoffe die beiden wichtigen ENaC-Untereinheiten regulieren können. Im Kolon ist eine gesteigerte Expression von β - und γ -ENaC-Untereinheit mit der entscheidende Faktor für den vermehrten Einbau des Kanals in die apikale Membran und der nachfolgenden Na⁺-Resorption. Die α -Einheit wird im Kolon, ganz anders als in der Niere, nur konstitutiv exprimiert und durch die hier untersuchten Stimulanzen nicht, bzw. nur geringfügig reguliert. Auffallend war in der Arbeit, dass im Allgemeinen die β -ENaC-Untereinheit scheinbar immer stärker durch Endiandrin A oder den Extrakt induziert wurde als die γ -Untereinheit. Der Grund dafür konnte hier nicht im Detail geklärt werden und auch in der Literatur finden sich keine Ansätze, die zur Aufklärung dieses beobachteten Effektes beitragen könnten. In einigen Studien zeigte sich aber ein Zusammenwirken von dem I κ B α -Kinase-Komplex (IKK), im Speziellen der Untereinheit IKK- β und

der β -ENaC-Untereinheit. Die Aktivierung des IKKs kann den Inhibitor von NF κ B, I κ B α , phosphorylieren und somit seine blockierende Funktion aufheben. Daneben kann IKK- β den Amilorid-sensitiven Kurzschlussstrom beeinflussen, indem es zum einen mit dem C-Terminus der β -ENaC-Untereinheit interagieren und zum anderen den Abbau des ENaCs verhindern kann [225, 226]. Da GC den entzündlichen NF κ B-induzierten Signalweg hemmen, könnte man nun gegebenenfalls annehmen, dass der molekulare Weg, welcher den β -ENaC betrifft, stärker ausgeprägt ist. Auf diese Thematik wird auch noch mal später im Abschnitt 4. 1. 1. 3 eingegangen.

Sehr bedeutend ist es, dass die Inhaltsstoffe der *E. anthropophagorum* DOMIN auch Wirkungen an nativen Darmpräparaten (Rattenkolon) ausüben können. Oft werden bei pflanzlichen Inhaltsstoffen zwar Effekte in der Zellkultur, aber leider keine an nativen Darmpräparaten beobachtet. Durchaus sind die Auswirkungen von Endiandrin A auf die ENaC-vermittelten Na⁺-Resorption in Rattendärmen nicht im selbem Ausmaß zu beobachten wie in der Kolonkarzinom-Zellkultur. Man muss hierbei jedoch beachten, dass im Rattenmodell der Amilorid-sensitive Strom generell intensiver ausfällt und der ENaC schneller und stärker durch Stimulanzen induziert wird. So wurde beobachtet, dass eine GC-Inkubationszeit von 6 bis 8 Stunden ausreicht, um den Kurzschlussstrom maximal zu induzieren [162]. Generell sollten Studien mit nativen Gewebekulturen nicht länger als 14 - 20 Stunden angesetzt werden, da sonst die Gefahr einer Induktion von apoptotischen Signalwegen, bzw. Barrierestörungen resultiert. Im Gegensatz dazu sollte die Kolonkarzinom-Zelllinie mindestens 24 Stunden und länger mit den Stimulanzen behandelt werden, um signifikante Effekte zu erzielen. Es wird nun angenommen, dass die Endiandra-Wirkstoffe im nativen Rattenkolon einerseits auf Grund der verkürzten Inkubationszeit und andererseits auf Grund der bereits starken GC-Wirkung per se nicht die gleichen relativen Effekte auf den Na⁺-Transport wie in der Zellkultur ausüben können.

Die transkriptionelle Regulation des intestinalen ENaCs wird, außer durch GC und Mineralocorticoide (MC), auch durch die essentielle kurzkettige Fettsäure Butyrat gesteuert. So ist gezeigt worden, dass Butyrat die Transkription der γ -ENaC-Untereinheit im Kolon induziert. Die Na⁺-Resorption kann jedoch hierbei nur bei zeitgleichem Vorliegen einer Steroidstimulation gesteigert werden [99]. Da Endiandrin A die Wirkungsweise eines GCs intensiviert, ruft es nun ebenso eine Steigerung der Butyrat-induzierten γ -ENaC-Stimulation hervor. Das Zusammenspiel zwischen GC, TNF- α und Endiandrin A konnte sich dadurch erneut intensivieren. Die Fettsäure Butyrat ist zudem befähigt, im Kolon apoptotische und entzündliche

Mechanismen zu hemmen [94-96]. Inhaltsstoffe aus dem Knoblauch zeigten in dem Zusammenhang in HT-29-Zellen einen unterstützenden Effekt [227]. Es könnte vermutet werden, dass Endiandrin A ebenso diese Butyrat-Wirkung intensiviert, um so beispielsweise entzündliche Auswirkungen von Zytokinen zu verringern. Der Ansatz zu einer angenommenen anti-entzündlichen Wirkung von Endiandrin A wird im folgenden Abschnitt genauer diskutiert (4.1.1.1.1). Erstmals schafft diese Studie einen Überblick, wie die australische Pflanze *E. anthropophagorum* DOMIN mit ihrem Wirkungspotential in der Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen, die mit einer gestörten ENaC-vermittelten Na⁺-Resorption einhergehen, eingesetzt werden könnte.

4.1.1.1.1 Rolle der JNK im Endiandrin A-abhängigen Signalweg

Die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) gehört zu der Familie der mitogen-activated protein kinases (MAP-Kinasen), welche durch verschiedene Stressfaktoren, u. a. Zytokine wie TNF- α , initiiert wird. Mehrfach zeigten vorangegangene Studien, dass die Aktivierung des JNK-Signalweges die transkriptionelle Aktivität des humanen GRs beeinträchtigen kann. Die Anregung der JNK führt zur Phosphorylierung am GR und zu posttranskriptionellen Modifikationen, die nachfolgend die Translokation und generell die Funktion des Rezeptors hemmen [178, 179]. Rogatsky und seine Arbeitsgruppe berichteten davon, dass die Phosphorylierung am Ser-246-GR ausschlaggebend für die Hemmung der GR-vermittelten transkriptionellen Aktivität sei [179]. Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wird heutzutage häufig eine GC-Resistenz beobachtet, wobei beispielsweise Patienten nicht oder nur ungenügend auf eine applizierte GC-Therapie ansprechen. Eine anhaltende Stimulation von entzündlichen Signalwegen, im Speziellen der JNK, könnten mitunter an der Entstehung einer solchen Resistenz beteiligt sein. Wird JNK permanent aktiviert, beispielsweise durch TNF- α , kann dadurch die Funktion des GRs gestört und die Wirkung von endogenen oder exogenen GC beeinträchtigt sein. Die Inhibition der JNK würde sich in dem Zusammenhang als therapeutisches Ziel eignen, um eine Normalisierung der GR-Funktion hervorzurufen [178]. In dieser Studie ist beobachtet worden, dass der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport unter GC- und TNF- α -Stimulation durch Inkubation mit dem JNK-Inhibitor SP600125 zunahm. Anschließend ähnelte der ermittelte Kurzschlussstrom stark dem von Endiandrin A und gleichzeitiger GC- und Zytokin-Behandlung. Zudem konnte Endiandrin A eine Intensivierung des nukleären GR-Signals bewirken, was mittels GR-Immunofluoreszenzfärbung ersichtlich wurde. Die Daten dieser Arbeit deuten daher darauf hin, dass Endiandrin A, ähnlich wie SP600125, die

JNK-Aktivierung inhibieren kann. Infolgedessen wird der blockierende Einfluss der JNK auf den GR aufgehoben, was wiederum die Translokation des GRs erleichtert und den Synergismus von GC und TNF- α stärkt, bzw. unterstützt. In der Literatur sind neben Endiandrin A, weitere pflanzliche JNK-Inhibitoren beschrieben. Silymarin, ein Flavonoid aus der Mariendistel, *Silybum marianum* (L.) GAERTN. (Asteraceae, Korbblütler), inhibierte in der humanen Makrophagenzelllinie U-937 die TNF- α -induzierte JNK-Aktivierung [228]. Ebenso hemmen Inhaltsstoffe der asiatischen Pflanze *Orostachys japonica* (MAXIM.) A.BERGER (Crassiceae, Dickblattgewächse) die JNK in murinen RAW 267.7 Zellen [229]. Das bereits erwähnte Curcumin der *Curcuma longa* L. verbesserte eine Kollagen-induzierte Arthritis, einem Mausmodell der Rheumatoiden Arthritis, wobei dieser Effekt u. a. auf die Inhibierung der JNK zurückgeführt worden ist [230]. Interessant ist, dass Endiandrin A und Curcumin ähnliche chemische Strukturen aufweisen, denn beide besitzen dieselben aromatischen Substituenten (Abb. 4. 3). Weitere Untersuchungen müssten in dem Zusammenhang folgen, um zu klären, inwieweit eine bestimmte chemische Struktur ausschlaggebend für eine JNK-Inhibierung ist.

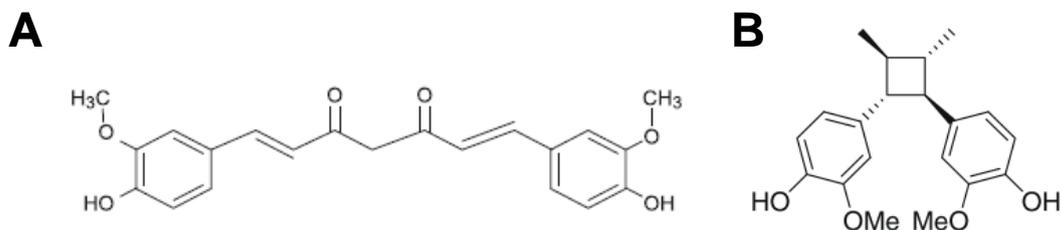


Abb. 4.3: Pflanzliche JNK-Inhibitoren

(A) Curcumin (entnommen aus Mun et al 2009).

(B) Endiandrin A (entnommen aus Davis et al. 2009)

Die vorgestellten pflanzlichen JNK-Inhibitoren scheinen inflammatorische Signalwege zu hemmen, indem sie die JNK-MAPK blockieren. Bei keinem ist jedoch eine Verbindung zu dem GR hergestellt worden. Endiandrin A inhibiert zwar die JNK, wodurch sich die GR-Funktion normalisiert, dennoch ist in dieser Arbeit im Speziellen kein anti-entzündlicher Mechanismus analysiert worden. Zukünftig soll demnach auch untersucht werden, ob Endiandrin A eine Entzündung im Gewebe bekämpfen kann. Hierfür sind einige

in vitro- und in vivo-Experimente in Planung, welche eine anti-inflammatorische Wirkung von Endiandrin A offenbaren sollen.

Ein weiterer, sehr kritisch anzusehender Punkt muss ebenfalls in späteren Untersuchungen geklärt werden. Endiandrin A besitzt die Eigenschaft, GC in ihrer Wirkung zu unterstützen. Die beobachtete Steigerung der GR-Translokation führt zur Transaktivierung GR-sensitiver Zielgene. Im hier vorliegenden Fall kommt es durch die Beeinflussung der JNK und des GRs letztendlich zu einer Erhöhung der ENaC mRNA Untereinheiten und zu einer Steigerung des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports. In der medikamentösen Langzeittherapie mit GC resultieren jedoch oftmals durch den Wirkmechanismus der Transaktivierung schwerwiegende Nebenwirkungen, wie die Entstehung von Diabetes mellitus oder Osteoporose. Auf alle Fälle muss analysiert werden, inwieweit Endiandrin A in einem Entzündungs- bzw. CED-Modell GC-assoziierte Nebenwirkungen beeinflusst. Allerdings sollte hierbei unbedingt zwischen physiologischen und synthetischen GC differenziert werden. Kann Endiandrin A beispielsweise in einer CED die Wirkung des körpereigenen Cortisols verstärken, wäre es eine bedeutende Beobachtung. In einem solchem Fall wäre es dann unnötig, eine zusätzliche Steroid-Therapie anzuordnen. Unter einer 100-fachen GC-Dosisreduktion zeigt Endiandrin A dennoch einen sehr starken Effekt auf ein GC-sensitives System. Es muss aber noch geklärt werden, ob Endiandrin A in der Therapie mit synthetischen GC metabolische Wirkungen bestärkt und daraus intensivierete Nebenwirkungen resultieren können.

In dieser Arbeit wird ersichtlich, dass Endiandrin A zu der Gruppe pflanzlicher JNK-Inhibitoren gezählt werden kann. Diese entdeckte Eigenschaft hat eine entscheidende Auswirkung auf das hier untersuchte GC-sensitive ENaC-System.

4.1.1.1.2 Rolle der p38 und ERK im Endiandrin A-abhängigen Signalweg

Bei einer CED-assoziierten Diarrhöe wurde beobachtet, dass es innerhalb kürzester Zeit nach GC-Einnahme zu einem Rückgang der massiven Wasser- und Elektrolytausscheidung kommt [164]. Die resorptionssteigernde Wirkung von GC kann auf ein Zusammenspiel mit dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- α zurückgeführt werden [165]. Es zeigte sich, dass TNF- α ein gesteigertes GR-Gesamtlevel induziert, indem es über die Aktivierung der p38-MAPK eine Verlängerung der GR mRNA-Halblebenszeit und somit eine Stabilisierung der mRNA bewirkt. Schon von einigen Arbeitsgruppen wurden nach Aktivierung des p38-Signalweges Veränderungen in der mRNA-Stabilität beobachtet [231, 232]. So konnte beispielsweise in humanen Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (FLS) die Zytokin-induzierte

Stabilisierung der Interleukin (IL)-6 mRNA mittels SB202190, einem spezifischen p38-Inhibitor, gehemmt werden [233]. Andere Publikationen verweisen sogar auf einen TNF- α -Effekt, welcher zu Stabilisierungen von mRNA führen kann [234, 235]. Von wesentlicher Bedeutung in der vorliegenden Arbeit ist, dass Endiandrin A die p38-MAPK zeitabhängig aktiviert, wobei die p38-Phosphorylierung durch GC und TNF- α synergistisch verstärkt wird. Folglich steigt der zelluläre GR-Gehalt, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene an, was wiederum die GC-Wirkung unterstützt.

Obwohl in der Arbeit nicht untersucht, könnte Endiandrin A möglicherweise die MAPK-Phosphatase (MPK)-1 inhibieren. Die MPK-1 reguliert über Dephosphorylierungs-Reaktionen die MAPK-Aktivitäten, vor allem die der p38 und der JNK. Durch Hemmung der Phosphatase kommt es zu einer verlängerten Phosphorylierung der MAPKs, wie sie interessanterweise auch unter dem Einfluss von Endiandrin A festzustellen war [236-238]. In der Literatur ist ein weiterer Pflanzeninhaltsstoff beschrieben, welcher eine hemmende Wirkung auf die MPK-1 ausüben kann. Vogt und seine Arbeitsgruppe identifizierten das Alkaloid Sanguinarin, einen bereits erwähnten Inhaltsstoff des Schöllkrauts *Chelidonium majus* L., als einen MKP-1-Inhibitor in HeLa-Zellen [239]. Weitere Experimente sollen gegebenenfalls folgen, um den vermuteten Einfluss von Endiandrin A auf die MPK-1 genauer zu untersuchen.

Neben p38 kann ebenso die extracelluar-signal regulated kinase (ERK)-MAPK die ENaC-Funktion beeinflussen [122, 182]. Verschiedene Publikationen demonstrierten, dass eine ERK-vermittelte Phosphorylierung der β - und γ -ENaC-Untereinheiten die Interaktion zwischen der Ubiquitinligase Nedd4-2 und dem Kanal erleichtert. Nachfolgend wird der Abbau des ENaCs eingeleitet, was letztendlich zu einer Erniedrigung der elektrogenen Na⁺-Resorption führt [122, 240, 241]. Unter einer Endiandrin A-Behandlung konnte eine starke Aktivierung des ERK-Signalweges festgestellt werden. Möglicherweise behindert gerade dieser Effekt die Eigenwirkung von Endiandrin A, einen Einfluss auf den GC-sensitiven ENaC-vermittelten Na⁺-Transport zu besitzen. Es ist vorstellbar, dass die Endiandrin A-induzierte ERK-Phosphorylierung vermehrt den Abbau des Kanals durch die Ligase Nedd4-2 bewirkt. Dabei genügt der Effekt von Endiandrin A, u. a. auf die p38- oder JNK-Signalkaskade, aber dennoch, um eine Steigerung der elektrogenen Na⁺-Resorption gegenüber einer alleinigen GC und TNF- α -Behandlung zu verursachen. Interessant ist, dass die Inkubation mit U0126, einem spezifischen MEK/ERK-Inhibitor, den ENaC-vermittelten Na⁺-Transport und die Genexpression der γ -ENaC-Untereinheit erneut ansteigen ließ. Vermutlich werden die anderen beiden MAPK-Signalwege durch die ERK-Hemmung verstärkt, so dass

Endiandrin A einen noch gravierenden Einfluss auf das ENaC-System ausüben kann. Einige Studien untermauern diesen angenommenen Zusammenhang, denn oftmals geht die Inhibierung der einen MAPK gleichzeitig mit einer Induktion einer anderen einher [242].

Die intensive Endiandrin A-induzierte ERK-Aktivierung kann ein erneuter Hinweis darauf sein, dass Endiandrin A eine Wirkung auf die Phosphatase MKP-1 besitzt. Neben dem Einfluss auf die p38- und JNK-Funktion, vermag MKP-1 ebenso ERK zu dephosphorylieren und damit zu inaktiveren [243]. Ein enges Zusammenspiel zwischen ERK und MKP-1 wurde bereits von einigen Autoren beschrieben. So zeigten Liao und seine Arbeitsgruppe an Bauchspeicheldrüsen-Gewebebiopsien, dass eine MKP-1-Hemmung zu einer erhöhten ERK-Aktivierung führt [244]. Des Weiteren verursachte die erhöhte ERK-Phosphorylierung in der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinie CL3 eine Degradierung von MKP-1, welche durch das Ubiquitin-Proteasom-System eingeleitet wurde [245].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Endiandrin A den Synergismus zwischen GC und TNF- α verstärkt, indem es die Aktivierung von p38 steigert und damit nachgeschaltete Signalwege, im Speziellen die der GR- und ENaC-Gen- und Proteinexpression beeinflusst. Zudem konnte Endiandrin A als potenter ERK-Aktivator identifiziert werden. Beide Eigenschaften haben eine wesentliche Bedeutung für den Effekt von Endiandrin A auf das GC-sensitive ENaC-System.

4.1.1.1.3 Rolle der Sgk-1 im Endiandrin A-abhängigen Signalweg

In der vorliegenden Studie konnte ein erheblicher Anstieg der serum- and GC-regulated kinase (sgk)-1 festgestellt werden. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung auf ein Mitwirken der Ligase Nedd4-2 im Wirkmechanismus von Endiandrin A. Es ist beschrieben, dass die Serin/Threonin-Kinase Sgk-1 Nedd4-2 dephosphoryliert und in der Folge dadurch die Ubiquitinierung, bzw. Degradierung der Ligase ausgelöst wird [183, 185]. Frühere Studien beobachteten eine Corticosteroid-induzierte Zunahme der Sgk-1 mRNA, was mit einem Anstieg des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports in Nierenzellen einherging [183, 246]. Interessanterweise deckten Itiani und seine Arbeitsgruppe ein wenig später auf, dass Glucocorticoide die Genexpression der Sgk-1 mittels der Aktivierung eines GRE in der 5'-flankierenden Region des Sgk-1-Gens stimulieren können [184]. Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Beobachtung, da auch hier GC einen Anstieg der Sgk-1 mRNA induzieren, was wiederum durch die Inkubation mit TNF- α gesteigert und durch Endiandrin A abermals intensiviert wird.

Zudem wurde berichtet, dass die p38-MAPK Sgk-1 beeinflussen kann. In der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 erhöhte die p38-Aktivierung die Sgk-1-Expression [187]. Darüber hinaus verursachte die Stimulation des p38-Signallwegs eine Zunahme der Sgk-1-Promotoraktivität in NMuMg-Zellen, einer murinen Mammaepithel-Zelllinie [186]. In der vorgelegten Studie führte die Inhibition von p38 (mit SB201290) zu einer Abnahme der Sgk-1-Expression, was zur Erniedrigung des ENaC-vermittelten Na^+ -Transports durch Ubiquitinierung der ENaC-Untereinheiten via Nedd4-2 beigetragen haben könnte. Andererseits kann das nicht die beobachtete, verminderte Genexpression der γ -ENaC-Untereinheit erklären, welche bei p38-Inhibierung eintrat. Aber der Inhibitor SB201290 regulierte auch das Gesamtproteinlevel des GRs herab. Somit könnte man daraus folgern, dass die Hemmung der elektrogenen Na^+ -Resorption auf Grund dieser zwei parallel ablaufenden Signalwege entsteht. Ferner konnte ebenso $\text{TNF-}\alpha$ alleine eine Zunahme der Sgk-1 mRNA induzieren, wobei die Genexpression nochmals durch Endiandrin A verstärkt wurde. Dies könnte auf eine Stabilisierung der Sgk-1 mRNA hindeuten, was auch mit anderen Berichten übereinstimmen würde. So wurde beispielsweise von Meng und seiner Arbeitsgruppe eine erhöhte sgk-Genexpression in der Cholangiokarzinom-Zelllinie KMCH-1 beobachtet, die über eine Aktivierung von p38 durch Zytokinstimulation eingeleitet worden ist [247].

Nicht nur p38 vermag Sgk-1 zu beeinflussen, sondern auch ERK kann die Kinase aktivieren [188]. Andererseits wurde zudem erst kürzlich berichtet, dass eine Überexpression von Sgk-1 die ERK-Aktivierung in primären murinen Hepatozyten steigerte [248]. Die hier vorliegenden Daten zeigen einen deutlichen Rückgang in der Sgk-1-Expression unter der Behandlung mit U0126 (ERK-Inhibitor), was in der Tat auf eine funktionelle Wechselwirkung zwischen der ERK- und Sgk-1-Signalkaskade hindeutet. Interessanterweise hatte die U0126-induzierte Abnahme des Sgk-1-Expressionslevels keinen inhibitorischen Einfluss auf die ENaC-vermittelte Na^+ -Resorption, sowie auf die Genexpression der γ -ENaC-Untereinheit. Vielmehr konnte sowohl bei dem einen als auch bei dem anderen eine Steigerung erzielt werden, welche durch eine verbesserte p38-Aktivierung zustande gekommen sein könnte. Demzufolge ist die Sgk-1 ein wichtiger Faktor im Wirkmechanismus von Endiandrin A, da die Kinase einerseits vom GR, andererseits auch von der p38- und ERK-MAPK beeinflusst wird.

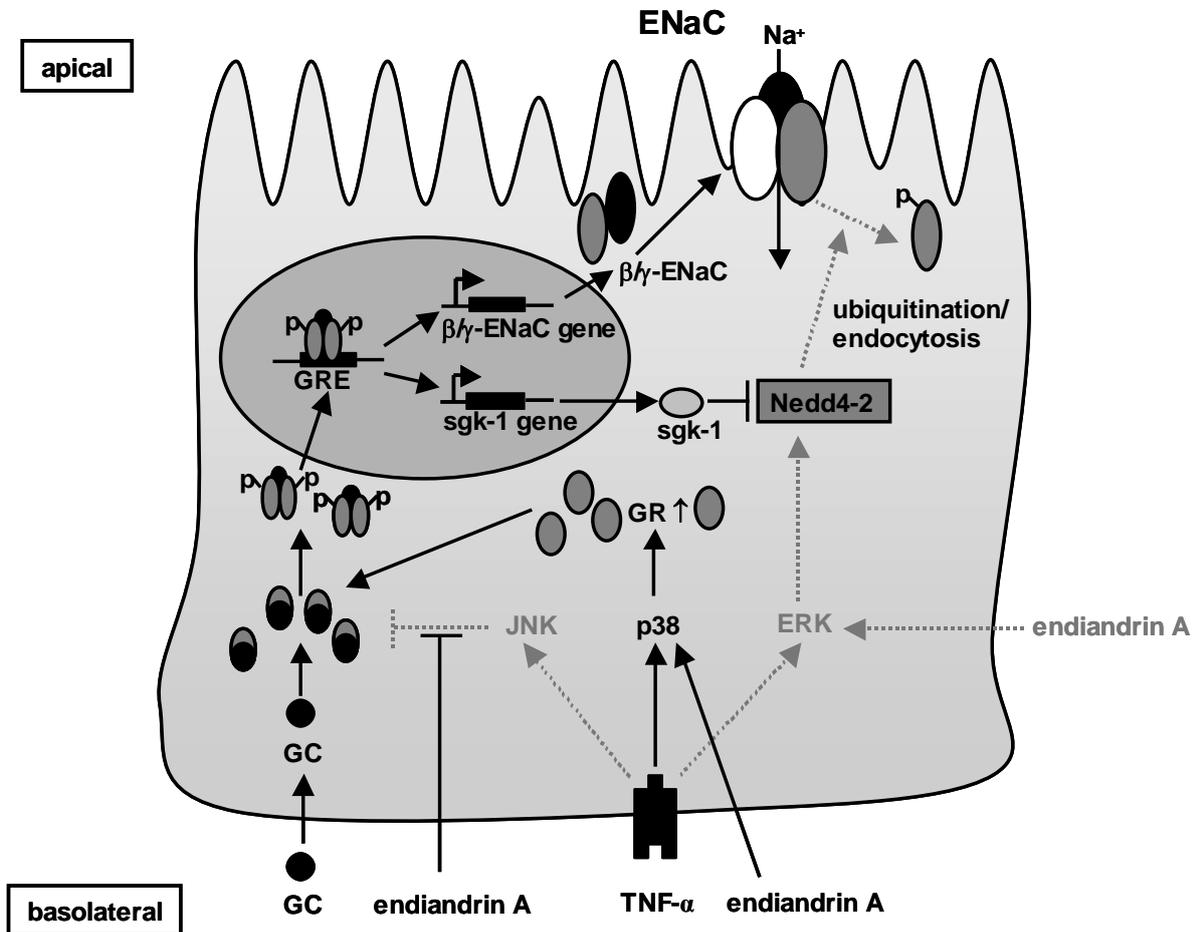


Abb. 4.4: Schema zu den Effekten von Endiandrin A auf die ENaC-abhängige Na⁺-Resorption
 Das Cyclobutan-Lignan Endiandrin A beeinflusst die ENaC-Funktion im Colon. Dabei spielen die MAPK p38, ERK und JNK eine entscheidende Rolle. Die TNF- α -induzierte JNK-Aktivierung, welche in der Literatur beschrieben wurde den GR negativ regulieren zu können, wird durch Endiandrin A gehemmt. Zusätzlich bewirkt Endiandrin A gemeinsam mit TNF- α eine verlängerte Phosphorylierung von p38, was zum einen die GR mRNA stabilisiert und zum anderen das GR-Proteingestamtlevelevel steigert. Endiandrin A fördert die Dexamethason-induzierte nukleäre Translokation des GRs. Dadurch kommt es zu einer erhöhten GRE-Transaktivierung sowie zu einer verstärkten Genexpression der β - und γ -ENaC-Untereinheiten und der Sgk-1. Zudem aktiviert Endiandrin A ERK, wobei sich diese Regulation negativ auf die ENaC-Funktion auswirkt. Grau-gestrichelte Linien zeigen Signalwege, die den ENaC in seiner Funktionsweise inhibieren

Der Vollständigkeit halber sollen hier zwei weitere, möglicherweise entscheidende Signalwege nur kurz erwähnt werden. In der humanen embryonalen Nieren-Zelllinie 293T erwies sich Sgk-1 als ein Negativ-Regulator der JNK [249]. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die erhöhte Sgk-1-Expression könnte den Zytokin-induzierten JNK-Signalweg

zusätzlich inhibieren, wodurch der Synergismus zwischen den Stimulantien, GC, TNF- α und Endiandrin A, verstärkt würde.

Ebenso wurde berichtet, dass sgk Wirkungen auf die bereits erwähnte IKK- β -Signalkaskade besitzt (Abschnitt 4. 1. 1. 1.). An humanen Mammakarzinom-Zellen MDA231 offenbarte sich IKK- β als Target von sgk [250]. Inwieweit die Sgk-1 IKK- β ebenso zu aktivieren vermag, müsste in Folgeexperimenten analysiert werden. Nichtsdestotrotz könnte dieses funktionelle Wechselspiel von Bedeutung sein. Würde die Sgk-1 die IKK- β vermehrt phosphorylieren, kann IKK- β einen aktivierenden Einfluss auf den ENaC, im Speziellen auf die β -Untereinheit und auf die Ligase Nedd4-2, ausüben [225, 226]. Man hätte durch diese Erkenntnis möglicherweise einen noch tieferen Einblick in das Zusammenspiel von GC und TNF- α , bzw. Endiandrin A.

4.1.2 Inhaltstoffe aus *Panax ginseng* C.A.MEY und *Bupleurum falcatum* L. als Glucocorticoidrezeptor-Liganden

Die Heilpflanzen Ginseng (*Panax ginseng* C.A.MEY, Araliaceae, Araliengewächse) und Bupleurum (*Bupleurum falcatum* L., Apiaceae, Doldenblütler) genießen beide eine lange Anwendungstradition in der asiatischen Medizin. Interessant ist, dass sowohl die eine als auch die andere Pflanze häufig für die Therapie entzündlicher Erkrankungen verwendet wird. Bei Aufklärung der molekularen Mechanismen demonstrierten deren Inhaltsstoffe anti-inflammatorische Eigenschaften, wodurch Signalwege, wie beispielsweise der des NF κ B, in ihrer Funktion gehemmt werden [41, 59, 60, 251]. Hierbei wurde dem Inhaltsstoff des Ginsengs Ginsenosid Rg₁ (GinRg₁) und dem des Bupleurums Saikosaponin D (SsD) die Hauptwirkungen zugeschrieben. In der Struktur besitzen beide ein C₃₀-Steroidgerüst, was ähnlich dem der physiologischen Corticosteroide ist. Einige Arbeitsgruppen zeigten für die Inhaltsstoffe Bindungsaffinitäten zum GR auf [29, 32, 42]. Dies könnte vermutlich den anti-entzündlichen Effekt von GinRg₁ und SsD begründen. In dieser Studie wurden nun beide Stoffe analysiert, inwieweit sie ein GC-abhängiges System, im Speziellen die intestinale GC-sensitive elektrogene Na⁺-Resorption, beeinflussen können.

Ginsenosid Rg₁ ist als ein Inhibitor von inflammatorischen Signalwegen charakterisiert worden. Erst kürzlich wurden in in vivo-Entzündungsmodellen, wie den murinen Zymosan-induzierten Pfotenödem, anti-entzündliche Eigenschaften belegt [31]. Dabei verweisen Publikationen auf einen GR-bindenden Effekt [29, 31, 42]. Interessant ist, dass GinRg₁

anscheinend zwar eine nukleäre Translokation des GRs bewirkt, aber dabei nur transrepressorisches und keine transaktivierende Wirkung hervorgerufen werden. Transaktivierende Effekte bedingen zumeist die GC-assoziierten Nebenwirkungen einer GC-Langzeittherapie. Ginseng, im Speziellen der Inhaltsstoff GinRg₁, könnte demnach ein potentieller Kandidat sein um die schulmedizinischen GC, wie Dexamethason, in der anti-entzündlichen Therapie zu ersetzen.

Nichtsdestotrotz wurde GinRg₁ hier getestet, ob es möglicherweise auch eine Wirkung auf den GR der hier verwendeten Kolonkarzinom-Zellen bzw. auf die intestinale ENaC-vermittelte Na⁺-Resorption besitzt. Die vorliegenden Vorversuche (Vorversuche auf Grund geringer n-Zahlen) zeigen, dass GinRg₁ keine GR-Transaktivierung induziert und keinen aktivierenden Effekt auf das ENaC-System in der Zelllinie HT-29/B6-GR ausübt. Das ist in der Hinsicht äußerst bedeutsam, da in fast allen Veröffentlichungen die Aktivierung eines GRE dargelegt wurde [29, 31]. Ob die GR-bindende Eigenschaft sich nur auf einige in vitro-Systeme beschränkt, muss nachfolgend geklärt werden. Die vorliegenden Vorversuche deuten sogar an, dass GinRg₁ den Synergismus zwischen GC und TNF- α abschwächt. Wohlmöglich könnte diese Beobachtung von zwei berichteten Eigenschaften abgeleitet werden. In der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 zeigte GinRg₁ einen inhibitorischen Einfluss auf die MAPK p38, ERK und JNK [31]. Alle drei MAPK besitzen im Synergismus von GC und TNF- α wichtige Funktionen. Werden diese jedoch durch GinRg₁ moduliert, könnte möglicherweise die elektrogene Na⁺-Resorption negativ beeinflusst werden. Des Weiteren konnte in murinen Hepatomazellen FTO2B eine GinRg₁-induzierte Reduzierung des GRs nachgewiesen werden, was ebenso Folgen für den Synergismus haben könnte [29]. Demnach eignet sich Ginseng nach den Ergebnissen unserer Studie nicht für die Therapie einer CED-assoziierten Diarrhöe.

Ähnlich wie GinRg₁ zeigte Saikosaponin D die Eigenschaft auf, Entzündungssignalwege blockieren zu können. Die orale Applikation von SsD verbesserte im murinen in vivo-Modell der anti-GMP Glomerulonephritis (anti-glomerular basement membrane) das pathologische Krankheitsbild. In dem Zusammenhang konnte SsD als GR-Agonist charakterisiert werden [32]. Erst kürzlich wurde zudem in der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 demonstriert, dass SsD den NF κ B-Signalweg inhibiert, was beispielsweise mit einem Rückgang proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α oder Interleukin(IL)-6, einherging [251]. Obwohl erschienene Publikationen GR-induzierte Effekte vermuteten ließen, zeigten die vorliegenden Vorversuche, dass die Inkubation mit SsD wahrscheinlich keine Auswirkungen auf die

GC-sensitive intestinale elektrogene Na^+ -Resorption hat. Saikosaponin D kann vermutlich weder den ENaC-vermittelten Na^+ -Transport allein stimulieren, noch den Synergismus zwischen GC und $\text{TNF-}\alpha$ stärken. Eine lange Inkubation mit einem GC und SsD verursacht anscheinend sogar einen Abfall des Kurzschlussstroms, was möglicherweise einen partiellen Agonismus erahnen lässt. Demnach könnte es sein, dass SsD den GR in seiner Funktion so blockiert, dass ein GC keine transaktivierenden Effekte mehr auslösen kann.

Zwar scheinen beide Substanzen, GinRg_1 und SsD, laut den vorliegenden Daten ungeeignet für die Behandlung von CED-assoziiierter Diarrhöe, nichtsdestotrotz können sie aber pflanzliche GR-Liganden sein. Sie besitzen jedoch höchstwahrscheinlich hauptsächlich nur transrepressorische Eigenschaften, was aber unbedingt einen therapeutischen Einsatz bei entzündlichen Erkrankungen begründen kann und sollte. Ihre phytopharmazeutische GR-bindende Wirkungsweise soll in der Arbeit keinesfalls in Frage gestellt werden. Vielmehr dienen die Daten nochmals dazu, beiden anti-entzündlichen Inhaltsstoffen das große Potential zuzuschreiben, schulmedizinische GC in der Therapie abzulösen bzw. zu unterstützen, um auch bei einer Langzeittherapie in chronischen Krankheitsfällen keine Nebenwirkungen zu bewirken. Im Übrigen konnte die in der Behandlung mit GinRg_1 auftretende Reduzierung von unerwünschten Nebenwirkungen auch auf eine zusätzliche Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor (ER) zurückgeführt werden [31]. Es ist allemal interessant, dass sowohl GinRg_1 und SsD phytoöstrogene Wirkung demonstrierten [45, 63]. Endiandrin A gehört der Stoffgruppe der Lignane an, denen ebenso phytoöstrogene Effekte nachgesagt werden (siehe Abschnitt 4.1.1). Weitere Experimente könnten klären, ob Endiandrin A in der Lage ist, den ER zu binden und ob sich diese Eigenschaft dann auf GC-assoziierte Nebenwirkungen auswirkt.

4.1.3 Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit pflanzlich angewandeter Medizin

Immer häufiger fordern und wünschen viele Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) traditionell angewandte Heilmethoden. Zwar stehen für eine CED-Therapie verschiedene schulmedizinische Arzneistoffe, wie GC, Antiphlogistika (z.B. Mesalazin) und $\text{TNF-}\alpha$ -Blocker, zur Verfügung, doch mitunter kann sich die medikamentöse Behandlung einer CED äußerst schwierig gestalten. Einer der Hauptgründe ist vor allem das individuelle therapeutische Ansprechen auf die verordneten Medikamente. Oft genügt auch vielen Patienten eine reine Symptombehandlung nicht mehr, welche zwar im akut

entzündlichen Schub das Leiden lindert, langfristig aber keine Ausheilung der Erkrankung bewirkt. Gegenwärtig ist die genaue Pathogenese von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nicht bekannt. Allerdings wird heutzutage in der Medizin generell die Auffassung vertreten, dass sowohl eine genetische Prädisposition sowie auch äußere Faktoren des westlichen Lebensstils (Rauchen, Stress, Fehlernährung) zur Entstehung einer CED beitragen können. Daher scheint es nicht verwunderlich, dass in der Alternativmedizin der Patient als Individuum in seiner Gesamtheit bzw. seine ihn umgebene Umwelt entscheidend für eine Krankheitsanamnese und erforderliche Therapie ist. Studien belegen, dass alternative Herangehensweisen ebenso eine Linderung der CED-Symptome bewirken und dass manche Patienten darunter ein weitgehend beschwerdefreies Leben genießen können. Zweifellos sollten stark akute entzündliche Krankheitszustände mit schulmedizinischen Medikamenten, die häufig einfach ein schnelleres Wirkungsprofil besitzen, behandelt werden. Nichtsdestotrotz vermag die ganzheitliche Medizin das körperliche Gleichgewicht des erkrankten Patienten wiederherzustellen, sodass oft auf eine Langzeittherapie mit synthetischen Wirkstoffen verzichtet werden könnte. Viele Mediziner sehen die Studienlage zu alternativen Heilungsmethoden, wobei in der vorliegenden Arbeit nur auf pflanzliche angewandte Medizin eingegangen wird, sehr kritisch. Es gibt meist nur unzureichend gute Humandaten, die eine eindeutige Verbesserung der CED aufzeigen, zumal gelegentlich dem Placebo-Effekt auch ein Mitwirken unterstellt wird [252, 253]. Anders in Maus- bzw. Rattenmodellen, hier demonstrierten einige Arbeiten eine Abnahme bestimmter Entzündungsmarker und pathologischer Gewebsveränderungen, welche charakteristischerweise bei Formen der CED auftreten, durch Einwirken von Pflanzenextrakten oder isolierten pflanzlichen Inhaltsstoffen [254-257]. So zeigten Zhao und seine Arbeitsgruppe erst kürzlich auf, dass das asiatische Bitterholz, *Picrasma quassioides* (D.DON) BENN. (Simaroubaceae, Bittereschengewächse), auf Grund der anti-entzündlichen Wirkungsweise eine mögliche Verbesserung einer Colitis bewirken könnte [257]. In den letzten Jahren konnten für den Extrakt des indischen Weihrauchbaumes, *Boswellia serrata* ROXB. (Burseaceae, Balsambaumgewächse) bzw. der Heildroge Weihrauch, einem Harzgemisch aus verschiedenen *Boswellia*-Arten, ähnliche anti-inflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden [256, 258-260]. Sogar in Studien mit CED-Patienten erwies sich der *Boswellia*-Extrakt als wirksames Heilmittel [261]. Demgegenüber zeigte der Extrakt in einer anderen Humanstudie keinen Effekt auf [262]. Bevor Endiandrin A bzw. der Endiandra-Extrakt an Patienten getestet werden kann, bedarf es noch einige offene Fragen zu klären. Weitere Mechanismen, mit Augenmerk auf entzündliche

Signalwege, müssen analysiert werden. Zudem sind in nächster Zukunft Experimente an Mäusen oder Ratten, die eine CED-Charakteristik aufzeigen, geplant, bei denen die Reinsubstanz oder der Extrakt verabreicht werden soll. Hierbei wird auch die Charakterisierung der Pharmakodynamik und Pharmakokinetik im Vordergrund stehen.

Höchstwahrscheinlich kann Endiandrin A oder der Endiandra-Extrakt die GC-Therapie bei einer CED nicht ersetzen. Vielleicht verstärken die Inhaltsstoffe der Endiandra-Pflanze aber physiologische Cortisol-Effekte oder sie sind dabei behilflich, therapeutische Steroid-Dosen zu reduzieren (mit dem Ziel, GC-assoziierte Nebenwirkungen zu vermindern). In dem Zusammenhang wären auch multimodale Therapiekonzepte vorstellbar. So könnten CED beispielsweise mit einer Kombination aus synthetischen Arzneimitteln und Phytopharmaka, wie die anti-entzündlichen Ginseng- oder Bupleurumpflanzen sowie den pro-absorptiven Endiandra-Inhaltsstoffen, behandelt werden. Doch auch dies ist zunächst ein rein spekulativer Denkansatz, der in zukünftigen Experimenten weiter untersucht werden soll.

Zusammenfassend lässt sich zum ersten Teil der vorliegenden Arbeit folgendes sagen: Es sind GR-agonistische Effekte von beschriebenen pflanzlichen GR-Liganden, im Detail von Endiandrin A aus *Endiandra anthropogorum* DOMIN, Ginsenosid Rg₁ aus *Panax ginseng* C.A.MEY und Saikosaponin D aus *Bupleurum falcatum* L., in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6-GR und an Rattenkolonpräparaten untersucht worden. Dabei wurde ausschließlich für Endiandrin A, einer Hauptkomponente des Endiandra-Wurzelextraktes, ein neuer regulatorischer Einfluss auf die p38, ERK und JNK sowie auf die Sgk-1, ermittelt, welcher ein synergistisches Zusammenspiel mit dem GC Dexamethason und TNF- α bedingte. In der Folge wirkte sich die Interaktion der Synergisten förderlich auf die intestinale elektrogene ENaC-vermittelte Na⁺-Resorption aus.

4.2 Diskussion der phytochemischen Untersuchung von Bupleurum-Spezies

Ein Wurzelextrakt der Gattung Bupleurum (Hasenohren, Doldenblütler, Apiaceae), welcher in der traditionellen asiatischen Medizin Verwendung findet, erweist sich als äußerst wirksam bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen (Pan et al. 2006). Aktuelle in vivo-Daten belegen zudem eine Wirksamkeit des Extraktes bei Hyperthyreose, sowie bei Stress- bzw. Angstzuständen [263, 264]. Als Stammpflanze für die pharmazeutische Droge Bupleuri Radix können dabei je nach Kultivierungsland u. a. folgende Arten dienen: *B. falcatum* L. (Kultivierung in Japan, „Saiko“ und auch dort in der Japanischen Pharmakopöe benannt) oder *B. chinensis* DC. (Kultivierung in China, „Chai hu“ und auch dort in der Chinesischen Pharmakopöe benannt). In der Literatur wird häufig von der Stammpflanze *B. falcatum* L. s. sl. gesprochen, welche die beiden genannten Arten, aber auch Varietäten, wie beispielsweise die europäische Art *B. falcatum* L. s. str., umfassen (Pan et al. 2006, Hager et al. 1994). Der Bupleurum-Extrakt besteht aus einem komplexen Stoffgemisch, wobei sich prinzipiell alle Bestandteile, Hauptwirkstoffe und Begleitstoffe, an der phytopharmazeutischen Gesamtwirkung beteiligen. Nichtsdestotrotz gilt die Stoffgruppe der Saikosaponine als wirksamkeitsbestimmend und wird daher seit Anfang der 1960er intensiv beforscht. Für einen qualitativen Nachweis eignet sich die Dünnschichtchromatographie (DC.), ein Trennverfahren, bei dem das Stoffgemisch durch Verteilung zwischen einer mobilen und stationären Phase in seine Bestandteile aufgetrennt wird. Bei der HPTLC (high-performance thin-layer chromatography, Hochleistungsdünnschichtchromatographie), welche in der vorliegenden Studie angewandt wurde, handelt es sich um eine Weiterentwicklung der klassischen DC. Die Vorteile einer HPTLC überwiegen, denn u. a. ist die Auftrennung der Komponenten eines Stoffgemisches auf Grund des Einsatzes eines leistungsstärkeren stationären Trennmaterials noch exakter. Außerdem erlaubt die Methode neben der qualitativen, ebenso eine anschließende quantitative Analyse der Proben. Die quantitative Auswertung stand jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht im Fokus.

In der Literatur werden unterschiedliche Extraktionsmethoden für den qualitativen Nachweis der Bupleurumwurzel bzw. der Saikosaponine genannt. Strukturell werden die pharmakologisch wirksamen Saikosaponine den Triterpensaponinen des Oleanantypen zugeordnet. Sie besitzen ein C₃₀-Grundgerüst und auf Grund ihrer chemischen Struktur sowohl polare (durch mehrere Hydroxygruppen) als auch unpolare Eigenschaften. Eine geeignete Extraktionsmethode sollte demnach ein Extraktionsmittel angeben, welches die Saikosaponine aus der

Wurzel herauszulösen vermag. Es wurden 5 verschiedene Extraktionsverfahren miteinander verglichen, die im Methodenteil ausführlich beschrieben worden sind (Abschnitt 2. 2. 1. 1). Alle Verfahren nennen als Extraktionsmittel entweder Methanol oder Ethanol. Beide Lösungsmittel besitzen eine ausreichende Polarität, um die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe zu extrahieren. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass die Methoden nach Tian und seiner Arbeitsgruppe bzw. nach dem Arzneibuch der chinesischen Medizin weniger effizient, gemessen am qualitativen Gehalt auf den entwickelten HPTLC-Platten, zu sein scheinen als die anderen 3 Verfahren [168]. Vermutlich hängt dies nicht mit der Auswahl des Extraktionsmittels, sondern eher mit der Extraktionsmethode an sich zusammen.

Tian und seine Arbeitsgruppe nennen sehr viele Arbeitsschritte, was gleichzeitig aber die Anhäufung von Fehlerquellen bedeuten kann. Außerdem minimiert sich möglicherweise der Gehalt an Wirkstoffen durch den Gebrauch einer C₁₈-Säule. Diese Festphasenextraktionskartusche soll eigentlich ein zusätzlicher Aufreinigungsprozess, wenn nicht sogar eine zusätzliche Extraktion, sein, doch vielleicht geht in diesem Arbeitsschritt einfach zu viel an Inhaltsstoffen verloren. Weitere Experimente, ohne die Verwendung der C₁₈-Säule, könnten Aufschluss darüber bringen. Von Vorteil bei dieser Methode ist, dass sie als einziges Verfahren die Degradierung der Saikosaponine durch den zusätzlichen Einsatz von Pyridin zum Methanol zu verhindern versucht [47].

In der Methode des chinesischen Arzneibuches wird die Droge Bupleuri radix im Ultraschallbad mit Methanol extrahiert. Die Ultraschallwellen zerstören die Zellwände des Wurzelgewebes, wodurch die Inhaltsstoffe einerseits durch Diffusionsprozesse, andererseits durch Auswaschprozesse ins Extraktionsmittel Methanol freigesetzt werden. An sich stellt die Ultraschallextraktion ein schnelles und effizientes Verfahren dar. Die Vorteile dieser Extraktionsmethode, wie eine kürzere Extraktionsdauer auf Grund der erhöhten Molekülbewegungen oder eine benötigte niedrigere Extraktionstemperatur, überwiegen gegenüber herkömmlichen Extraktionsverfahren, im Speziellen beispielsweise gegenüber der Soxhlet-Methode [265-267]. Dennoch scheinen aber die vom chinesischen Arzneibuch vorgeschlagenen Arbeitsschritte für die Ultraschallextraktion nicht auszureichen, um die Saikosaponine ausreichend aus der Wurzel herauszulösen. Im Arzneibuch wird nur die Angabe von einer 10-minütigen Beschallung gemacht. Hingegen gibt beispielsweise eine andere Publikation für die Saikosaponin-Extraktion eine 30-minütige Beschallung unter der Temperatur von 80 °C vor [268]. Möglicherweise könnten weitere Experimente aufklären, ob die Effizienz der Extraktion durch veränderte Parameter verbessert wird. Auch könnten durch die angewandte

Ultraschall-Methode die Inhaltsstoffe chemisch potentiell verändert sein, sodass letztendlich der Gehalt an den zu untersuchenden Wirkstoffen sinkt. Dieser Gedanke bedarf ebenso einer weiteren Klärung.

Neben dem Vergleich von Extraktionsverfahren stand auch der Vergleich von 3 verschiedenen Fließmitteln in der vorliegenden Arbeit im Fokus. Für die einwandfreie Entwicklung von HPTLC-Platten und einem aussagekräftigen qualitativen Nachweis ist die Auswahl der mobilen Phase von entscheidender Bedeutung. Genau wie ein Extraktionsmittel muss die mobile Phase abgestimmt auf sein die zu untersuchende Droge, bzw. auf die nachzuweisenden Inhaltsstoffe. Die Saikosaponine A und D unterscheiden sich rein chemisch nur in der räumlichen Struktur voneinander (Stereoisomere), wobei eine Hydroxyfunktion am C₁₆ entweder in α (cis)- (SsD) oder β (trans)-Position (SsA) steht. Eine ideale mobile Phase sollte nun in der Lage sein, die Saikosaponine voneinander zu trennen, sodass zunächst ein qualitativer und später ebenso ein quantitativer Nachweis möglich wäre. Die Ergebnisse zeigen, dass das Fließmittel 3 (FM 3), vorgeschlagen vom chinesischen Arzneibuch, bzw. von Yen und seiner Arbeitsgruppe, die idealen Eigenschaften aufweist. In der Kombination Ethylacetat:Ethanol:Wasser (8:2:1) besitzt es gegenüber dem Fließmittel 1 (FM 1, Dichlormethan: Ethylacetat:Methanol:Wasser nach Tian und seiner Arbeitsgruppe) über den Vorteil einer höheren Polarität [168, 170]. Die Eigenschaft des FM 3 kann nicht nur eine optimale Trennung der Inhaltsstoffe insgesamt, sondern sogar die der Stereoisomere Saikosaponin A und D bedingen. Es zeigte sich, dass SsD auf Grund der C₁₆ α (cis)-OH-Funktion etwas unpolarer als SsA ist. Die Trennung beider ist umso effektiver, desto polarer ein FM ist. Mit Hilfe der höheren FM-Polarität können auch polare Inhaltsstoffe besser aufgetrennt werden, so dass beispielsweise auch eine bessere qualitative bzw. quantitative Bestimmung des Saikosaponins C im FM 3 möglich wäre.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass nicht alle in der Literatur beschriebenen Extraktionsverfahren bzw. vorgeschlagenen Fließmittel für den qualitativen Bupleurum-Nachweis ideal sind. Die besten hier geprüften Methoden sind die vom japanischen Arzneibuch, von Yen und Zhoa bzw. deren jeweiligen Arbeitsgruppen [169, 170]. Das vom chinesischen Arzneibuch genannte Fließmittel (FM 3) konnte die besten Trenneigenschaften demonstrieren.

Die europäische Species *B. falcatum* L. s. str. ist bis jetzt eher weniger untersucht worden und findet auch, laut der Literatur, kaum Anwendung in der traditionellen Medizin. In der hier vorgelegten Arbeit konnte womöglich ein Grund dafür aufgezeigt werden. Im Gegensatz zu

den asiatischen Arten, welche heutzutage auf Grund der großen Nachfrage großflächig kultiviert werden, kommt die europäische Art hauptsächlich in der Natur selbst oder in Botanischen Gärten vor. In einem direkten Vergleich zeigte sich, dass die europäische Art qualitativ über weniger der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe, gemessen an SsA und SsD, verfügt. Obwohl die asiatische Art *B. chinensis* DC. nur nach der Extraktionsmethode 4, beschrieben vom chinesischen Arzneibuch, behandelt worden ist, zeigte sie im Vergleich dazu einen weit aus höheren qualitativen Gehalt an Saikosaponinen. Die anderen Extraktionsmethoden wurden nicht weiter untersucht. Es könnte demnach interessant sein, inwieweit diese Feststellung auch bei den übrigen Verfahren in Erscheinung tritt. Andererseits muss aber nebenbei bemerkt werden, dass es sich bei dem Vergleich der beiden Arten jeweils nur um eine Beispieldpflanze handelt. Unbedingt müssten weitere, sogar noch vorhandene aus verschiedenen Botanischen Gärten erhaltene Proben miteinander verglichen werden, um die Erkenntnis auch zu bestätigen.

Schon Pan deutete an, dass wohl die asiatischen Bupleurum-Arten, *B. chinensis* DC. bzw. *B. falcatum* L., den höchsten Gehalt an wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen besitzen (Pan et al. 2006). Daher finden hauptsächlich diese Arten medizinischen Einsatz in der Phytopharmazie. In folgenden Experimenten könnte möglicherweise ermittelt werden, wie sehr sich der quantitative Gehalt von der asiatischen und europäischen Art wirklich unterscheidet und ob eventuell sogar der Extrakt einer europäischen Art anti-entzündliche Eigenschaften aufweist.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist das Interesse an der Phytotherapie stetig gestiegen, wobei inzwischen die Aufklärung der phytopharmazeutischen Wirkung von Heilpflanzen im Vordergrund steht, um die therapeutische Verwendung auf Grund von experimentellen Daten zu begründen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden pflanzliche Glucocorticoidrezeptor (GR)-Modulatoren im Hinblick auf eine mögliche Anwendbarkeit bei den chronisch-entzündlichen Erkrankungen (CED) Morbus Crohn und Colitis ulcerosa untersucht. Bei diesen Erkrankungen verursachen neben einer genetischen Prädisposition vor allem exogene Faktoren eine überschießende Immunantwort, was nachfolgend weitere molekulare Signalwege beeinflusst und letztendlich zu einer manifesten Entzündung führen kann. Für die medikamentöse Therapie stehen u. a. anti-entzündliche, immunsupprimierende Glucocorticoide (GC) wie Dexamethason zur Verfügung. GC weisen in der Langzeittherapie bekanntermaßen ein erhebliches Nebenwirkungspotential auf. Daher werden Alternativen, auch pflanzliche, erforscht, die zwar die positiven, nicht aber die negativen Eigenschaften der GC besitzen sollen. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, wie Endiandrin A aus der australischen Pflanze *Endiandra anthropophagorum* DOMIN, Ginsenosid Rg₁ aus *Panax ginseng* C.A.MEY und Saikosaponin D aus *Bupleurum falcatum* L., zeigten die Fähigkeit auf, den GR binden zu können. Ziel dieser Arbeit war ihren Effekt genauer an einem GR-sensitiven Signalweg, im Speziellen der GR-abhängigen intestinalen Na⁺-Resorption, in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6-GR sowie am Rattenkolon zu charakterisieren. Es konnte demonstriert werden, dass ausschließlich die Inhaltsstoffe der *E. anthropophagorum* DOMIN befähigt waren, den GC-sensitiven epithelialen Na⁺-Kanal (ENaC)-vermittelten Na⁺-Transport zu beeinflussen. Obwohl keine alleinigen GR-transaktivierenden Eigenschaften ermittelt wurden, unterstützte Endiandrin A, ein Cyclobutan-Lignan der australischen Pflanze, die Wirkung des GCs Dexamethason und dadurch auch einen beschriebenen Synergismus zwischen GC und TNF- α . Mit einer verstärkten Endiandrin A-induzierten Aktivierung der p38 MAP-Kinase (MAPK) ging eine Steigerung des Sgk-1-Expressionslevels und GR-Gesamtlevels (GR mRNA und Protein) einher. Endiandrin A bewirkte die Inhibierung der GC- und TNF- α -induzierten JNK-Aktivierung sowie eine erhöhte nukleäre GR-Translokation. Ebenso konnte Endiandrin A eine Zunahme der Expression von β - und γ -ENaC-Untereinheit bedingen und infolgedessen eine Erhöhung der GC-gesteuerten ENaC-vermittelten

Na⁺-Resorption hervorrufen. Endiandrin A, bzw. die Pflanze *E. anthropophagorum* DOMIN, könnte demnach eine potentielle pflanzliche Alternative zu synthetischen GC in der Therapie chronisch-entzündlicher Erkrankungen darstellen, weil sie keine transaktivierenden Eigenschaften aufweist, aber GR-abhängige Signalwege beeinflusst.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Fokus auf die Pflanze *Bupleurum falcatum* L. gelegt. Es handelt sich hierbei um eine bekannte Heilpflanze, die sehr häufig in der traditionellen asiatischen Medizin verwendet wird. In der Phytotherapie stellt eine der häufigsten Darreichungsformen der Extrakt dar. Ziel war es, eine geeignete Methode zur Extrakterstellung und zum qualitativen Nachweis der wirksamkeitsbestimmenden Bupleurum-Inhaltsstoffe (Saikosaponine) zu ermitteln. Sowohl in der Auswahl des Extraktionsmittels, als auch in der Auswahl des Fließmittels für eine geplante Dünnschichtchromatographie (DC), müssen entsprechend der zu untersuchenden Stoffe gewisse Polaritäten beachtet werden. Die Saikosaponine besitzen zwar ein unpolares Steroidgrundgerüst, aber auch genügend Hydroxygruppen und damit polare Strukturen im Molekül. Somit sollte ein Lösungsmittel genau jene Eigenschaften aufweisen, um die Inhaltsstoffe optimal zu extrahieren. Es konnte demonstriert werden, dass einige beschriebene Methoden sich eher weniger, andere mehr für die Extrakterstellung eignen. Für den qualitativen Nachweis der Saikosaponine wurde das Fließmittel, das sich aus Ethylacetat, Ethanol und Wasser (8:2:1) zusammensetzt, als am besten geeignet ermittelt.

6 Summary

In recent years, the interest in phytotherapy steadily increased. Today research is focused on enlightening the phytopharmaceutical effects of medicinal plants, in order to establish the therapeutic use on basis of experimental data.

In the first part of this work, plant-derived glucocorticoid receptor (GR) modulators were analyzed. Chronic inflammatory diseases are diseases of the western lifestyle, mainly caused by genetic and environmental factors leading to an uncontrolled immune response, which impact other signaling pathways and result in a manifest inflammation. For the medicinal treatment, glucocorticoids (GC) as e.g. dexamethasone are applied, basically focused on suppressing the inflammation. However, GCs often show various and serious side effects, especially in the long-term treatment. Therefore, alternatives including plant-derived drugs are highly appreciated, which only have to possess the positive characteristics of GCs. A few secondary plant-compounds, e.g. endiandrin A from the Australian tree *Endiandra anthropophagorum* DOMIN, ginsenoside Rg₁ from *Panax ginseng* C.A.MEY and saikosaponin D from *Bupleurum falcatum* L., showed the ability to bind to the GR. Our aim was to characterize their effects more in detail on a GR-sensitive signaling pathway, especially the GR-dependent intestinal Na⁺ absorption, in the human colon carcinoma cell line HT-29/B6-GR as well as in rat colon specimens in vivo. It was demonstrated that only compounds from *E. anthropophagorum* DOMIN were able to influence the GC-dependent epithelial Na⁺ channel (ENaC)-mediated Na⁺ transport. The results showed that while endiandrin A, a cyclobutane lignan of the Australian plant, alone possessed no significant GR transactivation capacity, it could effectively facilitate the effect of the GC dexamethasone and thereby also support the synergism between GCs and TNF- α . Endiandrin A enhanced p38 MAP-kinase activation and this was accompanied by an increase in Sgk-1 expression as well as total GR levels (GR mRNA and protein levels). Furthermore, endiandrin A inhibited GC- and TNF- α -induced JNK activation and increased levels of GR localized to the nucleus. Additionally, it caused an up-regulation of the β - and γ -ENaC subunit expression which enhanced GC-sensitive ENaC-mediated Na⁺ absorption. Endiandrin A or rather the plant *E. anthropophagorum* DOMIN may serve as potential herbal alternative to synthetic GCs for the treatment of chronic inflammatory diseases as they show no transcriptional activation, but affect GR-dependent signaling pathways.

Summary

The second part of this work focused on *Bupleurum falcatum* L., a well-known medicinal plant extensively used in traditional Asian medicine. Extracts are one of the most common pharmaceutical application forms. The aim was to determine an efficient method for the extraction and for the qualitative analysis of Bupleurum's active ingredients (saikosaponins). According to the substances to be analyzed, certain polarities must be observed for selecting an extracting solvent as well as a mobile phase of an intended thin-layer chromatography. Indeed, saikosaponins exhibit a non-polar steroidal structure, but they also have enough hydroxyl groups and thus polar characteristics. Therefore the solvent should have exactly those characteristics to extract the active substance in an optimal manner. It was demonstrated that some described methods are less well, others more suitable for the extract manufacturing. For qualitative analysis of saikosaponins the ideal eluent was composed of ethyl acetate, ethanol and water (8:2:1).

7 Literatur

1. Lamberts, S.W.J., Bruining, H.A., and de Jong, F.H., *Corticosteroid Therapy in Severe Illness* doi:10.1056/NEJM199710303371807. New England Journal of Medicine, 1997. **337**(18): p. 1285-1292.
2. Gaillard, R.C. and Al-Damluji, S., *Stress and the pituitary-adrenal axis*. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1987. **1**(2): p. 319-54.
3. Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., and Spencer, R.L., *Stress response, adrenal steroid receptor levels and corticosteroid-binding globulin levels--a comparison between Sprague-Dawley, Fischer 344 and Lewis rats*. Brain Res, 1993. **616**(1-2): p. 89-98.
4. Chrousos, G.P. and Gold, P.W., *The concepts of stress and stress system disorders overview of physical and behavioral homeostasis*. JAMA, 1992. **267**(9): p. 1244-1252.
5. Raju, T.N., *The Nobel chronicles. 1950: Edward Calvin Kendall (1886-1972); Philip Showalter Hench (1896-1965); and Tadeus Reichstein (1897-1996)*. Lancet, 1999. **353**(9161): p. 1370.
6. Chrousos, G.P., *The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation*. N Engl J Med, 1995. **332**(20): p. 1351-62.
7. Webster, J.I., Tonelli, L., and Sternberg, E.M., *Neuroendocrine regulation of immunity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 125-63.
8. Bamberger, C.M., Schulte, H.M., and Chrousos, G.P., *Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids*. Endocr Rev, 1996. **17**(3): p. 245-61.
9. Funder, J.W., *Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance*. Annu Rev Med, 1997. **48**: p. 231-40.
10. Nuclear Receptors Nomenclature, C., *A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily*. Cell, 1999. **97**(2): p. 161-3.
11. Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M., *Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA*. Nature, 1985. **318**(6047): p. 635-41.
12. Adcock, I.M., *Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions*. Pulm Pharmacol Ther, 2000. **13**(3): p. 115-26.
13. Wang, Z., Frederick, J., and Garabedian, M.J., *Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 26573-80.
14. Hench, P., *Effects of cortisone in the rheumatic diseases*. Lancet, 1950. **2**(6634): p. 483-4.
15. Zhou, J. and Cidlowski, J.A., *The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses*. Steroids, 2005. **70**(5-7): p. 407-17.
16. Wen, A.Y., Sakamoto, K.M., and Miller, L.S., *The role of the transcription factor CREB in immune function*. J Immunol, 2010. **185**(11): p. 6413-9.
17. Herrlich, P., *Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1*. Oncogene, 2001. **20**(19): p. 2465-75.
18. Klein-Hitpass, L., Schwerck, C., Kahmann, S., and Vassen, L., *Targets of activated steroid hormone receptors: basal transcription factors and receptor interacting proteins*. J Mol Med (Berl), 1998. **76**(7): p. 490-6.

19. Barnes, P.J., *Glucocorticosteroids: current and future directions*. Br J Pharmacol, 2011. **163**(1): p. 29-43.
20. Belvisi, M.G., Brown, T.J., Wicks, S., and Foster, M.L., *New Glucocorticosteroids with an improved therapeutic ratio?* Pulm Pharmacol Ther, 2001. **14**(3): p. 221-7.
21. De Bosscher, K., Haegeman, G., and Elewaut, D., *Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators*. Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(4): p. 497-504.
22. Vayssiere, B.M., Dupont, S., Choquart, A., Petit, F., Garcia, T., Marchandeu, C., Gronemeyer, H., and Resche-Rigon, M., *Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(9): p. 1245-55.
23. Thiele, S., Ziegler, N., Tsourdi, E., De Bosscher, K., Tuckermann, J.P., Hofbauer, L.C., and Rauner, M., *Selective glucocorticoid receptor modulation maintains bone mineral density in mice*. J Bone Miner Res, 2012.
24. Rosen, J. and Miner, J.N., *The search for safer glucocorticoid receptor ligands*. Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 452-64.
25. Quax, R.A., Peeters, R.P., and Feelders, R.A., *Selective glucocorticoid receptor modulators: future of glucocorticoid immunosuppressive therapy?* Endocrinology, 2011. **152**(8): p. 2927-9.
26. Biju, P., Wang, H., Anthes, J., McCormick, K., Aslanian, R., Berlin, M., Bitar, R., Lim, Y.H., Lee, Y.J., Prelusky, D., McLeod, R., Jia, Y., Fernandez, X., Lieber, G., Jimenez, J., Eckel, S., House, A., Chapman, R., and Phillips, J., *Steroidal C-21 heteroaryl thioethers. Part 3: pregn-4-eno-[3,2-c]pyrazole fused A ring modified steroids as selective glucocorticoid receptor modulators (dissociated steroids)*. Bioorg Med Chem Lett, 2012. **22**(9): p. 3291-5.
27. Belvisi, M.G., Wicks, S.L., Battram, C.H., Bottoms, S.E., Redford, J.E., Woodman, P., Brown, T.J., Webber, S.E., and Foster, M.L., *Therapeutic benefit of a dissociated glucocorticoid and the relevance of in vitro separation of transrepression from transactivation activity*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1975-82.
28. Russell, L., Hicks, G.S., Low, A.K., Shepherd, J.M., and Brown, C.A., *Phytoestrogens: a viable option?* Am J Med Sci, 2002. **324**(4): p. 185-8.
29. Chung, E., Lee, K.Y., Lee, Y.J., Lee, Y.H., and Lee, S.K., *Ginsenoside Rg1 down-regulates glucocorticoid receptor and displays synergistic effects with cAMP*. Steroids, 1998. **63**(7-8): p. 421-4.
30. Davis, R.A., Carroll, A.R., Duffy, S., Avery, V.M., Guymer, G.P., Forster, P.I., and Quinn, R.J., *Endiandrin A, a potent glucocorticoid receptor binder isolated from the Australian plant Endiandra anthropophagorum*. J Nat Prod, 2007. **70**(7): p. 1118-21.
31. Du, J., Cheng, B., Zhu, X., and Ling, C., *Ginsenoside Rg1, a novel glucocorticoid receptor agonist of plant origin, maintains glucocorticoid efficacy with reduced side effects*. J Immunol, 2012. **187**(2): p. 942-50.
32. Hattori, T., Nishimura, H., Kase, Y., and Takeda, S., *Saireito and saikosaponin D prevent urinary protein excretion via glucocorticoid receptor in adrenalectomized WKY rats with heterologous-phase anti-GBM nephritis*. Nephron Physiol, 2008. **109**(2): p. p19-27.
33. Liu, Y., Wang, H., Zhu, Y., Chen, L., and Qu, Y., *The protective effect of nordihydroguaiaretic acid on cerebral ischemia/reperfusion injury is mediated by the JNK pathway*. Brain Res, 2012. **1445**: p. 73-81.
34. Hien, T.T., Oh, W.K., Nguyen, P.H., Oh, S.J., Lee, M.Y., and Kang, K.W., *Nectandrin B activates endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation in endothelial cells: role*

- of the AMP-activated protein kinase/estrogen receptor alpha/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Mol Pharmacol*, 2011. **80**(6): p. 1166-78.
35. Davis, R.A., Barnes, E.C., Longden, J., Avery, V.M., and Healy, P.C., *Isolation, structure elucidation and cytotoxic evaluation of endiandrin B from the Australian rainforest plant Endiandra anthropophagorum*. *Bioorg Med Chem*, 2009. **17**(3): p. 1387-92.
 36. Cheng, T.O., *Panax (ginseng) is not a panacea*. *Arch Intern Med*, 2000. **160**(21): p. 3329; author reply 3330-1.
 37. Fuzzati, N., Gabetta, B., Jayakar, K., Pace, R., and Peterlongo, F., *Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric identification of ginsenosides in Panax ginseng roots*. *J Chromatogr A*, 1999. **854**(1-2): p. 69-79.
 38. Hofseth, L.J. and Wargovich, M.J., *Inflammation, cancer, and targets of ginseng*. *J Nutr*, 2007. **137**(1 Suppl): p. 183S-185S.
 39. Radad, K., Gille, G., Liu, L., and Rausch, W.D., *Use of ginseng in medicine with emphasis on neurodegenerative disorders*. *J Pharmacol Sci*, 2006. **100**(3): p. 175-86.
 40. Wang, C.Z., Mehendale, S.R., and Yuan, C.S., *Commonly used antioxidant botanicals: active constituents and their potential role in cardiovascular illness*. *Am J Chin Med*, 2007. **35**(4): p. 543-58.
 41. Wu, C.F., Bi, X.L., Yang, J.Y., Zhan, J.Y., Dong, Y.X., Wang, J.H., Wang, J.M., Zhang, R., and Li, X., *Differential effects of ginsenosides on NO and TNF-alpha production by LPS-activated N9 microglia*. *Int Immunopharmacol*, 2007. **7**(3): p. 313-20.
 42. Lee, Y.J., Chung, E., Lee, K.Y., Lee, Y.H., Huh, B., and Lee, S.K., *Ginsenoside-Rg1, one of the major active molecules from Panax ginseng, is a functional ligand of glucocorticoid receptor*. *Mol Cell Endocrinol*, 1997. **133**(2): p. 135-40.
 43. McDougall, K.E., Perry, M.J., Gibson, R.L., Colley, S.M., Korach, K.S., and Tobias, J.H., *Estrogen receptor-alpha dependency of estrogen's stimulatory action on cancellous bone formation in male mice*. *Endocrinology*, 2003. **144**(5): p. 1994-9.
 44. Gu, G., Hentunen, T.A., Nars, M., Harkonen, P.L., and Vaananen, H.K., *Estrogen protects primary osteocytes against glucocorticoid-induced apoptosis*. *Apoptosis*, 2005. **10**(3): p. 583-95.
 45. Chan, R.Y., Chen, W.F., Dong, A., Guo, D., and Wong, M.S., *Estrogen-like activity of ginsenoside Rg1 derived from Panax notoginseng*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(8): p. 3691-5.
 46. Neves, S.S. and Watson, M.F., *Phylogenetic relationships in Bupleurum (apiaceae) based on nuclear ribosomal DNA its sequence data*. *Ann Bot*, 2004. **93**(4): p. 379-98.
 47. Shimaoka, A., Seo, S., and Minato, H., *Saponins isolated from Bupleurum falcatum L.; components of saikosaponin b*. *J Chem Soc Perkin 1*, 1975(20): p. 2043-8.
 48. Kimata, H., Hiyama, C., Yahara, S., Tanaka, O., Ishikawa, O., and Aiura, M., *Application of High Performance Liquid Chromatography to the Analysis of Crude Drugs : Separatory Determination of Saponins of Bupleuri Radix*. 1979.
 49. Bell, C.R. and Constance, L., *Chromosome Numbers in Umbelliferae. II*. 1957.
 50. Li, R., Jiang, C., Wang, H., and Liu, M., *Chromosomes of So-called <i>Bupleurum falcatum</i> in Northeast China*. 1994.
 51. Abe, H., Sakaguchi, M., Yamada, M., Arichi, S., and Odashima, S., *Pharmacological actions of saikosaponins isolated from Bupleurum falcatum. 1. Effects of saikosaponins on liver function*. *Planta Med*, 1980. **40**(4): p. 366-72.
 52. Guinea, M.C., Parellada, J., Lacaille-Dubois, M.A., and Wagner, H., *Biologically active triterpene saponins from Bupleurum fruticosum*. *Planta Med*, 1994. **60**(2): p. 163-7.

53. Takagi, K. and Shibata, M., [*Pharmacological studies on Bupleurum falcatum L. I. Acute toxicity and central depressant action of crude saikosides*]. Yakugaku Zasshi, 1969. **89**(5): p. 712-20.
54. Bermejo, P., Abad, M.J., Diaz, A.M., Fernandez, L., De Santos, J., Sanchez, S., Villaescusa, L., Carrasco, L., and Irurzun, A., *Antiviral activity of seven iridoids, three saikosaponins and one phenylpropanoid glycoside extracted from Bupleurum rigidum and Scrophularia scorodonia*. Planta Med, 2002. **68**(2): p. 106-10.
55. Kumazawa, Y., Takimoto, H., Nishimura, C., Kawakita, T., and Nomoto, K., *Activation of murine peritoneal macrophages by saikosaponin a, saikosaponin d and saikogenin d*. Int J Immunopharmacol, 1989. **11**(1): p. 21-8.
56. Kato, M., Pu, M.Y., Isobe, K., Hattori, T., Yanagita, N., and Nakashima, I., *Cell type-oriented differential modulatory actions of saikosaponin-d on growth responses and DNA fragmentation of lymphocytes triggered by receptor-mediated and receptor-bypassed pathways*. Immunopharmacology, 1995. **29**(3): p. 207-13.
57. Hsu, M.J., Cheng, J.S., and Huang, H.C., *Effect of saikosaponin, a triterpene saponin, on apoptosis in lymphocytes: association with c-myc, p53, and bcl-2 mRNA*. Br J Pharmacol, 2000. **131**(7): p. 1285-93.
58. Park, K.H., Park, J., Koh, D., and Lim, Y., *Effect of saikosaponin-A, a triterpenoid glycoside, isolated from Bupleurum falcatum on experimental allergic asthma*. Phytother Res, 2002. **16**(4): p. 359-63.
59. Takagi, K. and Shibata, M., [*Pharmacological studies on Bupleurum falcatum L. II. Antiinflammatory and other pharmacological actions of crude saikosides*]. Yakugaku Zasshi, 1969. **89**(10): p. 1367-78.
60. Navarro, P., Giner, R.M., Recio, M.C., Manez, S., Cerda-Nicolas, M., and Rios, J.L., *In vivo anti-inflammatory activity of saponins from Bupleurum rotundifolium*. Life Sci, 2001. **68**(10): p. 1199-206.
61. Abe, H., Sakaguchi, M., Odashima, S., and Arichi, S., *Protective effect of saikosaponin-d isolated from Bupleurum falcatum L. on CCl4-induced liver injury in the rat*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1982. **320**(3): p. 266-71.
62. Leung, C.Y., Liu, L., Wong, R.N., Zeng, Y.Y., Li, M., and Zhou, H., *Saikosaponin-d inhibits T cell activation through the modulation of PKC θ , JNK, and NF-kappaB transcription factor*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(4): p. 1920-7.
63. Wang, P., Ren, J., Tang, J., Zhang, D., Li, B., and Li, Y., *Estrogen-like activities of saikosaponin-d in vitro: a pilot study*. Eur J Pharmacol, 2009. **626**(2-3): p. 159-65.
64. Rossier, B.C., Canessa, C.M., Schild, L., and Horisberger, J.D., *Epithelial sodium channels*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 1994. **3**(5): p. 487-96.
65. Garty, H. and Palmer, L.G., *Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation*. Physiol Rev, 1997. **77**(2): p. 359-96.
66. Rossier, B.C., Pradervand, S., Schild, L., and Hummler, E., *Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 877-97.
67. Garty, H., *Mechanisms of aldosterone action in tight epithelia*. J Membr Biol, 1986. **90**(3): p. 193-205.
68. Fromm, M., Schulzke, J.D., and Hegel, U., *Control of electrogenic Na⁺ absorption in rat late distal colon by nanomolar aldosterone added in vitro*. Am J Physiol, 1993. **264**(1 Pt 1): p. E68-73.
69. Kunzelmann, K. and Mall, M., *Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 245-89.

70. Beesley, A.H., Hornby, D., and White, S.J., *Regulation of distal nephron K⁺ channels (ROMK) mRNA expression by aldosterone in rat kidney*. J Physiol, 1998. **509 (Pt 3)**: p. 629-34.
71. Sorensen, M.V. and Leipziger, J., *The essential role of luminal BK channels in distal colonic K⁺ secretion*. J Med Invest, 2009. **56 Suppl**: p. 301.
72. Bhalla, V. and Hallows, K.R., *Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19(10)**: p. 1845-54.
73. Giraldez, T., Rojas, P., Jou, J., Flores, C., and Alvarez de la Rosa, D., *Invited Review- The epithelial sodium channel delta subunit: new notes for an old song*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012.
74. Krueger, B., Schlotzer-Schrehardt, U., Haerteis, S., Zenkel, M., Chankiewicz, V.E., Amann, K.U., Kruse, F.E., and Korbmayer, C., *Four subunits (alphatagammadelta) of the epithelial sodium channel (ENaC) are expressed in the human eye in various locations*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53(2)**: p. 596-604.
75. Wesch, D., Althaus, M., Miranda, P., Cruz-Muros, I., Fronius, M., Gonzalez-Hernandez, T., Clauss, W.G., Alvarez de la Rosa, D., and Giraldez, T., *Differential N termini in epithelial Na⁺ channel delta-subunit isoforms modulate channel trafficking to the membrane*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302(6)**: p. C868-79.
76. Firsov, D., Gautschi, I., Merillat, A.M., Rossier, B.C., and Schild, L., *The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC)*. EMBO J, 1998. **17(2)**: p. 344-52.
77. Snyder, P.M., Cheng, C., Prince, L.S., Rogers, J.C., and Welsh, M.J., *Electrophysiological and biochemical evidence that DEG/ENaC cation channels are composed of nine subunits*. J Biol Chem, 1998. **273(2)**: p. 681-4.
78. Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E.B., and Gouaux, E., *Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH*. Nature, 2007. **449(7160)**: p. 316-23.
79. Snyder, P.M., *The epithelial Na⁺ channel: cell surface insertion and retrieval in Na⁺ homeostasis and hypertension*. Endocr Rev, 2002. **23(2)**: p. 258-75.
80. McDonald, F.J., Yang, B., Hrstka, R.F., Drummond, H.A., Tarr, D.E., McCray, P.B., Jr., Stokes, J.B., Welsh, M.J., and Williamson, R.A., *Disruption of the beta subunit of the epithelial Na⁺ channel in mice: hyperkalemia and neonatal death associated with a pseudohypoaldosteronism phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96(4)**: p. 1727-31.
81. Hummler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., Boucher, R., and Rossier, B.C., *Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice*. Nat Genet, 1996. **12(3)**: p. 325-8.
82. Barker, P.M., Nguyen, M.S., Gatzky, J.T., Grubb, B., Norman, H., Hummler, E., Rossier, B., Boucher, R.C., and Koller, B., *Role of gammaENaC subunit in lung liquid clearance and electrolyte balance in newborn mice. Insights into perinatal adaptation and pseudohypoaldosteronism*. J Clin Invest, 1998. **102(8)**: p. 1634-40.
83. Canessa, C.M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J.D., and Rossier, B.C., *Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits*. Nature, 1994. **367(6462)**: p. 463-7.
84. Kellenberger, S. and Schild, L., *Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure*. Physiol Rev, 2002. **82(3)**: p. 735-67.
85. Voilley, N., Bassilana, F., Mignon, C., Merscher, S., Mattei, M.G., Carle, G.F., Lazdunski, M., and Barbry, P., *Cloning, chromosomal localization, and physical linkage of the beta and gamma subunits (SCNN1B and SCNN1G) of the human epithelial amiloride-sensitive sodium channel*. Genomics, 1995. **28(3)**: p. 560-5.

86. Voilley, N., Lingueglia, E., Champigny, G., Mattei, M.G., Waldmann, R., Lazdunski, M., and Barbry, P., *The lung amiloride-sensitive Na⁺ channel: biophysical properties, pharmacology, ontogenesis, and molecular cloning*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(1): p. 247-51.
87. Asher, C., Wald, H., Rossier, B.C., and Garty, H., *Aldosterone-induced increase in the abundance of Na⁺ channel subunits*. Am J Physiol, 1996. **271**(2 Pt 1): p. C605-11.
88. Epple, H.J., Amasheh, S., Mankertz, J., Goltz, M., Schulzke, J.D., and Fromm, M., *Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **278**(5): p. G718-24.
89. Renard, S., Voilley, N., Bassilana, F., Lazdunski, M., and Barbry, P., *Localization and regulation by steroids of the alpha, beta and gamma subunits of the amiloride-sensitive Na⁺ channel in colon, lung and kidney*. Pflugers Arch, 1995. **430**(3): p. 299-307.
90. Frindt, G. and Palmer, L.G., *Regulation of epithelial Na⁺ channels by adrenal steroids: mineralocorticoid and glucocorticoid effects*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **302**(1): p. F20-6.
91. Will, P.C., Cortright, R.N., DeLisle, R.C., Douglas, J.G., and Hopfer, U., *Regulation of amiloride-sensitive electrogenic sodium transport in the rat colon by steroid hormones*. Am J Physiol, 1985. **248**(1 Pt 1): p. G124-32.
92. Evans, R.M. and Arriza, J.L., *A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system*. Neuron, 1989. **2**(2): p. 1105-12.
93. Wong, J.M., de Souza, R., Kendall, C.W., Emam, A., and Jenkins, D.J., *Colonic health: fermentation and short chain fatty acids*. J Clin Gastroenterol, 2006. **40**(3): p. 235-43.
94. Mortensen, P.B. and Clausen, M.R., *Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1996. **216**: p. 132-48.
95. Segain, J.P., Raingeard de la Bletiere, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottiere, H.M., and Galmiche, J.P., *Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease*. Gut, 2000. **47**(3): p. 397-403.
96. Wachtershauser, A. and Stein, J., *Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases*. Eur J Nutr, 2000. **39**(4): p. 164-71.
97. Musch, M.W., Bookstein, C., Xie, Y., Sellin, J.H., and Chang, E.B., *SCFA increase intestinal Na absorption by induction of NHE3 in rat colon and human intestinal C2/bbe cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(4): p. G687-93.
98. Iordache, C. and Duszyk, M., *Sodium 4-phenylbutyrate upregulates ENaC and sodium absorption in T84 cells*. Exp Cell Res, 2007. **313**(2): p. 305-11.
99. Zeissig, S., Fromm, A., Mankertz, J., Weiske, J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.D., *Butyrate induces intestinal sodium absorption via Sp3-mediated transcriptional up-regulation of epithelial sodium channels*. Gastroenterology, 2007. **132**(1): p. 236-48.
100. Palmer, L.G. and Frindt, G., *Gating of Na channels in the rat cortical collecting tubule: effects of voltage and membrane stretch*. J Gen Physiol, 1996. **107**(1): p. 35-45.
101. Valentijn, J.A., Fyfe, G.K., and Canessa, C.M., *Biosynthesis and processing of epithelial sodium channels in Xenopus oocytes*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30344-51.
102. Weisz, O.A., Wang, J.M., Edinger, R.S., and Johnson, J.P., *Non-coordinate regulation of endogenous epithelial sodium channel (ENaC) subunit expression at the*

- apical membrane of A6 cells in response to various transporting conditions. *J Biol Chem*, 2000. **275**(51): p. 39886-93.
103. Butterworth, M.B., Edinger, R.S., Johnson, J.P., and Frizzell, R.A., *Acute ENaC stimulation by cAMP in a kidney cell line is mediated by exocytic insertion from a recycling channel pool*. *J Gen Physiol*, 2005. **125**(1): p. 81-101.
 104. Snyder, P.M., *Liddle's syndrome mutations disrupt cAMP-mediated translocation of the epithelial Na(+) channel to the cell surface*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(1): p. 45-53.
 105. Kabra, R., Knight, K.K., Zhou, R., and Snyder, P.M., *Nedd4-2 induces endocytosis and degradation of proteolytically cleaved epithelial Na⁺ channels*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(10): p. 6033-9.
 106. Lu, C., Pribanic, S., Debonneville, A., Jiang, C., and Rotin, D., *The PY motif of ENaC, mutated in Liddle syndrome, regulates channel internalization, sorting and mobilization from subapical pool*. *Traffic*, 2007. **8**(9): p. 1246-64.
 107. Wang, H., Traub, L.M., Weixel, K.M., Hawryluk, M.J., Shah, N., Edinger, R.S., Perry, C.J., Kester, L., Butterworth, M.B., Peters, K.W., Kleyman, T.R., Frizzell, R.A., and Johnson, J.P., *Clathrin-mediated endocytosis of the epithelial sodium channel. Role of epsin*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(20): p. 14129-35.
 108. Shimkets, R.A., Lifton, R.P., and Canessa, C.M., *The activity of the epithelial sodium channel is regulated by clathrin-mediated endocytosis*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(41): p. 25537-41.
 109. Snyder, P.M., Olson, D.R., Kabra, R., Zhou, R., and Steines, J.C., *cAMP and serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) regulate the epithelial Na(+) channel through convergent phosphorylation of Nedd4-2*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(44): p. 45753-8.
 110. Kobayashi, T. and Cohen, P., *Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2*. *Biochem J*, 1999. **339** (Pt 2): p. 319-28.
 111. Brickley, D.R., Mikosz, C.A., Hagan, C.R., and Conzen, S.D., *Ubiquitin modification of serum and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (SGK-1)*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(45): p. 43064-70.
 112. Bhargava, A., Fullerton, M.J., Myles, K., Purdy, T.M., Funder, J.W., Pearce, D., and Cole, T.J., *The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action*. *Endocrinology*, 2001. **142**(4): p. 1587-94.
 113. Spindler, B. and Verrey, F., *Aldosterone action: induction of p21(ras) and fra-2 and transcription-independent decrease in myc, jun, and fos*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(5 Pt 1): p. C1154-61.
 114. Stockand, J.D., Spier, B.J., Worrell, R.T., Yue, G., Al-Baldawi, N., and Eaton, D.C., *Regulation of Na(+) reabsorption by the aldosterone-induced small G protein K-Ras2A*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(50): p. 35449-54.
 115. Mastroberardino, L., Spindler, B., Forster, I., Loffing, J., Assandri, R., May, A., and Verrey, F., *Ras pathway activates epithelial Na⁺ channel and decreases its surface expression in Xenopus oocytes*. *Mol Biol Cell*, 1998. **9**(12): p. 3417-27.
 116. Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D., and Downward, J., *Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras*. *Nature*, 1994. **370**(6490): p. 527-32.
 117. Zhou, R. and Snyder, P.M., *Nedd4-2 phosphorylation induces serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) ubiquitination and degradation*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(6): p. 4518-23.

118. Muller, O.G., Parnova, R.G., Centeno, G., Rossier, B.C., Firsov, D., and Horisberger, J.D., *Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na⁺ and K⁺*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(5): p. 1107-15.
119. Robert-Nicoud, M., Flahaut, M., Elalouf, J.M., Nicod, M., Salinas, M., Bens, M., Doucet, A., Wincker, P., Artiguenave, F., Horisberger, J.D., Vandewalle, A., Rossier, B.C., and Firsov, D., *Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: effects of aldosterone and vasopressin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2712-6.
120. D'Adamio, F., Zollo, O., Moraca, R., Ayroldi, E., Bruscoli, S., Bartoli, A., Cannarile, L., Migliorati, G., and Riccardi, C., *A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 803-12.
121. Soundararajan, R., Zhang, T.T., Wang, J., Vandewalle, A., and Pearce, D., *A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport*. J Biol Chem, 2005. **280**(48): p. 39970-81.
122. Shi, H., Asher, C., Chigae, A., Yung, Y., Reuveny, E., Seger, R., and Garty, H., *Interactions of beta and gamma ENaC with Nedd4 can be facilitated by an ERK-mediated phosphorylation*. J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 13539-47.
123. Ayroldi, E., Zollo, O., Macchiarulo, A., Di Marco, B., Marchetti, C., and Riccardi, C., *Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(22): p. 7929-41.
124. Arteaga, M.F., Wang, L., Ravid, T., Hochstrasser, M., and Canessa, C.M., *An amphipathic helix targets serum and glucocorticoid-induced kinase 1 to the endoplasmic reticulum-associated ubiquitin-conjugation machinery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(30): p. 11178-83.
125. Soundararajan, R., Wang, J., Melters, D., and Pearce, D., *Glucocorticoid-induced Leucine zipper 1 stimulates the epithelial sodium channel by regulating serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 stability and subcellular localization*. J Biol Chem, 2010. **285**(51): p. 39905-13.
126. Soundararajan, R., Pearce, D., and Ziera, T., *The role of the ENaC-regulatory complex in aldosterone-mediated sodium transport*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **350**(2): p. 242-7.
127. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
128. Voigt, E., Griga, T., Tromm, A., Henschel, M.G., Vorgerd, M., and May, B., *Polymyositis of the skeletal muscles as an extraintestinal complication in quiescent ulcerative colitis*. Int J Colorectal Dis, 1999. **14**(6): p. 304-7.
129. Mathew, C.G. and Lewis, C.M., *Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects*. Hum Mol Genet, 2004. **13 Spec No 1**: p. R161-8.
130. Berg, D.J., Zhang, J., Weinstock, J.V., Ismail, H.F., Earle, K.A., Alila, H., Pamukcu, R., Moore, S., and Lynch, R.G., *Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice*. Gastroenterology, 2002. **123**(5): p. 1527-42.
131. Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nunez, G., and Fernandez-Luna, J.L., *Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41701-5.
132. Lala, S., Ogura, Y., Osborne, C., Hor, S.Y., Bromfield, A., Davies, S., Ogunbiyi, O., Nunez, G., and Keshav, S., *Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells*. Gastroenterology, 2003. **125**(1): p. 47-57.

133. Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., and Nunez, G., *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
134. Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S.J., Moran, A.P., Fernandez-Luna, J.L., and Nunez, G., *Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5509-12.
135. Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., and Sansonetti, P.J., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
136. Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A., and Watanabe, T., *Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 9-20.
137. Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., and Ouellette, A.J., *Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 113-8.
138. Ouellette, A.J. and Bevins, C.L., *Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel*. Inflamm Bowel Dis, 2001. **7**(1): p. 43-50.
139. Abraham, C. and Cho, J.H., *Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(7): p. 641-50.
140. Strober, W. and Fuss, I.J., *Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2011. **140**(6): p. 1756-67.
141. Fuss, I.J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J.S., de la Motte, C., Strong, S.A., Fiocchi, C., and Strober, W., *Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5*. J Immunol, 1996. **157**(3): p. 1261-70.
142. Monteleone, G., Biancone, L., Marasco, R., Morrone, G., Marasco, O., Lizza, F., and Pallone, F., *Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells*. Gastroenterology, 1997. **112**(4): p. 1169-78.
143. Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Becchio, A., Giannarini, L., Maggi, E., Pupilli, C., Tonelli, F., and Romagnani, S., *Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease*. Am J Pathol, 1997. **150**(3): p. 823-32.
144. Shih, D.Q. and Targan, S.R., *Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(3): p. 390-400.
145. Mullin, J.M. and Snock, K.V., *Effect of tumor necrosis factor on epithelial tight junctions and transepithelial permeability*. Cancer Res, 1990. **50**(7): p. 2172-6.
146. Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C.A., Madara, J.L., Hopkins, A.M., and Nusrat, A., *Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6164-72.
147. Mankertz, J., Tavalali, S., Schmitz, H., Mankertz, A., Riecken, E.O., Fromm, M., and Schulzke, J.D., *Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 11)**: p. 2085-90.
148. Schmitz, H., Fromm, M., Bentzel, C.J., Scholz, P., Detjen, K., Mankertz, J., Bode, H., Epple, H.J., Riecken, E.O., and Schulzke, J.D., *Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 1)**: p. 137-46.

149. Zeissig, S., Burgel, N., Gunzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.D., *Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease*. Gut, 2007. **56**(1): p. 61-72.
150. Wang, F., Graham, W.V., Wang, Y., Witkowski, E.D., Schwarz, B.T., and Turner, J.R., *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression*. Am J Pathol, 2005. **166**(2): p. 409-19.
151. Youakim, A. and Ahdieh, M., *Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 1): p. G1279-88.
152. Weber, C.R., Nalle, S.C., Tretiakova, M., Rubin, D.T., and Turner, J.R., *Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation*. Lab Invest, 2008. **88**(10): p. 1110-20.
153. Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Burgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W., and Schulzke, J.D., *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution*. Gastroenterology, 2005. **129**(2): p. 550-64.
154. Mankertz, J., Amasheh, M., Krug, S.M., Fromm, A., Amasheh, S., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Fromm, M., and Schulzke, J.D., *TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling*. Cell Tissue Res, 2009. **336**(1): p. 67-77.
155. Sullivan, S., Alex, P., Dassopoulos, T., Zachos, N.C., Iacobuzio-Donahue, C., Donowitz, M., Brant, S.R., Cuffari, C., Harris, M.L., Datta, L.W., Conklin, L., Chen, Y., and Li, X., *Downregulation of sodium transporters and NHERF proteins in IBD patients and mouse colitis models: potential contributors to IBD-associated diarrhea*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(2): p. 261-74.
156. Siddique, I., Hasan, F., and Khan, I., *Suppression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform-3 in human inflammatory bowel disease: lack of reversal by 5'-aminosalicylate treatment*. Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(1): p. 56-64.
157. Larmonier, C.B., Laubitz, D., Thurston, R.D., Bucknam, A.L., Hill, F.M., Midura-Kiela, M., Ramalingam, R., Kiela, P.R., and Ghishan, F.K., *NHE3 modulates the severity of colitis in IL-10-deficient mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(6): p. G998-G1009.
158. Greig, E.R., Boot-Handford, R.P., Mani, V., and Sandle, G.I., *Decreased expression of apical Na⁺ channels and basolateral Na⁺, K⁺-ATPase in ulcerative colitis*. J Pathol, 2004. **204**(1): p. 84-92.
159. Sandle, G.I., Higgs, N., Crowe, P., Marsh, M.N., Venkatesan, S., and Peters, T.J., *Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon*. Gastroenterology, 1990. **99**(1): p. 97-105.
160. Amasheh, S., Barmeyer, C., Koch, C.S., Tavalali, S., Mankertz, J., Epple, H.J., Gehring, M.M., Florian, P., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.D., *Cytokine-dependent transcriptional down-regulation of epithelial sodium channel in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2004. **126**(7): p. 1711-20.
161. Barmeyer, C., Erko, I., Fromm, A., Bojarski, C., Allers, K., Moos, V., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.D., *Ion transport and barrier function are disturbed in microscopic colitis*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1258**(1): p. 143-8.

-
162. Barmeyer, C., Amasheh, S., Tavalali, S., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.D., *IL-1beta and TNFalpha regulate sodium absorption in rat distal colon*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(2): p. 500-7.
163. Zeissig, S., Bergann, T., Fromm, A., Bojarski, C., Heller, F., Guenther, U., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.D., *Altered ENaC expression leads to impaired sodium absorption in the noninflamed intestine in Crohn's disease*. Gastroenterology, 2008. **134**(5): p. 1436-47.
164. Sandle, G.I., Hayslett, J.P., and Binder, H.J., *Effect of glucocorticoids on rectal transport in normal subjects and patients with ulcerative colitis*. Gut, 1986. **27**(3): p. 309-16.
165. Bergann, T., Zeissig, S., Fromm, A., Richter, J.F., Fromm, M., and Schulzke, J.D., *Glucocorticoids and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce absorption by the epithelial sodium channel in the colon*. Gastroenterology, 2009. **136**(3): p. 933-42.
166. Zeissig, S., Fromm, A., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.D., *Restoration of ENaC expression by glucocorticoid receptor transfection in human HT-29/B6 colon cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(4): p. 1065-70.
167. Kreuzel, K.M., Fromm, M., Schulzke, J.D., and Hegel, U., *Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6)*. Am J Physiol, 1991. **261**(4 Pt 1): p. C574-82.
168. Tian, R.T., Xie, P.S., and Liu, H.P., *Evaluation of traditional Chinese herbal medicine: Chaihu (Bupleuri Radix) by both high-performance liquid chromatographic and high-performance thin-layer chromatographic fingerprint and chemometric analysis*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(11): p. 2150-5.
169. Zhao, L., Liu, B., Wu, F., Tao, L., and Liu, J., *[Study on extraction process of Radix Bupleuri]*. Zhong Yao Cai, 2004. **27**(10): p. 764-6.
170. Yen, M.H., Lin, C.C., Chuang, C.H., and Liu, S.Y., *Evaluation of root quality of Bupleurum species by TLC scanner and the liver protective effects of "xiao-chai-hu-tang" prepared using three different Bupleurum species*. J Ethnopharmacol, 1991. **34**(2-3): p. 155-65.
171. Gillies, R.J., Didier, N., and Denton, M., *Determination of cell number in monolayer cultures*. Anal Biochem, 1986. **159**(1): p. 109-13.
172. Chomczynski, P. and Sacchi, N., *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
173. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
174. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
175. Ussing, H.H. and Zerahn, K., *Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin*. Acta Physiol Scand, 1951. **23**(2-3): p. 110-27.
176. Li, H., Sheppard, D.N., and Hug, M.J., *Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber*. J Cyst Fibros, 2004. **3 Suppl 2**: p. 123-6.
177. Wang, F., Schwarz, B.T., Graham, W.V., Wang, Y., Su, L., Clayburgh, D.R., Abraham, C., and Turner, J.R., *IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction*. Gastroenterology, 2006. **131**(4): p. 1153-63.

178. Wang, X., Wu, H., Lakdawala, V.S., Hu, F., Hanson, N.D., and Miller, A.H., *Inhibition of Jun N-terminal kinase (JNK) enhances glucocorticoid receptor-mediated function in mouse hippocampal HT22 cells*. Neuropsychopharmacology, 2005. **30**(2): p. 242-9.
179. Rogatsky, I., Logan, S.K., and Garabedian, M.J., *Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2050-5.
180. Roy, P.K., Rashid, F., Bragg, J., and Ibdah, J.A., *Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(2): p. 200-2.
181. Niisato, N., Taruno, A., and Marunaka, Y., *Involvement of p38 MAPK in hypotonic stress-induced stimulation of beta- and gamma-ENaC expression in renal epithelium*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(3): p. 819-24.
182. Zentner, M.D., Lin, H.H., Wen, X., Kim, K.J., and Ann, D.K., *The amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha-subunit is transcriptionally down-regulated in rat parotid cells by the extracellular signal-regulated protein kinase pathway*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30770-6.
183. Debonneville, C., Flores, S.Y., Kamynina, E., Plant, P.J., Tauxe, C., Thomas, M.A., Munster, C., Chraïbi, A., Pratt, J.H., Horisberger, J.D., Pearce, D., Loffing, J., and Staub, O., *Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁺ channel cell surface expression*. Embo J, 2001. **20**(24): p. 7052-9.
184. Itani, O.A., Liu, K.Z., Cornish, K.L., Campbell, J.R., and Thomas, C.P., *Glucocorticoids stimulate human sgk1 gene expression by activation of a GRE in its 5'-flanking region*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(5): p. E971-9.
185. Snyder, P.M., Olson, D.R., and Thomas, B.C., *Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 5-8.
186. Bell, L.M., Leong, M.L., Kim, B., Wang, E., Park, J., Hemmings, B.A., and Firestone, G.L., *Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by a p38 MAPK-dependent pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25262-72.
187. Waldegger, S., Gabrysch, S., Barth, P., Fillon, S., and Lang, F., *h-sgk serine-threonine protein kinase as transcriptional target of p38/MAP kinase pathway in HepG2 human hepatoma cells*. Cell Physiol Biochem, 2000. **10**(4): p. 203-8.
188. Lee, C.T., Tyan, S.W., Ma, Y.L., Tsai, M.C., Yang, Y.C., and Lee, E.H., *Serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the MAPK/ERK signaling pathway that mediates memory formation in rats*. Eur J Neurosci, 2006. **23**(5): p. 1311-20.
189. Lofberg, R., *Medical treatment for inflammatory bowel disease--refinements and new modalities*. J Intern Med, 1997. **241**(1): p. 1-4.
190. Kirsner, J.B., *Historical aspects of inflammatory bowel disease*. J Clin Gastroenterol, 1988. **10**(3): p. 286-97.
191. Pae, H.O., Oh, G.S., Choi, B.M., Shin, S., Chai, K.Y., Oh, H., Kim, J.M., Kim, H.J., Jang, S.I., and Chung, H.T., *Inhibitory effects of the stem bark of Catalpa ovata G. Don. (Bignoniaceae) on the productions of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide by the lipopolisaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages*. J Ethnopharmacol, 2003. **88**(2-3): p. 287-91.
192. Ammon, H.P., *Boswellic acids in chronic inflammatory diseases*. Planta Med, 2006. **72**(12): p. 1100-16.
193. Chaturvedi, M.M., Kumar, A., Darnay, B.G., Chainy, G.B., Agarwal, S., and Aggarwal, B.B., *Sanguinarine (pseudochelethrine) is a potent inhibitor of NF-kappaB activation, I kappa B alpha phosphorylation, and degradation*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30129-34.

194. Chan, M.M., *Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical*. Biochem Pharmacol, 1995. **49**(11): p. 1551-6.
195. Singh, S. and Aggarwal, B.B., *Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]*. J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 24995-5000.
196. Sugimoto, K., Hanai, H., Tozawa, K., Aoshi, T., Uchijima, M., Nagata, T., and Koide, Y., *Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice*. Gastroenterology, 2002. **123**(6): p. 1912-22.
197. Hanai, H. and Sugimoto, K., *Curcumin has bright prospects for the treatment of inflammatory bowel disease*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(18): p. 2087-94.
198. Hull, M.A., *Nutritional Agents with Anti-Inflammatory Properties in Chemoprevention of Colorectal Neoplasia*. Recent Results Cancer Res, 2012. **191**: p. 143-56.
199. Vinod, B.S., Maliekal, T.T., and Anto, R.J., *Phytochemicals As Chemosensitizers: From Molecular Mechanism to Clinical Significance*. Antioxid Redox Signal, 2012.
200. Dvorak, Z., Vrzal, R., Maurel, P., and Ulrichova, J., *Differential effects of selected natural compounds with anti-inflammatory activity on the glucocorticoid receptor and NF-kappaB in HeLa cells*. Chem Biol Interact, 2006. **159**(2): p. 117-28.
201. Manez, S., Recio, M.C., Giner, R.M., and Rios, J.L., *Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation*. Eur J Pharmacol, 1997. **334**(1): p. 103-5.
202. Recio, M.C., Giner, R.M., Manez, S., Gueho, J., Julien, H.R., Hostettmann, K., and Rios, J.L., *Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from Diospyros leucomelas*. Planta Med, 1995. **61**(1): p. 9-12.
203. Aburai, N., Yoshida, M., Ohnishi, M., and Kimura, K., *Sanguinarine as a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 2C in vitro and induces apoptosis via phosphorylation of p38 in HL60 cells*. Biosci Biotechnol Biochem, 2010. **74**(3): p. 548-52.
204. Fulda, S. and Kroemer, G., *Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers*. Drug Discov Today, 2009. **14**(17-18): p. 885-90.
205. Carroll, A.R., Addepalli, R., Fechner, G., Smith, J., Guymer, G.P., Forster, P.I., and Quinn, R.J., *Alkaloids from the Australian rainforest tree Ochrosia moorei*. J Nat Prod, 2008. **71**(6): p. 1063-5.
206. Cao, S., Low, K.N., Glover, R.P., Crasta, S.C., Ng, S., Buss, A.D., and Butler, M.S., *Sundaicumones A and B, polyprenylated acylphloroglucinol derivatives from Calophyllumsundaicum with weak activity against the glucocorticoid receptor*. J Nat Prod, 2006. **69**(4): p. 707-9.
207. Aehle, E., Muller, U., Eklund, P.C., Willfor, S.M., Sippl, W., and Drager, B., *Lignans as food constituents with estrogen and antiestrogen activity*. Phytochemistry, 2011. **72**(18): p. 2396-405.
208. Abarzua, S., Szewczyk, M., Gailus, S., Richter, D.U., Ruth, W., Briese, V., and Piechulla, B., *Effects of phytoestrogen extracts from Linum usitatissimum on the Jeg3 human trophoblast tumour cell line*. Anticancer Res, 2007. **27**(4A): p. 2053-8.
209. Singh, K.K., Mridula, D., Rehal, J., and Barnwal, P., *Flaxseed: a potential source of food, feed and fiber*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2011. **51**(3): p. 210-22.
210. Pianjing, P., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Watcharasit, P., Mahidol, C., and Satayavivad, J., *Estrogenic activities of sesame lignans and their metabolites on human breast cancer cells*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(1): p. 212-21.
211. Ryu, J.H., Son, H.J., Lee, S.H., and Sohn, D.H., *Two neolignans from Perilla frutescens and their inhibition of nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha expression in murine macrophage cell line RAW 264.7*. Bioorg Med Chem Lett, 2002. **12**(4): p. 649-51.

-
212. Lee, A.K., Sung, S.H., Kim, Y.C., and Kim, S.G., *Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-alpha and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappaBalpha phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation*. Br J Pharmacol, 2003. **139**(1): p. 11-20.
213. Barnes, P.J., *Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms*. Clin Sci (Lond), 1998. **94**(6): p. 557-72.
214. Taniguchi-Yanai, K., Koike, Y., Hasegawa, T., Furuta, Y., Serizawa, M., Ohshima, N., Kato, N., and Yanai, K., *Identification and characterization of glucocorticoid receptor-binding sites in the human genome*. J Recept Signal Transduct Res, 2010. **30**(2): p. 88-105.
215. Schacke, H., Schottelius, A., Docke, W.D., Strehlke, P., Jaroch, S., Schmees, N., Rehwinkel, H., Hennekes, H., and Asadullah, K., *Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 227-32.
216. Haridas, V., Xu, Z.X., Kitchen, D., Jiang, A., Michels, P., and Gutterman, J.U., *The anticancer plant triterpenoid, avicin d, regulates glucocorticoid receptor signaling: implications for cellular metabolism*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e28037.
217. Li, X.X., Davis, B., Haridas, V., Gutterman, J.U., and Colombini, M., *Proapoptotic triterpene electrophiles (avicins) form channels in membranes: cholesterol dependence*. Biophys J, 2005. **88**(4): p. 2577-84.
218. Lemeshko, V.V., Haridas, V., Quijano Perez, J.C., and Gutterman, J.U., *Avicins, natural anticancer saponins, permeabilize mitochondrial membranes*. Arch Biochem Biophys, 2006. **454**(2): p. 114-22.
219. Ismaili, N. and Garabedian, M.J., *Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1024**: p. 86-101.
220. Barmeyer, C., Harren, M., Schmitz, H., Heinzl-Pleines, U., Mankertz, J., Seidler, U., Horak, I., Wiedenmann, B., Fromm, M., and Schulzke, J.D., *Mechanisms of diarrhea in the interleukin-2-deficient mouse model of colonic inflammation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(2): p. G244-52.
221. Sousa, M., Ousingawat, J., Seitz, R., Puntheeranurak, S., Regalado, A., Schmidt, A., Grego, T., Jansakul, C., Amaral, M.D., Schreiber, R., and Kunzelmann, K., *An extract from the medicinal plant Phyllanthus acidus and its isolated compounds induce airway chloride secretion: A potential treatment for cystic fibrosis*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(1): p. 366-76.
222. Butt, M.S., Sultan, M.T., and Iqbal, J., *Garlic: nature's protection against physiological threats*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2009. **49**(6): p. 538-51.
223. Krumm, P., Giraldez, T., Alvarez de la Rosa, D., Clauss, W.G., Fronius, M., and Althaus, M., *Thiol-reactive compounds from garlic inhibit the epithelial sodium channel (ENaC)*. Bioorg Med Chem, 2012. **20**(13): p. 3979-84.
224. Aoi, W., Niisato, N., Miyazaki, H., and Marunaka, Y., *Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **315**(4): p. 892-6.
225. Lebowitz, J., Edinger, R.S., An, B., Perry, C.J., Onate, S., Kleyman, T.R., and Johnson, J.P., *IkkappaB kinase-beta (ikkbeta) modulation of epithelial sodium channel activity*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 41985-90.
226. Edinger, R.S., Lebowitz, J., Li, H., Alzamora, R., Wang, H., Johnson, J.P., and Hallows, K.R., *Functional regulation of the epithelial Na⁺ channel by IkkappaB kinase-beta occurs via phosphorylation of the ubiquitin ligase Nedd4-2*. J Biol Chem, 2009. **284**(1): p. 150-7.

-
227. Altonsy, M.O. and Andrews, S.C., *Diallyl disulphide, a beneficial component of garlic oil, causes a redistribution of cell-cycle growth phases, induces apoptosis, and enhances butyrate-induced apoptosis in colorectal adenocarcinoma cells (HT-29)*. *Nutr Cancer*, 2011. **63**(7): p. 1104-13.
228. Manna, S.K., Mukhopadhyay, A., Van, N.T., and Aggarwal, B.B., *Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis*. *J Immunol*, 1999. **163**(12): p. 6800-9.
229. Lee, H.S., Ryu, D.S., Lee, G.S., and Lee, D.S., *Anti-inflammatory effects of dichloromethane fraction from *Orostachys japonicus* in RAW 264.7 cells: suppression of NF-kappaB activation and MAPK signaling*. *J Ethnopharmacol*, 2012. **140**(2): p. 271-6.
230. Mun, S.H., Kim, H.S., Kim, J.W., Ko, N.Y., Kim do, K., Lee, B.Y., Kim, B., Won, H.S., Shin, H.S., Han, J.W., Lee, H.Y., Kim, Y.M., and Choi, W.S., *Oral administration of curcumin suppresses production of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 to ameliorate collagen-induced arthritis: inhibition of the PKCdelta/JNK/c-Jun pathway*. *J Pharmacol Sci*, 2009. **111**(1): p. 13-21.
231. Dean, J.L., Sarsfield, S.J., Tsounakou, E., and Saklatvala, J., *p38 Mitogen-activated protein kinase stabilizes mRNAs that contain cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor AU-rich elements by inhibiting deadenylation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(41): p. 39470-6.
232. Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C.Y., Shyu, A.B., Muller, M., Gaestel, M., Resch, K., and Holtmann, H., *The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism*. *Embo J*, 1999. **18**(18): p. 4969-80.
233. Miyazawa, K., Mori, A., Miyata, H., Akahane, M., Ajisawa, Y., and Okudaira, H., *Regulation of interleukin-1beta-induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(38): p. 24832-8.
234. Ehling, C., Lai, W.S., Schaper, F., Brenndorfer, E.D., Matthes, R.J., Heinrich, P.C., Ludwig, S., Blackshear, P.J., Gaestel, M., Haussinger, D., and Bode, J.G., *Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade*. *J Immunol*, 2007. **178**(5): p. 2813-26.
235. Stephens, J.M., Carter, B.Z., Pekala, P.H., and Malter, J.S., *Tumor necrosis factor alpha-induced glucose transporter (GLUT-1) mRNA stabilization in 3T3-L1 preadipocytes. Regulation by the adenosine-uridine binding factor*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(12): p. 8336-41.
236. Clark, A.R. and Lasa, M., *Crosstalk between glucocorticoids and mitogen-activated protein kinase signalling pathways*. *Curr Opin Pharmacol*, 2003. **3**(4): p. 404-11.
237. Hutter, D., Chen, P., Barnes, J., and Liu, Y., *Catalytic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 by binding to p38 MAP kinase: critical role of the p38 C-terminal domain in its negative regulation*. *Biochem J*, 2000. **352 Pt 1**: p. 155-63.
238. Kassel, O., Sancono, A., Kratzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M., and Cato, A.C., *Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1*. *Embo J*, 2001. **20**(24): p. 7108-16.
239. Vogt, A., Tamewitz, A., Skoko, J., Sikorski, R.P., Giuliano, K.A., and Lazo, J.S., *The benzo[c]phenanthridine alkaloid, sanguinarine, is a selective, cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(19): p. 19078-86.

-
240. Booth, R.E. and Stockand, J.D., *Targeted degradation of ENaC in response to PKC activation of the ERK1/2 cascade*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(5): p. F938-47.
241. Niisato, N., Ohta, M., Eaton, D.C., and Marunaka, Y., *Hypotonic stress upregulates beta- and gamma-ENaC expression through suppression of ERK by inducing MKP-1*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **303**(2): p. F240-52.
242. Cobb, M.H., *MAP kinase pathways*. Prog Biophys Mol Biol, 1999. **71**(3-4): p. 479-500.
243. Slack, D.N., Seternes, O.M., Gabrielsen, M., and Keyse, S.M., *Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16491-500.
244. Liao, Q., Guo, J., Kleeff, J., Zimmermann, A., Buchler, M.W., Korc, M., and Friess, H., *Down-regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1 suppresses tumorigenicity of pancreatic cancer cells*. Gastroenterology, 2003. **124**(7): p. 1830-45.
245. Lin, Y.W., Chuang, S.M., and Yang, J.L., *ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21534-41.
246. Naray-Fejes-Toth, A., Fejes-Toth, G., Volk, K.A., and Stokes, J.B., *SGK is a primary glucocorticoid-induced gene in the human*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000. **75**(1): p. 51-6.
247. Meng, F., Yamagiwa, Y., Taffetani, S., Han, J., and Patel, T., *IL-6 activates serum and glucocorticoid kinase via p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(4): p. C971-81.
248. Won, M., Park, K.A., Byun, H.S., Kim, Y.R., Choi, B.L., Hong, J.H., Park, J., Seok, J.H., Lee, Y.H., Cho, C.H., Song, I.S., Kim, Y.K., Shen, H.M., and Hur, G.M., *Protein kinase SGK1 enhances MEK/ERK complex formation through the phosphorylation of ERK2: implication for the positive regulatory role of SGK1 on the ERK function during liver regeneration*. J Hepatol, 2009. **51**(1): p. 67-76.
249. Kim, M.J., Chae, J.S., Kim, K.J., Hwang, S.G., Yoon, K.W., Kim, E.K., Yun, H.J., Cho, J.H., Kim, J., Kim, B.W., Kim, H.C., Kang, S.S., Lang, F., Cho, S.G., and Choi, E.J., *Negative regulation of SEK1 signaling by serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase 1*. EMBO J, 2007. **26**(13): p. 3075-85.
250. Zhang, L., Cui, R., Cheng, X., and Du, J., *Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I{kappa}B kinase*. Cancer Res, 2005. **65**(2): p. 457-64.
251. Lu, C.N., Yuan, Z.G., Zhang, X.L., Yan, R., Zhao, Y.Q., Liao, M., and Chen, J.X., *Saikosaponin a and its epimer saikosaponin d exhibit anti-inflammatory activity by suppressing activation of NF-kappaB signaling pathway*. Int Immunopharmacol, 2012. **14**(1): p. 121-6.
252. Chande, N., MacDonald, J.K., and McDonald, J.W., *Interventions for treating microscopic colitis: a Cochrane Inflammatory Bowel Disease and Functional Bowel Disorders Review Group systematic review of randomized trials*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(1): p. 235-41; quiz 234, 242.
253. Joos, S., Rosemann, T., Szecsenyi, J., Hahn, E.G., Willich, S.N., and Brinkhaus, B., *Use of complementary and alternative medicine in Germany - a survey of patients with inflammatory bowel disease*. BMC Complement Altern Med, 2006. **6**: p. 19.
254. Kim, S.W., Choi, S.C., Choi, E.Y., Kim, K.S., Oh, J.M., Lee, H.J., Oh, H.M., Kim, S., Oh, B.S., Kimm, K.C., Lee, M.H., Seo, G.S., Kim, T.H., Oh, H.C., Woo, W.H., Kim, Y.S., Pae, H.O., Park, D.S., Chung, H.T., and Jun, C.D., *Catalposide, a compound*

- isolated from catalpa ovata, attenuates induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduces the severity of trinitrobenzene sulfonic Acid-induced colitis in mice.* Inflamm Bowel Dis, 2004. **10**(5): p. 564-72.
255. Kwon, H.S., Oh, S.M., and Kim, J.K., *Glabridin, a functional compound of liquorice, attenuates colonic inflammation in mice with dextran sulphate sodium-induced colitis.* Clin Exp Immunol, 2008. **151**(1): p. 165-73.
256. Latella, G., Sferra, R., Vetusch, A., Zanninelli, G., D'Angelo, A., Catitti, V., Caprilli, R., and Gaudio, E., *Prevention of colonic fibrosis by Boswellia and Scutellaria extracts in rats with colitis induced by 2,4,5-trinitrobenzene sulphonic acid.* Eur J Clin Invest, 2008. **38**(6): p. 410-20.
257. Zhao, W., Sun, C., He, J., Chen, L., Zhang, Y., and Sun, W., *The possible mechanisms of Picrasma quassiodes (D. Don) Benn. in the treatment of colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid in mice.* J Ethnopharmacol, 2012.
258. Anthoni, C., Laukoetter, M.G., Rijcken, E., Vowinkel, T., Mennigen, R., Muller, S., Senninger, N., Russell, J., Jauch, J., Bergmann, J., Granger, D.N., and Krieglstein, C.F., *Mechanisms underlying the anti-inflammatory actions of boswellic acid derivatives in experimental colitis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(6): p. G1131-7.
259. Kiela, P.R., Midura, A.J., Kuscuoglu, N., Jolad, S.D., Solyom, A.M., Besselsen, D.G., Timmermann, B.N., and Ghishan, F.K., *Effects of Boswellia serrata in mouse models of chemically induced colitis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(4): p. G798-808.
260. Krieglstein, C.F., Anthoni, C., Rijcken, E.J., Laukoetter, M., Spiegel, H.U., Boden, S.E., Schweizer, S., Safayhi, H., Senninger, N., and Schurmann, G., *Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid, a constituent of a herbal medicine from Boswellia serrata resin, attenuates experimental ileitis.* Int J Colorectal Dis, 2001. **16**(2): p. 88-95.
261. Madisch, A., Miehlke, S., Eichele, O., Mrwa, J., Bethke, B., Kuhlisch, E., Bastlein, E., Wilhelms, G., Morgner, A., Wigglinghaus, B., and Stolte, M., *Boswellia serrata extract for the treatment of collagenous colitis. A double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial.* Int J Colorectal Dis, 2007. **22**(12): p. 1445-51.
262. Holtmeier, W., Zeuzem, S., Preiss, J., Kruis, W., Bohm, S., Maaser, C., Raedler, A., Schmidt, C., Schnitker, J., Schwarz, J., Zeitz, M., and Caspary, W., *Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of Boswellia serrata in maintaining remission of Crohn's disease: good safety profile but lack of efficacy.* Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(2): p. 573-82.
263. Kim, S.M., Kim, S.C., Chung, I.K., Cheon, W.H., and Ku, S.K., *Antioxidant and Protective Effects of Bupleurum falcatum on the L-Thyroxine-Induced Hyperthyroidism in Rats.* Evid Based Complement Alternat Med, 2012. **2012**: p. 578497.
264. Lee, B., Yun, H.Y., Shim, I., Lee, H., and Hahm, D.H., *Bupleurum falcatum prevents depression and anxiety-like behaviors in rats exposed to repeated restraint stress.* J Microbiol Biotechnol, 2012. **22**(3): p. 422-30.
265. Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., and Mason, T.J., *Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction.* Ultrason Sonochem, 2001. **8**(2): p. 137-42.
266. Valachovic, P., Pechova, A., and Mason, T.J., *Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction.* Ultrason Sonochem, 2001. **8**(2): p. 111-7.
267. Vinatoru, M., *An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs.* Ultrason Sonochem, 2001. **8**(3): p. 303-13.

268. Zhao, S., Kwok, K.-C., and Liang, H., *Investigation on ultrasound assisted extraction of saikosaponins from Radix Bupleuri*. Separation and Purification Technology, 2007. **55**(3): p. 307-12.

7.1 Verwendete Bücher

- Bensky (1989) Chinese Herbal Medicine. Formulas & Strategies. Eastland Press. & Barolet
- DOMIN (1928) Beiträge zur Flora und Pflanzengeographie Australiens. Bibliotheca botanica. 89.
- Hayland (1989) Australian Systematic Botany 2: A revision of Lauraceae in Australia
- Pan et al. (2006) Bupleurum Species. Scientific Evaluation and Clinical Applications. Taylor & Francis. CRC Press Book.
- Sticher et al. (2007) Pharmakognosie – Phytopharmazie. Springer Verlag.
- Wagner et al. (1993) Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe. Gustav Fischer Verlag.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
AP-1	Activator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ASCI-1	Acid-sensing Ion Channel 1
BK	Big K ⁺ Channel
BSA	Bovines Serum Albumin
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CNK3	Connector Enhancer of Kinase Suppressor of Ras 3
C-Terminus	Carboxyterminus
CREB	cAMP Response Element Binding-Protein
CU	Colitis Ulcerosa
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENaC	Epithelialer Natrium-Kanal (<i>Epithelial Na⁺ Channel</i>)
End A	Endiandrin A
ERC	ENaC-regulierender Komplex (<i>ENaC-regulating complex</i>)
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehy-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Glucocorticoid
GILZ	Glucocorticoid-induced Leucine Zipper
Gin Rg ₁	Ginsenosid Rg ₁
GR	Glucocorticoidrezeptor

Abkürzungsverzeichnis

GRE	Glucocorticoid responsive elements
11 β -HSD 2	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 2
HRE	Hormone responsive elements
Hsp	Hitzeschockprotein (<i>Heat Shock Protein</i>)
IEC	Intestinale Epithelzelle (<i>Intestinal Epithelial cell</i>)
IFN- γ	Interferon- γ
IL-2	Interleukin 2
I _{sc}	Kurzschlussstrom
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MAPKAPK	MAPK-activated Protein Kinase
MC	Morbus Crohn
MC	Mineralocorticoid
MDP	Murayl-Dipeptid
MMTV	Maus-Mammatumovirus
MR	Mineralocorticoidrezeptor
MW	Mittelwert
Nedd4-2	Neural Presursor Cell-expressed, Developmentally Downregulated Gene 4
NFKB	Nuclear factor-KB
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ -Exchanger 3
NOD2	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Protein 2
NR3C1	Nuclear Receptor subfamily 3, Group C, member 1
NSAID	Nicht-Steroidales Antirheumatikum (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug)
N-Terminus	Aminoterminus
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDK1	3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

Abkürzungsverzeichnis

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RT	Raumtemperatur
SCFA	Kurzkettige Fettsäure (<i>Short Chain Fatty Acid</i>)
SCNN1	Sodium Channel Non-neuronal 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Mittlerer Standardfehler (<i>Standard error of the mean</i>)
SGK-1	Serum- and Glucocorticoid-induced Kinase 1
SsD	Saikosaponin D
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
TER	Transepitheliale Widerstand
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TBS	Tris-buffered saline

Internationale übliche SI-Einheiten sind nicht extra aufgeführt worden.

9 Anhang

Publikationen

Originalarbeiten:

· Kuntzsch, D., Bergann, T., Dames, P., Fromm, A., Fromm, M., Davis, R. A., Melzig, M. F., Schulzke, J. D., *The plant-derived glucocorticoid receptor agonist Endiandrin A acts as co-stimulator of colonic epithelial sodium channels (ENaC) via Sgk-1 and MAPKs*. PLoS One, 2012. 7(11): p. e49426.

Kongressbeiträge

Vorträge:

· 8. Veranstaltung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) Landesgruppe Berlin-Brandenburg, „Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor“, Berlin, 02. Juli 2010
Kuntzsch, D., Bergann, T., Davis, R. A., Melzig, M. F., Schulzke, J. D., *Effect of Endiandrin A on the epithelial sodium channel (ENaC) in the colon*.

· 24rd Meeting European Intestinal Transport Group (EITG), Oxford, England, 04. – 07. September 2011
Kuntzsch, D., Bergann, T., Davis, R. A., Melzig, M. F., Fromm, M., Schulzke, J. D., *Endiandrin A a phyto-glucocorticoid that enhances colonic epithelial sodium channel (ENaC) function*.

Abstract erschienen in: Genes and Nutrition, 2012. 6 (Supplement 1): p. S23

Teilnahme:

23rd Meeting European Intestinal Transport Group (EITG), Salerno, Italien,
07. – 10. April 2010

III. Meeting Intestinale Mucosafunktion, Kloster Arnsburg, 09. – 10. Juli 2010

Kuntzsch, D., Fromm, A., Fromm, M., Schulzke, J. D., Bergann, T., *The epithelial sodium channel (ENaC): Regulation in the glucocorticoid therapy of Inflammatory Bowel Diseases (IBD)*.

Extended Abstract erschienen in: Zeitschrift für Gastroenterologie, 2011. 49: S6-S8

International Conference on „Barriers and channels formed by Tight Junction“, Berlin,
22. – 24. September 2011

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke (Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, Charité Campus Benjamin Franklin), der mir die Möglichkeit gab, die Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Auch möchte ich mich für die Betreuung, die intensiven und lebhaften Gespräche und Diskussionen bedanken.

Prof. Dr. Matthias F. Melzig (Institut für Pharmazeutische Biologie, Freie Universität Berlin) möchte ich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit an der Freien Universität Berlin danken. Zudem danke ich für den gelegentlichen fachlichen Austausch und für die Mitnutzung der Laboreinrichtungen. Prof. Dr. Gerhard Wolber (Institut für Pharmazeutische Chemie, Freie Universität Berlin) möchte ich für seine Unterstützung danken.

Dr. Rohan Davis (Eskitis Institute, Griffith University, Australien) und den Botanischen Gärten Berlin, Bonn und Wien möchte ich für die freundliche Kooperation danken. Prof. Dr. Michael Fromm (Institut für Klinische Physiologie, Charité, Campus Benjamin Franklin) danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und Hilfe bei der Anfertigung von Vorträgen und für das Korrekturlesen meiner Arbeiten.

Mein Dank gilt Dr. Theresa Bergann für die gemeinsame Erarbeitung eines interessanten Themas, für die Laboreinarbeitung und sorgsame Betreuung über die Jahre meiner Forschungsarbeit. Auch möchte ich mich bei ihr für die Durchsicht einiger Arbeiten, für fachliche Ratschläge und für eine ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herzlich bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für die gemeinsame Zeit im Labor. Bei Ing. grad. Detlef Sorgenfrei und In-Fah Maria Lee möchte ich mich ganz besonders für ihre tatkräftige Unterstützung zu jeder Zeit bedanken. Ein herzlicher Dank geht an Lena John und Dr. Svenja Plöger.

Zum Schluss möchte ich es nicht missen, meiner Familie und meinen Freunden für die aufmunternden und antreibenden Worte zu danken. Ein großer Dank an meine Großeltern. Marcial, du warst und bist immer für mich da, Dank dafür.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Dana Kuntzsch, versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.