



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Screening verschiedener Farnextrakte auf Rezeptoraktivierung von PPAR α , PPAR γ und auf Rezeptorinhibierung von NF κ B

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Katharina Huber
Matrikel-Nummer:	a0200637
Studienrichtung:	A449 Diplomstudium Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek

Wien, im Juli 2009

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Diplomarbeit beigetragen haben.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, am Department für Pharmakognosie der Universität Wien, bedanke ich mich bei Frau **Univ. Prof. Dr. Verena M. Dirsch**.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Professor, **Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek**, für die interessante Themenstellung und die hervorragende fachliche Betreuung während der praktischen Arbeit, sowie bei der Erstellung der Diplomarbeit.

Weiters möchte ich mich bei **Univ. Prof. Mag. Dr. Johann Jurenitsch** für die interessanten Diskussionen und Anregungen zur praktischen Arbeit bedanken.

Ein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe Dirsch. Im Besonderen **Dr. Atanas Atanasov**, der die gewonnen Extrakte mittels Zelltest untersucht und mir die Ergebnisse zur Verfügung gestellt hat.

Meinen Kollegen und Kolleginnen möchte ich danken für das angenehme Arbeitsklima und die vielen lustigen Stunden die wir gemeinsam verbracht haben.

Ein herzlicher Dank gilt auch meine Eltern und Geschwistern, die mich während der Zeit des Studiums immer unterstützt und begleitet haben.

Meinem Freund **Christoph** sei ein ganz besonderer Dank ausgesprochen. Er hat immer an mich geglaubt und ist mir immer zur Seite gestanden.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	13
2 Problemstellung	15
3 Material	17
3.1 Dryopteris filix-mas	18
3.2 Dryopteris dilatata.....	19
3.3 Athyrium filix-femina	20
3.4 Matteuccia struthiopteris.....	21
4 Methoden	23
4.1 Beschleunigte Lösungsmittlextraktion	23
4.2 Dünnschichtchromatographie	26
4.3 Festphasenextraktion	28
4.4 Pharmakologische Untersuchungen	31
4.4.1 Zellen.....	31
4.4.2 Luciferasen	32
4.4.3 PPAR.....	33
4.4.4 NFκB.....	35
4.4.5 Zellkultur	37
4.4.6 Transfektion.....	38
5 Experimenteller Teil	41
5.1 Drogenvorbereitung.....	42
5.2 Extraktion.....	42
5.3 Chlorophyllabtrennung.....	43
5.4 DC-Überprüfung der Chlorophyllabtrennung	44
5.5 Festphasenextraktion	50
5.6 DC-Überprüfung der SPE-Fractionen	52

5.7	Zelltest.....	62
5.7.1	PPAR-Test	63
5.7.2	NFκB-Test	63
5.7.3	Auswertung der Messungen.....	64
5.7.4	Zelltest mit Extrakten unterschiedlicher Polarität.....	64
5.7.5	Zelltest mit Dichlormethanextrakten	67
6	Ergebnisse und Diskussion	71
7	Zusammenfassung.....	75
	Literaturverzeichnis	77
	Lebenslauf	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nennungen verschiedener Drogen bei Rheuma und Gicht in der VOLKSMED-Daktenbank [2].....	13
Abbildung 2: Ödemreduktion verschiedener Farnextrakte im Vergleich zu Indomethacin beim Mäuseohr-Ödem-Test [3].	14
Abbildung 3: Echter Wurmfarne (<i>Dryopteris filix-mas</i>), Unterseite einer Blatffieder mit einzelnen Fiederblättchen und den noch schleierbedeckten jungen Sori [11].	18
Abbildung 4: Breitblättriger Dornfarne (<i>Dryopteris dilatata</i>) [9], mit Sori besetzte Blattunterseite [11].....	19
Abbildung 5: Wald-Frauenfarne (<i>Athyrium filix-femina</i>) [11].	20
Abbildung 6: Straußenfarne (<i>Matteuccia struthiopteris</i>) [11].....	22
Abbildung 7: Allgemeiner Funktionsablauf einer ASE [15].....	24
Abbildung 8: Probenzelle, Dionex ASE 200 - Accelerated Solvent Extractor.....	24
Abbildung 9: Allgemeiner Ablauf einer Festphasenextraktion [14].....	29
Abbildung 10: Apparativer Aufbau der Festphasenextraktion.....	30
Abbildung 11: Skizze einer Apparatur zur Festphasenextraktion [13].....	30
Abbildung 12: HEK-293-Zellen in serumfreiem Medium [9].	31
Abbildung 13: Großer Leuchtkäfer (<i>Lampyrus noctiluca</i>) [9].....	32
Abbildung 14: Fluorometer / Luminometer.....	32
Abbildung 15: Aktivierungsschema des PPAR α und PPAR γ [9].....	34
Abbildung 16: Aktivierung des NF κ B-Signalweges in T-Lymphozyten [19]. (Bild modifiziert)	36
Abbildung 17: Überblick der einzelnen Arbeitsschritte	41
Abbildung 18: DC-Überprüfung von <i>Dryopteris filix-mas</i> 2006	45
Abbildung 19: DC-Überprüfung von <i>Dryopteris filix-mas</i> 2007	46
Abbildung 20: DC-Überprüfung von <i>Dryopteris dilatata</i>	46

Abbildung 21: DC-Überprüfung von <i>Athyrium filix-femina</i>	47
Abbildung 22: DC-Überprüfung von <i>Matteuccia struthiopteris</i>	47
Abbildung 23: DC-Überprüfung aller fünf gereinigten Drogenextrakte im Vergleich.....	48
Abbildung 24: 30%, 70% und 100% Methanolfractionen.....	50
Abbildung 25: DC-Vergleich von <i>Dryopteris filix-mas</i> 2006	53
Abbildung 26: DC-Vergleich von <i>Dryopteris filix-mas</i> 2007	54
Abbildung 27: DC-Vergleich von <i>Dryopteris dilatata</i>	55
Abbildung 28: DC-Vergleich von <i>Athyrium filix-femina</i>	56
Abbildung 29: DC-Vergleich von <i>Matteuccia struthiopteris</i>	57
Abbildung 30: DC-Vergleich der 30% Methanolfractionen	58
Abbildung 31: DC-Vergleich der 70% Methanolfractionen	59
Abbildung 32: DC-Vergleich der 100% Methanolfractionen	60
Abbildung 33: Übersicht der Extrakte für den Zelltest	62
Abbildung 34: Rezeptorinhibierung von NFκB.....	66
Abbildung 35: Rezeptoaktivierung von PPARα und PPARγ durch die gereinigten, fraktionierten Dichlormethanextrakte aus <i>Dryopteris filix-mas</i> 2006.	68
Abbildung 36: Rezeptorinhibierung von NFκB durch die gereinigten, fraktionierten Dichlormethanextrakte aus <i>Dryopteris filix-mas</i> 2006.	69
Abbildung 37: Ödemreduktion beim Mäuseohr-Ödem-Test durch Testung des Dichlormethanextraktes und dessen Aufarbeitungsprodukte im Vergleich zu Indomethacin [4]......	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick der Rezeptoraktivierung von PPAR α und PPAR γ , sowie der Rezeptorinhibierung von NF κ B durch die Originalextrakte.	65
Tabelle 2: Überblick der Rezeptoraktivierung von PPAR α und PPAR γ , sowie der Rezeptorinhibierung von NF κ B durch die Dichlormethanextrakte.	67
Tabelle 3: Überblick der Rezeptoraktivierung von PPAR α und PPAR γ , sowie der Rezeptorinhibierung von NF κ B durch die gereinigten, fraktionierten Dichlormethanextrakte aus <i>Dryopteris filix-mas</i> 2006.	68
Tabelle 4: Werte zu Abbildung 35.	68
Tabelle 5: Werte zu Abbildung 36.	69

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ASE	Accelerated Solvent Extraction
AMP	Adenosinmonophosphat
ASR	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celcius
cm ²	Quadratzenimeter
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EPFG	Enhanced Green Fluorescent Protein
FBS	Fetal bovine serum
FR	Filterrückstand
g	Gramm
GE	Gereinigtes Extrakt
HEK	Human Embryonic Kidney
IKK	I κ B α -Kinase-Komplex
LM	Lösungsmittel
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter

MPa	Megapascal
NFκB	Nuclear factor κB
nm	Nanometer
NSR	Naturstoffreagens A
OE	Originalextrakt
PBS	Phosphat buffered saline
PEG	Polyethylenglycol
PKC	Proteinkinase C
PLCγ	Phospholipase Cγ
PPAR	Peroxisomen Proliferator Aktivierter Rezeptor
RXR	Retinoid-X- Rezeptor
SPE	Solid Phase Extraction
TCR	T-Cell-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

1 Einleitung

Ausgangspunkt dieser und vorangegangener Diplomarbeiten war die Erstellung einer Volksmedizinischen Datenbank am Department für Pharmakognosie der Universität Wien. In dieser Datenbank wurde der volksmedizinische Erfahrungsschatz der älteren, ländlichen Bevölkerung in Österreich und der angrenzenden Gebiete zusammengetragen [2].

Bei der genaueren Analyse traditionell eingesetzter biogener Arzneimittel zur Anwendung bei Rheuma und Gicht, sowie Schmerzen des Bewegungsapparates, konnte festgestellt werden, dass Farne, äußerlich angewendet, die am häufigsten verwendete Arzneidroge bei dieser Indikation ist. Dies ist auch in Abbildung 1 ersichtlich.

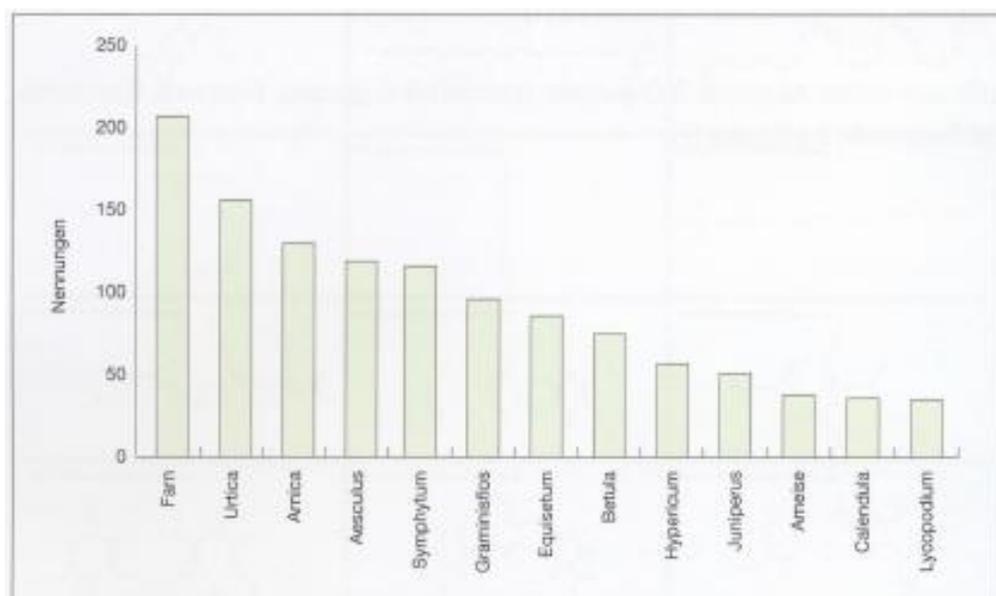


Abbildung 1: Nennungen verschiedener Drogen bei Rheuma und Gicht in der VOLKSMED-Datenbank [2].

Es ist anzumerken, dass in Österreich über 50 Farnarten vorkommen, deren Systematik noch nicht genau geklärt werden konnte. Ein Grund dafür ist das gehäufte Auftreten von Hybriden, sowie die große Komplexität der Merkmale.

Bei der volksmedizinischen Anwendung wird jedoch nicht zwischen den einzelnen Farnarten unterschieden, was ein Problem bei der

Untersuchung der Farne mit sich bringt. Auch in der Literatur ist zur Anwendung von Farnen als Antiphlogistikum wenig zu finden. Früher wurden Farnauszüge innerlich als Antihelmintikum, zur Bekämpfung bei Bandwurmbefall, eingesetzt. Aufgrund der geringen therapeutischen Breite kam es immer wieder wegen der enthaltenen Acylphloroglucinole zu Intoxikationen, weshalb diese Anwendung von Farnextrakten heute obsolet ist.

Die ersten wissenschaftlichen Belege für ein antiphlogistisches Potential konnten bei *Dryopteris filix-mas*, dem Wurmfarne, mittels in-vitro-Assay an murinen Makrophagen und an einem in-vivo-Tiermodell (Croton-Mäuseohr-Ödem-Test) mit Extrakten unterschiedlicher Polarität belegt werden. In Abbildung 2 wird gezeigt, dass die unpolaren Extrakte, vor allem der Dichlormethanextrakt, im Vergleich zu Indomethacin, die größte Aktivität aufweist [3].

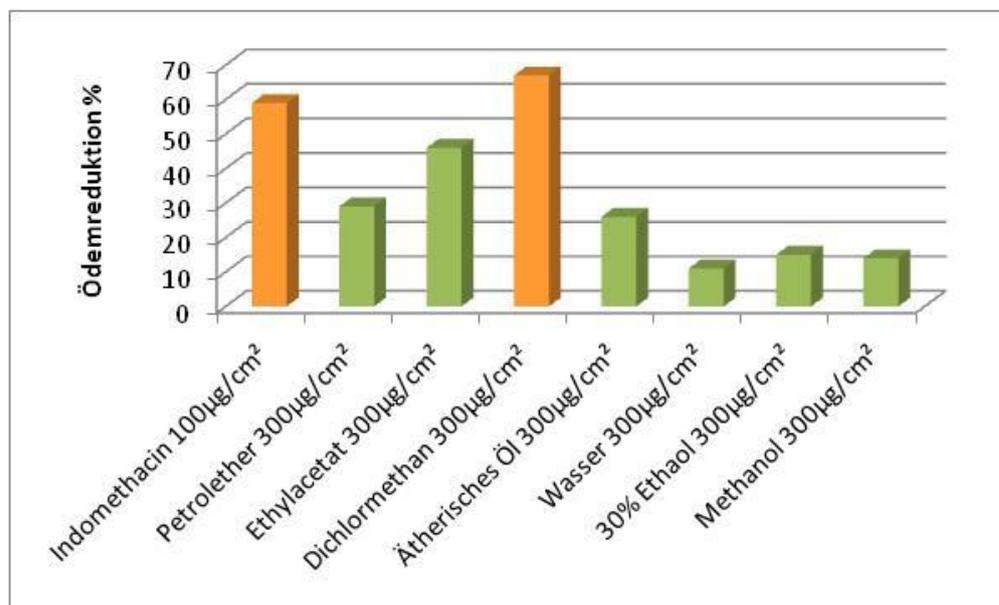


Abbildung 2: Ödemreduktion verschiedener Farnextrakte im Vergleich zu Indomethacin beim Mäuseohr-Ödem-Test [3].

2 Problemstellung

In vorangegangenen Diplomarbeiten wurde *Dryopteris filix-mas* untersucht. Diese Farnart ist am sichersten zu bestimmen und in Österreich am weitesten verbreitet. Zum Screening einer antiphlogistischen Wirkung wurden Tierversuche herangezogen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse waren vielversprechend und boten Anregungen für weitere Forschungsziele. Inzwischen ist es am Department für Pharmakognosie gelungen, drei weitere Farnarten eindeutig zu identifizieren und erste Untersuchungen durchzuführen.

Identifiziert Farne:

- *Dryopteris filix-mas* (Echter Wurmfarne)
- *Dryopteris dilatata* (Breitblättriger Dornfarne)
- *Athyrium filix-femina* (Wald-Frauenfarne)
- *Matteuccia struthiopteris* (Straußenfarne)

Bei vergleichenden phytochemischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Inhaltsstoffmuster dieser vier Farne voneinander abweichen. *Dryopteris dilatata*, *Athyrium filix-femina* und *Matteuccia struthiopteris* zeigten eine sehr ähnliche qualitative Zusammensetzung bei teilweise erheblichen quantitativen Unterschieden, während sich zu *Dryopteris filix-mas* deutlich qualitative und quantitative Unterschiede ergaben. *Dryopteris filix-mas* (Muster 2006 und 2007) zeigte ein annähernd gleiches Inhaltsstoffmuster aus zwei verschiedenen Vegetationsperioden [7].

Die bisherigen Untersuchungen bezüglich antiphlogistisches Potential der Farnextrakte wurden bis jetzt nur bei *Dryopteris filix-mas* mittels Tierversuchen durchgeführt. Leider sind diese Tests sehr

kostenintensiv, da viele Versuchstiere benötigt werden und sie bringen auch viele ethische Fragen mit sich.

In dieser Diplomarbeit sollte dementsprechend ein anderes Testsystem, basierend auf einem Zelltest, herangezogen werden. Am Department für Pharmakognosie wurden vor kurzem Testsysteme etabliert, welche die Testung einer Rezeptoraktivierung von PPAR α , PPAR γ und einer Rezeptorinhibierung von NF κ B ermöglichen. Es sollte festgestellt werden, ob die bisherigen in-vivo-Ergebnisse untermauert werden können bzw. ob diese Zell-Tests die Tierversuche für weitere Untersuchungen ersetzen könnten.

3 Material

Farne sind weit verbreitet. Weltweit gibt es rund 12.000 Arten, davon sind in Mitteleuropa etwa 200 Arten beheimatet. Sie kommen fast ausschließlich, bis auf wenige lichtliebende Arten, an schattigen und feuchten Plätzen vor und sind eine Gruppe innerhalb der Gefäßsporenpflanzen. Der Großteil der Farne ist krautig und besitzt ein Rhizom. Die Blätter sind Megaphylle, die sowohl der Photosynthese als auch der Fortpflanzung dienen. Sie sind häufig gefiedert, bilden den klassischen Wedel und sind während des Wachstums oft charakteristisch eingerollt. Als Inhaltsstoffe sind bis jetzt Phloroglucinole, Flavonoide, Phytosterole, Phenolsäuren, Terpenoide und ätherische Öle bekannt. Im Herbarium des Departments für Pharmakognosie der Universität Wien, liegen authentische Belegexemplare der identifizierten Farne auf [8].

1. *Dryopteris filix-mas* (Echter Wurmfarne)
2. *Dryopteris dilatata* (Breitblättriger Dornfarne)
3. *Athyrium filix-femina* (Wald-Frauenfarne)
4. *Matteuccia struthiopteris* (Straußenfarne)

3.1 *Dryopteris filix-mas*

Dryopteris filix-mas (L.) SCHOTT

Aufsammlung Sommer 2006 und 2007

Hochstaff bei Kleinzell, Niederösterreich

Systematik

Abteilung: Gefäßsporenpflanzen (*Polypodiophyta*)

Klasse: Echte Farne (*Polypodiopsida*)

Ordnung: Tüpfelartige (*Polypodiales*)

Familie: Wurmfarngewächse (*Dryopteridaceae*)

Gattung: Wurmfarne (*Dryopteris*)

Art: Echter Wurmfarn

Dryopteris filix-mas gehört zur Gattung der Wurmfarne und gilt als häufigster Vertreter. Er wird auch als **Echter-, Gewöhnlicher-** bzw. **Gemeiner Wurmfarn** oder als **Männerfarn** bezeichnet.

Die Wedel des immergrünen Farns sind in Rosetten angeordnet und erreichen eine Länge von 30 bis 140 Zentimeter. Der Blattstiel ist kurz und mit gelbbraunen Spreuschuppen locker besetzt. Das Blatt läuft spitz zu und ist zweifach gefiedert. Die abgerundeten Fiederblättchen sind am Rand scharf gesägt. Die Sporenbhälter sitzen zweireihig auf der Unterseite des Wedels [10,11].



Abbildung 3: Echter Wurmfarn (*Dryopteris filix-mas*), Unterseite einer Blattfieder mit einzelnen Fiederblättchen und den noch schleierbedeckten jungen Sori [11].

3.2 *Dryopteris dilatata*

Dryopteris dilatata (HOFFM.) A.GRAY

Ausammlung Sommer 2007

Hochstift bei Kleinzell, Niederösterreich

Systematik

Abteilung: Gefäßsporenpflanzen (*Polypodiophyta*)

Klasse: Echte Farne (*Polypodiopsida*)

Ordnung: Tüpfelartige (*Polypodiales*)

Familie: Wurmfarngewächse (*Dryopteridaceae*)

Gattung: Wurmfarne (*Dryopteris*)

Art: Breitblättriger Dornfarn

Dryopteris dilatata wird auch als **Breitblättriger Dornfarn** bezeichnet. Die überhängenden Wedel des sommergrünen Farns sind in Rosetten angeordnet und erreichen eine Länge von etwa einem Meter. Das Blatt ist drei- bis vierfach gefiedert, von dreieckigem bis ovalem Umriss und läuft spitz zu. Der Blattstiel ist halb bis fast so lang wie die Spreite. Die eckigen Fiederblättchen sind am Rand sehr fein gesägt [9,11].



Abbildung 4: Breitblättriger Dornfarn (*Dryopteris dilatata*) [9],
mit Sori besetzte Blattunterseite [11].

3.3 *Athyrium filix-femina*

Athyrium filix-femina (L.) ROTH

Aufsammlung Sommer 2007

Hochstaff bei Kleinzell, Niederösterreich

Systematik

Abteilung: Gefäßsporenpflanzen (*Polypodiophyta*)

Klasse: Echte Farne (*Polypodiopsida*)

Ordnung: Tüpfelartige (*Polypodiales*)

Familie: Wimpernfarngewächse (*Woodsiaceae*)

Gattung: Frauenfarne (*Athyrium*)

Art: Wald-Frauenfarn

Athyrium filix-femina, auch **Wald-Frauenfarn** genannt, ist eine sommergrüne Pflanze die mit ihrem Rhizom überwintert. Die Wedel erreichen eine Länge von 50 bis 100 Zentimeter und sind zwei- bis dreifach gefiedert. Ihre Hauptachse ist meist grün, manchmal strohfarben bis rosa. Die fiederschnittigen Fiederblättchen sind zwei- bis fünfmal so lang wie breit. Die Unterseite der Wedel ist mit kleinen, keulenförmigen Haaren besetzt. Die Sori sind langgestreckt, oft hackenförmig und mit einem schmalen Schleier bedeckt [10,11,12].



Abbildung 5: Wald-Frauenfarn (*Athyrium filix-femina*) [11].

Insgesamt ähnelt der Wald-Frauenfarn dem Wurmfarne, kann aber anhand der Form der Sori unterschieden werden. Aufgrund der Ähnlichkeit mit dem Echten Wurmfarne, der meist etwas derbere und größere Wedel hat, hielt man diese beiden Arten früher für Männchen und Weibchen. Daher kommt sowohl der deutsche Name „Frauenfarn“, als auch die wissenschaftliche Aufzeichnung *filix-femina* (*filix*=Farn, *femineus*=weiblich).

3.4 *Matteuccia struthiopteris*

Matteuccia struthiopteris (L.) TOD

Aufsammlung Sommer 2007

Lungau, Salzburg

Systematik

Abteilung: Gefäßsporenpflanzen (*Polypodiophyta*)

Klasse: Echte Farne (*Polypodiopsida*)

Ordnung: Tüpfelartige (*Polypodiales*)

Familie: *Onocleaceae*

Gattung: *Matteuccia*

Art: Straußenfarn

Matteuccia struthiopteris, auch **Straußenfarn** genannt, ist eine mehrjährige Pflanze. Die Blätter bilden eine aufrechte, trichterförmige Rosette, die zum Grund stark verschmälert ist. Die Pflanze kann eine Höhe von etwa 50 bis 60 Zentimeter erreichen. Die sterilen Blätter sind hellgrün und im Umriss breit-lanzettlich. Die Hauptfiedern sind fiederspaltig bis fiederschnittig. Der jeweils innerste Abschnitt, besonders der untersten Fiedern, ist sichelförmig über die Blattspindel gebogen. Von den sterilen Blättern unterscheiden sich die Sporophylle deutlich. Sie sind bei der Sporenreife dunkelbraun und straußenfedernartig, haben einen lineal-lanzettlichen Umriss, die

Hauptfiedern sind fiederlappig und die einzelnen Abschnitte sind zusammengerollt. Die Sporen werden erst im folgenden Frühjahr ausgestreut [10,11,12].



Abbildung 6: Straußenfarn (*Matteuccia struthiopteris*) [11].

4 Methoden

4.1 Beschleunigte Lösungsmittlextraktion

Unter Extraktion versteht man das Herauslösen eines oder mehrerer Stoffe aus einem Extraktionsgut mit geeigneten Lösungsmitteln.

In dieser Arbeit erfolgte die Extraktion durch **Accelerated Solvent Extraction (ASE, übersetzt: Beschleunigte Lösungsmittlextraktion)**. ASE ist ein Extraktionsverfahren für Inhaltsstoffe aus festen und halbfesten Proben. Die Arbeitsbedingungen unter Druck und bei erhöhten Temperaturen führen zu einer starken Beschleunigung der Reaktionskinetik, zur schnelleren Desorption der Analyte von der Matrix, sowie zu einem beschleunigten Verlauf des Lösungsprozesses insgesamt. Als Lösungsmittel (LM) können zum einen organische LM, zum anderen auch wässrige Flüssigkeiten verwendet werden. Je nach Apparatur können bis zu vier verschiedene LM kombiniert oder abwechselnd für eine Extraktion verwendet werden.

Abbildung 7 zeigt einen allgemeinen Funktionsablauf einer ASE. Die Extraktionszelle wird mit dem zu untersuchenden Probenmaterial befüllt und in einen regelbaren Ofen platziert (*load cell*). Es folgt die Füllung der Zelle mit dem LM (*fill with solvent*). Anschließend wird die Zelle unter konstantem Druck, einstellbar von 0,3 bis 20 MPa, auf die zuvor bestimmte Temperatur (40 bis 200 °C) erhitzt (*heat und pressure*) und eine Zeit lang auf konstanten Bedingungen gehalten, damit sich das Gleichgewicht einstellen kann (*static extraction*). Das Extrakt wird dann in ein Probenglas übergeführt und anschließend wird die Extraktionszelle nochmals mit LM gespült (*flush with fresh solvent*). Nachfolgend wird das Spülventil geöffnet und die Zelle, sowie alle

Leitungen mit Stickstoff gespült (*purge with nitrogen*) und die Apparatur für weitere Extraktionen vorbereitet [13,14].

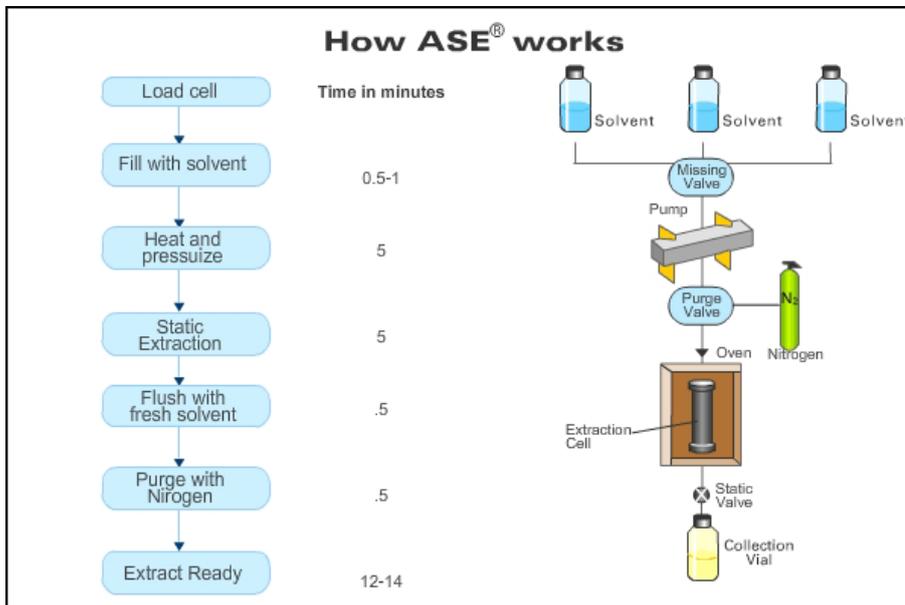


Abbildung 7: Allgemeiner Funktionsablauf einer ASE [15].



Abbildung 8: Probenzelle, Dionex ASE 200 - Accelerated Solvent Extractor

Auf der linken Seite in Abbildung 8 ist eine Probenzelle abgebildet. Diese gibt es in verschiedenen Größen und sie sind aus Edelstahl gefertigt um dem hohen Druck stand zu halten. Rechts sieht man eine gesamte Apparatur mit den verschiedenen LM-Behältern, dem Display zur Einstellung der Parameter, den Zellen und den Probengläsern.

Die Vorteile dieses Extraktionsverfahrens, im Vergleich zu anderen Methoden, liegen in einem geringeren Lösungsmittelverbrauch, der besseren Löslichkeit bei höheren Temperaturen, in der guten Reproduzierbarkeit, da Temperatur und Druck einstellbar sind und in der Schnelligkeit, mit der die Extraktion erfolgt.

Durch verschiedene Tests mehrerer Dissertanten konnte festgestellt werden, dass beim Durchlaufen eines Zyklus, d.h. das Drogenmaterial in einer Zelle wird dreimal mit frischem LM extrahiert, die größte Menge an Extrakt gewonnen werden kann.

Parameter der ASE:

Heat-up time:	5 min
Static time:	2 min
Flush:	10 %
Purge time:	1 min
Cycles:	1
Pressure:	150 bar
Temperature:	40°C
Solvent:	Petrolether Methanol Ethylacetat Dichlormethan Destilliertes Wasser Ethanol 30%

Füllmaterial:

DIONEX ASE® Prep DE

Diatomaceous Earth

4.2 Dünnschichtchromatographie

Die **Dünnschichtchromatographie (DC)** ist ein Verfahren zur Auftrennung und Analyse von Stoffgemischen. Besonders vorteilhaft sind der geringe apparative Aufwand, die Schnelligkeit der Methode, die hohe Trennleistung und der geringe Substanzbedarf. Basis der Auftrennung ist die unterschiedliche Verteilung der Stoffe in zwei Phasen. Die mobile Phase (Flüssigkeit oder Gas) bewegt sich an der stationären Phase (Feststoff oder Flüssigkeit) vorbei und nimmt die Stoffe dabei unterschiedlich schnell mit.

➤ **Stationäre Phase**

Die stationäre Phase wird von einer dünnen Schicht einer stark adsorbierenden Substanz gebildet. Die vorwiegend verwendeten Adsorbentien sind Siliziumoxide (Kieselgur, Kieselgel), Magnesiumsilicat, Magnesiumoxid und Aluminiumoxid.

➤ **Mobile Phase**

Als mobile Phase eignen sich organische Flüssigkeiten (z.B. Petrolether, Isopropanol, Butanol o.Ä.).

➤ **Der Trennungsmechanismus**

Die Trennung beruht vorwiegend auf Adsorptionsphänomenen. Die Stoffe verteilen sich zwischen der Oberfläche der stationären Phase und der mobilen Phase. Für die Wandergeschwindigkeit ist entscheidend, wie stark sich der Stoff an die stationäre Phase bindet und wie gut der Stoff in der mobilen Phase löslich ist.

➤ **Detektion**

Eine Möglichkeit der Detektion ist das Betrachten unter UV-Licht. Alternativ können getrennte Substanzen mittels Sprüh- oder Tauchreagentien sichtbar gemacht werden. Bei der Verwendung dieser Reagentien kommen Farbreaktionen zum Einsatz, die empfindlich und spezifisch genug sind, um zum Nachweis bestimmter funktioneller Gruppen verwendet werden zu können [13,14,16].

Parameter für die dünnschichtchromatographische Untersuchungen:

- Stationäre Phase: KG 60 F₂₄₅, Fertigplatten MERCK®
Schichtdicke: 0,25 mm
- Mobile Phase: Toluol – Ethylformiat – konz. Ameisensäure
(5 + 4 + 1)
- Trennstrecke: 8 cm
- Detektion: **Naturstoffreagens A (NSR)**
1%ige methanolische Lösung von
Diphenylboryloxyethylamin
Nachbesprüht mit einer 5%igen
ethanolischen Lösung von
Polyethylenglykol (PEG) 400

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (ASR)

17 T Ethanol

2 T konz. Schwefelsäure

1 T Anisaldehyd

Nach dem Besprühen 5 min auf 100°C im
Trockenschrank erhitzen.

Naturstoffreagens A wird zum Nachweis von Flavonen und Flavonolen eingesetzt. Dabei kommt es zur Komplexbildung mit dem Reagens und somit zu fluoreszierenden Substanzzonen. Die Fluoreszenzintensität kann durch Nachbesprühen mit PEG-Lösung verstärkt werden. Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens ist ein Universalreagens zur Detektion vieler organischer Verbindungen. Erst nach dem Erhitzen entstehen Substanzzonen [13].

4.3 Festphasenextraktion

Die **Festphasenextraktion** (*engl. Solid Phase Extraction, SPE*) kann als Sonderform der Säulenchromatographie gesehen werden. Das Prinzip basiert, wie bei allen chromatographischen Methoden, auf der Wechselwirkung des Analyten mit stationärer und mobiler Phase. Dadurch können nun:

- Zielanalyten zurückgehalten und Interferenzen eluiert oder
- Zielanalyten eluiert und Interferenzen zurückgehalten werden,

wodurch eine Reinigung (clean-up) und Anreicherung der Analyten erreicht werden kann.

Abbildung 9 zeigt den prinzipiellen Ablauf einer Festphasenextraktion:

1. Es erfolgt die Konditionierung des Trägermaterials um ein Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase einzustellen.
2. Die Probenauftragung soll langsam und in möglichst kleinen Volumen erfolgen.
3. Es kommt zu Wechselwirkungen zwischen der Probe und dem Säulenmaterial. Innerhalb der stationären Phase werden die Analyte sowie mögliche Verunreinigungen durch die Wechselwirkungen zurückgehalten und angereichert.
4. Durch vorsichtiges Waschen der Säule mit LM, die keine Desorption der Analyte auslösen, können Großteile der Verunreinigungen entfernt werden.
5. Die Sorbens-Trocknung erfolgt mit Stickstoff oder Luft.
6. Mit starken LM erfolgt eine selektive Elution der Zielanalyte.

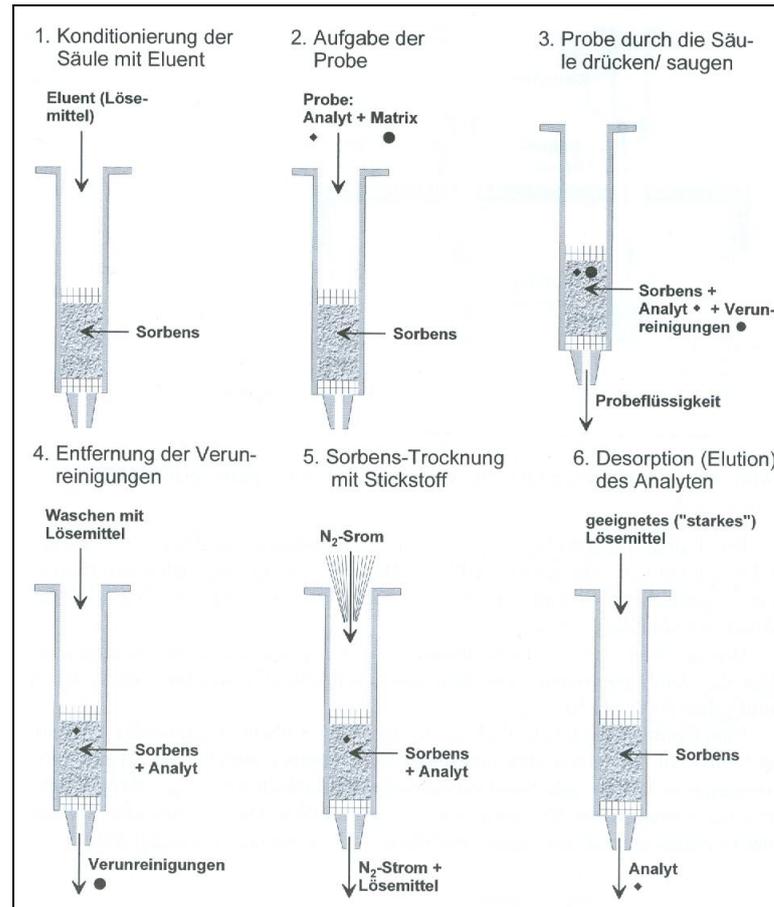


Abbildung 9: Allgemeiner Ablauf einer Festphasenextraktion [14].

In den Abbildungen 10 und 11 ist der Aufbau einer SPE abgebildet. Die Apparatur besteht aus einer am Vakuum angeschlossenen Glaskammer. Am Deckel dieser Kammer befinden sich Vorrichtungen zum Befestigen der Säulchen (auch Kartuschen genannt), die aus Polypropylen bestehen und die stationäre Phase enthalten, deren Ober- und Unterseite mit Filterfritten abgedeckt sind. Auf der Innenseite des Deckels befinden sich Kanülen um die Fraktionen gezielt in den Probengefäßen auffangen zu können. Mittels Ventil kann die Stärke des Vakuums geregelt werden und somit auch die Geschwindigkeit der Elution. Durch das Vakuum wird in der Kammer ein Unterdruck aufgebaut, der es ermöglicht, dass das Elutionsmittel die Kartusche schneller durchläuft.



Abbildung 10: Apparativer Aufbau der Festphasenextraktion.

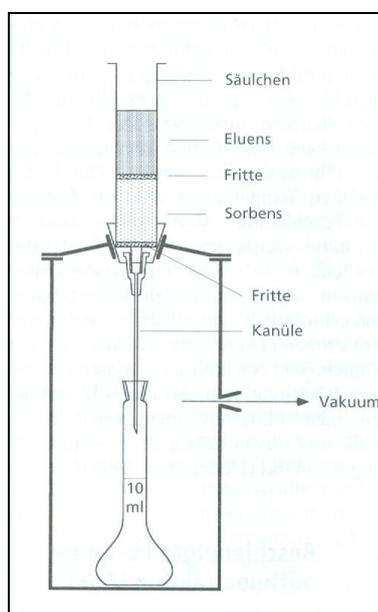


Abbildung 11: Skizze einer Apparatur zur Festphasenextraktion [13].

Parameter der Festphasenextraktion:

Stationäre Phase: Varian Mega Bond Eluent C18, 5 g

Mobile Phase: 30%, 70% und 100% Methanol

Auftragemenge: ca. 50 mg gereinigtes Extrakt

Elutionsmenge: 5 Reservoirvolumina je 20 ml

4.4 Pharmakologische Untersuchungen

Die pharmakologischen Untersuchungen beruhen auf einem Luciferase basierenden Zelltest, mit welchem die Rezeptoraktivierung von Peroxisomen Proliferator Aktivierte Rezeptoren (PPAR) und die Rezeptorinhibierung von Nuclear Faktor- κ B (NF κ B) überprüft werden kann.

4.4.1 Zellen

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um „Human Embryonic Kidney“-Zellen (HEK-293), also um menschliche embryonale Nierenzellen. HEK-293 ist eine humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus geschaffen wurden und mit denen bestimmte Adenovirus-Gene exprimiert werden. Eine Variante der HEK-293-Zellen, die HEK-293T-Zellen exprimieren zusätzlich das „SV40 large T-Antigen“, welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem „SV40 origin of replication“ ermöglichen [9].

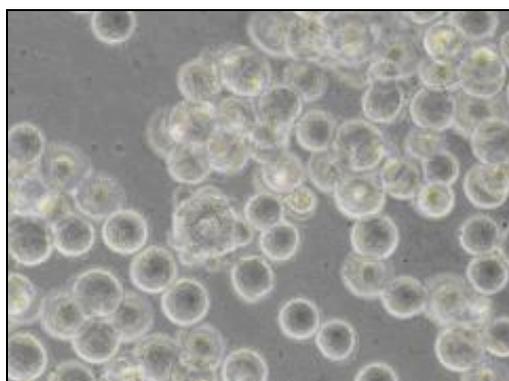


Abbildung 12: HEK-293-Zellen in serumfreiem Medium [9].

4.4.2 Luciferasen

Luciferasen sind Enzyme, in deren Anwesenheit Luciferin mit Sauerstoff zu einem energiereicheren, instabilen Dioxetan reagiert. Beim Zerfall dieser Substanz kommt es zur Biolumineszenz, d.h. Lebewesen haben die Fähigkeit Licht selbst oder mit Hilfe von Symbionten zu erzeugen. Verwendet wurden Firefly-Luciferasen aus dem Leuchtkäfer. Allgemein betrachtet reagieren Luciferin, ATP und Sauerstoff zu Kohlendioxid, AMP und Licht. Das bei dieser Reaktion entstehende Licht wird mittels Luminometer detektiert.

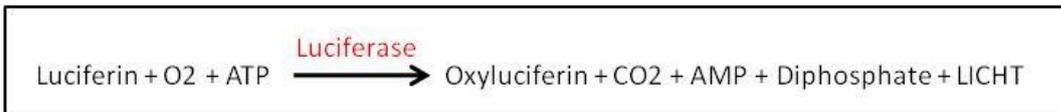


Abbildung 13: Großer Leuchtkäfer (*Lampyris noctiluca*) [9].



Abbildung 14: Fluorometer / Luminometer

4.4.3 PPAR

PPAR steht für „*Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor*“, NFκB für „*Nuclear Factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells*“. PPAR und NFκB sind nukleäre Rezeptoren, welche die Expression verschiedener Gene stimulieren und/oder inhibieren. Man spricht von Transaktivierung oder Transrepression. Die mit Liganden besetzten Rezeptoren werden zu Transkriptionsfaktoren, oder sie fördern oder hemmen andere Transkriptionsfaktoren [17].

Von PPAR sind inzwischen mehrere Isoformen bekannt:

PPAR α

PPAR α kommt vor allem in der Leber, aber auch im braunen Fettgewebe, der Niere, dem Herz und im Skelettmuskel vor. Seine Aktivierung steigert den Fettsäureabbau in der Leber [18].

PPAR γ

PPAR γ kommt hauptsächlich im Fettgewebe vor und bewirkt bei Aktivierung eine vermehrte Expressierung von Glucosetransportern und damit eine verstärkte Aufnahme von Glucose in die Zelle. In der Leber verringert er die Gluconeogenese und erhöht die Glykolyse. Außerdem senkt er die Expressierung des Tumornekrosefaktors- α , der als eine Ursache der Insulinresistenz vermutet wird. PPAR γ hemmt aber auch inflammatorische Zytokine und die Proliferation aktivierter T-Zellen. Darüber hinaus hat PPAR γ Einfluß auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung [18].

PPAR δ/β

PPAR δ , auch als PPAR β bezeichnet, tritt in vielen Geweben wie Darm, Niere und Herz auf [18].

Bislang konnten jedoch nur für die α - und die γ -Form funktionelle Bedeutungen nachgewiesen werden.

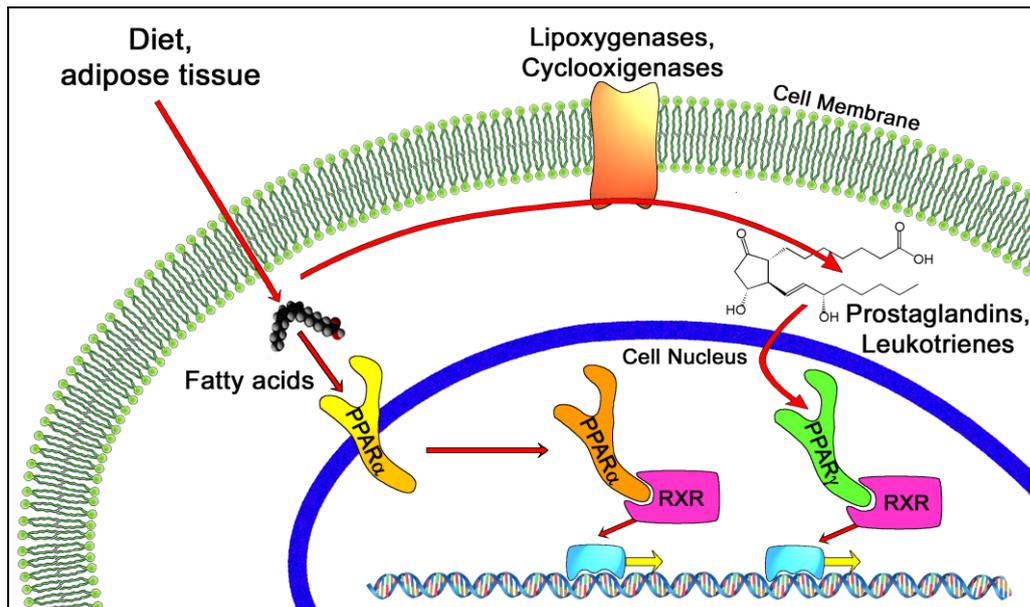


Abbildung 15: Aktivierungsschema des PPAR α und PPAR γ [9].

Abbildung 15 zeigt das allgemeine Aktivierungsschema von PPAR α und PPAR γ . PPARs werden durch spezifische Liganden aktiviert. Bei PPAR α sind dies endogene Liganden wie Fettsäuren, einige Eicosanoide und zur Therapie von Hyperlipoproteinämie eingesetzte hochaffine, synthetische, lipidsenkende Fibrate. Thiazolidindione, die Anwendung in der Behandlung des Typ 2 Diabetes finden, sind Liganden für PPAR γ , ebenso wie oxidierte Fettsäuren und Prostaglandinderivate. Nach Bindung eines Liganden bilden die PPARs funktionell aktive Heterodimere mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Diese PPAR/RXR-Heterodimere binden über eine DNA-bindende Domäne an spezifische DNA-Fragmente und die Gentranskription wird aktiviert [18].

Der genaue Zusammenhang zwischen PPAR-Aktivierung und dem Entzündungsgeschehen ist Teil vieler Untersuchungen. PPARs sind nukleäre Rezeptoren mit Einfluss auf die Genexpression. In der Literatur wird PPAR α vor allem mit dem Fettstoffwechsel, PPAR γ mit dem Kohlenhydratstoffwechsel in Verbindung gebracht. PPAR γ hemmt aber auch inflammatorische Zytokine und die Proliferation aktivierter T-Zellen.

Verschiedene Autoren konnten in den vergangenen Jahren zeigen, dass PPAR α und PPAR γ auch in der Gefäßwand vorhanden sind und in Makrophagen, Endothelzellen und in glatten Muskelzellen exprimiert werden. In Makrophagen führt die Aktivierung von PPAR α zur Reduktion der prokoagulatorischen Aktivität wohingegen die Aktivierung von PPAR γ unter anderem die Sekretion entzündungsfördernder Zytokine inhibiert. PPAR γ hemmt in Endothelzellen die Expression chemotaktisch wirksamer Proteine und unterbindet somit die Migration proinflammatorischer Zellen aus dem Blut. PPAR α -Aktivatoren inhibieren in glatten Gefäßmuskelzellen die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Interleukin 6.

Berücksichtigt man die zahlreichen Mechanismen die von PPARs beeinflusst werden, so ist von einer Schlüsselrolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen auszugehen. Auch ist zu erwarten, dass von diesen Transkriptionsfaktoren ein therapeutischer Nutzen bei inflammatorischen Prozessen ausgeht [22].

4.4.4 NF κ B

Nuclear Faktor- κ B (NF κ B) reguliert die Genexpression, welche Entzündung, Proliferation, Differenzierung und Apoptose kontrollieren. NF κ B ist in einigen wenigen Zelltypen (B-Lymphozyten und dendritischen Zellen) immer im Zellkern vorhanden und damit konstitutiv aktiv, d.h. ohne Einwirkung von äußeren Stimuli. In den

meisten anderen Zelltypen dagegen liegt NF κ B inaktiv im Zytoplasma vor und hat deswegen keinen Zugang zu der im Zellkern befindlichen DNA. Eine Aktivierung durch Stimuli, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und chemisch- physikalische Noxen bewirkt eine Änderung der Aktivität zellulärer Signalwege, die häufig durch Phosphorylierung vermittelt werden. Diese Aktivierung erfolgt schon wenige Minuten nach der

Stimulation, da keine neuen Proteine synthetisiert werden müssen, weil NF κ B bereits funktionsbereit im Zytoplasma vorliegt [9].

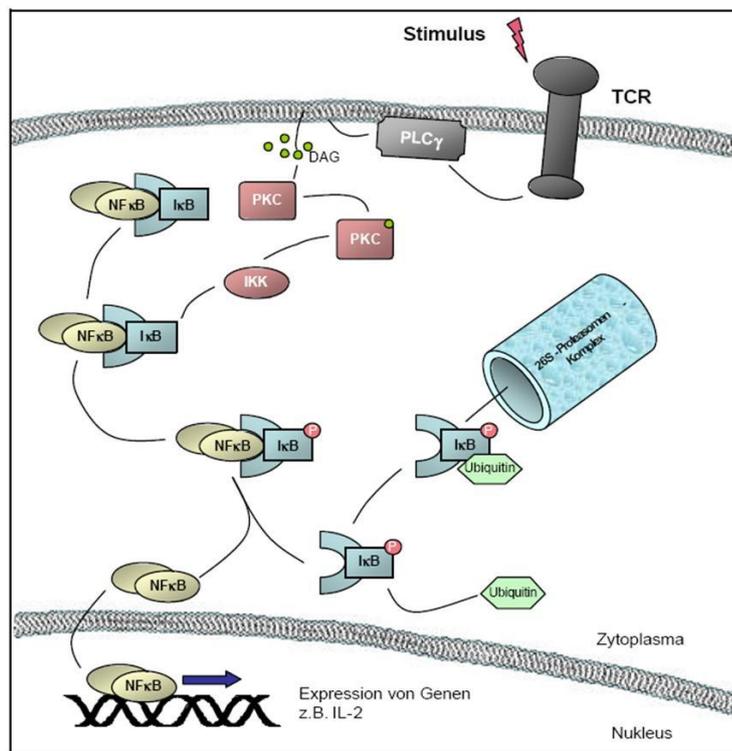


Abbildung 16: Aktivierung des NF κ B-Signalweges in T-Lymphozyten [19].
(Bild modifiziert)

Nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) wird, wie in Abbildung 16 veranschaulicht, die membranständige Phospholipase C γ (PLC γ) aktiviert, die durch Lipolyse aus der Membran Diacylglycerol (DAG) freisetzt. Dieser sekundärer Botenstoff aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und diese nachfolgend einen I κ B α -Kinase-Komplex (IKK). Durch Phosphorylierung des Inhibitors κ B dissoziiert dieser von NF κ B ab und der Transkriptionsfaktor kann in den Zellkern translozieren, dort an spezifische DNA-Sequenzen binden und die Expression von Genen beeinflussen. Der phosphorylierte Inhibitor κ B wird ubiquitinyliert und vom 26S-Proteasomen-Komplex abgebaut [19].

Die Aktivierung von NFκB hat einen bedeutenden Einfluss auf die Entstehung von Entzündungen. NFκB wird durch verschiedenste Formen von Zellstress aktiviert und fungiert als sogenannter Transkriptionsfaktor. Durch ihn wird ein entzündliches und abwehribereites Muster der Gen-Expression hervorgerufen. Einige der entstehenden entzündlichen Botenstoffe sind in der Lage den NFκB erneut zu aktivieren, so dass eine Wirkungsverstärkung eintritt. Ein antiphlogistischer Zusammenhang besteht darin diese Kaskade zu durchbrechen, NFκB zu inhibieren und somit auf das Entzündungsgeschehen Einfluss zu nehmen [21].

4.4.5 Zellkultur

Human embryonic kidney Zellen (HEK) sind adhärenente Fibroblasten ähnliche Zellen, die als Monolayer wachsen und aus primärem embryonalem Nierengewebe stammen.

Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte nach standardisierten Methoden. Als Nährmedium wird Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet. Die Supplementierung, eine gezielte und ergänzende Aufnahme einzelner Nährstoffe neben dem gewöhnlichen Nährmedium, erfolgt mit 10%igem fetalem Kälberserum (FBS, fetal bovine serum), Penicillin-Streptomycin und Glutamin. Anschließend werden die Zellen bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert, bis zum Erreichen der Konfluenz. In diesem Stadium ist die gesamte Oberfläche mit Zellen bedeckt. Die Zellen befinden sich in sehr engem Kontakt und hören meist auf, sich zu

teilen. Um ein weiteres Wachstum zu gewährleisten, muss das Medium gewechselt und die Zellen unter Verdünnung in ein neues Kulturgefäß übergeführt werden. Diesen Vorgang nennt man auch „Passagieren“. Trypsin-EDTA-Lösung wird zum Ablösen der Zellen benötigt, FBS um

die Trypsinierung wieder zu stoppen. Phosphat buffered saline (PBS) ist eine physiologische Salzlösung, die durch ihre Pufferkapazität den pH-Wert stabilisiert und ein osmotisches Gleichgewicht gewährleistet. PBS wird vor allem zum Waschen der Zellen verwendet.

4.4.6 Transfektion

Die Transfektion ist eine Methode zur Einschleusung von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Verwendet wurde die Methode der Kalzium-Phosphat-Präzipitation, die meist verwendete Technik. Dabei sind Kalzium- und Phosphationen die entscheidenden Komponenten. Die Fremd-DNA wird mit einer Kalziumchloridlösung gemischt. Bei der weiteren Zugabe einer Phosphatlösung fällt Kalziumphosphat als Präzipitat (Niederschlag) aus. Die DNA, die auch Phosphatgruppen hat, fällt mit aus und wird mit dem Kalziumphosphat in die Zelle vermutlich über Endozytose aufgenommen. Die aufgenommene DNA wird im Zellkern transkribiert, wobei eine komplementäre mRNA entsteht. Diese wird aus dem Nucleus zu den Ribosomen im Zytoplasma transportiert, dort translatiert und in ein Protein übersetzt.

Während der Transfektion sollten sich die Zellen im exponentiellen Wachstum befinden. Sind sie bereits zu dicht gewachsen und ist die Konfluenz erreicht, können sie sich nicht mehr teilen und die Transfektion funktioniert nicht [20].

Die Transfektion erfolgte mit PPRE-tk3x-Luc, bzw. mit pNF κ B-Luc und pEGFP-C1 (Clontech[®]).

- **PPRE-tk3x-Luc** ist ein in DNA inkludiertes PPAR-Luciferase-Reporter Konstrukt, je für PPAR α und PPAR γ , ein Expressions-Plasmid für das entsprechende PPAR Rezeptor Protein.

- **pNFκB-Luc** ist ein in DNA inkludiertes NFκB-Luciferase-Reporter Konstrukt, ein Expressions-Plasmid für das NFκB Rezeptor Protein.
- **pEGFP-C1** (*enhanced-green-fluorescence-protein*, **EGFP**) ist ein grün fluoreszierendes Markergen für eine bessere Detektion und dient auch als interne Kontrolle. Es weist gegenüber dem Wildtyp eine fünf bis zehnfach stärkere Expression auf.

Quantifiziert werden die Lumineszenz des Glühwürmchens und die Fluoreszenz von EGFP mittels „*GeniosPro plate reader*“ (Tecan, Austria), einem Fluorometer/Luminometer. Das Luciferase-Signal vom PPRE-tk3x-Luc-, bzw. pNFκB-Luc-Reporter wird gegen die Fluoreszenz vom pEGFP-C1 normalisiert um die Unterschiede in der Zellzahl und/oder in der Effizienz der Transfektion berechnen zu können.

Parameter des Zelltests:

Zellen:	HEK-293-Zellen HEK-293T-Zellen
Medien:	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) FBS (Fetal bovine serum) BPS (Phospat buffered saline) Trypsin-EDTA
Plasmide:	PPRE-tk3x-Luc pNFκB-Luc pEGFP-C1

5 Experimenteller Teil

Der experimentelle Teil beschäftigt sich mit der praktischen Arbeit dieser Diplomarbeit. In den nachfolgenden Kapiteln sollen die verschiedenen Vorgangsweisen explizit dargestellt werden. Abbildung 17 zeigt einen Überblick der verschiedenen Arbeitsschritte, von der Bearbeitung des Ausgangsmaterials über die Pulverisierung, der Extraktion mit verschiedenen polaren LM und der Aufbereitung der gewonnenen Extrakte, bis hin zur Testung im Zellsystem.

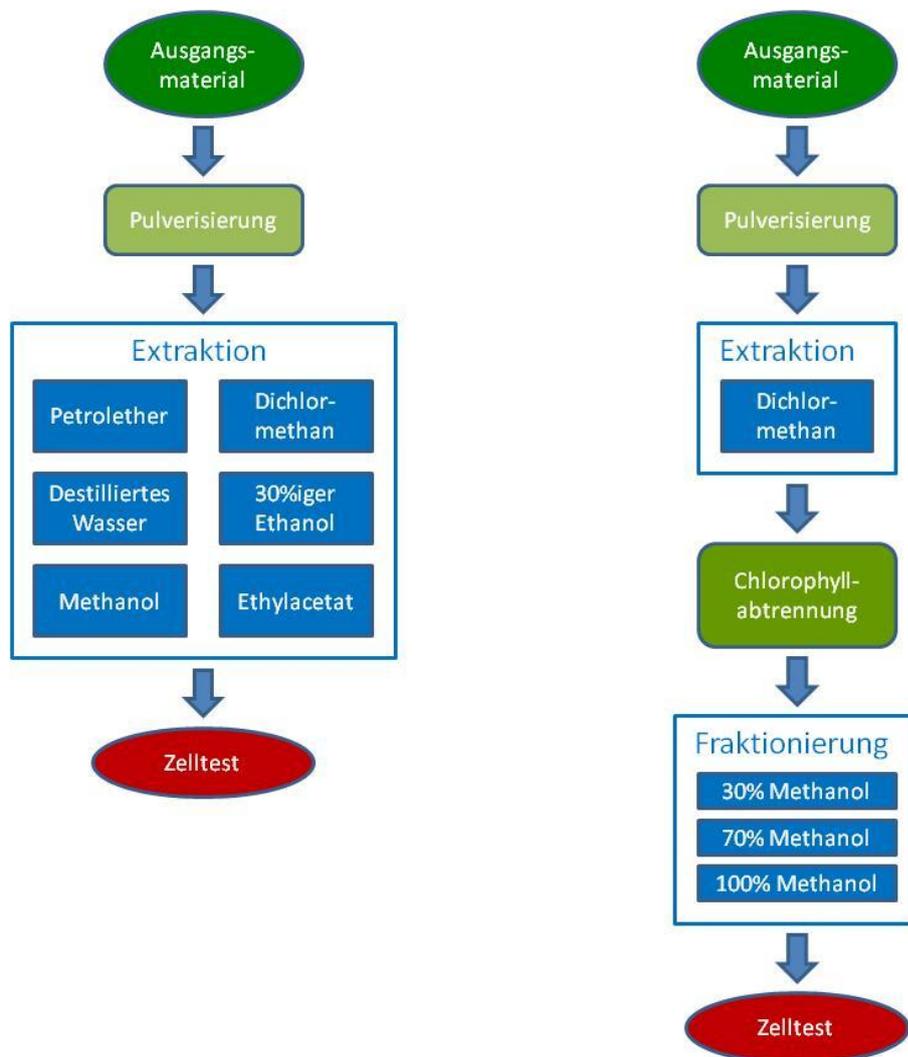


Abbildung 17: Überblick der einzelnen Arbeitsschritte

5.1 Drogenvorbereitung

Das gesammelte Pflanzenmaterial wurde nach der Aufsammlung getrocknet und stand somit für die Weiterverarbeitung zur Verfügung. Mit einer elektronischen Drogenmühle wurden die getrockneten Farnwedel auf eine Siebgröße von 0,75 mm zerkleinert. Das dabei entstandene Pulver wurde für die Extraktion verwendet.

5.2 Extraktion

In vorangegangenen Arbeiten wurden die Drogenpulver mit den entsprechenden LM am Ultraschallbad extrahiert. In dieser Arbeit erfolgte die Extraktion mittels ASE. Die Vorteile dieser Methode und die Parameter wurden bereits in Kapitel 4.1 beschrieben.

Zuerst wurden Extrakte aus den fünf verschiedenen Drogenpulvern, jeweils mit Petrolether, Methanol, Ethylacetat, Dichlormethan, destilliertem Wasser und 30%igem Ethanol hergestellt. Diese wurden unter vermindertem Druck am Rotavapor bei ca. 45°C eingedampft und die Trockenextrakte dem Zelltest zugeführt.

Aus 5 g Drogenpulver konnten, je nach LM, zwischen 50 und 1000 mg Trockenextrakt gewonnen werden. Wasser und 30%iger Ethanol verstopften die Extraktionszelle, daher musste das Drogenpulver mit Dionex-Sand im Verhältnis 1:1 gemischt werden. Auch das Eindampfen von Wasser bereitete Probleme. Selbst bei sehr niedrigem Druck gelang es nicht, das Wasser vollständig zu entfernen. Aus diesem Grund wurden zwei Teile Wasserextrakt mit einem Teil Isopropanol, das als Schlepper diente, versetzt und am Rotavapor eingedampft. So gelang die vollständige Trocknung der Extrakte.

Da wir auf die Ergebnisse der Zelltests warten mussten und aus früheren Arbeiten bekannt war, dass Dichlormethanextrakte die größte Aktivität aufweisen, wurden größere Mengen dieser Extrakte mittels ASE hergestellt:

<i>Dryopteris filix-mas</i> 2006:	Einwaage: 101,68 g Ausbeute: 4,07 g
<i>Dryopteris filix-mas</i> 2007:	Einwaage: 102,49 g Ausbeute: 3,38 g
<i>Dryopteris dilatata</i> :	Einwaage: 102,42 g Ausbeute: 2,85 g
<i>Athyrium filix-femina</i> :	Einwaage: 101,18 g Ausbeute: 2,55 g
<i>Matteuccia struthioeris</i> :	Einwaage: 101,30 g Ausbeute: 2,10 g

Bevor die Dichlormethanextrakte für die Zelltests zur Verfügung standen, musste eine Abtrennung des Chlorophylls erfolgen.

5.3 Chlorophyllabtrennung

Chlorophyll, welches im starken Überfluss vorhanden ist, musste vor der weiteren Bearbeitung abgetrennt werden, da es zur Störung von Chromatogrammen und Tests führen kann. Hierfür wurde die Methode der Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan und einem Methanol-Wasser-Gemisch (1:1) angewendet. Dieses Verfahren hat sich in verschiedenen Test in einer vorangegangenen Arbeit am effektivsten erwiesen und eine einmalige Abtrennung ist meist auch ausreichend [4]. Es wurden, in aliquot größeren Mengen, je 250 mg Trockenextrakt in 30 ml Dichlormethan gelöst und mit 30 ml des Methanol-Wasser-Gemisches versetzt. Das dabei entstandene Zweiphasengemisch wurde unter vermindertem Druck bei 650 mbar und einer Temperatur von ca. 45°C eingedampft. Bei diesem Druck dampfte nur

Dichlormethan vollständig ab, während das Methanol-Wasser-Gemisch zurückblieb. In der verbleibenden Methanol-Wasser-Phase fielen die unlöslichen Begleitstoffe (vor allem Chlorophyll) aus, welche durch Filtration abgetrennt werden konnten. Die vom Chlorophyll getrennten Extrakte waren nun nicht mehr grün, sondern zeigten Färbungen von gelb bis ocker. Anschließend wurden die chlorophyllarmen Extrakte zur Trockene gebracht.

5.4 DC-Überprüfung der Chlorophyllabtrennung

Im nächsten Schritt wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) überprüft, ob die Chlorophyllabtrennung erfolgreich war. Von jedem Auszug wurden etwa 1 mg des Originalextraktes (OE), des Filtrerrückstandes (FR) und des gereinigten Extraktes (GE) in 1 ml Dichlormethan gelöst. Die Auftragemenge vom OE und FR betrug 10 µl, vom GE 15 µl. Diese Menge wurde strichförmig auf die DC-Platten aufgetragen. Bei den Vergleichs-DC aller GE wurden 20 µl aufgetragen. Als Fließmittel verwendeten wir eine Mischung aus Toluol–Ethylformiat–konzentrierter Ameisensäure im Verhältnis 5 + 4 + 1.

Die DC-Platten wurden bei Tageslicht und unter UV-Licht dedektiert, fotografiert, danach mit Naturstoffreagens A und PEG 400 besprüht und nochmals fotografiert. Es konnte festgestellt werden, dass bei *Athyrium filix-femina* die Abtrennung des Chlorophylls nicht ausreichend war, weshalb der Vorgang ein zweites Mal wiederholt und mittels DC überprüft wurde.

Die folgenden Abbildungen dokumentieren die Ergebnisse der Chlorophyllabtrennung, wobei die roten Zonen vom Chlorophyll stammen.

OE = Originalextrakt

FR = Filtrerrückstand

GE = Gereinigter Extrakt

Abbildung 18: DC-Überprüfung von *Dryopteris filix-mas* 2006



Abb.: 18 a Tageslicht



Abb.: 18 b UV 366nm



Abb.: 18 c NSR/PEG
UV 366nm

Abbildung 19: DC-Überprüfung von *Dryopteris filix-mas* 2007



Abb.: 19 a Tageslicht

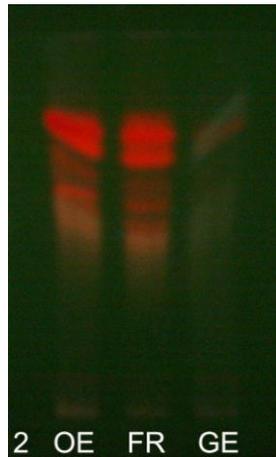


Abb.: 19 b UV 366nm



Abb.: 19 c NSR/PEG
UV 366nm

Abbildung 20: DC-Überprüfung von *Dryopteris dilatata*



Abb.: 20 a Tageslicht



Abb.: 20 b UV 366nm



Abb.: 20 c NSR/PEG
UV 366nm

Abbildung 21: DC-Überprüfung von *Athyrium filix-femina*

Abb.: 21 a Tageslicht



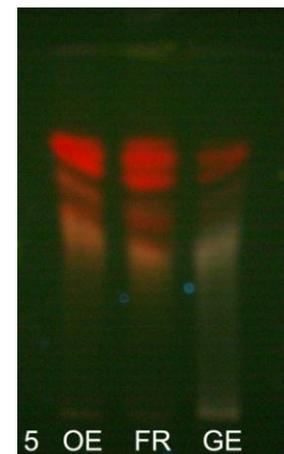
Abb.: 21 b UV 366nm

Abb.: 21 c NSR/PEG
UV 366nmAbbildung 22: DC-Überprüfung von *Matteuccia struthiopteris*

Abb.: 22 a Tageslicht



Abb.: 22 b UV 366nm

Abb.: 22 c NSR/PEG
UV 366nm

Die Abbildungen 18 bis 22 können allgemein beschrieben werden: Bei der Betrachtung der DC-Platten bei Tageslicht kann man kaum Zonen erkennen. Unter UV 254 nm war nichts zu sehen, erst unter UV 366 nm sind die stark roten Zonen des Chlorophylls sichtbar, vor allem im Originalextrakt und im Filtrerrückstand. Es wurde auch deutlich, dass durch das Chlorophyll andere Bereiche überdeckt werden und damit kaum andere Zonen erkennbar sind. Die gereinigten Extrakte hingegen zeigten eine deutliche Abreicherung des Chlorophylls und es sind dadurch auch andere Zonen erkennbar.

Abbildung 23: DC-Überprüfung aller fünf gereinigten Drogenextrakte im Vergleich

1 = *Dryopteris filix-mas* 2006

2 = *Dryopteris filix-mas* 2007

3 = *Dryopteris dilatata*

4 = *Athyrium filix-femina*

5 = *Matteuccia struthiopteris*



Abb.: 23 a Tageslicht

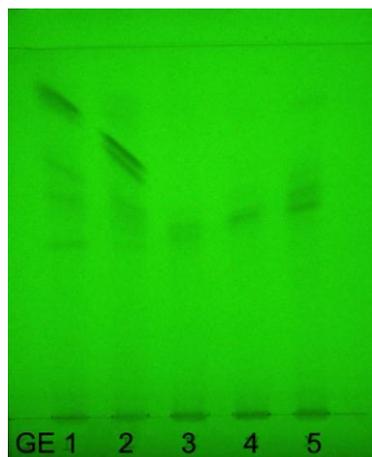


Abb.: 23 b UV 254nm

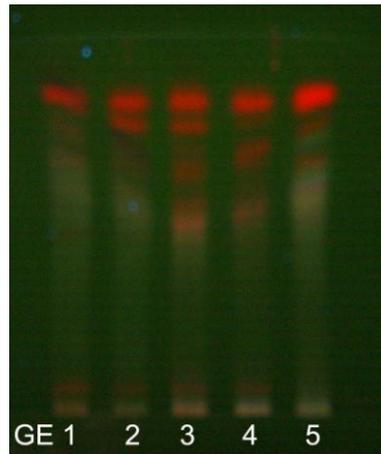
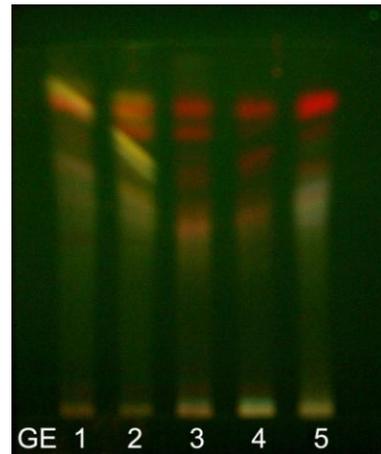


Abb.: 23 c UV 366nm

Abb.: 23 d NSR/PEG
UV 366nm

Beim Vergleich aller gereinigten Extrakte wurde die Auftragemenge auf 20 µl erhöht. Wie bei den einzelnen DC-Überprüfungen ist auch diesmal bei Tageslicht kaum etwas erkennbar, bei UV 254 nm sind nun deutlich Löschungen sichtbar. Bei der Betrachtung von Abbildung 23 c, unter UV 366 nm, sind im obersten Bereich noch immer rote Zonen des Chlorophylls sichtbar, doch lassen sich auch bereits andere Zonen erkennen. Die Nachbehandlung mit NSR führte zur Fluoreszenz einiger Banden, die durch Nachbesprühen mit PEG-Lösung verstärkt wurden. Nach der Behandlung mit den Sprühreagentien kann man nun erkennen, dass *Dryopteris filix-mas* 2006 und *Dryopteris filix-mas* 2007 große Ähnlichkeiten aufweisen. Abbildung 23 d zeigt bei beiden eine stark gelb fluoreszierende Zone im oberen und leicht gelb fluoreszierende Zonen im mittleren Bereich.

Eine Ähnlichkeit liegt auch bei den drei anderen Farnarten vor, die sich jedoch von den ersten beiden deutlich unterscheiden. *Dryopteris dilatata*, *Athyrium filix-femina* und *Matteuccia struthiopteris* zeigen mehrere rote Zonen, welche bei *Matteuccia struthiopteris* noch zusätzlich von blauen Zonen umgeben sind.

5.5 Festphasenextraktion

Mit der Festphasenextraktion erfolgte nun eine weitere Auftrennung der gereinigten Extrakte in drei weitere Fraktionen.

Zu Beginn wurden die Kartuschen konditioniert. Die Spülung erfolgte mit einem dreifachen Reservoirvolumen Methanol und anschließend mit einem Reservoirvolumen destilliertem Wasser. Danach mussten die Kartuschen mit Luft getrocknet werden.

Etwa 50 mg der gereinigten Extrakte wurden in je 2 ml Dichlormethan am Ultraschallbad gelöst und jeweils auf eine separate Kartusche aufgetragen. Das Dichlormethan wurde abgesaugt und die Kartuschen wieder mit Luft getrocknet. Die Elution erfolgte zunächst mit 30%, danach mit 70% und 100%igem Methanol, jeweils mit fünf Reservoirvolumen. Die fraktionierten Extrakte zeigten rosa bis gelbliche Färbungen, deren Farbintensitäten mit der zunehmenden Methanolkonzentration gestiegen sind.

Abbildung 24: 30%, 70% und 100% Methanolfractionen

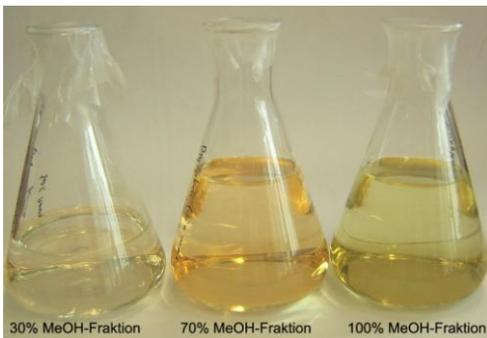
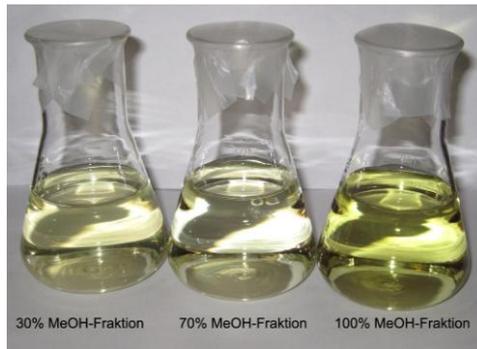


Abb.: 24 a *Dryopteris filix-mas* 2006



Abb.: 24 b *Dryopteris filix-mas* 2007

Abb.: 24 c *Dryopteris dilatata*Abb.: 24 d *Athyrium filix-femina*Abb.: 24 e *Matteuccia struthiopteris*

Von allen fünf gereinigten Drogenextrakten wurden die einzelnen Fraktionen gesammelt und unter vermindertem Druck am Rotavapor zur Trockene gebracht. Jeweils etwa 1 mg der gereinigten, fraktionierten Trockenextrakte wurde den Zelltests zugeführt.

5.6 DC-Überprüfung der SPE-Fractionen

Die nach der Festphasenextraktion erhaltenen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch überprüft und miteinander verglichen.

Die Parameter wurden bereits in Kapitel 4.1 angeführt.

Wie bei den ersten DC-Überprüfungen sollte jeweils 1 mg verwendet, aber diesmal in Methanol gelöst werden. Leider zeigten die ersten Versuche, dass die Konzentrationen zu gering waren und die DC-Platten nicht detektiert werden konnten. Aus diesem Grund wurden jeweils die gesamten Fraktionen in 1 ml Methanol gelöst und davon 15 µl strichförmig aufgetragen.

Zum Vergleich wurden von den fünf Farnen jeweils der gereinigte Extrakt neben der 30%, 70% und 100% Methanolfraction aufgetragen. Anschließend wurden auch die jeweils gleichen Fraktionen miteinander verglichen.

Die Detektion erfolgte bei Tageslicht, UV 254 nm und UV 366 nm. Aus jeder Fraktion wurden zwei DC-Platten hergestellt die zum Einen mit Naturstoffreagens und PEG-Lösung, zum Anderen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens besprüht und detektiert wurden.

GE = Gereinigter Extrakt

NSR = Naturstoffreagens A

30% = 30%ige Methanolfraction

PEG = Polyethylenglycol

70% = 70%ige Methanolfraction

ASR = Anisaldehyd-

100% = 100%ige Methanolfraction

Schwefelsäure-

Reagens

1 = *Dryopteris filix-mas* 2006

2 = *Dryopteris filix-mas* 2007

3 = *Dryopteris dilatata*

4 = *Athyrium filix-femina*

5 = *Matteuccia struthiopteris*

Abbildung 25: DC-Vergleich von *Dryopteris filix-mas* 2006

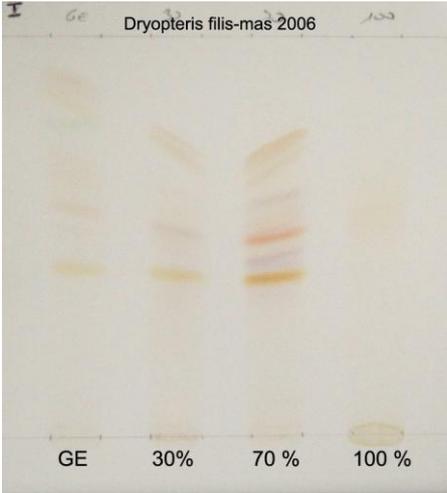


Abb.: 25 a Tageslicht

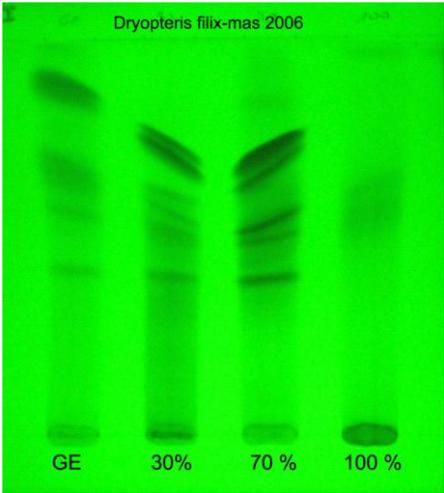


Abb.: 25 b UV 254nm

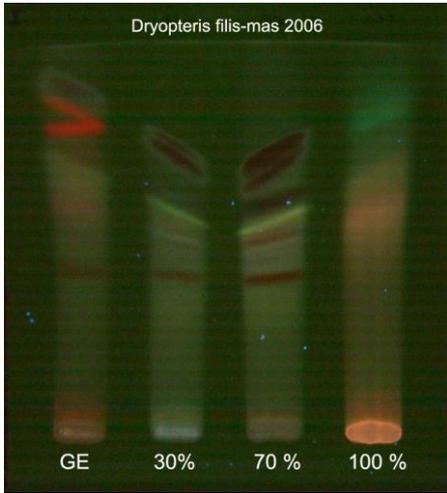


Abb.: 25 c UV 366nm

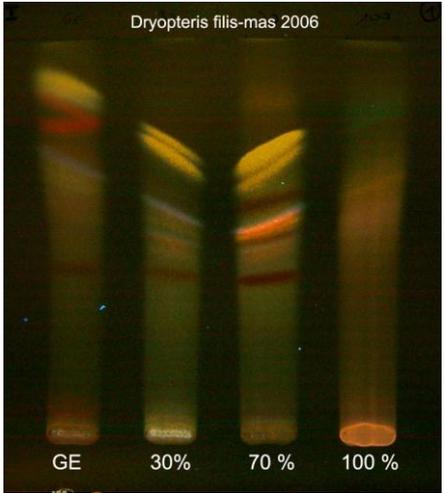


Abb.: 25 d NSR/PEG UV 366nm

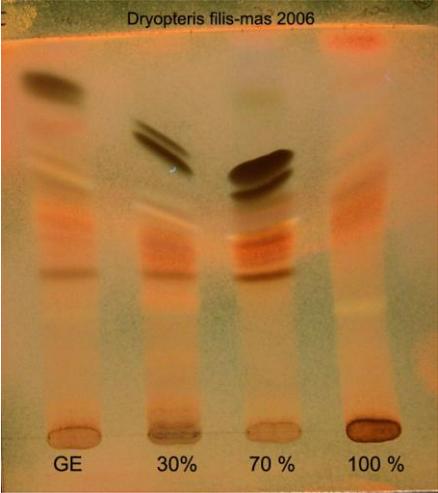


Abb.: 25 e ASR UV 366nm

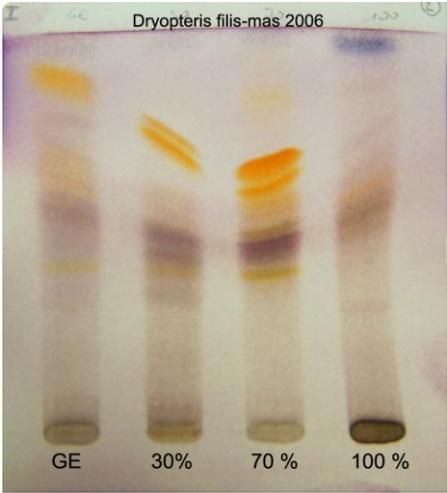


Abb.: 25 f ASR Tageslicht

Abbildung 26: DC-Vergleich von *Dryopteris filix-mas* 2007

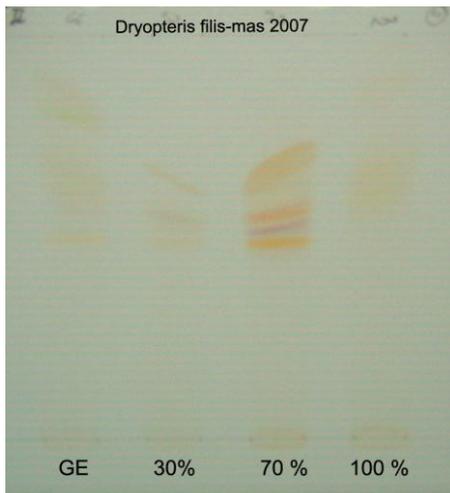


Abb.: 26 a Tageslicht

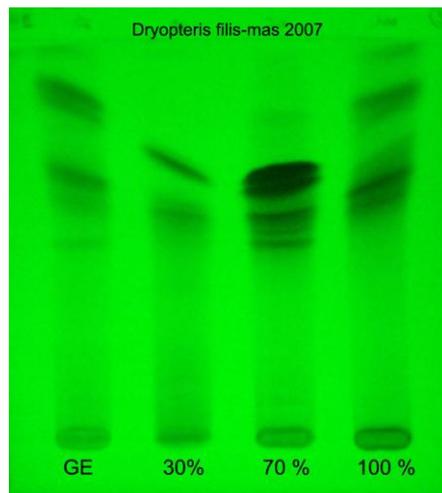


Abb.: 26 b UV 254nm

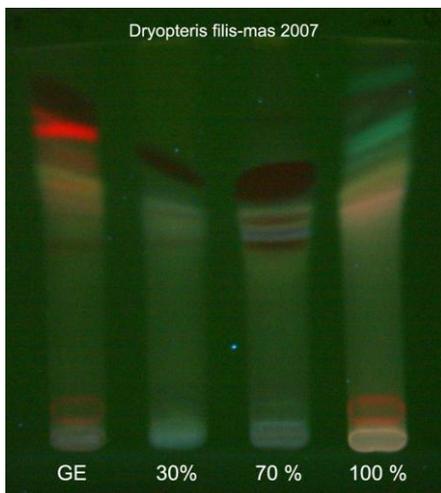


Abb.: 26 c UV 366nm

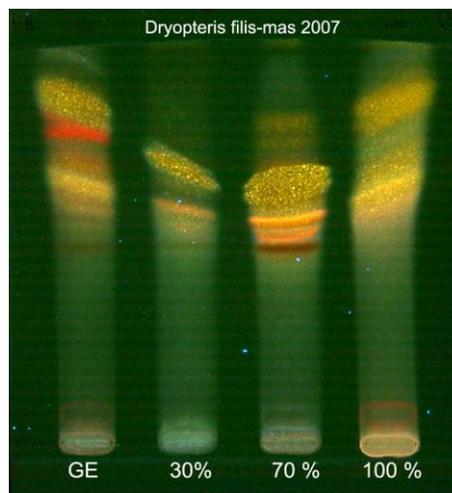


Abb.: 26 d NSR/PEG UV 366nm

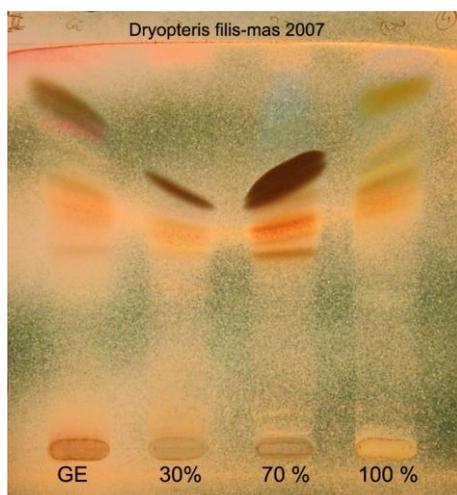


Abb.: 26 e ASR UV 366nm

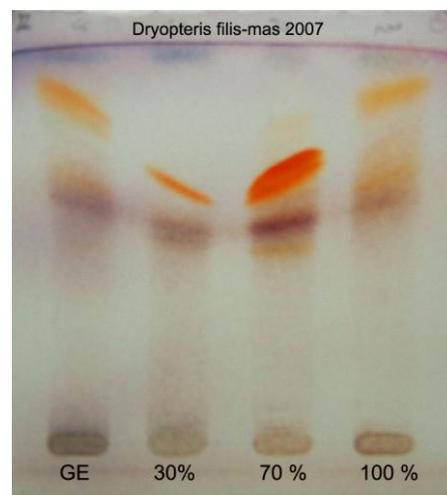


Abb.: 26 f ASR Tageslicht

Abbildung 27: DC-Vergleich von *Dryopteris dilatata*

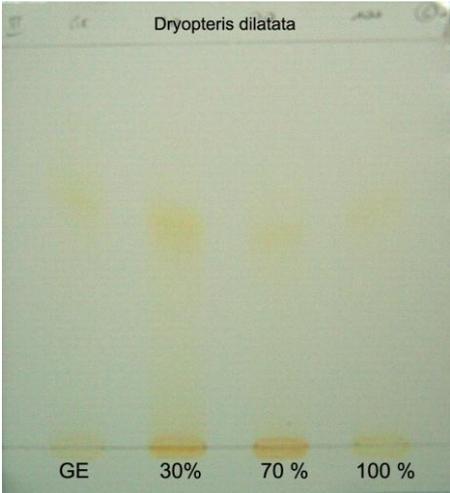


Abb.: 27 a Tageslicht

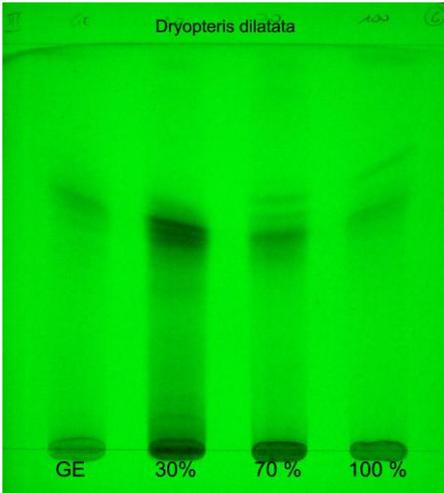


Abb.: 27 b UV 254nm

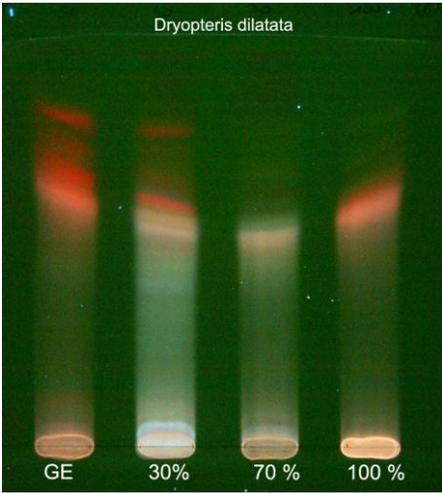


Abb.: 27 c UV 366nm

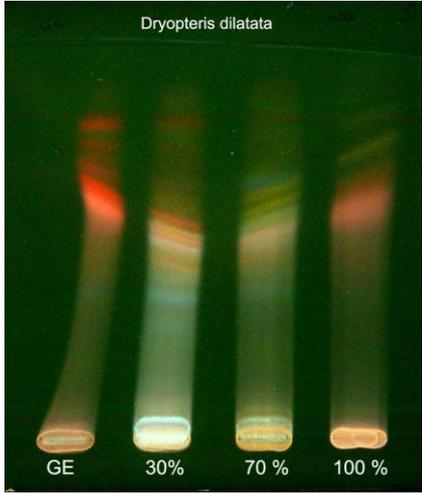


Abb.: 27 d NSR/PEG UV 366nm

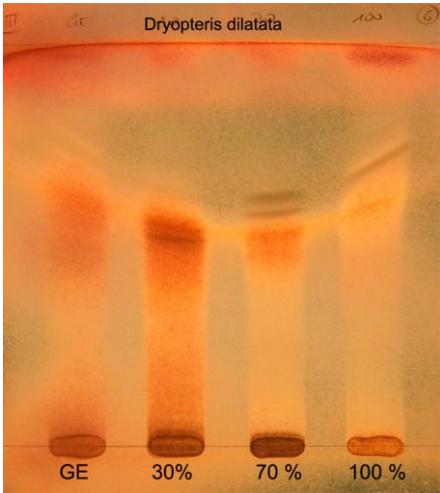


Abb.: 27 e ASR UV 366nm

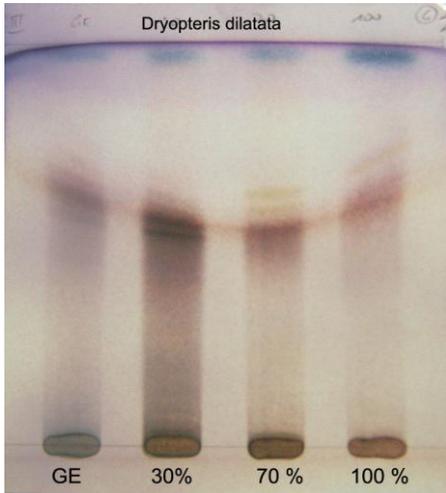


Abb.: 27 f ASR Tageslicht

Abbildung 28: DC-Vergleich von *Athyrium filix-femina*

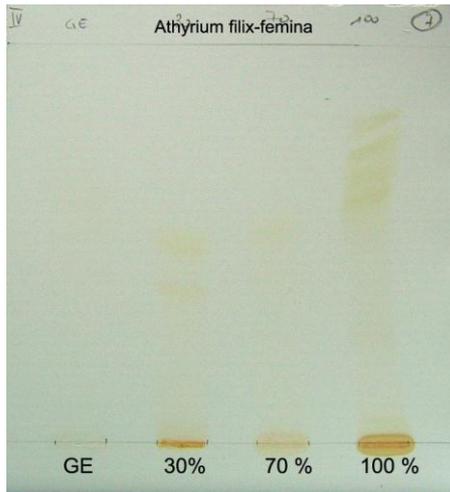


Abb.: 28 a Tageslicht



Abb.: 28 b UV 254nm

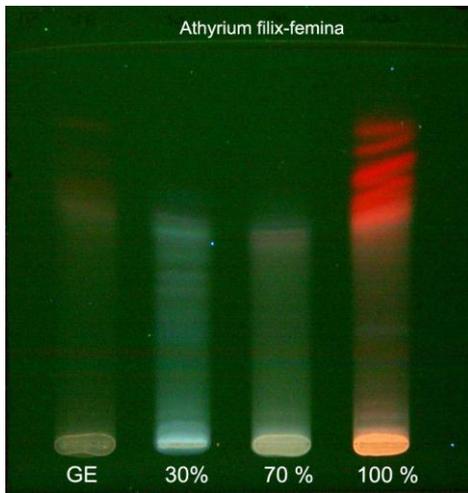


Abb.: 28 c UV 366nm

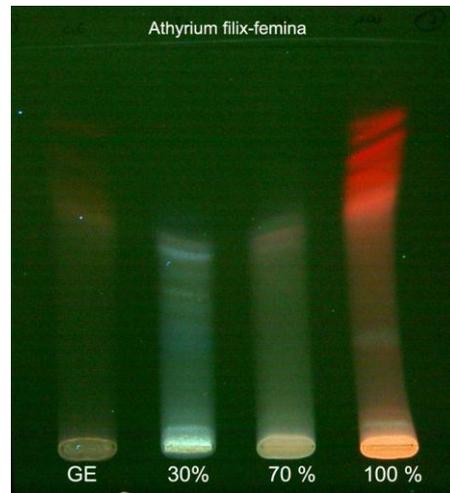


Abb.: 28 d NSR/PEG UV 366nm

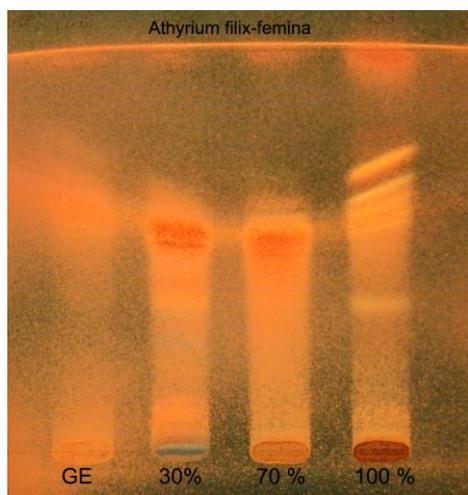


Abb.: 28 e ASR UV 366nm

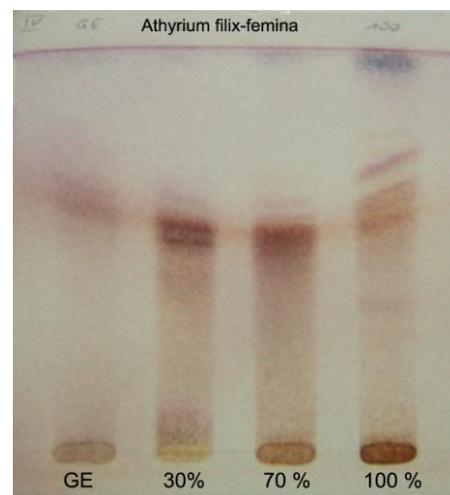


Abb.: 28 f ASR Tageslicht

Abbildung 29: DC-Vergleich von *Matteuccia struthiopteris*

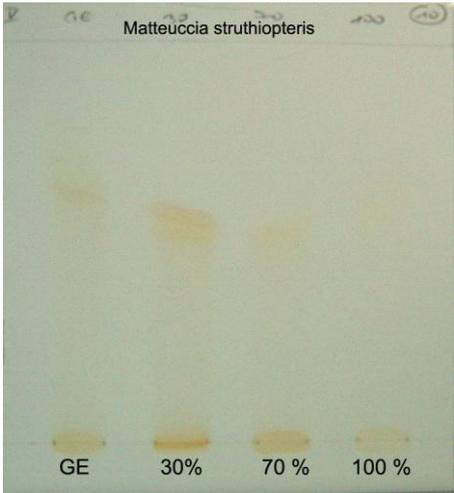


Abb.: 29 a Tageslicht

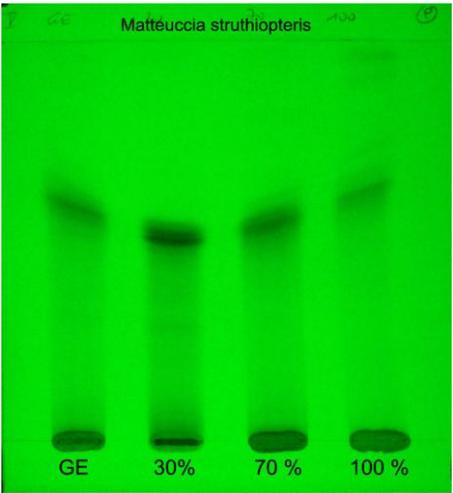


Abb.: 29 b UV 254nm

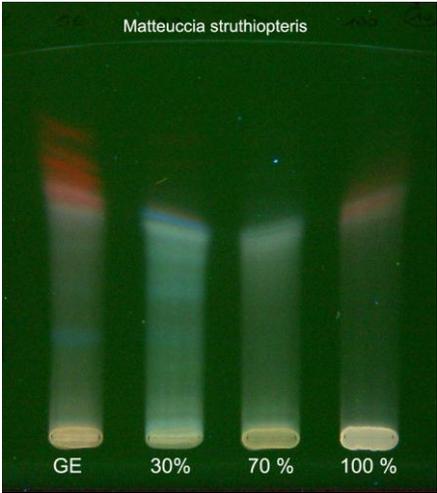


Abb.: 29 c UV 366nm

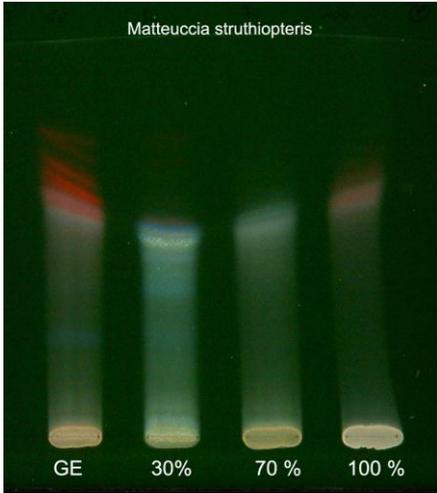


Abb.: 29 d NSR/PEG UV 366nm

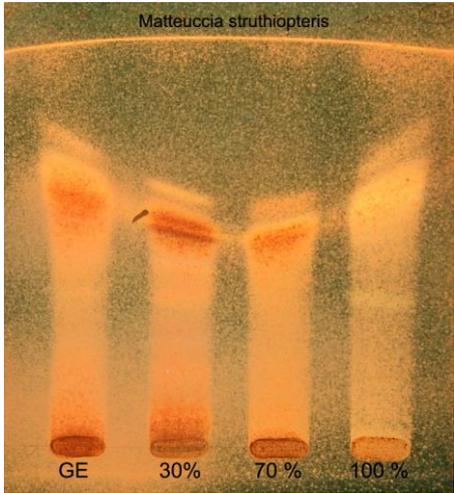


Abb.: 29 e ASR UV 366nm

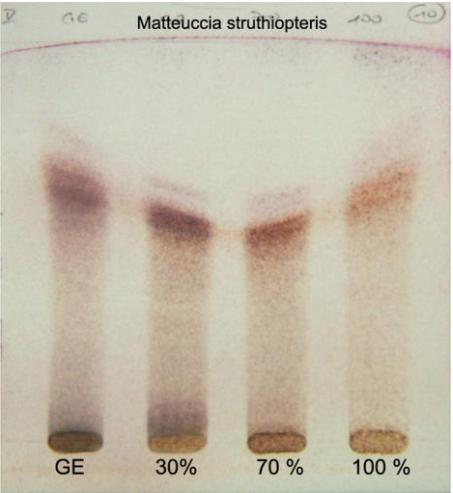


Abb.: 29 f ASR Tageslicht

Abbildung 30: DC-Vergleich der 30% Methanolfractionen

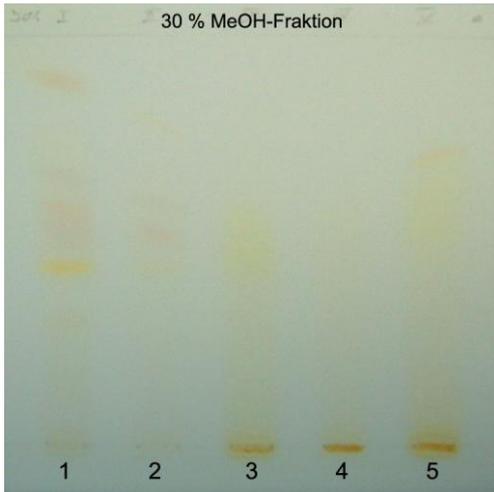


Abb.: 30 a Tageslicht

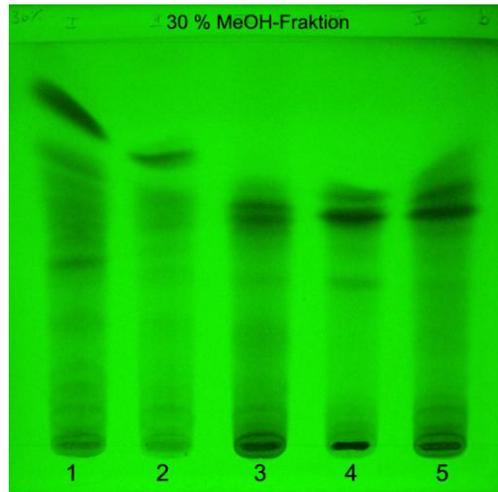


Abb.: 30 b UV 254nm

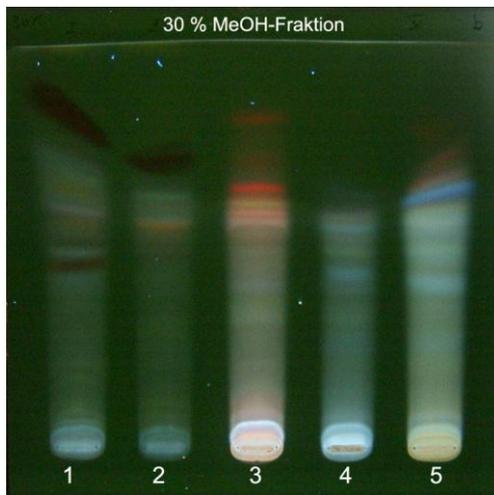


Abb.: 30 c UV 366nm

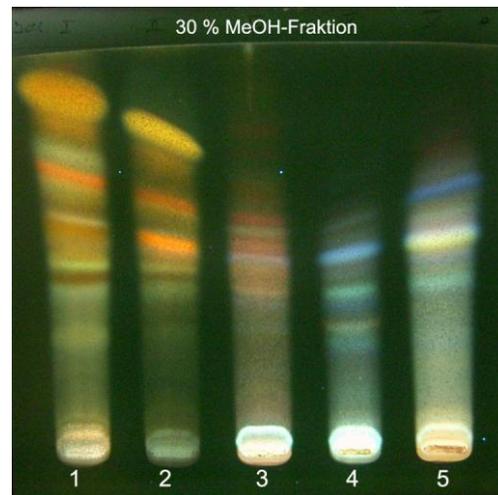


Abb.: 30 d NSR/PEG UV 366nm

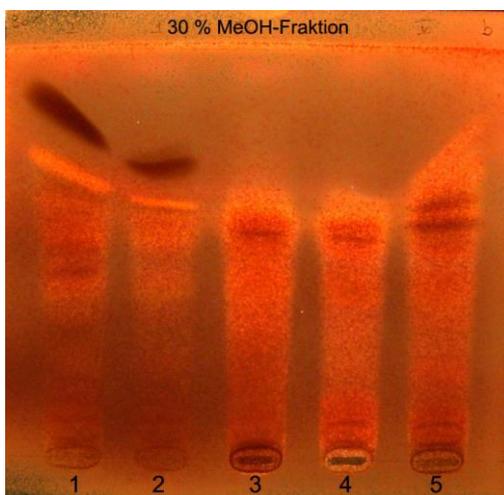


Abb.: 30 e ASR UV 366nm

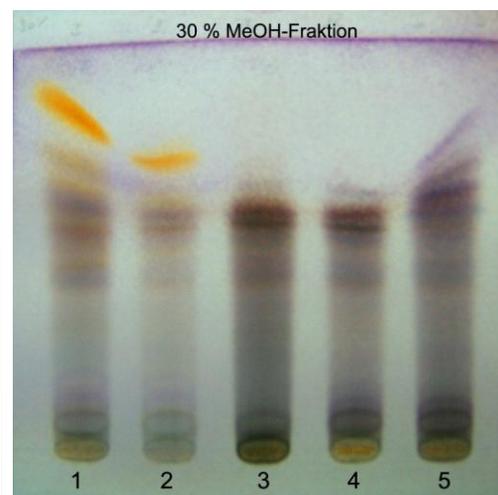


Abb.: 30 f ASR Tageslicht

Abbildung 31: DC-Vergleich der 70% Methanolfractionen

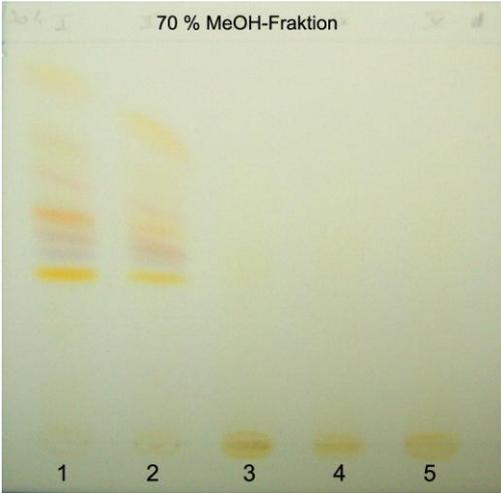


Abb.: 31 a Tageslicht

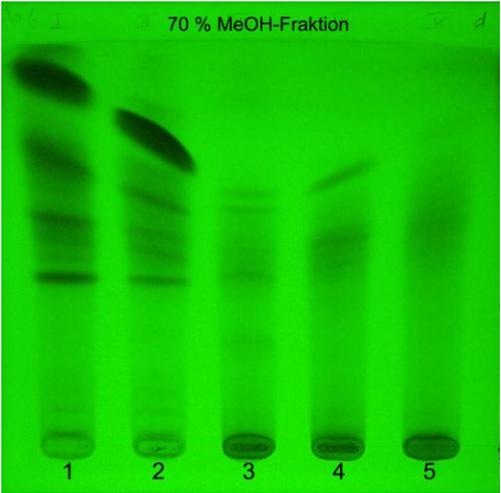


Abb.: 31 b UV 254nm

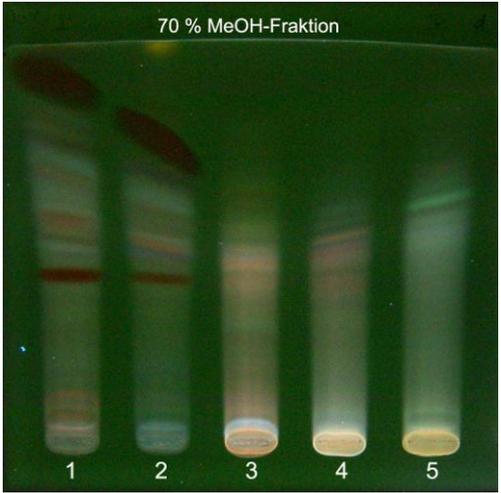


Abb.: 31 c UV 366nm

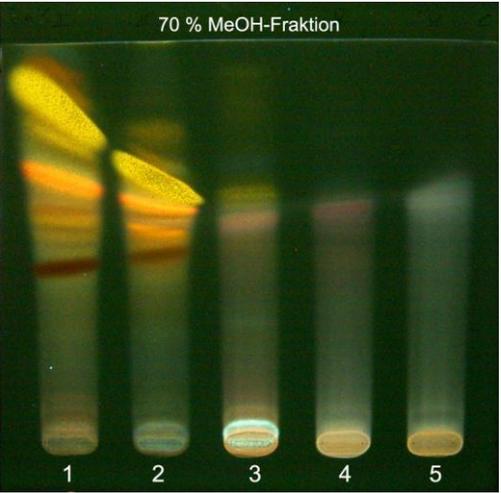


Abb.: 31 d NSR/PEG UV366nm

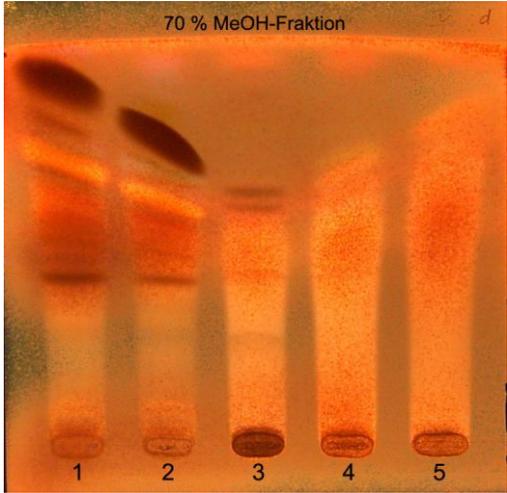


Abb.: 31 e ASR UV 366nm

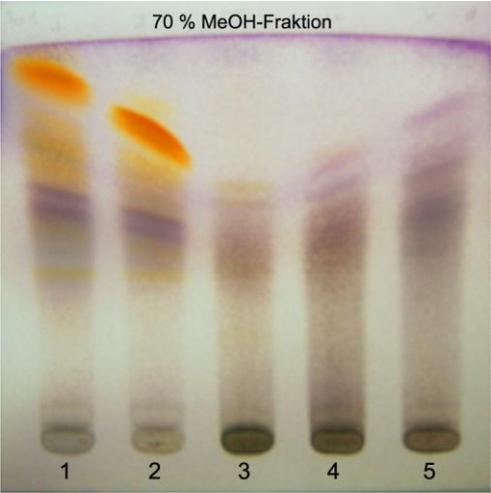


Abb.: 31 f ASR Tageslicht

Abbildung 32: DC-Vergleich der 100% Methanolfractionen

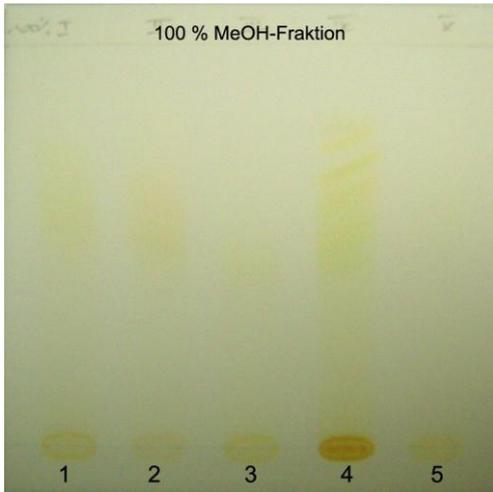


Abb.: 32 a Tageslicht

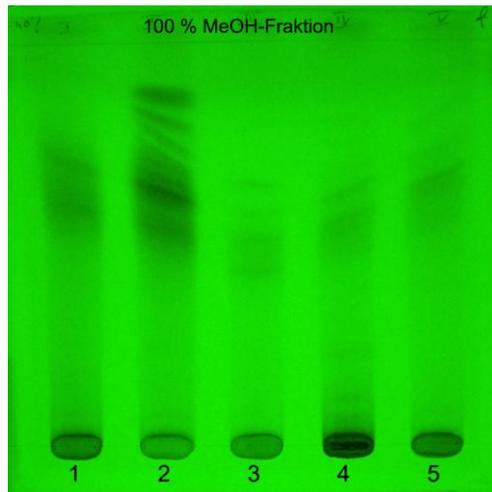


Abb.: 32 b UV 254nm

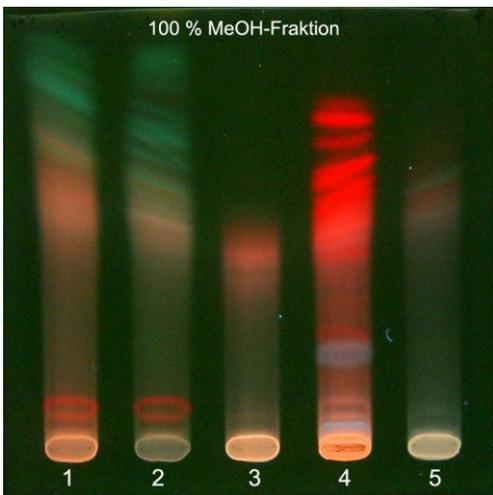


Abb.: 32 c UV 366nm

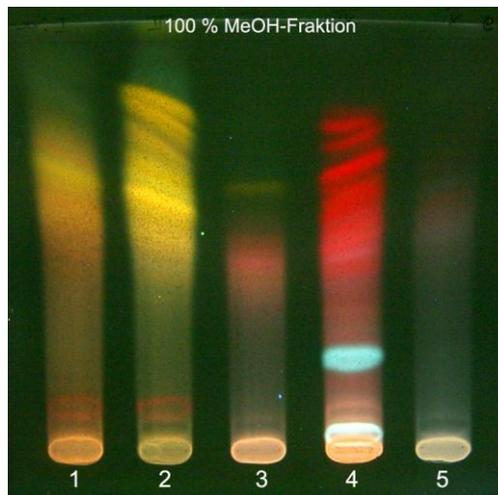


Abb.: 32 d NSR/PEG UV 366nm

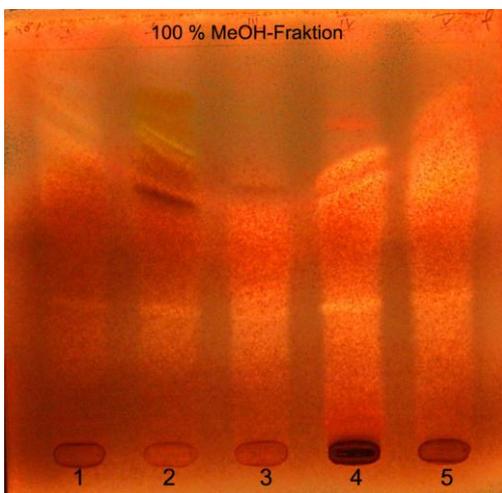


Abb.: 32 e ASR UV 366nm

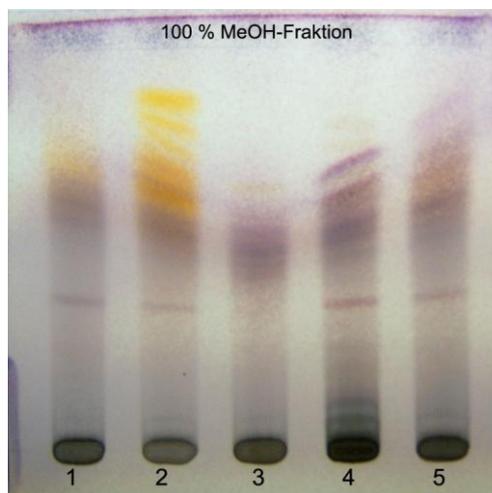


Abb.: 32 f ASR Tageslicht

30% Methanol-Fraktion

Abbildung 30 vergleicht die 30% MeOH-Fraktionen der verschiedenen Farne. *Dryopteris filix-mas* 2006 und 2007 lassen sich gut miteinander vergleichen. Beide zeigen nach dem Besprühen mit NSR und PEG gelbe, orange und grüne Zonen in annähernd gleicher Höhe. Auch bei *Athyrium filix-femina* und *Matteuccia struthiopteris* lassen sich Ähnlichkeiten erkennen. Lediglich *Dryopteris dilatata* erscheint mit seinen roten und rosa Zonen anders. Beide *Dryopteris filix-mas*-Proben weisen ihre Zonen bei mittleren und hohen Rf-Werten auf, während die anderen drei Arten ihre Zonen nur im mittleren Bereich zeigen. Abbildung 30 f zeigt die DC-Platte nach dem Besprühen mit ASR. Auffällig sind hier die beiden orangefarbenen Zonen bei *Dryopteris filix-mas* 2006 und 2007. Der mittlere Bereich gleicht sich bei allen fünf Arten, lediglich die Intensität ist verschieden. *Matteuccia struthiopteris* zeigt zusätzlich noch zwei lila Zonen im oberen Bereich.

70% Methanol-Fraktion

Abbildung 31 vergleicht die 70% MeOH-Fraktionen. *Dryopteris filix-mas* 2006 und 2007 gleichen auch hier einander sehr stark. Auffallend sind die stark gelb und orange fluoreszierenden Zonen nach dem Besprühen mit NSR und PEG. In beiden Fällen kann man auch auf gleicher Höhe eine schmale rotbraune Zone erkennen. Die drei anderen Farne weisen kaum Zonen auf und sind einander ähnlich. Gleiches kann auch über Abbildung 31 f gesagt werden.

100% Methanol-Fraktion

Abbildung 32 vergleicht die 100% MeOH-Fraktionen. Abbildung 32 d zeigt, dass *Dryopteris filix-mas* 2006 und 2007 wieder einander sehr ähnlich sind. Sie unterscheiden sich maximal in der Intensität der verschwimmenden gelben Zonen. Auffallend ist hier *Athyrium filix-femina* mit seinen vielen roten Zonen und der blau fluoreszierenden

Zone im unteren Bereich. *Dryopteris dilatata* zeigt neben einer schwachen roten Zone auch eine darüberliegende schwache gelbe Zone. *Matteuccia struthiopteris* weist kaum sichtbare Zonen auf. In Abbildung 32 f wurde die DC-Platte mit ASR besprüht. Alle fünf Farne zeigen hier im mittleren Bereich eine schmale Zone auf. Zusätzlich sind bei *Dryopteris filix-mas* 2007 gelbe Zonen im oberen Bereich erkennbar.

5.7 Zelltest

In der folgenden Abbildung soll nochmals veranschaulicht werden, welche Extrakte hergestellt und für den Zelltest vorbereitet wurden.

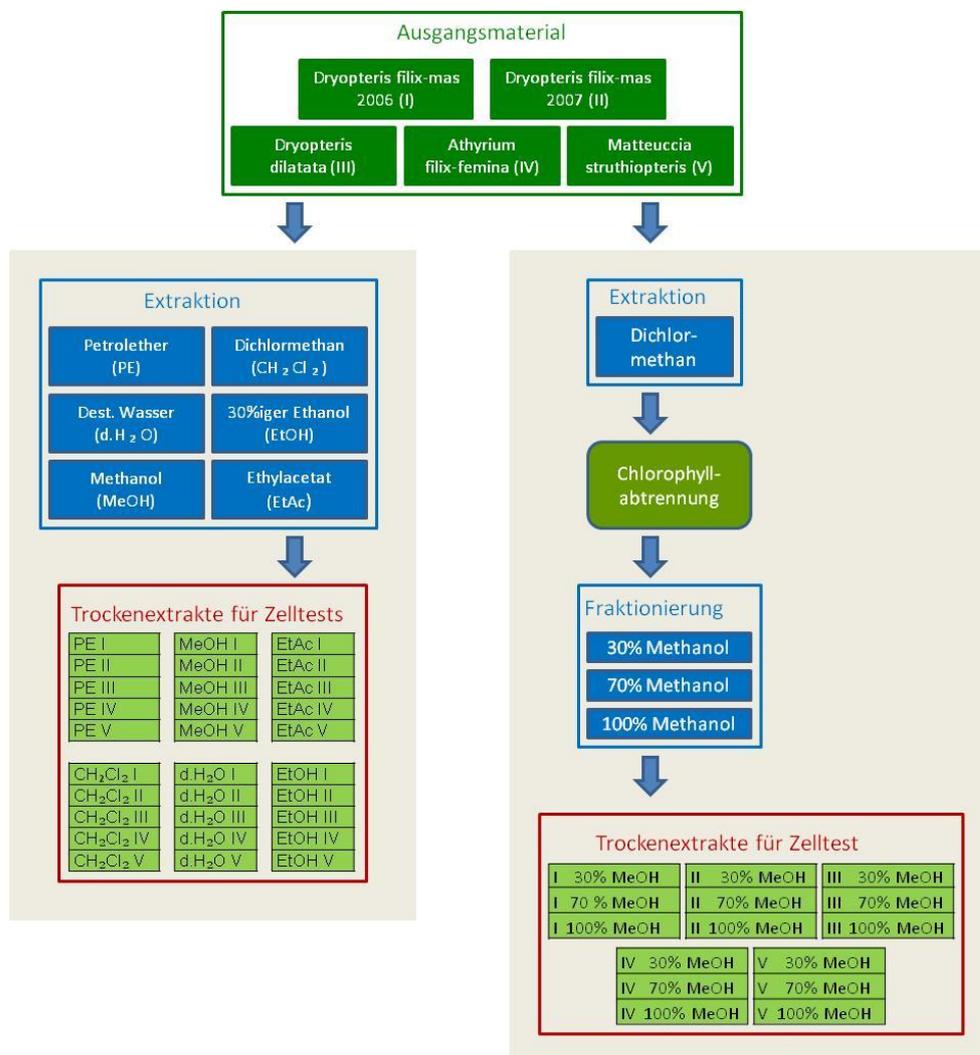


Abbildung 33: Übersicht der Extrakte für den Zelltest

Aus den fünf pulverisierten Farnen wurden Extrakte unterschiedlicher Polarität hergestellt. Auf der linken Seite der Abbildung sind die 30 Originalextrakte unterschiedlicher Polarität gezeigt, auf der rechten Seite die 15 gereinigten, fraktionierten Dichlormethanextrakte, welche zur Testung an den Zellen hergestellt wurden.

5.7.1 PPAR-Test

Die HEK-293T-Zellen wurden wie in Kapitel 4.4.5 beschrieben kultiviert. Als die Konfluenz zwischen 60% und 70% betrug wurden die Zellen mit PPRE-tk3x-Luc, und pEGFP-C1 transfiziert und erneut inkubiert. Sechs Stunden später erfolgte die Übertragung der Zellen auf Mikrotiterplatten (96-well-plate) wobei auch das Medium gewechselt wurde (DMEM mit 5% FBS). Eine Stunde danach wurden die Farnextrakte aufgetragen und es folgte eine erneute Inkubation für 18 Stunden im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, lysiert und vermessen.

5.7.2 NF κ B-Test

Die HEK-293-Zellen wurden wie in Kapitel 4.4.5 beschrieben kultiviert. Als die Konfluenz zwischen 60% und 70% betrug wurden die Zellen mit pNF κ B-Luc, und pEGFP-C1 transfiziert und erneut inkubiert. Sechs Stunden später erfolgte die Übertragung der Zellen auf Mikrotiterplatten (96-well-plate), die über Nacht im Brutschrank inkubiert wurden. Am nächsten Tag erfolgte ein Wechsel des Mediums (serumfreies DMEM) und die Zugabe der Farnextrakte. Eine Stunde danach wurden die Zellen mit einem Tumornekrosefaktor (TNF; „human recombinant TNF- α “) über sechs Stunden stimuliert, anschließend gewaschen, lysiert und vermessen.

5.7.3 Auswertung der Messungen

Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Genexpression und in weiterer Folge zur Luciferaseaktivität, welche die Umwandlung von Luciferin, ATP und Sauerstoff zu Kohlendioxid, AMP und Licht ermöglicht. pEGFP-C1 ist ein grün fluoreszierendes Markergen, es dient der besseren Detektion und als interne Kontrolle.

Die Lumineszenz des Glühwürmchens und die Fluoreszenz von EGFP (enhanced green fluorescent protein) wurden mittels „GeniosPro plate reader“ (Tecan, Austria) quantifiziert. Das Luciferase-Signal vom PPRE-tk3x-Luc-Reporter bzw. pNFκB-Luc-Reporter wurde gegen die Fluoreszenz vom pEGFP-C1 normalisiert um die Unterschiede in der Zellzahl und/oder in der Effizienz der Transfektion berechnen zu können.

- Von einer PPAR-Aktivierung kann gesprochen werden, wenn das Signal mehr als 50% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe gestiegen ist.
- Von einer NFκB-Hemmung kann gesprochen werden, wenn das Signal mehr als 50% gehemmt wurde.

5.7.4 Zelltest mit Extrakten unterschiedlicher Polarität

Tabelle 1 verschafft einen Überblick der ersten Ergebnisse. Es wurden je 10 µg/ml aller Originalextrakte mit unterschiedlicher Polarität auf Rezeptoraktivierung von PPARα und PPARγ, sowie auf Rezeptorinhibierung von NFκB getestet. Die bezeichnenden Abkürzungen der Extrakte sind aus Abbildung 33 ersichtlich.

Es ist erkennbar, dass es zu keiner Aktivierung von PPARα durch die Extrakte gekommen ist. PPARγ wurde durch den Ethylacetat- und den Dichlormethanextrakt, jeweils aus *Dryopteris filix-mas* 2006 aktiviert. Zur Rezeptorinhibierung von NFκB kam es mit Petrolether-, Ethylacetat-

und Dichlormethanextrakten, jeweils aus *Dryopteris filix-mas* 2006 und 2007.

Extracted with:	Activation of PPAR α :	Activation of PPAR γ :	Inhibition of NF κ B :
PE I	no	no	yes
PE II	no	no	yes
PE III	no	no	no
PE IV	no	no	no
PE V	no	no	no
MeOH I	no	no	no
MeOH II	no	no	no
MeOH III	no	no	no
MeOH IV	no	no	no
MeOH V	no	no	no
EtAc I	no	yes	yes
EtAc II	no	no	yes
EtAc III	no	no	no
EtAc IV	no	no	no
EtAc V	no	no	no
CH ₂ Cl ₂ I	no	yes	yes
CH ₂ Cl ₂ II	no	no	yes
CH ₂ Cl ₂ III	no	no	no
CH ₂ Cl ₂ IV	no	no	no
CH ₂ Cl ₂ V	no	no	no
d.H ₂ O I	no	no	no
d.H ₂ O II	no	no	no
d.H ₂ O III	no	no	no
d.H ₂ O IV	no	no	no
d.H ₂ O V	no	no	no
EtOH I	no	no	no
EtOH II	no	no	no
EtOH III	no	no	no
EtOH IV	no	no	no
EtOH V	no	no	no

Tabelle 1: Überblick der Rezeptoraktivierung von PPAR α und PPAR γ , sowie der Rezeptorinhibierung von NF κ B durch die Originalextrakte.

In Abbildung 34 ist die genaue Auswertung der Rezeptorinhibierung von NF κ B dargestellt. Bei der Testung von 10 μ g/ml des jeweiligen Extraktes kann dann von einer Inhibierung gesprochen werden, wenn

das Signal mehr als 50% gehemmt wird. Dies wird hier veranschaulicht. Zum Vergleich wurde eine Kontrollgruppe, ohne Extraktzusätze und eine Gruppe mit einem spezifischen NFκB-Hemmer herangezogen. Diese sind in der Abbildung orange hinterlegt. Als spezifischer NFκB-Hemmer wurde „*Parthenolid*“, ein Sesquiterpenlacton, in einer Dosis von 5 μM verwendet. Die aktiven Fraktionen sind grün hinterlegt und zeigen eine signifikante Hemmung.

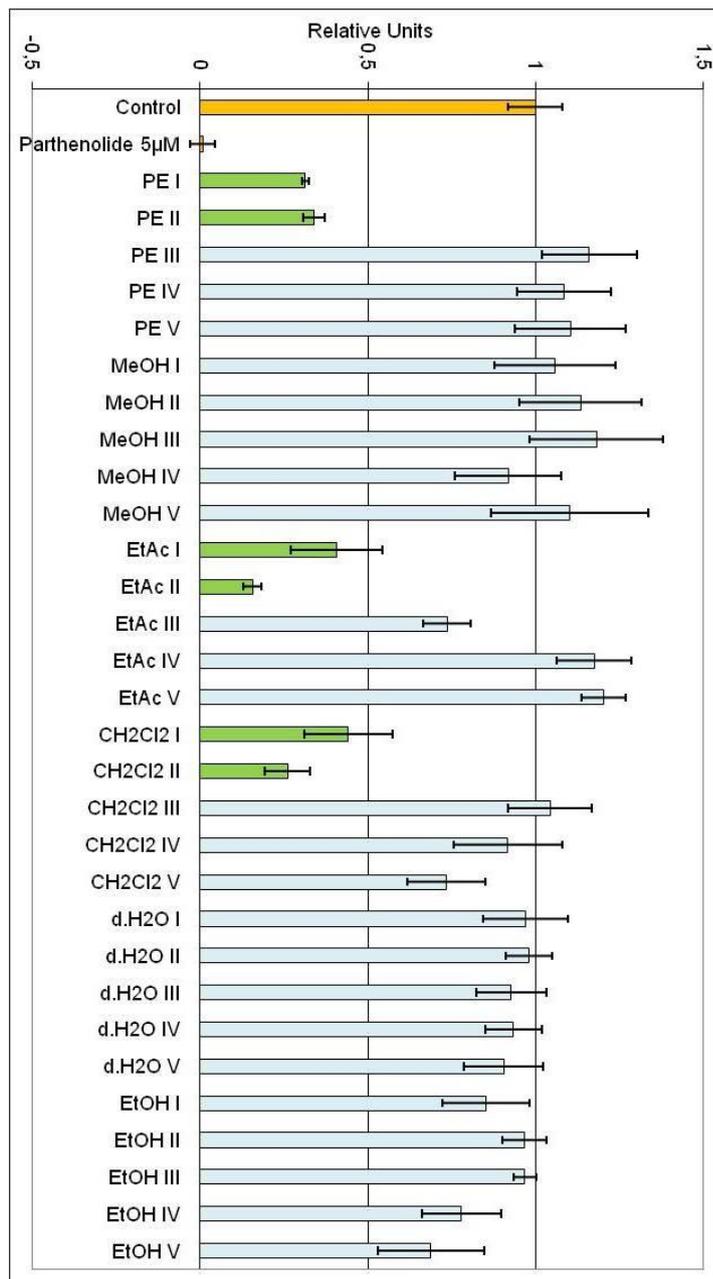


Abbildung 34: Rezeptorinhibition von NFκB

5.7.5 Zelltest mit Dichlormethanextrakten

Im nächsten Schritt sollten die gereinigten, fraktionierten Dichlormethanextrakte dem Zelltest zugeführt werden. Wie in Tabelle 2 ersichtlich, zeigte der erste Zelltest vor allem bei *Dryopteris filix-mas* 2006 (CH₂Cl₂ I) Aktivität. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde dieser Extrakte für die weiteren Tests ausgewählt.

Extracted with:	Activation of PPAR α :	Activation of PPAR γ :	Inhibition of NF κ B :
CH ₂ Cl ₂ I	no	yes	yes
CH ₂ Cl ₂ II	no	no	yes
CH ₂ Cl ₂ III	no	no	no
CH ₂ Cl ₂ IV	no	no	no
CH ₂ Cl ₂ V	no	no	no

Tabelle 2: Überblick der Rezeptoraktivierung von PPAR α und PPAR γ , sowie der Rezeptorinhibierung von NF κ B durch die Dichlormethanextrakte.

Einen Überblick der Rezeptoraktivierung von PPAR α und PPAR γ , sowie der Rezeptorinhibierung von NF κ B durch die gereinigten, fraktionierten Dichlormethanextrakte aus *Dryopteris filix-mas* 2006 kann man in Tabelle 3 sehen. Es wurde wie in den ersten Untersuchungen eine Dosierung von 10 μ g/ml getestet. Bei der 30% MeOH-Fraktion konnten PPAR γ aktiviert und NF κ B inhibiert werden. Beim NF κ B-Test wurde neben 10 μ g/ml auch eine Dosis von 2 μ g/ml getestet. Diese Dosisänderung ist mit * in Tabelle 3 markiert und sie zeigte keine Inhibierung, wodurch die Unterschiede in der Aktivität erklärt werden können. Die 70% MeOH-Fraktion ist in allen drei Fällen aktiv. PPAR α und PPAR γ wurden aktiviert und bei NF κ B kam es zur Inhibierung. Die 100% MeOH-Fraktion zeigt nur bei NF κ B Aktivität auf.

Extracted with:	Activation of PPAR α :	Activation of PPAR γ :	Inhibition of NF κ B :
30% MeOH I	no	yes	yes/no *
70% MeOH I	yes	yes	yes
100% MeOH I	no	no	yes

Tabelle 3: Überblick der Rezeptoraktivierung von PPAR α und PPAR γ , sowie der Rezeptorinhibierung von NF κ B durch die gereinigten, fraktionierten Dichlormethanextrakte aus *Dryopteris filix-mas* 2006.

Eine genaue Auswertung der Tabelle 3 ist aus den Abbildungen 35 und 36 ersichtlich.

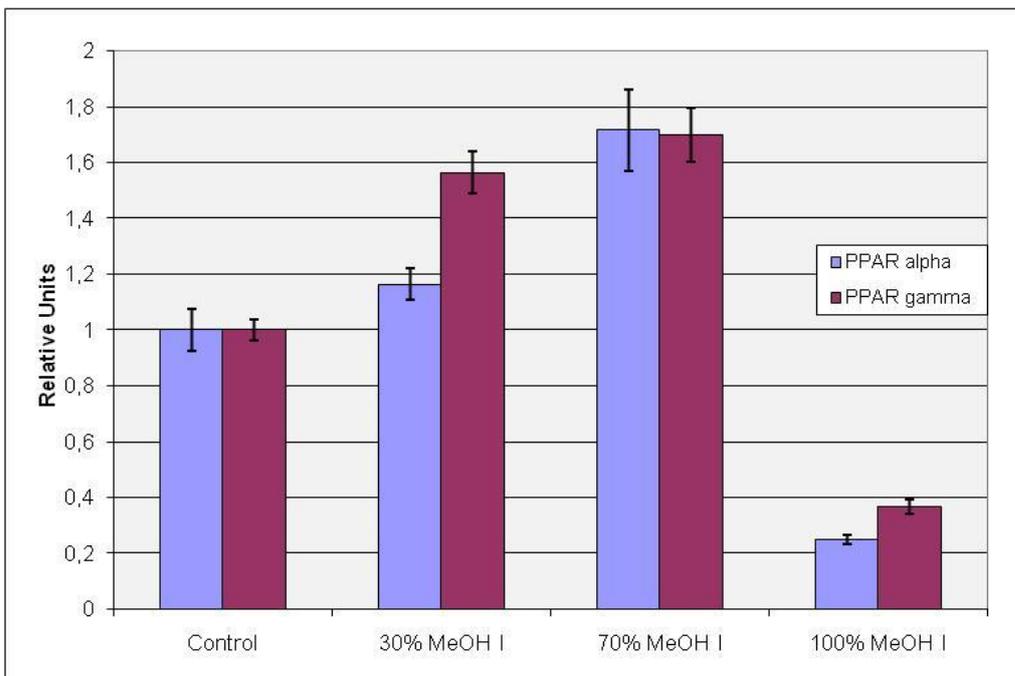


Abbildung 35: Rezeptoraktivierung von PPAR α und PPAR γ durch die gereinigten, fraktionierten Dichlormethanextrakte aus *Dryopteris filix-mas* 2006.

	Control	30% MeOH I	70% MeOH I	100% MeOH I
PPAR α	1	1,163714256	1,717170863	0,249327066
PPAR γ	1	1,56323069	1,699022219	0,368503817

Tabelle 4: Werte zu Abbildung 35

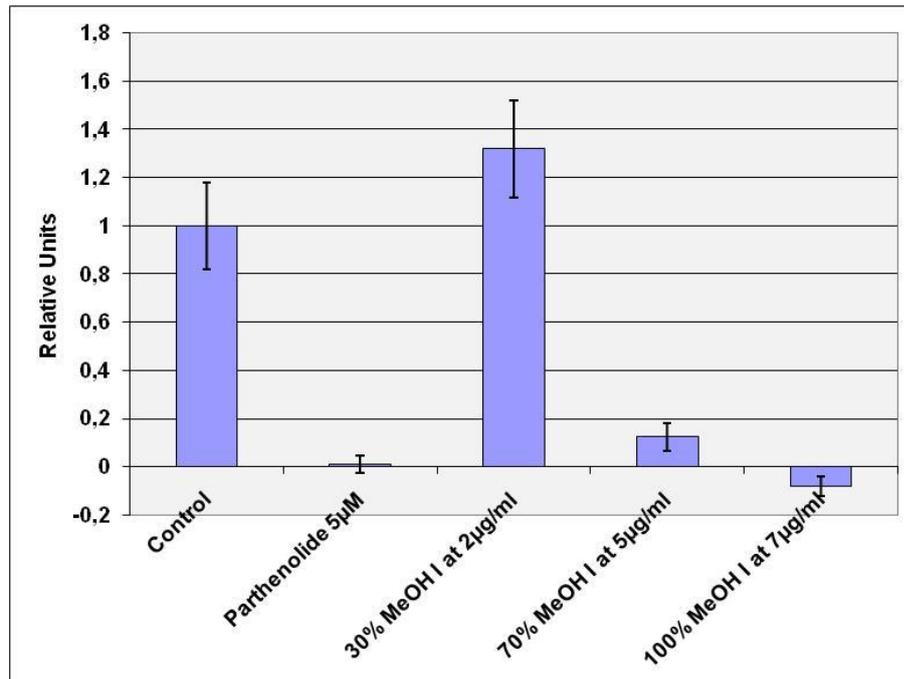


Abbildung 36: Rezeptorinhibierung von NFκB durch die gereinigten, fraktionierten Dichlormethanextrakte aus *Dryopteris filix-mas* 2006.

Control	Parthenolide 5µM	30% MeOH I 2µg/ml	70% MeOH I 5µg/ml	100% MeOH I 7µg/ml
1	0,008939408	1,318261614	0,124953734	-0,081275991

Tabelle 5: Werte zu Abbildung 36

6 Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nur *Dryopteris filix-mas* aus zwei Vegetationsperioden Aktivität aufzeigte. PPAR α wurde in keinem der ersten Tests aktiviert. Eine PPAR γ -Aktivierung konnte durch den Ethylacetat- und den Dichlormethanextrakt erzielt werden. Eine Inhibierung von NF κ B wurde durch Petrolether-, Ethylacetat- und Dichlormethanextrakte erreicht.

Bei den gereinigten, fraktionierten Dichlormethanextrakten zeigte vor allem die 70% MeOH-Fraktion Aktivität, die bei allen Rezeptortypen durch diese Zelltests nachgewiesen werden konnte. Auffallend war auch, wenn Aktivität gegeben war, diese vor allem bei PPAR γ und NF κ B auftrat.

Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurde die Aktivität des Dichlormethanextraktes und dessen Aufarbeitungsprodukte aus *Dryopteris filix-mas* 2006 mittels Mäuseohr-Ödem-Test belegt [3,4]. Abbildung 37 zeigt die Ergebnisse der Ödemreduktion beim Mäuseohr-Ödem-Test durch den Dichlormethanextrakt und dessen Aufarbeitungsprodukte im Vergleich zu Indomethacin [4]. Es ist ersichtlich, dass die 70% und 100% MeOH-Fraktion eine stärkere Ödemreduktion hervorrufen als die 30% MeOH-Fraktion.

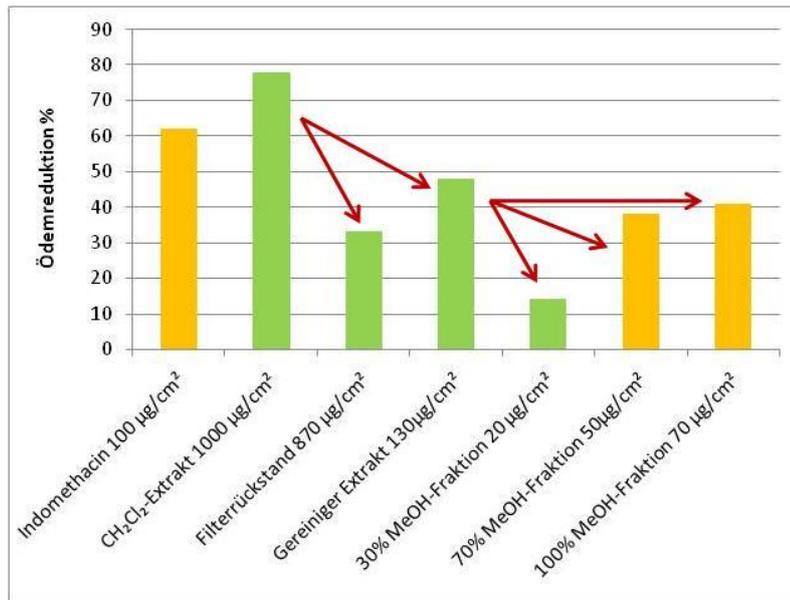


Abbildung 37: Ödemreduktion beim Mäuseohr-Ödem-Test durch Testung des Dichlormethanextraktes und dessen Aufarbeitungsprodukte im Vergleich zu Indomethacin [4].

Diese Abbildung erlaubt auch eine Gegenüberstellung der neu gewonnenen Daten mit den bereits bekannten Ergebnissen aus früheren Arbeiten.

In dieser Diplomarbeit wurde gezeigt, dass der Dichlormethanextrakt und alle drei Subfraktionen Aktivität aufweisen und die Ergebnisse vorangegangener Arbeiten eindeutig untermauert werden können. So kann auf die Frage: „Ob die Tierversuche durch andere Tests ersetzt werden können?“ eindeutig mit „Ja“ geantwortet werden. Die Zelltests können den Mäuseohr-Ödem-Test nicht nur ersetzen, sie erlauben zusätzlich einen spezifischen Umgang mit der Problemstellung, da die Aktivität einzelner Rezeptoren überprüft werden kann. Betrachtet man Tabelle 3 aus dem vorhergehenden Kapitel so fällt auf, dass vor allem bei PPAR γ und NF κ B eine Aktivität erzielt wurde. Bei beiden Rezeptoren besteht ein sicherer Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen, der bei PPAR α bis jetzt noch nicht belegt werden konnte.

Leider sind noch einzelne Signalwege in den Zellen nicht ausreichend untersucht, so dass für die Zukunft noch viele Fragen offen bleiben.

Teresa Rotter-le Beau führte bei Ihrer Diplomarbeit vergleichende phytochemische Untersuchungen an Farnen durch und konnte feststellen, dass die Inhaltsstoffmuster der Farne voneinander abweichen. Lediglich *Dryopteris filix-mas* aus zwei Vegetationsperioden zeigten ein annähernd gleiches Stoffmuster [7]. Diese Ergebnisse spiegeln sich ebenfalls in dieser Arbeit wieder, denn nur die Inhaltsstoffe aus *Dryopteris filix-mas* 2006 und 2007 führten zur Aktivität.

Bei unseren Untersuchungen zeigten neben dem Dichlormethanextrakt auch der Ethylacetat- und der Petroletherextrakt Aktivität. Leider würden die Untersuchungen dieser Auszüge den Rahmen dieser Diplomarbeit sprengen und sind somit nachfolgenden Arbeiten vorbehalten.

7 Zusammenfassung

Diese Diplomarbeit befasst sich mit der bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung zur Auffindung von Substanzen/Fraktionen aus heimischen Farnen mit antiphlogistischer Aktivität. Es wurde versucht, ein zelluläres Testsystem zu etablieren, welches die teuren Tierversuche zum Nachweis der entzündungshemmenden Wirkung ersetzen soll.

Für den Zelltest wurden HEK-Zellen verwendet, die mit spezifischen Plasmiden transfiziert wurden. Diese Plasmide trugen ein Rezeptorgen für PPAR α , PPAR γ oder NF κ B. Somit konnte der Einfluss der Farnextrakte auf die Aktivität von PPAR α , PPAR γ und NF κ B überprüft werden, was Hinweise auf antiphlogistische Aktivität erlaubt.

Es wurden Extrakte aus verschiedenen Farnen unterschiedlicher Polarität mittels ASE hergestellt und dem Zelltest zugeführt. Diese führten zu einer Aktivierung von PPAR γ durch den Ethylacetat- und den Dichlormethanextrakt und zu einer Inhibierung von NF κ B durch den Petrolther-, Ethylacetat- und Dichlormethanextrakt. Weiters wurden von *Dryopteris filix-mas* vom Chlorophyll gereinigte und mittels SPE fraktionierte Dichlormethanextrakte hergestellt, die ebenfalls dem Zelltest zugeführt wurden. Bei der 30% MeOH-Fraktion konnten PPAR γ aktiviert und NF κ B inhibiert werden. Die 70% MeOH-Fraktion war in allen drei Fällen aktiv. PPAR α und PPAR γ wurden aktiviert und bei NF κ B kam es zur Inhibierung. Die 100% MeOH-Fraktion zeigte nur bei NF κ B Aktivität auf.

Diese Ergebnisse wurden mit jenen aus vorangegangenen Tierversuchen verglichen und sie zeigten eine sehr gute Übereinstimmung. Darüber hinaus ist es möglich, genauere Aussagen über einzelne Rezeptoraktivitäten zu treffen.

Es ist also gelungen ein Testsystem einzuführen, welches die Tierversuche ersetzen kann und die Ergebnisse dieser aussagekräftig und sicher wiedergibt.

Damit konnte gezeigt werden, dass die verwendeten zellulären Testsysteme eine ansprechende Alternative zu Tierversuchen für die aktivitätsgeleitete Fraktionierung und Isolierung von Wirkstoffen mit antiphlogistischer Aktivität darstellen.

Literaturverzeichnis

- [1] **R. Karmasin, R. Ribing**; Die Gestaltung wissenschaftlicher Arbeiten; Facultus Verlags- und Buchhandels AG; 4. Auflage (2009)
- [2] **S. Gerlach**; Dissertation; Universität Wien (in Vorbereitung)
- [3] **M. Tremesberger**; Diplomarbeit; Universität Wien (2007)
- [4] **M. Sommergruber**; Diplomarbeit; Universität Wien (2007)
- [5] **N. Ritter**; Diplomarbeit; Universität Wien (2008)
- [6] **S. Ismail**; Diplomarbeit; Universität Wien (2008)
- [7] **T. Rotter-le Beau**, Diplomarbeit; Universität Wien (2008)
- [8] **Herbarium** des instituts der Pharmakognosie; Universität Wien
http://bibliothek.univie.ac.at/sammlungen/herbarium_des_departments_fur_pharmakognosie.html (06/2009)
- [9] **Wikipedia** <http://www.wikipedia.org> (06/2009)
- [10] **M. A. Fischer**; Exkursionsflora von Österreich; Stuttgart (1994)
- [11] **H. Haeupler, T. Muer**; Bildatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands; Ulmer, Stuttgart (2000)
- [12] **H. M. Jahns**; BLV Bestimmungsbuch Farne, Moose, Flechten; BLV Verlagsgesellschaft mbH; München (1982)
- [13] **Adam, Becker**, Analytik biogener Arzneistoffe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Pharmazeutische Biologie, Band 4 (2000)
- [14] **M. H. Gay**; Instrumentelle Analytik und Bioanalytik; 2. Auflage; Springer Verlag (2008)
- [15] **Internet** <http://www.dionex.com> (06/2009)
- [16] **Internet** <http://www.med4you.at/> (06/2009)

[17] **Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke**; Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Urban und Fischer; 9. Auflage (2005)

[18] **E. Mutschler** u. a.; Arzneimittelwirkungen; 8. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; Stuttgart (2001)

[19] **Internet** (6/2009)

<http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/03/03H052/t2.pdf>

[20] **C.Mülhardt**; Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics Spektrum; 5.Auflage (2006)

[21] **Internet**; (7/2009)

<http://www.cfs-aktuell.de/Juli%2009%20Teil%20I.pdf>

[22] **H. König**; Dissertation; Philipps-Universität Marburg; „*PPARalpha* induzierte Hemmung der *TNFalpha*-mRNA-Expression bei durch Talkum induzierter Perikarditis der Ratte“; (2002)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Katharina Huber
Geboren am: 20.07.1978 in Zwettl/ NÖ
Eltern: Maria und Franz Huber
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung:

1984 – 1992 Volks- und Hauptschule Arbesbach
1992 – 1997 Bundes- Bildungsanstalt für Kindergartenpädagogik
mit Abschluss der Reifeprüfung
2000 – 2002 Ausbildung zur Montessoripädagogin
2002 – 2009 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Berufliche Tätigkeiten:

1997 – 1998 Kindergärtnerin im Privatkindergarten „Fleur“, Wien
1998 – 2002 Kindergärtnerin bei der Gemeinde Wien
2004 – 2009 St. Severinus Apotheke

