

1. Einleitung

1.1 Johanniskräuter – *Hypericum*

Zur Pflanzenfamilie der Johanniskrautgewächse (Hypericaceae) zählt die Gattung der Johanniskräuter (*Hypericum*) mit fast 500 Arten von Kräutern, Büschen und wenigen Bäumen. Die Gattung entstand im Mittelmeerraum und ihre Arten kommen weltweit, bevorzugt in den gemäßigten Zonen der nördlichen Hemisphäre, vor. Außerdem sind sie auf höhergelegenen Bergen der tropischen Zonen, z. B. den Anden, zu finden (Abbildung 1) (Bridi et al., 2018; Crockett und Robson, 2011; Nürk und Blattner, 2010).

Der lateinische Gattungsname *Hypericum* leitet sich vom griechischen υπερεϊκον (Upereikon) ab und wurde das erste Mal von Nikander (Alexipharmaka) im zweiten Jahrhundert v. Chr. erwähnt. Mit Upereikon wurden im antiken Griechenland Pflanzen bezeichnet, welche zur Abwehr böser Geister über religiöse Figuren gehängt wurden. Damit einhergehend lässt sich die Anwendung gegen Depressionen seit der Antike erklären, da angenommen wurde, dass diese durch böse Geister verursacht werden, die den erkrankten Menschen bewohnten. Der deutsche Gattungsname hat seinen Ursprung im Beginn der Blütezeit um den 24. Juni, den Geburtstag von Johannes dem Täufer (Robson, 2003).

In dieser Arbeit wird das Echte Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) und das Polster-Johanniskraut (*Hypericum polyphyllum*) bearbeitet, diese Arten werden im Folgenden genauer vorgestellt.

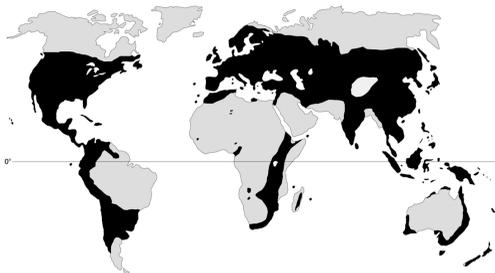


Abbildung 1: Verteilung von *Hypericum* weltweit (Nürk, 2011)

1.1.1 Echtes Johanniskraut – *Hypericum perforatum* L.

Mit 28,8 Mio. definierter Tagesdosen (2018) sind standardisierte Extrakte aus *H. perforatum* (Abbildung 2) die einzigen verschreibungspflichtigen Phytopharmaka in Deutschland (Lohse und Müller-Oerlinghausen, 2019). Der Einsatz vom Echten Johanniskraut als Heilpflanze begann schon in der Antike. Plinius der Ältere (23 – 79 n. Chr.)

1. Einleitung

erwähnte es als Mittel gegen Brandwunden, 1525 schrieb Paracelsus dem Johanniskraut eine Wirkung bei melancholischen Verstimmungen zu (Czygan, 2003). Heute wird der standardisierte Gesamtextrakt bei leichten bis mittelschweren Depressionen eingesetzt. Trotz intensiver Forschung zum Wirkmechanismus ist dieser weiterhin umstritten und es wird der standardisierte Gesamtextrakt eingesetzt (Linde, 2009). Die Wirkung ist jedoch durch Studien gut belegt, so ist der Gesamtextrakt Placebo überlegen, er zeigt vergleichbare Effekte wie Standardantidepressiva, z. B. Amitriptylin, und weist zudem weniger Nebenwirkungen als diese auf (Linde et al., 2008). Als Nebenwirkungen können allergische Hautreaktionen, gastrointestinale Beschwerden und eine Fotosensibilisierung auftreten. Aufgrund der Induktion von Cytochrom P450 Enzymen und dem P-Glykoprotein kommt es zu Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln (Russo et al., 2014). Diese Wechselwirkungen können in der hausärztlichen Praxis zur Verunsicherung führen (Linde et al., 2015).

In der Europäischen Union ist der Gesamtextrakt des Echten Johanniskrauts zur Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen bei oraler Aufnahme von der *European Medicines Agency* (EMA) zugelassen (*well-established medicinal use*) (EMA, 2008). Außerdem ist der Gesamtextrakt zur traditionellen Behandlung kurzzeitiger mentaler Erschöpfung, kleinerer Wunden und Entzündungen der Haut, z. B. bei Sonnenbrand, und gastrointestinaler Beschwerden registriert (*traditional use*) (EMA, 2009). In der Volksmedizin wird es topisch aufgrund seiner entzündungshemmenden und antimikrobiellen Eigenschaften bei Beschwerden wie Prellungen, Blutergüssen, Ulcera, Hämorrhoiden und Rheuma sowie gegen atopische Dermatitis und Psoriasis eingesetzt. Klassisch wird hierfür ein öliges Mazerat der Blüten („Rotöl“) hergestellt, mittlerweile gibt es jedoch auch Cremes, Gele und Lotionen, welche leichter anzuwenden und stabiler sind (Wölflé et al., 2014).



Abbildung 2: *Hypericum perforatum* L.

Für die antidepressive Wirkung ist das polyzyklische polyprenylierte Acylphloroglucin (PPAP) Hyperforin (Abbildung 3 A) hauptverantwortlich. Nachdem zuerst festgestellt

worden ist, dass es die Wiederaufnahme von Neurotransmittern wie Serotonin, Dopamin, Noradrenalin und γ -Aminobuttersäure hemmt (Chatterjee et al., 1998), konnte später der genaue Wirkmechanismus aufgeklärt werden. Hyperforin aktiviert TRPC6 (*transient receptor potential channel*), wodurch es zu einem Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in die Nervenzelle kommt. Dadurch bricht der transmembrane Na^+ -Konzentrationsgradient zusammen und die Wiederaufnahme von Neurotransmittern durch Symporter wird verhindert. Aufgrund dieses neuartigen Wirkmechanismus ist Hyperforin eine interessante Leitstruktur für eine neue Antidepressiva-Klasse (Leuner et al., 2007). Da die Stimulierung von TRPC6 außerdem zu einer gesteigerten Differenzierung der Keratinozyten führt, kann Hyperforin zur Behandlung der atopischen Dermatitis verwendet werden (Müller et al., 2008). Weitere pharmakologische Wirkungen von Hyperforin sind in Tabelle 1 beschrieben.

Tabelle 1: Pharmakologische Wirkungen von Hyperforin, modifiziert nach (Velingkar et al., 2017)

Wirkung	Referenzen
antibakteriell	(Avato et al., 2004; Schiavone et al., 2013)
antidemtiv	(Brenn et al., 2014; Klusa et al., 2001)
antidepressiv	(Leuner et al., 2007; Linde et al., 2008)
antientzündlich	(Hammer et al., 2007; Sosa et al., 2007)
antioxidativ	(Meinke et al., 2012; Ševčovičová et al., 2015)
antiplasmodial	(Verotta et al., 2007)
antitumoral	(Schempp et al., 2002; Šemeláková et al., 2012; Wiechmann et al., 2015)
anti-Parkinson	(Gómez del Rio et al., 2013)

Das instabile Hyperforin akkumuliert in *H. perforatum* zusammen mit ätherischem Öl in den durchscheinenden schizogenen Ölbehältern der Blätter und Blüten sowie in Ölgängen der Blüten und Früchte. Während der Entwicklung der Pflanze steigt der Gehalt von 2,5 % in den Knospen auf einen Maximalgehalt von 8,5 % in unreifen Früchten (Ciccarelli et al., 2001b; Soelberg et al., 2007; Tekel'ová et al., 2000). Genuin dient Hyperforin vermutlich als UV-Pigment und als Abwehrstoff gegen Herbivoren und Pathogene (Gronquist et al., 2001). Neben Hyperforin kommt außerdem in geringerer Menge das PPAP Adhyperforin in *H. perforatum* vor (Porzel et al., 2014; Tatsis et al., 2007).

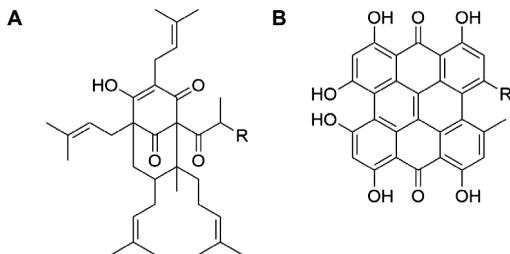
Neben den Phloroglucinen (z. B. Hyperforin, Adhyperforin) sind weitere wichtige Sekundärstoffe des Johanniskrauts Naphthodianthrone (z. B. Hypericin, Pseudohypericin), Flavonoide (z. B. Quercetin, Hyperosid, Rutin) und Xanthone (z. B. 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon, Mangiferin) (Nahrstedt und Butterweck, 1997).

1. Einleitung

Das Naphthodianthron Hypericin (Abbildung 3 B) kommt in einem Gehalt von 0,03 – 0,45 % in *H. perforatum* vor und wird in den schwarzen Drüsen der Blätter und Blütenblätter gespeichert (Ciccarelli et al., 2001a; Hölscher et al., 2009; Soelberg et al., 2007; Tekel'ová et al., 2000). Aufgrund der Hemmung von Monoaminoxidasen (MAOs) wurde zu Beginn angenommen, dass es für die antidepressive Wirkung verantwortlich ist (Suzuki et al., 1984). Dieser Mechanismus konnte jedoch nicht ausreichend belegt werden und ist fraglich (Paulke et al., 2008). Neuere Ergebnisse zeigen, dass Hypericin die Spiegel von Corticotropin-Releasing-Hormon und Corticotropin im Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System beeinflusst und somit zum antidepressiven Effekt beiträgt (Butterweck et al., 2001a; Butterweck et al., 2001b). Weitere Wirkungen von Hypericin sind in Tabelle 2 beschrieben, aktuell wird es zur Diagnostik von Blasen-tumoren verwendet (Jendželovská et al., 2016). Neben Hypericin kommt auch Pseudohypericin als Naphthodianthron in *H. perforatum* vor (Porzel et al., 2014). Obwohl Hyperforin in seinen antidepressiven Eigenschaften gut untersucht ist, kann es nicht allein verantwortlich für die antidepressive Wirkung von *H. perforatum* gemacht werden (Mir et al., 2019)

Tabelle 2: Pharmakologische Wirkungen von Hypericin, modifiziert nach (Velingkar et al., 2017)

Wirkung	Referenzen
antibakteriell	(Avato et al., 2004; Cecchini et al., 2007)
antidementiv	(Rizzo et al., 2019)
antidepressiv	(Butterweck et al., 2001a; Butterweck et al., 2001b; Paulke et al., 2008; Suzuki et al., 1984)
antinozizeptiv	(Galeotti et al., 2010)
antitumoral	(Maduray und Davids, 2011; Ritz et al., 2012)
antiviral	(Barnes et al., 2001; Wölfle et al., 2014)



R = CH₃ Hyperforin

R = C₂H₅ Adhyperforin

R = CH₃ Hypericin

R = CH₂OH Pseudohypericin

Abbildung 3: PPAPs (A) und Naphthodianthrone (B) aus *H. perforatum*

Aus der Sekundärstoffgruppe der Flavonoide kommen in *H. perforatum* vor allem Flavonol-Glykoside mit dem Aglykon Quercetin (insgesamt 2 – 4 %) (Abbildung 4 A) sowie die Biflavone 13',118-Biapigenin und Amentoflavon (13',118-Biapigenin) (Abbildung 4 B) vor (Nahrstedt und Butterweck, 1997). Physiologische Funktionen sind hauptsächlich der Schutz vor ultravioletter Strahlung, Pathogenen und Herbivoren sowie die Färbung von Blüten (Winkel-Shirley, 2001). Auch die Flavonoide tragen zur antidepressiven Wirkung von *H. perforatum* bei. So wurde gezeigt, dass die Flavonole die MAO A hemmen (Thiede und Walper, 1994), Hyperosid, Isoquercitin, Miquelianin und Rutin zeigten antidepressive Aktivität im Porsolt-Schwimmtest (*forced swimming test*) mit Ratten (Butterweck et al., 2000; Nöldner und Schötz, 2002) und das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System wird gehemmt (Butterweck et al., 2004). Weitere Wirkungen der Flavonoide sind in Tabelle 3 beschrieben.

Tabelle 3: Pharmakologische Wirkungen von Flavonoiden aus *H. perforatum*, modifiziert nach (Velingkar et al., 2017)

Wirkung	Referenzen
antidepressiv	(Butterweck et al., 2004; Butterweck et al., 2000; Nöldner und Schötz, 2002; Thiede und Walper, 1994)
antientzündlich	(Hammer et al., 2007; Huang et al., 2011)
antioxidativ	(Orčić et al., 2011; Zou et al., 2004)
anti-Parkinson	(Gómez del Rio et al., 2013)

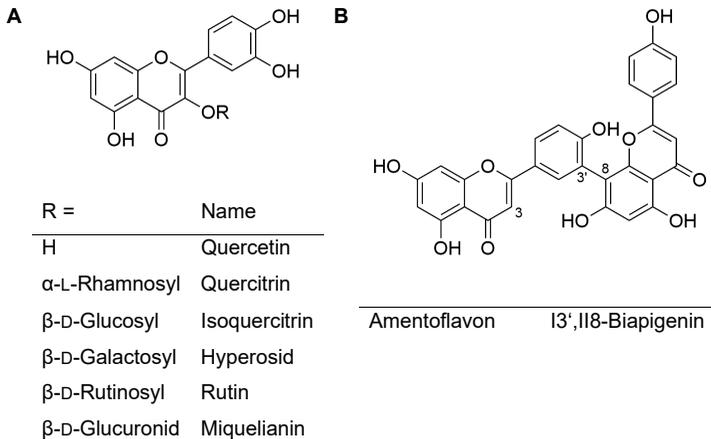


Abbildung 4: Flavonoide (A) und Amentoflavon (B) aus *H. perforatum*

1. Einleitung

Xanthone kommen nur in Spuren in den oberirdischen Teilen und in geringen Mengen in der Wurzel des Johanniskrautes vor. So konnten unter anderem 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon, Kielcorin und Mangiferin nachgewiesen werden (Abbildung 5) (Kitanov und Nedialkov, 1998; Nahrstedt und Butterweck, 1997; Tocci et al., 2013). Durch Hemmung der MAO A haben auch Xanthone eine antidepressive Wirkung (Suzuki et al., 1981). Aufgrund der geringen Menge in der Krautdroge muss ihr Beitrag zur pharmakologischen Wirkung des Johanniskrautes jedoch kritisch betrachtet werden. Weitere Xanthone und ein höherer Gehalt kann durch Zellkulturen und *in vitro*-Systeme durch biotischen Stress oder Elicitor-Behandlung gewonnen werden, da sie als Abwehrstoffe dienen (Tocci et al., 2011; Tusevski et al., 2016).

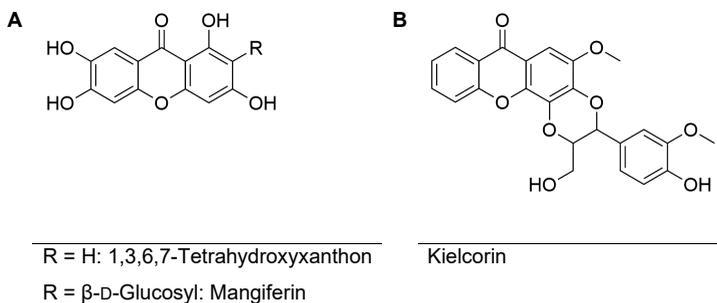


Abbildung 5: Xanthone aus *H. perforatum*

1.1.2 Polster-Johanniskraut – *Hypericum polyphyllum*

Das Polster-Johanniskraut (*Hypericum polyphyllum*) ist eine Art der Gattung *Hypericum* die unter anderem in sandigen und steinigen Höhenlagen im Süden der Türkei beheimatet ist (Cirak et al., 2017). Aufgrund seines horizontalen Wachstums hat es eine kissenartige Erscheinung. Es zeichnet sich in seiner Gattung durch besonders kleine Blätter (12 x 4 mm) und große gelben Blütenblätter (23 x 12 mm) (Abbildung 6) aus (Osińska und Weglarz, 2000). Porzel et al. (2014) konnten zeigen, dass es nach *H. perforatum* den höchsten Gehalt an Phloroglucinen besitzt und somit als Alternative zu diesem dienen könnte. Jedoch enthält es als Hauptphloroglucin anstelle des Hyperforins Hyperpolyphyllirin (Abbildung 7), ein neues Hyperforin, das bisher nur in den Blüten dieser Art gefunden wurde. Es besitzt an Position 1 eine Methylgruppe anstelle des Prenylrestes. Dies ist für Hyperforine ungewöhnlich und die Biosynthese ist bisher nicht bekannt. Außerdem besitzt es nach *H. perforatum* den höchsten Gehalt an Hypericinen, welche in den Blättern und Blüten akkumulieren. Extrakte aus *H. polyphyllum* haben zytotoxische Eigenschaften. Weitere Sekundärstoffe, die in *H. polyphyllum* vorkommen, sind Flavonoide, Biflavone und prenylierte Benzophenone (Cirak et al., 2016; Porzel et al., 2014).



Abbildung 6: *H. polyphyllum* während der Blüte (Cirak et al., 2017)

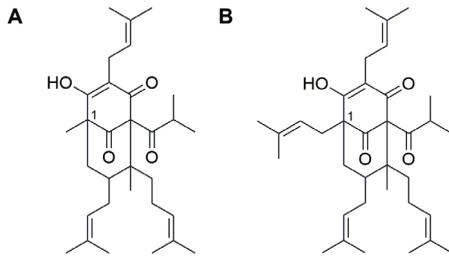
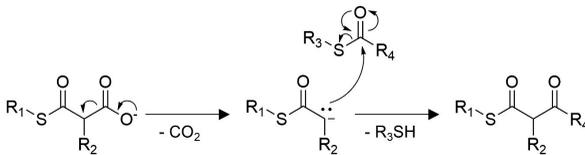


Abbildung 7: Hyperpolyphyllirin (A) und Hyperforin (B)

1.2 Polyketidsynthesen

Die wichtigsten Sekundärstoffe des Johanniskrautes, polyprenylierte Acylphloroglucine, Flavonoide, Naphthodianthrone und Xanthone gehören zu der sehr großen und strukturell vielfältigen Naturstoffgruppe der Polyketide. Sekundärstoffe im Allgemeinen entstammen dem Sekundärstoffwechsel und dienen den Pflanzen der Anpassung an die stetig wechselnden Anforderungen der Umwelt an ihrem nicht veränderbaren Standort. Sie werden konstitutiv oder aufgrund akuter äußerer Einflüsse gebildet und dienen vor allem zur chemischen Abwehr von Herbivoren und Pathogenen, als Duft- und Farbstoffe zur Anlockung von Bestäubern sowie dem Schutz vor UV-Strahlung und Verdunstung. Sie sind somit ein Vorteil zum Überleben am Standort und zur Fortpflanzung, jedoch nicht notwendig für Wachstum und Entwicklung der Pflanze. Stoffe mit letzteren Eigenschaften entspringen dem Primärstoffwechsel (Hartmann, 2007).

Polyketide werden durch wiederholende decarboxylierende Claisen-Kondensation eines aktivierten Extendersubstrates an ein ebenso aktiviertes Acyl-Startersubstrat durch eine Kettenverlängerung gebildet. Die Biosynthese wird durch Polyketidsynthesen (PKS) katalysiert, welche in drei Klassen unterteilt werden (Birch, 1967).



<u>Typ I PKS</u>	<u>Typ II PKS</u>	<u>Typ III PKS</u>
R ₁ = ACP	R ₁ = ACP	R ₁ = CoA
R ₂ = H, CH ₃ , CH ₂ CH ₃ CH ₂ CH ₂ Cl, OH, OCH ₃ , NH ₂	R ₂ = H	R ₂ = H, CH ₃ , CH ₂ CH ₃
R ₃ = KS	R ₃ = KS	R ₃ = PKS
R ₄ = CH ₂ -R	R ₄ = CH ₂ -R	R ₄ = CH ₂ -R

Abbildung 8: Mechanismus der decarboxylierenden Claisen-Kondensation der Polyketidsynthesen nach (Chan et al., 2009)

1.2.1 Typ I Polyketidsynthesen

In Anlehnung an die Multidomänen-Enzyme der Typ I Fettsäuresynthase des Primärstoffwechsels der Hefen und Tiere sind Typ I PKS ebenso Multidomänen-Enzyme, die modular oder iterativ Polyketide synthetisieren und in Pilzen und Bakterien vorkommen (Austin und Noel, 2003).

Modulare Typ I PKS, etwa 350 kDa groß, bestehen aus einer variablen Anzahl funktioneller Einheiten, die jeweils einen Schritt der Kettenverlängerung katalysieren. Jede funktionelle Einheit besteht mindestens aus den drei Domänen Ketosynthase (KS), Acyltransferase (AT) und Acylcarrier-Protein (ACP). An die Thiolgruppe eines Cysteins der KS ist das Startersubstrat und in späteren Zyklen die wachsende Kette gebunden und sie katalysiert die Kondensation des Startersubstrats/der Kette an das Extendersubstrat. Die verlängerte Kette ist nun als β -Ketothioester an das ACP gebunden. Extendersubstrate werden durch die AT spezifisch an das ACP gebunden und aktiviert. Das ACP dient als flexibler Arm, der das Extendersubstrat zur KS und nach Kondensation die verlängerte Kette zur nächsten KS transportiert. Dieser Zyklus wiederholt sich je nach Anzahl der funktionellen Einheiten. Jede Einheit kann zusätzliche Domänen (Ketoreduktase, Dehydratase, Enoylreduktase) zur Modifikation der Keto-Gruppe beinhalten. Die Kettenverlängerung wird durch die Thioesterase-Domäne beendet. Hierbei wird das Polyketid als freie Säure oder Acylester abgegeben (Staunton und Weissman, 2001). Die 6-Deoxyerythronolid-B-Synthase aus *Saccharopolyspora erythraea* ist die am besten untersuchte modulare Typ I PKS und katalysiert die Biosynthese des Makrolides Erythromycin A (Weissman, 2009). Neben den Makrolid-Antibiotika werden außerdem die pharmazeutisch relevanten Polyen-Antimykotika, z. B. Amphotericin B, und die Makrolid-Immunsuppressiva Tacrolimus und Sirolimus von modularen Typ I PKS synthetisiert (Dewick, 2009).

Iterative Typ I PKS bestehen hingegen nur aus einem einzelnen Modul und werden wiederholend zur Synthese des Polyketids verwendet. Ein pharmazeutisch relevantes Beispiel ist die Synthese von Lovastatin in *Aspergillus terreus*, welches die (3S)-Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase hemmt und zur Behandlung von Hypercholesterinämie verwendet wird (Staunton und Weissman, 2001).

1.2.2 Typ II Polyketidsynthesen

In Anlehnung an die separaten Enzyme der Typ II Fettsäuresynthesen des Primärstoffwechsels der Bakterien und Pflanzen sind die Typ II PKS ebenso separate Enzyme, die aromatische Polyketide in Bakterien iterativ biosynthetisieren. Sie bestehen mindestens aus zwei Ketosynthase-Einheiten (KS_{α} und KS_{β}) und einem Acylcarrier-Protein (minimale Typ II PKS). Außerdem können sie noch Ketoreduktase-, Zyklyase-, und Aromatase-

1. Einleitung

Untereinheiten besitzen. Die minimale Typ II PKS katalysiert die iterative decarboxylierende Claisen-Kondensation des Extendersubstrates Malonyl-CoA an ein Acyl-Startersubstrat bzw. an die wachsende Kette. Im Vergleich zur Typ I PKS wird hier ausschließlich Malonyl-CoA als Extendersubstrat verwendet und an das ACP gebunden. Hierbei ist noch nicht vollständig geklärt, ob dies selbstständig oder durch eine Malonyl-CoA:ACP-Transferase des Fettsäurestoffwechsels geschieht. Trotz hoher Sequenz-Identität von KS_{α} und KS_{β} besitzt nur KS_{α} ein Cystein im aktiven Zentrum und kann somit die Kondensation durchführen. KS_{β} hingegen begrenzt die Kettenlänge des Polyketids und wird deswegen auch *chain length factor* genannt. Außerdem wird diskutiert, ob sie für die Decarboxylierung des Malonyl-ACP zuständig ist. Pharmazeutisch relevante Produkte der Typ II PKS sind die zytostatischen Anthracycline, z. B. Daunorubicin und Doxorubicin, und antibiotisch wirksame Tetracycline, z. B. Tetracyclin und Doxycyclin (Hertweck et al., 2007).

1.2.3 Typ III Polyketidsynthasen

Typ III PKS kommen vor allem in Pflanzen und Bakterien vor. Außerdem sind sie in Pilzen und anderen Eukaryoten wie Amoebozoa zu finden (Abbildung 9). Jede Landpflanze besitzt mindestens eine Typ III PKS, Tiere hingegen keine (Shimizu et al., 2017).

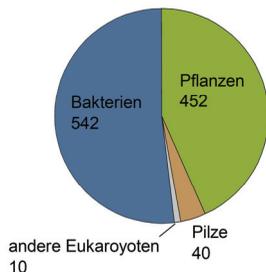


Abbildung 9: Typ III PKS in der KEGG GENES Datenbank nach (Shimizu et al., 2017)

Typ III PKS sind am einfachsten aufgebaut. Sie sind ein Homodimer aus identischen Ketosynthase-Domänen mit einer Größe von 80 – 90 kDa. Sie haben sich wahrscheinlich aus der homodimeren β -Ketoacyl-Acylcarrier-Protein-Synthase III (KAS III) entwickelt, welche Bestandteil der Typ II Fettsäuresynthasen der Bakterien und Pflanzen ist und diese initiiert. KAS III katalysiert die Verlängerung eines Startermoleküls um eine Acetyl-Einheit durch decarboxylierende Kondensation von Malonyl-ACP. Typ III PKS katalysieren die iterative decarboxylierende Kondensation eines Extendersubstrates an ein Startersubstrat. Die entstehende lineare Polyketid-Kette wird zudem zyklisiert und es findet eine Aromatisierung statt. Alle Reaktionen finden in einem aktiven Zentrum mit