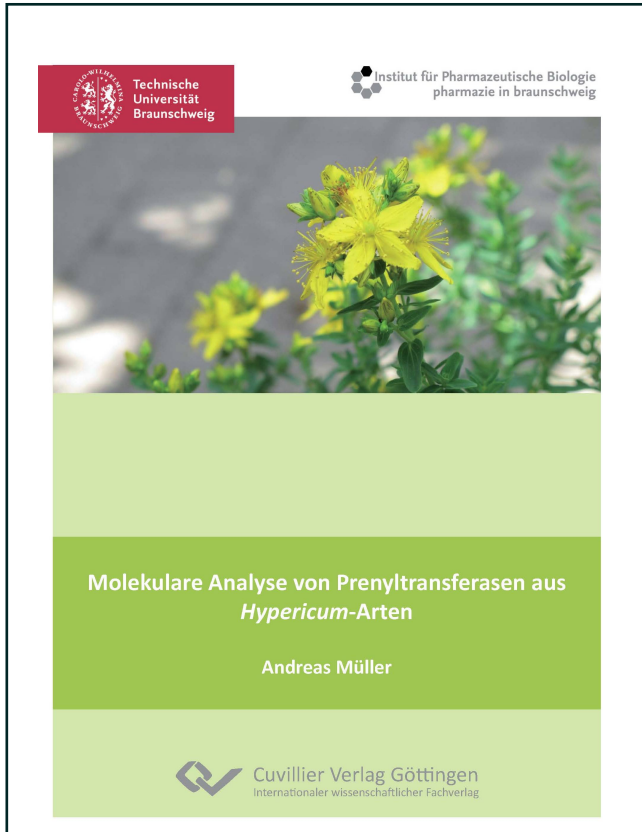




Andreas Müller (Autor)
**Molekulare Analyse von Prenyltransferasen aus
Hypericum-Arten**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6355>

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



I Einleitung

1 Johanniskraut

Um den 24. Juni, den Tag des Heiligen Johannes des Täufers, ist es möglich das Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L., Abb. 1) in voller Blüte zu sehen. Die Pflanze inspiriert aufgrund ihrer strahlend gelben Blüten seit über zweitausend Jahren die Phantasie der Menschen und bereits in der Antike wurden ihr eine Vielzahl von Wirkungen zugeschrieben. Es ist daher nicht überraschend, dass *Hypericum* als Arzneipflanze bereits bei Plinius dem Älteren in seiner „Historia Naturalis“ zu finden ist.



Abb. 1 *Hypericum perforatum* L. (Johanniskraut)

Die hellen gelben Blüten, von vielen Staubblättern gesäumt, haben die Menschen an die Sonne erinnert. So lag der Schluss nahe, dass die Pflanze die bösen Geister vertreibt, wie die Sonne die Nacht vertreibt. Später wurde dieser Glaube wahrscheinlich von irischen Christen übernommen, die der Pflanze den Namen Johanniskraut („St. John’s wort“) gaben, da ihre Blütezeit mit dem Jahrestag des Heiligen Johannes zusammenfiel. Bestärkt wurde dies durch die Tatsache, dass die Blätter und Blüten einen roten Saft enthalten, der des Märtyrers Blut symbolisiere.

Die Verwendung der Pflanze als Apotropaikum findet sich in vielen alten Namen aus dem Volksmund wieder, wie z.B. Jageteufel, Teufelsflucht und „*fuga daemonum*“. Johanniskraut wurde bei einer Reihe von Leiden eingesetzt (Czygan, 2003). Die große Vielfalt der zugeschriebenen Wirkungen hat dem wissenschaftlichen Ruf der Pflanze in der Neuzeit aber eher geschadet als ihn zu bewerben (Tschupp, 2004). Allerdings sind einige Wirkungen wie



z.B. die antidepressiven und wundheilenden Eigenschaften inzwischen gut belegt (Müller, 2003; Leuner et al., 2011)

Der lateinische Name der Pflanzengattung *Hypericum* leitet sich vermutlich von den griechischen Worten „*hyper*“ und „*eikon*“ ab, also „Über“ und „Ikone“, was damit zusammenhängen könnte, dass die Pflanze über Ikonen und Götterbildnisse gehängt wurde, um böse Geister fernzuhalten. Der Artname *perforatum* lässt sich hingegen leicht erklären, da die Blätter der Pflanze gegen das Licht gehalten wie perforiert erscheinen (Abb. 2), was sich durch die durchscheinenden Ölbehälter erklären lässt. *Hypericum perforatum* L. wurde zuerst von Carl von Linné in seiner „Species plantarum“ als „durchlöchertes oder perforiertes“ Johanniskraut beschrieben (Czygan, 2003).



Abb. 2 Johanniskraut - Blatt

Heute wird Johanniskraut, welches im Mittelalter die Melancholie, auch als böse Geister interpretiert, heilen sollte, hauptsächlich als Antidepressivum eingesetzt. Seine Wirksamkeit konnte in vielen klinischen Studien zur Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen belegt werden. Dabei ist es modernen synthetischen Antidepressiva äquivalent (Barnes et al., 2001; Linde et al., 2008). Hervorzuheben ist aber, dass das Nebenwirkungsspektrum der Johanniskrautextrakte sich als günstiger herausstellte als das von synthetischen Antidepressiva, vor allem der älteren Wirkstoffe.

Allerdings darf das Interaktionspotential der Johanniskrautextrakte nicht außer Acht gelassen werden, das sich durch die Induktion von Enzymen des Xenobiotikametabolismus vom Typ CYP 3A4 und p-Glycoprotein erklären lässt (Watkins et al., 2003). Diese Enzyminduktion kann zu einer Reduktion der Plasmaspiegel anderer koapplizierter Arzneistoffe, z.B. Ciclosporin, Proteaseinhibitoren und Zytostatika, führen und deren Wirkung vermindern, was im schlimmsten Fall lebensbedrohlich sein kann (Whitten et al., 2006).

2 Depression

Depression ist definiert als eine psychische Verstimmung, die den Lebensumständen nicht entspricht. Dem entgegen steht die Trauer, welche eine angemessene Reaktion auf die jeweiligen Lebensumstände ist. Das Krankheitsbild der Depression zeichnet sich durch eine allgemeine Verschlechterung der Stimmung aus. Die Patienten sind freud- und hoffnungslos, leiden häufig unter Schlafstörungen und Appetitlosigkeit. Des Weiteren sind viele der Patienten von einer starken Hemmung des Antriebs betroffen (Mutschler et al., 2001).



Im Jahr 2010 zählten Depressionen zu den häufigsten Erkrankungen der Psyche in Europa. Hierbei sind mehr als zweimal so viele Frauen betroffen wie Männer (Wittchen et al., 2011). Depressionen stellen eine immense psychische Belastung für den Betroffenen, aber auch für dessen Angehörige dar. Im schlimmsten Fall endet eine schwere Depression im Suizid des Erkrankten und kann damit als lebensbedrohliche Erkrankung gesehen werden. Betrachtet man krankheitsbedingtes Fehlen am Arbeitsplatz, so verursachen Depressionen mehr Fehltage als Erkrankungen des Herzens, der Lunge und Diabetes (Wittchen und Jacobi, 2005). Die WHO geht davon aus, dass bis zum Jahr 2020 Depressionen zur Krankheit mit der zweithöchsten Zahl an Jahren, verloren durch Behinderung und frühzeitigen Tod, avancieren werden (WHO, 2012).

Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass eine adäquate Behandlung von Depressionen von äußerster Wichtigkeit ist. Therapeutisch genutzt werden heute meist Antidepressiva, deren größter Teil von modernen, chemisch-synthetischen Antidepressiva, u.a. selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmern (SSRI) ausgemacht wird, dicht gefolgt von den älteren tricyclischen Antidepressiva (TCA) (Schwabe und Paffrath, 2007). Beide Gruppen zeigen allerdings häufig Nebenwirkungen, die von den Patienten als Belastung wahrgenommen werden und auch zur Ablehnung ihrer Therapie führen können (Müller et al., 1999). Eine Alternative zu den chemisch-synthetischen Antidepressiva sind Arzneimittel aus standardisierten Johanniskrautextrakten. Obwohl in der Vergangenheit einige Studien die Effektivität von Johanniskrautpräparaten in Frage gestellt haben (Shelton et al., 2001; Davidson et al., 2002), konnte in einem Cochrane-Review für standardisierte Johanniskrautextrakte gezeigt werden, dass diese eine stärkere Wirkung als Placebo haben, die sogar mit der von modernen Antidepressiva vergleichbar ist. Ein großer Vorteil dieser Extrakte ist das sehr günstige Nebenwirkungsprofil, welches auf einer Ebene mit Placebo ist (Linde et al., 2008).

Der Wirkmechanismus der Antidepressiva konnte bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Allen gemeinsam ist, dass sie die Konzentration von Monoaminen im synaptischen Spalt erhöhen, allen voran Serotonin und Noradrenalin. Obwohl die Konzentrationserhöhung der Neurotransmitter schon kurze Zeit nach Applikation des Antidepressivums auftritt, werden dennoch meist zwei bis vier Wochen Therapie benötigt, um den vollen antidepressiven Effekt zu erreichen. Es wird angenommen, dass es in dieser Latenzzeit zu adaptiven Änderungen der Rezeptorendichte kommt, die am ehesten die Wirkung erklären können (Mutschler et al., 2001).

3 Johanniskraut (*Hypericum*)

Der Gattung *Hypericum* (Familie Hypericaceae) gehören über 450 verschiedene Arten an, deren Erscheinung von Kräutern über Büsche bis hin zu Bäumen reicht. Man findet sie weltweit in allen Gebieten der gemäßigten Zone, allerdings sind einige wenige sogar bis nach Südamerika, Australien und Neu-Seeland vorgedrungen (Robson, 2003). Im Verlauf dieser



Arbeit wird sich auf zwei *Hypericum*-Arten beschränkt, *Hypericum perforatum* L. (Tüpfeljohanniskraut) und *Hypericum calycinum* L. (Großkelchiges Johanniskraut).

3.1 *Hypericum perforatum* L.

Das Tüpfeljohanniskraut, *H. perforatum* L. ist ein ausdauerndes Kraut, welches normalerweise aufrecht wächst. Es ist häufig stark verzweigt. Die Blätter sind lanzettlich, in der Regel stiellos oder kurz gestielt und weisen eine Vielzahl von durchscheinenden Ölbehältern auf. Diese durchscheinenden Ölbehälter, bei denen es sich um schizogene Räume handelt, sind über die Blattfläche verteilt. Neben diesen Ölbehältern finden sich auf dem Blatt auch dunkle Punkte, bei denen es sich um Verbände von Zellen handelt, die das rote Pigment enthalten. Die Blüten sind radiär symmetrisch mit fünf frei stehenden, leuchtend gelben Petalen und einem oberständigen Fruchtknoten (Robson, 2003).

3.2 *Hypericum calycinum* L.

H. calycinum, das großkelchige Johanniskraut (Abb. 3) ist eine in Südosteuropa verbreitete Zierpflanze. Auch hier können wir fünf Petalen sowie einen oberständigen Fruchtknoten finden. Obwohl die Blütezeit der Pflanze sich über den ganzen Sommer erstreckt, verblühen die einzelnen Blüten in der Regel nach nur einem Tag. So kann man am Ende dieses Tages bereits sehen, wie sich Antheren und Filamente bräunlich verfärben (Gronquist et al., 2001).



Abb. 3 Blüte von *Hypericum calycinum*



4 Inhaltsstoffe

Der pflanzliche Metabolismus bringt eine Vielzahl von Verbindungen hervor, welche unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Es wird zwischen zwei Ebenen metabolischer Prozesse unterschieden. Der Primärstoffwechsel zeichnet sich dadurch aus, dass er essentielle Prozesse des Wachstums und der Entwicklung des Individuums beinhaltet. Er ist unentbehrlich, universal und einheitlich; und er unterliegt keinen gravierenden funktionellen Veränderungen. Dem gegenüber steht der Sekundärstoffwechsel, dessen Prozesse Reaktionen auf die das Individuum umgebende Umwelt sind. Er ermöglicht Interaktion mit dieser, wie die Anlockung potentieller Bestäuber oder das Abschrecken von Fressfeinden. Diese Ebene des Stoffwechsels zeichnet sich dadurch aus, dass sie für Wachstum und Entwicklung des Individuums nicht essentiell ist, allerdings durchaus für das Überleben in der Umwelt. Der Sekundärstoffwechsel ist innerhalb des Pflanzenreichs sehr unterschiedlich und dabei nicht nur einzigartig von einer Pflanzenart zur anderen, sondern häufig auch von Population zu Population. Zudem ist der Sekundärstoffwechsel sehr adaptiv, was sich in der Vielzahl von existierenden Metaboliten widerspiegelt (Hartmann, 2007).

Heute sind über 200.000 verschiedene Strukturen an Sekundärstoffen bekannt. Viele von ihnen besitzen interessante biologische, sowie häufig auch pharmakologische Eigenschaften. Aus diesem Grund sind sie, nicht nur von einem pharmazeutischen Standpunkt aus, sehr interessant. Wenn in dem folgenden Kapitel von Inhaltsstoffen gesprochen wird, so sind aus eben genannten Gründen Metabolite des Sekundärstoffwechsels gemeint.

4.1 Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L.

Da das Tüpfeljohanniskraut seit Jahrhunderten als Arzneipflanze bekannt ist und seit den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts eine Renaissance als Arzneipflanze feiert (Tschupp, 2004), ergab sich ein großes Interesse an den Inhaltsstoffen der Pflanze. Dies führte dazu, dass das Johanniskraut heute eine der besten untersuchten Arzneipflanzen ist.

4.1.1 Flavonoide

Flavonoide sind Pflanzeninhaltsstoffe, die in allen höheren Pflanzen vorkommen. Häufig sind diese für die Färbung der Blüten verantwortlich und dienen in diesen Fällen der Anlockung von Bestäubern (Gronquist et al., 2001; Hänsel und Sticher, 2007). Aber sie können auch über antimikrobielle Eigenschaften verfügen, die der Abwehr dienen (Harborne und Williams, 2000). Es wurden Hinweise gefunden, dass Flavonoide eine Rolle beim Schutz der Pflanze gegen UV-B-Strahlung spielen. So konnte man nach UV-Bestrahlung eine Erhöhung der Menge an Flavonoiden in einem UV-B-resistenten Reis-Cultivar finden, die in einem UV-B-empfindlichen Cultivar fehlte. Es wird angenommen, dass diese Flavonoide durch Absorption von UV-B-Strahlen und durch ihre Eigenschaft als Radikalfänger die Pflanze schützen (Markham et al., 1998). Die Biosynthese der Flavonoide (Abb. 4) beginnt mit der



Kondensation von einem Zimtsäure-CoA-Ester-Derivat sowie von drei Molekülen Malonyl-CoA zu einem Chalkon, katalysiert durch die Chalkonsynthase, eine Typ-III-Polyketidsynthase. Dieses Chalkon wird im Anschluss durch die Chalkonflavanonisomerase zu einem Flavanon umgewandelt. Von diesem Flavanon-Grundkörper leiten sich alle weiteren Arten von Flavonoiden ab (Hänsel und Sticher, 2007).

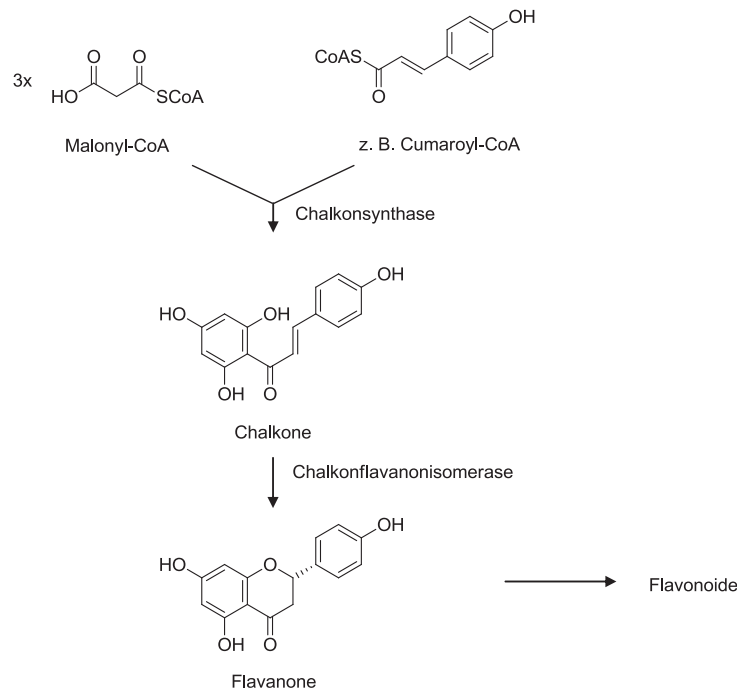


Abb. 4 Biosynthese der Flavonoide nach Hänsel und Sticher (2007)

Aus pharmakologischer Sicht gibt es Hinweise für verschiedenste Wirkungen von Flavonoiden. So konnte gezeigt werden, dass bestimmte Flavonoide die Xanthinoxidase hemmen, die eine wichtige Rolle in der Bildung von Harnsäure bei der Gicht spielt (Cos et al., 1998). Andere Flavonoide zeigen antithrombotische (Gryglewski et al., 1987), antiinflammatorische (Wang et al., 1999) oder antivirale Effekte (Kaul et al., 1985). Für einige konnte sogar eine cytotoxische Wirkung *in vitro* nachgewiesen werden (Silva et al., 1995; Lee et al., 1996) sowie, ebenfalls *in vitro*, eine Hemmung der Tumordinvasion (Parmar et al., 1994). Dabei ist die antioxidative Wirkung der Flavonoide hervorzuheben, die vermutlich an dem positiven Effekt auf das Risiko von Folgen koronarer Herzkrankheiten beteiligt ist. So konnte in einer niederländischen Kohortenstudie gezeigt werden, dass mit großer Wahrscheinlichkeit Quercetin sowie einige andere Flavonoide die Mortalität durch koronare Herzkrankheiten senken konnten (Hertog et al., 1993).

In *H. perforatum* machen die Flavonoide 2-4 % des Gehalts aus. Darunter finden sich vor allem Quercetinglykoside, wie Hyperosid, Rutin und Quercitrin (Abb. 5), sowie diverse Aglykone von Flavonoiden. Außerdem enthält *H. perforatum* noch die Biflavone I3,II8-Biapegenin und Amentoflavon (Hänsel und Sticher, 2007).



Es wird vermutet, dass die Flavonoide in Extrakten von *H. perforatum* auch zu der antidepressiven Wirkung beitragen. So wurde beobachtet, dass einige Flavonoide Aktivität im „Forced Swimming Test“ (FST) zeigen konnten (Butterweck et al., 2000), was ein Hinweis für einen antidepressiven Effekt ist. Auch Rutin, welches isoliert keine Aktivität im FST aufweist, scheint für die antidepressive Wirkung wichtig zu sein. So konnte im FST gezeigt werden, dass ein methanolischer, rutinarmer Extrakt erst nach Anreicherung mit Rutin eine Wirkung entwickelte. Da Rutin selber hingegen keine Aktivität gezeigt hat, ist anzunehmen, dass es die Bioverfügbarkeit der für die Wirkung verantwortlichen Komponenten des Extraktes steigert (Nöldner und Schütz, 2002).

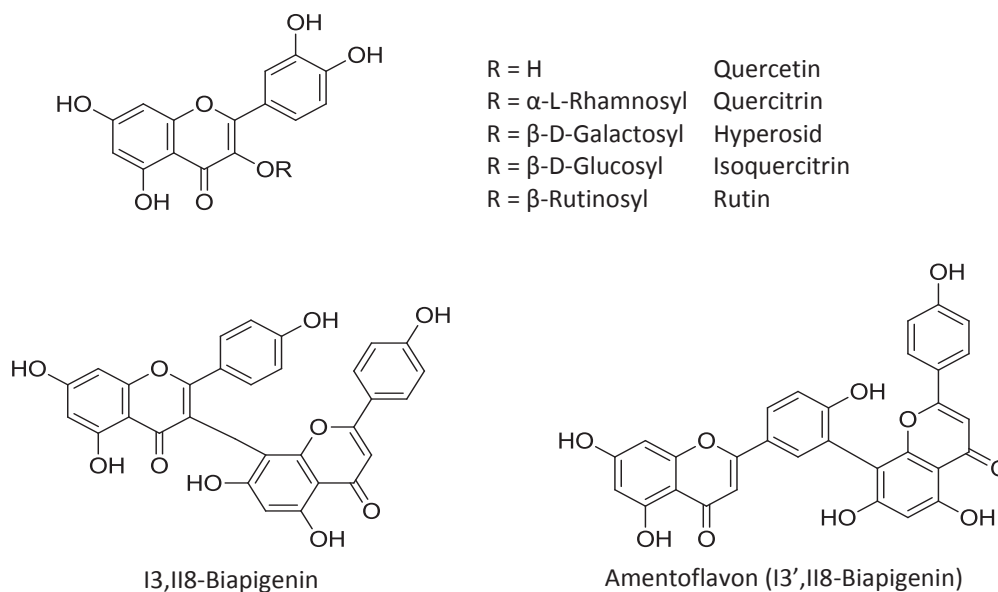


Abb. 5 Flavonoide aus *Hypericum perforatum* nach Tekel'ova et al. (2000)

4.1.2 Naphtodianthrone

Naphtodianthrone gehören zu der Stoffgruppe der Anthranoide, bzw. der Anthracenderivate. Zu dieser Klasse von Naturstoffen gehören u.a. einige laxierende Verbindungen, wie die Sennoside aus Sennesblättern. Anthranoide entstehen durch Kondensation von Acetyl-CoA mit sieben Molekülen Malonyl-CoA, wodurch ein Octaketid-Intermediat gebildet wird (Abb. 6). Aus diesem Octaketid-Intermediat entsteht durch Cyclisierung, unter Verlust von drei Molekülen Wasser, und Decarboxylierung ein Anthron. Zwei dieser Anthronmoleküle werden zunächst oxidativ über C-10 gekuppelt, woraufhin sich durch weitere Oxidationsschritte die Naphtodianthrone ableiten (Hänsel et al., 1999; Hänsel und Sticher, 2007).

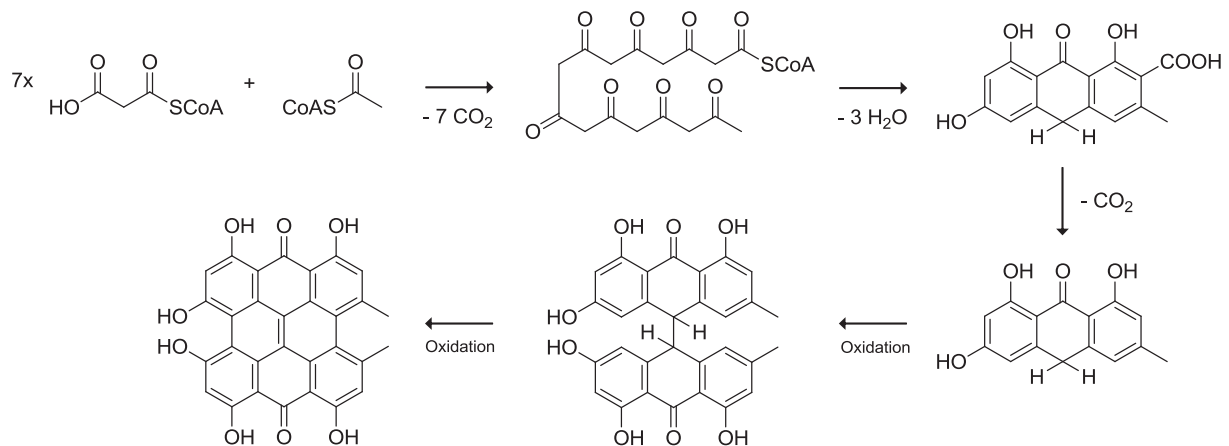


Abb. 6 Biosynthese der Naphtodianthrone am Beispiel des Hypericins (Hänsel et al., 1999; Hänsel und Sticher, 2007)

In Extrakten von *H. perforatum* finden sich verschiedene Naphtodianthronderivate, von denen Hypericin und Pseudohypericin den Großteil ausmachen (Abb. 7). Des Weiteren liegen Isohypericin und die Vorläufer von Hypericin und Pseudohypericin (Protohypericin und Protopseudohypericin) vor.

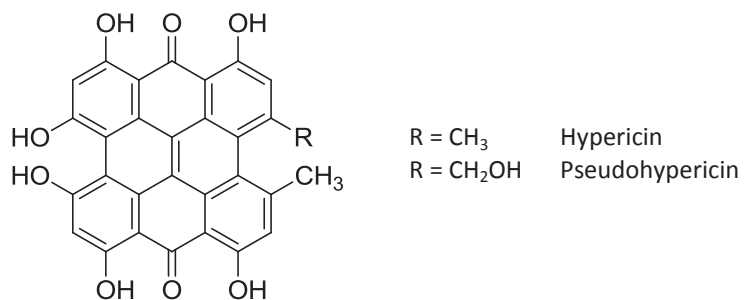


Abb. 7 Hypericine

Abbauprodukte der Hypericine sind für die intensive rote Färbung des Rotöls verantwortlich, das durch Extraktion von Knospen und Blüten mit Olivenöl gewonnen wird.

Der Gehalt an Gesamthypericin beträgt 0,1 – 0,15 % und beinhaltet Hypericin und Pseudohypericin (Barnes et al., 2001; Hänsel und Sticher, 2007).

In der Vergangenheit wurde angenommen, dass Hypericin ein Inhibitor der Monoaminoxidase (MAO) ist (Suzuki et al., 1984) und somit verantwortlich für die antidepressive Wirkung von *H. perforatum*. Diese Effekte konnten allerdings in folgenden Untersuchungen nicht belegt werden. Ein Grund dafür könnte der geringe Reinheitsgrad (80 %) der von Suzuki untersuchten Hypericinprobe sein (Butterweck, 2003). Bei Untersuchungen der Konzentration von (Pseudo-)Hypericin im Rattenhirn, nach oraler Gabe eines Johanniskrautextraktes oder puren (Pseudo-)Hypericins, konnte weder Hypericin noch



Pseudohypericin detektiert werden. Auch deswegen ist die Beteiligung von Hypericin an der antidepressiven Wirkung von Johanniskrautextrakten zweifelhaft (Paulke et al., 2008).

Heute wird Hypericin auf seine Eignung in der photodynamischen Therapie von Tumoren untersucht. Hierbei wird ausgenutzt, dass Hypericin, nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 595 nm, reaktive Sauerstoffspezies bildet, die zur Zerstörung der bestrahlten Tumorzellen führen. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht abschließend geklärt (Agostinis et al., 2002). Es konnte im Mausmodell eine effektive Tumorbehandlung erreicht werden. Die Wirkung schien größtenteils von einer Schädigung der Gefäße des Tumors herzurühren (Chen et al., 2001). Da Hypericin nach Anregung auch eine Eigenfluoreszenz aufweist, wurden Versuche unternommen Hypericin als Indikator für die Detektion von Tumorgewebe für chirurgische sowie photodynamische Eingriffe zu verwenden. Die Tatsache, dass sich Hypericin selektiv in Tumorgeweben anzureichern scheint (Chen et al., 2001), unterstützt diesen Ansatz. So konnte erst kürzlich an fünf Patienten mit malignen Gliomen gezeigt werden, dass operative Tumoresektionen mit Hypericin als Fluoreszenzmarker eine hohe Spezifität erreichen können (Ritz et al., 2012).

4.1.3 Prenylierte Phloroglucinolderivate

In vielen Pflanzen können prenylierte Phloroglucinolderivate gefunden werden. Es wird vermutet, dass sie eine Rolle als Abschreckung von Herbivoren wahrnehmen, wie die Hopfenbitterstoffe in *Humulus lupulus* oder die Hypercaline (Abb. 8) in *H. calycinum*. Aber auch die häufig auftretende Eigenschaft UV-Licht der Wellenlängen zwischen 340 und 380 nm zu absorbieren und ein häufiges Vorkommen im Zentrum der offenen Blüte könnten ein Hinweis darauf sein, dass die prenylierten Phloroglucinolderivate auch der Anlockung potentieller Bestäuber dienen (Gronquist et al., 2001).

Zu der Klasse der prenylierten Phloroglucinolderivate gehören Verbindungen wie die Hopfenbitterstoffe (Humolone und Lupulone), die dem Bier seinen charakteristischen bitteren Geschmack verleihen (Hänsel und Sticher, 2007). Es konnten aber, neben dieser praktischen Anwendung als Geschmackskomponente, weitere Effekte gefunden werden, die pharmakologisch sehr interessant sind. Humulon und Xanthohumol konnten in *in vitro* Versuchen den Abbau von Knochenmasse durch Osteoklasten verringern (Tobe et al., 1997). Prenylierte Phloroglucinolderivate aus *Hypericum empetrifolium* sowie *Melicope ptelefolia* zeigten antiinflammatorische Aktivität durch Hemmung von Cyclooxygenasen (COX) und 5-Lipoxygenase (5-LOX) in Untersuchungen an den isolierten Enzymen (Crockett et al., 2008; Shaari et al., 2011). Es konnten antimikrobielle Wirkungen für prenylierte Phloroglucinolderivate nachgewiesen werden, so zeigen zum Beispiel Verbindungen aus *Hypericum yojiroanum* Aktivität gegen Pilze, u.a. *Aspergillus niger* und *Candida albicans* (Tanaka et al., 2011). Ebenfalls weist Garcinol (Abb. 8), eine Verbindung aus *Garcinia purpurea*, antimikrobielle Eigenschaften gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme auf (Iinuma et al., 1996). Garcinol zeigt auch eine Dosis-abhängige Induktion von



Apoptose in isolierten, menschlichen Leukämie-Zellen der Linie HL-60 (Pan et al., 2001), während Humulon in Versuchen an Colon-Karzinomzellen der Maus (Co26) die Tumorangio-genese inhibierte (Shimamura et al., 2001).

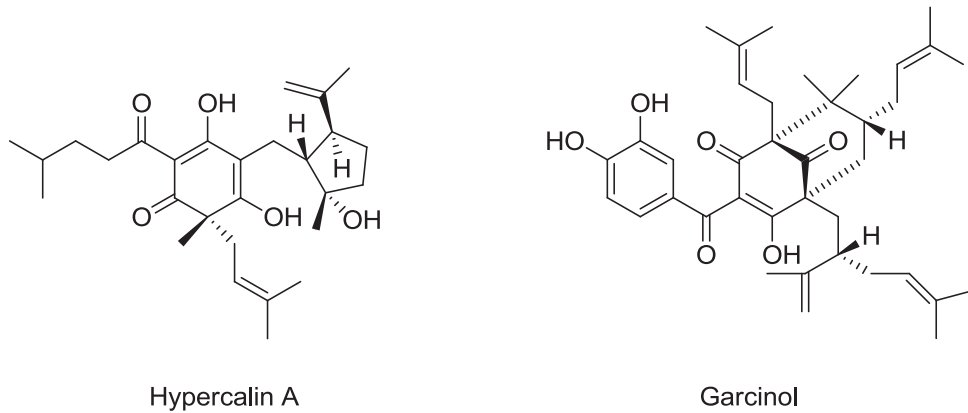


Abb. 8 Prenylierte Phloroglucinderivate: Hypercalin A aus *Hypericum calycinum*, Garcinol aus *Garcinia purpurea*

Phloroglucinderivate machen in *H. perforatum* 2-4 % aus (Hänsel und Sticher, 2007), darunter vor allem Hyperforin und Adhyperforin (Abb. 9), aber auch deren postulierte Vorstufen, Hyperfirin und Adhyperfirin, konnten detektiert werden (Tatsis et al., 2007). Vor allem Hyperforin ist aufgrund seiner vielseitigen pharmakologischen Eigenschaften in den letzten Jahren in den Fokus vieler Untersuchungen gerückt (Medina et al., 2006). Da vor allem Hyperforin in dieser Arbeit im Fokus steht, wird diesem Molekül an späterer Stelle noch ein eigenes Kapitel gewidmet (I.5).

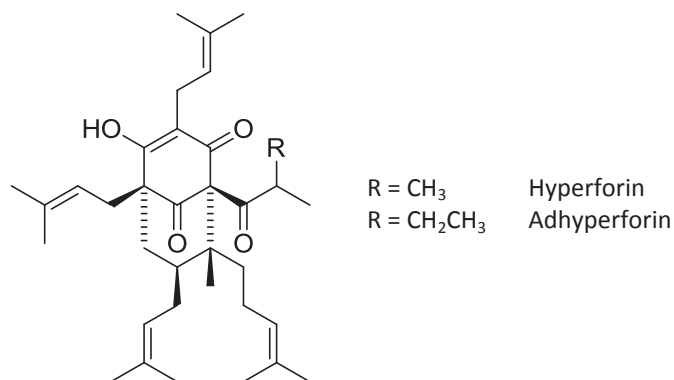


Abb. 9 Phloroglucinderivate in *Hypericum perforatum*



4.1.4 Xanthone

Xanthone (Abb. 10) sind Sekundärstoffe, die aus einem Dreiringssystem bestehen, das neben einem Sauerstoffatom auch eine Carbonylfunktion im mittleren Ring aufweist. Die Verbindungen stellen also Dibenzo- γ -pyrone dar. Vor allem in den Familien Gentianaceae und Hypericaceae wurden Xanthone gefunden und identifiziert (Beerhues und Berger, 1995).

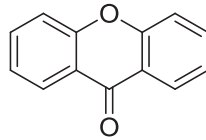


Abb. 10 Grundkörper der Xanthone

Die Biosynthese der Xanthone (Abb. 11) wurde in Zellsuspensionskulturen von *Centaurium erythraea* sowie von *Hypericum androsaemum* biochemisch aufgeklärt. Ausgehend von 3'-Hydroxybenzoesäure oder Benzoesäure wird durch die Benzophenonsynthese (eine Typ-III-Polyketidsynthese) ein Benzophenon gebildet, welches nun entweder direkt oder nach einer zusätzlichen Hydroxylierung mittels der Xanthon-Synthase zu einem Xanthon zyklisiert wird. Anschließend können noch weitere Modifikationen an dem Molekül eingefügt werden. Die betreffende Hydroxylase sowie die Xanthon-Synthase sind Enzyme vom Typ Cytochrom P450 (Schmidt und Beerhues, 1997; Peters et al., 1998).

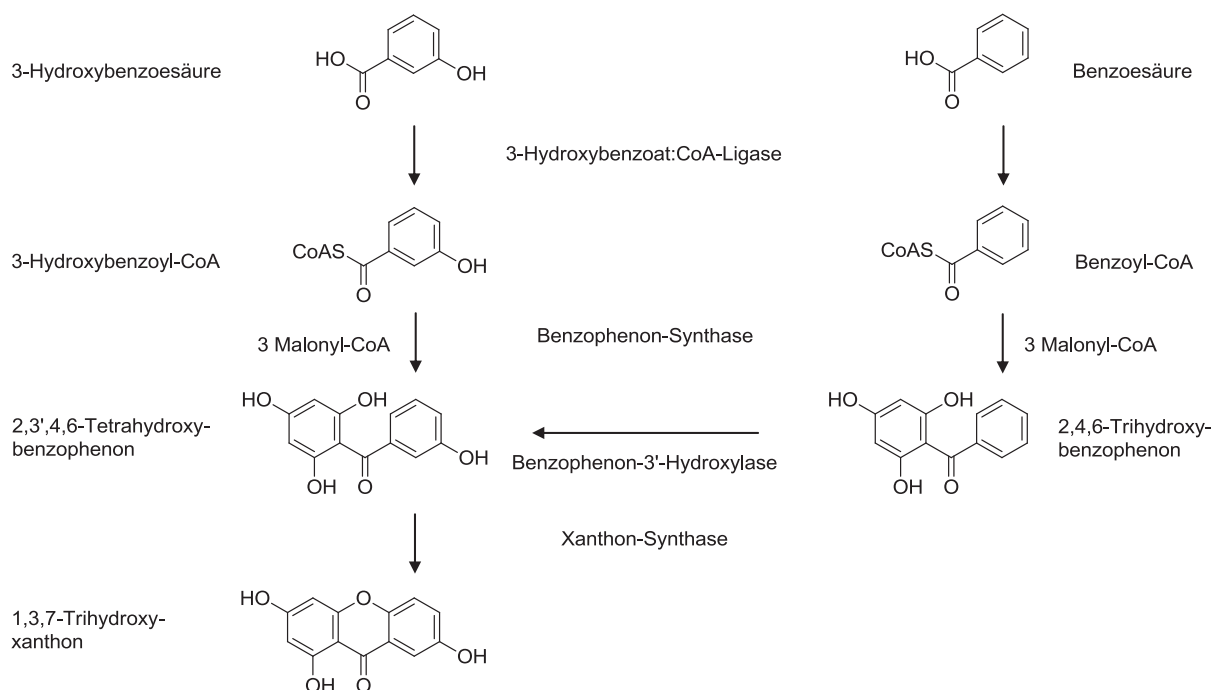


Abb. 11 Postulierte Biosynthese der Xanthone nach Schmidt und Beerhues (1997)



Es wird vermutet, dass Xanthone eine Rolle in der pflanzlichen Abwehr gegen Mikroorganismen spielen (Crockett et al., 2011). Diese These wird durch die Tatsache gestützt, dass Zell- oder Wurzelkulturen Xanthon-produzierender Pflanzen nach Exposition mit Mikroorganismen, Hefeextrakt, Methyljasmonat oder Chitosan ihre Xanthonsynthese induzieren (Beerhues und Berger, 1995; Franklin et al., 2009; Tocci et al., 2011).

Verschiedene pharmakologische Aktivitäten konnten bei der Untersuchung von Xanthonen nachgewiesen werden. Dazu zählen antimikrobielle Aktivität gegen grampositive und gramnegative Bakterien, auch Methicillin-resistente Staphylococcen, einige pathogene Pilze (Saeed et al., 1998; Dharmaratne et al., 2002) sowie einen Stamm von *Mycobacterium tuberculosis*, dem Erreger der Tuberkulose (Suksamrarn et al., 2003). Es konnte Aktivität von Xanthonen gegen einen Chloroquin-resistenten *Plasmodium falciparum*-Stamm gezeigt werden. *Plasmodium falciparum* ist der Erreger der Malaria tropica und die steigende Zahl von Resistenzen erhöht die Dringlichkeit einer Suche nach neuen Arzneistoffen (Hay et al., 2004). In einem primären Anti-HIV-Screening konnte für einige prenylierte Xanthone aus *Maclura tinctoria* Aktivität nachgewiesen werden, allerdings waren diese Verbindungen auch toxisch gegen die benutzten Wirtszellen (Groweiss et al., 2000). Cytotoxische Wirkungen gegen vier Linien von Krebszellen konnte für Formoxanthon C gezeigt werden, aber auch Xanthon V₁ und Gerontoxanthon I waren in diesem Versuch cytotoxisch, wenn auch in zum Teil höheren Konzentrationen (Boonsri et al., 2006).

Diverse Xanthone zeigen antioxidative Eigenschaften (Ashida et al., 1994; Franklin et al., 2009) sowie cardioprotektive Effekte, für die vermutlich u.a. das antioxidative Potential verantwortlich ist (Jiang et al., 2004). Aber auch die antientzündlichen Effekte von Xanthonen könnten hier von Bedeutung sein (Jiang et al., 2004), wie zum Beispiel die Fähigkeit 5-LOX und die beiden Cyclooxygenasen, COX1 und 2, zu hemmen (Crockett et al., 2011).

In *H. perforatum* liegen Xanthone nur in einer sehr geringen Menge vor, können allerdings hochreguliert werden. Dabei lassen sich *in vivo* 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und Mangiferin nachweisen (Hänsel und Sticher, 2007), in *in vitro*-Systemen werden auch weitere Xanthone gebildet. Diese vermehrte und neue Bildung von Xanthonen geschieht bei Befall der Pflanze durch Mikroorganismen und kann auch in Zell- und Wurzelkulturen durch Agrobakterien oder Methyljasmonat stimuliert werden (Franklin et al., 2009; Tocci et al., 2011).

Suzuki et al. (1981) konnten feststellen, dass einige Xanthone potente Inhibitoren beider Isoformen der Monoaminoxidase (MAO) sind. Da Hemmer der Monoaminoxidase auch in der Behandlung der Depression eingesetzt werden, könnte man vermuten, dass die Xanthone in *H. perforatum* einen Anteil an der antidepressiven Wirkung haben. Hierbei darf man allerdings nicht außer Acht lassen, dass Xanthone in *H. perforatum* hauptsächlich in den Wurzeln vorkommen. Für die Herstellung der verwendeten, wirksamen Extrakte wird allerdings ausschließlich das Kraut eingesetzt, das nur aus oberirdischen Pflanzenteilen besteht (Greeson et al., 2001).



4.1.5 Weitere Inhaltsstoffe

Neben den genannten Inhaltsstoffen findet man weitere, wie Procyanidine und Catechingerbstoffe, die einen Gehalt von bis zu 15 % aufweisen können. Außerdem enthält Johanniskraut Bisanthrachinonglycoside, ätherisches Öl, Chinasäurederivate und Phenolcarbonsäuren (Hänsel und Sticher, 2007).

4.2 Inhaltsstoffe von *Hypericum calycinum* L.

In *H. calycinum* wurden neben Flavonoiden und Xanthonen flüchtige Verbindungen gefunden, von denen, je nach Standort, entweder α - und β -Pinen oder α -Humulen und Germacren D den höchsten Gehalt aufwiesen (Erken et al., 2001; Maggi et al., 2010). Außerdem kommen Anthranoide und Phloroglucinol-Derivate vor.

In Zellkulturen von *H. calycinum* konnten Hyperforin und Adhyperforin nachgewiesen werden (Klingauf et al., 2005). Auch die Bildung eines prenylierten Xanthons nach Elicitor-Induktion wurde beobachtet (Gaid et al., 2012).

5 Hyperforin

Hyperforin ist ein prenyliertes Phloroglucinol-Derivat, welches in einem stärkeren Ausmaß in den Blüten als in den grünen Teilen der Pflanze *H. perforatum* akkumuliert wird (Umek et al., 1999). In den Blüten steigt die Konzentration im Verlauf der Entwicklung an und erreicht ihr Maximum in unreifen Früchten, wo der Gehalt bis zu 8,5 % des Trockengewichts ausmachen kann (Tekel'ova et al., 2000). Bei Untersuchungen der Blätter von *H. perforatum* konnte festgestellt werden, dass sich Hyperforin fast ausschließlich in den durchscheinenden schizogenen Ölbehältern finden lässt. Da die Produktion des ätherischen Öls vermutlich in den sezernierenden Zellen dieser Ölbehälter stattfindet, wird auch vermutet, dass sich die Hyperforinsynthese dort abspielt. Die Prenylreste des Hyperforinmoleküls sind ebenfalls Produkte des Terpenstoffwechsels, aus dem auch das ätherische Öl hervorgeht (Soelberg et al., 2007). Untersuchungen an *Hypericum elodes* lassen vermuten, dass in den Blüten Hyperforin in durchscheinenden Kanälen akkumuliert wird, analog zu den durchscheinenden Ölbehältern der vegetativen Blätter, dies könnte auch der Fall für *H. perforatum* sein (Piovan et al., 2004).

5.1 Die Pharmakologie von Hyperforin

Bei Versuchen die verschiedenen pharmakologischen Aktivitäten von Johanniskrautextrakten aufzuklären zeigt sich, dass Hyperforin, wenn auch nicht immer ausschließlich, eine zentrale Rolle einnimmt. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle noch einmal detaillierter auf die Pharmakologie eingegangen werden.



5.1.1 Antibakterielle Eigenschaften

Es konnte gezeigt werden, dass Hyperforin antibakterielle Eigenschaften gegen grampositive Bakterien zeigt, unter anderem auch gegen *Staphylococcus aureus*-Stämme, die Resistenzen gegenüber Penicillin oder Methicillin aufweisen. Diese Beobachtung könnte die traditionelle Anwendung von Johanniskrautextrakten bei der Behandlung von Verletzungen und Verbrennungen der Haut erklären. Keine Wirkung konnte beobachtet werden bei Tests von Hyperforin an gramnegativen Bakterien oder *Candida albicans* (Gurevich et al., 1971; Schempp et al., 1999).

5.1.2 Antitumorale Eigenschaften

Untersuchungen an verschiedenen Tumorzelllinien aus Ratten und Menschen *in vitro* konnten zeigen, dass Hyperforin das Wachstum dieser hemmt. Auch *in vivo*, in tumorinfizierten Ratten, konnte dies beobachtet werden. Diese Wachstumshemmung scheint durch Induktion der Apoptose über den mitochondrialen Weg eingeleitet zu werden, wobei die gefundene Menge von Apoptose-typischen Faktoren proportional der Hyperforindosis ist (Schempp et al., 2002; Hostanska et al., 2003). Auch Invasion und Metastasierung von Tumorzelllinien konnten durch eine Hyperforingabe, welche unter der cytotoxischen Konzentration lag, verringert werden, *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell (Donà et al., 2004). Trotz dieser positiven Befunde muss beachtet werden, dass die Induktion von Enzymen des Xenobiotikastoffwechsels durch Hyperforin zu einer Reduktion der Plasmakonzentration co-applizierter Zytostatika führen und deren Wirkung verringern kann. Im schlimmsten Fall kommt es zu einem lebensbedrohlichen Therapieversagen (Mathijssen et al., 2002).

5.1.3 Antientzündliche Eigenschaften

Hyperforin zeigt inhibitorische Eigenschaften auf isolierte Cyclooxygenase-1 und 5-Lipoxygenase sowie auf deren Aktivität in intakten Thrombozyten bzw. Leukozyten. Somit wird die Bildung von proinflammatorischen Eicosanoiden verringert (Albert et al., 2002). Diese antientzündlichen Effekte könnten einen Anteil an der Wirksamkeit von Hyperforin bei der Behandlung der atopischen Dermatitis haben, welche in einer Studie mit Pilotcharakter nachgewiesen werden konnte (Schempp et al., 2003).

5.1.4 Antiproliferative Eigenschaften

Psoriasis zeichnet sich durch schuppige Haut und Entzündungen aus, begleitet von einer erhöhten Proliferation und einer verringerten Differenzierung der Keratinozyten. Es scheint als sei das mangelnde Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung auf einen gestörten Ca^{2+} -Einstrom in die Keratinozyten zurückzuführen. Diese Störung geht mit einer verminderten Expression von unselektiven Kationen-Kanälen vom Typ TRPC (u.a. TRPC 6)



einher, deren geringere Expression das Ausbleiben des die Differenzierung stimulierenden Ca^{2+} -Einstroms erklären könnte (Tu et al., 2004; Leuner et al., 2011). Hyperforin aktiviert spezifisch TRPC6, was zu einer Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms in die Keratinozyten führt und deren übermäßige Proliferation hemmt sowie deren Differenzierung anregt. In Verbindung mit den antientzündlichen Wirkungen (I.5.1.4) kann auch dieser Effekt von Hyperforin als möglicher Behandlungsansatz bei Psoriasis oder atopischer Dermatitis gesehen werden (Müller et al., 2008; Leuner et al., 2011).

5.1.5 Antidepressive Wirksamkeit

Obwohl die Wirksamkeit von Johanniskrautpräparaten bei Depressionen durch klinische Studien belegt werden konnte (Linde et al., 2008), ist bis heute nicht abschließend geklärt, welcher Inhaltsstoff für diese Wirkung verantwortlich ist. Es ist sogar eher davon auszugehen, dass es das Zusammenspiel unterschiedlicher Inhaltsstoffe ist. Somit ist der Gesamtextrakt als der Wirkstoff anzusehen (Butterweck und Schmidt, 2007). Dennoch konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass Hyperforin einen entscheidenden Anteil an dieser Wirkung hat (Chatterjee et al., 1998; Müller et al., 1998; Müller, 2003). Bekräftigt wurde dies durch die Entdeckung eines Mechanismus, über den sich die Hyperforinwirkung erklären lassen kann (Leuner et al., 2007).

Johanniskrautextrakte erhöhen wie synthetische Antidepressiva die Konzentration von Neurotransmittern im synaptischen Spalt. Es konnte für Hyperforin gezeigt werden, dass dieses zu einer Konzentrationserhöhung der Monoamine durch deren Wiederaufnahmehemmung führt. Im Gegensatz zu den SSRIs und TCAs wird im Fall von Hyperforin der verantwortliche Transporter nicht direkt gehemmt, sondern es werden unselektive Kationenkanäle vom Typ TRPC6 aktiviert (Abb. 12). Diese Aktivierung führt zu einem Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in die Zelle und verringert dadurch den Na^+ -Gradienten, der die treibende Kraft hinter der Wiederaufnahme der Neurotransmitter ist (Singer et al., 1999; Leuner et al., 2007). Somit wird im Fall des Hyperforins die Monoaminwiederaufnahme unselektiv gehemmt und betrifft neben Serotonin und Noradrenalin auch Dopamin, Glutamin und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) (Chatterjee et al., 1998). Mit dem Verlauf der Therapie kommt es zu adaptiven Veränderungen, wie einer Verringerung der β -Rezeptordichte sowie einer Erhöhung der 5-HT₂-Rezeptordichte. Solche Effekte können zum Teil auch bei der Therapie mit synthetischen Antidepressiva oder unter elektrokonvulsiver Therapie, der letzten Behandlungsoption antidepressiver Therapie, beobachtet werden. Es wird vermutet, dass diese Änderungen ein wichtiger Aspekt des Mechanismus antidepressiver Therapie sind (Müller, 2003).

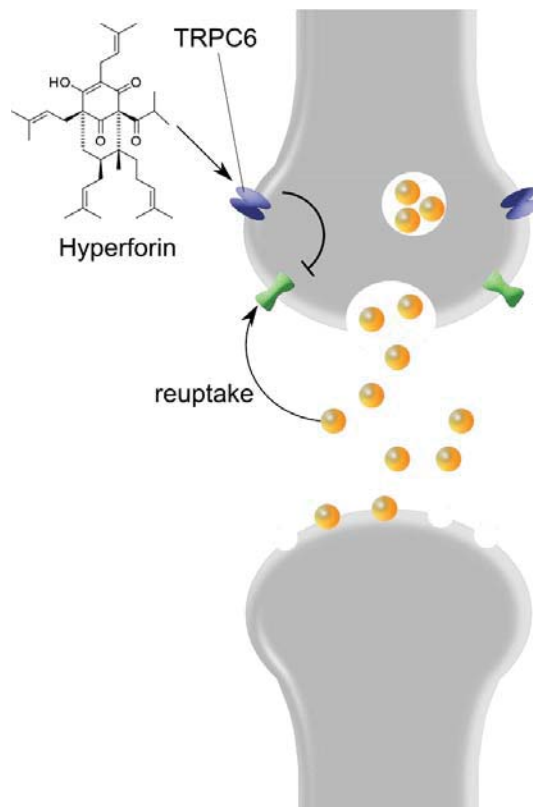


Abb. 12 Wiederaufnahmehemmung („reuptake inhibition“) von Neurotransmittern durch Hyperforin

Vor kurzem wurde die These aufgestellt, dass Hyperforin auch über Imitation der Funktion des „Brain-Derived Neurotrophic Factor“ (BDNF) wirken könnte, welcher morphologische Änderungen der dendritischen Dornen verursacht. Bei depressiven Patienten ist die Menge an BDNF im Hippocampus verringert, dessen Wiederanstieg man während der Therapie mit Antidepressiva beobachten konnte. Es wird angenommen, dass die unter Antidepressiva erhöhte Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt zu einer vermehrten Rezeptorenaktivierung führt, die u.a. die vermehrte Transkription des BDNF-Gens induziert. Vermutlich sind die von BDNF induzierten Änderungen der finale Wirkmechanismus von Antidepressiva. BDNF agiert durch eine Aktivierung von TRPC3-Kanälen, wobei es zu einem Einstrom von Ca^{2+} in die Synapse kommt. Auch nach Aktivierung von TRPC6 durch Hyperforin kommt es zu einem Einstrom von Ca^{2+} und somit zu den erwähnten morphologischen Änderungen (Leuner et al., 2012).



5.2 Biosynthese von Hyperforin

Obwohl die vollständige Struktur von Hyperforin seit den siebziger Jahren bekannt ist (Gurevich et al., 1971; Bystrov et al., 1975), ist es bisher nicht gelungen das Molekül zu synthetisieren (Nicolaou et al., 2005; Mehta und Bera, 2009). Auch ein Syntheseversuch von Shimizu et al. (2010), der zu ent-Hyperforin (Abb. 13) führte, resultierte nicht in der exakten Stereochemie und umfasste zudem eine Vielzahl von Syntheseschritten.

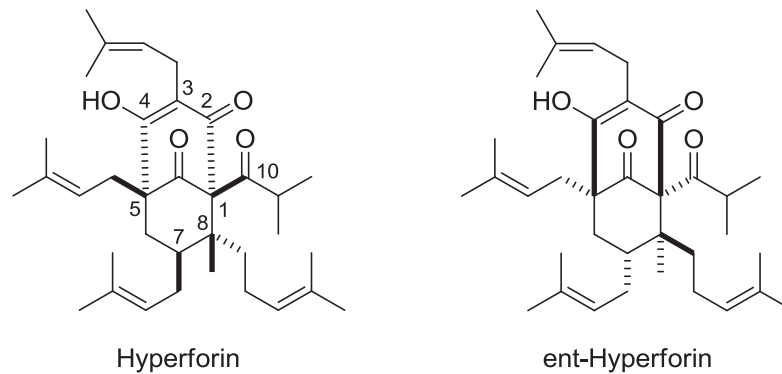


Abb. 13 Hyperforin und ent-Hyperforin nach Shimizu et al. (2010)

Der postulierte Biosyntheseweg (Abb. 14) geht von einem Molekül Isobutyryl-CoA und drei Molekülen Malonyl-CoA aus. Dabei wird Isobutyryl-CoA aus der Aminosäure Valin gebildet (Adam et al., 2002; Karppinen et al., 2007). Die Startermoleküle werden nun durch eine Polyketidsynthese vom Typ III (Isobutyrophenonsynthase) kondensiert und bilden Phlorisobutyrophenon (Klingauf et al., 2005). Dieses Grundgerüst wird nun zweimal mit Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) prenyliert, wobei der erste Prenylierungsschritt bereits in Zellkulturen von *Hypericum calycinum* nachgewiesen werden konnte (Boubakir et al., 2005). Anschließend folgt eine Prenylierung mit Geranylpyrophosphat (GPP) sowie eine letzte Prenylierung mit DMAPP, wobei es zu einem intramolekularen Ringschluss kommt (Beerhues, 2006). Die Isopreneinheiten, die in den Prenylierungsschritten verwendet werden, stammen aus dem Desoxyxylulosephosphat-Weg (Adam et al., 2002).

Der Ringschluss wurde mechanistisch durch einen elektrophilen Angriff von DMAPP auf die Doppelbindungselektronen des Geranyl-Restes erklärt, welcher die Ausbildung des zweiten Ringes katalysiert (Adam et al., 2002; Beerhues, 2006). Seit der kürzlichen Entdeckung von Hyperforin, dem der Isoprenrest an C7 fehlt, ergab sich die These, dass der Ringschluss bereits bei der Prenylierung mit GPP stattfinden könnte und Hyperforin anschließend mit DMAPP prenyliert würde (Tatsis et al., 2007). Allerdings könnte diese Struktur auch parallel zum Hyperforin gebildet werden.

Die vier Prenylierungen werden durch spezifische Enzyme katalysiert, sogenannte aromatische Prenyltransferasen. Von diesen konnte noch keine auf cDNA-Ebene identifiziert werden und nur die erste wurde biochemisch in Zellsuspensionskulturen von *H. calycinum* charakterisiert (Boubakir et al., 2005). Die genaue Betrachtung von Prenyltransferasen



erfolgt in Kombination mit den Ergebnissen dieser Arbeit im Verlauf des Kapitels „Diskussion“ (V.1).

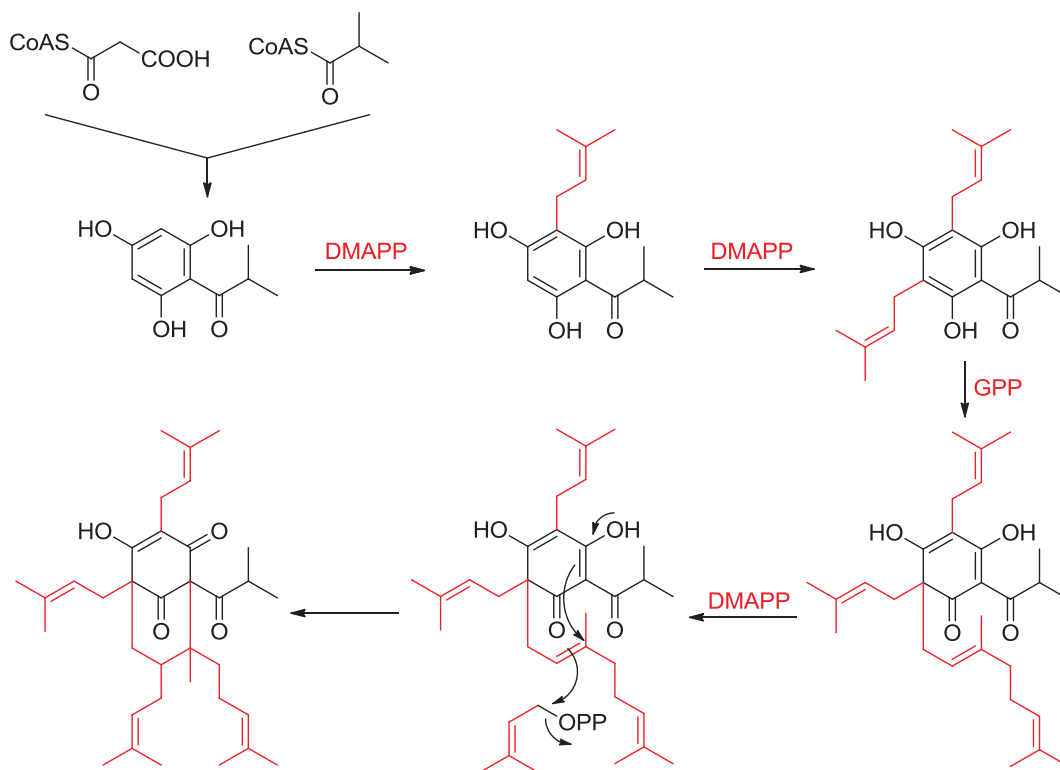


Abb. 14 Postulierte Biosynthese von Hyperforin nach Beerhues (2006)

6 Ziel der Arbeit

Hyperforin hat sich aus pharmakologischer Sicht als eine interessante Struktur erwiesen, deren Synthese auf chemischem Weg bisher noch nicht gelungen ist. Es liegt deswegen nahe einen biotechnologischen Ansatz für die Gewinnung zu verfolgen. Ein entscheidender Teil dieser Strategie ist die molekulare Identifikation der aromatischen Prenyltransferasen aus *H. perforatum*. Mit diesem Wissen wäre es möglich, die Enzyme heterolog zu exprimieren und gezielt zu nutzen, um Hyperforin zu synthetisieren. Des Weiteren wären Modifikationen von Hyperforin durch Kombination von Prenyltransferasen aus *H. perforatum* mit Prenyltransferasen aus anderen *Hypericum*-Arten denkbar. Solche Modifikationen wären äußerst interessant um Moleküle zu gewinnen, die womöglich veränderte Wirkungen oder ein günstigeres Interaktionspotential aufweisen könnten (Di Carlo et al., 2001). So ist es zum Beispiel gelungen durch eine chemische Zweischritt-Synthese Aristoforin (*O*-Carboxymethylhyperforin) aus isoliertem Hyperforin zu gewinnen, welches eine verbesserte



Löslichkeit und Stabilität als Hyperforin aufweist und im Tiermodell vergleichbare antitumorale Eigenschaften besitzt (Gartner et al., 2005).

Zu Beginn dieser Arbeit lag in unserem Arbeitskreis bereits ein cDNA-Fragment einer putativen Prenyltransferase aus *H. perforatum* vor, dessen 5'-Ende aber noch nicht identifiziert werden konnte (Kühle, 2009) und das im weiteren Verlauf als Fragment A bezeichnet wird. Somit war das erste Ziel dieser Arbeit der Versuch, das Fragment A zu vervollständigen.

Des Weiteren sollte versucht werden, weitere Prenyltransferase-cDNAs, auch aus anderen *Hypericum*-Arten, zu identifizieren und zu charakterisieren. Dies würde zusätzliche Aufschlüsse über die Struktur und Funktion von aromatischen Prenyltransferasen des Sekundärstoffwechsels der Gattung *Hypericum* geben und auch wichtige Anhaltspunkte für die Suche nach Prenyltransferasen der Hyperforinbiosynthese liefern. Darüber hinaus sind solche Enzyme natürlich auch interessante Kandidaten für Kombinationen von Prenyltransferasen, um neue Strukturen biotechnologisch herzustellen.