

Lehrstuhl für Phytopathologie
der Technischen Universität München

**Selektion von Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.)
anhand biochemischer Testsysteme**

Dipl.-Ing. agr. (Univ.) Elke Mann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten
Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. B. Hock
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. F. Elstner
2. Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann

Die Dissertation wurde am 28.8.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 07.11.2003 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
1	JOHANNISKRAUT BEI DER BEHANDLUNG VON DEPRESSION	1
1.1	DEPRESSION: DEFINITION UND MÖGLICHE URSACHEN	1
1.2	WIRKUNG VON JOHANNISKRAUT	2
2	CHARAKTERISIERUNG DER PFLANZE	3
2.1	BOTANIK	3
2.2	INDIKATIONSBEREICHE	3
2.3	INHALTSSTOFFE	4
3	<i>HYPERICUM</i>-ZÜCHTUNG	7
3.1	ZUCHTZIELE	7
3.2	SELEKTIONSKRITERIEN UND ZÜCHTUNGSVERFAHREN	7
4	ZIELE DER ARBEIT	8
II	MATERIAL UND METHODEN	10
1	MATERIAL	10
1.1	CHEMIKALIEN	10
1.2	JOHANNISKRAUTEXTRAKTE	11
1.3	JOHANNISKRAUTSAMEN	11
1.4	PUFFER, REAGENZIEEN UND DEREN HERSTELLUNG	12
1.5	ANALYSENGERÄTE	13
2	METHODEN	15
2.1	VERSUCHSAUFBAU	15
2.2	FELDVERSUCHE	15
2.2.1	Anzucht, Pflanzung und Kulturmaßnahmen	16
2.2.2	Bonitur der morphologischen Pflanzenmerkmale	18
2.2.3	Ernte	19
2.3	ZUSAMMENSTELLUNG, BEZEICHNUNG UND HERSTELLUNG DER EXTRAKTE	23
2.3.1	Extraktzusammenstellung und Bezeichnung	23
2.3.2	Vorversuch zur Extrakterstellung	24
2.3.3	Herstellung der Extrakte aus dem geernteten Pflanzenmaterial	24
2.4	ANALYTIK DER INHALTSSTOFFE	25
2.5	BIOCHEMISCHE MODELLREAKTIONEN	26
2.5.1	POD-katalysierte Dimerisierung von L-Tyrosin	26
2.5.2	Oxidation der Indoleessigsäure durch POD (IAA-Oxidation)	28
2.5.3	Dopamin- β -Hydroxylase (D- β -H)	29
2.5.4	LDL-Oxidation als Modell für die Lipidperoxidation	31
2.5.4.1	LDL-Präparation	31
2.5.4.2	Cu(II)-induzierte LDL-Oxidation	33
2.5.4.2.1	Bildung konjugierter Diene während der Lipidperoxidation (Dienkonjugation)	33
2.5.4.2.2	Tryptophanfluoreszenz	35
2.5.4.3	LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale	36
2.5.5	Auswertung der Meßergebnisse	38
2.6	SELEKTIONSKRITERIEN UND BEWERTUNG DER JOHANNISKRAUTYPEN	38
2.6.1	Selektionskriterien der agronomischen Merkmale	38
2.6.2	Selektionskriterien der pharmakologischen Merkmale	39
2.6.3	Gesamtbeurteilung	39

1	VERSUCHSJAHR 1999	40
1.1	ERGEBNISSE DES FELDANBAUS	40
1.1.1	Morphologische Charakterisierung der <i>Hypericum</i> -Phänotypen	40
1.1.2	Ertragsparameter	43
1.2	ERGEBNISSE DER PHARMAKOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN	45
1.2.1	Inhaltsstoffanalytik	45
1.2.2	Vergleich der Wirksamkeit der verschiedenen Phänotypen in biochemischen Testsystemen	48
1.2.2.1	POD-katalysierte Dimerisierung von L-Tyrosin	48
1.2.2.1.1	Versuchsreihe zur Maceration von <i>Hypericum</i> -Droge	49
1.2.2.1.2	<i>Hypericum</i> -Extrakte des Feldanbaus 1999	55
1.2.2.1.3	Einzelsubstanzen	60
1.2.2.2	IAA-Oxidation durch POD	63
1.2.2.3	Dopamin- β -Hydroxylase (D- β -H)	66
1.2.2.4	Cu(II)-induzierte LDL-Oxidation: Dienkonjugation	69
1.2.2.5	LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale	71
1.2.2.5.1	Systementwicklung	71
1.2.2.5.2	weitere Untersuchungen und Kontrollen des Systems	75
1.2.2.5.3	Extrakte des Jahres 1999 im Test	80
2	VERSUCHSJAHRE 2000/2001	82
2.1	ERGEBNISSE DES FELDANBAUS	82
2.1.1	Morphologische Charakterisierung der <i>Hypericum</i> -Phänotypen	82
2.1.1.1	Sorten und Eliteselektionen	82
2.1.1.2	Abweichende Phänotypen aus den Sorten	86
2.1.1.3	Eigenselektionen	88
2.1.2	Ertragsparameter	91
2.1.2.1	Sorten und Eliteselektionen	91
2.1.2.2	Eigenselektionen	93
2.1.3	Anfälligkeit gegenüber <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	96
2.2	ERGEBNISSE DER PHARMAKOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN	97
2.2.1	Zusammensetzung der Extrakte	98
2.2.2	Inhaltsstoffanalyse	99
2.2.2.1	Anbaujahr 2000	99
2.2.2.2	Anbaujahr 2001	101
2.2.3	Vergleich der Sorten, Eliteselektionen und Eigenselektionen in verschiedenen biochemischen Testsystemen	104
2.2.3.1	Peroxidase - katalysierte Dimerisierung von L-Tyrosin	104
2.2.3.1.1	Ergebnisse der Extrakte des Anbaujahres 2000	104
2.2.3.1.2	Ergebnisse der Extrakte des Anbaujahres 2001	110
2.2.3.2	Cu(II)-induzierte LDL-Oxidation	116
2.2.3.2.1	Dienkonjugation	116
2.2.3.2.2	Tryptophanfluoreszenz	118
2.2.3.3	LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale	120

IV DISKUSSION

1	ANBAUVERSUCHE	125
2	ANALYTIK	127
2.1	INHALTSSTOFFE	127
2.2	BIOCHEMISCHE TESTSYSTEME	130
2.2.1	POD-katalysierte Dimerisierung von L-Tyrosin	130
2.2.2	Indolessigsäure (IAA) -Oxidation	132

2.2.3	Dopamin- β -Hydroxylase (D- β -H)	134
2.2.4	Cu(II)-induzierte LDL-Oxidation	135
2.2.5	LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale	138
3	BEWERTUNG DER JOHANNISKRAUTHERKÜNFTE UND SELEKTIONEN	140
3.1	SORTEN UND ELITSELEKTIONEN	140
3.1.1	‘Taubertal’	141
3.1.2	‘Topaz’	141
3.1.3	SN	142
3.1.4	Goldstern	143
3.1.5	NLC	144
3.2	EIGENSELEKTIONEN	145
4	FAZIT UND AUSBLICK	147
V ZUSAMMENFASSUNG		148
VI LITERATUR		150
ANHANG		164

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
DAC	Deutscher Arzneimittel-Codex
D- β -H	Dopamin- β -Hydroxylase
Em	Emission
Ex	Excitation
Fr	Fruchtknoten
FS	Frischsubstanz
GR	Grundreaktion
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
i.A.	im Ansatz
IAA	Indolessigsäure
LDL	low density lipoprotein
MAO	Monoaminoxidase
mAU	milli Absorbance Units
MPO	Myeloperoxidase
N _{min}	mineralischer Stickstoff
PBS	phosphate buffered saline
POD	Meerrettich-Peroxidase
RT	Retentionszeit
rlu	relative light units
s.	siehe
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TS	Trockensubstanz
Tyr	Tyrosin
U	Units
UV	ultraviolett

Abkürzungen der Johanniskrautsorten und -herkünfte:

s. Material und Methoden 2.2.1 Tab. 3

I EINLEITUNG

1 JOHANNISKRAUT BEI DER BEHANDLUNG VON DEPRESSION

Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) spielt eine zentrale Rolle in der Phytotherapie von leichten bis mittelschweren Depressionen und psychovegetativen Störungen. In klinischen Studien konnte die antidepressive Wirkung von *Hypericum perforatum* L., auch im Vergleich zu Standard-Antidepressiva, bereits nachgewiesen werden. Johanniskraut zeichnet sich allerdings gegenüber den synthetischen Mitteln durch eine wesentlich bessere Verträglichkeit und geringere Nebenwirkungen aus (LINDE ET AL., 1996; MILLER, 1998; WHEATLEY, 1998; KASPER, 2001; SCHULZ, 2002).

1.1 Depression: Definition und mögliche Ursachen

Die Depression wird allgemein als unspezifische Störung der Affektivität definiert, bei der ein depressives Syndrom im Vordergrund steht. Die vielfältigen Symptome auf psychischer, somatischer und psychosozialer Ebene erschweren häufig die Diagnose. Neben Angstzuständen, Freudlosigkeit und Schlafstörungen gehören Kreislaufstörungen, Atemenge, Leistungsabfall, Isolationsneigung und noch weitere Anzeichen zu dem Erscheinungsbild der Depression (PSCHYREMBEL, 1994).

Die genauen Auslöser, sowie die chemischen und zellulären Prozesse im Gehirn, die eine Depression verursachen, sind immer noch unklar. Verschiedene Hypothesen werden in diesem Zusammenhang diskutiert.

Eine mögliche Ursache ist der Mangel an dem Neurotransmitter 5-Hydroxytryptamin (Serotonin). Einige Antidepressiva können die Monoaminoxidase (MAO) hemmen und so den Abbau dieser Substanz verhindern. Die neuronale Wiederaufnahme von Serotonin wird durch tricyclische Antidepressiva unterbunden. Dies erhöht ebenfalls die Konzentration von Serotonin im Gehirn (COPER UND HELMCHEN, 1992).

Das Opiatsystem des Gehirns ist wesentlich am Empfinden und Befinden des Menschen beteiligt (STARKE UND PALM, 1992). Eine Störung des Opiathaushalts könnte daher negative psychische Auswirkungen zur Folge haben. HURD ET AL. (1997) fanden bei *post mortem*-Untersuchungen auf molekulargenetischer Ebene Hinweise auf eine Verbindung zwischen der Störung des Opiathaushalts und Depressionen. Die Enkephaline gehören zu den am opioden System beteiligten Stoffen. In einem Versuchsmodell für Depression (learned helplessness) an

Ratten konnte ein positiver Einfluß durch Enkephaline und Substanzen, die deren Abbau hemmen, festgestellt werden (TEJEDOR-REAL ET AL., 1995). Tests an Mäusen ließen wiederum einen Zusammenhang zwischen der schmerzlindernden Wirkung von tricyclischen Antidepressiva und dem opioiden System erkennen (VALVERDE ET AL., 1994).

Entzündungen im Gehirn und Lipidperoxidation scheinen ebenfalls eine Rolle bei Depressionen zu spielen, da bei depressiven Patienten die Lipidperoxidation gegenüber Gesunden erhöht ist (BILICI ET AL., 2001). Eine geringere Vitamin E-Konzentration im Serum bei depressiven Zuständen deutet ebenfalls auf oxidativen Streß hin und könnte mit einer erhöhten Lipidperoxidation in Verbindung stehen (MAES ET AL., 2000).

1.2 Wirkung von Johanniskraut

Die Einnahme sowohl von Johanniskrautpräparaten als auch von tricyclischen Antidepressiva muß mindestens 10 bis 14 Tage erfolgen, bis eine signifikante Wirkung eintritt. Die Anzahl der Serotonin-Rezeptoren erhöht sich bei einer längeren Verabreichungsdauer von *Hypericum* wie auch bei synthetischen Antidepressiva (TEUFEL-MAYER UND GLEITZ, 1997; MÜLLER ET AL., 1997). Johanniskrautextrakte zeigen einen hemmenden Einfluß sowohl auf die MAO-Aktivität (COTT, 1997) als auch auf die Wiederaufnahme von Serotonin (MÜLLER ET AL., 1997). RAFFA (1998) konnte die Bindung von Hypericin an Aufnahmerezeptoren nachweisen. Auch Hyperforin und Amentoflavon werden als Aufnahme-Inhibitoren angesehen (BAUREITHEL ET AL., 1997; CHATTERJEE ET AL., 1998). KLEBER ET AL. (1999) belegten, daß Hypericin den Abbau des Neurotransmitters Dopamin durch die Hemmung der Dopamin- β -Hydroxylase unterbindet. BUTTERWECK ET AL. (2000) konnten im „forced swimming test“ bei Ratten die Wirksamkeit flavonoidreicher Fraktionen von *Hypericum*-Extrakten nachweisen. Die Einzelsubstanzen Hyperosid und Isoquercitrin hatten in diesen Untersuchungen ebenfalls eine positive Wirkung. NÖLDNER UND SCHÖTZ (2002) identifizierten Rutin als essentiell für die Wirkung von Johanniskrautextrakten im „forced swimming test“.

Das exakte Wirkprinzip von Johanniskraut und die daran beteiligten Substanzen bleiben jedoch weiterhin unklar.

2 CHARAKTERISIERUNG DER PFLANZE

2.1 Botanik

Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.)

Ordnung: Theales (= Guttiferales)

Familie: Hypericaceae

Gattung: *Hypericum* (ca. 400 Arten)

Verbreitung: Europa – westliches Asien

Standorte: Wegränder, Wiesen, Trockenhänge und Ruderalflächen

Morphologie: ausdauernde, krautige und ausläuferbildende Pflanze

Höhe: bis ca. 1 m

Blatt: gegenständig, hell- bis braungrün, eiförmig-elliptisch, ganzrandig, kahl, durchscheinend punktiert (→ *perforatum*) aufgrund von lipidhaltigen, stark lichtbrechenden Exkretbehältern im Mesophyll

Stengel: hohl mit zwei hervortretenden Längsleisten (charakteristisch für die Art)

Blütenstand: traubig zusammengesetzte Trugdolden

Blüte: 5 gelbe Kronblätter

Blühbeginn: Ende Juni (24. Juni = Johannistag)

Sonstiges: lysigene Sekreträume (= Hypericinbehälter), die als dunkle Punktierung auf Petalen, Blättern und Stengel sichtbar sind

(HÖLZL UND OSTROWSKI, 1987; SCHNEIDER, 1990; WICHTL, 1997)

2.2 Indikationsbereiche

Die zur Vollblüte geernteten und getrockneten Triebspitzen werden als *Hyperici herba*, die offizielle Johanniskrautdroge, bezeichnet. Diese dient als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Tees und Arzneimitteln. Aber auch das frische, blühende Kraut kommt im medizinischen Bereich in Form von Arzneipräparaten zur Anwendung (BOMME, 1986; SCHNEIDER, 1990; WICHTL, 1997). Zur Standardisierung von Johanniskrautpräparaten wurde bis Mitte der 90er Jahre Hypericin als Leitsubstanz herangezogen, da es als die aktive Komponente von *Hypericum perforatum* L. angesehen wurde (DAC 1986, 3. Ergänzung 1991). Dies konnte jedoch nicht ausreichend nachgewiesen und abgesichert werden. Daher wird seit September 1995 auf das eingesetzte Trockengewicht standardisiert (BÜHLER, BfArM 1995).

Äußerliche Anwendung

Plinius d. Ä. (23 - 79 n. Chr.) erwähnte Johanniskraut bereits in seiner *Historia Naturalis* als Mittel gegen Verbrennungen (CZYGAN, 1993). *Hypericum* fördert äußerlich aufgetragen Heilungsprozesse nach leichten Verletzungen. Dabei kommt Johanniskraut als Johanniskrautöl (*Oleum hyperici*), auch Rotöl genannt, zum Einsatz. Zu dessen Herstellung werden frische Blüten in hochwertige Pflanzenöle eingelegt und an einem hellen Standort mehrere Wochen extrahiert (WICHTL, 1997).

Innere Anwendung/Einnahme

Johanniskrauttee wirkt nicht nur durch hohe Gehalte an Gerbstoffen als Antidiarrhoikum, sondern hat durch den hohen Gehalt an Flavonoiden auch einen diuretischen Effekt. Traditionell wird auch Bettnässen, Rheumatismus und Gicht damit behandelt (WICHTL, 1997).

Das Hauptanwendungsgebiet von Johanniskraut ist jedoch die Einnahme bei psychovegetativen Störungen. Seine beruhigende Wirkung spielte schon im Mittelalter bei der Inquisition von „Besessenen“ eine wichtige Rolle (CZYGAN, 1993). Die antidepressive Wirkung ist heute wissenschaftlich fundiert nachgewiesen.

2.3 Inhaltsstoffe

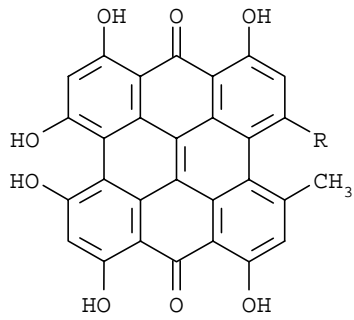
Hypericum perforatum L. besitzt ein arttypisches Spektrum an Inhaltsstoffen, von denen einige antidepressive Eigenschaften aufweisen sollen. Es ist bisher allerdings noch nicht eindeutig erforscht, welche Substanz als Hauptwirkstoff bezeichnet werden kann. Eine Übersicht über die pharmakologisch relevanten Substanzen von *Hypericum* geben Tab. 1 und Abb. 1.

Eine umfassende Übersicht zu Pharmakologie und Toxikologie von Johanniskraut ist bei KAUL (2000) zu finden.

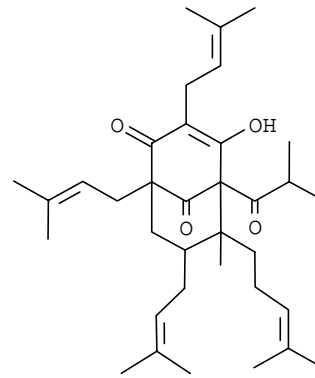
Tab. 1: Pharmakologisch relevante Inhaltsstoffe von Johanniskraut

<i>Stoffklasse</i>	<i>Substanz</i>	<i>Gehalt</i>	<i>Wirkung</i>	<i>Sonstiges</i>
Naphtho- dianthrachinone	Hypericin u. dessen Derivate	0,1-0,3%	antidepressiv (?) antiviral; photo- sensibilisierend	rot gefärbt; photodynamisch; führt bei Überdosierung zu Hautverbrennungen (→ Hypericismus)
Phloroglucinderivate	Hyperforin u. dessen Derivate	2-4%	antidepressiv (?) antibiotisch	nur in <i>H. perforatum</i> ; nicht lange in Extrakten haltbar; Ähnlichkeit mit beruhigend wirkenden Hopfenbitterstoffen
Flavonoide Flavonoid-Glykoside	Quercetin, Kämpferol, Luteolin Rutin, Hyperosid, Quercitrin, Isoquercitrin	2-4%	Antioxidantien; antidepressiv (?) diuretisch (= harntreibend)	
Biflavonoide	I3, I18- Biapigenin, Amentoflavon		antidepressiv (?)	selten; ähnliche Stoffe mit sedierender Wirkung in <i>Taxus baccata</i>
Gerbstoffe	Catechin- Gerbstoffe	6-15%	Antidiarrhoikum	
weitere Inhaltsstoffe: ätherische Öle, Kaffeesäure, Chlorogensäure, Xanthone, Procyanidine				

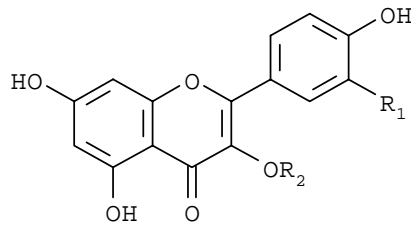
(NACH BERGHÖFER UND HÖLZL, 1986; BORS, 1987; HÖLZL, 1993; WICHTL, 1997)



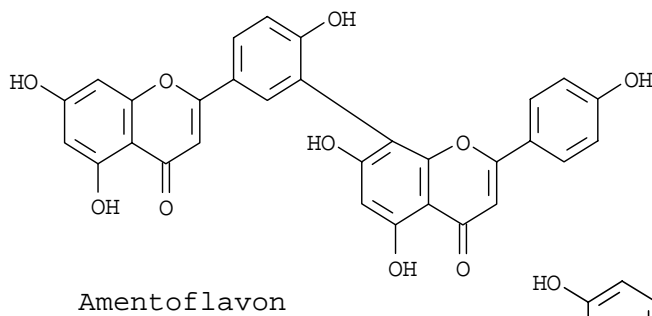
R = CH₃ = Hypericin
 R = CH₂OH = Pseudohypericin



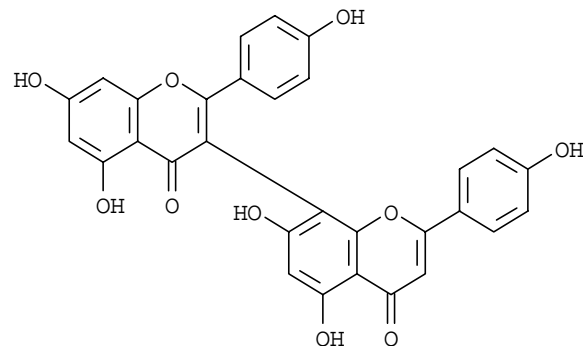
Hyperforin



R₁ = OH; R₂ = H = Quercetin
 R₁ = OH; R₂ = Galaktose = Hyperosid
 R₁ = OH; R₂ = Rhamnose = Quercitrin
 R₁ = OH; R₂ = Glukose = Isoquercitrin
 R₁ = OH; R₂ = Rhamnose-Glukose = Rutin
 R₁ = H; R₂ = H = Kämpferol



Amentoflavon



I3,II8-Biapiigenin

Abb. 1: Strukturformeln pharmakologisch relevanter Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L.

3 *HYPERICUM-ZÜCHTUNG*

Zur Produktion einer hochwertigen Arzneidroge sind der kontrollierte Anbau und eine geeignete Sorte von entscheidender Bedeutung.

An der Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau wurde durch langjährige Anbauversuche eine Kulturanleitung für Johanniskraut erstellt, die durch das Anbauverfahren bedingte Schwankungen der Drogenqualität vermeiden soll (BOMME, 1981-87; BOMME, 1986). Eine anbauwürdige Sorte muß möglichst viele optimale und stabile Merkmale sowohl in agronomischer als auch in pharmakologischer Hinsicht aufweisen. Dies ist auch in der Züchtung maßgeblich für die Entwicklung einer neuen Sorte.

3.1 Zuchtziele

Die wichtigsten agronomischen und pharmakologischen Zuchtziele lassen sich wie folgt definieren:

Agronomische Zuchtziele

- **hohe und stabile Erträge**
- **hohe technologische Eignung hinsichtlich Anbau- und Ernteverfahren**

Pharmakologische Zuchtziele

- **hoher Gehalt an pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffen**
- **hohe pharmakologische Wirksamkeit/Bioaktivität**

3.2 Selektionskriterien und Züchtungsverfahren

Die Eigenschaften einer Pflanze, die die agronomischen Merkmale beeinflussen (s. Material und Methoden 2.6.1), und der Gehalt an Inhaltsstoffen sind durch meist einfache Meßmethoden bestimmbar. Bei der pharmakologischen Wirksamkeit/Bioaktivität ist dies nicht der Fall. Die Quantifizierung der Inhaltsstoffe allein reicht dafür nicht aus, da Wirkprinzip und Wirkstoff noch nicht eindeutig identifiziert sind.

Die bisherigen Forschungsergebnisse bieten jedoch einen Ansatzpunkt für die Auswahl und Entwicklung von biochemischen Testsystemen, die die Wirkung von Johanniskraut-Extrakten auf das neuronale Geschehen beurteilen sollen. Wie bereits geschildert, werden Störungen im Opiat- und Neurotransmitterhaushalt sowie eine erhöhte Lipidperoxidation mit der Depression in Zusammenhang gebracht. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurden

folgende Testsysteme ausgewählt bzw. entwickelt, um Johanniskrautextrakte auf ihre Wirksamkeit zu untersuchen (s. Material und Methoden 2.5):

- POD-katalysierte Dimerisierung von L-Tyrosin
- Oxidation von Indolessigsäure durch POD (IAA-Oxidation)
- Dopamin- β -Hydroxylase (D- β -H)
- Cu(II)-induzierte LDL-Oxidation
- LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale

Die gezielte züchterische Bearbeitung von Johanniskraut auf die angestrebten agronomischen und pharmakologischen Merkmale ist jedoch problematisch. *Hypericum perforatum* L. ist tetraploid ($2n = 4x = 32$), wobei Allopolyploidie nicht ausgeschlossen wird, und vermehrt sich fakultativ apomiktisch. Der Grad der Apomixis ist mit bis zu 97% sehr hoch (NOACK, 1939; BRUTOVSKA ET AL., 1998), d.h. eine Befruchtung und Rekombination des Erbgutes ist zwar möglich, findet aber in den seltensten Fällen statt, so daß die Nachkommen erbgleich mit der Mutterpflanze sind. Folglich ist der Anteil von echten Kreuzungen bzw. Rekombinationen sehr gering und deren Nachweis aufwendig und schwierig.

Wildsammlungen bzw. die Selektion aus einem heterogenen Pflanzenbestand bieten hier eine Alternative zur klassischen Kombinationszüchtung, da Pflanzen verschiedener Herkunft bzw. aus Wildsammlungen sich sowohl morphologisch als auch in ihrem Gehalt an Inhaltsstoffen unterscheiden. Dies konnten Untersuchungen in der Schweiz (BÜTER ET AL., 1998), in Litauen (BAGDONAITE ET AL., 2001), in Australien (CAMPBELL ET AL., 1997; SOUTHWELL UND BOURKE, 2001) und in den USA (WALKER ET AL., 2001) nachweisen.

4 ZIELE DER ARBEIT

Die Qualität einer Arzneidroge wird maßgeblich von den agronomischen und pharmakologischen Eigenschaften des angebauten Pflanzenmaterials beeinflusst. Die pharmakologische Wirksamkeit ist dabei mit von entscheidender Bedeutung, wurde aber bisher kaum als Kriterium bei der Bewertung und Selektion von Johanniskraut verwendet. Im Rahmen eines 3jährigen Versuchsanbaus und der biochemischen Untersuchung von Johanniskraut-Sorten und Saatgut aus unterschiedlicher Herkunft lag das Hauptaugenmerk daher v.a. auf den Ergebnissen in physiologisch relevanten Modellreaktionen.

Die Ziele, die in der vorliegenden Arbeit angestrebt wurden, lassen sich wie folgt formulieren:

- Bewertung der im Handel erhältlichen Johanniskrautsorten und Eliteselktionen von Saatgutfirmen im Hinblick auf Homogenität, agronomische und pharmakologische Eigenschaften
- Selektion neuer Johanniskrauttypen anhand ihrer agronomischen und pharmakologischen Merkmale
- Bewertung der gewählten biochemischen Testsysteme als Selektionsmittel für die pharmakologische Wirksamkeit. Das Testsystem der POD-katalysierten Tyrosin-Dimerisierung wurde dabei als Vergleichsstandard im Hinblick auf Genauigkeit und Selektionsvermögen herangezogen.
- Entwicklung und Bewertung der LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale als neues, physiologisch relevantes Testsystem

II MATERIAL UND METHODEN

1 MATERIAL

1.1 Chemikalien

Verbindung	Abkürzung/Formel	Firma/Art.Nr.
Amentoflavon	$C_{30}H_{18}O_{10} \cdot 3 H_2O$	Roth, 5255.1
L-Ascorbinsäure	$C_6H_7O_6Na$	Sigma, A-7631
Citronensäure-Monohydrat	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Merck, 818707
Dinatriumphosphat-Dihydrat	$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$	Merck, 1.06580.5000
Dopamin- β -Hydroxylase	D- β -H	Sigma, D-1893, Lot 66H7170
Eisen(III)chlorid-Hexahydrat	$FeCl_3 \cdot 6 H_2O$	Merck, 3943
Ethanol	C_2H_5OH , EtOH	Merck, 1.00983.2500
Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2 H_2O$ EDTA	Merck, 1.08418
Fumarsäure	$C_4H_2Na_2O_4$	Sigma, F-1506
1-Hexansulfonsäure	$C_6H_{13}NaO_3$	Sigma, H-5269
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	Merck, 2790
Hypericin	$C_{30}H_{16}O_8$	Roth, 7929.1
Hyperosid	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Roth, 7932.1
Indol-3-Essigsäure	IAA	Sigma, I-1250
Isoquercitrin	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Roth, 7586.1
Kaliumbromid	KBr	Merck, 1.05125.0250
L-Tyrosin	$C_9H_{11}NO_3$	Merck, 1.08371.0025
Natriumchlorid	NaCl	Merck, 6404.5000
Methanol für die präparative HPLC	CH_3OH , MetOH	Merck, 1.13351.2500
Methanol pro Analyse	CH_3OH , MetOH	Merck, 822283
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Merck, 1.06346.1000
Natriumhydroxid	NaOH	Merck, 6498
Peroxidase aus Meerrettich	POD	Boehringer, Lot 83742448
o-Phosphorsäure	H_3PO_4	Merck, 1.00565.0500
Pseudohypericin	$C_{30}H_{16}O_9$	Roth, P068.1
Quercetin Dihydrat	$C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2 H_2O$	Merck, 59662
Quercitrin	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Roth, 9417.1

Rutin Trihydrat	$C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3 H_2O$	Roth, 7422.1
Schwefelsäure, 95-97%	H_2SO_4	Merck, 732
Tyramin	$C_8H_{11}NO$	Sigma, T-2879
Trichloressigsäure	TCA	Sigma, T-4885
Wasserstoffperoxid, 30%	H_2O_2	Merck, 1.08597.1000

1.2 Johanniskrautextrakte

Es wurden insgesamt 305 Johanniskrautextrakte verwendet. Aus dem Anbaujahr 1999 wurden 91 Extrakte getestet, 92 Extrakte aus dem Jahr 2000 und 64 aus dem Jahr 2001. Hinzu kommen 58 Extrakte aus einem Macerationsversuch mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln. Die Extraktion wurde durch die Firma Steigerwald vorgenommen. Die genaue Bezeichnung und Herstellungsweise der Extrakte wird in Material und Methoden 2.3 erläutert.

1.3 Johanniskrautsamen

Das Saatgut stammte von Saatgutfirmen (Martin Bauer, Pharmasaat, Sperling, N. L. Chrestensen), einem Züchter (Rieger) und aus dem Garteneinzelhandel (Austrosaat). Zwei Herkünfte wurden aus eigener Produktion und Anbauversuchen gewonnen (MANN, 1998).

Tab. 2: Bezugsquellen des Saatgutes

Firma	Bezeichnung der Herkunft/Sorte
Rieger & Hoffmann GmbH, Blaufelden-Raboldshausen	`Taubertal` 1 `Taubertal` 2 Goldstern 1 Goldstern 2
Carl Sperling & Co, Lüneburg	429 430 `Topaz` 1
Pharmasaat GmbH, Artern	`Taubertal` 3 `Topaz` 2
N. L. Chrestensen Erfurter Samen- und Pflanzenzucht GmbH, Erfurt	NLC `Topaz` 3
Martin Bauer, Vestenbergsgreuth	M. B.
Austrosaat AG, Wien	Austrosaat
eigene Selektion (MANN, 1998)	SN BREIT

1.4 Puffer, Reagenzien und deren Herstellung

Soweit nicht anders vermerkt, werden alle Lösungen mit *aqua bidest* hergestellt.

* **Phosphatpuffer:** 0,1 M oder 0,2 M; verschiedene pH-Werte

Lösung A: NaH_2PO_4 , 0,1 M (13,8 g/l) oder 0,2 M (27,9 g/l)

Lösung B: Na_2HPO_4 , 0,1 M (17,8 g/l) oder 0,2 M (35,6 g/l)

Abhängig vom gewünschten Wert wird mit Lösung A oder B an der pH-Elektrode der pH-Wert eingestellt.

* **Citrat-Phosphatpuffer:** 0,15 M; pH 5,6

Lösung A: 0,1 M Citrat (21,0 g/l)

Lösung B: 0,2 M Na_2HPO_4 (35,6 g/l)

Mit Lösung B erfolgt die Feineinstellung.

* **PBS:** pH 7,4

In 100 ml Phosphatpuffer (pH 7,4; 0,2 M)

9 g NaCl lösen und mit H_2O auf 1 l auffüllen.

* **HPLC-Puffer (Tyrosin-Dimerisierung):** 0,05 M; pH 2,1

Lösungen von NaH_2PO_4 (6,9 g/l) und H_3PO_4 (4,9 g/l) vereinigen.

* **HPLC-Puffer (D- β -H):** 0,05 M; pH 2,1

In 1 l Phosphatpuffer (0,05 M; pH 2,1)

5 g 1-Hexansulfonsäure lösen.

* **Dichtelösungen für die LDL-Isolation:**

A (d = 1,080 g/ml):

40 g KBr und 0,5 g EDTA ad 500 ml H_2O lösen.

B (d = 1,050 g/ml):

25 g KBr und 0,5 g EDTA ad 500 ml H_2O lösen.

C (d = 1,000 g/ml):

0,5 g EDTA ad 500 ml H_2O lösen.

*** FeCl₃/H₂SO₄-Reagenz**

15 ml	0,5 M FeCl ₃ * 6 H ₂ O
500 ml	H ₂ O
300 ml	konz. H ₂ SO ₄

Da eine starke Hitzeentwicklung eintritt, wird die konzentrierte H₂SO₄ unter ständigem Rühren auf Eis und unter dem Abzug zur FeCl₃-Lösung gegeben.

1.5 Analysengeräte*** HPLC - high performance liquid chromatography**

- HPLC, Fa. Waters:

Pumpen:	No. 600
Controller:	No. 600
Detektor:	No. 996
Autosampler:	No. 717 plus

Integration und Auswertung wurde mit Millenium Software durchgeführt.

- HPLC, Fa. Beckman, System Gold:

Pumpen:	126 NM
Detektor:	168 NM
Autosampler:	Triathlon

Die Auswertung geschah mit Gold Nouveau 2.6-Software.

*** Photometer**

- Kontron Uvikon Modell 922 und Modell 930

- Pharmacia LKB Ultrospec III

*** Fluoreszenzspektrophotometer**

Hitachi, Modell F-4500

*** pH-Meter**

Bachhofer Orion Research 701 A

*** Zentrifugen**

- Beckman Ultrazentrifuge Optima LE-70 (Rotor: SW 40 Ti)
- Heraeus Minifuge RF

*** Waagen**

- Sartorius Modell 2474
- Sartorius L310

2 METHODEN

2.1 Versuchsaufbau

Zur Selektion neuer Johanniskrauttypen, der Bewertung dieser Selektionen und der Prüfung von Sorten und Eliteselektionen war eine Kombination von Feldanbau und biochemischen Untersuchungen erforderlich.

Zunächst wurden die agronomischen Parameter der *Hypericum*-Typen im Rahmen eines Versuchsanbaus der Saatgutherkünfte dokumentiert. Aus dem dabei gewonnenen Erntematerial der verschiedenen Johanniskrautphänotypen wurden Extrakte hergestellt, die sowohl auf ihr Inhaltsstoffspektrum analysiert wurden als auch auf ihre Wirkung in biochemischen Testsystemen. Die Ergebnisse des Feldanbaus und der labortechnischen Untersuchungen dienten schließlich als Grundlage zur Selektion und Bewertung der Johanniskrauttypen und der im Handel vertriebenen Sorten.

Es standen zwei Johanniskrautfelder zur Bearbeitung dieses Aufgabenkomplexes zur Verfügung.

Feld 1999

Hierbei handelte es sich um einen Bestand der beiden Selektionen BREIT und SN (s. Material und Methoden 1.3; MANN, 1998) im 2. Standjahr. Dieser wurde zur Durchführung eines Vorversuchs genutzt. Die Möglichkeit der oben beschriebenen Vorgehensweise zur Selektion von Johanniskrauttypen sollte dadurch überprüft werden.

Blockanlage 2000/2001

Im Jahr 2000 wurde ein neues Feld in Form einer Blockanlage mit 15 verschiedenen Saatgutherkünften angelegt (s. Anhang I). Diese Form wurde gewählt, um standortbedingte Unterschiede auszugleichen. Auf dieser Fläche wurde sowohl die Selektion neuer Pflanzentypen durchgeführt als auch die Prüfung von Handelssaatgut auf Homogenität.

2.2 Feldversuche

Der Anbau von *Hypericum perforatum* L. wurde unter besonderer Berücksichtigung der Kulturanleitung von Prof. Dr. Bomme, Leiter des Sachgebietes Heil- und Gewürzpflanzenbau der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau in Freising, durchgeführt.

Die Versuchsstation des Lehrstuhls für Zierpflanzenbau, TUM Weihenstephan, in Dürnst übernahm die Jungpflanzenanzucht. Auf den Freilandflächen des Lehrstuhls für

Phytopathologie, TUM Weihenstephan, in Dürnast fand die weitere pflanzenbauliche Durchführung der Versuche statt.

Die Anbauversuche beziehen sich auf die Vegetationsperioden der Jahre 1999 (Feld 1999, 2. Standjahr), sowie 2000 und 2001 (Blockanlage, 1. und 2. Standjahr).

2.2.1 Anzucht, Pflanzung und Kulturmaßnahmen

Anzucht der Jungpflanzen für die Blockanlage 2000/2001

	Termin	Kulturmaßnahmen
Beizung	08.02.00	Oberflächensterilisation des Saatgutes mit Bleichlauge (1%); Dauer: 5 min
Aussaat	09.02.00	12er Töpfe mit Floraton 1 Keimtemperatur: 20-25 °C
Pikieren	09.03.00	in Anzuchtplatten (11 x 7 Töpfe) Düngung: 2x wöchentlich mit 2‰ Wuxal (8-8-6)
Abhärtung	26.04.00	im Gewächshaus bei 8 °C
Pflanzung	11.05.00	

Pflanzung

Gepflanzt wurde in pflanzfähig vorbereiteten Boden.

a) Feld 1999

Die beiden Herkünfte BREIT und SN waren bereits 1998 getrennt voneinander angepflanzt worden. Pro Herkunft wurden 2 Blöcke mit je 6 Reihen à 36 Pflanzen angelegt.

Reihenabstand: 42 cm

Pflanzenabstand: 30 cm

b) Blockanlage 2000/2001

15 Saatgutherkünfte wurden in Form einer Blockanlage angepflanzt: 4 Blöcke mit je 15 Parzellen (SCHUSTER UND VON LOCHOW, 1979; s. Anhang I). Jede Parzelle bestand aus 4 Pflanzreihen à 8 Pflanzen.

Reihenabstand: 50 cm

Pflanzenabstand: 40 cm

5 Herkünfte wurden ausschließlich zur Selektion neuer Pflanzentypen genutzt. Die übrigen dienten zum Vergleich der Sorten und deren Prüfung auf Homogenität.

In Tab. 3 wird die Zuordnung der Parzellen-Nummern zu den verschiedenen Saatgut-herkünften, ihre Abkürzungen und Verwendung im Rahmen dieser Arbeit erläutert.

Tab. 3: Parzellen-Nummern, Abkürzungen und Verwendung der Herkünfte

Parzellen-Nr.	Bezeichnung / Sorte	Abkürzung	Verwendung
1	M. B.		Selektion
2	`Topaz` 1	To 1	Sortenvergleich u. Homogenitätsprüfung
3	`Topaz` 2	To 2	Sortenvergleich u. Homogenitätsprüfung
4	`Topaz` 3	To 3	Sortenvergleich u. Homogenitätsprüfung
5	`Taubertal` 1	TT 1	Sortenvergleich u. Homogenitätsprüfung
6	`Taubertal` 2	TT 2	Sortenvergleich u. Homogenitätsprüfung
7	Goldstern 1	GS 1	Sortenvergleich u. Homogenitätsprüfung
8	Goldstern 2	GS 2	Sortenvergleich u. Homogenitätsprüfung
9	NLC		Sortenvergleich u. Homogenitätsprüfung
10	SN		Sortenvergleich u. Homogenitätsprüfung
11	BREIT		Selektion
12	`Taubertal` 3	TT 3	Sortenvergleich u. Homogenitätsprüfung
13	Austrosaat	AU	Selektion
14	429		Selektion
15	430		Selektion

Düngung

Der Entzug durch Johanniskraut liegt bei ca. 100 kg N/ha. BOMME (1986) empfiehlt eine Stickstoffdüngung von bis zu 150 kg N/ha.

Im Hinblick auf die Selektion neuer Pflanzentypen wurde jedoch ein geringer Stickstoffgehalt der Versuchsfläche angestrebt, um das Potential der Pflanzen unter Minimalbedingungen zu überprüfen. Auf Düngungen wurde somit bei allen Versuchsfeldern verzichtet.

N_{min}-Gehalt

a) Feld 1999

Über den N_{min}-Status des Versuchsfeldes 1999 liegen keine Angaben vor.

b) Blockanlage 2000/2001

Der N_{\min} -Gehalt der Blockanlage in 0-60 cm Bodentiefe betrug laut Bodenprobe und -analyse im Frühjahr 2000 3 kg N/ha. Durch die natürliche Stickstofffreisetzung des Bodens im Winter waren 2001 50 kg N/ha vorhanden.

Eine geringe Stickstoffversorgung war somit auf dem Feld gewährleistet.

Weitere Kulturmaßnahmen**a) Feld 1999**

Dieses Feld befand sich zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits im 2. Standjahr und wurde zur Unkrautregulierung gemulcht.

b) Blockanlage 2000/2001

Im 1. Standjahr fand zu Beginn der Feldkultur eine Zusatzbewässerung und während der Vegetationsperiode häufigeres Hacken statt. Im 2. Standjahr wurde im zeitigen Frühjahr Rindenmulch ausgebracht, um den Hackaufwand zu minimieren.

2.2.2 Bonitur der morphologischen Pflanzenmerkmale

Zur Charakterisierung der Phänotypen wurden verschiedene morphologische Merkmale von Blatt, Stengel und Blüte erfaßt und deren Ausprägung wie folgt gemessen bzw. bonitiert:

Blattmerkmale***Blatt-Typ***

- b breitblättrig
- bb extrem breitblättrig
- s schmalblättrig

Hypericinbehälter auf der Blattspreite

- 1 nur auf Blattrand, nicht auf der Blattspreite
- 2 auf Blattrand und vereinzelt auf der Blattspreite
- 3 Blattrand und vermehrt (> 5) auf der Blattspreite

Die verschiedenen Ausprägungen der beiden Blattmerkmale sind in Abb. 2 zu sehen.

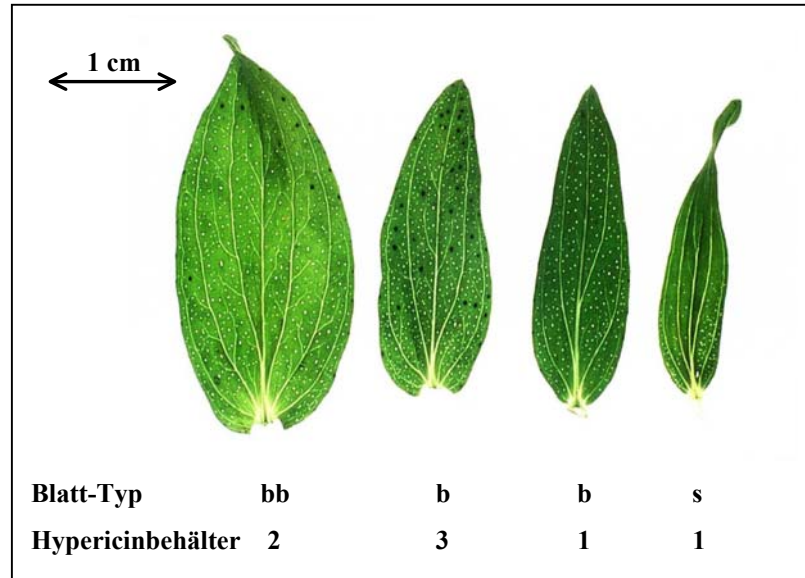


Abb. 2: Boniturstufen der Merkmale Blatt-Typ und Hypericinbehalter auf der Blattspreite

Stengelmerkmale

Stengelfärbung

- 0 Stengel grün
- 1 Stengel zeigt Rotfärbung (Anthocyane)

Stengelanzahl

Es wurden nur blühende Triebe erfaßt.

Pflanzenhöhe

Die Pflanzenhöhe wurde zum Erntezeitpunkt mit Hilfe eines Zollstocks ermittelt.

Zur Veranschaulichung der möglichen Unterschiede in der Pflanzenhöhe wurden in Abb. 3 Stengel von vier verschiedene Phänotypen nebeneinander abgebildet.



Abb. 3: Vergleich der Pflanzhöhe verschiedener Johanniskrauttypen

Blütenmerkmale

Blühhorizont

Der Blühhorizont wurde als Differenz zwischen der Pflanzhöhe und der Höhe des niedrigsten Blütenstandes der Pflanze ermittelt.

Hypericinbehälter auf den Petalen

- 1 nur am Petalenrand
- 2 vereinzelte Punkte und kleine Streifen auf den Petalen
- 3 mehrere Streifen über die gesamte Länge der Petalen

Die Boniturstufen dieses Merkmals sind in Abb. 4 anhand von *Hypericum*-Knospen dargestellt.

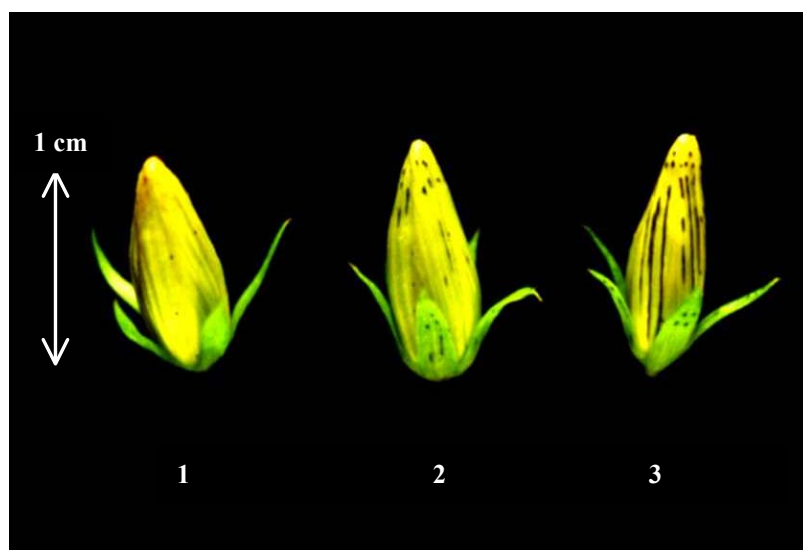


Abb. 4: Knospen mit verschiedener Ausprägung von Hypericinbehältern auf den Petalen

Hypericinbehälter im Fruchtknotenquerschnitt

- keine Hypericinbehälter im Fruchtknotenquerschnitt vorhanden
- + Hypericinbehälter im Fruchtknotenquerschnitt vorhanden

Abb. 5 zeigt einen Querschnitt durch einen Fruchtknoten mit Hypericinbehältern.

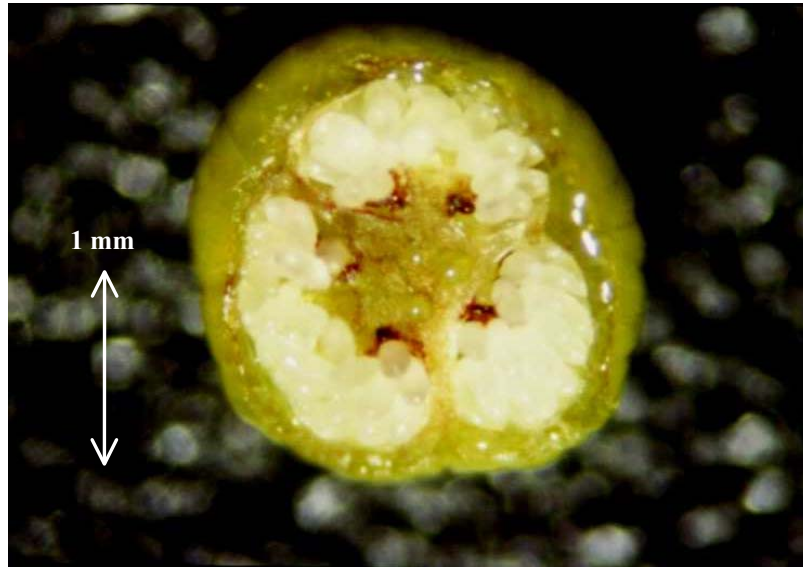


Abb. 5: Fruchtknoten mit Hypericinbehältern

2. Blüte

- keine 2. Blüte wurde ausgebildet
- + 2. Blüte wurde ausgebildet



Abb. 6: Johanniskrautpflanzen in der 2. Blüte

2.2.3 Ernte

Laut BRAUNEWELL (1991) ist der optimale Erntezeitpunkt für *Hypericum perforatum* L., wenn die apikale Blüte bereits zur grünen Kapsel herangereift ist. Die Ernte fand grundsätzlich statt, wenn der jeweilige Phänotyp sich in diesem Kapselstadium befand.

a) Feld 1999

Die charakterisierten Phänotypen wurden getrennt voneinander und nach Einzelpflanzen gesondert beerntet. Ein einheitliches Ernteschema wurde nicht durchgeführt, da die Pflanzentypen in der Herkunft BREIT zufällig verteilt waren. Bei der sehr homogenen Herkunft SN wurden zufallsverteilt pro Reihe 5 Pflanzen beerntet.

b) Ernteschema Blockanlage 2000/2001

Sorten/Eliteselektionen

Bei den Parzellen der Sorten/Eliteselektionen wurden in den Jahren 2000/2001 pro Parzelle 8 Pflanzen nach einem festgelegten Raster beerntet (s. Anhang II).

Im Jahr 2001 wurden unabhängig von dem Ernteraster Pflanzen beerntet, die einen sortenuntypischen Phänotyp aufwiesen („Ausreißer“).

Eigenselektionen

Ein einheitliches Ernteschema war bei den Eigenselektionen nicht möglich, da die Anzahl gleichartiger Selektionstypen in den einzelnen Blöcken/Parzellen stark schwankte.

Im 1. Standjahr wurde pro Parzelle die höchstmögliche Anzahl an gleichartigen Phänotypen geerntet, im 2. Standjahr nur noch eine Pflanze je Phänotyp und Parzelle. Bei manchen Phänotypen konnte nur ein einziges Exemplar auf der gesamten Anbaufläche gefunden bzw. geerntet werden.

2.3 Zusammenstellung, Bezeichnung und Herstellung der Extrakte

Probenaufbereitung

Das frisch geerntete Pflanzenmaterial wurde bei 40 °C für 72 h im Trockenschrank getrocknet.

2.3.1 Extraktzusammenstellung und Bezeichnung

a) Extrakte des Feldes 1999

Für die Extrakte der am häufigsten vorkommenden Pflanzentypen wurde jeweils ein Teil des Trockenmaterials von 5 Pflanzen gepoolt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Pflanzen gleichmäßig über die Fläche verteilt waren. Pflanzen aus den Randreihen wurden gesondert zu Extrakten verarbeitet. Bei Phänotypen, die seltener auftraten, wurden Einzelpflanzenextrakte hergestellt.

Bezeichnung der Extrakte

Die Bezeichnung der einzelnen Extrakte setzt sich folgendermaßen zusammen:

Kürzel des Pflanzentyps und fortlaufende Numerierung

Beispiel: BN 24

Zur näheren Erläuterung der Pflanzentyp-Kürzel siehe Ergebnisteil 1.1.1

b) Blockanlage 2000/2001

Das Drogenmaterial der Pflanzen wurde pro Parzelle, Pflanzentyp/Sorte und Block zu gleichen Teilen gepoolt.

Die Extraktbezeichnungen setzten sich wie folgt zusammen:

Sortenextrakte:

Parzelle / Block z.B. 12 / IV

Selektionen:

Parzelle / Phänotyp / Block z.B. 14 / 2 / III (1. Standjahr)

bzw.

Parzelle / Phänotyp z.B. 14 / 2 (2. Standjahr)

Einzelpflanzen wurden mit Großbuchstaben in alphabetischer Reihenfolge betitelt (A, B, usw.).

Die Phänotypen bzw. Extrakte, die sortenuntypische Pflanzen („Ausreißer“) darstellten, wurden nach folgendem Schema benannt:

Parzelle A Phänotyp z.B. 3 A 1

2.3.2 Vorversuch zur Extrakterstellung

Um die optimalen Extraktionsbedingungen zu finden, wurden aus handelsüblicher Droge von *Hypericum* verschiedene Extrakte hergestellt. Dabei wurden Extraktionsdauer, Extraktionsmittel, Schnittgröße der Droge und das Verhältnis Droge zu Extraktionsmittel variiert. Alle Extraktvarianten wurden doppelt ausgeführt.

Methanol und Ethanol als Lösungsmittel in aufsteigender Konzentration

Als Extraktionsmittel dienten Methanol und Ethanol mit 50, 60, 70 oder 80% v/v, sowie Ethanol 96% v/v und reines Methanol. Bei allen Extrakten dieser Herstellungsreihe betrug die Drogenschnittgröße 2-4 mm, das Droge/Extraktionsmittel-Verhältnis 1:16 und die Extraktionsdauer 8 h.

Zeitkinetik

In dieser Extraktreihe wurde pulverisierte Johanniskrautdroge mit 96%igem Ethanol im Verhältnis 1:100 für die Dauer von 2, 4, 6, 8 oder 16 h maceriert.

Variation der Drogenschnittgröße, Extraktionsdauer und Verhältnis von Droge zu Extraktionsmittel

Hier wurde 4 oder 16 h lang die geschnittene (2-4 mm) oder pulverisierte Droge mit 50% v/v Ethanol maceriert. Das Verhältnis Droge zu Extraktionsmittel wurde folgendermaßen variiert: 1:5 (pulverisierte Droge), 1:8 (geschnittene Droge), 1:10 und 1:20 (beide Schnittgrößen). Somit entstanden 12 verschiedene Extraktvarianten

2.3.3 Herstellung der Extrakte aus dem geernteten Pflanzenmaterial

Das getrocknete Pflanzenmaterial wurde fein gemahlen und anschließend unter folgenden Extraktionsbedingungen maceriert:

Extraktionsmittel: 50% EtOH

Droge/Extraktionsmittel - Verhältnis: 1:16

Temperatur: 40 °C

Dauer: 4 h

2.4 Analytik der Inhaltsstoffe

Zur Analytik der pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffe wurden die Extrakte verdünnt und an der HPLC analysiert. Die Bestimmung der Stoffmenge erfolgte relativ über die Peakfläche der jeweiligen Substanzen.

HPLC-Methode:

- Gerät: HPLC, Fa. Beckman
- Säule: Merck Superspher 60 RP select B 250 x 4.6 mm mit Vorsäule
- Laufmittel A: Phosphatpuffer, pH 2,4 (50 mM)
- Laufmittel B: Acetonitril 59%, Methanol 40%, Laufmittel A 1%
- Laufprogramm:

bei	0 min:	%B = 19	Flußrate: 0,6 ml/min
bei	8 min:	%B = 19	
bei	30 min:	%B = 50	
bei	45 min:	%B = 100	
bei	75 min:	%B = 100	
bei	78 min:	%B = 10	
bei	90 min:	%B = 10	
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Detektion: UVλ = 254 nm

Abb. 7 zeigt ein typisches Chromatogramm eines Johanniskrautextraktes mit den eindeutig durch Referenzsubstanzen oder publizierten UV/VIS-Spektren (HÖLZL UND OSTROWSKI, 1987) identifizierten Substanzen.

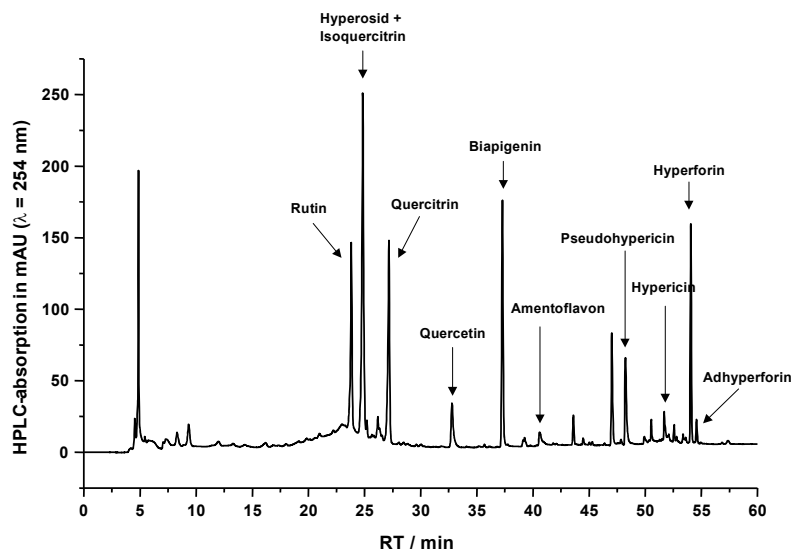


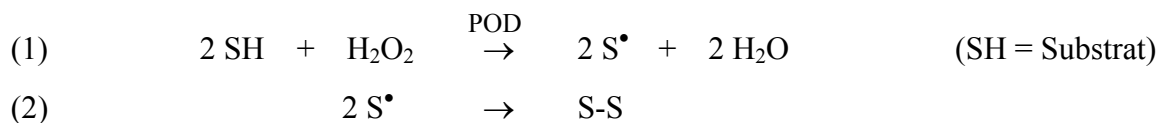
Abb. 7: HPLC-Chromatogramm eines Johanniskrautextraktes

2.5 Biochemische Modellreaktionen

2.5.1 POD-katalysierte Dimerisierung von L-Tyrosin

Dieses Testsystem basiert auf den Forschungsergebnissen mehrerer Arbeitsgruppen. TURKALL ET AL. (1982) wiesen nach, daß Methionin-Enkephalin von polymorphkernigen phagozytierenden neutrophilen Granulozyten im Gehirn durch Myeloperoxidase (MPO) in Anwesenheit von H_2O_2 oxidiert werden kann. Die opioide Eigenschaften des Enkephalins werden dabei beeinträchtigt. HEINECKE ET AL. (1993) bewiesen die Bildung eines Tyrosin-Dimers infolge von oxidativem Streß durch MPO und H_2O_2 auf neuronaler Ebene. ROSEI ET AL. (1991) wiederum konnten die Dimerisierung von Methionin-Enkephalinen über deren Tyrosin-Enden durch Meerrettichperoxidase (POD) und H_2O_2 nachweisen. Schließlich entwickelte DENKE (1997) im Hinblick auf diese Ergebnisse das System der POD-katalysierten Dimerisierung von L-Tyrosin.

Peroxidasen, die nur eine geringe Substratspezifität aufweisen, katalysieren die folgende Umsetzung von H_2O_2 zu H_2O :



H_2O_2 fungiert dabei als Elektronenakzeptor und Tyrosin als Wasserstoffdonor. Die Peroxidase oxidiert Tyrosin-Moleküle zu Radikalen, die Dimere bilden (HALLIWELL UND GUTTERIDGE, 1989). Im ersten Schritt der Peroxidasereaktion wird der sog. Compound I gebildet. Dabei ist H_2O_2 an das Häm-Zentrum des Enzyms gebunden. Compound I oxidiert nun ein geeignetes Substrat unter zwischenzeitlicher Bildung eines Compound II. Peroxid wird dabei abgebaut, und die Peroxidase kehrt wieder in ihre Ausgangsform zurück.

Die Hemmung dieser Reaktion durch pflanzliche Extrakte wurde bereits erfolgreich zur qualitativen Bewertung von Johanniskrautextrakten eingesetzt (DENKE, 1997). Die Johanniskrautextrakte wurden anhand ihrer Hemmwirkung auf die Dimerbildung beurteilt.

Testansatz:

Phosphatpuffer pH 8,2	50 mM i.A.
L-Tyrosin (in 20 mM NaOH)	0,5 mM i.A.
Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen	
H ₂ O ₂	0,33 mM i.A.
Reaktionsstart: POD	3 U i.A.
Inkubation: 60 min bei 37 °C	

Nach der Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von TCA (2% i.A.) abgestoppt (DENKE, 1997).

Die während der Reaktion entstandenen Dimere werden anhand der HPLC von den Monomeren getrennt und detektiert.

HPLC-Methode:

- Gerät: HPLC, Fa. Waters
- Säule: Hypersil - ODS (octadecyl) - 5 µm (reversed phase)
Länge: 15 cm
Innendurchmesser: 4,6 mm
- Laufmittel A: Phosphatpuffer, pH 2,4 (50 mM)
- Laufmittel B: Methanol 100%ig
- Laufprogramm:

bei	0 min:	%B = 0	Flußrate: 1,0 ml/min
bei	1,5 min:	%B = 0	
bei	9 min:	%B = 30	
bei	11 min:	%B = 100	
bei	15 min:	%B = 100	
bei	17 min:	%B = 0	
bei	25 min:	%B = 0	
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Detektion: UVλ = 280 nm

2.5.2 Oxidation der Indolessigsäure durch POD (IAA-Oxidation)

VOLPERT (1993) zeigte die mögliche Standardisierung von phenolhaltigen Propolis-Extrakten durch den hemmenden Einfluß der o-Diphenole auf die IAA-Oxidation durch POD. Auch Johanniskrautextrakte wurden bereits erfolgreich damit differenziert (MANN, 1998). Daher wurde dieses Testsystem auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Bei der H_2O_2 -unabhängigen, radikalischen Oxidation der Indolessigsäure (IAA) wirkt die Peroxidase als Oxidase und kann durch Monophenole aktiviert oder durch o-Diphenole inhibiert werden (GORTNER UND KENT, 1958). Monophenole beschleunigen die Bildung von IAA-Radikalen und erhöhen dadurch den IAA-Umsatz. o-Diphenole verhindern die Reduktion der POD, so daß keine IAA-Radikale entstehen können (SCHEMP, mündliche Mitteilung). Der Übergang zwischen der maximalen Stimulation und der vollständigen Hemmung der Reaktion geschieht sehr abrupt in einem sog. „Reaktionssprung“. Abb. 8 zeigt exemplarisch den Einfluß eines Extraktes mit steigenden Konzentrationen im Ansatz (i.A.) auf die IAA-Oxidation.

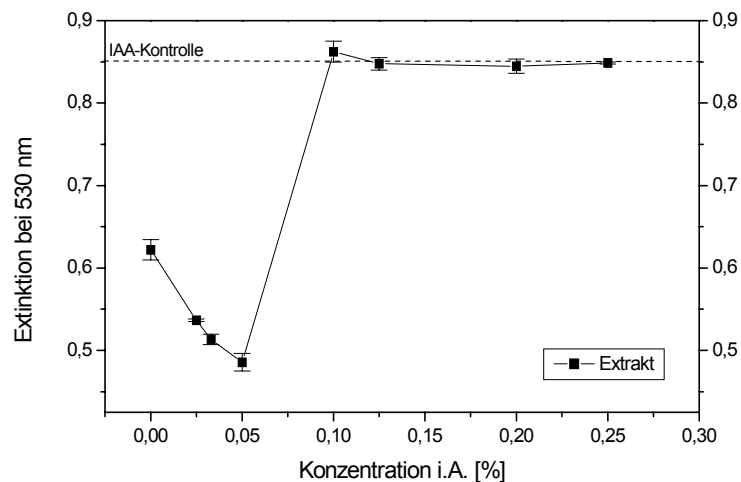


Abb. 8: Einfluß eines Extraktes auf die IAA-Oxidation

Die Konzentration des Extraktes i.A., bei der die IAA-Oxidation inhibiert wird, ermöglicht eine qualitative Aussage über die Extraktzusammensetzung bzw. das Verhältnis von (substituierten) Mono- und Diphenolen. Je mehr o-Diphenole enthalten sind, um so niedriger ist diese Konzentration des Extraktes i.A.

Testansatz:

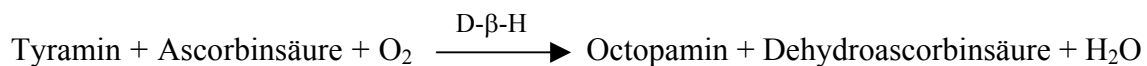
Citrat-Phosphatpuffer pH 5,6	150 mM i.A.
<i>aqua bidest</i>	ad 1 ml
IAA (in 10 mM NaOH)	0,3 mM i.A.
Testsubstanzen in verschiedene Konzentrationen	
Reaktionsstart: POD	0,3 U i.A.
Inkubation: 30 min bei 37 °C	

Die Detektion von Indoleessigsäure erfolgt nach TANG UND BONNER (1947) durch das FeCl₃/H₂SO₄-Reagenz, das im 4fachen Überschuß zum Testansatz hinzugegeben wird. Die enzymatische IAA-Oxidation wird dabei abgestoppt. Nach 14 min wird bei $\lambda = 530$ nm am Photometer die Messung durchgeführt, da jetzt die höchste Farbentwicklung erreicht ist.

Bei der Farbreaktion erfolgt eine Chelatkomplexbildung zwischen dem Fe³⁺-Ion, dem Carbonylsauerstoff und dem Iminostickstoff der IAA. Die daraus folgende Bildung eines 7-stelligen Ringes erzeugt einen Farbumschlag von gelb nach pink.

2.5.3 Dopamin- β -Hydroxylase (D- β -H)

Ein Defizit an Katecholaminen wird als ein möglicher Auslöser von Depressionen angesehen. Eine Hemmung des Abbaus dieser Substanzen wird als weiterer Wirkmechanismus von *Hypericum* diskutiert. Das Enzym Dopamin- β -Hydroxylase (D- β -H) katalysiert die Reaktion des Neurotransmitters Dopamin zu Noradrenalin. KLEBER ET AL. (1999) stellten anhand der Sauerstoffelektrode eine Verminderung des O₂-Verbrauchs und folglich eine Hemmung der Enzymaktivität durch *Hypericum*-Extrakte fest. Eine Vereinfachung des Systems wurde durch den Ersatz von Dopamin durch Tyramin vollzogen (DENKE, 2000).



Testansatz:

Phosphatpuffer	100 mM i.A.
<i>aqua bidest</i>	ad 1 ml
Ascorbat	5 mM i.A.
Fumarat	5 mM i.A.
Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen	
Reaktionsstart: D- β -H	0,02 U i.A.
Inkubation: 30 min bei 37 °C	

Das Abstoppen der Reaktion geschieht durch die Zugabe von TCA (2% i.A.).

Die Detektion des Produktes Octopamin wurde mit Hilfe der HPLC durchgeführt.

HPLC-Methode:

- Gerät: HPLC, Fa. Waters
- Säule: Macherey Nagel Nucleosil 100-5 C18-AB mit Vorsäule AB
Länge: 12,5 cm
Innendurchmesser: 4,6 mm
- Laufmittel A: Phosphatpuffer (pH 2,4; 50 mM) mit 1-Hexansulfonsäure (5 g/l)
- Laufmittel B: Methanol 100%ig
- Laufprogramm:

bei	0 min:	%B = 15	Flußrate: 1,0 ml/min
bei	0,5 min:	%B = 15	
bei	10 min:	%B = 15	
bei	12 min:	%B = 100	
bei	20 min:	%B = 100	
bei	22 min:	%B = 15	
bei	40 min:	%B = 15	
- Injektionsvolumen: 20 μ l
- Detektion: UV λ = 200 nm

2.5.4 LDL-Oxidation als Modell für die Lipidperoxidation

Bei Untersuchungen depressiver Patienten wurde eine im Vergleich zu gesunden Probanden höhere Lipidperoxidation festgestellt (BILICI ET AL., 2001). Der erhöhte oxidative Streß bei Alzheimer kann auf die Lipidperoxidation durch Übergangsmetalle zurückgeführt werden (ARLT ET AL., 2002). Aber auch durch MPO generierte Tyrosyl-Radikale können Lipidperoxidation hervorrufen (PODREZ ET AL., 2000).

Als Modell für die Lipidperoxidation wird in der vorliegenden Arbeit die Oxidation des low density lipoproteins (LDL) herangezogen.

Entsprechend den oben genannten Forschungsergebnissen wurden zwei Systeme der LDL-Oxidation verwendet:

- Cu(II)-induzierte LDL-Oxidation
- LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale

2.5.4.1 LDL-Präparation

Plasmagewinnung

Zur Plasmagewinnung wurde zunächst von 12 gesunden Freiwilligen unterschiedlichen Geschlechts und Alters Blut abgenommen.

Direkt nach der Blutabnahme werden 100 ml Blut mit 4 ml EDTA-Lösung (25 mg EDTA/ml H₂O) versetzt. Durch einen Zentrifugationsschritt (1600 x g, 10 °C, 20 min) trennt sich das Plasma von den Blutzellen und kann nun abgezogen werden. Die Plasmaproben der verschiedenen Probanden werden vereinigt und je 100 ml des Pools mit 1 ml 60%iger Saccharoselösung versetzt. In Kryogefäße abgefüllt und mit Stickstoff überschichtet ist das gepoolte Plasma bei -70 °C bis zu einem halben Jahr haltbar.

LDL-Isolation

Das LDL wird mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation aus dem Plasma isoliert. In 3 ml Plasma werden vorsichtig 1,23 g KBr gelöst und somit auf eine Dichte von 1,41 g/ml eingestellt. In einem Beckman Polyallomer Zentrifugen Tube wird diese Lösung nacheinander mit je ca. 2,5 ml Dichtelösung A (1,080 g/ml mit 1 g EDTA) und Dichtelösung B (1,050 g/ml mit 1 g EDTA) überschichtet. Mit Dichtelösung C (1,000 g/ml mit 1 g EDTA) wird das Röhrchen bis knapp unter den Rand aufgefüllt und bei 10 °C und 275000 x g (40000 U/min) zwischen 22 und 24 h zentrifugiert. Dabei bilden sich drei voneinander getrennte

Banden über dem restlichen Plasma aus: unten HDL (high density lipoprotein), darüber LDL (low density lipoprotein) und an der Oberfläche VLDL (very low density lipoprotein) und Chylomikronen. Das LDL wird abgezogen und sterilfiltriert (Nalgene 0,22 μM -Filter). Im Kühlschrank gelagert ist es bis zu zwei Wochen verwendbar.

Bevor eine LDL-Probe im Versuchsansatz verwendet werden kann, muß über eine EconoPac DG-10 Gelfiltrationssäule (BioRad) das EDTA entfernt werden.

Proteinbestimmung

Die LDL-Konzentration in einer Probe wird über deren Proteingehalt anhand einer BSA (bovine serum albumin)-Eichgerade ermittelt. Bei dem hierfür verwendeten BioRad-Protein-Assay kommt es zu einer Komplexbildung der Reagenzlösung mit Protein, die bei 595 nm photometrisch quantifiziert werden kann.

Ansatz:

Probe bzw. BSA-Lösung (Standard)	10 μl
unverdünnte Reagenzlösung	200 μl
H ₂ O	790 μl
Inkubation: 10 min bei Raumtemperatur	

Die Proteinmenge in der Probe wird anhand einer BSA-Kalibrationsgerade berechnet.

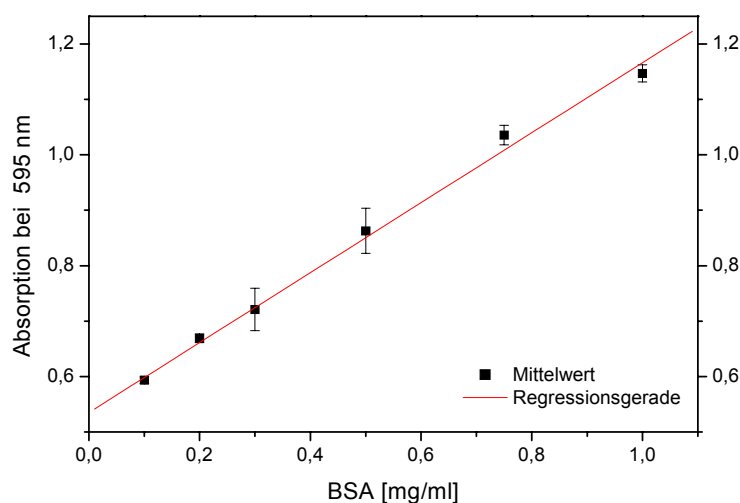


Abb. 9: Protein-Kalibrationsgerade

Der Proteingehalt der Probe kann nun nach folgender Regressionsgleichung ermittelt werden:

$$c(\text{Protein}) [\text{mg/ml}] = (\text{Absorption} - 0,53505) / 0,63122 [(\text{mg/ml})^{-1}]$$

$$r = 0,9982$$

2.5.4.2 Cu(II)-induzierte LDL-Oxidation

2.5.4.2.1 Bildung konjugierter Diene während der Lipidperoxidation (Dienkonjugation)

Bei der Oxidation des Fettsäureanteils im LDL werden konjugierte Diene gebildet, deren Entstehung photometrisch bei 234 nm quantifiziert werden kann (ESTERBAUER ET AL., 1989).

Deren typischer Verlauf, wie in Abb. 10 zu sehen, läßt sich in drei Phasen gliedern:

- Phase A: In dieser sog. Lag-Phase werden endogene Antioxidantien (z.B. Q_{10} , α -Tocopherol) verbraucht und nur eine sehr langsame Oxidation ist zu beobachten.
- Phase B: Die Bildung konjugierter Diene nimmt stark zu (Propagationsphase) und erreicht ihr Maximum. Durch die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren entstehen Lipidhydroperoxide.
- Phase C: Die konjugierten Diene zerfallen u.a. zu Aldehyden, Alkoholen und Epoxiden (Dekompositionsphase).

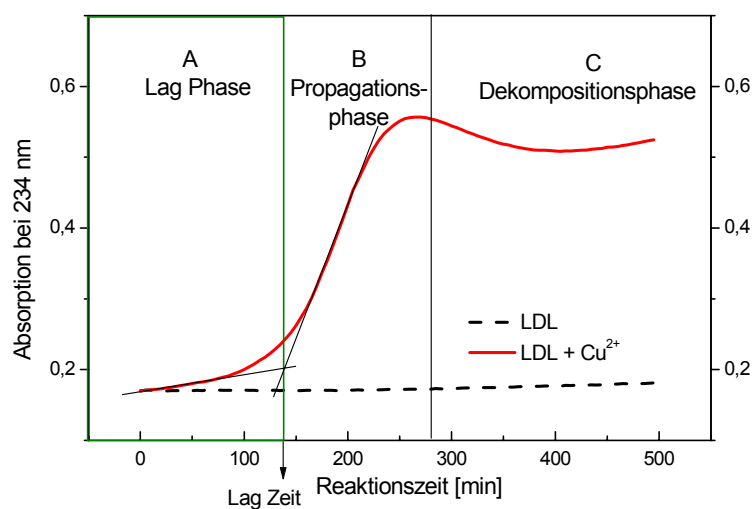


Abb. 10: Verlauf einer Cu(II)-induzierten Bildung konjugierter Diene (Dienkonjugation)

$$c(\text{Quercetin}) [\mu\text{M}] = (\text{Lag-Verschiebung} [\text{min}] - 2,93455) / 161,28872 [\text{min} \cdot \mu\text{M}^{-1}]$$

$$r = 0,9907$$

Dies ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit der Extrakte.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Johanniskrautextrakte im LDL-Cu(II)-System in Quercetin-Äquivalenten angegeben.

2.5.4.2.2 Tryptophanfluoreszenz

Nicht nur die Lipide des LDL sind bei Oxidation betroffen, sondern auch der Proteinteil (ApoB 100) wird angegriffen (REYFTMANN ET AL., 1990). Dies kann über eine Verminderung der Fluoreszenz an Tryptophanresten beobachtet werden.

Testansatz:

PBS	ad 1 ml
entsalztes LDL	50 μg Protein i.A.
Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen	
Cu(II)	3,36 μM i.A.

Die Kontrolle enthält nur LDL und 100 μM EDTA i.A.

Die Messung erfolgt alle 10 min. Jede Probe wird dabei zweimal gemessen, um Geräteschwankungen auszugleichen. Die Küvetten dürfen zwischen den Meßzeiten nicht im Lichtgang stehen, da sonst eine Bleichung der Proben auftritt.

Parameter der Messung am Fluoreszenzphotometer:

Excitation:	282 nm
Emission:	331 nm
Slit:	5,0 nm / 5,0 nm
PMT Voltage:	950 V
Delay Time:	0 sec
Integration Time:	2,0 sec

Die Oxidation des Proteinteils untergliedert sich, wie in Abb. 12 ersichtlich, in eine frühe und eine späte Proteinoxidation. Die frühe Proteinoxidation ist durch eine langsame Fluoreszenz-

abnahme gekennzeichnet. Nach der Lag-Phase der Dienkonjugation beschleunigen die Produkte der Lipidperoxidation die Fluoreszenzabnahme (späte Proteinoxidation).

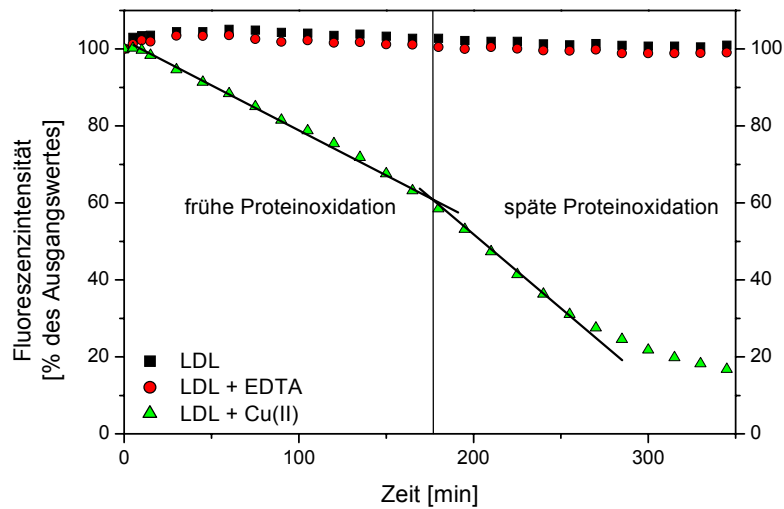


Abb. 12: Abnahme der Tryptophanfluoreszenz während der Proteinoxidation von LDL

2.5.4.3 LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale

LDL-Oxidation und die Bildung von konjugierten Dienen kann nicht nur durch Übergangsmetalle sondern auch durch enzymatisch generierte Radikale induziert werden. SAVENKOVA ET AL. (1994) verwendeten ein System aus Glucose/Glucoseoxidase (H_2O_2 -Produktion), Tyrosin und Myeloperoxidase (MPO) zur Bildung von Tyrosyl-Radikalen.

Dieser Reaktionsansatz wurde in der vorliegenden Arbeit modifiziert und als weiteres Testsystem verwendet. Glucose/Glucoseoxidase wurde durch eine Zugabe von H_2O_2 ersetzt, sowie MPO durch die kostengünstigere Meerrettichperoxidase (POD). Auf die Systementwicklung wird in Ergebnisse 1.2.2.5.1 näher eingegangen. Im Zuge der Untersuchung der Extrakte wurde der folgende Ansatz verwendet.

Testansatz:

PBS	ad 1 ml
entsalztes LDL	25 µg Protein/ml
Tyrosin	25 µM i.A.
Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen	
H ₂ O ₂	50 µM i.A.
POD	1 U i.A.
Online-Messung bei 234 nm und 37 °C.	

Der Absorptionsverlauf über die Zeit bei der Tyrosyl-Radikal induzierten Dienkonjugation ist in Abb. 13 dargestellt.

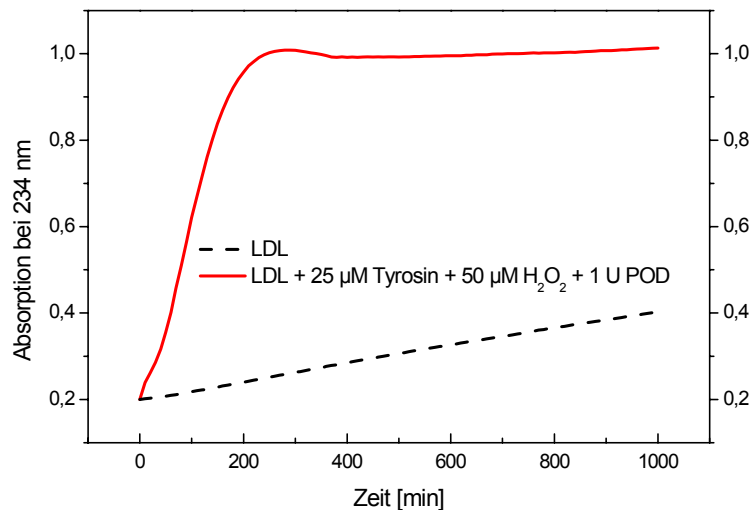


Abb. 13: Verlauf der Tyrosin-Radikal induzierten Dienkonjugation

Im Vergleich zur Cu(II)-induzierten Dienkonjugation kommt es zu keiner Lag-Phase. Die Radikal-induzierte Oxidation beginnt direkt mit der Propagationsphase. Diese kommt an ihrem Maximum zu einem abrupten Stillstand. Die Menge an gebildeten konjugierten Dienen bleibt ab hier fast konstant. Anstatt einer Dekompositionsphase ist ein „Plateau“ zu beobachten.

Die Höhe und die Verschiebung dieses Plateaus diene als Ansatzpunkt zur Beurteilung der antioxidativen Kapazität der jeweiligen Testsubstanzen/Extrakte: je niedriger das Plateau, desto weniger konjugierte Diene werden gebildet, die Testsubstanz wirkt antioxidativ.

2.5.5 Auswertung der Meßergebnisse

Falls nicht anders angegeben, stellen die Ergebnisse den Mittelwert von 2 Versuchstagen mit je 3 Parallelen und die dazugehörige Standardabweichung (σ_{n-1}) dar.

Bei den Systemen mit LDL wurde jeweils ein repräsentatives Ergebnis eines Versuchs dargestellt.

In allen Testsystemen wurden Kontrollen durchgeführt, die Störungen der Nachweisreaktion durch die eingesetzten Substanzen ausschließen sollten.

Folgende Software wurde zur Auswertung und Darstellung der Ergebnisse verwendet:

Office 97, Microcal Origin 6.1, Isis Draw 1.2.

2.6 Selektionskriterien und Bewertung der Johanniskrauttypen

2.6.1 Selektionskriterien der agronomischen Merkmale

Folgende Eigenschaften der Pflanze bestimmen deren agronomische Merkmale bzw. Anforderungen und wurden daher als Selektions- und Bewertungskriterien herangezogen:

Hohe und stabile Erträge:

- hoher Blüten- und Blattanteil
- viele Triebe
- gleichmäßige Blühentwicklung
- Nachtriebsvermögen für einen ertragreichen 2. Schnitt
- Toleranz gegen *Colletotrichum gloeosporioides*

Technologische Eignung:

- aufrechter, niedriger Wuchs
- Standfestigkeit
- gleichmäßige Bestandeshöhe
- kompakter Blühhorizont
- geringe Lagerneigung

Je weniger eine Sorte oder Selektion von diesen Eigenschaften aufweisen konnte, desto schlechter wurde sie in agronomischer Hinsicht beurteilt.

2.6.2 Selektionskriterien der pharmakologischen Merkmale

Hoher Gehalt an pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffen

Ein in allen drei relevanten Substanzgruppen (Flavonoide, Hypericine, Hyperforine) ausgeglichener und hoher Gehalt wurde als optimal und damit am besten bewertet.

Das Quercetin-Glycosid Rutin nimmt dabei eine Sonderstellung ein. Das Fehlen von Rutin stellt ein Ausschlußkriterium dar, da eine solche Droge/Pflanze nicht arzneibuchkonform ist.

Hohe pharmakologische Wirksamkeit/Bioaktivität

Durch die Ergebnisse der Extrakte der verschiedenen Phänotypen in den biochemischen Testsystemen kann eine Aussage über deren pharmakologische Wirksamkeit getroffen werden. Ein Extrakt/Phänotyp wurde als gut bewertet, wenn er in möglichst vielen Testsystemen ein gutes Ergebnis erzielte.

2.6.3 Gesamtbeurteilung

Die Gesamtbeurteilung der Selektionen und Sorten setzte sich aus den einzelnen Bewertungen der agronomischen und pharmakologischen Merkmalen zusammen. Eine gute Sorte bzw. ein guter Johanniskrauttyp muß optimale agronomische und pharmakologische Merkmale aufweisen, um die Anforderungen/Zuchtziele zu erfüllen. Daher wurden Pharmakologie und Agronomie gleich gewichtet, wie in Abb. 14 ersichtlich, und zu einer Gesamtbeurteilung verbunden.

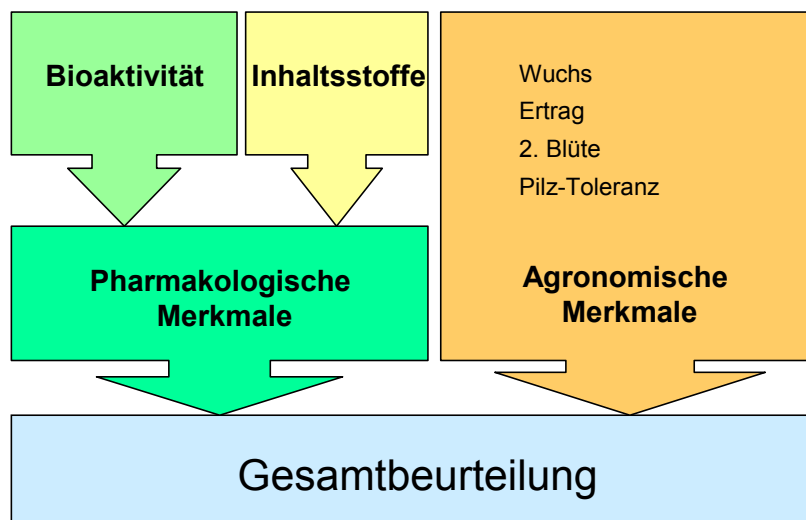


Abb. 14: Schema zur Gesamtbeurteilung der Merkmale einer Sorte oder Selektion

III ERGEBNISSE

1 VERSUCHSJAHR 1999

1.1 Ergebnisse des Feldanbaus

1.1.1 Morphologische Charakterisierung der *Hypericum*-Phänotypen

Aus dem Samen eines schmal- und eines breitblättrigen *Hypericum*-Phänotyps wurden im Jahr 1998 Pflanzen angezogen und getrennt nach ihrer Herkunft aufgepflanzt.

Im breitblättrigen Bestand konnten im Jahr 1999 drei Hauptphänotypen unterschieden werden:

BN breitblättrig, normaler Typ

BB extrem breitblättrig

BR breitblättrig, Rotstengel-Typ mit sehr wenig Hypericinbehältern auf den Blättern

Neben dem normalen BR-Typ wurden zwei weitere BR-Phänotypen gefunden, die sich nur geringfügig vom Haupttyp unterschieden:

BR+/- breitblättriger Rotstengel-Typ mit vermehrt Hypericinbehältern auf den Blättern und Hypericinbehältern im Fruchtknotenquerschnitt

BR+/- breitblättriger Rotstengel-Typ mit vermehrt Hypericinbehältern auf den Blättern ohne Hypericinbehältern im Fruchtknotenquerschnitt

Aus dem schmalblättrigen Saatgut ging ein sehr einheitlicher Pflanzenbestand hervor.

Es konnten nur zwei Phänotypen identifiziert werden:

SN schmalblättrig, normaler Typ

SR schmalblättrig, Rotstengel-Typ, der insgesamt mit nur vier Pflanzen vertreten war.

Die 4 Haupttypen BN, BB, BR, SN konnten anhand phänotypischer Merkmale von Blatt, Stengel und Blüte, wie in Tab. 4 veranschaulicht, charakterisiert werden.

Tab. 4: Phänotypische Merkmale der *Hypericum*-Typen BN, BB, BR und SN

Typ	Blatt		Stengel			Blüte		
	Hypericinbehälter	Wuchs	Rotfärbung	Anzahl	Pflanzenhöhe [cm]	Horizont [cm]	Hypericinbehälter	Hypericinbehälter im Fr-Knoten
BN	3	aufrecht	nur Triebspitze	25 ± 7	92 ± 6	18 ± 5	1	-
BB	2	aufrecht	keine	18 ± 8	99 ± 11	16 ± 5	2	-
BR	1	standschwach	gesamter Stengel	10 ± 5	81 ± 8	13 ± 5	1	+
SN	2	aufrecht	nur Triebspitze	32 ± 9	71 ± 5	13 ± 3	3	-

Boniturschema: s. Material und Methoden 2.2.2

BN wies die meisten Hypericinbehälter auf der Blattspreite auf, gefolgt von BB und SN. BR besaß die wenigsten Hypericinbehälter.

Als einziger Pflanzentyp hatte BR einen sehr standschwachen Wuchs und zeichnete sich durch eine Rotfärbung des gesamten Stengels aus. Bei BN und SN zeigten nur die Triebspitzen eine rötliche Färbung, bei BB fehlte auch diese völlig.

Die Anzahl der Triebe pro Pflanze war bei SN deutlich am größten, wobei dieser Typ gleichzeitig die niedrigste Pflanzenhöhe erreichte. Mit weniger als 20 bildeten BB und besonders BR die geringste Anzahl an Stengeln aus. Die höchsten Pflanzen brachte BB hervor.

Der Blühhorizont war bei den „hohen“ Typen BB und BN am größten, bei den niedrigen Typen BR und SN dagegen deutlich geringer.

Die meisten Hypericinbehälter auf den Petalen bildete der SN-Phänotyp. BN und BR zeigten kaum Hypericin auf ihren Blütenblättern. BR besaß als einziger Hypericinbehälter in seinem Fruchtknotenquerschnitt.

Zur Verdeutlichung werden die wichtigsten metrischen Merkmale, Stengelanzahl und Pflanzenhöhe, in den Abbildungen 15 und 16 mittels Box-Plot-Diagrammen nochmals graphisch dargestellt:

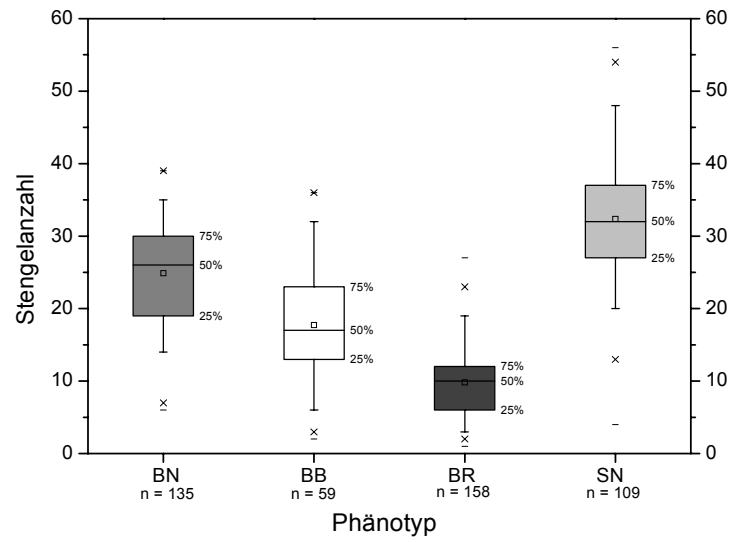


Abb. 15: Stengelanzahl der Johanniskrautphänotypen BN, BB, BR und SN

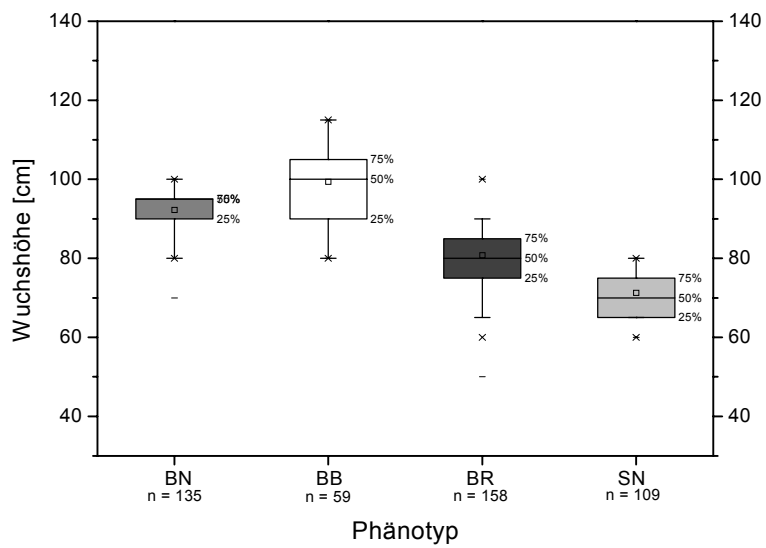


Abb. 16: Wuchshöhe der Phänotypen BN, BB, BR und SN

1.1.2 Ertragsparameter

Neben den phänotypischen Merkmalen ist der Ertrag ein entscheidender Parameter zur Charakterisierung und Validierung der Pflanzentypen.

Die folgende Tab. 5 erfasst die verschiedenen Ertragsparameter der 4 Phänotypen. Es werden sowohl die Erträge der Frischsubstanz (FS) und der Trockensubstanz (TS) der Einzelpflanzen jeden Typs, als auch der TS-Ertrag pro ha (40.000 Pflanzen) dargestellt. Das Verhältnis FS zu TS gibt Auskunft über den Gewichtsverlust bei der Trocknung.

Johanniskraut besitzt im Allgemeinen die Fähigkeit, nach der Ernte erneut zur Blüte zu kommen. Ein 2. Schnitt wird im Praxisanbau häufig durchgeführt. Daher wurde ebenfalls bonitiert, ob eine 2. Blüte stattfand.

Tab. 5: Ertragsparameter der Phänotypen BN, BB, BR und SN

Typ	Ertrag pro Pflanze		kg TS/ha	FS / TS	2. Blüte
	FS [g]	TS [g]			
BN	177 ± 66	43 ± 17	1720	4,4	+
BB	175 ± 78	39 ± 19	1560	4,8	+
BR	66 ± 43	16 ± 12	640	4,3	+
SN	113 ± 39	33 ± 11	1320	3,5	-

Boniturschema: s. Material und Methoden 2.2.2

Der TS-Ertrag der Einzelpflanzen ist in der nachstehenden Abb. 17 anhand von Box-Plot-Diagrammen nochmals veranschaulicht.

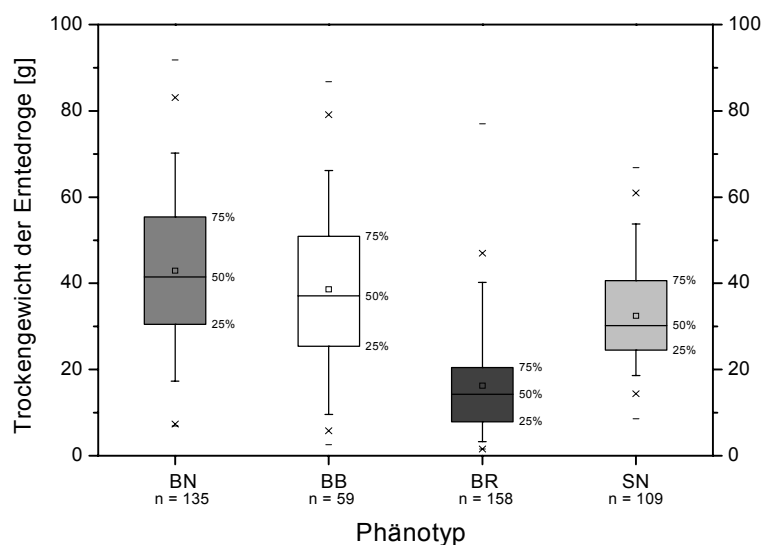


Abb. 17: Trockengewicht der Erntedroge von BN, BB, BR und SN

Die Phänotypen BN und BB erbrachten mit ca. 40 g TS pro Pflanze die höchsten Erträge. SN erreichte dagegen nur etwa 30 g TS pro Pflanze, zeichnete sich aber durch das niedrigste FS/TS-Verhältnis aus. BR erzielte den geringsten Ertrag. Eine 2. Blüte war nur bei den breitblättrigen Pflanzentypen zu beobachten.

Zusammenfassung der Ergebnisse des Feldanbaus 1999:

- Es konnten 4 Hauptphänotypen (BN, BB, BR und SN) anhand morphologischer Merkmale charakterisiert werden.
- Der schmalblättrige Phänotyp SN wies im Vergleich zu den übrigen Typen die meisten Hypericinbehälter auf den Petalen auf. Weiterhin zeichnete er sich durch einen kompakten Wuchs, der höchsten Stengelanzahl pro Pflanze und einem niedrigen FS/TS-Verhältnis aus.
- BN erzielte von allen Phänotypen den höchsten Ertrag, besaß aber kaum Hypericinbehälter auf den Petalen.
- Die Pflanzen des Typs BB zeigten den höchsten Wuchs, die besten Erträge bei geringer Stengelanzahl, aber auch das größte FS/TS-Verhältnis.
- BR schnitt bei allen agronomisch wichtigen Merkmalen am schlechtesten ab.

1.2 Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen

Um die Pflanzentypen anhand ihrer pharmakologischen Merkmale charakterisieren und bewerten zu können, wurde aus dem Drogenmaterial von je 5 Einzelpflanzen des entsprechenden Phänotyps eine Mischprobe erstellt und diese zu einem Extrakt verarbeitet (s. Material und Methoden 2.3.1).

Aufgrund der unterschiedlichen Drogeneinwaage und um eine qualitative Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die fertigen Extrakte vor dem Einsatz in das Testsystem auf 20 mg Drogeneinwaage/ml Extraktendvolumen eingestellt. Die weiteren Verdünnungsschritte gingen von diesem Standard als Basis aus.

Die Extrakte werden im Folgenden nur mit dem Phänotyp-Kürzel und ihrer laufenden Nummer aufgeführt.

1.2.1 Inhaltsstoffanalytik

Da das Wirkprinzip von *Hypericum* nicht auf eine Substanz oder Substanzklasse festgelegt werden kann, ist ein möglichst hoher Gehalt und ein breites Spektrum an Inhaltsstoffen anzustreben.

Zur qualitativen und quantitativen Erfassung der Inhaltsstoffe wurden pro Phänotyp 5 Extrakte (aus je 5 Pflanzen) 1:10 verdünnt und mit Hilfe der HPLC bei 254 nm analysiert.

In Abb. 18 werden die Substanzklassen folgendermaßen zusammengefaßt:

Hypericine = Pseudohypericin, Hypericin

Biflavone = Amentoflavon, Biapigenin

Quercetin u. dessen Derivate = Rutin, Hyperosid, Isoquercitrin, Quercitrin, Quercetin

Zwei quantitativ auffällige, aber nicht näher bestimmbare Substanzen mit einer Retentionszeit (RT) von 10 bzw. 32 min werden ebenfalls mit aufgeführt.

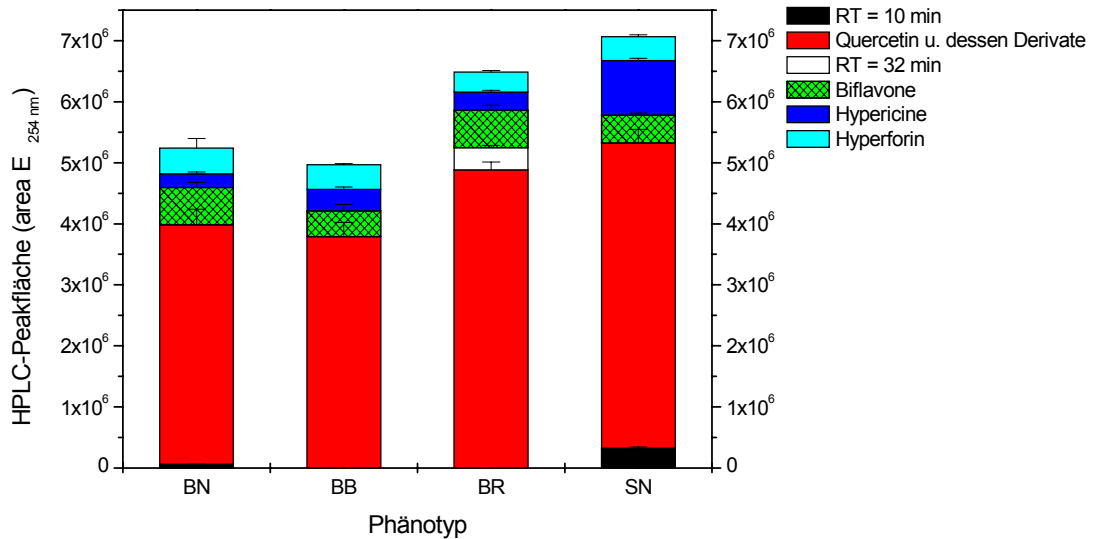


Abb. 18: Qualitativer und quantitativer Vergleich der Inhaltsstoffe der Phänotypen BN, BB, BR und SN

SN und BR enthielten nicht nur die größten Mengen an Quercetin-Derivaten, sondern hatten auch die größte Summe an Inhaltsstoffen allgemein. BB wies die geringste Menge an Quercetin-Derivaten und an Gesamt-Inhaltsstoffen auf. BR zeichnete sich durch besonders viel Biflavone aus. Der Gehalt an Hypericinen war bei SN deutlich am höchsten, gefolgt von BB. Hier spiegelte sich die Bonitur der Hypericinbehälter auf den Blütenblättern wider.

Alle Phänotypen enthielten vergleichbare Mengen an Hyperforin. Die Chromatogramme von SN und BN wiesen zusätzlich eine unbekannte Substanz bei RT = 10 min auf. Auch bei BR war ein nicht identifizierter Stoff bei RT = 32 min vorhanden, der in größeren Mengen vorlag, aber nicht zum typischen Inhaltsstoffspektrum gehörte.

Bei sämtlichen Phänotypen waren alle charakteristischen Quercetin-Derivate in ausreichenden Mengen vorhanden, mit Ausnahme von Rutin. Hier zeigten sich, wie in Abb. 19 zu sehen, gravierende Unterschiede.

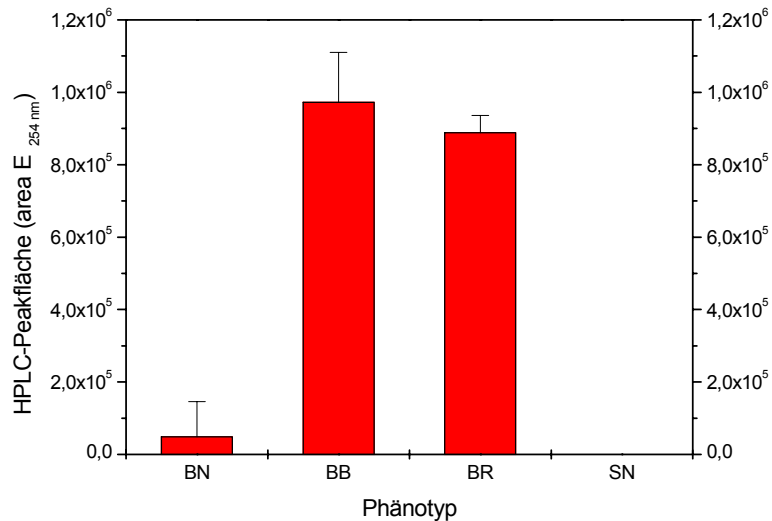


Abb. 19: Rutingehalt der Phänotypen BN, BB, BR und SN

Im Gegensatz zu BN enthielten BB und BR weit größere Mengen an Rutin. Bei SN fehlte diese Substanz völlig.

Zusammenfassung der Inhaltsstoffanalytik:

- SN enthielt die größte Menge an Inhaltsstoffen. Ebenso wies dieser Phänotyp den höchsten Gehalt sowohl an Hypericinen als auch an Quercetin und dessen Derivaten auf, Rutin allerdings fehlte völlig.
- Biflavone waren besonders bei BR in größeren Mengen vorhanden.
- Der Gehalt an Hyperforin lag bei allen Phänotypen im selben Bereich.
- SN und BN wiesen eine unbekannte Substanz mit einer Retentionszeit von 10 min auf. BR hatte bei RT = 32 min im Chromatogramm einen auffälligen, nicht identifizierten Inhaltsstoff.
- Die Ergebnisse der Hypericinbestimmung an der HPLC konnten die Bonitur der Hypericinbehälter auf den Petalen bestätigen.

1.2.2 Vergleich der Wirksamkeit der verschiedenen Phänotypen in biochemischen Testsystemen

Eine Beurteilung der Extrakte allein anhand ihrer Inhaltsstoffe ist kaum möglich, da sie ein komplexes Substanzgemisch darstellen und die pharmakologische Relevanz der einzelnen Stoffe nicht geklärt ist. Mittels biochemischer und physiologisch relevanter Testsysteme kann die Bioaktivität der Extrakte ermittelt werden. Dies stellt ein weiteres Kriterium zur Unterscheidung und Selektion von *Hypericum*-Phänotypen dar.

1.2.2.1 POD-katalysierte Dimerisierung von L-Tyrosin

Peroxidasen sind in der Lage mit Hilfe von H₂O₂ Methionin-Enkephaline (opioide Peptide) an ihrem N-terminalen Tyrosinrest miteinander zu verbinden (ROSEI ET AL., 1991). Durch die Verwendung von L-Tyrosin konnte der Versuchsansatz wesentlich vereinfacht werden (DENKE, 1997).

Testansatz:

Phosphatpuffer pH 8,2	50 mM i.A.
L-Tyrosin (in 20 mM NaOH)	0,5 mM i.A.
Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen	
H ₂ O ₂	0,33 mM i.A.
Reaktionsstart: POD aus Meerrettich	3 U i.A.
Inkubation: 60 min bei 37 °C	

Die Tyrosin-Dimere wurde an der HPLC quantifiziert.

Die Dimermenge der, nur mit Lösungsmittel angesetzten, Grundreaktion wurde gleich 100% gesetzt. Die mit Testsubstanzen gemessenen Dimere wurden dazu ins Verhältnis gesetzt.

Dieses System wurde bereits in früheren Arbeiten (DENKE, 1997; MANN, 1998) zur Unterscheidung von *Hypericum*-Extrakten verwendet und diente bei den vorliegenden Untersuchungen als Standardsystem.

1.2.2.1.1 Versuchsreihe zur Maceration von *Hypericum*-Droge

Das Herstellungsverfahren der Johanniskrautextrakte hat einen entscheidenden Einfluß auf die Ergebnisse in den verwendeten Testsystemen. Daher wurden zunächst die verschiedenen Parameter der Extraktion, wie Drogenaufbereitung, Extraktionsmittel, Droge-Extraktionsmittel-Verhältnis, Extraktionstemperatur und -dauer, variiert. Die entsprechenden Extrakte wurden im Tyrosin-Testsystem eingesetzt und deren Einfluß auf die Hemmung der Tyrosin-Dimerisierung betrachtet.

Ziel dieser Untersuchungen war es, ein optimales Verfahren zu ermitteln, bei dem die Extrakte eine möglichst große Wirksamkeit im Testsystem der Tyrosin-Dimerisierung entfalten.

Anhand einer Konzentrationsreihe wurde bestimmt, welche Konzentration i.A. zur Unterscheidung der einzelnen Extrakte am günstigsten ist. Eine einheitliche Konzentration i.A. konnte dabei nicht gefunden werden. Die Extrakte jeder Versuchsvariante mußten daher mit der für sie individuell ermittelten Konzentration in das Testsystem eingesetzt werden.

Vergleich von Methanol und Ethanol als Extraktionsmittel

Bei der Herstellung dieser Extrakte wurden Ethanol und Methanol mit verschiedenen Vol% verwendet. Der Einfluß der Variationen auf die Wirksamkeit dieser Extrakte im Testsystem der Tyrosin-Dimerisierung ist in Abb. 20 dargestellt.

Die weiteren Parameter wurden mit geschnittener Droge, einem Verhältnis Droge zu Extraktionsmittel von 1:16 und 8 h Extraktionsdauer bei 40 °C festgelegt.

Die Konzentration der Extrakte i.A. betrug 2%.

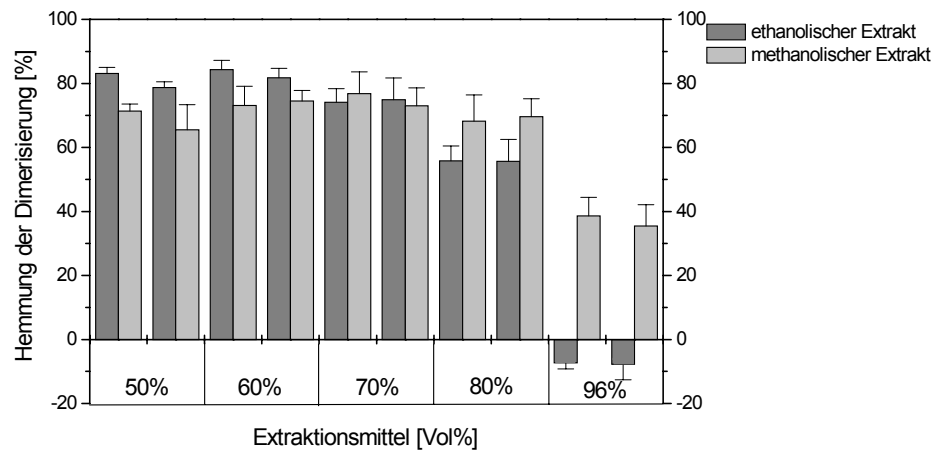


Abb. 20: Vergleich der mit unterschiedlichen Lösungsmitteln hergestellten Extrakte anhand der Hemmung der Dimerisierung von Tyrosin

Die ethanolischen Extrakte bis 60 Vol% waren in ihrer Hemmleistung wirksamer als die entsprechenden methanolischen Extrakte. Bei 70 Vol% waren keine Unterschiede zwischen den beiden Lösungsmitteln zu erkennen. Die Wirksamkeit der Ethanol-Extrakte sank bei 80 Vol% erheblich, während dies bei den Methanol-Extrakten nicht zu beobachten war. Schließlich trat in der höchsten Vol%-Konzentration bei Ethanol eine Stimulierung der Dimerisierung ein, wohingegen die Methanol-Variante eine noch ca. 35%ige Hemmung dieser Reaktion erreichte.

Zeitkinetik

Bei den in Abb. 21 dargestellten Extrakten wurde die Dauer der Maceration mit 2, 4, 6, 8 und 16 h variiert. Die weiteren Parameter blieben konstant, so daß die pulverisierte Droge bei 40°C mit 96%igem Ethanol im Verhältnis 1:100 extrahiert wurde.

Die Extrakte wurden mit 10% i.A. in das Testsystem eingesetzt.

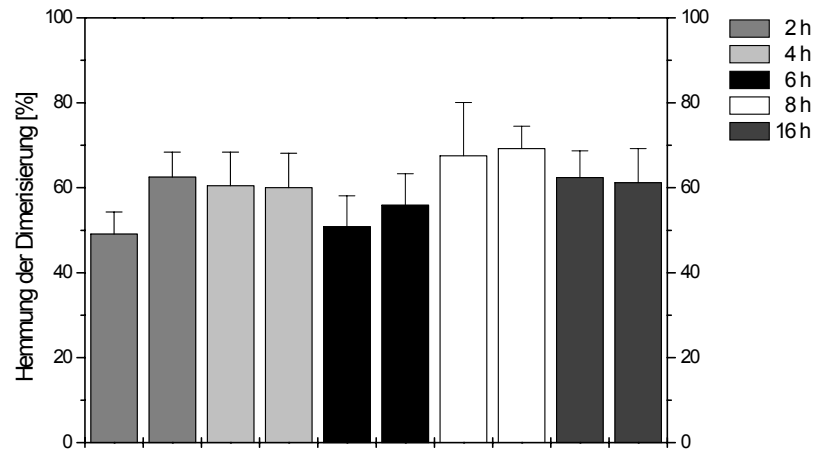


Abb. 21: Einfluß der Macerationsdauer auf die Hemmung der Dimerisierung

Die Extrakte der 6 h-Variante sowie der erste Extrakt der 2 h-Maceration hemmten im Vergleich zu den übrigen Herstellungsarten die Dimerisierung von Tyrosin am geringsten. Eine Macerationsdauer von 8 h erzielte mit den entsprechenden Extrakten die beste Wirksamkeit im Testsystem.

Variationen von Drogenschnitt, Droge/Lösungsmittel-Verhältnis und Extraktionsdauer

Zwei Zerkleinerungsstufen der Johanniskrautdroge, pulverisiert und geschnitten, wurden bei der Herstellung der folgenden Extrakte verwendet. Die beiden Zerkleinerungsstufen wurden außerdem mit verschiedenen Verhältnissen von Droge zu Extraktionsmittel kombiniert. Die Extraktionsdauer betrug 4 bzw. 16 h.

Als Extraktionsmittel diente 50%iges Ethanol. Die Temperatur betrug 40 °C und die Extrakte wurden mit 1% i.A. eingesetzt. Der Einfluß der Extrakte auf die Dimerisierung wird in den Abb. 22 und 23 veranschaulicht.

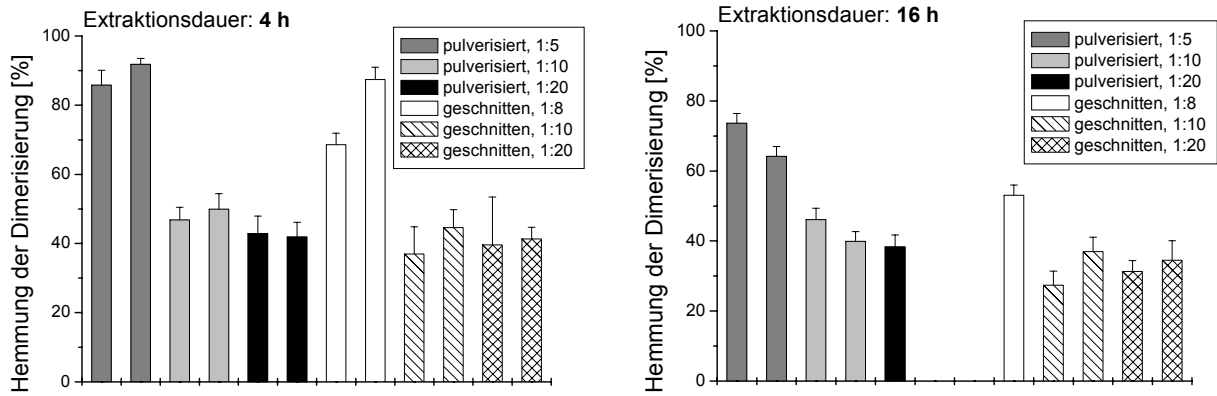


Abb. 22/23: Verschiedene Herstellungsarten im Vergleich ihrer Wirksamkeit im Tyrosin-Dimer-System. Zwei Extrakte aus den 16 h-Varianten wurden nicht gemessen.

Die pulverisierte Aufbereitung der Droge brachte bei sonst konstanten Herstellungsbedingungen die wirksamsten Extrakte hervor. Die Extrakte mit dem Droge/Extraktionsmittel-Verhältnis 1:5 bzw. 1:8 besaßen eine wesentlich bessere Hemmleistung als die Varianten mit 1:10 und 1:20. Die Extrakte mit einer Macerationsdauer von 16 h erreichten, unabhängig von ihrer sonstigen Herstellungsweise, eine geringere Wirksamkeit im Testsystem als die 4 h-Extrakte.

Temperatur

Bei diesen Extrakten wurden zwei verschiedene Temperaturen (40 und 60 °C) als Rahmenbedingungen für die Maceration gewählt. Die geschnittene Droge wurde 10 h lang mit 50%igem Ethanol extrahiert. Das Droge/Extraktionsmittel-Verhältnis lag bei 1:16.

Dies galt jedoch nicht für zwei weitere Extrakte. Hier wurde dieselbe Droge zweimal mit einem Droge/Extraktionsmittel-Verhältnis von 1:8 maceriert und diese beiden Extrakte wurden anschließend miteinander vereinigt.

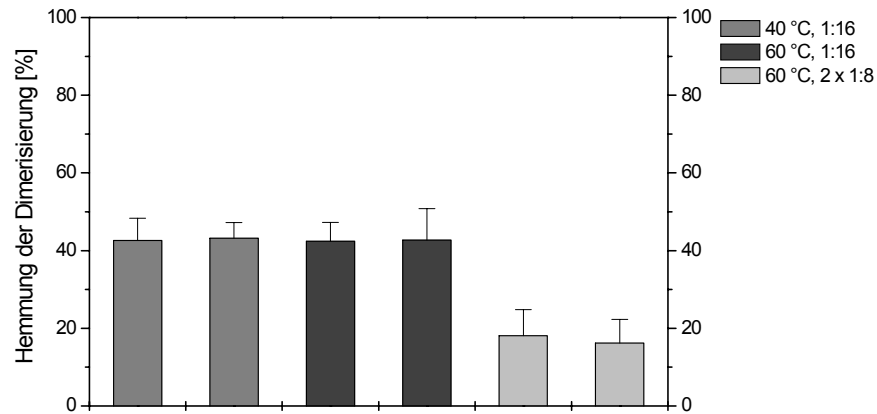


Abb. 24: Einfluß der Macerationstemperatur auf die Wirksamkeit der Extrakte im Testsystem der Tyrosin-Dimerisierung

Die Unterschiede in der Macerationstemperatur bei den Extrakten spiegelten sich in keiner Weise in der Hemmwirkung wider. Die Extrakte der 60°C und 2 x 1:8 Variante zeigten im Vergleich jedoch eine deutlich niedrigere Wirksamkeit im Testsystem auf.

Zusammenfassung der Extraktionsversuche:

- Extraktionsmittel:

Die ethanolischen Extrakte mit 50 Vol% erzielten bei dem Vergleich der Lösungsmittel die beste Wirksamkeit im Testsystem. Eine Steigerung der Vol% hatte keinen bzw. sogar einen negativen Einfluß.

Die Hemmleistung der methanolischen Extrakte war weitgehend Vol% unabhängig. Erst bei reinem Methanol als Lösungsmittel trat eine wesentliche Verschlechterung der Wirksamkeit der Extrakte auf.

- Extraktionsdauer:

Ein Einfluß der Extraktionsdauer auf die Hemmleistung im Testsystem der Tyrosin-Dimerisierung war bei den hierfür hergestellten Extrakten mit 2-16 h Macerationsdauer nicht eindeutig nachzuweisen.

Im Rahmen des Extraktvergleichs mit unterschiedlicher Droгенаufbereitung und unterschiedlichem Droge/Lösungsmittel-Verhältnis zeigten die 4 h-Extrakte eine eindeutig bessere Wirkung als die gleich hergestellten 16 h-Extrakte.

- Drogenaufbereitung:

Die Extrakte aus pulverisierter Johanniskrautdroge waren vergleichbaren Extrakten aus geschnittener Ware im Testsystem überlegen.

- Droge/Extraktionsmittel-Verhältnis:

Je geringer das Verhältnis von Droge zu Extraktionsmittel war, desto besser wurde die Dimerisierung von Tyrosin gehemmt.

- Temperatur:

Die untersuchten Extrakte ließen keinen Unterschied zwischen einer Maceration bei 40 bzw. 60 °C erkennen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit die folgende Herstellungsmethode für alle Johanniskrautextraktionen gewählt (s. Material und Methoden 2.3.3):

- Drogenaufbereitung: pulverisiert
- Extraktionsmittel: Ethanol 50 Vol%
- Droge/Extraktionsmittel-Verhältnis: 1:16

Bei einem geringeren Verhältnis wurde die Droge häufig nicht von Lösungsmittel bedeckt.

- Extraktionsdauer: 4 h
- Temperatur: 40 °C

1.2.2.1.2 *Hypericum*-Extrakte des Feldanbaus 1999

Ermittlung der Testkonzentration zum Vergleich der Extrakte

Die optimale Konzentration zum Vergleich der Extrakte wurde ermittelt, indem von jedem Pflanzentyp willkürlich ein Extrakt herausgegriffen und eine Konzentrationsreihe erstellt wurde. Diese wurde im Tyrosin-Dimer-System getestet. Dabei zeigte sich, wie in Abb. 25 zu sehen, folgendes Ergebnis:

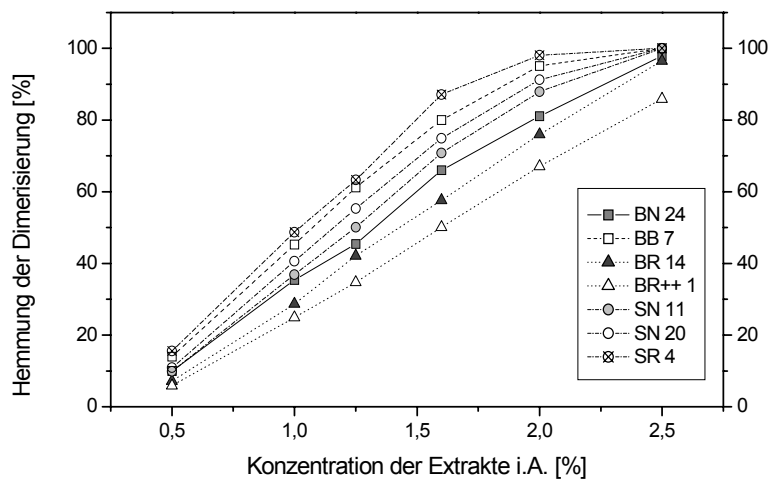


Abb. 25: Konzentrationsreihe verschiedener Extrakte im Tyrosin-Dimer-System

Bei einer Extraktkonzentration von 1,6% i.A. zeigten die einzelnen Extrakte den größten Unterschied hinsichtlich ihrer Hemmleistung im Testsystem.

Im Folgenden wurden daher alle Extrakte bei einer Konzentration i.A. von 1,6% getestet und miteinander verglichen.

BN-Extrakte

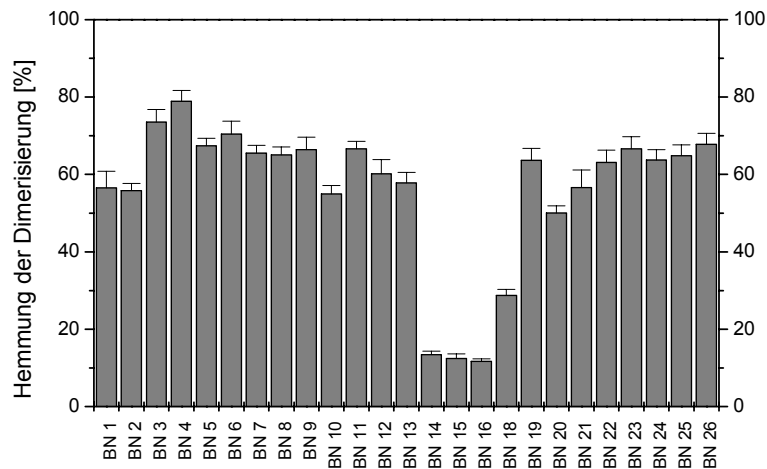


Abb. 26: Hemmung der Dimerisierung von Tyrosin durch die Extrakte des Phänotyps BN

Die Extrakte BN 14 bis 16 lagen deutlich hinter der Wirksamkeit der übrigen BN-Extrakte zurück. Bei der Trocknung der Ausgangsdroge dieser Extrakte kam es zu einer Fehlfunktion des Trockenschrankes. Das Pflanzenmaterial wurde nicht, wie üblich, bei 40 °C, sondern bei ca. 70-80 °C getrocknet und war innerhalb kürzester Zeit verbräunt. Das schlechte Ergebnis von BN 18 kann nicht erklärt werden. Die Extrakte BN 3 und BN 4 schnitten innerhalb dieser Extraktgruppe am besten ab. Die Pflanzen, aus denen sie gewonnen wurden, standen ausnahmslos in der 1. Reihe des Versuchsfeldes.

BB-Extrakte

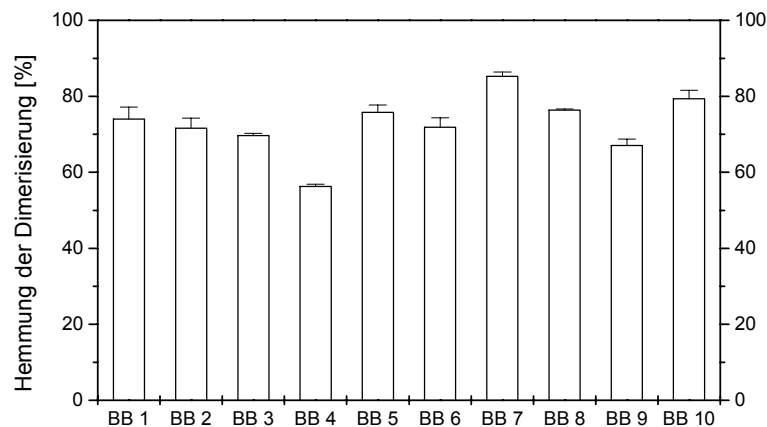


Abb. 27: Hemmung der Dimerisierung von Tyrosin durch die Extrakte des Phänotyps BB

Die Extrakte schwanken alle um einen Mittelwert von etwa 70% Hemmung der Dimerisierung. Dabei lag BB 4 mit ca. 60% Hemmleistung um 30%-Punkte hinter BB 7, dem besten Extrakt mit fast 90% Hemmung.

BR-Extrakte

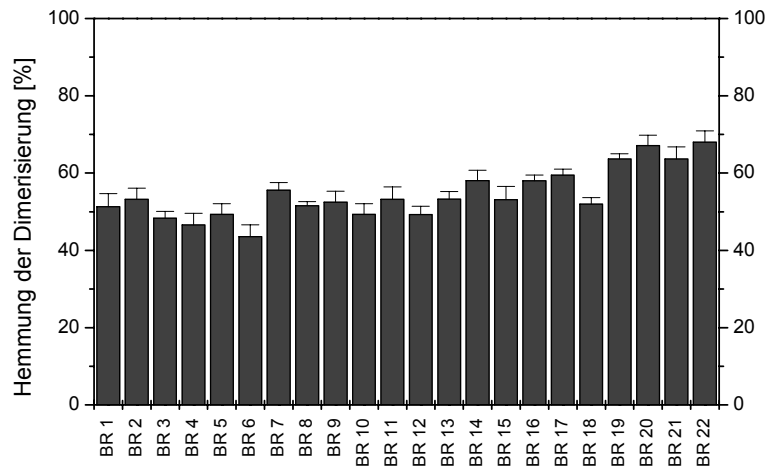


Abb. 28: Hemmung der Dimerisierung von Tyrosin durch die Extrakte des Phänotyps BR

Im Vergleich zu den bisherigen Pflanzentypen BN und BB schnitt der BR-Typ im Testsystem mit durchschnittlich 50% Hemmleistung deutlich schlechter ab. Die besten Extrakte (BR 19 - BR 22) stammten wiederum ausschließlich von Pflanzen aus der 1. Reihe des Versuchsfeldes (s. BN-Extrakte).

BR-Untertypen

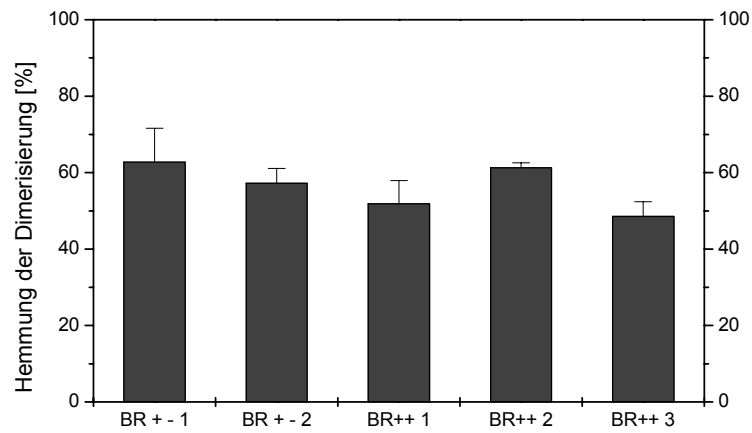


Abb. 29: Hemmung der Dimerisierung von Tyrosin durch die Extrakte des Phänotyps BR

Die BR-Untertypen lagen in ihrer Wirksamkeit zwischen 50% bei BR++ 3 und 60% bei BR+-1. Aufgrund der Schwankungen der Extrakte des jeweiligen Phänotyps konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Pflanzentypen abgeleitet werden.

SN- und SR-Extrakte

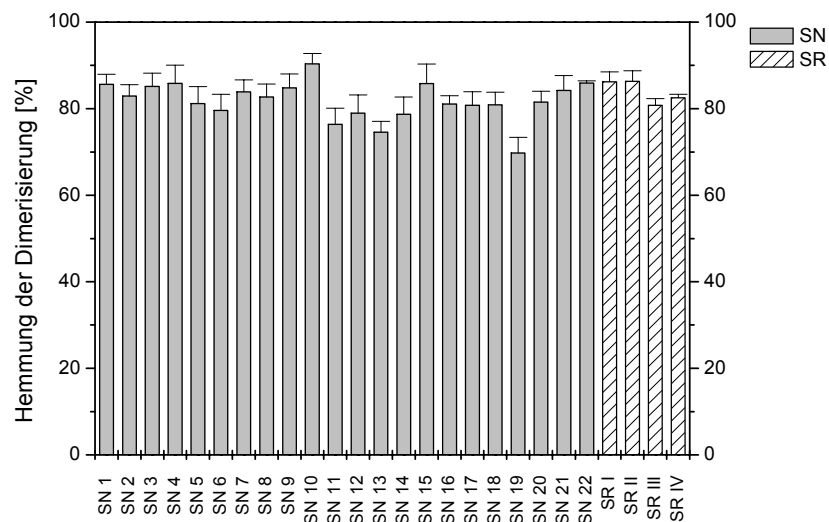


Abb. 30: Hemmung der Dimerisierung von Tyrosin durch die Extrakte der Phänotypen SN und SR

Die SN-Extrakte zeigten untereinander eine relativ geringe Schwankung in ihrer Hemmleistung, die teils fast 90% betrug. Die SR-Extrakte zeigten die gleiche Wirkung wie die SN-Extrakte.

Vergleich der Phänotypen und ihrer Varianten

Um einen besseren Vergleich der Phänotypen und ihrer Wirkung auf die Hemmleistung bei der Dimerisierung von Tyrosin zu ermöglichen, wurden die erzielten Hemmwerte der Einzelextrakte eines Phänotyps miteinander verrechnet. Dabei wurden Extrakte aus Pflanzen der 1. Reihe, sowie verbrannte Drogen-Chargen gesondert betrachtet, wie in Abb. 31 zu sehen.

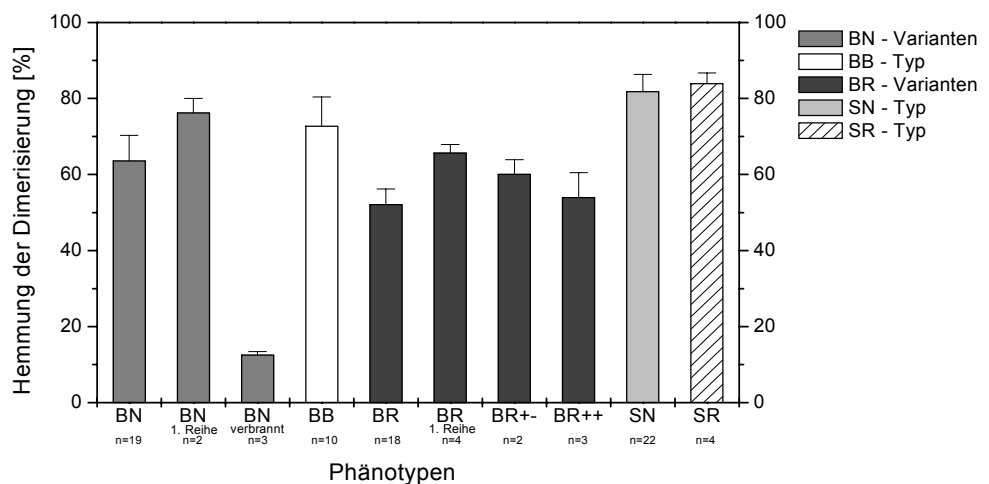


Abb. 31: Vergleich der verschiedenen Phänotypen anhand der gemittelten Hemmwerte der Einzelextrakte

Die schmalblättrigen Pflanzentypen SN und SR zeigten die beste Hemmwirkung im Tyrosin-Testsystem, gefolgt von BB. Der auf dem breitblättrigen Feldabschnitt häufigste Phänotyp BN schnitt im Tyrosin-Dimer-System nur mittelmäßig ab. Der BR-Typ zeigte im Testsystem, wie bereits in der Feldbonitur, die schlechtesten Ergebnisse.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Extrakte des Feldanbaus 1999 im Tyrosin-Dimer-System:

- Die Phänotypen BN, BB, BR und SN konnten anhand ihrer Hemmleistung unterschieden werden. Aufsteigend nach ihrer Hemmwirkung geordnet, ergab sich folgende Reihenfolge: BR, BN, BB, SN.
- Extrakte, die von Pflanzen aus der 1. Reihe des Versuchsfeldes gewonnen wurden, zeigten eine bessere Wirkung als Extrakte aus Pflanzen desselben Phänotyps, die mitten im Bestand gewachsen waren.
- Extrakte aus verbranntem/verbräuntem Drogenmaterial zeigten kaum mehr eine Hemmwirkung im System.

1.2.2.1.3 Einzelsubstanzen

Verschiedene, käufliche Inhaltsstoffe aus *Hypericum* wurden als Einzelsubstanzen in das Dimer-System eingesetzt, um Aufschluß über die wirksamen Komponenten in den Extrakten zu erhalten.

Quercetin und Quercetin-Glykoside

Zunächst wurden Quercetin und dessen Glykoside Rutin, Hyperosid, Isoquercitrin und Quercitrin auf ihre Wirksamkeit im Testsystem untersucht (Abb. 32).

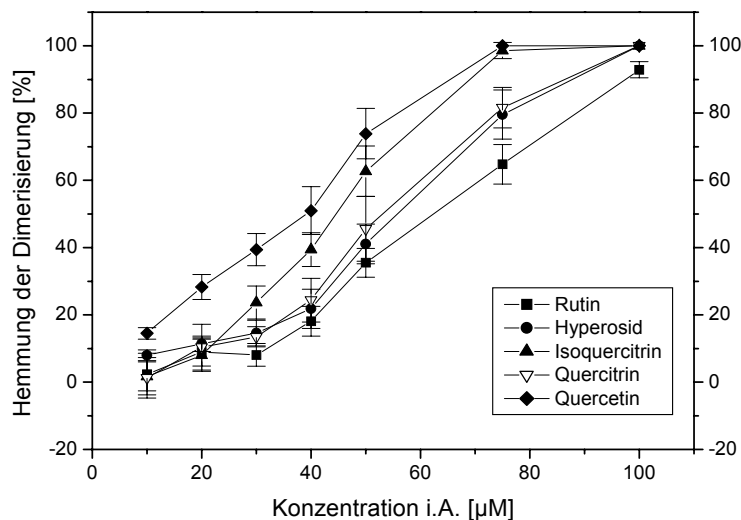


Abb. 32: Wirksamkeit von Quercetin und seinen Glykosiden im Tyrosin-Dimer-System

Die Dimerisierung von Tyrosin wurde konzentrationsabhängig von allen Substanzen gehemmt, Quercetin zeigte dabei die beste Wirksamkeit. Bei den Glykosiden konnte

Isoquercitrin die Reaktion am besten hemmen, gefolgt von Hyperosid und Quercitrin. Rutin schnitt hierbei am schlechtesten ab.

Hypericin, Pseudohypericin und Amentoflavon

Aus der Gruppe der Biflavone wurde nur Amentoflavon in das System eingesetzt, da Biapigenin nicht im Handel erhältlich ist.

In Abb. 33 werden exemplarisch die Ergebnisse eines Versuchsansatzes dargestellt.

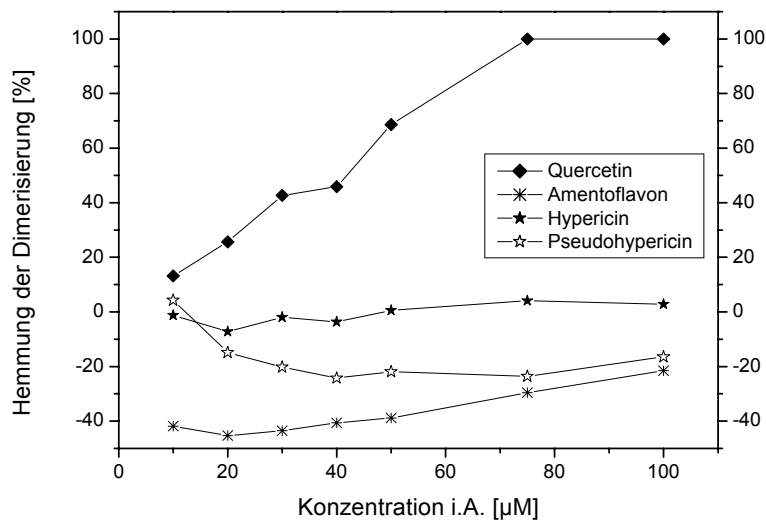


Abb. 33: Vergleich von Quercetin mit Hypericin, Pseudohypericin und Amentoflavon im Tyrosin-Dimer-System

Im Gegensatz zu Quercetin trat bei den Hypericinen und bei Amentoflavon keine Hemmung der Dimerisierung auf. Pseudohypericin stimulierte in höheren Konzentrationen die Dimerbildung. Hypericin selbst zeigte keinen Einfluß auf die Reaktion. Amentoflavon förderte v.a. bei niedrigen Konzentrationen die Entstehung von Dimeren.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Einzelsubstanzen im Tyrosin-Dimer-System:

- Quercetin und seine Glykoside konnten die Dimerisierungsreaktion konzentrationsabhängig hemmen. Das Aglykon Quercetin zeigte die beste Hemmwirkung.
- Hypericin hatte keinen Einfluß auf die Dimerbildung. Pseudohypericin stimulierte die Grundreaktion des Systems.
- Amentoflavon regte von allen Substanzen die Bildung von Dimeren am stärksten an.

1.2.2.2 IAA-Oxidation durch POD

Die Oxidation der Indoleessigsäure (IAA) durch Peroxidase in Abwesenheit von H₂O₂ wurde als weiteres Testsystem zur qualitativen Beurteilung der Johanniskraut-Extrakte herangezogen.

Diese Reaktion wird durch Monophenole stimuliert und durch Diphenole gehemmt. Innerhalb einer Konzentrationsreihe des zu prüfenden Extraktes ist eine plötzliche Hemmung des IAA-Abbaus („Reaktionssprung“) detektierbar. Je niedriger die Konzentration der Testsubstanz, bei der diese Hemmung auftritt, desto mehr Diphenole sind enthalten (VOLPERT, 1993). Auf diese Weise ist es möglich, die Qualität eines Extraktes zu beurteilen.

Diese Modellreaktion wurde bereits in früheren Arbeiten zum Thema Johanniskraut zur Bewertung von *Hypericum*-Typen und deren Extrakten eingesetzt (MANN, 1998).

Testansatz:

Citrat-Phosphatpuffer pH 5,6	150 mM i.A.
<i>aqua bidest</i>	ad 1 ml
IAA (in 10 mM NaOH)	0,3 mM i.A.
Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen	
Reaktionsstart: POD	0,3 U i.A.
Inkubation: 30 min bei 37 °C	

Die photometrische Bestimmung der IAA erfolgte nach 14 min bei 530 nm.

Von jedem der vier *Hypericum*-Typen wurde je ein Extrakt ausgewählt und in das Modellsystem eingesetzt.

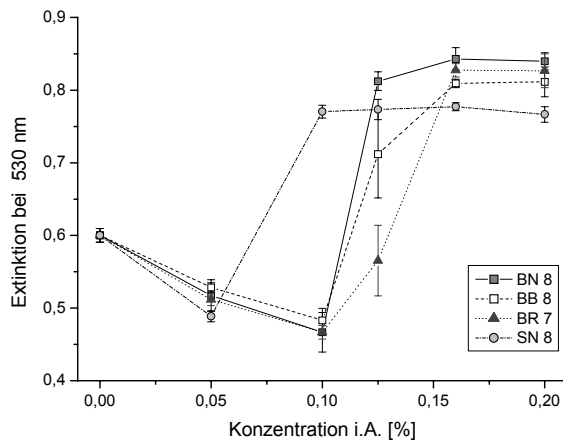
Im Tyrosin-Dimer-System hatten diese Extrakte folgende Hemmung der Dimerisierung erzielt:

Tab. 6: Ergebnisse der Extrakte BN 8, BB 8, BR 7 und SN 8 im Tyrosin-Dimer-System

Extrakt	Hemmung der Dimerisierung [%]
BN 8	65,1 ± 2,1
BB 8	76,4 ± 0,3
BR 7	55,5 ± 2,0
SN 8	82,7 ± 2,9

Die Extrakte wurden im IAA-System jeweils zweimal mit je 3 Parallelen getestet. Die Ergebnisse der beiden Versuche sind in den Abbildungen 34 und 35 dargestellt.

1. Versuchsdurchführung



2. Versuchsdurchführung

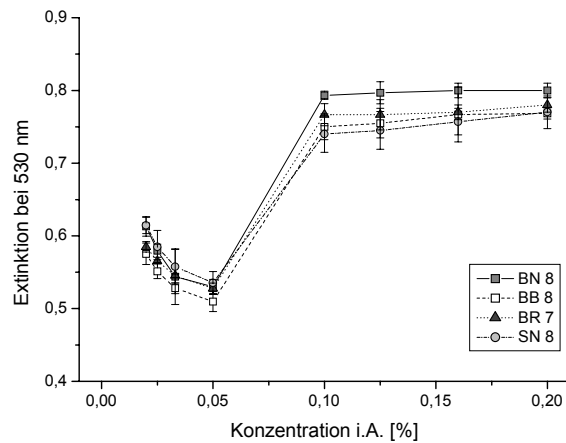


Abb. 34/35: Einfluß der Extrakte BN 8, BB 8, BR 7 und SN 8 auf die IAA-Oxidation

Die erste Testung der Extrakte zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Extrakten der Phänotypen. Der SN-Extrakt vollzog hier den Reaktionssprung bei den niedrigsten Konzentrationen i.A. Diesem folgten in der Reihenfolge ihres Sprungverlaufs die Extrakte von BN, BB und schließlich BR.

Bei der Wiederholung des Versuchs war keine Differenzierung der einzelnen Extrakte möglich. Alle vier Extrakte hemmten den IAA-Abbau bei derselben Konzentration i.A.

Desweiteren wurden SR-Extrakte, die bei der Hemmung der Tyrosin-Dimerisierung am wirksamsten gewesen waren, im Vergleich zu BN-Extrakten in das IAA-System eingesetzt. Die ausgewählten Extrakte hatten im Tyrosin-Dimer-System diese Testergebnisse erzielt:

Tab. 7: Ergebnisse ausgewählter Extrakte von BN und SR im Tyrosin-Dimer-System

Extrakt	Hemmung der Dimerisierung [%]
SR I	86,2 ± 2,3
SR IV	82,5 ± 0,8
BN 8	65,1 ± 2,1
BN 10	54,9 ± 2,2
BN 18	28,7 ± 1,6

Im IAA-System zeigte sich bei sämtlichen Wiederholungen des Versuchs folgendes Bild:

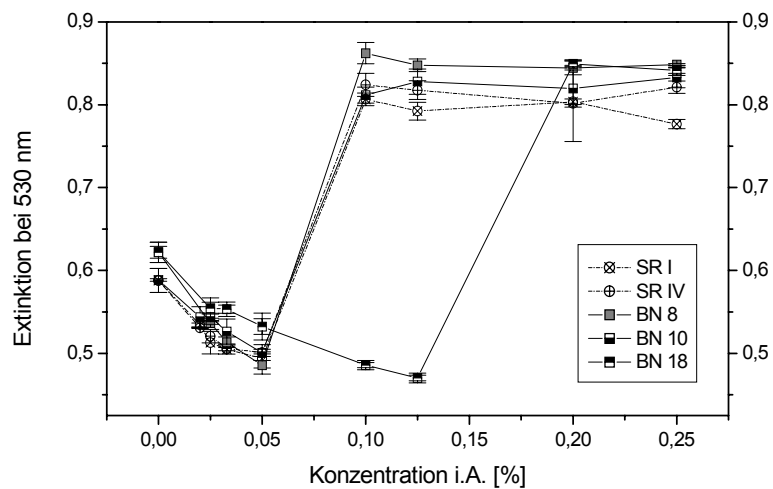


Abb. 36: Einfluß verschiedener SR- und BN-Extrakte auf die IAA-Oxidation durch POD

Fast alle Extrakte zeigten keinen Unterschied im Verlauf ihres Reaktionsmusters.

Der Extrakt BN 18 hob sich als einziger von den übrigen Extrakten ab, da er erst bei einer höheren Konzentration im Ansatz einen Sprung vollzog. Bereits im Tyrosin-Dimer-System hatte er eine äußerst geringe Wirksamkeit gezeigt.

Zusammenfassung der Ergebnisse im Testsystem der IAA-Oxidation durch POD:

- Die Versuche mit den Extrakten von BN, BB, BR und SN unterlagen erheblichen Schwankungen und ergaben keine reproduzierbaren Ergebnisse.
- Häufig waren die eingesetzten Extrakte durch das IAA-System nicht voneinander zu unterscheiden.
- Bezogen auf ihre Hemmleistung im Tyrosin-Dimer-System, ließen sich die wirksamsten Extrakte anhand des IAA-Systems nicht von durchschnittlichen Extrakten differenzieren. Nur ein Extrakt mit einer sehr geringen Wirksamkeit erzielte auch bei der IAA-Oxidation ein eindeutig schlechteres Ergebnis.

Da das IAA-System eine ungenügende Schärfe bei der Differenzierung von Extrakten und eine fragwürdige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aufwies, wurde es als Selektionskriterium im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht mehr angewandt.

1.2.2.3 Dopamin- β -Hydroxylase (D- β -H)

Durch das Enzym Dopamin- β -Hydroxylase (D- β -H) kommt es zu einem Abbau des Neurotransmitters Dopamin. Diese Reaktion wurde als weiteres Testsystem eingesetzt, da es mit den ursächlichen Prinzipien der Depression in Zusammenhang stehen könnte.

Im Reaktionsansatz kann Dopamin durch Tyramin ersetzt werden.

Testansatz:

Phosphatpuffer pH 5,0	100 mM i.A.
<i>aqua bidest</i>	ad 1 ml
Ascorbat	5 mM i.A.
Fumarat	5 mM i.A.
Tyramin	5 mM i.A.
Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen	
Reaktionsstart: D- β -H	0,02 U i.A.
Inkubation: 30 min bei 37 °C	

Wie bereits von DENKE (2000) beschrieben, wird die D- β -H vor allem von den Hypericinen gehemmt. Allerdings können auch Flavonoide eine Hemmung bewirken.

Ob Extrakte, die ein komplexes Gemisch dieser Stoffgruppen darstellen, sich anhand ihres Einflusses auf die D- β -H unterscheiden lassen, wurde hier untersucht.

Es wurden wiederum die Extrakt BN 8, BB 8, BR 7 und SN 8 in das Testsystem eingesetzt, die im Tyrosin-Dimer-System gut unterschieden werden konnten, nicht jedoch im IAA-System (s. Ergebnisse 1.2.2.2).

Eine Konzentrationsreihe der einzelnen Extrakte im D-β-H-System brachte folgendes Resultat:

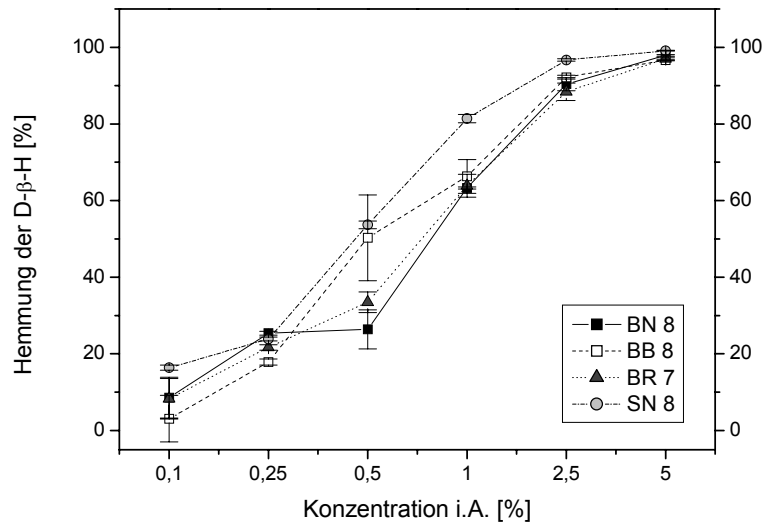


Abb. 37: Einfluß der Extrakte verschiedener *Hypericum*-Phänotypen auf die D-β-H

Bei einer Konzentration von 1% i.A. zeigten sich der größte Unterschied zwischen den Extrakten von BN, BB und BR und dem SN-Extrakt.

Dieser Bereich ist in Abb. 38 nochmals genauer dargestellt.

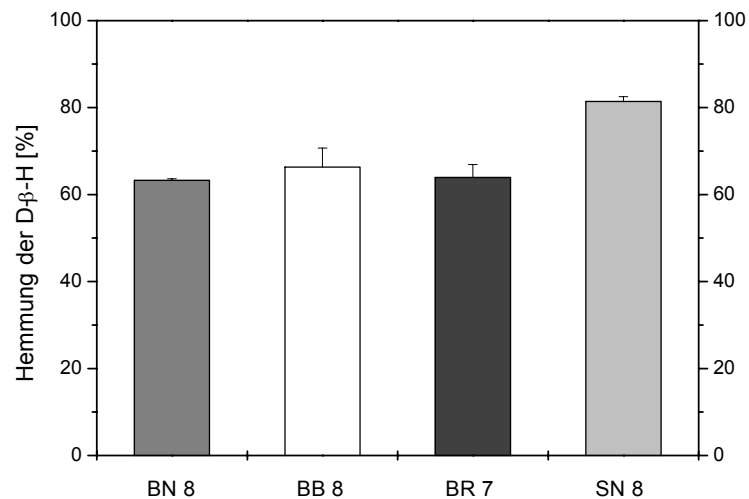


Abb. 38: Vergleich der Extrakte BN 8, BB 8, BR 7 und SN 8 im D-β-H-System bei 1% i.A.

Der SN-Extrakt hemmte die D-β-H am besten, gefolgt von BN. Der BB-Extrakt erzielte nach BR das schlechteste Ergebnis im Testsystem. Diese Reihenfolge fand sich auch bei den

Gehalten an Hypericinen in den Extrakten wieder (s. Ergebnisse 1.2.1), so daß folgender linearer Zusammenhang abgeleitet werden konnte:

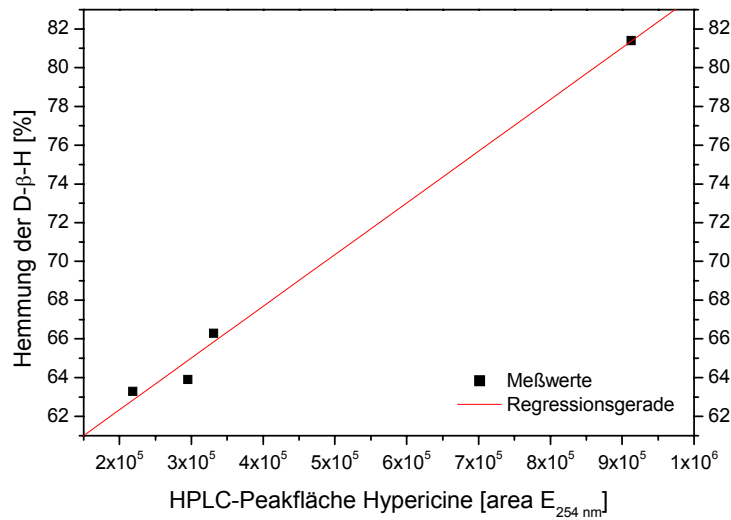


Abb. 39: Korrelation zwischen den Werten der Hypericine und der Hemmung der D-β-H bei 1% Extrakt i.A.

Die Korrelation zwischen der Hemmung der D-β-H und dem Gehalt an Hypericinen kann durch folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$\begin{aligned} \text{Hemmung der D-}\beta\text{-H [\%]} &= \\ &2,67174 \cdot 10^{-5} [\text{area E}_{254 \text{ nm}} / \%] * \text{Hypericine} [\text{area E}_{254 \text{ nm}}] + 56,99109 [\%] \\ r &= 0,99682 \end{aligned}$$

Zusammenfassung der Ergebnisse der D-β-H:

- Der SN-Extrakt hemmte die D-β-H-Reaktion am wirkungsvollsten.
- Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Gesamthypericin und der Hemmwirkung der Extrakte im Testsystem nachgewiesen werden.

1.2.2.4 Cu(II)-induzierte LDL-Oxidation: Dienkonjugation

Die Oxidation von LDL durch Cu(II) ist ein anerkanntes Reaktionsmodell zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität einer Substanz. Dabei wird die Bildung konjugierter Diene, die bei der Oxidation des Lipidteils des LDL entstehen (Dienkonjugation), am Photometer verfolgt (ESTERBAUER ET AL., 1989). Das Maß des antioxidativen Potentials ist die Dauer der Lag-Phase: je länger diese ist, desto größer ist der Schutz gegen den Oxidationsprozeß.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Zugabe von *Hypericum*-Extrakten in den Reaktionsansatz die Dienkonjugation beeinflusst und dadurch Johanniskrauttypen unterschieden werden können.

Testansatz:

PBS	ad 1 ml
entsalztes LDL	25 µg Protein i.A.
Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen	
Cu(II)	1,68 µM i.A.
Photometrische online-Messung bei 234 nm und 37 °C.	

Um den Vergleich zwischen den Extrakten zu erleichtern, wurde zunächst eine Quercetin-Konzentrationsreihe in das LDL-Cu(II)-System eingesetzt. Daraufhin wurde eine Kalibrationsgerade erstellt, mit deren Hilfe die Lag-Phasenverschiebung eines Extraktes in Quercetin-Äquivalente umgerechnet werden konnte (s. Material und Methoden 2.5.4.2.1).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Johanniskrautextrakte im LDL-Cu(II)-System in Quercetin-Äquivalenten angegeben.

Im Test wurden wieder die Extrakte BN 8, BB 8, BR 7 und SN 8, stellvertretend für ihre Phänotypen, verwendet. Die Konzentration i.A. betrug 0,1%.

Ihr Einfluß auf die Lag-Phasenverschiebung ist in Abb. 40 dargestellt.

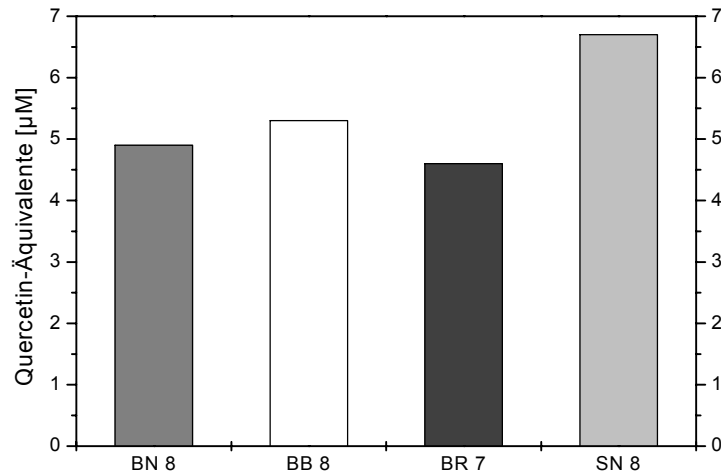


Abb. 40: Vergleich der Extrakte BN 8, BB 8, BR 7 und SN 8 im LDL-Cu(II)-System

BR 7 hatte mit ca. 4,5 µM Quercetin-Äquivalenten die geringste Wirkung auf die Dienkonjugation. Ein geringfügig besseres Ergebnis erzielten BN 8 mit knapp 5 µM und BB 8 mit etwa 5,5 µM Quercetin-Äquivalenten. SN 8 zeigte mit 6,8 µM Quercetin-Äquivalenten eindeutig den größten protektiven Effekt gegenüber der Oxidation des LDL.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Extrakte im System der Cu(II)-induzierten LDL-Oxidation:

- Der Extrakt des Phänotyps SN hatte mit Abstand den größten protektiven Einfluß auf die LDL-Oxidation.
- Die Extrakte von BN, BB und BR unterschieden sich in diesem System nur geringfügig.

1.2.2.5 LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale

Neben Übergangsmetallen sind auch Radikale in der Lage LDL zu oxidieren. SAVENKOVA ET AL. (1994) wiesen die LDL-Oxidation durch enzymatisch generierte Radikale nach. Dabei verwendeten sie Myeloperoxidase (MPO) und Tyrosin zur Bildung von Tyrosyl-Radikalen. Das für die MPO-Aktivität nötige H_2O_2 wurde durch Glucose/Glucoseoxidase kontinuierlich produziert.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit der Tyrosin-Dimerisierung durch POD und der LDL-Oxidation durch Cu(II) bereits die beiden Hauptaspekte dieses Reaktionsmodells durchgeführt wurden, lag es nahe, dieses Modell aufzugreifen.

1.2.2.5.1 Systementwicklung

Es galt das Reaktionsmodell von SAVENKOVA ET AL. (1994) soweit zu modifizieren und zu vereinfachen, daß eine aussagekräftige Bewertung von Extrakten möglich war und es als weiteres Testsystem verwendet werden konnte. Zunächst wurde untersucht, ob Glucose/Glucoseoxidase durch eine einmalige Zugabe (Bolus) von H_2O_2 ersetzt werden kann und die Reaktion dennoch denselben Verlauf aufzeigt, wie bei SAVENKOVA ET AL. (1994) beschrieben. Zu diesem Zweck wurde zunächst der Ansatz von SAVENKOVA ET AL. (1994) mit 200 μg LDL bzw. Protein/ml und 500 μM Tyrosin i.A. weitgehend nachgestellt, wobei die Proteinmenge stufenweise verringert wurde. Glucose/Glucoseoxidase wurde durch 100 μM H_2O_2 i.A. ersetzt. Die Konzentrationen an MPO i.A. wurden mit 5 mU und 200 mU variiert. Der Verlauf der Dienkonjugation dieser Ansatzvarianten ist in Abb. 41 festgehalten.

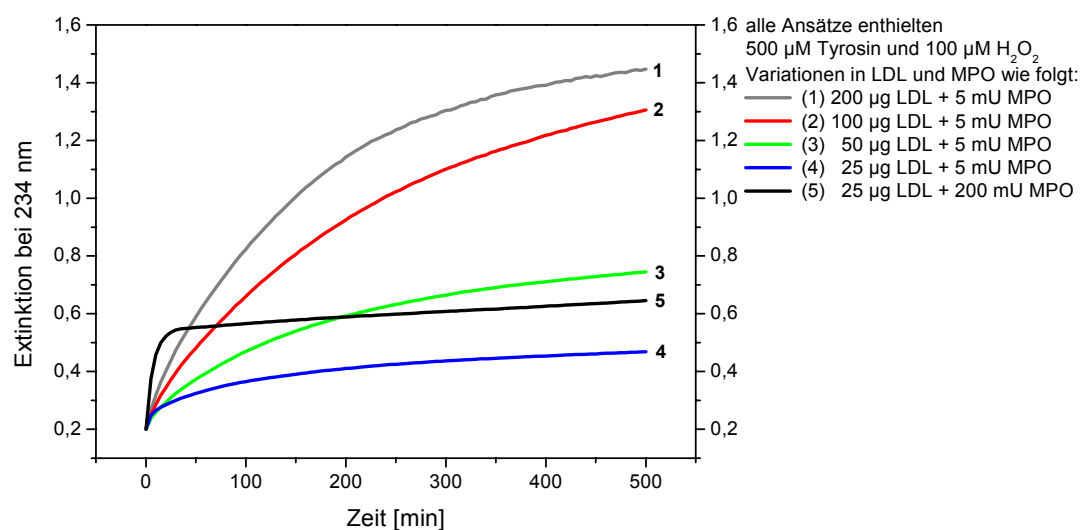


Abb. 41: Bildung konjugierter Diene durch MPO generierte Tyrosyl-Radikale

In allen Ansätzen war ein sofortiger Beginn der Dienkonjugation zu beobachten. Ansatz 1 kam dem Modell von SAVENKOVA ET AL. (1994) am nächsten und zeigte auch den dort beschriebenen Verlauf einer kontinuierlichen LDL-Oxidation. Eine Verringerung der LDL-Proteinmenge hatte eine verminderte Bildung von Dienen zur Folge (2-4). Diese konnte jedoch durch eine Erhöhung der MPO-Konzentration wieder gesteigert werden (5). Hierbei verlief die Dienkonjugation zunächst sehr rasch, blieb dann aber auf dem erreichten Niveau.

Um eine weitere Vereinfachung zu erzielen, wurde MPO durch die kostengünstigere POD ersetzt. Die Aufwandmenge an LDL wurde auf 25 µg/ml reduziert und damit dem LDL-Cu(II)-System angeglichen. Die H₂O₂-Konzentration wurde mit 50 µM i.A. und die POD-Konzentration mit 1 U i.A. festgelegt. Die Kombination dieser konstanten Parameter mit Tyrosin in verschiedenen Konzentrationen und deren Auswirkung auf die Bildung konjugierter Diene ist in Abb. 42 veranschaulicht.

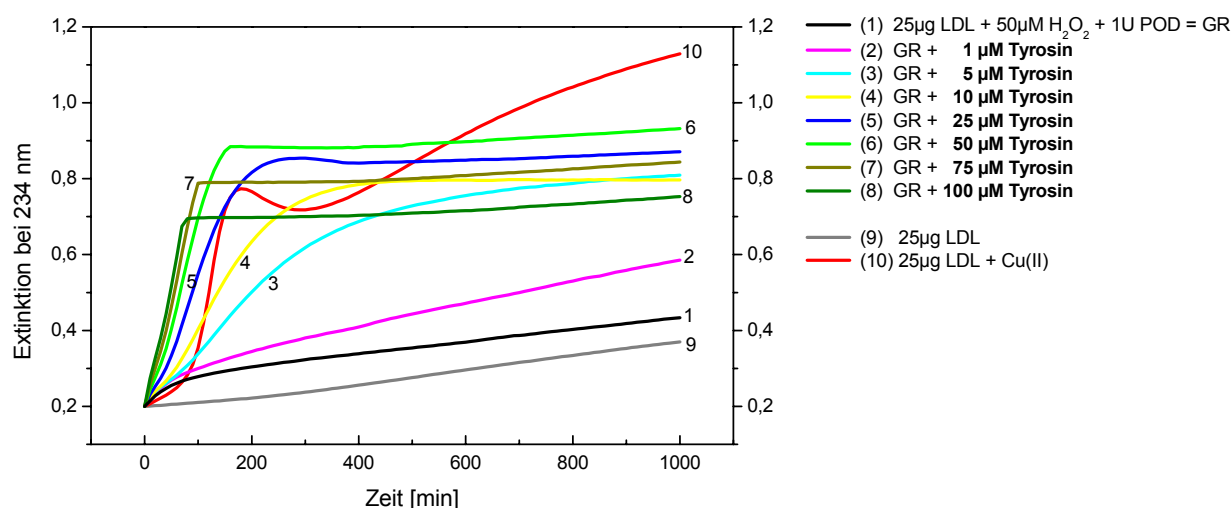


Abb. 42: Einfluß der Tyrosin-Konzentration auf die Bildung konjugierter Diene durch POD-generierte Tyrosyl-Radikale

Im Vergleich zur Cu(II)-induzierten LDL-Oxidation (10) begann die Radikal-induzierte Oxidation direkt mit der Propagationsphase, eine Lag-Phase fehlte. Ohne Tyrosin i.A. war nur eine schwache Oxidation festzustellen (1). Mit zunehmender Tyrosin-Konzentration stieg die Rate der LDL-Oxidation stetig an, wobei besonders die Dienkonjugation zu Beginn der Reaktion stark zunahm. Ab 10 µM Tyrosin i.A. (4) konnte nach der Propagationsphase ein Stillstand der Bildung konjugierter Diene beobachtet werden. Dieser war durch eine konstant bleibende Extinktion gekennzeichnet. Die Dauer bis zum Eintritt in dieses Plateau verkürzte

sich mit steigender Tyrosinkonzentration (5-8). Das Extinktionsniveau dieses Plateaus stieg bis 50 μM Tyrosin i.A. an (4-6), fiel danach aber merklich ab (7,8).

Aus den oben aufgeführten Reaktionsvarianten wurde Ansatz 5 mit 25 μM Tyrosin i.A. für weitere Untersuchungen ausgewählt. Dieser Ansatz zeigte eine sehr hohe Dienbildungsrate, deren Maximum bereits nach ca. 300 min erreicht wurde und mit auf dem höchstmöglichen Niveau lag. Zudem gab es keinen abrupten Übergang in die Plateauphase wie bei Ansatz 6.

Um den Einfluß der Substanzen des Ansatzes 5 auf die LDL-Oxidation genauer zu prüfen, wurde die Kombination von POD, Tyrosin (Tyr) und H_2O_2 im Ansatz variiert. Das Ergebnis dieser Kontrollversuche ist in Abb. 43 veranschaulicht.

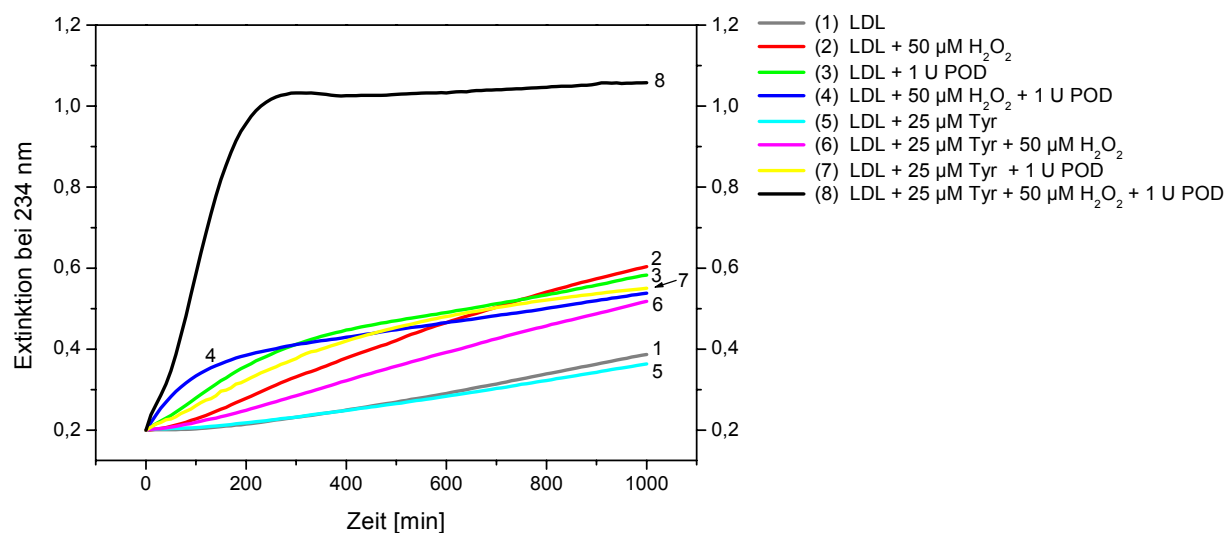


Abb. 43: Einfluß von Tyrosin, POD und H_2O_2 auf die Bildung konjugierter Diene

Im Vergleich zur LDL-Kontrolle (1) kam es nur bei der Kombination von H_2O_2 mit POD (4) zu einer Propagationsphase. Diese war jedoch nur von kurzer Dauer. H_2O_2 bzw. POD allein (2,3) oder in Kombination mit Tyrosin (6,7) ließen die Dienbildungsrate nur langsam und kontinuierlich ansteigen. Nur im vollständigen Ansatz mit Tyrosin, H_2O_2 und POD (8) war eine stark ausgeprägte Propagationsphase und eine maximale Dienbildung zu beobachten.

Zu diesem Ansatz wurde nun Quercetin in verschiedenen Konzentrationen gegeben (s. Abb. 44), um zu überprüfen, ob eine Hemmung der Dienkonjugation möglich war und wie sich diese im Reaktionsverlauf widerspiegelt.

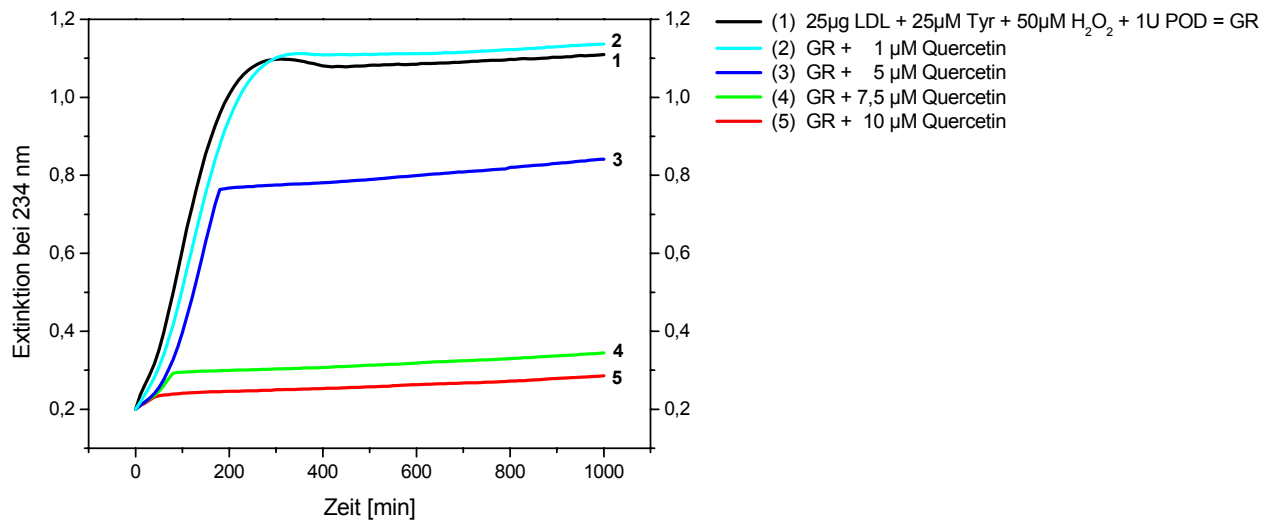


Abb. 44: Einfluß von Quercetin auf die Bildung konjugierter Diene durch POD-generierte Tyrosyl-Radikale

Im Vergleich zur Grundreaktion nahm bei steigender Quercetin-Konzentration die Bildungsrate von konjugierten Dienen ab. Gleichzeitig kam die Dienkonjugation früher zum Stillstand, d.h. das Extinktionsniveau der Plateauphase wurde durch eine Erhöhung der Quercetin-Konzentration gesenkt. Nur bei einer Konzentration von 1 µM Quercetin i.A. war eine leichte Zunahme des Extinktionsniveaus zu beobachten.

Die Höhe und die Verschiebung des Extinktionsniveaus diente in den weiteren Versuchen als Ansatzpunkt zur Beurteilung der antioxidativen Kapazität der jeweiligen Testsubstanzen bzw. Extrakte: je niedriger das Plateau, desto weniger konjugierte Diene werden gebildet, die Testsubstanz wirkt antioxidativ.

1.2.2.5.2 weitere Untersuchungen und Kontrollen des Systems

Um zu untersuchen, ob die Plateauphase wieder aufgehoben werden kann, wurde der 5 μM Quercetin-Ansatz (s. Abb. 44) modifiziert. Dies geschah durch eine Boluszugabe H_2O_2 während der Plateauphase, wie in Abb. 45 zu sehen.

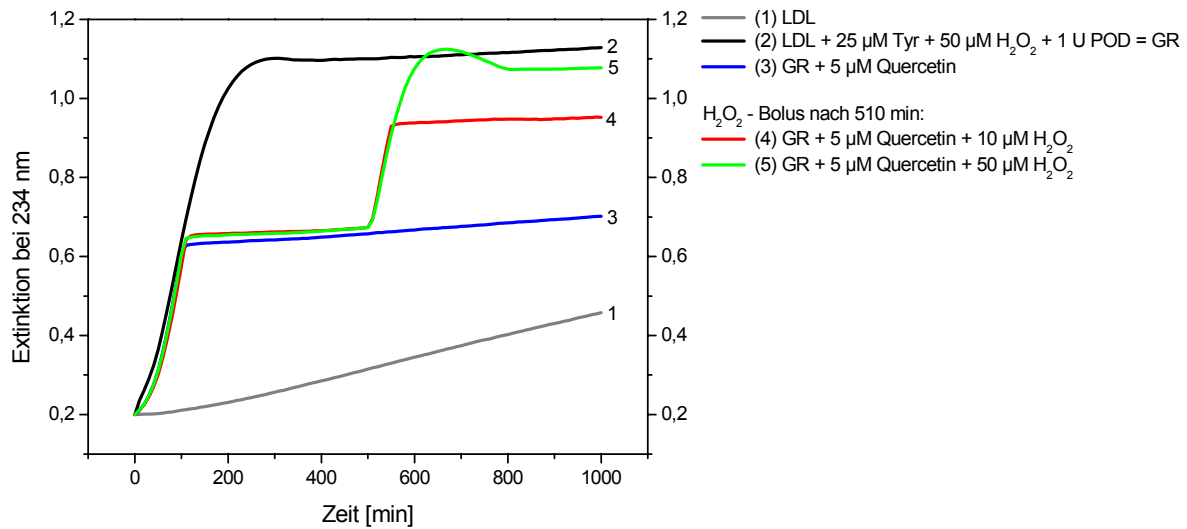


Abb. 45: Einfluß einer H_2O_2 -Zugabe auf den Verlauf der durch Quercetin gehemmten LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale

Die Zugabe von H_2O_2 während der Plateauphase hatte einen Anstieg der Dienkonjugation zur Folge (4,5). Diese erneute Propagationsphase mündete bei einer Zugabe von 10 μM H_2O_2 wieder abrupt in einem Plateau (4). Bei einem Bolus von 50 μM H_2O_2 (5) zeigte die Dienkonjugation denselben Verlauf und dasselbe Maximum wie die ungehemmte Grundreaktion (2).

Damit Interaktionen zwischen Extrakt und den Systemkomponenten ausgeschlossen werden konnten, wurden verschiedene Kontrolluntersuchungen unternommen (s. Abb. 46).

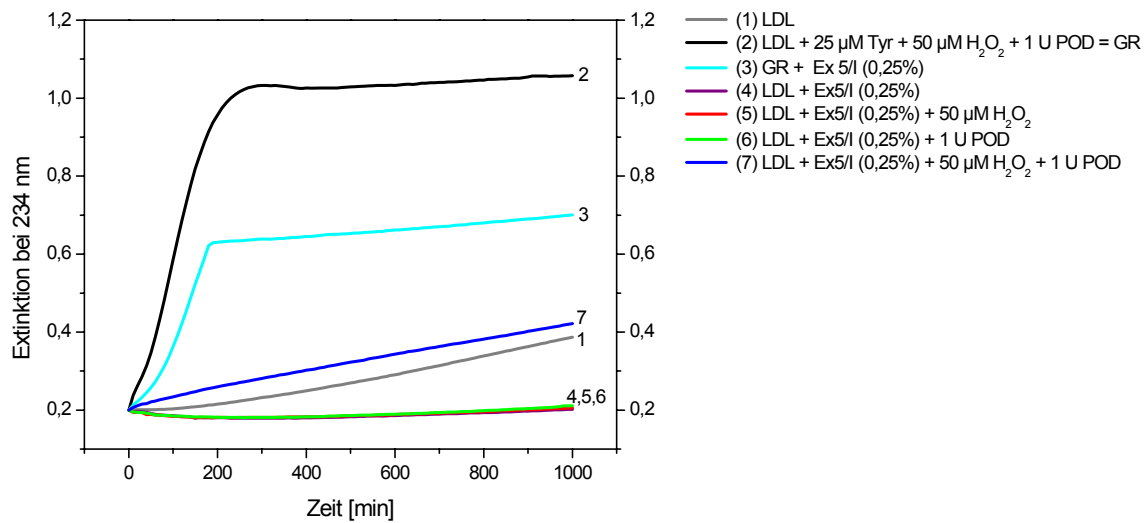


Abb. 46: Einfluß von *Hypericum*-Extrakt in Kombination mit Tyrosin, POD und H₂O₂ auf die Bildung konjugierter Diene

Die Kombination von Extrakt mit H₂O₂ und POD (7) zeigte eine kaum höhere Zunahme der Diene wie die LDL-Kontrolle (1). Bei LDL allein mit Extrakt (4) sowie zusammen mit H₂O₂ (5) oder POD (6) war keine Dienbildung zu beobachten.

In der folgenden Abb. 47 ist die Grundreaktion der Tyrosyl-Radikal-Bildung mit und ohne Extrakt dargestellt. Bei der Messung dieser Reaktionen befand sich kein LDL im Ansatz, um mögliche Einflüsse der anderen Komponenten auf den Extinktionsverlauf zu untersuchen.

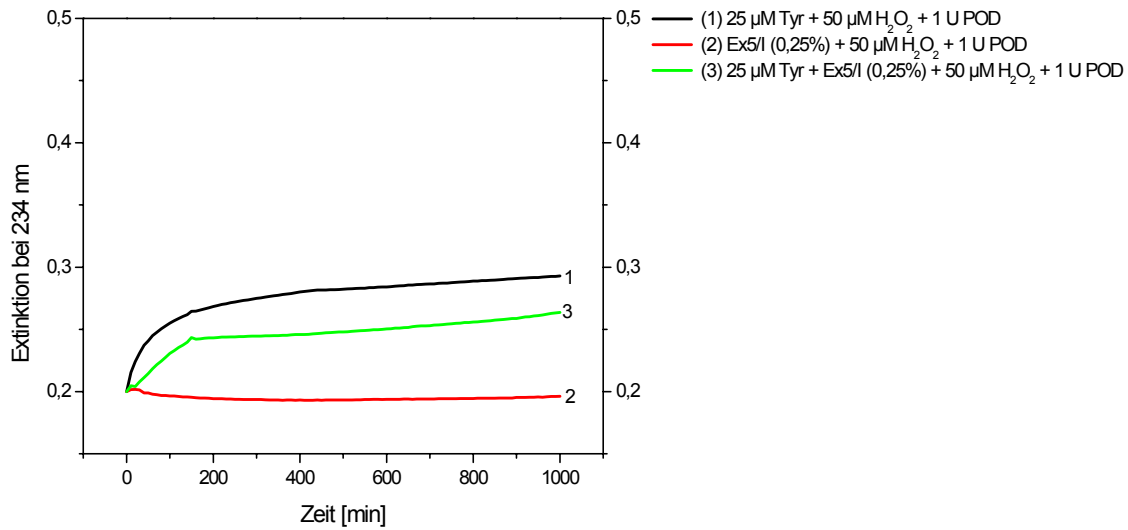


Abb. 47: Kinetik des Generatorsystems der Tyrosyl-Radikale mit und ohne *Hypericum*-Extrakt bei 234 nm

Bei der Reaktion ohne Extrakt (1) war ein schneller Anstieg der Extinktion zu beobachten, der sich aber dann auf einem fast konstanten, niedrigen Niveau bewegte. Mit Extrakt (3) kam es nach einer linearen Zunahme der Extinktion zu einer plötzlichen Stagnation des Extinktionsniveaus, das sich auch kaum noch erhöhte. Der Extrakt mit H₂O₂ und POD (2) zeigte keine nennenswerte Veränderung der Extinktion.

Bei der LDL-Oxidation wird das Protein ApoB100 an seinen Tryptophanresten angegriffen. Dies kann mittels der Abnahme der Tryptophanfluoreszenz verfolgt werden (REYFTMANN ET AL., 1990).

Um einen genaueren Einblick in den Mechanismus der LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale zu erhalten, wurde dieses System mit Hilfe der Tryptophanfluoreszenz untersucht bzw. die Ansätze im Fluoreszenzphotometer (Parameter s. Material und Methoden 2.5.4.2.2) gemessen. Die LDL-Konzentration i.A. in den folgenden Testansätzen betrug 50 µg/ml.

Der Verlauf der Fluoreszenzintensität durch die Kombination der verschiedenen Reaktionskomponenten (Tyrosin, H₂O₂, POD) ist in Abb. 48 dargestellt.

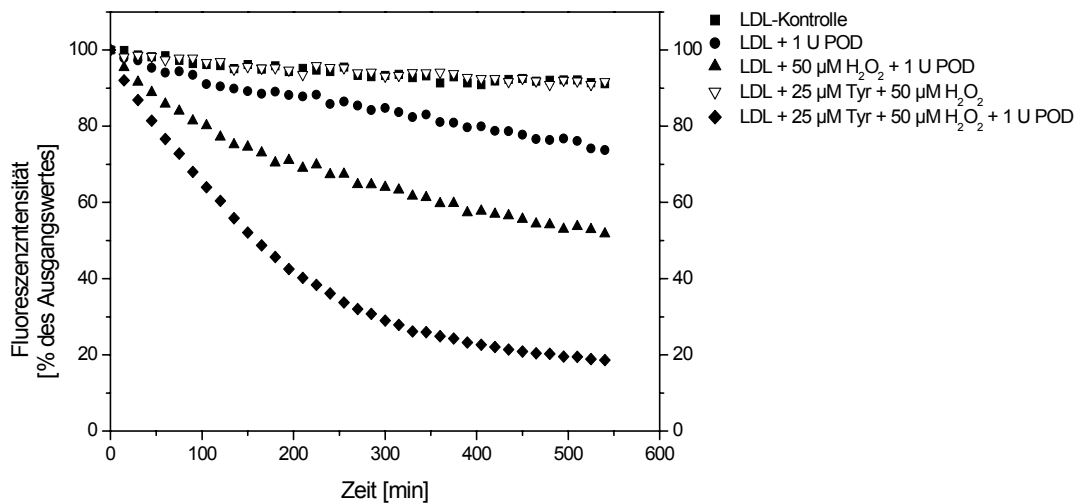


Abb. 48: Verlauf der Tryptophanfluoreszenz bei der LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale

Das vollständige System von LDL in Kombination mit Tyrosin, H₂O₂ und POD senkte die Fluoreszenzintensität am schnellsten und stärksten.

Den Einfluß von *Hypericum*-Extrakt auf den Fluoreszenzverlauf bei der LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale ist in Abb. 49 ersichtlich.

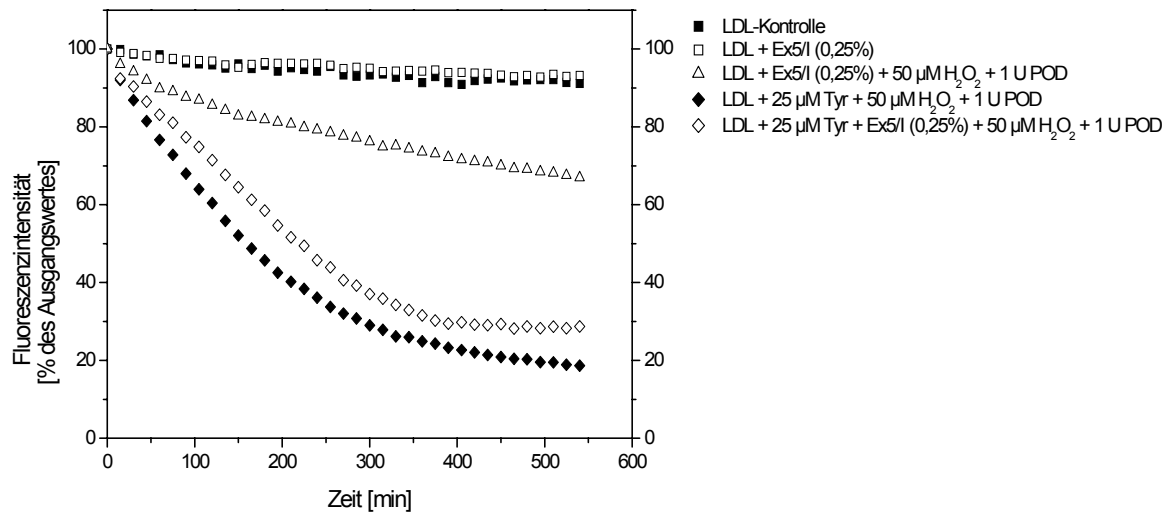


Abb. 49: Einfluß von *Hypericum*-Extrakt auf den Verlauf der Tryptophanfluoreszenz bei der LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale

Im Vergleich zur Grundreaktion kam es durch den Extrakt ab ca. 350 min zu einer deutlichen Stagnation der Fluoreszenz.

Das Generatorsystem der Tyrosyl-Radikale (Tyrosin, H₂O₂, POD) wurde ebenfalls fluoreszenzphotometrisch untersucht. Die in Abb. 50 dargestellten Ergebnisse bzw. die entsprechenden Ansätze enthielten kein LDL. Die Ausgangswerte der Emission lagen daher bei nur ca. 1000 rlu (relative light units) und nicht bei ca. 6000-7000 rlu, wie bei den Ansätzen mit LDL. Dies ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten.

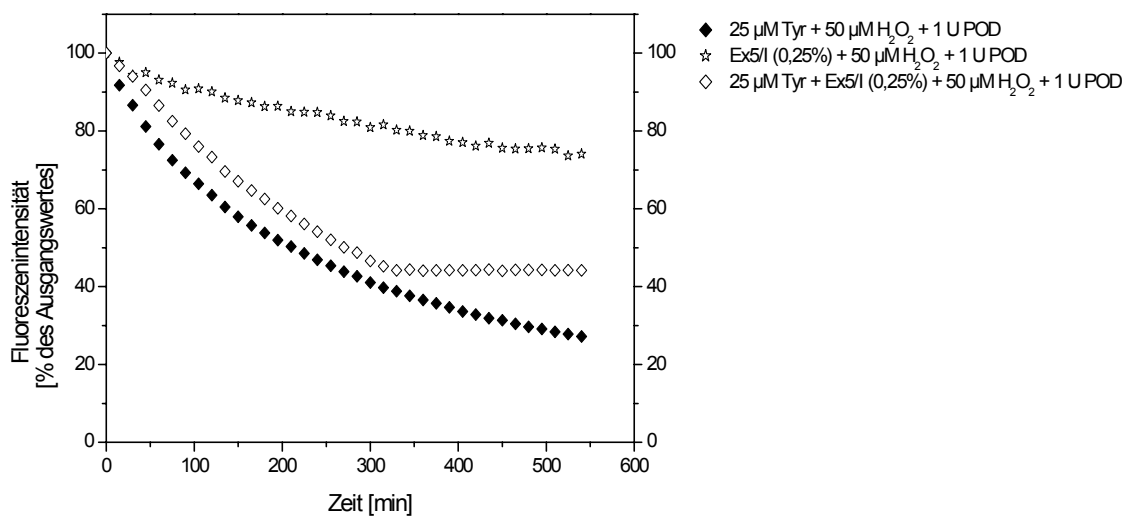


Abb. 50: Verlauf der Fluoreszenz während der Tyrosyl-Radikal-Generierung ohne LDL

Das Generatorsystem der Tyrosyl-Radikale in Abwesenheit von LDL zeigte denselben Reaktionsverlauf wie in Gegenwart von LDL (s. Abb. 49). Ab ca. 350 min war eine deutliche Stagnation der Reaktion durch den Extrakt zu erkennen.

1.2.2.5.3 Extrakte des Jahres 1999 im Test

Stellvertretend für die verschiedenen Phänotypen wurden, wie bereits in den vorangegangenen biochemischen Modellreaktionen, die Extrakte BN 8, BB 8, BR 7 und SN 8 auf ihre Wirksamkeit im Testsystem untersucht. Die Extrakte wurden mit 0,1% i.A. eingesetzt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 51 veranschaulicht.

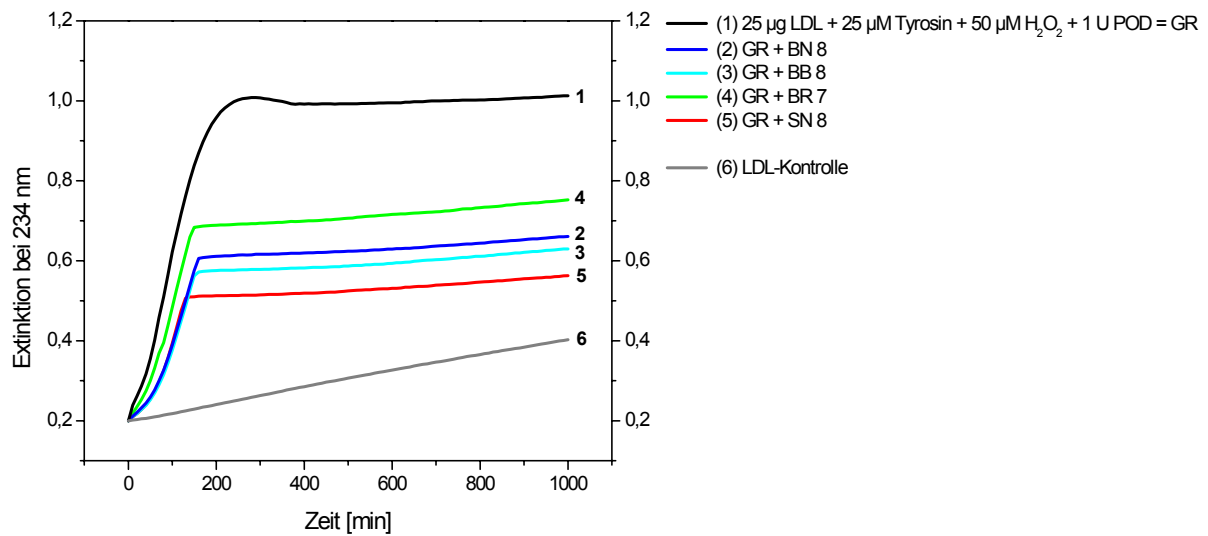


Abb. 51: Einfluß von *Hypericum*-Extrakten auf die Bildung konjugierter Diene durch POD-generierte Tyrosyl-Radikale

Das Plateau der Grundreaktion wurde durch die Extrakte deutlich gesenkt. Der Übergang von der Dienbildung zum Stillstand dieser Reaktion war dabei wesentlich abrupter als bei der Grundreaktion. SN 8 bewirkte die stärkste Verschiebung und zeichnete sich durch das niedrigste Niveau aus. Die Reihenfolge der übrigen Extrakte, geordnet nach dem jeweils nächsthöheren Plateau lautete BB 8, BN 8 und BR 7. Dieses Ergebnis entspricht fast genau den Verhältnissen im Tyrosin-Dimer-System:

Tab. 6: Ergebnisse der Extrakte BN 8, BB 8, BR 7 und SN 8 im Tyrosin-Dimer-System

Extrakt	Hemmung der Dimerisierung [%]
BN 8	65,1 ± 2,1
BB 8	76,4 ± 0,3
BR 7	55,5 ± 2,0
SN 8	82,7 ± 2,9

Zusammenfassung der Untersuchungen zur LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale:

- Die von SAVENKOVA ET AL. (1994) beschriebene Oxidation von LDL durch MPO-generierte Tyrosyl-Radikale konnte erfolgreich reproduziert und modifiziert werden. Dabei wurde anstatt Glucose/Glucoseoxidase direkt H_2O_2 in den Ansatz gegeben.
- MPO wurde im Zuge der Systementwicklung durch POD ersetzt.
- Der Reaktionsverlauf der Dienkonjugation durch POD-generierte Tyrosyl-Radikale zeichnete sich durch einen sofortigen Beginn der Propagationsphase aus. Diese endete mit einer Plateauphase, in der das Extinktionsniveau konstant blieb. Bei sonst gleichbleibenden Parametern war die Bildungsrate von Dienen und die Höhe des Extinktionsniveaus abhängig von der Tyrosinkonzentration.
- Quercetin konnte ebenfalls konzentrationsabhängig im gewählten Testansatz mit konstanten Bedingungen die Plateauphase verschieben.
- Die Extrakte der verschiedenen Phänotypen waren in der Lage, die Höhe der Plateauphase zu beeinflussen. Eine Differenzierung der Extrakte anhand ihrer Plateauverschiebung war möglich.

2 VERSUCHSJAHRE 2000/2001

Im Frühjahr des Jahres 2000 wurde ein Feld mit 15 verschiedenen Johanniskrautherkünften in Form einer Blockanlage angelegt.

Bei 10 Herkünften handelte es sich um Sorten und Eliteselektionen von Saatgutfirmen und Züchtern, sowie eine eigene Selektion. Hier wurde überprüft, ob das Saatgut einer Sorte trotz unterschiedlicher Bezugsquellen immer denselben homogenen, phänotypisch gleichen Bestand hervorbringt. Die Eigen- und Eliteselektionen der Saatgutfirmen und Züchter wurden mit den Sorten verglichen und ihre Anbauwürdigkeit bewertet. Von besonderem Interesse waren dabei die pharmakologischen Eigenschaften der Sorten/Eliteselektionen, die anhand biochemischer Modellreaktionen erfaßt wurden.

Weitere 5 Johanniskrautherkünfte dienten ausschließlich zur Selektion neuer Phänotypen mit guten agronomischen und pharmakologischen Merkmalen.

2.1 Ergebnisse des Feldanbaus

2.1.1 Morphologische Charakterisierung der *Hypericum*-Phänotypen

In Anlehnung an die bereits in Ergebnisse 1.1.1 vorgestellten Phänotypen des Jahres 1999 wurde in die Blatt-Bonitur das Merkmal 'Blatt-Typ' aufgenommen (s. Material und Methoden 2.2.2).

2.1.1.1 Sorten und Eliteselektionen

Zur Erfassung der morphologischen Merkmale wurden 8 Pflanzen je Parzelle (Ernteschema s. Anhang II) vermessen und bonitiert. Die Charakterisierung der Sorten erfolgte anhand des am häufigsten vorkommenden Phänotyps innerhalb dieser 32 bonitierten Pflanzen. Abweichende Phänotypen wurden gesondert erfaßt.

Anbaujahr 2000 (1. Standjahr)

Tab. 8: Phänotypische Merkmale der *Hypericum*-Sorten und Eliteselektionen im Jahr 2000

Sorte/ Herkunft		Blatt		Stengel				Blüte		
	Nr.	Typ	Hypericin Punkte	Wuchs	Färbung	Anzahl	Pflanzenhöhe [cm]	Horizont [cm]	Hypericin Punkte	Fr- Knoten
To 1	2 n = 23	b	1	aufrecht	0	14 ± 2	66 ± 5	20 ± 5	1	-
To 2	3 n = 27	bb	1	aufrecht	0	13 ± 3	53 ± 4	16 ± 5	3	-
To 3	4 n = 27	b	3	aufrecht	0	14 ± 3	66 ± 9	21 ± 7	2	-
TT 1	5 n = 32	b	1	aufrecht kompakt	1	20 ± 5	51 ± 4	15 ± 2	3	-
TT 2	6 n = 32	b	1	aufrecht kompakt	1	18 ± 3	48 ± 4	14 ± 3	3	-
TT 3	12 n = 32	b	1	aufrecht kompakt	1	18 ± 4	47 ± 5	14 ± 4	3	-
GS 1	7 n = 32	s	1	aufrecht kompakt	0	18 ± 4	43 ± 4	13 ± 2	1	-
GS 2	8 n = 32	s	1	aufrecht kompakt	0	17 ± 3	44 ± 4	13 ± 4	1	-
NLC	9 n = 29	bb	2	aufrecht, instabil	0	13 ± 3	64 ± 5	21 ± 4	2	-
SN	10 n = 32	s	1	aufrecht kompakt	0	23 ± 5	42 ± 4	13 ± 3	3	-

Abkürzungen, Nr. der Sorten/Herkünfte, Boniturschema: s. Material und Methoden 2.2.1 u. 2.2.2

Die Herkünfte der Sorte 'Topaz' wichen in ihrem Phänotyp deutlich voneinander ab. Bei 'Taubertal' und Goldstern konnten dagegen keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Herkünften festgestellt werden.

Die schmalblättrigen Typen Goldstern und SN zeichneten sich durch den niedrigsten Wuchs aus. To 1, To 3 und NLC waren nicht nur die höchsten Phänotypen, sondern besaßen auch den größten Blühhorizont.

Die meisten Stengel pro Pflanze bildete SN, dicht gefolgt von 'Taubertal' und Goldstern. NLC und alle 'Topaz'-Herkünfte hatten mit durchschnittlich 14 die wenigsten Stengel. NLC erwies sich zudem als standschwach.

Durch besonders viele Hypericinbehälter auf den Petalen fielen SN, 'Taubertal' und To 2 auf. Goldstern und To 1 besaßen kaum Hypericinbehälter auf ihren Blütenblättern.

Anbaujahr 2001 (2. Standjahr)

Tab. 9: Phänotypische Merkmale der *Hypericum*-Sorten und Eliteselektionen im Jahr 2001

Sorte/ Herkunft		Blatt		Stengel				Blüte		
	Nr.	Typ	Hypericin Punkte	Wuchs	Färbung	Anzahl	Pflanzenhöhe [cm]	Horizont [cm]	Hypericin Punkte	Fr- Knoten
To 1	2 n = 23	b	1	aufrecht	0	17 ± 5	106 ± 7	21 ± 5	1	-
To 2	3 n = 27	bb	1	aufrecht	0	26 ± 7	101 ± 8	17 ± 7	3	-
To 3	4 n = 27	b	3	aufrecht	0	26 ± 5	112 ± 6	16 ± 5	2	-
TT 1	5 n = 32	b	1	aufrecht kompakt	1	34 ± 7	86 ± 4	15 ± 4	3	-
TT 2	6 n = 32	b	1	aufrecht kompakt	1	34 ± 7	88 ± 5	17 ± 2	3	-
TT 3	12 n = 32	b	1	aufrecht kompakt	1	33 ± 5	89 ± 6	18 ± 6	3	-
GS 1	Ausfall durch Infektion mit <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>									
GS 2	Ausfall durch Infektion mit <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>									
NLC	9 n = 29	bb	2	aufrecht, instabil	0	34 ± 11	103 ± 7	20 ± 6	3	-
SN	10 n = 32	s	1	aufrecht kompakt	0	39 ± 11	84 ± 5	15 ± 4	3	-

Abkürzungen, Nr. der Sorten/Herkünfte, Boniturschema: s. Material und Methoden 2.2.1 u. 2.2.2

Die Boniturmerkmale von Blatt, Stengel und Blüte blieben im Vergleich zum 1. Standjahr bei den einzelnen Herkünften gleich.

Die metrischen Parameter Stengelanzahl und Pflanzenhöhe veränderten sich dagegen deutlich, da sie ihre Werte des Jahres 2000 nahezu verdoppelten. Eine Ausnahme bildete dabei die Stengelanzahl von To 1, die sich nur geringfügig vom 1. Standjahr unterschied.

Der Blühhorizont der verschiedenen Herkünfte nahm nur geringfügig zu.

Goldstern stand nicht mehr für Untersuchungen zur Verfügung, da alle Pflanzen aufgrund einer Infektion mit *Colletotrichum gloeosporioides* abgestorben waren.

Die Stengelanzahl und die Pflanzenhöhe der Sorten und Eliteselektionen in den Anbaujahren 2000/2001 werden in den Abbildungen 52 und 53 graphisch dargestellt.

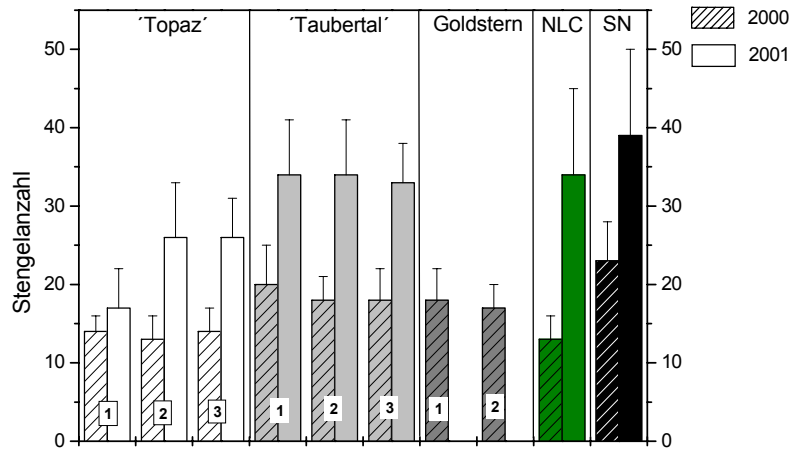


Abb. 52: Stengelanzahl der Sorten und Eliteselktionen im 1. und 2. Standjahr

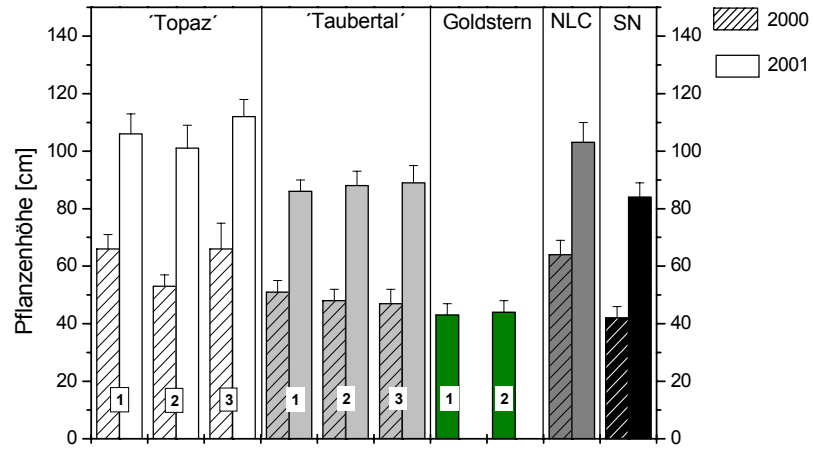


Abb. 53: Wuchshöhe der Sorten und Eliteselktionen im 1. und 2. Standjahr

2.1.1.2 Abweichende Phänotypen aus den Sorten

Die Herkünfte von 'Topaz' unterschieden sich nicht nur untereinander. Jede Herkunft bestand aus mindestens 2 weiteren Phänotypen. Auch bei NLC gab es mehrere Pflanzentypen im Bestand.

In der folgenden Tab. 10 werden die morphologischen Merkmale des Haupttyps jeder Herkunft denjenigen, der am auffälligsten davon abweichenden Pflanzentypen (=„Ausreißer“) gegenübergestellt. Für diese Ausreißer wurden alle Pflanzen erfaßt, die im gesamten Bestand der Herkunft vorhanden waren.

Tab. 10: Morphologische Merkmale von sortenabweichenden Phänotypen

Sorte/ Herkunft		Blatt		Stengel				Blüte		
		Typ	Hypericin Punkte	Wuchs	Färbung	Anzahl	Pflanzenhöhe [cm]	Horizont [cm]	Hypericin Punkte	Fr- Knoten
2 (To 1)	Haupt Typ n = 23	b	1	aufrecht	0	17 ± 5	106 ± 7	21 ± 5	1	-
	2A1 n = 24	bb	1	aufrecht	0	28 ± 10	99 ± 8	23 ± 4	3	-
	2A2 n = 4	b	1	aufrecht	0	21 ± 3	85 ± 5	27 ± 7	3	+
	2A3	b	1	aufrecht	0	10	80	20	1	-
3 (To 2)	Haupt Typ n = 27	bb	1	aufrecht	0	26 ± 7	101 ± 8	17 ± 7	3	-
	3A1 n = 16	b	1	aufrecht	0	17 ± 5	106 ± 8	22 ± 6	1	-
4 (To 3)	Haupt Typ n = 27	b	3	aufrecht	0	26 ± 5	112 ± 6	16 ± 5	2	-
	4A1 n = 3	b	1	aufrecht kompakt	0	24 ± 8	88 ± 7	20 ± 5	1	+
	4A2 n = 3	b	1	aufrecht kompakt	0	24 ± 8	87 ± 4	25 ± 0	1	-
	4A3	bb	2	aufrecht	0	40	110	20	2	-
	4A4	b	2	aufrecht	0	11	100	20	2	+
	4A5	bb	3	aufrecht	0	15	90	30	3	-
9 (NLC)	Haupt Typ n = 29	bb	2	aufrecht, instabil	0	34 ± 11	103 ± 7	20 ± 6	3	-
	9A1 n = 2	b	3	aufrecht	0	35 ± 4	100 ± 0	25 ± 7	3	-
	9A2 n = 3	b	1	aufrecht	0	28 ± 5	92 ± 4	22 ± 4	12	-

Abkürzungen, Nr. der Sorten/Herkünfte, Boniturschema: s. Material und Methoden 2.2.1 u. 2.2.2

Anhand der morphologischen Unterschiede ist deutlich erkennbar, daß die Herkünfte von 'Topaz' und NLC sehr heterogene Bestände bilden. Bei To 1 und To 2 war bemerkenswert, daß der Typ 2A1 genau dem Haupttyp von To 2 entsprach. Typ 3A1 wiederum war mit dem Haupttyp von To 1 identisch.

Tab. 10 stellt aus Gründen der Überschaubarkeit nur die häufigsten und auffälligsten abweichenden Pflanzentypen dar. In Tab. 11 werden auch alle weiteren abweichenden Pflanzentypen berücksichtigt, die nur als Einzelpflanzen existierten.

Tab. 11: Anteil der abweichenden Typen an einer Herkunft

Sorte/ Herkunft	abweichender Typ	Anzahl im Bestand	Anteil am Bestand [%]
2 (To 1)	2A1	24	19
	2A2	4	3
	2A3	1	1
	weitere Einzeltypen	3	2
	Summe	32	25
3 (To 2)	3A1	16	13
4 (To 3)	4A1	3	2
	4A2	3	2
	4A3	1	1
	4A4	1	1
	4A5	1	1
	weitere Einzeltypen	22	17
	Summe	31	24
9 (NLC)	9A1	2	2
	9A2	3	2
	weitere Einzeltypen	4	3
	Summe	9	7

Abkürzungen der Sorten/Herkünfte und deren Parzellen-Nr.: s. Material und Methoden 2.2.1

To 1 und To 3 hatten mit 24 bzw. 25% den größten Anteil an vom Haupt-Typ abweichenden Pflanzen im Bestand. To 2 hatte nur einen abweichenden Phänotyp, der 13% des Bestandes bildete. NLC wies mit 7% den geringsten Anteil an bestandsuntypischen Pflanzen auf.

2.1.1.3 Eigenselektionen

Die Herkünfte M.B. (Parzellen-Nr. 1), BREIT (Parzellen-Nr. 11), Austro (Parzellen-Nr. 13), 429 (Parzellen-Nr. 14) und 430 (Parzellen-Nr. 15) wurden ausschließlich zur Selektion neuer Phänotypen genutzt. Aus diesen Herkünften wurden insgesamt 19 Pflanzentypen selektiert, die in Tab. 12 und 13 näher charakterisiert sind. Davon waren 10 Typen in größeren Stückzahlen in den Beständen zu finden. Bei den restlichen 9 Phänotypen handelte es sich um Einzelpflanzen, die nur mit einem Exemplar auf dem gesamten Feld vertreten waren.

Anbaujahr 2000 (1. Standjahr)

Tab. 12: Morphologische Merkmale der Eigenselektionen im 1. Standjahr

Nr.	Blatt		Stengel				Blüte		
	Typ	Punkte Hypericin	Wuchs	Färbung	Anzahl	Pflanzenhöhe [cm]	Horizont [cm]	Hypericin Punkte	Fr- Knoten
1 / 1 n = 9	b	1	aufrecht kompakt	1	15 ± 4	51 ± 3	13 ± 3	3	-
1 / 2 n = 3	b	3	aufrecht kompakt	0	9 ± 3	30 ± 4	12 ± 3	1	+
11 / 1 n = 8	b	3	aufrecht breitbuschig	0	16 ± 2	53 ± 4	20 ± 4	1	-
11 / 2 n = 24	bb	2	aufrecht breitbuschig	0	15 ± 3	66 ± 4	25 ± 6	2	-
11 / 3 n = 24	b	1	aufrecht breitbuschig	1	10 ± 2	55 ± 4	15 ± 4	1	+
11 / 4 n = 17	b	3	aufrecht breitbuschig	1	11 ± 2	51 ± 3	13 ± 4	1	+
14 / 1 n = 6	b	1	aufrecht kompakt	0	14 ± 2	41 ± 4	10 ± 4	1	+
14 / 2 n = 6	bb	3	aufrecht	0	16 ± 3	60 ± 5	22 ± 6	3	-
15 / 1 n = 20	s	2	aufrecht kompakt	1	18 ± 4	49 ± 4	15 ± 3	3	-
15 / 2 n = 8	bb	3	aufrecht breitbuschig	0	20 ± 5	64 ± 4	21 ± 4	2	-
Einzelpflanzen									
A	b	3	aufrecht kompakt	0	27	50	15	3	+
B	b	3	aufrecht kompakt	0	15	45	20	3	-
C	b	3	aufrecht breitbuschig	0	18	55	20	3	++
D	s	2	breitbuschig	0	11	40	15	3	-
E	b	3	aufrecht kompakt	0	24	40	15	3	-
F	sb	3	aufrecht kompakt	1	19	45	15	3	-
G	b	2	aufrecht kompakt	0	17	40	15	3	+
H	s	2	aufrecht kompakt	0	20	50	15	3	-
J	b	3	aufrecht kompakt	0	12	45	15	2	-

Abkürzungen, Nr. der Sorten/Herkünfte, Boniturschema: s. Material und Methoden 2.2.1 u. 2.2.2

Die selektierten Phänotypen konnten im 1. Anbaujahr durch gute Wuchseigenschaften (kompakt; hohe Stengelanzahl; geringe Pflanzenhöhe) und/oder guter Hypericin-Boniturwerte überzeugen.

Dies galt nur bedingt für die Phänotypen 11/1, 11/2 und 11/3. Sie wurden ausgewählt, da sie die bereits beschriebenen Phänotypen BN, BB und BR repräsentierten.

Anbaujahr 2001 (2. Standjahr)

Falls nicht anders vermerkt, wurden im 2. Standjahr bei den häufiger auftretenden Selektionstypen jeweils nur 4 Pflanzen bonitiert (eine je Block).

Tab. 13: Morphologische Merkmale der Eigenselektionen im 2. Standjahr

Nr.	Blatt		Stengel				Blüte		
	Typ	Hypericin Punkte	Wuchs	Färbung	Anzahl	Pflanzenhöhe [cm]	Horizont [cm]	Hypericin Punkte	Fr-Knoten
1 / 1	b	2	aufrecht kompakt	1	31 ± 5	95 ± 5	24 ± 3	3	-
1 / 2 n = 2	s	3	aufrecht kompakt	0	21 ± 4	73 ± 2	20 ± 3	1	+
11 / 1	b	3	aufrecht breitbuschig	0	25 ± 3	97 ± 3	25 ± 4	1	-
11 / 2	bb	2	aufrecht breitbuschig	0	24 ± 2	114 ± 3	27 ± 4	2	-
11 / 3	b	1	aufrecht breitbuschig	1	18 ± 2	93 ± 5	20 ± 2	1	+
11 / 4	b	3	aufrecht breitbuschig	1	21 ± 3	90 ± 4	22 ± 4	1	+
14 / 1	b	2	aufrecht kompakt	0	33 ± 3	81 ± 6	21 ± 7	1	+
14 / 2	bb	3	aufrecht	0	26 ± 3	101 ± 5	23 ± 11	3	-
15 / 1	s	2	aufrecht kompakt	0	29 ± 4	91 ± 8	17 ± 6	3	-
15 / 2	bb	3	aufrecht breitbuschig	0	22 ± 2	108 ± 6	22 ± 5	3	-
Einzelpflanzen									
A	b	3	aufrecht	0	44	90	15	3	+
B	Ausfall durch Infektion mit <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>								
C	b(b)	3	aufrecht	0	34	105	20	3,5	+
D	Ausfall durch Infektion mit <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>								
E	b	2	aufrecht	0	25	90	30	2,5	-
F	b	3	aufrecht	1	23	100	20	2	-
G	bb	3	aufrecht	1	26	85	20	2,5	+
H	s	2	aufrecht	0	26	80	30	3	-
J	b	3	aufrecht	0	23	100	30	2	-

Abkürzungen, Nr. der Sorten/Herkünfte, Boniturschema: s. Material und Methoden 2.2.1 u. 2.2.2

Im Vergleich zum 1. Standjahr traten die größten Veränderungen bei der Stengelanzahl und der Pflanzenhöhe der einzelnen Phänotypen auf. Die meisten Pflanzen hatten einen deutlichen Anstieg der Stengelanzahl zu verzeichnen, mit Ausnahme von 15/2 und E, deren

Stengelanzahl stagnierte. Alle Pflanzentypen erreichten häufig eine Verdoppelung ihrer Wuchshöhe des Vorjahres.

Die Einzelpflanzen B und D und eine Pflanze aus 1/2 waren aufgrund einer Infektion durch *Colletotrichum gloeosporioides* abgestorben.

2.1.2 Ertragsparameter

2.1.2.1 Sorten und Eliteselektionen

Anbaujahr 2000 (1. Standjahr)

Tab. 14: Erntetermin und Ertrag der Sorten und Eliteselektionen im Jahr 2000

Sorte/ Herkunft		Ernte Datum	Ertrag		
	Nr.		FS/Pflanze [g]	TS/Pflanze [g]	kg TS/ha
To 1	2 n = 23	23.08.00	140 ± 35	43 ± 9	1720
To 2	3 n = 27	25.08.00	125 ± 44	53 ± 19	2120
To 3	4 n = 27	29.08.00	137 ± 51	45 ± 20	1800
TT 1	5 n = 32	17.08.00	96 ± 40	32 ± 10	1280
TT 2	6 n = 32	17.08.00	84 ± 28	30 ± 9	1200
TT 3	12 n = 32	17.08.00	68 ± 21	29 ± 7	1160
GS 1	7 n = 32	15.08.00	87 ± 29	34 ± 10	1360
GS 2	8 n = 32	15.08.00	88 ± 28	44 ± 9	1760
NLC	9 n = 29	21.08.00	99 ± 43	35 ± 13	1400
SN	10 n = 32	28.08.00	120 ± 43	40 ± 14	1600

Abkürzungen der Sorten/Herkünfte und deren Parzellen-Nr.: s. Material und Methoden 2.2.1

Die Herkünfte von Goldstern und 'Taubertal' blühten jeweils zum gleichen Zeitpunkt. Dagegen mußten die Herkünfte von 'Topaz' zu unterschiedlichen Terminen beerntet werden. Goldstern hatte den frühesten Erntetermin, gefolgt von 'Taubertal'. To 3 und SN kamen am spätesten zur Vollblüte, wobei SN eine sehr spärliche Blüte zeigte.

Die höchsten Erträge erbrachten die Herkünfte von 'Topaz', mit To 2 an der Spitze, und GS 2. Die niedrigsten Erträge hatten die Herkünfte von 'Taubertal' und GS 1.

Anbaujahr 2001 (2. Standjahr)

Tab. 15: Erntetermin und Ertrag der Sorten und Eliteselektionen im Jahr 2001

Sorte/ Herkunft		Ernte Datum	Ertrag			
Nr.	FS/Pflanze [g]		TS/Pflanze [g]	kg TS/ha	2. Blüte	
To 1	2 n = 23	26.06.01	169 ± 61	47 ± 18	1880	+
To 2	3 n = 27	15.07.01	104 ± 32	33 ± 10	1320	+
To 3	4 n = 27	05.07.01	138 ± 43	45 ± 15	1800	+
TT 1	5 n = 32	26.06.01	123 ± 33	26 ± 7	1040	+
TT 2	6 n = 32	26.06.01	103 ± 22	27 ± 5	1080	+
TT 3	12 n = 32	26.06.01	102 ± 25	28 ± 6	1120	+
GS 1	Ausfall durch Infektion mit <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>					
GS 2	Ausfall durch Infektion mit <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>					
NLC	9 n = 29	04.07.01	125 ± 40	35 ± 11	1400	-
SN	10 n = 32	30.06.01	132 ± 37	42 ± 11	1680	-

Abkürzungen, Nr. der Sorten/Herkünfte, Boniturschema: s. Material und Methoden 2.2.1 u. 2.2.2

Die Staffelung der Erntetermine der einzelnen Herkünfte entsprach weitgehend derjenigen im Jahr 2000. Wie im Vorjahr erreichten die Herkünfte von 'Taubertal' die Vollblüte als erste und Herkunft To 3 als letzte. Herkunft To 1 blühte zeitgleich mit 'Taubertal'. NLC wurde nur einen Tag vor To 3 beerntet. SN überzeugte im Gegensatz zum Vorjahr durch eine reiche und gleichmäßige Blüte.

Im Vergleich zum 1. Standjahr war bei fast allen Herkünften eine Stagnation oder sogar eine leichte Abnahme des Ertrages zu beobachten. To 2 zeigte den größten Ertragsverlust und lag damit hinter den anderen beiden 'Topaz'-Herkünften zurück. Nur To 1 und SN konnten einen geringen Ertragszuwachs verzeichnen. Abb. 54 veranschaulicht nochmals die Unterschiede im Ertrag der Sorten/Eliteselektionen in den beiden Anbaujahren.

Alle Herkünfte von 'Topaz' und 'Taubertal' konnten im 2. Standjahr eine 2. Blüte ausbilden, SN und NLC hingegen nicht.

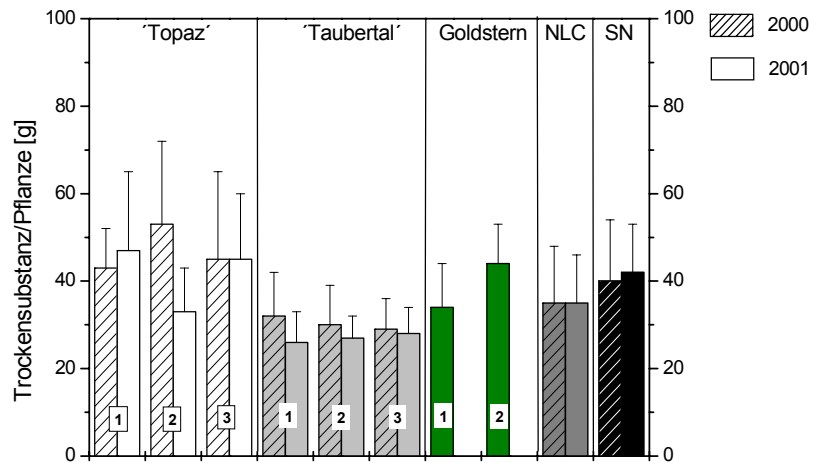


Abb. 54: Trockengewicht der Erntedroge der Sorten/Eliteselektionen im 1. und 2. Standjahr

2.1.2.2 Eigenselektionen

Anbaujahr 2000 (1. Standjahr)

Tab. 16: Erntetermin und Ertrag der Eigenselektionen im Jahr 2000

Nr.	Ernte	Ertrag			Nr.	Ernte	Ertrag		
	Datum	FS/ Pflanze [g]	TS/ Pflanze [g]	kg TS/ ha		Datum	FS/ Pflanze [g]	TS/ Pflanze [g]	kg TS/ ha
1 / 1 n = 9	13.08.00	84 ± 29	26 ± 7	1040	A	22.08.00	120	35	1400
1 / 2 n = 3	04.08.00	127 ± 83	22 ± 7	880	B	13.08.00	100	35	1400
11 / 1 n = 8	13.08.00	96 ± 24	28 ± 13	1120	C	13.08.00	123	37	1480
11 / 2 n = 24	21.08.00	86 ± 26	30 ± 8	1200	D	13.08.00	53	20	800
11 / 3 n = 24	09.08.00	107 ± 39	28 ± 7	1120	E	22.08.00	73	25	1000
11 / 4 n = 17	07.08.00	106 ± 26	25 ± 6	1000	F	13.08.00	93	33	1320
14 / 1 n = 6	04.08.00	162 ± 41	32 ± 9	1280	G	13.08.00	75	23	920
14 / 2 n = 6	31.08.00	83 ± 44	39 ± 15	1560	H	22.08.00	90	29	1160
15 / 1 n = 20	18.08.00	80 ± 32	29 ± 9	1160	J	13.08.00	153	62	2480
15 / 2 n = 8	22.08.00	133 ± 44	40 ± 13	1600					

Abkürzungen der Sorten/Herkünfte und deren Parzellen-Nr.: s. Material und Methoden 2.2.1

Die Selektionen 1/2, 14/1 und J hatten den frühesten Erntetermin der Selektionen und lagen damit noch deutlich vor Goldstern und 'Taubertal' (s. 2.1.2.1). 14/2 kam als letzter Pflanzentyp des gesamten Anbauversuchs zur Vollblüte, erwies sich aber neben 15/2 und B als ertragreichste Selektion.

Anbaujahr 2001 (2. Standjahr)

Tab. 17: Erntetermin und Ertrag der Eigenselektionen im Jahr 2001

Nr. (n = 4)	Ernte	Ertrag			
	Datum	FS/ Pflanze [g]	TS/ Pflanze [g]	kg TS/ ha	2. Blüte
1 / 1	29.06.01	144 ± 41	36 ± 7	1440	+
1 / 2 n = 2	29.06.01	68 ± 10	18 ± 2	720	+
11 / 1	29.06.01	132 ± 31	33 ± 7	1320	-
11 / 2	02.07.01	139 ± 42	46 ± 18	1840	-
11 / 3	02.07.01	96 ± 29	28 ± 7	1120	-
11 / 4	02.07.01	96 ± 21	26 ± 5	1040	-
14 / 1	04.08.00	196 ± 81	50 ± 23	2000	+
14 / 2	02.07.01	193 ± 65	48 ± 13	1920	+
15 / 1	18.08.00	177 ± 71	42 ± 14	1680	-
15 / 2	02.07.01	141 ± 45	33 ± 11	1320	+

Nr.	Ernte	Ertrag			
	Datum	FS/ Pflanze [g]	TS/ Pflanze [g]	kg TS/ ha	2. Blüte
A	15.07.01	199	64	2560	-
B	Ausfall durch <i>C. gloeosporioides</i>				
C	02.07.01	205	51	2040	-
D	Ausfall durch <i>C. gloeosporioides</i>				
E	02.07.01	126	36	1440	+
F	02.07.01	110	37	1480	?
G	02.07.01	90	24	960	-
H	15.07.01	164	48	1920	-
J	02.07.01	110	37	1480	-

Abkürzungen, Nr. der Sorten/Herkünfte, Boniturschema: s. Material und Methoden 2.2.1 u. 2.2.2

Zusammenfassung der Ergebnisse der Anbauversuche:

Allgemein

- Die Boniturmerkmale Blattform, Stengelfärbung, Hypericinpunkte auf den Blättern, Petalen und im Fruchtknoten veränderten sich im Vergleich von 1. zu 2. Standjahr nicht wesentlich.
- Stengelanzahl und Wuchshöhe verdoppelten sich im 2. Anbaujahr bei fast allen Pflanzentypen.
- Die Abfolge der Erntetermine der einzelnen Phänotypen verlief in beiden Anbaujahren in ähnlicher Reihenfolge. Der Erntezeitraum erstreckte sich über ca. 5 Wochen.

Sorten und Eliteselektionen

- Die Herkünfte von 'Taubertal' und Goldstern waren in sich morphologisch gleich und einheitlich. Auch SN bildete einen homogenen Pflanzenbestand. Bei 'Topaz' war jede Herkunft von einem anderen Phänotyp geprägt. Alle 'Topaz'-Herkünfte waren wiederum in sich sehr heterogen. NLC wies ebenfalls mehrere unterschiedliche Pflanzentypen im Bestand auf.
- Goldstern zeigte sich besonders anfällig gegenüber dem Pilz *Colletotrichum gloeosporioides*. Sämtliche Pflanzen dieser Sorte waren zu Beginn des 2. Standjahres abgestorben.
- Goldstern und To 1 zeichneten sich durch die schlechteste Boniturnote bezüglich Hypericin auf den Petalen aus. 'Taubertal' wies in beiden Anbaujahren den geringsten Ertrag auf.
- Durch einen besonders kompakten und teils gedrungenen Wuchs fielen Goldstern, 'Taubertal' und SN auf.
- SN hatte als einzige Eliteselektion im 1. Jahr keine gleichmäßige und reiche Blüte aufzuweisen.
- Im 2. Standjahr konnten NLC und SN keine Nachblüte ausbilden.
- Der Ertrag der Sorten und Eliteselektionen im 2. Standjahr stagnierte meist auf dem Niveau des Vorjahres. Bei To 2 wurde sogar eine erhebliche Ertragseinbuße verzeichnet.

Eigenselektionen

- Die Mindestanforderung für die Selektionen waren günstige Wachstumsparameter und/oder eine sehr gute Boniturnote in der Kategorie „Hypericinbehälter auf den Petalen“.
- Bei den Eigenselektionen konnte zum Teil eine deutliche Steigerung im Ertrag beobachtet werden. Die Erträge der Eigenselektionen waren vergleichbar mit den durchschnittlichen Werten der Sorten.

2.1.3 Anfälligkeit gegenüber *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum gloeosporioides ist der Erreger der Johnniskrautwelke. Hierbei handelt es sich um ein hochaggressives Pathogen, das bereits bei geringer Inokulumdichte zu einer Infektion führt. Dies geschieht häufig bereits bei der Jungpflanzenproduktion durch infiziertes Saatgut. Zu dem Ausbruch der Krankheit bei latent infizierten Pflanzen kommt es meist erst unter Streßbedingungen, z.B. Wasserstreß (GÄRBER UND SCHENK, 2002).

Das erste Anzeichen ist die plötzliche Welke einzelner Triebe, die auf die gesamte Pflanze übergreift. Die Stengel vertrocknen und färben sich dabei rostrot. Bei extrem trockener Witterung sterben die Pflanzen nach dem Auftreten der ersten Symptome innerhalb weniger Tage ab. Ein häufiger Wechsel zwischen trockenen Perioden und ergiebigen Niederschlägen begünstigt die Verbreitung des Pilzes im Bestand. In der Praxis ist ein Totalausfall aller Pflanzen bzw. der Ernte keine Seltenheit. Wirksame Spritzmittel sind bisher nicht verfügbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Infektionsversuche durchgeführt. Die Infektionen sind auf natürlichen Befall zurückzuführen. Gezielte Untersuchungen hinsichtlich der Toleranz der Pflanzen gegenüber dem Pilz waren nicht möglich, da die Infektionsherde im Bestand nicht gleichmäßig verteilt waren. Daher werden im Folgenden keine Boniturdaten aufgelistet, sondern nur Beobachtungen wiedergegeben.

Anbaujahr 1999

Bereits im Frühjahr 1999 wurden die Samen der einzelnen Herkünfte der späteren Blockanlage ausgesät. Das Saatgut wurde dabei nicht vorbehandelt bzw. desinfiziert. Kurz vor der geplanten Pflanzung Anfang Mai zeigten die ersten Jungpflanzen die typischen Welkesymptome. Durch das Spritzwasser der Überkopfbewässerung verbreiteten sich die Konidien des Pilzes sehr schnell in der Jungpflanzenanzucht. Der Infektionsdruck war so hoch, daß nur vereinzelt Jungpflanzen von 'Taubertal' überlebten. Da der Befall sehr spät eingesetzt hatte, war eine erneute Aussaat für die geplante Frühjahrspflanzung nicht mehr sinnvoll.

Das Feld des Jahres 1999, das sich bereits im 2. Standjahr befand, zeigte zu Beginn der Ernte die ersten Anzeichen der Welke. Die Rendreihe von SN, die nicht an die BREIT-Herkunft angrenzte, war zuerst betroffen. Die sichtbare Infektion schritt allerdings nicht sehr schnell voran, so daß die übrigen Pflanzen noch „gesund“ beerntet werden konnten. Auch nach der Ernte breitete sich der Befall nur langsam weiter aus. Im Herbst wurde das Feld zur Eindämmung des Pilzes untergepflügt.

Anbaujahre 2000/2001

Im Frühjahr 2000 wurde das Saatgut mit Bleichlaugung vorbehandelt (s. Material und Methoden 2.2.1). Bei der Jungpflanzenaufzucht war kein Befall von *Colletotrichum gloeosporioides* sichtbar. Ebenso hatten die Pflanzen auf dem Feld während der Vegetationsperiode 2000 im Allgemeinen keine Krankheitsmerkmale. Nur bei Goldstern waren vereinzelt Pflanzen zu beobachten, die kurz nach der Ernte Symptome zeigten.

Im Frühjahr 2001 war auf sämtlichen Goldstern-Parzellen kein Austrieb zu beobachten. Diese Parzellen waren die Hauptinfektionsquelle, durch die sich der Pilz zunächst langsam über das gesamte Feld ausbreitete. Die Nachbarparzellen von Goldstern waren daher meist besonders betroffen. Im Erntezeitraum Juni/Juli schritt der Befall besonders drastisch fort. Auffällig dabei war, daß bereits beerntete Pflanzen am häufigsten befallen wurden.

Eine besondere Schwäche gegenüber *Colletotrichum gloeosporioides* zeigte die Selektion 11/3, die im Block I komplett ausfiel, und die Einzelpflanzen B und D, die noch weit vor der Blüte abstarben. Aber auch alle anderen Selektionen und die Sorten/Eliteselektionen wurden bei dem stetig ansteigenden Befallsdruck infiziert. Die höchste Toleranz gegen das Pathogen zeigte 'Taubertal'. Pflanzen dieser Sorte wiesen selbst neben Goldstern-Parzellen erst weit nach der Ernte Symptome auf. Eine Resistenz gegen den Pilz war bei keinem Johanniskrauttyp oder Sorte festzustellen.



Abb. 55: Befall von *Colletotrichum gloeosporioides* an Johanniskraut

2.2 Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen

Zur Bewertung der pharmakologischen Eigenschaften der verschiedenen Johanniskraut-herkünfte wurden Extrakte aus dem getrockneten Erntematerial der Pflanzen untersucht.

2.2.1 Zusammensetzung der Extrakte

Sorten und Eliteselektionen

Für die Extrakte der Sorten und Eliteselektionen wurden im 1. und 2. Standjahr pro Block je 8 Pflanzen einer Herkunft nach einem Raster (s. Anhang II) beerntet, ihr Drogenmaterial zu gleichen Teilen gepoolt und extrahiert. Das Ernteraster wurde stets beibehalten, auch wenn sich teilweise sortenabweichende Phänotypen darunter befanden. Dies war bei NLC und den Herkünften von 'Topaz' der Fall (s. Ergebnisse 2.1.1.2), deren Extrakte folgendermaßen zusammengesetzt waren:

Tab. 18: Anteil der sortenuntypischen Pflanzen an den Extrakten von 'Topaz' und NLC

Sorte/ Herkunft	Extrakt	sortenuntypische Pflanzen / „Ausreißer“		
		Anzahl	Typ	% des Extraktes
2 (To 1)	2 I	2	2A1	25
	2 II	1	2A1	12,5
	2 III	4	2A1	50
	2 IV	2	2A1	25
3 (To 2)	3 I	2	3A1	25
	3 II	1	3A1	12,5
	3 III	0	3A1	0
	3 IV	2	3A1	25
4 (To 3)	4 I	2	4A1; 4A2	25
	4 II	2	4A1	25
	4 III	1	4A3	12,5
	4 IV	0		0
9 (NLC)	9 I	1	9A2	12,5
	9 II	0		0
	9 III	1	9A1	12,5
	9 IV	1	9A1	12,5

Abkürzungen der Herkünfte, Parzellen-Nr. u. Extraktbezeichnung: s. Material und Methoden 2.2.1 u. 2.3.1

Eigenselektionen

Im Jahr 2000 (1. Standjahr) wurde pro Block eine höchstmögliche Anzahl an gleichartigen Phänotypen je Parzelle geerntet und zu einem Extrakt verarbeitet. Im Jahr 2001 (2. Standjahr) wurde nur noch eine Pflanze je Phänotyp und Block beerntet. Das getrocknete Erntematerial dieser 4 Pflanzen wurde vereinigt und ein Extrakt daraus gewonnen.

2.2.2 Inhaltsstoffanalyse

Zur relativen Bestimmung des Gehalts an Inhaltsstoffen wurden die Extrakte mit Hilfe der HPLC bei einer Wellenlänge von 254 nm auf ihre Hauptsubstanzgruppen untersucht. Falls nicht anders vermerkt, wurde aus rationellen Gründen von jeder Herkunft bzw. Selektion nur der Extrakt aus Block I untersucht. Bei Goldstern und 'Taubertal' wurde exemplarisch nur jeweils die erste Herkunft getestet.

2.2.2.1 Anbaujahr 2000

Die Extrakte des Jahres 2000 wurden auf 8 mg TS/ml eingestellt und in dieser Konzentration an der HPLC gemessen.

Sorten/Eliteselektionen

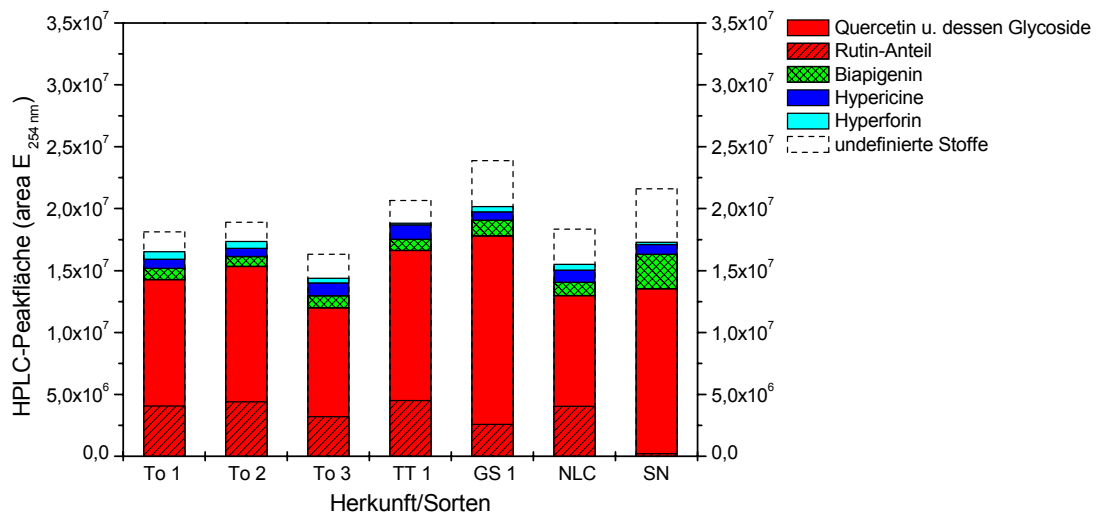


Abb. 56: Vergleich des relativen Gehalts an Inhaltsstoffen der Sorten/Eliteselektionen (2000)

Goldstern 1 wies den höchsten Gehalt an Gesamtinhaltsstoffen auf. Dies war auch im Bezug auf Quercetin und seinen Glykosiden der Fall, gefolgt von 'Taubertal' 1 und 'Topaz' 2. Rutin war außer bei SN in ausreichendem Maß vorhanden. Diese Herkunft zeichnete sich zudem

durch den höchsten Biapigenin-Gehalt und den größten Anteil an nicht näher definierbaren Inhaltsstoffen aus. Besonders hohe Hypericin-Werte erzielten 'Taubertal' 1, 'Topaz' 3 und NLC. Allerdings wiesen 'Taubertal' 1, 'Topaz' 3 und auch SN nur geringe Mengen an Hyperforin auf.

Eigenselektionen

Es wurden nur diejenigen Eigenselektionen untersucht, die in der Bonitur durch besonders günstige Merkmale hervortraten (s. Tab. 12).

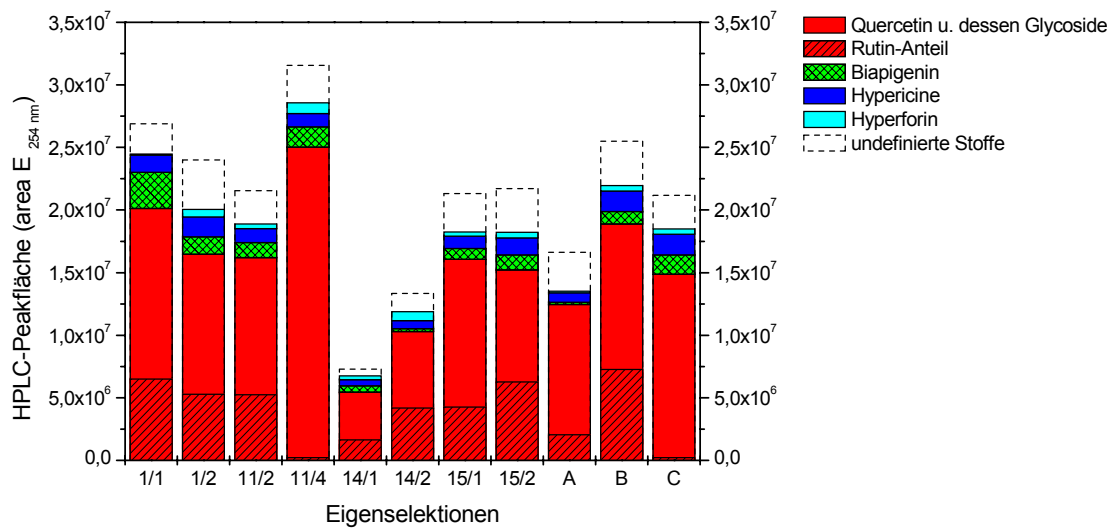


Abb. 57: Vergleich des relativen Gehalts an Inhaltsstoffen der Eigenselektionen (2000)

11/4 zeichnete sich durch die höchsten Mengen an Gesamtinhaltsstoffen und an Quercetin-Derivaten aus, gefolgt von 1/1 und der Einzelpflanze B. 11/4 und die Einzelpflanze C enthielten nur geringe Mengen an Rutin. 1/1 und 11/4 wiesen die höchsten Biapigenin-Mengen auf. Die meisten Hypericine lagen in 1/2, 15/2 und den Einzelpflanzen B und C vor. Die höchsten Hyperforin-Werte konnte 11/4 erzielen. Außer bei den Selektionen 14/1 und 14/2 war der Anteil an nicht bestimmbar Substanzen sehr hoch.

2.2.2.2 Anbaujahr 2001

Die Extrakte des Jahres 2001 wurden auf 20 mg TS/ml standardisiert und in dieser Konzentration mit Hilfe der HPLC analysiert.

Sorten/Eliteselektionen

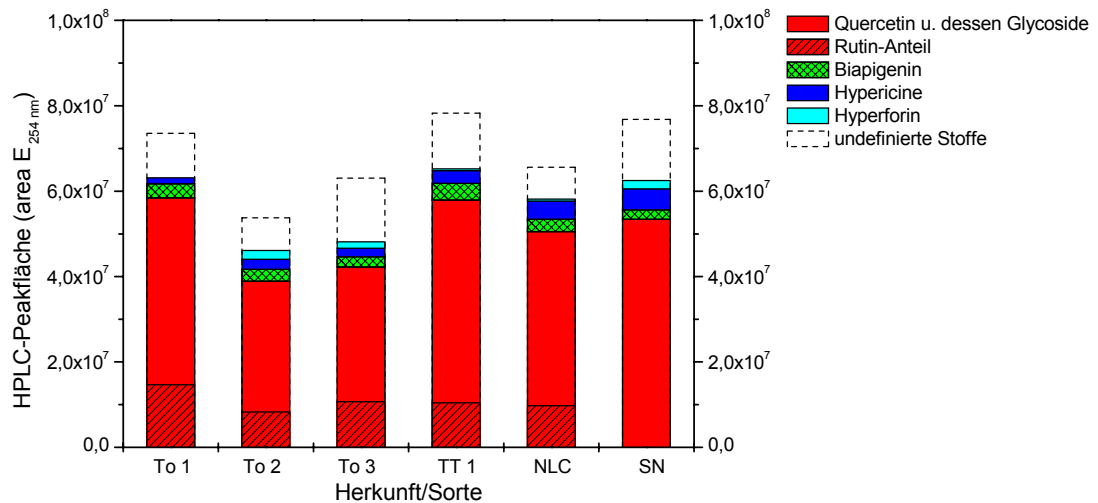


Abb. 58: Vergleich des relativen Gehalts an Inhaltsstoffen der Sorten und Eliteselektionen (2001)

Im Vergleich zum Vorjahr verschob sich die relative Menge der Inhaltsstoffe der Sorten/Eliteselektionen zueinander teilweise erheblich.

SN erreichte neben 'Taubertal' 1 und 'Topaz' 1 die höchsten Werte an Gesamtinhaltsstoffen und Quercetin-Derivaten. Rutin fehlte bei SN jedoch völlig. NLC und SN zeichneten sich durch den höchsten Gehalt an Hypericinen aus. Hyperforin konnte bei 'Topaz' 1, 'Taubertal' 1 und NLC nur in geringen Mengen nachgewiesen werden.

Abweichende Phänotypen aus den Sorten/Eliteselektionen

Von den sortenabweichenden Pflanzen wurde im Jahr 2001 jeweils eine Pflanze beerntet und extrahiert. In der folgenden Abbildung wurden NLC (9) und den 'Topaz'-Herkünften (2-4) exemplarisch die häufigsten und optisch auffälligsten Ausreißer gegenübergestellt.

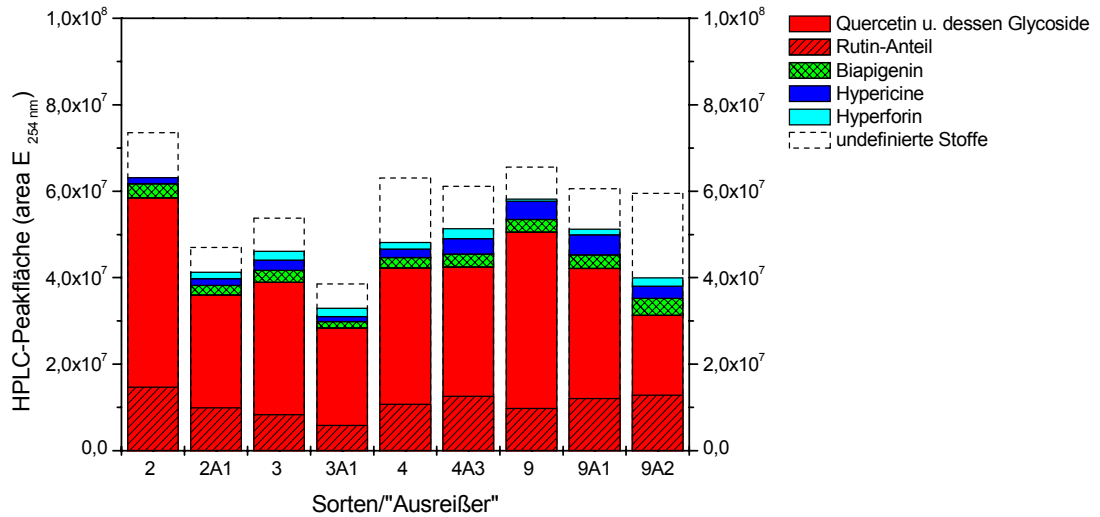


Abb. 59: Vergleich des relativen Gehalts an Inhaltsstoffen der Sorten und der daraus abweichenden Pflanzentypen

Anhand der Inhaltsstoffspektren und der relativen Menge an Substanzen waren teilweise sehr große Unterschiede zwischen den Herkünften und ihren abweichenden Phänotypen zu beobachten.

Eigenselektionen

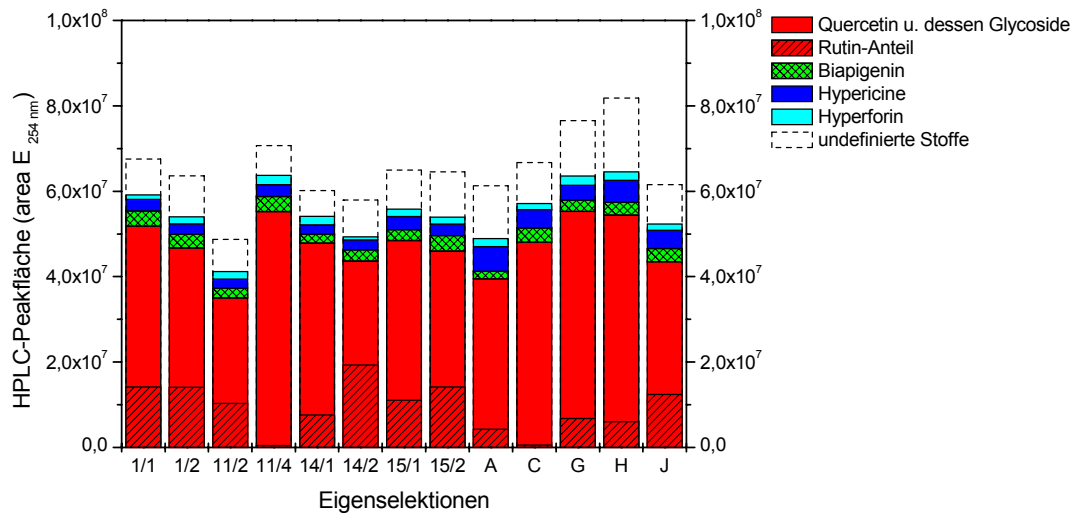


Abb. 60: Vergleich des relativen Gehalts an Inhaltsstoffen der Eigenselektionen (2001)

Im Vergleich zum Jahr 2000 (s. Abb. 57) zeigte sich eine Verringerung der Unterschiede zwischen den Selektionen hinsichtlich ihrer Gesamtinhaltsstoffmenge.

Wie im Vorjahr besaß die Selektion 11/4 die höchste Menge an Quercetin-Derivaten, jedoch genau wie Einzelpflanze C nur sehr geringe Mengen an Rutin. Es kam nur zu geringfügigen Verschiebungen bei der Verteilung der Substanzgruppen innerhalb der jeweiligen Selektionen. Nur bei der Einzelpflanze A war eine drastische Zunahme an Hypericinen zu verzeichnen.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Inhaltsstoffanalyse der Extrakte der Jahre 2000/2001:

- Das Inhaltsstoffspektrum und das Verhältnis der Substanzen zueinander blieb bei den jeweiligen Herkünften bzw. Selektionen in beiden Anbaujahren annähernd gleich.
- Einige Pflanzentypen produzierten kaum bzw. kein Rutin. Ähnliches war auch bei Hyperforin zu beobachten.
- Die „Ausreißer“ aus den Sorten zeigten auch in Inhaltsstoffspektrum und -menge klare Unterschiede zu den jeweiligen Sorten.
- Der Anteil an nicht definierbaren Substanzen stieg im 2. Standjahr an und war besonders bei den „Ausreißern“ aus den Sorten sehr hoch.
- SN fiel im 2. Standjahr durch eine besonders deutliche Zunahme an Quercetin-Derivaten und Hypericinen bei gleichzeitiger Reduktion von Biapigenin auf.

2.2.3 Vergleich der Sorten, Eliteselektionen und Eigenselektionen in verschiedenen biochemischen Testsystemen

2.2.3.1 Peroxidase - katalysierte Dimerisierung von L-Tyrosin

Die POD-katalysierte Dimerisierung von L-Tyrosin stellt eine vereinfachte Modellreaktion der Dimerisierung von Enkephalinen durch Myeloperoxidase dar (HEINECKE ET AL., 1993; DENKE, 1997). Der genaue Testansatz ist unter Material und Methoden 2.5.1 beschrieben.

2.2.3.1.1 Ergebnisse der Extrakte des Anbaujahres 2000

Sorten und Eliteselektionen

Die Extrakte wurden zunächst auf 20 mg Drogeneinwaage/ml Extraktendvolumen eingestellt und anschließend mit einer Konzentration von 1,6% i.A. in das Testsystem eingesetzt. In Tab. 19 sind die Ergebnisse der einzelnen Extrakte je Sorte (2, 3, ...) und Block (I – IV) aufgeführt. Aus diesen Ergebnissen wurde wiederum der Durchschnittswert über die 4 Blöcke der Sorte/Eliteselektion berechnet.

Tab. 19: Hemmung der Tyrosin-Dimerisierung durch die Extrakte der Sorten/Eliteselektionen des Anbaujahres 2000

Sorte/ Herkunft	Extrakt	Hemmung der Dimerisierung [%]	Mittelwert der Blöcke
‘Topaz’ 1	2 I	62,6 ± 5,0	64,6 ± 2,0
	2 II	65,4 ± 4,8	
	2 III	63,4 ± 4,2	
	2 IV	67,1 ± 3,3	
‘Topaz’ 2	3 I	61,0 ± 2,1	63,5 ± 3,4
	3 II	63,2 ± 5,0	
	3 III	61,5 ± 2,0	
	3 IV	68,4 ± 5,5	
‘Topaz’ 3	4 I	62,3 ± 4,3	62,3 ± 6,8
	4 II	59,2 ± 5,1	
	4 III	71,7 ± 6,2	
	4 IV	56,1 ± 4,1	
‘Taubertal’ 1	5 I	82,6 ± 5,9	80,3 ± 2,0
	5 II	79,8 ± 5,9	
	5 III	81,1 ± 6,6	
	5 IV	77,8 ± 4,0	
‘Taubertal’ 2	6 I	77,4 ± 3,6	77,0 ± 6,2
	6 II	68,5 ± 5,8	
	6 III	83,3 ± 3,9	
	6 IV	78,8 ± 3,9	
Goldstern 1	7 I	70,4 ± 4,5	72,4 ± 2,6
	7 II	75,3 ± 4,9	
	7 III	74,0 ± 6,2	
	7 IV	70,0 ± 2,2	
Goldstern 2	8 I	72,8 ± 3,6	71,5 ± 2,4
	8 II	73,4 ± 3,2	
	8 III	68,0 ± 1,8	
	8 IV	71,7 ± 4,0	
NLC	9 I	76,3 ± 4,8	74,9 ± 5,5
	9 II	76,3 ± 4,0	
	9 III	67,0 ± 4,4	
	9 IV	79,9 ± 3,0	
SN	10 I	58,4 ± 5,1	65,0 ± 5,6
	10 II	62,7 ± 2,4	
	10 III	68,1 ± 4,2	
	10 IV	70,9 ± 0,6	
‘Taubertal’ 3	12 I	83,4 ± 2,3	82,5 ± 1,8
	12 II	82,6 ± 3,8	
	12 III	80,0 ± 2,7	
	12 IV	84,0 ± 4,5	

Abkürzungen der Herkünfte, Parzellen-Nr. u. Extraktbezeichnung: s. Material und Methoden 2.2.1 u. 2.3.1

Die besten Ergebnisse erzielten die Extrakte von 'Taubertal'. NLC erreichte, gefolgt von Goldstern, mit seinen Extrakten eine fast ebenso gute Hemmwirkung im Testsystem. SN konnte die Dimerisierung nur geringfügig besser hemmen als die 'Topaz'-Herkünfte.

Die Unterschiede zwischen den Blöcken I – IV einer Johanniskrautherkunft lagen bei bis zu 15% (4 III und 4 IV; 6 II und 6 III).

Die Sorten zeigten kaum Unterschiede hinsichtlich ihrer Herkünfte, wie in Abb. 61 anhand der Mittelwerte der Blöcke veranschaulicht wird.

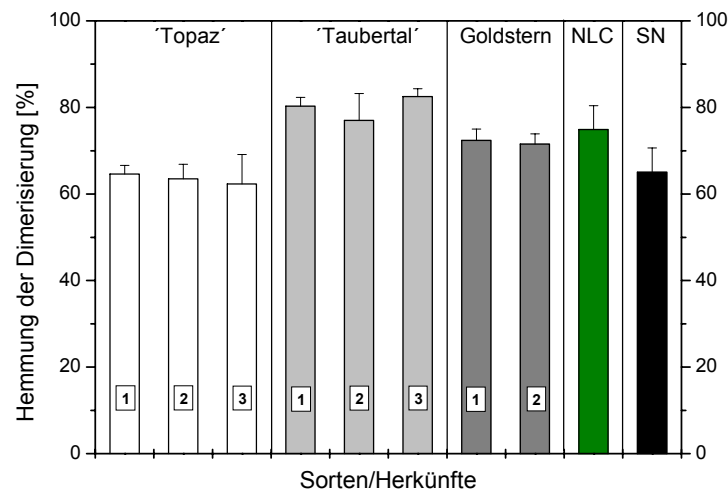


Abb. 61: Hemmung der Tyrosin-Dimerisierung durch die Extrakte der Sorten/Eliteselektionen des Anbaujahres 2000 (Mittel über die Blöcke)

Eigenselektionen

Da hier eine geringere Drogenmenge vorgelegen hatte als bei den Sorten, konnten die Extrakte nur auf 8 mg Droge/ml eingestellt und mit einer Konzentration von 2,5% i.A. in das Testsystem eingesetzt werden. Um einen Vergleich mit 'Taubertal' zu ermöglichen, wurde der Extrakt 5 I ('Taubertal' 1) mit der gleichen Konzentration i.A. getestet. In Tab. 20 sind die Ergebnisse der Extrakte der Selektionen, sowie deren Mittelwert über die Blöcke aufgelistet. Tab. 21 gibt die Testwerte der selektierten Einzelpflanzen wider.

Tab. 20: Hemmung der Tyrosin-Dimerisierung durch die Extrakte der Eigenselektionen des Anbaujahres 2000

Selektion	Extrakt	Hemmung der Dimerisierung [%]	Mittelwert der Blöcke
1/1	1/1/I	53,8 ± 0,4	55,9 ± 3,7
	1/1/II	51,8 ± 1,4	
	1/1/III	58,0 ± 0,5	
	1/1/IV	59,9 ± 2,2	
1/2	1/2/I	39,7 ± 0,9	52,8 ± 28,9
	1/2/II	32,6 ± 2,2	
	1/2/IV	85,9 ± 2,1	
11/1	11/1/II	48,4 ± 2,7	47,8 ± 1,3
	11/1/III	48,6 ± 2,6	
	11/1/IV	46,3 ± 2,7	
11/2	11/2/I	61,8 ± 2,8	58,7 ± 8,8
	11/2/II	59,9 ± 2,6	
	11/2/III	66,8 ± 2,5	
	11/2/IV	46,2 ± 6,2	
11/3	11/3/I	55,0 ± 3,5	50,3 ± 4,1
	11/3/II	51,6 ± 3,8	
	11/3/III	49,3 ± 2,2	
	11/3/IV	45,2 ± 0,9	
11/4	11/4/I	54,3 ± 4,6	52,3 ± 5,0
	11/4/II	55,4 ± 3,4	
	11/4/III	54,5 ± 4,2	
	11/4/IV	44,8 ± 1,3	
14/1	14/1/I	6,8 ± 0,6	31,6 ± 17,6
	14/1/II	33,3 ± 7,0	
	14/1/III	38,7 ± 0,7	
	14/1/IV	47,7 ± 1,1	
14/2	14/2/I	41,1 ± 2,2	39,8 ± 2,6
	14/2/II	42,7 ± 2,4	
	14/2/III	37,1 ± 1,1	
	14/2/IV	38,2 ± 0,5	
15/1	15/1/I	55,3 ± 3,4	51,3 ± 3,4
	15/1/II	52,8 ± 1,8	
	15/1/III	49,0 ± 2,2	
	15/1/IV	47,9 ± 1,7	
15/2	15/2/I	59,9 ± 2,4	54,3 ± 5,3
	15/2/II	57,3 ± 2,3	
	15/2/III	51,6 ± 0,6	
	15/2/IV	48,3 ± 1,6	
'Taubertal' 1	5 I	62,8 ± 4,6	

Abkürzungen der Herkünfte, Parzellen-Nr. u. Extraktbezeichnung: s. Material und Methoden 2.2.1 u. 2.3.1

Tab. 21: Hemmung der Tyrosin-Dimerisierung durch die Extrakte der Einzelpflanzen des Anbaujahres 2000

Einzelpflanzen	
A	34,6 ± 1,3
B	52,0 ± 2,8
C	47,4 ± 1,9
D	45,3 ± 1,2
E	47,2 ± 1,9
F	44,3 ± 2,3
G	45,9 ± 1,8
H	41,0 ± 1,6
TT 1	62,8 ± 4,6

Abkürzungen der Herkünfte, Parzellen-Nr. u. Extraktbezeichnung: s. Material und Methoden 2.2.1 u. 2.3.1

Im Vergleich zu den anderen Selektionen schnitten die Selektionen 1/1, 11/2, 15/1, 15/2 und die Einzelpflanze B mit über 50% Hemmung am besten ab. In den Selektionen 1/2 und 14/1 fiel jeweils ein Extrakt durch ein außergewöhnliches Ergebnis auf. 1/2/III erzielte eine überdurchschnittlich gute, 11/4/I eine außergewöhnlich schlechte Hemmung der Dimerisierung. Diese Extrakte gingen nicht mit in die Berechnung der Mittelwerte der jeweiligen Selektion ein. Die Schwankung zwischen den Blöcken lag wie bei den Sorten bei bis zu 15%.

Keine der Selektionen erreichte die Hemmleistung des 'Taubertal'-Extraktes 5 I.

In den Abb. 62 und 63 sind die Mittelwerte der Selektionen bzw. Einzelpflanzen nochmals im Vergleich zu TT 1 dargestellt.

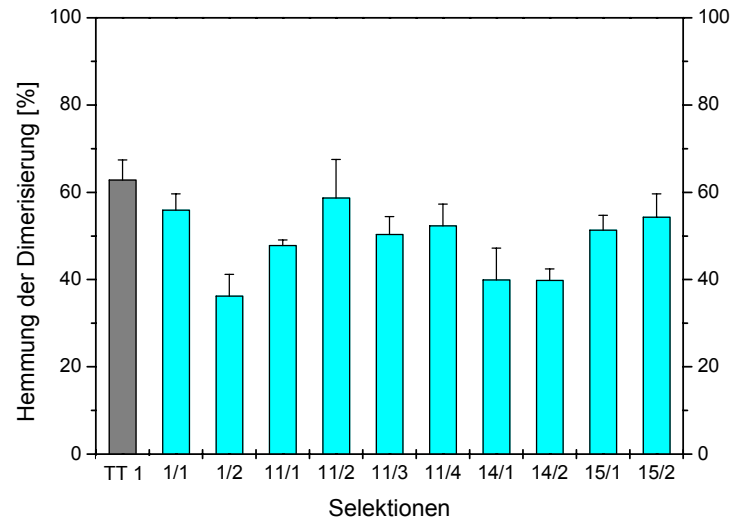


Abb. 62: Hemmung der Tyrosin-Dimerisierung durch die Extrakte der Eigenselektionen im Anbaujahr 2000 (Mittel über die Blöcke)

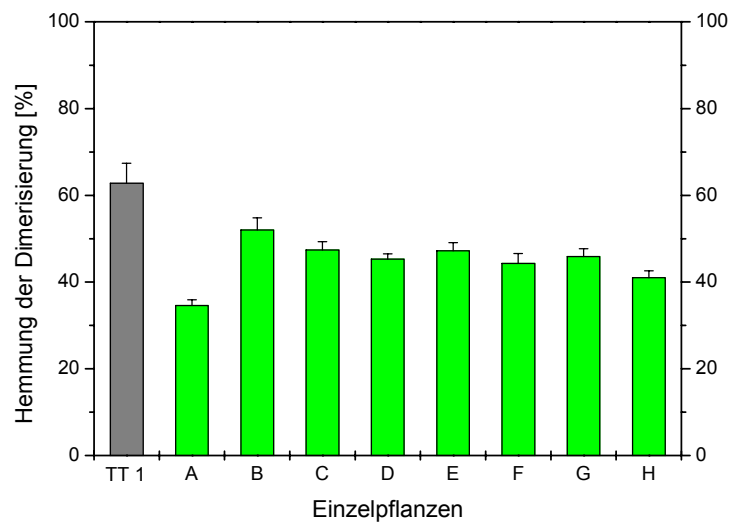


Abb. 63: Hemmung der Tyrosin-Dimerisierung durch die Extrakte der selektierten Einzelpflanzen im Anbaujahr 2000

2.2.3.1.2 Ergebnisse der Extrakte des Anbaujahres 2001

Alle Extrakte des Jahres 2001 wurden auf 20 mg Droge/ml eingestellt. Sie wurden mit einer Konzentration von 1% i.A. in das Testsystem eingesetzt, um eine aussagekräftige Unterscheidung zu gewährleisten.

Sorten und Eliteselektionen

In Tab. 22 sind die Ergebnisse der Einzelextrakte und der daraus errechnete Mittelwert über alle Blöcke je Sorte/Eliteselektion aufgeführt.

Tab. 22: Hemmung der Tyrosin-Dimerisierung durch die Extrakte der Sorten und Eliteselektionen im Anbaujahr 2001

Sorte/ Herkunft	Extrakt	Hemmung der Dimerisierung [%]	Mittelwert der Blöcke
"Topaz" 1	2 I	26,3 ± 1,7	30,5 ± 3,0
	2 II	30,8 ± 2,6	
	2 III	33,2 ± 5,0	
	2 IV	31,8 ± 4,4	
"Topaz" 2	3 I	43,8 ± 3,0	41,5 ± 6,6
	3 II	40,9 ± 4,1	
	3 III	48,5 ± 4,3	
	3 IV	32,9 ± 3,1	
"Topaz" 3	4 I	39,6 ± 4,5	43,6 ± 12,1
	4 II	30,3 ± 3,8	
	4 III	44,9 ± 4,9	
	4 IV	59,3 ± 2,7	
"Taubertal" 1	5 I	67,2 ± 4,2	59,8 ± 6,7
	5 II	55,0 ± 6,3	
	5 III	63,6 ± 5,5	
	5 IV	53,3 ± 4,7	
"Taubertal" 2	6 I	59,7 ± 5,7	51,4 ± 6,4
	6 II	45,6 ± 3,1	
	6 III	53,3 ± 6,4	
	6 IV	47,1 ± 3,6	
Goldstern 1	Ausfall durch <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		
Goldstern 2	Ausfall durch <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		
NLC	9 I	56,9 ± 4,5	53,0 ± 7,8
	9 II	45,9 ± 4,9	
	9 III	47,1 ± 2,2	
	9 IV	62,1 ± 4,1	
SN	10 I	39,8 ± 2,1	52,7 ± 8,6
	10 II	56,1 ± 3,9	
	10 III	56,3 ± 2,5	
	10 IV	58,5 ± 0,6	
"Taubertal" 3	12 I	35,0 ± 2,8	48,8 ± 10,5
	12 II	46,3 ± 3,6	
	12 III	55,6 ± 3,7	
	12 IV	58,2 ± 4,2	

Abkürzungen der Herkünfte, Parzellen-Nr. u. Extraktbezeichnung: s. Material und Methoden 2.2.1. u. 2.3.1

‘Taubertal’ 1 erreichte mit Abstand die beste Hemmwirkung im Testsystem, gefolgt von NLC, SN und ‘Taubertal’ 2. Wie im Vorjahr hemmten die Herkünfte von ‘Topaz’ die Dimerisierung am schlechtesten.

Die Unterschiede zwischen den Blöcken einer Herkunft betragen teilweise über 20% (4 II und 4 IV; 12 I und 12 IV).

‘Taubertal’ und ‘Topaz’ unterschieden sich deutlich hinsichtlich ihrer Herkünfte im Testsystem. Besonders auffallend war dabei ‘Topaz’ 1 mit nur 30% Hemmung der Dimerisierung. Zur Veranschaulichung sind in Abb. 64 die Mittelwerte der Blöcke der einzelnen Herkünfte aufgetragen.

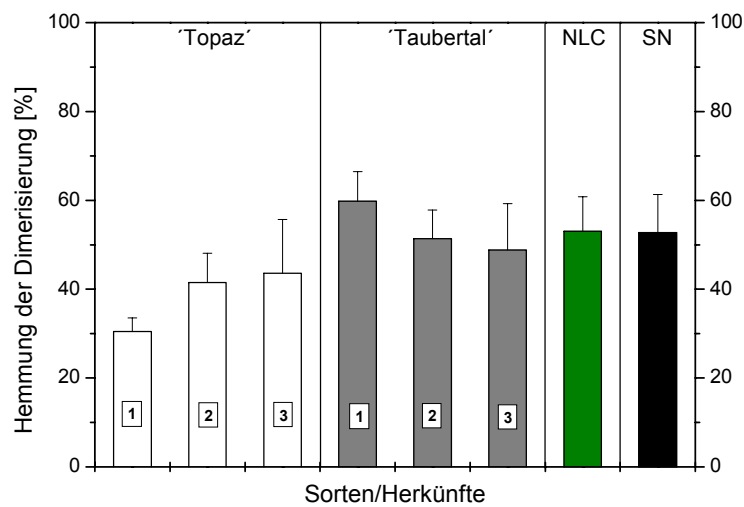


Abb. 64: Hemmung der Tyrosin-Dimerisierung durch die Extrakte der Sorten/Eliteselektionen des Anbaujahres 2001 (Mittel über die Blöcke)

Abweichende Phänotypen aus den Sorten/Eliteselektionen

Tab. 23 gibt die Ergebnisse der Extrakte der sortenuntypischen Phänotypen in dieser Untersuchung wieder.

Tab. 23: Hemmung der Dimerisierung von Tyrosin durch die Extrakte der abweichenden Phänotypen aus den Sorten/Eliteselektionen

Sorte/ Herkunft	Typ/Extrakt	Hemmung der Dimerisierung [%]
2 (To 1)	2A1	41,2 ± 4,3
	2A2	52,3 ± 3,8
	2A3	38,9 ± 9,0
3 (To 2)	3A1	28,0 ± 4,1
4 (To 3)	4A1	46,8 ± 3,8
	4A2	40,2 ± 4,4
	4A3	60,4 ± 2,4
	4A4	30,6 ± 4,2
	4A5	48,9 ± 3,5
9 (NLC)	9A1	79,6 ± 6,9
	9A2	66,1 ± 5,1

Abkürzungen der Herkünfte, Parzellen-Nr. u. Extraktbezeichnung: s. Material und Methoden 2.2.1 u. 2.3.1

Die Typen aus den jeweiligen Herkünften zeigten deutliche Unterschiede in ihrem Einfluß auf das Testsystem.

In Abb. 65 werden diese Ergebnisse den Mittelwerten der Ursprungsherkünfte gegenübergestellt.

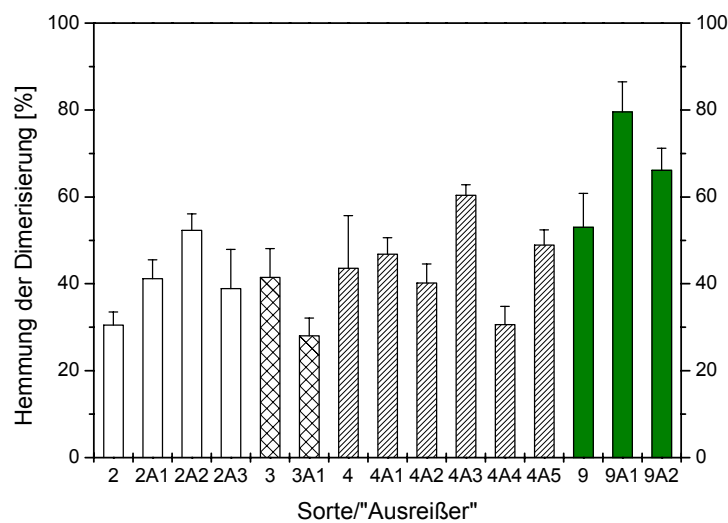


Abb. 65: Vergleich der Sorten/Eliteselektionen mit den phänotypisch abweichenden Pflanzentypen dieser Herkünfte im Tyrosin-Dimer-System

Die Ausreißer der Herkunft 2 (To 1) erbrachten zum Teil weitaus bessere Ergebnisse im Testsystem als To 1 selbst. 3A1 aus Herkunft 3 (To 2) konnte die Hemmwirkung seiner Herkunftssorte nicht erreichen. Auffallend war, daß die Werte von 2A1 und der Herkunft 3 nahezu identisch waren. Die Ausreißer der Herkunft 4 (To 3) zeigten ebenfalls eine große Variabilität in ihrer Hemmwirkung. 9A1 und 9A2 lagen mit ihren Ergebnissen nicht nur über ihrer Herkunft, sondern erzielten mit die besten Ergebnisse im Testsystem unter allen getesteten Extrakten.

Eigenselektionen

Die verschiedenen Phänotypen erzielten im Tyrosin-Dimer-System folgende Ergebnisse:

Tab. 24: Hemmung der Dimerisierung von Tyrosin durch die Extrakte der Eigenselektionen

Selektion / Extrakt	Hemmung der Dimerisierung [%]
1/1	67,8 ± 4,3
1/2	36,4 ± 4,7
11/1	44,4 ± 4,1
11/2	46,2 ± 4,4
11/3	35,6 ± 3,2
11/4	55,5 ± 5,2
14/1	39,2 ± 2,5
14/2	69,0 ± 3,7
15/1	63,1 ± 3,9
15/2	63,5 ± 3,6
Einzelpflanzen	
A	28,8 ± 3,6
B	Ausfall durch <i>C. gloeosporioides</i>
C	59,6 ± 4,3
D	Ausfall durch <i>C. gloeosporioides</i>
E	54,8 ± 4,9
F	62,6 ± 5,2
G	63,2 ± 3,9
H	40,5 ± 5,1
TT 1 (5 I)	67,2 ± 4,2

Abkürzungen der Herkünfte, Parzellen-Nr. u. Extraktbezeichnung: s. Material und Methoden 2.2.1 u. 2.3.1

Der Extrakt der Selektion 14/2 hemmte die Dimerisierung von Tyrosin am wirkungsvollsten. Die Selektionen 1/1, 15/1, 15/2 konnten ihr gutes Ergebnis des Vorjahres wiederholen. Die Einzelpflanzen F, C und G wiesen ebenfalls eine Hemmwirkung von über 60% auf. Die übrigen Selektionen erreichten dagegen meist nur knapp ihr Niveau des letzten Jahres, so daß die Unterschiede zwischen den Selektionen deutlicher hervortraten.

Die Abb. 66 und 67 stellen die Ergebnisse der Eigenselektionen im Vergleich zu 'Taubertal'1 graphisch dar.

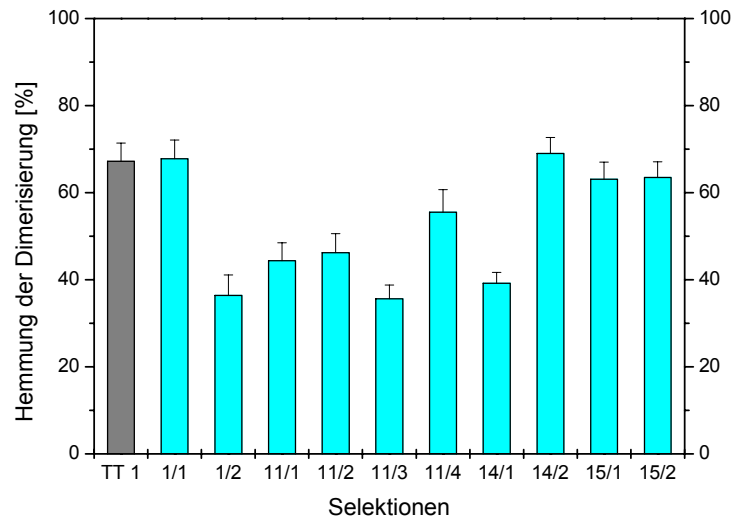


Abb. 66: Hemmung der Dimerisierung von Tyrosin durch die Extrakte der Eigenselektionen im Jahr 2001

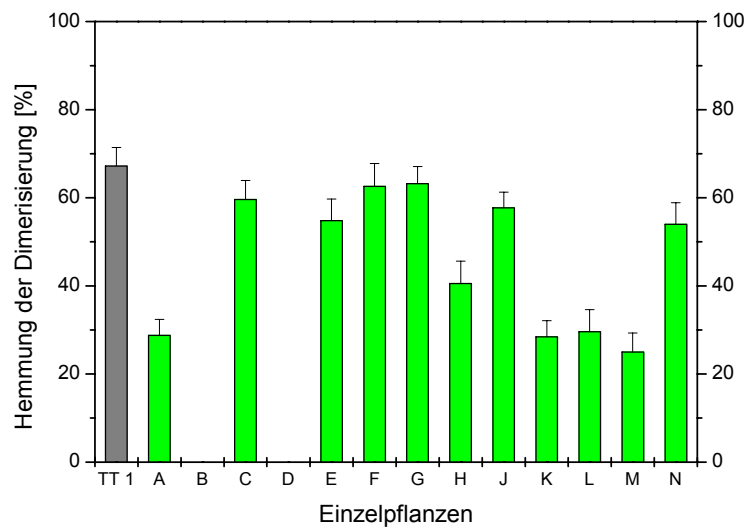


Abb. 67: Hemmung der Dimerisierung von Tyrosin durch die Extrakte der Einzelpflanzen-Selektionen im Jahr 2001

Zusammenfassung der Ergebnisse der Extrakte der Jahre 2000/2001 im Tyrosin-Dimer-

System:

Sorten und Eliteselektionen

- Die Extrakte von 'Taubertal' erzielten im Jahr 2000 die besten Ergebnisse im Testsystem. Im Jahr 2001 galt dies nur noch für eine Herkunft (TT 1) dieser Sorte. 'Topaz' schnitt in beiden Jahren am schlechtesten ab. Im 2. Standjahr konnte NLC sein gutes Ergebnis des Vorjahres im Testsystem wiederholen, SN wiederum verbesserte sich deutlich.
- Die verschiedenen Herkünfte von 'Topaz' und 'Taubertal' waren untereinander im 1. Standjahr anhand ihrer Hemmwirkung nicht zu differenzieren. Im 2. Standjahr traten deutliche Unterschiede auf, v.a. zwischen den 'Topaz'-Herkünften.
- Innerhalb der einzelnen Sorten/Eliteselektionen waren zwischen den Extrakten der Blöcke I – IV erhebliche Schwankungen hinsichtlich der Hemmung der Dimerisierung zu beobachten. Im 2. Standjahr betrug der Unterschied zwischen den Blöcken vereinzelt über 20%.
- Die Extrakte der Pflanzen mit sortenabweichendem Phänotyp in den 'Topaz'-Herkünften und NLC wichen in ihrer Wirkung auf das Testsystem teils stark vom Mittel ihrer Herkünfte ab.

Eigenselektionen

- Im 1. Standjahr konnte keine Selektion die Testwerte von 'Taubertal' erreichen.
- Im 2. Standjahr erzielten einige Selektionen eine deutliche Steigerung ihres Leistungsniveaus und erreichten damit teilweise bessere Hemmwerte als 'Taubertal'. Dies galt besonders für die Selektionen 1/1, 15/1, 15/2, die in beiden Jahren ein gutes Ergebnis im Testsystem aufwiesen.

2.2.3.2 Cu(II)-induzierte LDL-Oxidation

Die Cu(II)-induzierte LDL-Oxidation ist ein Modellsystem für die Lipidperoxidation an Membranen, die wiederum am depressiven Geschehen im Gehirn beteiligt ist (BILICI ET AL., 2001).

2.2.3.2.1 Dienkonjugation

Die LDL-Oxidation kann durch die Bildung konjugierter Diene photometrisch verfolgt werden (ESTERBAUER ET AL., 1989). Die Reaktionsabläufe und der genaue Reaktionsansatz wurde bereits in Material und Methoden 2.5.4.2.1 beschrieben.

Alle verwendeten Extrakte wurden auf 8 mg Droge/ml eingestellt und mit einer Konzentration von 0,1% i.A. in das Testsystem eingesetzt. Falls nicht anders angegeben, wurden stellvertretend für die Herkünfte nur deren Extrakte aus Block I verwendet.

Sorten und Eliteselektionen

Da die Herkünfte von 'Taubertal' und 'Goldstern' untereinander sehr einheitliche Ergebnisse im Tyrosin-Dimer-System erzielt hatten, wurde bei beiden Sorten jeweils nur die erste Herkunft (TT 1 bzw. GS 1) getestet.

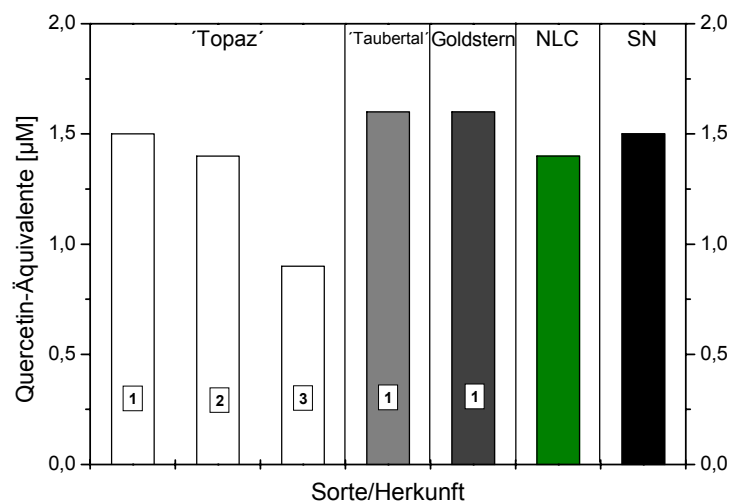


Abb. 68: Einfluß der Extrakte der Sorten/Eliteselektionen auf die Cu(II)-induzierte Dienkonjugation im LDL

'Topaz' 3 (4) konnte die Dienkonjugation im Vergleich zu den anderen Herkünften am schlechtesten hemmen. Die Differenz zu den anderen betrug knapp 1 μM Quercetin-Äquivalente.

Eigenselektionen

Aufgrund der großen Anzahl an Selektionen und der begrenzten Meßkapazität wurden nur eine Auswahl davon im Testsystem untersucht (unter besonderer Berücksichtigung ihrer Ergebnisse im Tyrosin-Dimer-Testsystem).

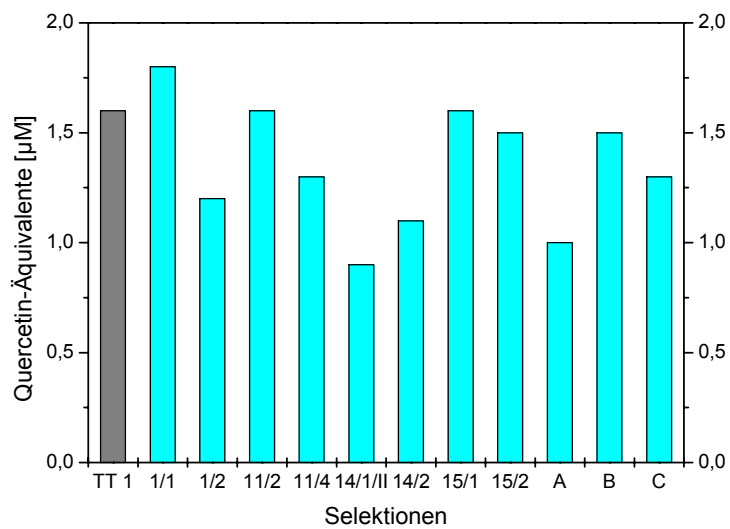


Abb. 69: Einfluß der Extrakte der Eigenselektionen auf die Cu(II)-induzierte Dienkonjugation

14/1 und A wiesen den geringsten Effekt im Testsystem auf. Die Differenz zu 1/1, der besten Selektion in diesem Testsystem, lag wiederum bei 1 μM Quercetin-Äquivalente.

Bei der Wiederholung der hier dargestellten Experimente verkleinerte sich diese Differenz teils soweit, daß keine Unterschiede zwischen den Extrakten meßbar waren. Durch eine Erhöhung der Extraktkonzentration auf 0,25% i.A. konnte keine qualitative Verbesserung der Unterscheidbarkeit der Extrakte erzielt werden.

2.2.3.2.2 Tryptophanfluoreszenz

LDL besitzt am ApoB-100 Tryptophanreste, die während der Oxidation des LDL ebenfalls oxidiert werden (REYFTMANN ET AL., 1990). Die Fluoreszenz von Tryptophan im UV wird zur Beobachtung des Oxidationsverlaufs genutzt, da ein Verlust der Fluoreszenz gemessen werden kann.

Die Abnahme der Fluoreszenz verläuft in der ersten Phase nahezu linear und langsam. In einer zweiten Phase kommt es zu einer Beschleunigung dieses Prozesses durch Produkte der Lipidperoxidation. Die Dauer der ersten Phase dient, wie die Lag-Phase bei der Dienkonjugation, zur Beurteilung einer Substanz hinsichtlich ihrer protektiven Wirkung gegenüber der LDL-Oxidation.

Testansatz:

PBS	ad 1 ml
entsalztes LDL	50 µg Protein i.A.
Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen	
Cu(II)	3,36 µM i.A.

Die Messung erfolgte am Fluoreszenzphotometer im Abstand von 15 min ($\lambda_{Ex} = 282$ nm; $\lambda_{Em} = 331$ nm).

Wie bereits bei der Cu(II)-induzierten Dienkonjugation wurden die Extrakte auch bei der Tryptophanfluoreszenz auf 8 mg Droge/ml eingestellt und mit einer Konzentration von 0,1% i.A. getestet.

Sorten und Eliteselektionen

Eine begrenzte Meßkapazität machte eine Beschränkung auf wenige Extrakte notwendig.

Bei den Sorten wurden daher nur 'Topaz' 1, 'Topaz' 3, 'Taubertal' 1 und SN getestet. Sie hatten bei den bis dahin durchgeführten Untersuchungen gute Ergebnisse erzielt. 'Taubertal' 1 und SN zeigten zudem auch im Feldversuch gute Eigenschaften. Stellvertretend für jede Herkunft wurde nur deren Extrakt aus Block I eingesetzt.

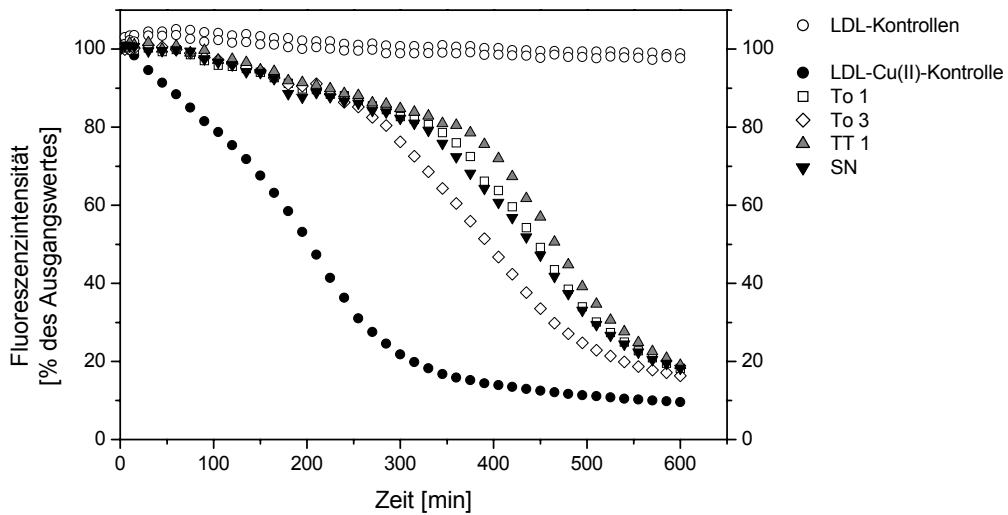


Abb. 70: Einfluß der Extrakte verschiedener Sorten/Eliteselktionen auf die Tryptophanfluoreszenz

Die 'Taubertal'-Herkunft konnte den Übergang in die rasche Fluoreszenzabnahme am längsten verzögern, dicht gefolgt von SN und 'Topaz' 1. 'Topaz' 3 wies die geringste Wirkung hinsichtlich der Phasenverschiebung auf.

Eigenselektionen

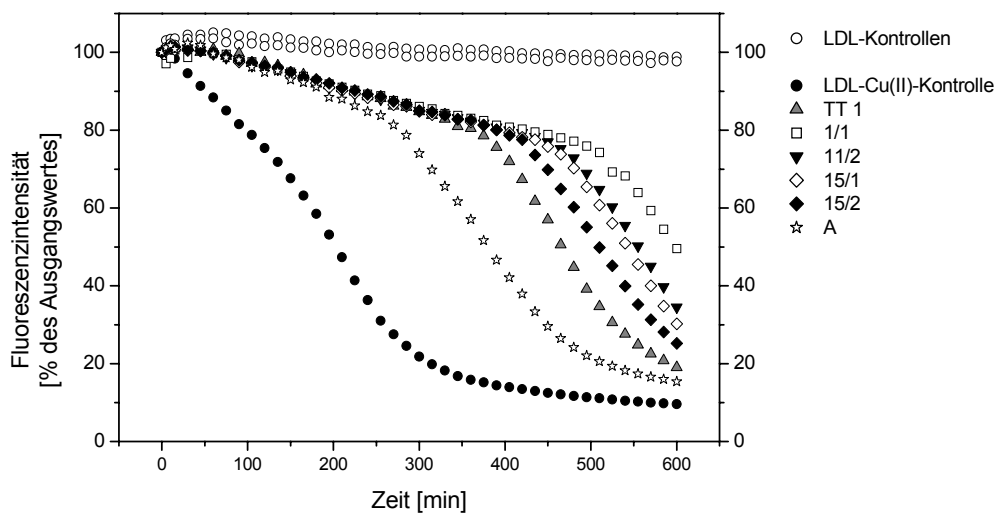


Abb. 71: Einfluß von Extrakten verschiedener Eigenselektionen auf die Tryptophanfluoreszenz

Außer dem Extrakt der Einzelpflanze A zeigten alle getesteten Extrakte eine bessere Wirkung auf die Fluoreszenzabnahme als 'Taubertal' 1.

Zusammenfassung der Ergebnisse in den Systemen der Cu(II)-induzierten LDL-Oxidation:

- Bei der Dienkonjugation zeigten sich nur so geringe Unterschiede zwischen den Extrakten, daß keine aussagekräftige Bewertung möglich war.
- Bei der Tryptophanfluoreszenz bewirkten fast alle ausgewählten Extrakte der Selektionen eine längere Verzögerung in der Abnahme der Fluoreszenzintensität als der 'Taubertal'-Extrakt, der unter den getesteten Sorten das beste Ergebnis erzielt hatte.

2.2.3.3 LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale

Tyrosyl-Radikale, katalysiert durch Myeloperoxidase MPO, können LDL oxidieren (SAVENKOVA ET AL., 1994). Diese Reaktion diente als Grundlage zur Entwicklung der LDL-Oxidation durch POD-katalysierte Tyrosyl-Radikale. Der genaue Entwicklungsverlauf und der verwendete Ansatz zur Testung von Johanniskrautextrakten wurde bereits in Material und Methoden 2.5.4.3 und Ergebnisse 1.2.2.5 dargelegt.

In den nun folgenden Untersuchungen wurden dieselben Extrakte verwendet wie bei der Cu(II)-induzierten Dienkonjugation. Ihre Konzentration betrug 0,25% i.A.

Sorten und Eliteselektionen

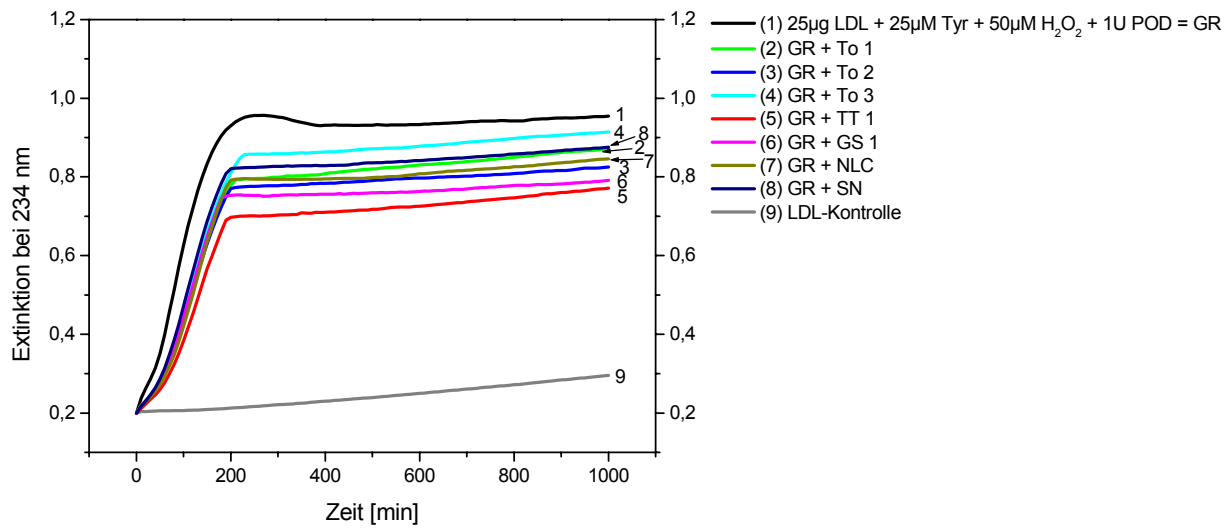


Abb. 72: Vergleich der Sorten/Eliteselektionen im System der LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale

Die Herkunft von 'Taubertal' 1 erzielte die größte Absenkung des Plateaus, 'Topaz' 3 die geringste. 'Taubertal' 1 besitzt demzufolge die größte antioxidative Wirkung in diesem System. Die Abstufungen der übrigen Extrakte waren teils so gering, daß sie nicht differenziert werden konnten.

Eigenselektionen

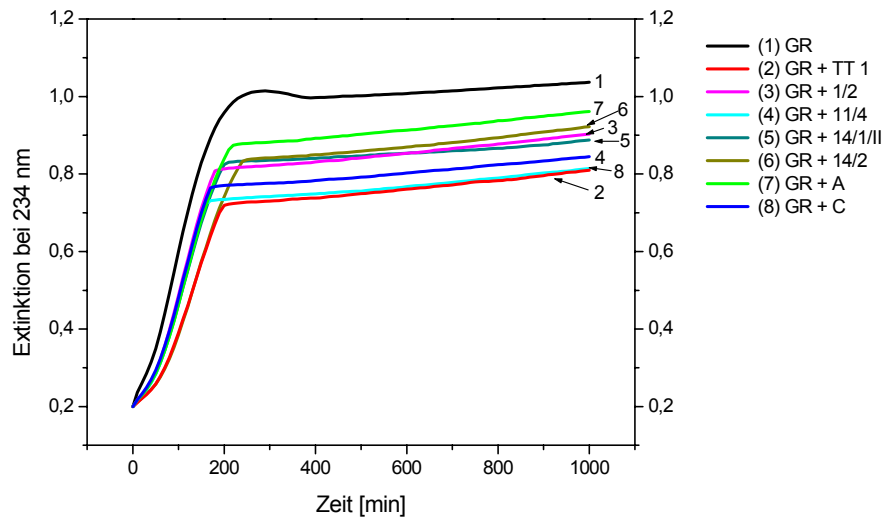


Abb. 73 (A): Vergleich der Eigenselektionen mit 'Taubertal' im System der LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale

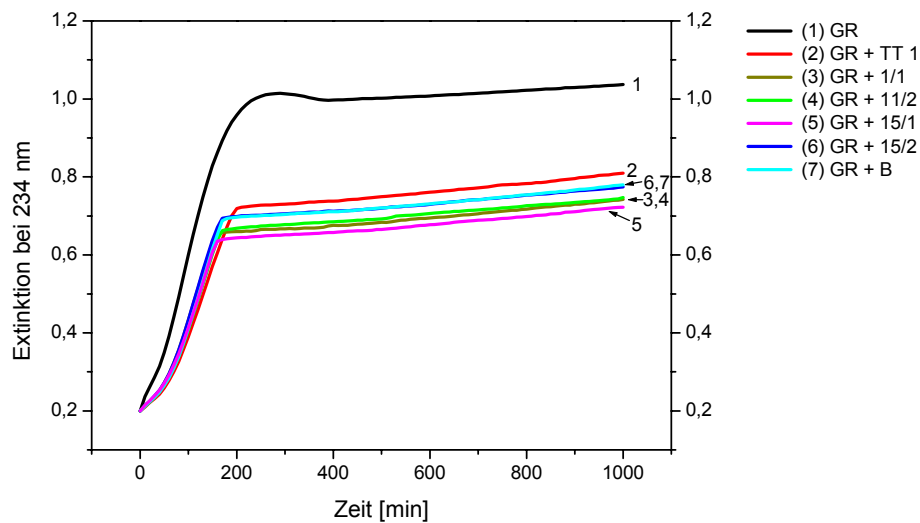


Abb. 73 (B): Vergleich der Eigenselektionen mit 'Taubertal' im System der LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale

Die Extrakte der Selektionen 1/2, 14/1 und 14/2, sowie die Einzelpflanzen A und C konnten das Plateau nicht in dem Maße wie die Extrakte von 'Taubertal' 1 und Selektion 11/4 absenken und sind daher weniger wirksam als 'Taubertal' 1 und 11/4. Die Selektionen 15/1, 15/2, 11/2 und 1/1 sowie Einzelpflanze B dagegen zeigten im Vergleich zu 'Taubertal' 1 eine

größere Absenkung des Plateaus und besitzen diesen gegenüber eine größere antioxidative Wirkung in diesem System.

Bei der Wiederholung dieser Experimente war die Reihenfolge von Extrakten, die untereinander keinen sehr großen Abstand zwischen den Plateaus aufwiesen, nicht reproduzierbar.

Zusammenfassung der Ergebnisse im System der LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale:

- 'Taubertal' 1 erreichte im Vergleich der Sorten und Eliteselektionen das beste Ergebnis.
- Die Extrakte der Selektionen konnten teilweise eine größere Absenkung des Plateaus erzielen als 'Taubertal' 1.
- Eine sichere Unterscheidung der Extrakte anhand ihrer Plateaubabfolge war jedoch nur dann möglich, wenn die Differenz der Plateauniveaus ausreichend groß war.

IV DISKUSSION

Zur Produktion hochwertiger Phytopharmaka ist die Qualität der Rohdroge von entscheidender Bedeutung. Die Homogenität des Drogenmaterials in pharmakologischer und agronomischer Hinsicht ist dabei unabdingbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob diese Kriterien von den im Handel vertriebenen Sorten erfüllt werden. Ein weiteres Ziel war es, Pflanzentypen mit agronomisch und pharmakologisch wertvollen Merkmalen zu selektieren, um daraus eine neue Sorte zu entwickeln. Als Bewertungsmaßstab diente neben den Anbaueigenschaften vor allem die Wirkung der Extrakte in biochemischen Modellreaktionen.

Zur Untersuchung der Versuchsfragen standen zwei Johanniskrautfelder zur Verfügung:

Feld 1999

Ein 2jähriger Bestand der beiden eigenen Saatgutselektionen BREIT und SN (s. Material und Methoden 1.3) wurde zur Durchführung eines Vorversuchs genutzt. Dabei sollte generell geklärt werden, ob die Unterscheidung mehrerer Pflanzentypen nicht nur anhand ihres Phänotyps, sondern auch durch ihre biochemische Wirkung möglich ist.

Blockanlage 2000/2001

Um die Prüfung auf Homogenität von Handelssaatgut und die Selektion neuer Pflanzentypen durchzuführen, wurde 2000 ein neues Feld in Form einer Blockanlage mit 15 verschiedenen Saatgutherkünften angelegt (s. Anhang I). Diese Form wurde gewählt, um standortbedingte Unterschiede auszugleichen.

Die Anbauversuche erstreckten sich über 3 Jahre. Im ersten Jahr wurde die grundsätzliche Durchführbarkeit von Selektionen anhand biochemischer und agronomischer Merkmale geklärt. Hierzu diente ein 2jähriger Pflanzenbestand einer *Hypericum*-Aussaart mit insgesamt 4 verschiedenen Phänotypen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde ein Versuchsfeld angelegt, das sowohl der Selektion neuer Phänotypen diente als auch der Untersuchung von *Hypericum*-Sorten hinsichtlich ihrer Homogenität und Leistungsfähigkeit.

1 ANBAUVERSUCHE

Zum besseren Verständnis der Ausführung über Selektionskriterien und Ertrag werden die wichtigsten Beobachtungen im Feldanbau nochmals dargelegt:

- Die Pflanzen nahezu jeden Phänotyps verdoppelten im 2. Standjahr sowohl ihre Größe als auch ihre Stengelanzahl.
- Je niedriger die Höhe der Pflanzen ist, desto kleiner ist der Blühhorizont. Ein geringerer Stengelanteil im Erntegut und eine höherwertige Droge sind die Folge.
- Hohe Pflanzen mit geringer Stengelanzahl bilden meist sehr stabile Stengel bzw. Stengel mit einem großen Durchmesser. Je niedriger die Pflanzen und je höher die Stengelanzahl, desto dünnere Triebe werden gebildet. Das Verhältnis FS/TS sinkt.
- Die Pflanzen behalten im 2. Jahr die morphologischen Merkmale, mit Ausnahme von Pflanzenhöhe und Stengelanzahl, des 1. Standjahres bei.
- Eine frühe Blüte macht eine Nachblüte wahrscheinlicher. Diese ist allerdings nicht sicher.
- Eine hohe Stengelanzahl und gute Krautentwicklung während des 1. Standjahres muß keinen für die Ernte ausreichenden Blütenansatz und gleichmäßige Blüte zur Folge haben. Im 2. Standjahr treten keine Probleme in dieser Hinsicht auf.

Für die Selektion hinsichtlich der metrischen bzw. makroskopisch erfaßbaren Pflanzenmerkmale ist es daher notwendig, daß selektionswürdige Pflanzen bereits im 1. Standjahr folgende Parameter aufweisen müssen:

- hohe Stengelanzahl (> 20)
- niedrige Wuchshöhe (< 50 cm)
- sicherer Blütenansatz
- Standfestigkeit
- gute morphologische Blütenmerkmale bezüglich Hypericin (d.h. Boniturnote 3 bei „Hypericinbehälter auf den Petalen“, s. Material und Methoden 2.2.2)

Eine frühe Blüte muß nicht erwünscht sein, da durch Phänotypen mit unterschiedlichen Blühterminen eine Staffelung der Ernte möglich ist.

Bei den hier festgelegten Selektionskriterien ist zu berücksichtigen, daß die im Verlauf dieser Arbeit praktizierte Kulturführung in drei Punkten nicht der des Praxisanbaus entspricht:

- keine Herbst-, sondern Frühjahrsplantation
- keine Düngung
- keine maschinelle Ernte, sondern Ernte von Hand

Die in der Praxis übliche Pflanzung im September/Oktober ermöglicht den Pflanzen bereits noch im Herbst die Bildung von Trieben für die nächste Vegetationsperiode. Dies führt im Folgejahr zu einer stärkeren Bestockung bzw. Stengelanzahl als dies bei einer Frühjahrsplantation der Fall ist. Ein sicherer Blütenansatz ist ebenfalls gewährleistet. Außerdem wird der Blütezeitpunkt beeinflußt. Die Pflanzen kommen im 1. Ertragsjahr bereits im Juni/Juli zur Blüte und nicht erst im August wie bei einer Pflanzung im Frühjahr. Eine 2. Blüte wird dadurch möglich. Durch eine Herbstpflanzung steigt somit der Ertrag und die Qualität der Droge.

Die Düngung hat einen entscheidenden Einfluß auf die Entwicklung, die Morphologie und den Metabolismus von Pflanzen. BRISKIN ET AL. (2000) konnten nachweisen, daß eine geringe Stickstoffversorgung von Johanniskraut eine erhöhte Produktion von Hypericinen zur Folge hat. Bereits BRAUNEWELL (1991) konnte bei ihren Untersuchungen an verschiedenen *Hypericum*-Herkünften feststellen, daß N-Düngung sowohl Triebzahl als auch Pflanzenhöhe und Verzweigungsanzahl (und damit die Blütenanzahl) steigert. Der gesteigerte Ertrag bei Düngergabe ist somit auf die Zunahme der Biomasse zurückzuführen, insbesondere auf eine größere Stengelanzahl. Hinsichtlich der durch Düngung gesteigerten Pflanzenhöhe ist das Selektionskriterium „niedrige Wuchshöhe“ daher besonders zu beachten. Von manchen Phänotypen kann bereits ohne Düngung eine Höhe von bis zu 120 cm erreicht werden.

Um das Potential der Pflanzen besser beurteilen zu können, wurde keine Düngung vorgenommen. Die Erträge sind daher nicht direkt mit denjenigen im Praxisanbau zu vergleichen. Dort erfolgt eine Düngergabe von bis zu 120 kg N/ha und es werden Erträge von bis zu 260 dt/ha Frischware bzw. 70 dt/ha Droge erzielt (BOMME, 1997). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Erträge liegen mit max. 25 dt/ha Droge weit darunter.

Im 2. Standjahr konnten viele Phänotypen keine Ertragssteigerung erzielen oder hatten sogar größere Ertragseinbußen im Vergleich zum Vorjahr zu verzeichnen. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den Verzicht von Düngereinsatz zurückzuführen. Die Ausbildung einer 2. Blüte könnte dadurch ebenfalls unterbunden sein. Zudem standen häufig nur Einzelpflanzen

zur Ernte zur Verfügung. Dies schränkt die Aussagekraft der gewonnenen Ertragsdaten ebenfalls ein.

Die Ernte aller Pflanzen der Anbauversuche erfolgte per Hand (unter Zuhilfenahme einer Gartenschere). Bei dieser Methode liegt der Schnitt höher bzw. ist der geerntete Pflanzenanteil geringer als bei der maschinellen Ernte in der Praxis. Dies vermindert den Ertrag. Gleichzeitig ist die gewonnene Droge von höherer Qualität, da der Stengelanteil im Verhältnis zum Blütenanteil sinkt.

Bei Phänotypen mit einem kleinen Blühhorizont trifft dies in besonderem Maß zu. Um diesen qualitativen Vorteil solcher Pflanzen auch im Praxisanbau zu nutzen, muß die Schnitthöhe bei der maschinellen Ernte dem Blühhorizont angepaßt werden. Damit für die Anbauer, die meist nach Ertrag entlohnt werden, kein finanzieller Nachteil entsteht, sollte die höhere Qualität der gelieferten Droge vom Abnehmer entsprechend honoriert werden. Sonst besteht für den Anbauer kein Anreiz die Erntemethode abzuändern. Der Vorteil des selektierten Pflanzentyps geht dann verloren.

Die Ergebnisse des Versuchsanbaus sind v.a. hinsichtlich des Ertrages nur bedingt auf die Praxis übertragbar. Der Anbau von Selektionen unter Praxisbedingungen ist daher unerlässlich, um eine endgültige Entscheidung bezüglich ihrer Anbauwürdigkeit treffen zu können.

2 ANALYTIK

2.1 Inhaltsstoffe

Eine qualitativ hochwertige Droge ist durch einen hohen Gehalt an Inhaltsstoffen gekennzeichnet. Dabei muß das gesamte Spektrum der relevanten Stoffklassen von Johanniskraut (Flavonoide, Biflavone, Naphthodianthrone, Phloroglucin-Derivate) in ausreichenden Mengen vorhanden sein.

Die Untersuchungen der verschiedenen Pflanzentypen ergab teils sehr große Unterschiede in der Inhaltsstoffzusammensetzung. Nicht nur die Anteile der bekannten Substanzen am Gesamtgehalt waren verschieden, sondern es traten auch neue bzw. nicht näher identifizierbare Stoffe in größeren Mengen auf. Jedem Phänotyp kann somit sein individuelles Inhaltsstoffsprofil zugeordnet werden. Besonders auffällig waren Typen, die zwar eindeutig *H. perforatum* waren, jedoch kein Rutin bildeten. MARTONFI ET AL. (2001) berichteten bereits

von einem *Hypericum*-Chemotyp ohne Rutin aus Italien. Rutin wird nicht nur als Wirkkomponente diskutiert (NÖLDNER UND SCHÖTZ, 2002), sondern muß laut DAC in der Droge nachweisbar sein, um die Herkunft der Droge aus *H. perforatum* sicherzustellen.

Hyperforin war bei manchen Pflanzentypen ebenfalls in nur geringen Mengen vorhanden. Dies ist, im Gegensatz zu Rutin, vermutlich nicht auf eine geringe oder fehlende Synthese der Substanz zurückzuführen. TEKELOVA ET AL. (2000) wiesen nach, daß Hyperforin v.a. in den unreifen Kapseln gebildet wird. Der Hyperforingehalt der Droge steigt daher mit dem Fortschreiten der Blüte. Alle Pflanzen des hier durchgeführten Versuchs wurden zum Stadium der Vollblüte geerntet, das nach subjektivem Ermessen bestimmt wurde. Dies war nach der Inhaltsstoffanalyse in manchen Fällen zu früh, d.h. es waren noch zu wenig Kapseln vorhanden, um eine ausreichende Menge an Hyperforin in der Droge zu gewährleisten. Um die Hyperforinkonzentration zu steigern, muß ein späterer Erntezeitpunkt gewählt werden. Dies kann aber wiederum die Flavonoid- und Hypericingehalte vermindern, die im fortgeschrittenen Blühstadium abnehmen (MARTONFI UND REPCAK, 1994; TEKELOVA ET AL., 2000). Beim sog. Hyperforinschnitt ist dies zu Gunsten einer maximalen Hyperforinausbeute beabsichtigt. Dieser Schnitt findet meist beim bereits abgeblühten Kraut statt, das nur noch Kapseln aufweist. Für diesen Schnitt sollte die 2. Blüte von Johanniskraut bevorzugt werden. Im Zusammenhang mit der Hyperforin-Problematik muß über die Vollblüte als bester Erntezeitpunkt erneut nachgedacht werden. Dieses Stadium ist für einen großen Pflanzenbestand nur schwer zu bestimmen und kann bei manchen Phänotypen zu einem Defizit an manchen Inhaltsstoffen, wie z.B. Hyperforin, führen.

Das Spektrum der Inhaltsstoffe und ihr Verhältnis zueinander blieb bei dem jeweiligen Phänotyp im 1. und 2. Standjahr nahezu gleich. Eine Ausnahme bildeten die Selektionen SN und die Einzelpflanze A. Sie zeigten im 2. Jahr eine extreme Zunahme an Hypericinen. Beide Pflanzentypen hatten im 1. Jahr nur einen spärlichen Blütenansatz aufzuweisen. Im 2. Standjahr war dies nicht der Fall, so daß der Verdünnungseffekt durch den Stengelanteil aufgehoben wurde.

Anhand des relativ spezifischen Substanzspektrums konnten „Ausreißer“-Typen in den Sorten zusätzlich zu ihren optischen Merkmalen identifiziert werden. Die Art und Menge an Inhaltsstoffen und Stoffklassen ist nicht nur genetisch festgelegt, sondern wird auch durch Umweltfaktoren mitbestimmt. So haben das Klima allgemein und die Witterung während der Vegetationsperiode bis zur Ernte Einfluß auf die Entwicklung der Pflanze und somit auch auf den Sekundärstoffwechsel. So stellten z.B. POUTARAUD ET AL. (2001) nach Belichtung von Blütenknospen eine Zunahme an Hypericinen fest.

Genauere Untersuchungen in Bezug auf die Zusammenhänge zwischen z.B. Sonnenscheindauer und Inhaltsstoffgehalt waren im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Allerdings konnte ein Ausbleichen der Petalen bei langanhaltender intensiver Strahlung beobachtet werden. Eine Auswaschung von Substanzen ist ebenfalls möglich. Dies kann bei den Hypericinen makroskopisch verfolgt werden. Nach längeren Niederschlägen waren die Hypericinbehälter auf den Petalen nicht mehr klar vom umgebenden Gewebe abgegrenzt und zeigten Spuren der Auswaschung bzw. Läsionen. Der Inhalt der Behälter verteilte sich in verwaschenen Flecken auf den Blütenblättern.

Da die Menge an Inhaltsstoffen im Extrakt nur relativ bestimmt wurde, können keine genauen Aussagen über ihre Konzentration im Extrakt oder der Droge gemacht werden. Ein Vergleich der Phänotypen ist jedoch möglich. Die Werte der Analyse sind nur begrenzt mit denjenigen aus Drogenmaterial, das aus Praxisanbau stammt, vergleichbar. Wie bereits erläutert, steigt durch die Handerte die Qualität der Droge und somit der Gehalt an Inhaltsstoffen. DENKE (1997) wiederum hat nachgewiesen, daß Düngung zwar den Ertrag steigert, die Inhaltsstoffe jedoch leicht zurückgehen. Dies bedeutet, daß die Droge jedes Phänotyps in diesem Anbauversuch höhere Gehalte an Inhaltsstoffen hat, als dies unter Praxisbedingungen der Fall wäre. Die Analysenwerte sind daher nur innerhalb des Versuches vergleichbar und aussagekräftig. Sie geben Hinweise auf vielversprechende Pflanzentypen, die sich allerdings erst in der Praxis bewähren müssen.

2.2 Biochemische Testsysteme

2.2.1 POD-katalysierte Dimerisierung von L-Tyrosin

Aktivierete Neutrophile sind in der Lage mit Hilfe von Myeloperoxidase (MPO) und H_2O_2 Tyrosyl-Radikale zu bilden und zu Dimeren zu verknüpfen (HEINECKE ET AL., 1993).

Dityrosin wurde in erhöhtem Maß in Gehirnen von Alzheimer betroffenen Patienten vorgefunden (HENSLEY ET AL., 1998). Die Dimerisierung von Tyrosin trägt ebenfalls zur Entstehung der sog. „Lewy bodies“, die im Gehirn von Parkinson-Patienten zu finden sind, bei (SOUZA ET AL., 2000).

TURKALL ET AL. (1982) wiesen nach, daß Methionin-Enkephaline von polymorphkernigen phagozytierenden neutrophilen Granulozyten mit Hilfe von MPO in Anwesenheit von H_2O_2 oxidiert und dadurch deren opioide Eigenschaften beeinträchtigt werden.

POD ist ebenfalls in der Lage, mit H_2O_2 Methionin-Enkephaline über deren Tyrosin-Enden zu dimerisieren (ROSEI ET AL., 1991). DENKE (1997) entwickelte daraus die POD-katalysierte Dimerisierung von L-Tyrosin.

Der Extrakt bzw. seine Inhaltsstoffe können die Dimerisierung von Tyrosin auf unterschiedliche Weise hemmen/beeinflussen:

- Anstatt Tyrosin können ebenfalls Extraktinhaltsstoffe von der POD umgesetzt werden, wenn sie ein besseres Substrat für das Enzym darstellen als Tyrosin (kompetitive Hemmung).
- Die entstehenden Radikale dieser Substanzen können miteinander dimerisieren oder sich mit Tyrosin-Radikalen verbinden. Dies senkt die Bildung von Tyrosin-Dimeren.
- Die Substanzen des Extraktes können die Tyrosin-Radikale zu Tyrosin reduzieren. Dabei werden die Extraktinhaltsstoffe selbst zu Radikalen, die die eben erläuterten Verbindungen mit anderen Radikalen eingehen können.
- Schließlich ist eine Hemmung der POD durch den Extrakt möglich, so daß das Enzym seine Aktivität verliert (allosterische Hemmung).

Der genaue Wirkmechanismus des Extraktes ist aufgrund der Komplexität des Reaktionsablaufs und der Zusammensetzung des Extraktes selbst nicht erfaßbar.

Johanniskrautextrakte, die von unterschiedlich kultivierten Pflanzen stammten, konnten anhand dieses Testsystems erfolgreich differenziert werden (DENKE, 1999). Extrakte eines schmalblättrigen und eines breitblättrigen Wuchstyps unterschieden sich ebenfalls in ihrer

Wirkung auf die Tyrosin-Dimerisierung (MANN, 1998). Durch diese Untersuchungen war die Eignung des Systems zur Charakterisierung von *Hypericum*-Extrakten ausreichend unter Beweis gestellt. Die zügige Analytik der Testansätze durch Verwendung einer HPLC mit Autosampler ermöglicht außerdem einen hohen Probendurchsatz.

Die Testung sowohl der Elitesektionen/Sorten von *Hypericum* als auch der Eigensektionen ergab deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Pflanzentypen. Eine vergleichbare Schärfe der Auflösung konnte von den übrigen Testsystemen nicht erzielt werden. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, daß das Dimer-Testsystem nicht nur auf Quercetin und seine Glykoside reagiert. Eine Untersuchung des Einflusses der Hauptinhaltsstoffe auf die Tyrosin-Dimerisierung zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Substanzen. Quercetin und seine Glykoside hemmen konzentrationsabhängig die Dimerisierung. Dies bestätigt die Ergebnisse von DENKE (1997). Dort wurden Quercetin-Glykoside als Reinsubstanzen und verschiedene Fraktionen eines Johanniskrautextraktes im Tyrosin-Dimer-System eingesetzt. Auch die Quercetin-Glykosid-Fraktion des Extraktes zeigte bei diesen Untersuchungen eine gute Hemmwirkung. Fraktionen mit überwiegend Biapigenin konnten die Reaktion wesentlich schlechter hemmen.

Die Biflavone und Hypericine wurden von DENKE (1997) nicht als Einzelsubstanzen in das Testsystem eingesetzt. Die entsprechenden Extraktfraktionen waren durch eine geringe Aktivität im System gekennzeichnet.

In der vorliegenden Arbeit stimuliert das Biflavin Amentoflavon als Einzelsubstanz die Dimerbildung sehr stark. Biapigenin, das in wesentlich größeren Mengen in den Extrakten zu finden ist als Amentoflavon (JÜRGENLIEMK UND NAHRSTEDT, 2002), konnte nicht getestet werden, da es zum damaligen Zeitpunkt nicht verfügbar war. Allerdings deuten die Untersuchungen von DENKE (1997) und die Daten der Inhaltsstoffanalyse im Zusammenhang mit den Ergebnissen des Dimer-Systems darauf hin, daß es ebenfalls die Dimerisierung stimuliert. Bei den Naphthodianthronen hatte Hypericin keinen Einfluß auf die Dimerbildung. Pseudohypericin, das sich nur in einer OH-Gruppe von Hypericin unterscheidet, zeichnete sich durch eine nur sehr leichte Stimulation der Grundreaktion aus. Es ist anzumerken, daß in frischen Extrakten Pseudohypericin im Vergleich zu Hypericin in knapp doppelter Menge vorliegt (JÜRGENLIEMK UND NAHRSTEDT, 2002). Auf die Testung von Hyperforin wurde aus Kostengründen verzichtet. Im Datenmaterial liegen zudem keine Hinweise vor, die auf einen Einfluß von Hyperforin auf das Testsystem schließen lassen.

Die Wirkung eines Johanniskrautextraktes im Dimer-System ist demnach durch seine Zusammensetzung bzw. die Verhältnisse seiner Einzelkomponenten zueinander bestimmt. Im Gegensatz zu den übrigen Testsystemen kann daher das Dimer-System zu einer wesentlich genaueren Differenzierung der Extrakte herangezogen werden.

Im Hinblick auf Pseudohypericin und die Biflavone ist zu berücksichtigen, daß sie auf die Hemmung der Dimerisierung zwar einen negativen Einfluß haben, daraus aber nicht auf ihre Unwirksamkeit in anderen antidepressiven Mechanismen geschlossen werden kann.

2.2.2 Indolessigsäure (IAA) -Oxidation

Die IAA-Oxidation durch Meerrettichperoxidase ohne Zugabe von H_2O_2 (Oxidase-Aktivität) wird, vereinfacht formuliert, durch Monophenole stimuliert und durch o-Diphenole gehemmt (GORTNER UND KENT, 1958). Pflanzliche Extrakte stellen ein komplexes Gemisch aus diesen Substanzgruppen dar. Werden Extrakte mit ansteigender Konzentration in dieses System eingesetzt, ist zunächst eine leichte Reaktionsstimulierung zu beobachten. Diese schlägt dann abrupt in eine vollständige Hemmung innerhalb eines sehr engen Konzentrationsbereiches um. Je niedriger die Konzentration des Extraktes, bei der die Hemmung eintritt, desto positiver ist der Extrakt zu bewerten und desto höher ist seine Konzentration an o-Diphenolen (VOLPERT, 1993). Ein Zusammenhang zwischen dem Testsystem und den physiologischen Vorgängen bei einer Depression ist nicht gegeben.

VOLPERT (1993) nutzte dieses System zur Charakterisierung und Differenzierung von Propolisextrakten. Johanniskrautextrakte enthalten hauptsächlich Quercetin-Glykoside (Quercetin weist im Ring B eine o-Dihydroxygruppierung auf) und konnten bereits im IAA-System unterschieden werden (MANN, 1998). Da die Detektion photometrisch erfolgt, schien das System geeignet für die schnelle Selektion von Johanniskrautphänotypen.

Zunächst wurden Extrakte der Phänotypen des Versuchsfeldes des Jahres 1999 in das Testsystem eingesetzt. Im ersten Versuchsansatz zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Extrakten der einzelnen Pflanzentypen. Auffällig dabei waren die großen Standardabweichungen bei den Meßpunkten. Bei einer Wiederholung des Experiments war kein Unterschied mehr zwischen den Phänotypen erkennbar (s. Ergebnisse 1.2.2.2). Im Tyrosin-System waren sie hingegen deutlich voneinander differenzierbar. Nur der Extrakt BN 18, der das schlechteste Ergebnis im Tyrosin-System erreicht hatte, wies auch bei der IAA-Oxidation eine schlechtere Leistung im Vergleich zu den übrigen Extrakten auf.

Die mangelnde Reproduzierbarkeit kann möglicherweise auf suboptimale Reaktionsbedingungen als auch auf Meßfehler bei der Durchführung zurückgeführt werden. Bereits eine Abweichung in der Inkubationszeit kann zu einer Verschiebung des Ergebnisses führen (VOLPERT, 1993). Unterschiede im Sauerstoffgehalt der Einzelansätze bzw. in den Reagenzien können die Reaktion ebenfalls beeinflussen und zu hohen Standardabweichungen führen.

Die unterschiedliche Zusammensetzung der Extrakte der hier getesteten Phänotypen spiegelt sich nicht in den Testergebnissen wider. Eine Unterscheidung der verschiedenen Pflanzentypen ist kaum möglich. Dies ist durch die fehlende Sensitivität des Testsystems bedingt. Die Phänotypen sind in Bezug auf die in der IAA-Reaktion wirksamen Komponenten bereits zu ähnlich, um unterschieden werden zu können.

Die photometrische Messung bietet den Vorteil, daß Ergebnisse schnell abgelesen werden können. Der Testansatz selbst ist jedoch sehr aufwendig. Die korrekte Durchführung des Tests erfordert pro Extrakt die Messung einer Verdünnungsreihe. Die Testung größerer Probenmengen wird dadurch aufwendig und ineffizient. Zudem ist die große Menge bzw. die Entsorgung des Schwefelsäureabfalls problematisch. In Bezug auf die pharmakologische Selektion von Johanniskraut ist dieses Testsystem daher weniger geeignet.

Zur Aufwandminimierung wird folgende Vorgehensweise als Alternative vorgeschlagen: zunächst wird der Test mit der Verdünnungsreihe eines Extraktes durchgeführt, der die gewünschten Inhaltsstoffmengen aufweist. Dies dient zur Bestimmung der Konzentration des Extraktes i.A., bei der IAA noch abgebaut wird, bevor dieser Abbau bei der nächst-höheren Extraktkonzentration gestoppt wird. Alle Extrakte werden nun nur mit dieser Konzentration in das Testsystem eingesetzt und überprüft, ob sie den Abbau der IAA hemmen oder nicht. Dies erhöht den Probendurchsatz, vermindert den Arbeitsaufwand sowie die Problematik der Schwefelsäureabfalls.

Obwohl sie keine physiologische Relevanz hinsichtlich des Depressionsgeschehens hat, ist die IAA-Oxidation durchaus im medizinischen Bereich von Interesse. FOLKES UND WARDMAN (2001) stellten fest, daß durch die Oxidation von IAA durch POD zytotoxische Verbindungen entstehen. Diese Untersuchungen werden in der Krebstherapie genutzt. WARDMAN (2002) schlägt die gezielte Beförderung von POD mit Hilfe von Antikörpern zu bösartigen Tumoren vor. In Kombination mit der Verabreichung von IAA stellt dies eine mögliche neue Methode zur Krebsbekämpfung dar.

2.2.3 Dopamin- β -Hydroxylase (D- β -H)

Die Verschiebung der Neurotransmitter-Homöostase spielt eine große Rolle bei der Entstehung von depressiven Erkrankungen. LAMBERT ET AL. (2000) konnten ein Defizit an Dopamin bei Patienten mit depressiver Erkrankung nachweisen. HIETALA ET AL. (1999) stellten eine niedrige Dopamin-Funktion/Synthese im Zusammenhang mit Depressionen bei Schizophrenie-Patienten fest. Die Verabreichung von Johanniskrautextrakt sowie Hypericin und Hyperforin als Einzelsubstanzen führte in klinischen Studien zu einer Erhöhung der Dopaminkonzentration im Gehirn (FRANKLIN UND COWEN, 2001). CALAPAI ET AL. (1999) beobachteten bei Ratten nach deren Behandlung mit Johanniskrautextrakten ebenfalls eine Zunahme von Dopamin in bestimmten Regionen des Gehirns. Ein flavonoidreicher Extrakt zeigte bei diesen Untersuchungen einen besonders ausgeprägten Einfluß auf die Konzentration der Neurotransmitter.

Das Enzym Dopamin- β -Hydroxylase (D- β -H) katalysiert die Reaktion von Dopamin zu Noradrenalin. KLEBER ET AL. (1999) und DENKE ET AL. (2000) konnten nachweisen, daß Johanniskrautextrakte das Enzym hemmen und somit den Abbau von Dopamin verhindern.

Die D- β -H-Reaktion kann durch den Extrakt folgendermaßen beeinflusst werden:

- Bereits die Einzelkomponenten des Testansatzes werden vom Extrakt gebunden, so daß sie nicht mehr in die Reaktion eingehen können.
- Der Extrakt selbst kann zum Substrat für das Enzym werden oder das Enzym hemmen.

Die genaue Wirkungsweise des Extraktes ist jedoch unklar.

Ein Vergleich der Reinsubstanzen zeigte, daß die Hypericine den Flavonoiden von Johanniskraut in ihrer Hemmwirkung auf das Enzym um das 10fache überlegen sind (DENKE ET AL., 2000). Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde bestätigt, daß der Hypericin-Gehalt der Extrakte positiv mit ihrer Hemmungswirkung auf die D- β -H korreliert.

Die Flavonoide sind jedoch nicht zu vernachlässigen, da sie mit bis zu 4% wesentlich höher in Extrakten vorhanden sind als die Hypericine (bis zu 0,3%) (WICHTL, 1997). Ein Hypericin-arter Extrakt mit hohem Flavonoidgehalt ist folglich ebenfalls in der Lage, ein gutes Ergebnis im Test zu erzielen. Dies relativiert die Bedeutung der Hypericine als Hauptwirkstoffklasse in diesem Testsystem, da bei den getesteten Phänotypen mit hohen Hypericin-Werten auch die Flavonoide in erhöhtem Maß vorhanden waren. Ein additiver Effekt der beiden Substanzklassen auf die Hemmung des Enzyms konnte jedoch nicht eindeutig festgestellt werden.

Weitere Untersuchungen waren aus Kostengründen und aus Mangel an Enzym leider nicht möglich. Eine Inhaltsstoffanalyse bzw. eine Bestimmung der Hypericingehalte ist jedoch im Allgemeinen ausreichend, um eine Aussage bezüglich der D- β -H-Hemmung treffen zu können.

Eine niedrige Aktivität der D- β -H ist allerdings nicht generell mit antidepressiven Effekten verknüpft. Bei Depressionen mit psychotischen Merkmalen wurde eine niedrigere Aktivität der D- β -H gemessen als bei depressiven Erkrankungen ohne Psychose (CUBELLS ET AL., 2002). Patienten mit wahnhaften Depressionen wiesen ebenfalls eine deutlich niedrigere Enzymaktivität auf als die Gruppe ohne Wahnvorstellungen oder gesunde Probanden (MEYERS ET AL., 1999). HAMNER UND GOLD (1998) hingegen fanden eine erhöhte Enzymaktivität bei Personen mit posttraumatischem Streßsyndrom psychotischer Natur gegenüber Erkrankten ohne psychotische Merkmale und Gesunden.

Im Zusammenhang mit diesen Unterschieden im Erscheinungsbild der Depression wird auch eine genetische Prädisposition diskutiert. WOOD ET AL. (2002) stellten fest, daß depressive Patienten, die paranoide Wahnvorstellungen hatten, einem anderen Alleltyp des D- β -H-Gens angehörten als Patienten ohne Paranoia. CUBELLS ET AL. (2002) konnten keine signifikante Beziehung zwischen Genotyp und den psychotischen Symptomen ihrer Probanden ableiten.

All diese Untersuchungen zeichnen ein sehr komplexes Bild der D- β -H-Aktivität und deren Bedeutung im Geschehen der Depression. Daher ist dieses Enzym, und insbesondere dessen Hemmung, bei den verschiedenen Formen der Depression jeweils gesondert zu bewerten.

2.2.4 Cu(II)-induzierte LDL-Oxidation

Die Lipidperoxidation gilt nicht nur als eine der Ursachen der Artherosklerose, sondern wird auch im Zusammenhang mit neurodegenerativen Prozessen diskutiert. PRATICÒ ET AL. (2001) konnten bei transgenen Mäusen eine positive Korrelation zwischen der Lipidperoxidation und der Bildung von Amyloid-Plaques, die bei Alzheimer auftreten, feststellen. In Verbindung mit dem Amyloid- β -Peptid werden Übergangsmetalle und Lipidperoxidation ebenfalls für erhöhten oxidativen Streß bei Alzheimer verantwortlich gemacht (ARLT ET AL., 2002). BILICI ET AL. (2001) wiederum fanden bei depressiven Patienten eine höhere Lipidperoxidation als bei der gesunden Kontrollgruppe.

Dienkonjugation

Die Cu(II)-induzierte Oxidation von LDL ist ein Modell für die Lipidperoxidation. Die Bewertung der antioxidativen Kapazität von Reinstoffen oder Extrakten geschieht in diesem System normalerweise über die Messung der Dienkonjugation und die Dauer bis zu deren exponentiellem Anstieg (Lag-Phase) (ESTERBAUER ET AL., 1992).

Die Untersuchungen von MANACH ET AL. (1998), BROWN ET AL. (1998), HEIJNEN ET AL. (2002) und anderen Gruppen bewiesen, daß Flavonoide, besonders Quercetin, die LDL-Partikel vor Oxidation schützen können.

Dieser Schutz wird durch verschiedene Mechanismen erreicht:

- Cu(II) - Komplexierung (BROWN ET AL., 1998; YAMAMOTO ET AL., 1999)
- Radikal-Scavenger (YAMAMOTO ET AL., 1999; PIETTA, 2000; NIJVELDT ET AL. 2001)
- Schutz des LDL-eigenen α -Tocopherols (HIRANO ET AL., 2001)
- Schutz des Apolipoproteins B 100 (FILIPE ET AL., 2002)

Um einen besseren Vergleich der Extrakte zu ermöglichen und deren Aktivität auch in Molarität ausdrücken zu können, wurden die Lag-Phasen der Extrakte anhand einer Quercetin-Kalibrationsgerade in Quercetin-Äquivalente umgerechnet. Bei den Untersuchungen der Extrakte des Jahres 2000 konnten Unterschiede von bis zu 1 μ M Quercetin-Äquivalent zwischen den Extrakten festgestellt werden. Die Rangfolge der Extrakte bei der Wiederholung der Experimente war jedoch nicht exakt reproduzierbar.

Bei einer genaueren Betrachtung der LDL-Cu(II)-Ergebnisse und der Flavonoidwerte der entsprechenden Extrakte kann eine relativ gute Übereinstimmung der Rangfolge festgestellt werden, d.h. die Rangfolge im LDL-Cu(II)-System entspricht im Wesentlichen dem Gehalt an Flavonoiden (s. Abb. 74).

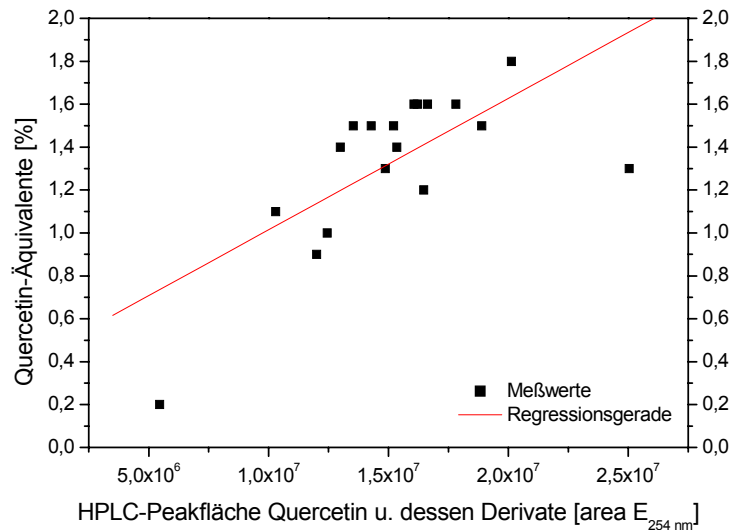


Abb. 74: Korrelation zwischen Quercetin u. dessen Derivaten und den Ergebnissen der Cu(II)-induzierten LDL-Oxidation

Die Gleichung der Regressionsgerade lautet wie folgt:

$$\begin{aligned} \text{Quercetin-Äquivalente } [\mu\text{M}] &= \\ &6,13295 \cdot 10^{-8} [\text{area E}_{254 \text{ nm}} / \%] * \text{Quercetin u. Derivate } [\text{area E}_{254 \text{ nm}}] + 0,401 [\mu\text{M}] \\ r &= 0,69429 \end{aligned}$$

Ein ähnlich hoher Korrelationskoeffizient konnte für keine der anderen Substanzklassen gefunden werden. Dies stützt die Vermutung, daß v.a. Quercetin und seine Derivate für die antioxidativen Eigenschaften der Johanniskrautextrakte im LDL-Cu(II)-System verantwortlich sind. Allerdings sind die offensichtlichen Unterschiede im Flavonoidgehalt weniger deutlich bei der Verzögerung der LDL-Oxidation wiederzufinden.

Die Unterschiede der Lag-Phasen desselben Extraktes bei der Wiederholung der Versuchsdurchführung erschwert eine aussagekräftige Bewertung. Die ungenügende Schärfe der Differenzierung und der Reproduzierbarkeit steht außerdem in keinem Verhältnis zu den aufwendigen Vorarbeiten für das Testsystem (LDL-Isolierung). Eine serielle Untersuchung großer Probenmengen ist ebenfalls aufgrund der geringen Meßkapazität und des hohen Arbeitsaufwandes nicht effizient.

Durch das LDL-Cu(II)-System kann eine antioxidative Wirkung von Johanniskrautextrakten nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen Flavonoidgehalt und den antioxidativen Eigenschaften im System ist ebenfalls tendentiell erkennbar. Eine sichere Differenzierung gelingt jedoch nur bei größeren Unterschieden im Flavonoidgehalt.

Tryptophanfluoreszenz

Bei der Tryptophanfluoreszenz-Messung der Cu(II)-induzierten LDL-Oxidation wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Die positive Korrelation zwischen dem Flavonoidgehalt der Extrakte und der Verzögerung der LDL-Oxidation war hier etwas deutlicher zu sehen als bei der Messung der Dienkonjugation. Jedoch erlaubt die, im Vergleich zur Messung der Dienkonjugation, noch aufwendigere Messung und der noch höhere Verbrauch an isoliertem LDL keine große Probenanzahl.

2.2.5 LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale

Durch MPO katalysierte Oxidationsprodukte wie Tyrosyl-Radikale, Nitro-, Chloro- und Dityrosin können in Zusammenhang mit Lipidperoxidation gebracht werden (PODREZ ET AL., 2000). Wie bereits geschildert, wird Dityrosin in erhöhtem Maß bei neurodegenerativen Krankheiten gebildet. SAVENKOVA ET AL. (1994) wiesen nach, daß LDL durch MPO-katalysierte Radikale oxidiert werden kann. Auf der Grundlage dieser Untersuchungen wurde angestrebt, ein neues physiologisch relevantes Testsystem zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurde der Ansatz von SAVENKOVA ET AL. (1994) modifiziert.

SAVENKOVA ET AL. (1994) verwendeten MPO zur Generierung von Tyrosyl-Radikalen, wobei Glucose/Glucoseoxidase als H_2O_2 -Generatorsystem diente. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit in soweit verändert, daß MPO durch POD und Glucose/Glucoseoxidase durch eine Boluszugabe H_2O_2 ersetzt wurde. Bereits WIELAND ET AL. (1993) wiesen eine LDL-Oxidation durch Meerrettichperoxidase in Anwesenheit von H_2O_2 nach. Die LDL-Oxidation durch Tyrosyl-Radikale unterscheidet sich in ihrem Verlauf deutlich von der Cu(II)-induzierten LDL-Oxidation. Im Gegensatz zu der Oxidation durch Cu(II) tritt bei der Oxidation durch Tyrosyl-Radikale keine Lag-Phase auf, sondern es ist ein sofortiges Einsetzen der Propagationsphase zu beobachten.

Bei konstanten Bedingungen für LDL, H_2O_2 und POD ist der Anstieg der Propagationsphase abhängig von der Tyrosinkonzentration. Ohne Tyrosin kommt es ebenfalls zur LDL-Oxidation, die allerdings wesentlich schwächer verläuft als mit Tyrosin.

Bei einer kontinuierlichen Steigerung von Tyrosin ist ab einer Konzentration von 10 μM i.A. zu beobachten, daß die Propagationsphase nach ca. 200 min stagniert und in eine „Plateauphase“ übergeht. Die Höhe dieses Extinktionsniveaus nimmt bis 50 μM i.A. zu. Eine weitere Erhöhung der Tyrosinkonzentration führt zu einer Absenkung des Plateaus. Dies

deutet auf eine Hemmung der Tyrosyl-Radikal-Generierung durch Tyrosin selbst hin (Substrathemmung).

Zur Durchführung weiterer Experimente wurde eine Tyrosinkonzentration von 25 μM i.A. gewählt, da hier eine maximale Dienbildung erreicht wurde ohne einen plötzlichen Übergang der Propagations- in die Plateauphase. Die Zugabe von Quercetin in diesen Ansatz führt zu einer konzentrationsabhängigen Erniedrigung des Extinktionsniveaus, wobei sich der Übergang in das Plateau sehr abrupt vollzieht.

Dies ist auch bei der Zugabe von Johanniskrautextrakten der Fall. Die Extrakte lassen sich anhand der Höhe des Plateaus unterscheiden. Die Absenkung des Plateaus ist dabei abhängig von der Konzentration der Inhaltsstoffe.

Wird in dem durch Quercetin ausgelösten Plateau H_2O_2 hinzugegeben, steigt die Dienbildung sofort wieder an. Eine zweite Propagationsphase ist die Folge. Diese bricht bei zu niedrigem H_2O_2 -Zusatz wieder vor der maximal möglichen Dienbildung ab. Bei einer höheren H_2O_2 -Gabe wird das maximale Niveau der Grundreaktion erreicht. Diese Beobachtung gibt Hinweise auf den möglichen Mechanismus der Hemmung durch Quercetin. Es reagiert mit Compound I (= Häm($\text{Fe}^{4+ \cdot}=\text{O}$)-Kationradikal, Reaktionsprodukt aus H_2O_2 und dem Häm Fe^{3+} der POD), so daß dieses nicht mehr für die Katalyse zur Verfügung steht. Es kommt zu einem Abbruch der Tyrosyl-Radikal-Produktion. Dadurch wird gleichzeitig die Oxidation von LDL unterbunden. Die Quercetin-Moleküle, die nicht durch Compound I oxidiert wurden, könnten weitere Oxidationsprozesse des LDL-Partikels verhindern und es „stabilisieren“. Dies wäre eine Erklärung, daß kein weiterer Anstieg der Dienbildung in der Plateauphase zu verzeichnen ist.

Bei der Tryptophanfluoreszenz ist ebenfalls ein im Vergleich zum LDL-Cu(II)-System ungewöhnlicher Verlauf der Reaktion zu sehen. Anstatt eines zweiphasigen Verlaufs des Fluoreszenzverlustes nimmt die Fluoreszenz zunächst stetig ab und verlangsamt sich gegen Ende der Meßzeit. Bei der Zugabe von Extrakt bleibt die Fluoreszenz nach der anfänglichen Abnahme ungefähr zu dem Zeitpunkt, bei dem in der Dienkonjugation das Plateau einsetzt, konstant auf einem Niveau.

Bei SAVENKOVA ET AL. (1994) zeigten die Messungen der Dienkonjugation keine eindeutige Plateauphase, der Meßzeitraum war nicht lang genug. SANTANAM UND PARATHASARATHY (1995) verwendeten zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Antioxidantien neben einem System aus POD/ H_2O_2 auch Lipoxigenase/ H_2O_2 zur Lipidperoxidation. Das bei diesen Untersuchungen beobachtete Plateau erklärte er mit dem Radikalkettenabbruch durch die Antioxidantien. Bei CARBONNEAU ET AL. (2002) ist ebenfalls ein Plateau zu finden, jedoch im

Cu(II)-System. Eine mögliche Erklärung wird hier allerdings nicht gegeben. ZIOUZENKOVA ET AL. (1998) konnten abhängig von der Cu(II)-Konzentration verschiedene, stark unterschiedliche Verläufe der Dienbildung feststellen. Dabei ließen äußerst niedrige Cu(II)-Konzentrationen einen vergleichbaren Verlauf der Lipidperoxidation erkennen, allerdings über einen wesentlich längeren Meßzeitraum als im hier untersuchten LDL-Tyrosin-System. Dies zeigt, daß es sich nicht nur beim LDL-Tyrosin, sondern auch beim LDL-Cu(II)-System um höchst komplexe Mechanismen handelt, zu deren Aufklärung noch mehr Forschungsarbeit geleistet werden muß.

Wie beim LDL-Cu(II)-System gilt auch für das LDL-Tyrosin-System, daß nur Extrakte mit stärkeren Unterschieden im Inhaltsstoffgehalt sich eindeutig differenzieren lassen. Für die serielle Untersuchung ist auch das LDL-Tyrosin-System zu aufwendig und daher nicht geeignet.

3 BEWERTUNG DER JOHANNISKRAUTHERKÜNFTE UND SELEKTIONEN

Eine Johanniskrautsorte muß sowohl gute agronomische als auch pharmakologische Merkmale aufweisen. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden beide Parameter berücksichtigt. Aufgrund dieser Ergebnisse wird im Folgenden eine Bewertung der Anbauwürdigkeit sowohl der Sorten/Eliteselektionen als auch der Eigenselektionen vorgenommen.

3.1 Sorten und Eliteselektionen

Da hier die meisten Daten vorliegen, ist die Bewertung einzelner Kriterien differenzierter dargestellt.

Das Bewertungsschema ist hierbei wie folgt:

- ★★★★ sehr gut
- ★★★ befriedigend
- ★ mangelhaft
- ★ nicht akzeptabel (Ausschlußkriterium)

3.1.1 'Taubertal'

'Taubertal' konnte bei den biochemischen Untersuchungen und den Anbauversuchen in fast allen untersuchten Punkten überzeugen. Besonders hervorzuheben sind dabei die erhebliche Toleranz gegenüber der Johanniskrautwelke und ein einheitlicher Feldbestand. Einzig der sehr niedrige Gehalt an Hyperforin zur Zeit der Vollblüte beeinträchtigt die positive Gesamtbewertung. Dies kann aber, wie bereits geschildert, durch einen späteren Erntezeitpunkt teilweise ausgeglichen werden.

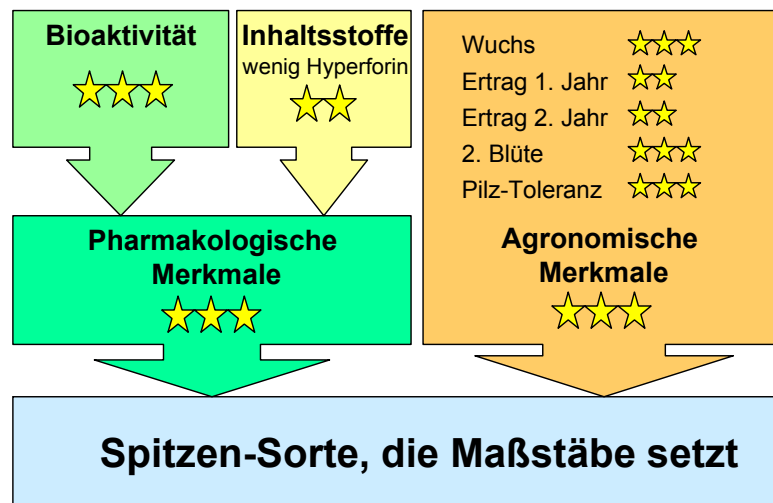


Abb. 75: Gesamtbewertung von 'Taubertal'

3.1.2 'Topaz'

'Topaz' gehört neben 'Taubertal' zu der am häufigsten angebauten Johanniskrautsorte.

Die Beurteilung von 'Topaz' als Sorte ist problematisch, da das Sortenkriterium der Einheitlichkeit des Bestandes von keiner der drei 'Topaz'-Herkünfte erfüllt wurde. Es ist jedoch anzunehmen, daß der Haupttyp von To 2 der ursprünglichen Sorte 'Topaz' entspricht.

Die Herkünfte To 1 und To 2 bestehen je aus 2 Pflanzentypen. Der in To 2 überwiegende Haupttyp kommt in To 1 mit etwa 20% vor. Er weist im Vergleich zum zweiten Typ, der einen Großteil von To 1 bildet, nicht nur die höheren Bonitur- und Gehaltswerte an Hypericin auf, sondern ist auch etwas kleiner im Wuchs.

Johanniskraut vermehrt sich zu 97% apomiktisch. Nur 3% der Nachkommen sind echte Rekombinanten. Wird keine Erhaltungszüchtung durchgeführt, können diese neuen Pflanzentypen jedoch innerhalb weniger Generationen den Bestand bzw. die Sorte massiv verfälschen. Die Vermutung liegt nahe, daß dies bei den Herkünften To 1 und To 2 geschehen ist, wobei dieser Prozeß in To 1 bereits weiter fortgeschritten war.

Die dritte 'Topaz'-Herkunft stellt ein heterogenes Gemisch an Pflanzentypen dar, in der keiner der beiden Pflanzentypen der anderen 'Topaz'-Herkünfte vorhanden ist.

Die hier vorgenommene Bewertung von 'Topaz' bezieht sich nicht auf diesen mutmaßlichen Urtyp, sondern berücksichtigt alle drei Herkünfte dieser Sorte und ist daher als eine gemittelte Bonitur anzusehen. Dies ist möglich, da trotz der Heterogenität der Herkünfte sowohl in sich als auch untereinander ähnliche agronomische und pharmakologische Merkmale erzielt wurden.

Die schlechte Bewertung des Wuchses ist v.a. auf die fehlende Homogenität des Pflanzenbestandes aber auch auf den relativ hohen Wuchs zurückzuführen. Die Bioaktivität aller drei Herkünfte von 'Topaz' liegt im guten Mittelfeld der getesteten Extrakte insgesamt. Ein einheitlicher Bestand des vermutlichen 'Topaz'-Urtyps würde bei einer Bewertung von sowohl pharmakologischen als auch agronomischen Merkmalen ein besseres Ergebnis erzielen als die hier vorliegenden heterogenen Pflanzenbestände.

'Topaz' spiegelt somit in vollem Umfang die Problematik der Qualitätssicherung bzw. Sortenreinheit von Handelssaatgut wider und verdeutlicht die wichtige Rolle der Erhaltungszüchtung bei fakultativ apomiktischen Pflanzen.

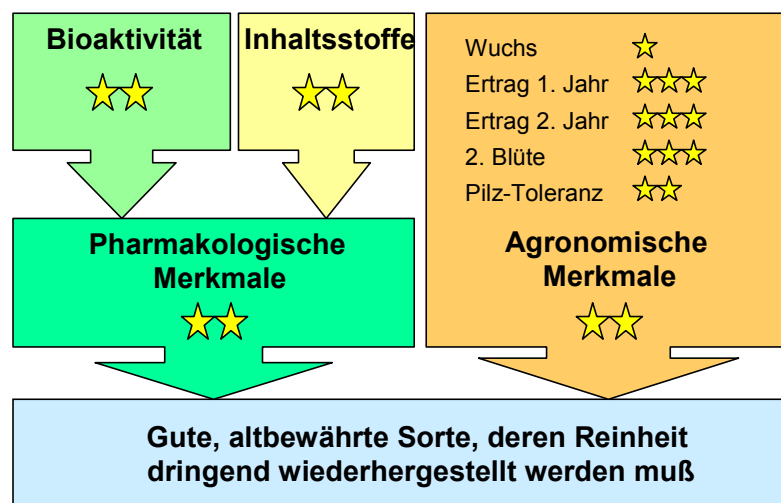


Abb. 76: Gesamtbeurteilung von 'Topaz'

3.1.3 SN

Diese Eliteselektion weist hervorragende Wuchseigenschaften auf: niedriger und kompakter Wuchs, hohe Stengellanzahl, dichter Blühhorizont, einheitlicher Feldbestand. Ein hoher Hypericin- und Flavonoidgehalt v.a. im 2. Standjahr scheinen diesen Pflanzentyp als ideale neue Sorte zu favorisieren. Jedoch sind zwei nicht unerhebliche Mängel vorhanden: eine schlechte Blühwilligkeit im 1. Standjahr und das Fehlen von Rutin im Inhaltsstoffspektrum.

Die geringe Blüte im 1. Standjahr wirkt sich nicht nur negativ auf den Ertrag sondern auch auf die Extraktqualität und folglich auf die Bioaktivität aus. Eine Herbstpflanzung könnte diesem Problem eventuell abhelfen. Eine solch einfache Lösung ist hinsichtlich des fehlenden Rutins nicht möglich. Rutin muß in der Johanniskrautdroge nachweisbar sein, sonst ist diese nicht arzneibuchkonform. Diese gesetzliche Vorgabe ist der Grund für die schlechte Bewertung von SN im Inhaltsstoff-Bereich (s. Abb. 77). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten biochemischen Untersuchungen geben jedoch keinen Hinweis auf eine essentielle Bedeutung von Rutin bei der Wirksamkeit der Extrakte in den Testsystemen. Denkbar wäre die Verwendung der SN-Droge zum Verschneiden mit herkömmlicher, rutinhaltiger Droge. Die Droge von SN allein kann nicht zur Herstellung von Arzneimitteln genutzt werden.

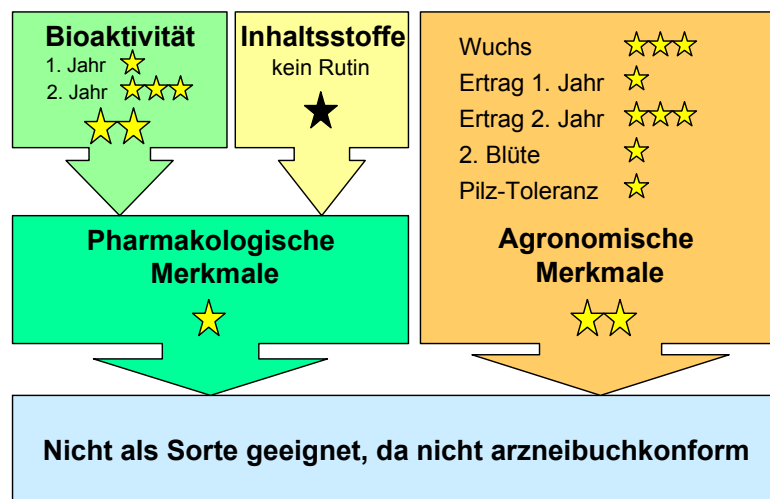


Abb. 77: Gesamtbeurteilung von SN

3.1.4 Goldstern

Diese Eliteselektion eines Züchters zeichnet sich durch sehr gute Wuchseigenschaften aus und ähnelt darin stark der SN-Selektion. Im Gegensatz zu SN sind bei Goldstern bereits im 1. Standjahr der Ertrag und die Bioaktivität der Extrakte bemerkenswert hoch. Letzteres kann auf die besonders hohen Gehalte an Quercetin und dessen Derivaten zurückgeführt werden. Hypericin ist dagegen kaum vorhanden und die von der Industrie gewünschten Werte werden bei weitem nicht erfüllt. Besonders problematisch ist die extreme Anfälligkeit gegenüber dem Erreger der Johanniskrautwelke, *Colletotrichum gloeosporioides*. Goldstern zeigte bereits im 1. Standjahr erste Symptome dieser Krankheit, die Ernte war dadurch jedoch nicht gefährdet. Im Folgejahr kam es bei den Pflanzen zu keinem Austrieb mehr, jedoch konnte deutlich die Ausbreitung der Johanniskrautwelke von den Goldstern-Parzellen aus auf die anderen

Parzellen beobachtet werden. Das Defizit an Hypericin und v.a. die hochgradige Empfindlichkeit gegen die Johanniskrautwelke machen Goldstern zu einem Risiko für den Anbauer bzw. indiskutabel.

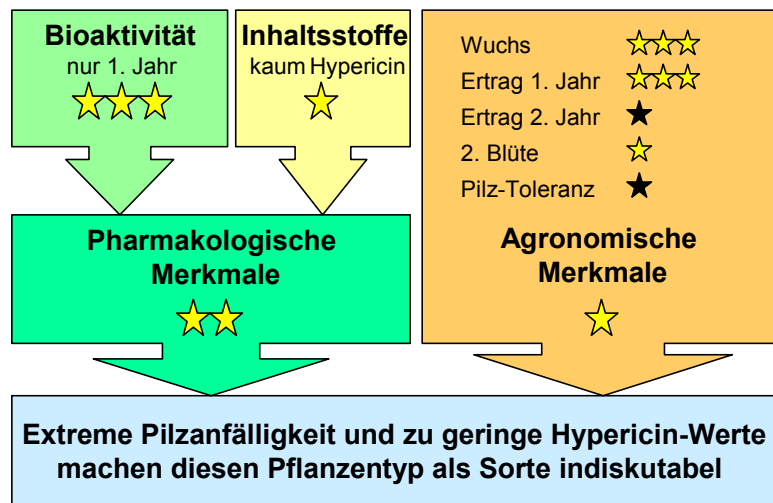


Abb. 78: Gesamtbeurteilung von Goldstern

3.1.5 NLC

Die Extrakte der Eliteselektion NLC konnten sowohl durch gute Inhaltsstoffgehalte als auch durch sehr gute Ergebnisse in den biochemischen Testsystemen überzeugen. Die Beurteilung der agronomischen Merkmale fiel dagegen weit weniger positiv aus. NLC zählte zu den höchsten Pflanzentypen aller angebauten Johanniskrautherkünfte. Doch im Gegensatz zu anderen hohen Typen war NLC durch eine extreme Lagerneigung gekennzeichnet, d.h. stärkere Windböen ließen die Pflanzen des gesamten Bestandes umkippen. Die Ernte wird dadurch erheblich erschwert oder sogar unmöglich, da der Blühhorizont nicht mehr genau erfaßt werden kann. Der Stengelanteil in der Droge steigt dadurch stark an. Schließlich war der Feldbestand ebenfalls nicht homogen. Es fielen mehrere Pflanzentypen innerhalb der NLC-Herkunft auf, die gute Inhaltsstoffprofile aufwiesen, aber einen schwachen/kränkenden Wuchs hatten. Deren weitere Selektion war daher nicht erfolgversprechend.

Trotz guter pharmakologischer Voraussetzungen ist die Praxistauglichkeit dieser Eliteselektion fraglich und für den Anbau nicht empfehlenswert.

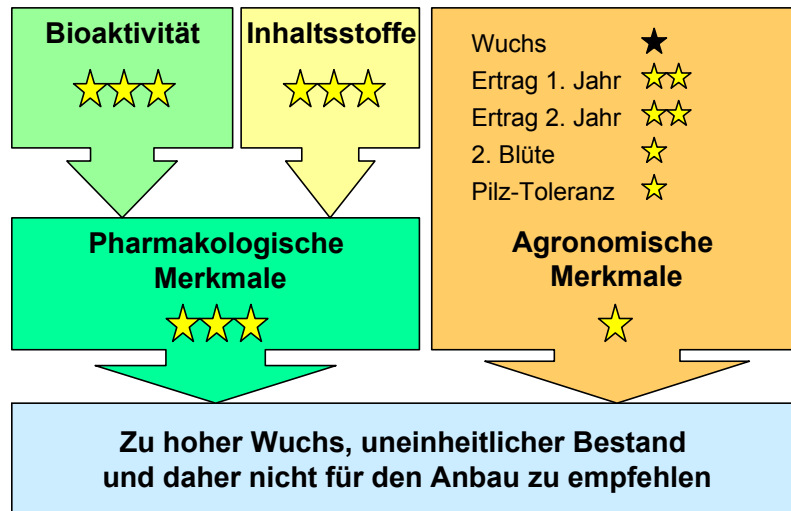


Abb. 79: Gesamtbeurteilung von NLC

3.2 Eigenselektionen

Die Bewertung der Eigenselektionen geschieht nach denselben Prinzipien wie bei den Sorten/Eliteselektionen. Allerdings kann es sich hier nicht um eine genau ausdifferenzierte Beurteilung handeln, da die untersuchten Stückzahlen dazu nicht ausreichen (Einzelpflanzen) und teils aus ausfallsbedingten Gründen keine erschöpfenden Daten vorliegen.

Die folgende Tabelle stellt die Eigenselektionen und deren Beurteilung in den Kategorien agronomische und pharmakologische Merkmale dar.

Tab. 25: Bewertung der agronomischen und pharmakologischen Merkmale der Eigen-selektionen

Nr.	Agronomische Merkmale	Pharmakologische Merkmale	Inhaltsstoffe	Bewertung gesamt
1 / 1	guter Wuchs u. Ertrag, pilzanfällig	sehr gut	kaum Hyperforin	weitere Untersuchungen lohnend
1 / 2	sehr schlechter Wuchs u. Ertrag	schlecht	befriedigend	ungeeignet
11 / 1	guter Wuchs u. Ertrag	gut	sehr wenig Rutin wenig Hypericin	ungeeignet
11 / 2	sehr guter Ertrag, aber zu hoher Wuchs u. Stengelanteil	gut	befriedigend	ungeeignet
11 / 3	geringer Ertrag stark pilzanfällig	schlecht	keine Angaben	ungeeignet
11 / 4	geringer Ertrag stark pilzanfällig	gut - sehr gut	kaum Rutin	ungeeignet
14 / 1	guter Wuchs u. Ertrag	schlecht	befriedigend	ungeeignet
14 / 2	sehr guter Ertrag, aber hoher Wuchs u. Stengelanteil	gut	befriedigend	weitere Untersuchungen lohnend
15 / 1	guter Wuchs u. Ertrag	sehr gut	befriedigend	weitere Untersuchungen lohnend
15 / 2	guter Ertrag, aber hoher Wuchs u. Stengelanteil	sehr gut	befriedigend	weitere Untersuchungen lohnend
A	sehr guter Wuchs, aber schlechte Blühwilligkeit	schlecht	sehr viel Hypericin	ungeeignet
B	zu wenig Stengel, sehr stark pilzanfällig	gut	sehr viel Hypericin	ungeeignet
C	zu hoher Wuchs	gut	kaum Rutin sehr viel Hypericin	ungeeignet
D	zu wenig Stengel, sehr stark pilzanfällig	gut	keine Angaben	ungeeignet
E	guter Wuchs	gut	keine Angaben	weitere Untersuchungen lohnend
F	zu hoher Wuchs	gut	keine Angaben	ungeeignet
G	guter Wuchs	gut	sehr viel Hypericin	weitere Untersuchungen lohnend
H	guter Wuchs	schlecht	sehr viel Hypericin	ungeeignet
J	zu hoher Wuchs stark pilzanfällig	keine Angaben	befriedigend	ungeeignet

Nr. der Herkünfte: s. Material und Methoden 2.2.1

Tab. 25 zeigt, daß nur wenige Selektionen für weitere Versuche lohnend sind.

Die meisten müssen als ungeeignet für weitere Untersuchungen bewertet werden. Wie bereits bei den Sorten deutlich wurde, reicht auch bei den Selektionen eine gute Bewertung in nur einer der beiden Kategorien Pharmakologie oder Agronomie nicht aus, um eine positive Gesamtbeurteilung zu erzielen.

Die hier vorgenommene Bewertung der Selektionen stellt nur einen weiteren Schritt auf dem Weg zu einer neuen Johanniskrautsorte dar. Sie kann kein endgültiges Kriterium für einen Pflanzentyp hinsichtlich seiner Eignung als Sorte sein.

4 FAZIT UND AUSBLICK

Die Selektion von Johanniskraut anhand physiologisch relevanter, biochemischer Modellreaktionen ist grundsätzlich möglich. Die Wahl des Testsystems ist dabei allerdings von entscheidender Bedeutung. So konnte nur das Tyrosin-Dimer-System als Selektionsmittel überzeugen. IAA-Oxidation, D- β -H-Reaktion und die LDL-Systeme erreichten keine vergleichbare Sensitivität in der Auflösung und waren durch teils sehr aufwendige Arbeitsschritte nicht für die Messung und Bewertung großer Probenmengen geeignet. Eine einfache Inhaltsstoffanalyse kann diese Systeme größtenteils ersetzen, da sie auf bestimmte Stoffgruppen im Extrakt reagieren (D- β -H – Hypericine, LDL-Cu(II) – Quercetin und dessen Derivate).

Die Eignung einer Johanniskrautselektion für Anbau und Industrie ist jedoch nicht allein von ihrem Ergebnis im biochemischen Testsystem abhängig. Die agronomischen Eigenschaften sind von genauso großer Bedeutung und sind bei der Beurteilung einer Selektion als mindestens gleichwertig gegenüber den pharmakologischen Merkmalen zu betrachten.

Nur wenige Eigenselektionen, die unter diesen Aspekten untersucht wurden, zeigen eine vielversprechende Kombination aus beiden Bereichen. Dies gilt ebenfalls für die im Handel erhältlichen Sorten/Eliteselektionen. Hier ist meist die fehlende Homogenität einer Sorte ein großes Problem.

Auf der Suche nach weiteren Johanniskrauttypen mit guten Merkmalskombinationen sollte in Zukunft das Potential von Wildsammlungen genutzt werden. Diese kann nun mehr unter Berücksichtigung der morphologischen Merkmale durchgeführt werden, die auf gute agronomische und pharmakologische Eigenschaften schließen lassen (z.B. Hypericinbehälter auf den Petalen). Im Hinblick auf deren pharmakologische Wirksamkeit müssen weitere physiologisch relevante Testsysteme entwickelt und auf ihre Tauglichkeit zur Selektion geprüft werden.

V ZUSAMMENFASSUNG

Durch eine Kombination von Feldversuch und biochemischen Analysen wurden im Handel erhältliche Sorten und Eliteselektionen von Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) hinsichtlich ihrer agronomischen und pharmakologischen Merkmale bewertet und neue Johanniskrauttypen aus heterogenem Saatgut selektiert. Zu diesem Zweck wurde ein 3jähriger Anbauversuch durchgeführt, in dem die agronomisch wichtigen Merkmale der Pflanzen erfaßt wurden. Die pharmakologische Beurteilung wurde anhand der Bestimmung der Inhaltsstoffe und der Wirksamkeit ethanolischer Extrakte der jeweiligen Phänotypen in biochemischen Modellreaktionen durchgeführt. Für die Testung der Extrakte wurden v.a. physiologisch relevante Testsysteme ausgewählt, die im Zusammenhang mit der Depression, dem Hauptanwendungsgebiet von *Hypericum*, diskutiert werden. Die Tauglichkeit der gewählten Systeme zur Differenzierung und Selektion von Johanniskrauttypen wurde dabei ebenfalls überprüft.

Die verschiedenen Johanniskrauttypen konnten nicht nur durch ihre morphologischen Merkmale differenziert werden, sondern wiesen auch Unterschiede in ihrem Inhaltsstoffspektrum und in ihrer Aktivität in den Testsystemen auf.

Das Testsystem der POD-katalysierten Dimerisierung von L-Tyrosin leitet sich von der Dimerisierung von Methionin-Enkephalinen an ihren Tyrosin-Enden durch aktivierte Leukozyten ab. Diese Störung des Opiatsystems kann mit der Depression verknüpft sein. Die Dimerisierung von Tyrosin wurde von den Extrakten der *Hypericum*-Typen unterschiedlich stark gehemmt, so daß eine Differenzierung der Pflanzentypen anhand dieses Systems sehr gut möglich war. Es wurde daher als Standardsystem für die Testung aller Extrakte verwendet.

Die Oxidation von Indolesigsäure durch Peroxidase ist physiologisch nicht relevant. Jedoch kann dadurch das Verhältnis von Mono- zu o-Diphenolen in Extrakten bestimmt und zur Unterscheidung von Extrakten genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte dies jedoch nicht erfolgreich zur Differenzierung eingesetzt werden, da die Sensitivität des Systems für die sehr ähnlichen *Hypericum*-Extrakte nicht ausreichte.

Das Enzym Dopamin- β -Hydroxylase (D- β -H) ist für einen Abbauweg des Neurotransmitters Dopamin verantwortlich. Die Extrakte der Johanniskrauttypen konnten diese Enzymreaktion erfolgreich hemmen, wobei ein direkter Zusammenhang zwischen Hypericingehalt und Hemmung erkennbar war.

Die Peroxidation von Lipiden ist ebenfalls am depressiven Geschehen im Gehirn beteiligt. Bei der Cu(II)-induzierten LDL-Oxidation, einem Modell für die Lipidperoxidation, wurden die Ergebnisse der Extrakte in Quercetin-Äquivalente umgerechnet und verglichen. Es konnten Unterschiede gemessen werden, jedoch erlaubt das System keine große Probenanzahl.

Als weiteres Modell für die Lipidperoxidation wurde im Rahmen dieser Arbeit die LDL-Oxidation durch POD-katalysierte Tyrosyl-Radikale entwickelt. Diese ist, im Vergleich zum LDL-Cu(II)-System, durch einen deutlich unterschiedlichen Verlauf der Dienkonjugation gekennzeichnet. Typisch für diese Reaktion ist eine konstante Plateauphase nach der maximalen Bildung von konjugierten Dienen. Eine Differenzierung der Extrakte durch die Verschiebung dieses Plateaus war möglich, eine serielle Untersuchung von Extrakten ist wie im LDL-Cu(II)-System durch den hohen Arbeitsaufwand nicht möglich.

Die Ergebnisse aller agronomischen und pharmakologischen Untersuchungen zeigten deutliche Unterschiede zwischen den handelsüblichen Sorten und Eliteselektionen auf, v.a. hinsichtlich ihrer Homogenität. Schließlich konnten einige vielversprechende neue Johanniskrauttypen selektiert werden, die zur Entwicklung neuer Sorten genutzt werden können.

VI LITERATUR

ARLT, S., BEISIEGEL, U., KONTUSH, A. (2002):

Lipid peroxidation in neurodegeneration: new insights into Alzheimer's disease. *Current Opinion in Lipidology*, 13 (3), 289-94

BAGDONAITE, E., ZYGMUNT, B., RADUSIENE, J. (2001):

Morphological and chemical evaluation of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) populations from Lithuania. *Herba Polonica* 47 (4), 294-303

BAUREITHEL, K. H., BÜTER, K. B., ENGESSER, A., BURKARD, W., SCHAFFNER, W. (1997):

Inhibition of benzodiazepine binding in vitro by amentoflavone, a constituent of various species of *Hypericum*. *Pharm-Acta-Helv.*, 72 (3), 153-157

BERGHÖFER, R., HÖLZL, J. (1986):

Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) Prüfung auf Verfälschung. *Deutsche Apotheker Zeitung* Nr. 47, 2569-2573

BILICI, M., EFE, H., KÖROGLU, M.A., UYDU, H.A., BEKAROGLU, M., DEGER, O. (2001):

Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *Journal of Affective Disorders*, 64, 43-51

BOMME, U. (1986):

Kulturanleitung für Johanniskraut. *Merkblätter für Pflanzenbau, Heil- und Gewürzpflanzen* 32; Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Freising, München

BOMME, U. (1981-87):

Versuchsergebnisse der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Heil- und Gewürzpflanzen, Freising-Weihenstephan

BOMME, U. (1997):

Produktionstechnologie von Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.). Z. Arzn. Gew.pfl., 2, 127-134

BORS, W. (1987):

Bedeutung und Wirkungsweisen von Antioxidantien. in: Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin. E. F. Elstner, W. Bors und W. Wilmanns (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 161-183

BRAUNEWELL, H. (1991):

Ökologische, ontogenetische und morphogenetische Einflüsse auf Ertrag und Inhaltsstoffgehalt von *Hypericum spp.* (Johanniskraut). Dissertation am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I der Justus-Liebig-Universität Gießen

BRISKIN, D. P., LEROY, A., GAWIENOWSKI, M. (2000):

Influence of nitrogen on the production of hypericins by St. John's wort. Plant Physiology and Biochemistry, 38 (5), 413-420

BRISKIN, D. P., GAWIENOWSKI, M. (2001):

Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. Plant Physiology and Biochemistry, 39 (12), 1075-1081

BROWN, J. E., KHODR, H., HIDER, R. C., RICE-EVANS, C. A. (1998):

Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. Biochem. J., 330, 1173-1178

BRUTOVSKA, R., CELLAROVA, E., DOLEZEL, J. (1998):

Cytogenetic variability of in vitro regenerated *Hypericum perforatum* L. plants and their seed progenies. Plant Science, 133 (2), 221-229

BÜHLER: BUNDESINSTITUT FÜR ARZNEIMITTEL UND MEDIZINPRODUKTE.

Schriftliche Mitteilung vom 7.9.1995 an den Bundesverband der Arzneimittelhersteller e.V. (BfArM), Bonn

BÜTER, B., ORLACCHIO, C., SOLDATI, A., BERGER, K. (1998):

Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum*. *Planta-Medica*, 64 (5), 431-437

BUTTERWECK, V., JÜRGENLIEMK, G., NAHRSTEDT, A., WINTERHOFF, H. (2000):

Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Medica*, 66, 3-6

CALAPAI, G., CRUPI, A., FIRENZUOLI, F., COSTANTINO, G., INFERRERA, G., CAMPO, G.M., CAPUTI, A.P. (1999):

Effects of *Hypericum perforatum* on levels of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and dopamine in the cortex, diencephalon and brainstem of the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51 (6), 723-728

CAMPBELL, M. H., MAY, C. E., SOUTHWELL, I. A., TOMLINSON, J. D., MICHAEL, P. W. (1997):

Variation in *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) in New South Wales. *Plant Protection Quarterly*, 12 (2), 64-66

CARBONNEAU, M.-A., CARTRON, E., LEGER, C.-L., SENGLAT, C., DESCOMPS, B. (2002):

New insight on the relationship between LDL composition, associated proteins, oxidative resistance and preparation procedure. *Free Radical Research*, 36 (2), 127-142

CHATTERJEE, S. S., BHATTACHRYA, S. K., WONNEMANN, M., SINGER, A., MÜLLER, W. E. (1998):

Hyperforin as a possible antidepressant component of *hypericum* extracts. *Life-Science*, 63 (6), 499-510

COPER, H., HELMCHEN, H. (1992):Coper, H., Helmchen, H. (1992):

Psychopharmaka; Pharmakotherapie von Psychosen und psychoreaktiven Störungen.
in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. BI Wissenschaftsverlag
Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich 6. Auflage: 281-303

COTT, J. H. (1997):

In vitro receptor binding and enzyme inhibition by *Hypericum perforatum* extract.
Pharmacopsychiatry, 30, Suppl. 2, 108-112

CUBELLS, J.F., PRICE, L.H., MEYERS, B.S., ANDERSON, G.M., ZABETIAN, C.P., ALEXOPOULOS,
G.S., NELSON, J.C., SANACORA, G., KIRWIN, P., CARPENTER, L., MALISON, R.T., GELERNTER, J.
(2002):

Genotype-controlled analysis of plasma dopamine beta-hydroxylase activity in psychotic
unipolar major depression. Biological Psychiatry, 51 (5), 358-364

CZYGAN, F.-C. (1993):

Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrautes. Zeitschrift für Phytotherapie, 14, 272-
278, Hippokrates Verlag GmbH

DENKE, A. (1997):

Kontrollierter Anbau von *Hypericum perforatum* und Untersuchung der methanolischen
Extrakte als Grundlage für die Standardisierung auf das Gesamtwirkungsspektrum.
Dissertation am Institut der Phytopathologie der Technischen Universität München-
Weihenstephan

DENKE, A., SCHNEIDER, W., ELSTNER, E.F. (1999):

Biochemical activities of extracts from *Hypericum perforatum* L. 2nd communication:
Inhibition of metenkephaline- and tyrosine-dimerization. Drug Res., 49 (I), 2, 109-114

DENKE, A., SCHEMP, H., WEISER, D., ELSTNER, E.F. (2000):

Biochemical activities of extracts from *Hypericum perforatum* L. 5th communication: Dopamine- β -hydroxylase-product quantification by HPLC and inhibition by hypericins and flavonoids. *Drug Res.*, 50 (I), 5, 415-419

DEUTSCHER ARZNEIMITTEL - CODEX (DAC) (1986): 3. Ergänzung 1991

ESTERBAUER, H., STRIEGL, G., PUHL, H., ROTHENEDER, M. (1989):

Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Comms.* 6(1), 67-75

ESTERBAUER, H., GEBICKI, J., PUHL, H., JÜRGENS, G. (1992):

The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.*, 13, 341-390

FILIPPE, P., MORLIÈRE, P., PATTERSON, L. K., HUG, G. L., MAZIÈRE, J.-C., MAZIÈRE, C., FREITAS, J. P., FERNANDES, A., SANTUS, R. (2002):

Repair of amino acid radicals of apolipoprotein B 100 of low-density lipoproteins by flavonoids. A pulse radiolysis study with quercetin and rutin. *Biochemistry*, 41, 11057-11064

FOLKES, L.K., WARDMAN, P. (2001):

Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species – a potential new role for plant auxins in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 61, 129-136

FRANKLIN, M., COWEN, P.J. (2001):

Researching the antidepressant actions of *Hypericum perforatum* (St. John's wort) in animals and man. *Pharmacopsychiatry*, 34, Suppl. 1, 29-37

GÄRBER, U., SCHENK, R. (2002):

Colletotrichum cf. *gloeosporioides* an Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.). 2. Teil: Untersuchungen zu den Übertragungswegen des Erregers. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., 54 (3), 63-68

GORTNER, W., KENT, M. J. (1958):

The coenzyme requirement and enzyme inhibitors of pineapple indoleacetic acid oxidase. J. Biol. Chem., 233, S.731-735

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. (1989):

Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press Oxford

HAMNER, M.B., GOLD, P.B. (1998):

Plasma dopamine beta-hydroxylase activity in psychotic and non-psychotic post-traumatic stress disorder. Psychiatry Research, 77 (3), 175-181

HEIJNEN, C. G. M., HAENEN, G. R. M. M., OOSTVEEN, R. M., STALPERS, E. M., BAST, A. (2002):

Protection of flavonoids against lipid peroxidation: The structure activity relationship revisited. Free Radical Research, 36 (5), 575-581

HEINECKE, J. W., LI, W., FRANCIS, G. A., GOLDSTEIN, J. A. (1993):

Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. Clin Invest, 91 (6), 2866-2872

HENSLEY, K., MAIDT, M. L., YU, Z., SANG, H., MARKESBERY, W. R., FLOYD, R. A. (1998):

Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. The Journal of Neuroscience, 18 (20), 8126-8132

HIETALA, J., SYVALAHTI, E., VILKMAN, H., VUORIO, K., RAKKOLAINEN, V., BERGMAN, J., HAAPARANTA, M., SOLIN, O., KUOPPAMAKI, M., ERONEN, E., RUOTSALAINEN, U., SALOKANGAS, R.K.R. (1999):

Depressive symptoms and presynaptic dopamine function in neuroleptic-naive schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 35 (1), 41-50

HIRANO, R., SASAMOTO, W., MATSUMOTO A., ITAKURA, H., IGARASHI, O., KONDO, K. (2001):

Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J. Nutr. Sci. Vitminol.*, 47 (5), 357-362

HÖLZL, J., OSTROWSKI, E. (1987):

Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) HPLC-Analyse der wichtigsten Inhaltsstoffe und deren Variabilität in einer Population. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 127. Jahrg., Nr. 23: 1227-1230

HURD, Y. L., HERMAN, M. M., HYDE, T. M., BIGELOW, L. B., WEINBERGER, D. R., KLEINMAN, J. E. (1997):

Prodynorphin mRNA expression is increased in the patch vs matrix compartment of the caudate nucleus in suicide subjects. *Molecular-Psychiatry*, 2 (6), 495-500

JÜRGENLIEMK, G., NAHRSTEDT, A. (2002):

Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Med*, 68, 88-91

KASPER, S. (2001):

Hypericum perforatum – a review of clinical studies. *Pharmacopsychiatry*, 34 (1), 51-55

KAUL, R. (2000):

Johanniskraut. Botanik, Inhaltsstoffe, Qualitätskontrolle, Pharmakologie, Toxikologie und Klinik. *Wiss. Verlagsgesellschaft*, Stuttgart

KLEBER, E., OBRY, T., HIPPELI, S., SCHNEIDER, W., ELSTNER, E.F. (1999):

Biochemical activities of extracts from *Hypericum perforatum* L. 1st communication: Inhibition of dopamine- β -hydroxylase. Drug. Res., 49 (I), 2, 106-109

LAMBERT, G., JOHANSSON, M., AGREN, H., FRIBERG, P. (2000):

Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness – Evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. Archives of general Psychiatry, 57 (8), 787-793

LINDE, K., RAMIREZ, G., MULROW, C. D., PAULS, A., WEIDENHAMMER, W., MELCHART, D. (1996):

St. John's wort for depression - an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. BMJ, 313 (7052), 253-258

MAES, M., DE VOS, N., PIOLI, R., DEMEDTS, P., WAUTERS, A., NEELS, H., CHRISTOPHE, A. (2000):

Lower serum vitamin E concentrations in major depression: Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. Journal of affective disorders, 58, 241-246

MANACH, C., MORAND, C., CRESPIY, V., DEMIGNÉ, C., TEXIER, O., RÉGÉRAT, F., RÉMÉSY, C. (1998):

Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. Federation of European Biochemical Societies Letters, 426, 331-336

MANN, E. (1998):

Unterscheidung breitblättriger und schmalblättriger Phänotypen von *Hypericum perforatum* L. mit Hilfe verschiedener biochemischer Modellreaktionen. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Phytopathologie, TUM-Weihenstephan

MARTONFI, P., REPCAK, M. (1994):

Secondary metabolites during flower ontogenesis of *Hypericum perforatum* L.. Zahradnictvi, 21, 37-44

MARTONFI, P., REPCAK, M., CICCARELLI, D., GARBARI F.(2001):

Hypericum perforatum L. – chemotype without rutin from Italy. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29 (6), 659 - 661

MEYERS, B.S., ALEXOPOULOS, G.S., KAKUMA, T., TIRUMALASETTI, F., GABRIELE, M., ALPERT, S., BOWDEN, C., MELTZER, H.Y. (1999):

Decreased dopamine beta-hydroxylase activity in unipolar geriatric delusional depression. *Biological Psychiatry*, 45 (4), 448-452

MILLER, A. L. (1998):

St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): clinical effects on depression and other conditions. *Altern-Med-Rev.*, 3 (1), 18-26

MÜLLER, W. E., ROLLI, M., SCHÄFER, C., HAFNER, U. (1997):

Effects of *hypericum* extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*, 30 Suppl. 2, 102-107

NIJVELDT, R. J., VAN NOOD, E., HOORN, D. E. C., BOELENS, P. G., VAN NORREN, K., VAN LEEUWEN P. A. M. (2001):

Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74, 418-425

NOACK, K. L. (1939):

Über *Hypericum*-Kreuzungen: VI. Fortpflanzungsverhältnisse und Bastarde von *Hypericum perforatum* L. *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*, 76, 569-601

NÖLDNER, M., SCHÖTZ, K. (2002):

Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. *Planta Med*, 68, 577-580

PIETTA, P. G. (2000):

Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63, 1035-1042

PODREZ, E.-A., ABU-SOUD, H. M., HAZEN, S. L. (2000):

Myeloperoxidase-generated oxidants and Atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 28 (12), 1717-1725

POUTARAUD, A., DI GREGORIO, F., TIN, V. C., GIRARDIN, P. (2001):

Effect of light on hypericins contents in fresh flowering top parts and in extract of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Medica*, 67 (3), 254 - 259

PRATICÒ, M., URYU, K., LEIGHT, S., TROJANOSKI, J.Q., LEE, V.M.-Y. (2001):

Increased Lipid Peroxidation Precedes Amyloid Plaque Formation in an Animal Model of Alzheimer Amyloidosis. *The Journal of Neuroscience*, 21 (12), 4183-4187

PSCHYREMBEL (1994):

Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 257. Auflage

RAFFA, R. B. (1998):

Screen of receptor and uptake-site activity of hypericin component of St. John's wort reveals sigma receptor binding. *Life-Sciences*, 62 (16), 265-270

REYFTMANN, J. P., SANTUS, R., MAZIÈRE, J. C., MORLIÈRE, P., SALMON, S., CANDIDE, C., MAZIÈRE, C., HAIGLE, J. (1990):

Sensitivity of tryptophan and related compounds to oxidation induced by lipid autooxidation. Application to human serum low- and high-density lipoproteins. *Biochem. Biophys. Acta*, 1042, 159-167

ROSEI, M. A., BLARZINO, C., FOPPOLI, C., COCCIA, R., DE MARCO, C. (1991):

The peroxidase-catalyzed oxidation of enkephalins. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 179 (1), 147-152

SAVENKOVA, M. I., MÜLLER, D. M., HEINECKE, J. W. (1994):

Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, No. 32, 20394-20400

SANTANAM, N., PARATHASARATHY, S. (1995):

Paradoxical actions of antioxidants in the oxidation of low density lipoprotein by peroxidases. *Journal of Clin. Invest.*, 95, 2594-2600

SCHEMP, H. (1998): mündliche Mitteilung

SCHNEIDER, G. (1990):

Arzneidrogen. Ein Kompendium für Pharmazeuten, Biologen und Chemiker.
BI Wissenschaftsverlag, S. 116

SCHULZ, V. (2002):

Klinische Studien mit *Hypericum*-Extrakten bei Patienten mit Depressionen. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 23, 11-15

SCHUSTER, W. H., VON LOCHOW, J. (1979):

Anlage und Auswertung von Feldversuchen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main

SOUTHWELL, I. A., BOURKE, C. A. (2001):

Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). *Phytochemistry*, 56, 437-441

SOUZA, J. M., GIASSON, B. I., CHEN, Q., LEE, V. M.-Y., ISCHIROPOULOS, H. (2000):

Dityrosine cross-linking promotes formation of stable α -synuclein polymers. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, No. 24, 18344-18349

STARKE, K., PALM, D. (1992):

Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. BI Wissenschaftsverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich 6. Auflage

TANG, Y. W., BONNER, T. (1947):

The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. 1. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. Arch. Biochem. Biophys., 13, 11-25

TEJEDOR-REAL, P., MICO, J. A., MALDONADO, R., ROQUES, B. P., GIBERT-RAHOLA, J. (1995):

Implication of endogenous opioid system in the learned helplessness model of depression. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 52 (1), 145-152

TEKELOVA, D., REPCAK, M., ZEMKOVA, E., TOTH, J. (2000):

Quantitative changes of dianthrone, hyperforin and flavonoids content in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*. Planta Medica, 66, 778-780

TEUFEL-MAYER, R., GLEITZ, J. (1997):

Effects of long-term administration of hypericum extracts on the affinity and density of the central serotonergic 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. Pharmacopsychiatry, 30, Suppl. 2, 113-116

TURKALL, R. M., DENISON, R. C., TSAN, M. F. (1982):

Degradation and oxidation of methionine enkephalin by human neutrophils. J-Lab-Clin-Med., 99 (3), 418-427

VALVERDE, O., MICO, J. A., MALDONADO, R., MELLADO, M., GIBERT-RAHOLA, J. (1994):

Participation of opioid and monoaminergic mechanisms on the antinociceptive effect induced by tricyclic antidepressants in two behavioural pain tests in mice. Prog-Neuropsychopharmacol-Biol-Psychiatry, 18 (6), 1073-92

VOLPERT, R. (1993):

Antioxidative Eigenschaften wäßriger und ethanolischer Propolis-Extrakte.

Dissertation am Institut für Botanik und Mikrobiologie der Technischen Universität München

WALKER, L., SIRVENT, T., GIBSON, D., VANCE, N. (2001):

Regional differences in hypericin and pseudohypericin concentrations and five morphological trait among *Hypericum perforatum* plants in the northwestern United States. Canadian Journal of Botany, 79 (10), 1248-1255

WARDMAN, P. (2002):

Indole-3-acetic acids and horseradish peroxidase: a new prodrug/enzyme combination for targeted cancer therapy. Curr. Pharm. Des., 8 (15), 1363-74

WHEATLEY, D. (1998):

Hypericum extract - Potential in the treatment of depression. CNS-Drugs, 9 (6), 431-440

WICHTL, M. (1997):

Teedrogen. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 3. Auflage, S. 309-312

WIELAND, E., PARTHASARATHY, S., STEINBERG, D. (1993):

Peroxidase-dependent metal-independent oxidation of low density lipoprotein in vitro: A model for in vivo oxidation? Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90, 5929-5933

WOOD, J.G., JOYCE, P.R., MILLER, A.L., MULDER, R.T., KENNEDY, M.A. (2002):

A polymorphism in the dopamine β -hydroxylase gene is associated with „paranoid ideation“ in patients with major depression. Biological Psychiatry, 51 (5), 365-369

YAMAMOTO, N., MOON, J.-H., TSUSHIDA, T., NAGAO, A., TERAQ, J. (1999):

Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper ion-induced lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 372, No. 2, 347-354

ZIOUZENKOVA, O., SEVANIAN, A., ABUJA, P. M., RAMOS, P., ESTERBAUER, H. (1998):

Copper can promote oxidation of LDL by markedly different mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 24, No. 24, 607-623

ANHANG I

Plan der Blockanlage 2000/2001

Block I	Randreihe														
	M. Bauer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	'Topaz' 1	'Topaz' 2	'Topaz' 3	'Taubertal' 1	'Taubertal' 2	Goldstern 1	Goldstern 2	NLC	SN	BREIT	'Taubertal' 3	Austro	429	430	
	Randreihe														

Block II	Randreihe														
	BREIT	11	15	9	13	10	12	14	6	4	2	8	5	1	7
430	NLC	Austro	SN	'Taubertal' 3	429	'Taubertal' 2	'Topaz' 3	'Topaz' 1	Goldstern 2	'Taubertal' 1	M. Bauer	Goldstern 1	'Topaz' 2		
	Randreihe														

Block III	Randreihe														
	SN	10	5	14	8	2	9	3	1	13	7	15	4	12	6
'Taubertal' 1	429	Goldstern 2	'Topaz' 1	NLC	'Topaz' 2	M. Bauer	Austro	Goldstern 1	430	'Topaz' 3	'Taubertal' 3	'Taubertal' 2	BREIT		
	Randreihe														

Block IV	Randreihe														
	Goldstern 1	7	12	6	15	4	11	13	5	14	3	1	10	2	9
'Taubertal' 3	'Taubertal' 2	430	'Topaz' 3	BREIT	Austro	'Taubertal' 1	429	'Topaz' 2	M. Bauer	SN	'Topaz' 1	NLC	Goldstern 2		
	Randreihe														

ANHANG II

Ernteraster der Parzellen mit Sorten und Eliteselektionen

		Reihe			
		1	2	3	4
Pflanze	1				
	2	X			
	3		X		X
	4			X	
	5		X		
	6				X
	7	X		X	
	8				

X bonitierte und beerntete Pflanze

DANKSAGUNG

Danken möchte ich an erster Stelle Herrn Prof. Dr. E. F. Elstner, Lehrstuhl für Phytopathologie der TU München-Weihenstephan, für die Überlassung des vielseitigen Themas, die Bereitstellung des Laborplatzes und anregende Gespräche und Ideen.

Auch Herrn Prof. G. Forkmann gilt mein Dank für seine Diskussionsbereitschaft und daß er mich zu Beginn dieser Arbeit einige Zeit im Lehrstuhl für Zierpflanzenbau aufgenommen hat.

Der Firma Steigerwald Arzneimittel GmbH danke ich sowohl für die finanzielle Unterstützung als auch für die Extraktion der Johanniskrautproben. Besonders möchte ich hier Herrn Dr. D. Weiser, Frau Dr. U. Kroll und Frau Dr. A. Heisner als persönlichen Ansprechpartnern danken.

Den Mitarbeitern in Dürnast, sowohl im Zierpflanzenbau als auch bei der Phytopathologie, danke ich für die tatkräftige Mithilfe bei der Anzucht, Pflanzung und Pflege der Pflanzen.

Allen „Phytos“ (auch bereits ehemaligen) danke ich herzlich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und einfach die schöne und lustige Zeit im Labor!

Dabei möchte ich vor allem Dedi, Kerstin, Karin und Angela für ihre Freundschaft und moralische Unterstützung danken. Bei Jens und Georg bedanke ich mich für die konstruktive Motivation bei meinen schriftlichen Ausführungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Harald Schempp. Mit seiner Geduld, guten Laune und seinem Wissen war er bei allen Arten von Problemen und Problemchen immer für mich da.

Daß ich mit meinen Sorgen um das Johanniskraut nicht alleine war, habe ich nicht zuletzt Johannes Nebelmeir zu verdanken. Als zweites und letztes Mitglied in unserem Kraut-Team ist er wohl der einzige, der die Freuden und Leiden der Arbeit mit dem Kraut nachfühlen kann. In ihm hatte ich einen wahren Verbündeten und Freund.

Meinen Eltern, Helga und Bernhard Mann, und meinem Bruder Jochen danke ich für ihre Liebe und, nicht nur finanzielle, Unterstützung, ohne die mir das Studium nicht möglich gewesen wäre! Danke für alles!

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Elke Mann
Geburtsdatum: 26.04.1973
Geburtsort: Bayreuth

AUSBILDUNG

Schule:

1979 – 1983 Volksschule St. Johannis, Bayreuth

1983 – 1992 Markgräfin-Wilhelmine-Gymnasium in Bayreuth

Studium:

11/1992 – 11/1998 Gartenbauwissenschaften (TU München-Weihenstephan)
Diplomarbeit:
„Unterscheidung breitblättriger und schmalblättriger Phänotypen von *Hypericum perforatum* L. mit Hilfe verschiedener biochemischer Modellreaktionen“

11/1998 – 02/1999 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Phytopathologie der TU München-Weihenstephan

Promotion:

03/1999 – 08/2003 Lehrstuhl für Phytopathologie der TU München-Weihenstephan
Thema:
„Selektion von *Hypericum perforatum* L. anhand biochemischer Testsysteme“