

Lehrstuhl für Phytopathologie  
der Technischen Universität München

**Der Einfluss von Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.)  
– Extrakt auf immunologische Prozesse in  
Mikroglia-Zellkulturen**

Birgit Kraus

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. G. Forkmann  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E. F. Elstner, em.  
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schemann

Die Dissertation wurde am 07.03.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.05.2005 angenommen.

*Wenn du das Unbekannte erforschst,  
weißt du nicht was du finden wirst.*

*Der letzte Grundsatz.  
Murphy`s neue Gesetze III*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Mikroglia – Immunzellen des Gehirns .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Rolle der Mikroglia bei der Pathogenese von Alzheimer .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Pathogenerkennung durch Phagozyten.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Phagozyten.....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 NO-Synthesen und NO als Signalmolekül.....</b>	<b>12</b>
<b>1.6 Johanniskraut und Depression.....</b>	<b>19</b>
<b>1.7 Ziel der Arbeit .....</b>	<b>23</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>24</b>
2.1.1. Verwendete Zelllinien .....	24
2.1.2 Zellkulturmedien, Puffer und Reagenzien für die Zellkultur.....	25
2.1.3 Johanniskraut-Extrakte.....	27
2.1.4 Chemikalien.....	28
2.1.5 Verwendete Kits .....	30
2.1.6 Herstellung von Puffern und anderen Lösungen.....	30
2.1.7 Analysegeräte.....	34
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>37</b>
2.2.1 Zellkulturtechniken.....	37
2.2.2 Extrakte und Einzelsubstanzen .....	38
2.2.3 MTT-Test.....	42
2.2.4 Toxizitätsbestimmung von Amyloid $\beta$ Fragment 25-35 und 35-25 .....	43
2.2.5 Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch iNOS .....	45
2.2.6 Untersuchung der Phagozytoseaktivität.....	46
2.2.7 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf Zellebene.....	50
2.2.8 Beeinflussung des Zytoskeletts .....	51
2.2.9 Statistische Auswertung der Daten .....	52

<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1 Extrakte und Einzelsubstanzen.....</b>	<b>54</b>
3.1.1 Analyse der Extrakte aus <i>Hypericum perforatum</i> mittels HPLC .....	54
3.1.2 Toxizität der Extrakte aus <i>Hypericum perforatum</i> .....	56
3.1.3 Toxizität der Einzelsubstanzen.....	60
<b>3.2 Einfluss von <i>Hypericum</i>-Extrakt und einzelnen Inhaltsstoffen auf die NO-Bildung durch die induzierbare NO Synthase .....</b>	<b>67</b>
3.2.1 Toxizität von LPS, PMA, FMLP und Calcimycin.....	67
3.2.2 Induzierte NO-Bildung durch LPS, fMLP, PMA und Calcimycin.....	74
3.2.3 Zeitlicher Verlauf der Nitrit-Akkumulation und Einfluss verschiedener Konzentrationen der Extrakte 1, 2 und 3 .....	75
3.2.4 Einfluss einzelner Inhaltsstoffe auf die NO-Bildung.....	79
3.2.5 Einfluss der Einzelsubstanz-Mischungen .....	84
<b>3.3 Beeinflussung der Phagozytose .....</b>	<b>86</b>
3.3.1 Absolute Phagozytoseaktivität.....	86
3.3.2 Einfluss von <i>Hypericum</i> -Extrakt auf die Phagozytoseaktivität.....	91
3.3.3 Einfluss der Einzelsubstanzen auf die Phagozytose von Zymosan und <i>S. aureus</i> .....	93
3.3.4 Einfluss der Einzelsubstanz-Mischungen auf die Phagozytose von Zymosan und <i>S. aureus</i> .....	100
3.3.5 Phagozytose von Amyloid $\beta$ 1-40 und Einfluss von <i>Hypericum</i> -Extrakt .....	103
<b>3.4 Zytotoxizität von Amyloid <math>\beta</math>.....</b>	<b>104</b>
3.4.1 Einfluss des <i>Hypericum</i> -Extraktes auf die Zytotoxizität von Amyloid $\beta$ Protein Fragment 25-35 und Fragment 35-25 .....	104
3.4.2 Einfluss der Einzelsubstanzen und Einzelsubstanz-Mischungen auf die Toxizität von Amyloid $\beta$ 25-35 auf die Zelllinie N11 .....	108
3.4.3 Toxizität von Amyloid $\beta$ Protein Fragment 25-35 auf die humane Neuroblastomzelllinie SK-N-SH.....	110
3.4.4 Fluorimetrische Bestimmung der Lebensfähigkeit.....	111

3.5 Einfluss von <i>Hypericum</i> -Extrakt und Einzelsubstanz-Mischungen auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies .....	113
3.6 Beeinflussung des Zytoskeletts durch <i>Hypericum</i> -Extrakt .....	115
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>118</b>
4.1 Inhaltsstoffmuster und Toxizität der <i>Hypericum</i> -Extrakte .....	119
4.2 Hemmung der NO-Bildung .....	122
4.3 Hemmung der Phagozytose .....	127
4.4 Einfluss auf die Bildung von ROS .....	132
4.5 Toxizität von Amyloid $\beta$ .....	135
4.6 Wirksamkeit von <i>Hypericum</i> -Extrakt .....	139
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>142</b>
<b>6 Literatur.....</b>	<b>144</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APP	amyloid precursor protein (Amyloid Vorläuferprotein)
A $\beta$	Amyloid $\beta$
BP	Bandpass
CI	Calcimycin
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Em	Emission
eNOS	epitheliale NO-Synthase
EtOH	Ethanol
Ex	excitation (Anregung)
FACS	fluorescence activated cell sorter
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
fMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FMN	Flavin-Mononukleotid
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
FT	Strahlteiler
g	Fallbeschleunigung ( $g_{\text{Erde}} = 9,81\text{m/s}^2$ )
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Aqua bidestillata
Hc	Hypericin
Hd	Hyperosid
Hf	Hyperforin
HPLC	high performance liquid chromatography
Hyp / Hyp1B	<i>Hypericum</i> -Extrakt 1B
i. A.	im Ansatz

## Abkürzungsverzeichnis

---

IC <sub>50</sub>	Inhibitorische Konzentration (bei 50 % Hemmung)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
kDa	KiloDalton
LP	Langpass
LPS	Lipopolysaccharid
LTS	Lipoteichonsäure
MAO	Monoaminoxidase
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
MPO	Myeloperoxidase
MTT	3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid
NADP	Nicotinamiddinukleotidphosphat
NADPH	Nicotinamiddinukleotidphosphat, protoniert
NED	N-(1-Naphtyl)-ethylendiamin Dihydrochlorid
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
NGF	nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Azetat
PRR	pattern-recognition receptor
Ps	Pseudohypericin
Que	Quercetin
Qui	Quercitrin
RNS	reactive nitrogen species (reaktive Stickstoffspezies)
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur

## Abkürzungsverzeichnis

---

Ru	Rutin
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	sideward scatter (Seitwärtstreulicht)
STAT-1 $\alpha$	signal transducer and activator of transcription-1 $\alpha$
Tab.	Tabelle
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TRITC	Texas Rot Isothiocyanat
ÜN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Mikroglia – Immunzellen des Gehirns

Das zentrale Nervensystem besteht aus Neuronen und Gliazellen. Die Neuronen dienen der Aufnahme, der Weiterleitung und der Verarbeitung von Informationen. Die Gliazellen üben Stütz-, Nähr- und Immunfunktion aus. Sie lassen sich unterteilen in Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia.

Lange Zeit wurde das Gehirn als ein vom Immunsystem abgeschirmtes Organ betrachtet. Diese Ansicht wurde durch das neue Konzept eines endogenen Immunsystems im zentralen Nervensystem (ZNS) ersetzt (Streit 2002). Dieses Immunsystem wird gebildet durch die Mikroglia, welche über das gesamte ZNS verteilt vorliegen und etwa 20 % der Gliazellen darstellen (Banati et al. 1993).

Die wichtige Rolle der Mikroglia bei verschiedenen pathologischen Zuständen wurde als erstes von del Rio Hortega erkannt, welcher auch ihren Namen prägte (del Rio-Hortega 1932).

Die ontogenetische Herkunft der Mikroglia war lange umstritten. Heute geht man davon aus, dass Mikroglia, anders als die restlichen Zellen des ZNS, mesodermalen Ursprungs sind, der mononukleären Phagozyten-Linie entstammen und während der perinatalen Phase das Gehirn infiltrieren (Gebicke-Haerter et al. 1998, Gehrman et al. 1995).

In der frühen Phase der Gehirnentwicklung besitzen Mikroglia die Morphologie von Makrophagen mit relativ großem Zellkörper und kurzen Zellfortsätzen und werden als „amöboide Mikroglia“ bezeichnet. Als ihre Hauptfunktion wird die Phagozytose toter und sterbender Zellen gesehen. Hierzu zählen auch Neuronen, welche in der späten pränatalen bzw. frühen postnatalen Phase natürlich stattfindender Apoptose unterliegen. Während der Entwicklung des Gehirns nehmen die amöboiden Mikroglia immer mehr an Zahl zu und wandeln sich schließlich zu verästelten Mikroglia mit kleinem Zellkörper und langen verzweigten Fortsätzen. Von diesen verästelten Mikroglia wird angenommen, dass sie funktionell inaktiv sind bzw. sich in einem Ruhestadium befinden. Sie werden deshalb auch „ruhende Mikroglia“ genannt (Nakajima und Kohsaka 2001).

Mikroglia sind ein integraler Bestandteil des ZNS. Sie besitzen zwei Aufgaben. Zum einen haben sie eine wichtige Rolle als Gliazellen, mit der Aufgabe Neuronen zu schützen und zu versorgen, zum anderen stellen sie die immunkompetenten Zellen des Gehirns dar (Streit 2002). Mikrogliazellen liegen in einer Population unterschiedlichster Zelltypen, welche sie überwachen und für deren Wohlergehen sie sorgen (Van Rossum und Hanisch 2004).

Um ihre Funktion erfüllen zu können, müssen Mikroglia erkennen, ob eine normale neuronale Funktion gewährleistet ist, oder ob pathologische Abweichungen von der Norm vorhanden sind (Van Rossum und Hanisch 2004). Dies wird gewährleistet durch Kommunikation zwischen Nervenzellen und Mikroglia. Diese dauernde Kommunikation im gesunden, erwachsenen Gehirn ist ein wichtiger Faktor, um die Mikroglia in ihrem Ruhezustand zu halten (Vilhardt 2005).

Des Weiteren fungieren Mikroglia als Promotoren der neuronalen Migration, des Wachstums von Axonen und der abschließenden Ausdifferenzierung von Neuronen mittels Abgabe verschiedener Faktoren und durch Zell-Zell-Kontakte (Vilhardt 2005).

Mikroglia sind die ersten Zellen im Gehirn, die auf Störung bzw. Verletzung reagieren. Sie werden als die primäre Verteidigungslinie des Gehirns betrachtet (Nakajima und Kohsaka 2001).

Aktivierte Mikroglia können eindringende Mikroorganismen zerstören, potentiell schädlichen Debris („Zellabfall“, tote Zellen) entfernen, sowie die Gewebereparatur durch Abgabe von Wachstumsfaktoren fördern und somit die Rückkehr zur Gewebshomöostase vereinfachen (Kreutzberg 1996).

Wenn das Gehirn verletzt oder durch eine Krankheit geschädigt wird, wandeln sich die ruhenden, verästelten Mikroglia zu sogenannten „aktiven Mikroglia“ mit vergrößertem Zellkörper und zurückgezogenen Zellfortsätzen um. Außerdem kommt es zur Proliferation der Mikroglia am betroffenen Ort (Nakajima und Kohsaka 2001).

Die Aktivierung von Mikroglia ist weiterhin durch mehrere funktionelle Veränderungen gekennzeichnet. Zum einen kommt es zur Freisetzung von zytotoxischen, zytotoxischen und inflammatorischen Mediatoren (Banati et al. 1993, Gehrman et al. 1995, Chao et al. 1996, Gebicke-Haerter 2001, Nakajima und Kohsaka 2001).

Hierzu zählen unter anderem:

- **Zytokine**, z. B. IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, TGF- $\beta$ , NGF u.v.a.
- **Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)**
- **Stickstoffmonoxid (NO)**
- **NMDA-Rezeptor Liganden**, z. B. Glutamat, Quinolinsäure
- **Entzündungsmediatoren**, z. B. Prostaglandin E, Histamin
- **Proteasen**, z. B.  $\alpha$ 1-Chymotrypsin, Elastase, Plasminogen-Aktivator, Plasminogen

Zum anderen wandeln sich die Mikroglia zu Phagozyten. Diese sind durch Expression von MHC II zur Antigenpräsentation fähig und können mit Lymphozyten in Kontakt treten (Gebicke-Haerter 2001).

Grundsätzlich ist die Aktivierung von Mikrogliazellen nicht darauf ausgerichtet Zellen zu zerstören, sondern Zellen, die durch andere Einflüsse bereits geschädigt wurden, zu entfernen und damit dem gesunden Gewebe regenerative Impulse zu geben.

Wenn gegenläufige Prozesse jedoch nicht in angemessener Weise in Gang gesetzt werden, kann es zur Überaktivierung der Mikroglia kommen, welche zu einer chronischen Krankheitssituation führen kann. Mikroglia werden somit durch ihr zellzerstörenderisches Potential auf längere Sicht zu einer wesentlichen Komponente chronisch-degenerativer Erkrankungen (Gebicke-Haerter et al. 1998).

## 1.2 Die Rolle der Mikroglia bei der Pathogenese von Alzheimer

Alzheimer ist die häufigste neurodegenerative Funktionsstörung weltweit. Allein in den USA sind zur Zeit etwa 4,5 Millionen Menschen an Alzheimer erkrankt (Bossy-Wetzel et al. 2004). In Deutschland geht man von etwa 1,2 Millionen Betroffenen im Jahr 2004 aus (Alzheimer Forschung Initiative e. V. 2004).

Die klinischen Symptome der Alzheimer-Krankheit werden durch einen fortschreitenden Verlust von Neuronen des Hippocampus und des Cerebralen Cortex hervorgerufen. Die Gehirne von Individuen mit Alzheimer offenbaren zwei charakteristische Läsionen:

Einerseits finden sich intrazelluläre neurofibrilläre Bündel aus hyperphosphoryliertem Protein Tau, welche zu Störungen von Stabilisierungs- und Transportprozessen der Zellen führen. Andererseits kommt es zur Bildung von extrazellulären Amyloid-Plaques. Diese Amyloid-Plaques bestehen aus Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ), einem kleinen Spaltprodukt des Amyloid Vorläuferproteins (APP) (Bossy-Wetzel et al. 2004). Das Amyloid Vorläuferprotein wird in Nervenzellen und vielen anderen Geweben des Körpers exprimiert. Die lösliche Form des APPs scheint als autokriner, neuroprotektiver und eventuell neuritotropher Faktor zu wirken. Für die Form des APPs, welches in die Plasmamembran eingelagert wird, wird eine Funktion bei der Zell-Zell-Interaktion vermutet (Selkoe 2001).

Es ist bekannt, dass Mikroglia eine Schlüsselrolle in der Vermittlung inflammatorischer Prozesse des ZNS spielen (Nakamura 2002). Aktivierung von Mikroglia ist eines der Kennzeichen für inflammatorische Krankheiten des ZNS, wie beispielsweise Multiple Sklerose, Parkinson, HIV vermittelte Demenz oder Alzheimer (Gebicke-Haerter 2001).

Bei Alzheimer finden sich aktivierte Mikroglia in großen Mengen in nächster Nähe der Amyloid-Plaques. Die Mikrogliazellen können  $A\beta$  über verschiedene Rezeptoren erkennen und phagozytieren.  $A\beta$  aktiviert die Mikroglia potentiell neurotoxische Substanzen wie ROS, NO, proinflammatorische Zytokine und andere inflammatorische Mediatoren zu produzieren (Streit 2004). In den Amyloid-Plaques findet man außerdem die Komplementsystem-Komponente C1q kolokalisiert mit dem fibrillären  $A\beta$ . C1q moduliert die Phagozytoseaktivität von Mikrogliazellen. Es wird

vermutet, dass die durch A $\beta$  hervorgerufene Entzündungsreaktion einen wichtigen Vermittler für die Schädigung der Neuronen bzw. Neurite darstellt (Selkoe 2001).

Über die genaue Rolle der Mikroglia im Pathomechanismus der Entstehung von Alzheimer gibt es zwei unterschiedliche Theorien:

Nach der sogenannten „Amyloid Kaskaden - Neuroinflammations - Hypothese“ (amyloid cascade/neuroinflammation hypothesis) aktiviert A $\beta$  Mikroglia-Zellen, welche daraufhin neurotoxische Substanzen wie ROS, NO, proinflammatorische Zytokine, Komplementfaktoren und andere inflammatorisch wirkende Mediatoren bilden, die zu neurodegenerativen Schäden führen (Streit 2004).

Die „Hypothese der mikroglialen Dysfunktion“ (microglial dysfunction hypothesis) geht davon aus, dass die normale neuronale Funktion stark abhängig von der mikroglialen Unterstützung ist. Bedingt durch Alterungsprozesse, aber auch durch genetische und epigenetische Faktoren, kommt es mit der Zeit zur Dysfunktion der Mikroglia. Diese äußert sich in einem verringerten Abbau des A $\beta$  Proteins, einer verringerten trophischen Unterstützung der Neuronen und einer zunehmenden Produktion von Neurotoxinen. Die daraus folgende neuronale Dysfunktion wird begleitet von A $\beta$  Überproduktion, welche, zusammen mit dem verringerten Abbau durch die Mikroglia, zur Bildung der Amyloid-Plaques führt. Die Bildung der Plaques und der Fibrillen geschieht hiernach unabhängig voneinander. Die chronische neuronale Dysfunktion führt zu neurodegenerativen Erscheinungen, wie Verlust von Synapsen und Bildung der typischen neurofibrillären Bündel, welche letztendlich Ursache der Alzheimer Demenz darstellen (Streit 2004).

### 1.3 Pathogenerkennung durch Phagozyten

Unter Phagozytose versteht man die aktive Aufnahme unbelebter oder belebter Partikel in das Innere einer Zelle zwecks Nahrungsaufnahme (z. B. bei Amöben, Pantoffeltierchen usw.) oder zur Eliminierung von Fremdelementen, v. a. als Mechanismus der unspezifischen Infektionsabwehr durch Phagozyten. Ein Phagozyt ist eine »Fresszelle« mit der Fähigkeit, unbelebte oder belebte Fremdpartikel (Mikroorganismen, Blutzellen, Gewebstrümmer etc.) aufzunehmen und zu verdauen. Hierzu zählen vor allem die Zellen des Immunsystems wie Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und Mikroglia.

Wenn Krankheitserreger eine Epithelbarriere überwinden, werden sie sofort von Phagozyten erkannt. Anschließend werden durch die unmittelbare, angeborene Immunantwort, mittels Gewebsmakrophagen, neutrophiler Granulozyten, antimikrobieller Peptide und des Komplementsystems, die eingedrungenen Mikroorganismen bekämpft (Aderem und Underhill 1999).

Die frühe, unmittelbare, angeborene Pathogenerkennung erfolgt dabei durch keimbahnkodierte Rezeptoren. Ein wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunität besteht darin bestimmte, in der Evolution hoch konservierte, Strukturen zu erkennen. Zu diesen Motiven, auch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) genannt, zählen unter anderem:

- Peptidoglykane (Murein der Bakterien)
- Lipopolysaccharide (LPS) (gramnegative Bakterien)
- Lipoteichonsäuren (LTS) (grampositive Bakterien)
- Mannane (Hefezellwand)
- bakterielle DNA

Diese chemisch sehr unterschiedlichen Strukturen haben mehrere Gemeinsamkeiten (Medzhitov und Janeway 2000 a):

- Sie werden von Mikroorganismen, jedoch nicht vom Wirt selbst gebildet.
- Sie sind essentiell für die Pathogenität oder das Überleben des Mikroorganismus.
- Sie kommen in einer Vielzahl von Pathogenen vor.

Die Rezeptoren der angeborenen Immunität, sogenannte mustererkennende Rezeptoren (pattern-recognition receptors, PRRs), werden auf verschiedenen Antigen präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Mikroglia exprimiert. Sie können in drei Klassen unterteilt werden: sezernierte, endozytierende und signaltransferierende Rezeptoren (Medzhitov und Janeway 2000 b).

Sezernierte PRRs fungieren als Opsonine, indem sie an mikrobielle Zellwände binden und diese zur Erkennung durch Phagozyten oder das Komplementsystem kennzeichnen. Der am Besten charakterisierte Rezeptor dieser Gruppe ist das Mannan-bindende Lektin, welches an mikrobielle Kohlenhydrate bindet und den Lektin-Weg der Komplementaktivierung einleitet. Er kann an Kohlenhydrate von gramnegativen und grampositiven Bakterien, Hefezellwänden und auch einiger Viren und Parasiten binden (Medzhitov und Janeway 2000 b).

Endozytierende PRRs kommen auf der Oberfläche von Phagozyten vor. Nach der Erkennung bestimmter mikrobieller Strukturen kommt es zur Aufnahme und Zerstörung der Pathogene in Phagolysosomen. Die vom Pathogen stammenden Proteine können nun verarbeitet und auf MHC-Molekülen der Phagozytenoberfläche präsentiert werden (Medzhitov und Janeway 2000 b). Der Mannose-Rezeptor ist ein solcher endozytierender PRR. Er erkennt spezifisch Kohlenhydrate mit einem hohen Anteil an Mannose, wie sie typisch für Mikroorganismen sind (Fraser et al. 1998).

Ein weiterer endozytierender PRR ist der Makrophagen-Scavenger-Rezeptor. Dieser Rezeptor erkennt unter anderem bakterielle Zellwandkomponenten wie LPS und LTS (Husemann et al. 2002). Über Scavenger-Rezeptoren erfolgt auch die Erkennung von Amyloid  $\beta$  durch Mikroglia im Gehirn (El Khoury et al. 1998, Husemann et al. 2002).

Bei signaltransferierenden Rezeptoren kommt es nach Erkennen von PAMPs zur Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade, welche die Information der Pathogenerkennung ins Innere der Zelle weiterleitet und die Expression verschiedener Gene der Immunantwort induziert, z. B. für inflammatorische Zytokine. Zu dieser Art zählen die Rezeptoren der sog. *Toll*-Familie (Medzhitov und Janeway 2000 b).

Ein anderer Mechanismus der Pathogenerkennung läuft über die humorale Immunität. Die von Plasmazellen gebildeten Antikörper erkennen spezifisch ihre Antigene und binden daran. Es kommt zur Opsonisierung des Pathogens, d. h. es wird als Fremdkörper markiert. Der konstante sogenannte Fc-Teil des an das Antigen gebundenen Antikörpers wird wiederum durch den Fc-Rezeptor der Phagozyten erkannt (Aderem und Underhill 1999).

### **Beteiligung des Zytoskeletts an der Phagozytose**

Phagozytose ist ein Aktin-abhängiger Prozess und eng mit dem Zytoskelett verknüpft. Die Partikelaufnahme wird initiiert durch die Interaktion spezifischer Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Phagozyten (siehe oben) mit Liganden auf der Oberfläche der Partikel. Dies führt zur Polymerisation von Aktin an der Stelle der Ingestion und zur Aufnahme des Partikels mittels eines auf Aktin basierenden Mechanismus.

Während der Phagozytose kommt es oft zum Abrunden der Zellen. Hierbei wird die Umverteilung von Zytoskelett- und Membranbestandteilen sichtbar, welche für Phagozytose sowie für Zelladhäsion zuständig sind (Aderem und Underhill 1999).

## 1.4 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Phagozyten

Die Erkennung von Pathogenen führt zu deren Phagozytose und Abtötung innerhalb des Phagozyten. Das gebundene Pathogen wird von der Membran des Phagozyten umhüllt, wodurch sich ein Vesikel, das sogenannten Phagosom, bildet. Dieses Vesikel wird anschließend angesäuert. Die Phagozyten besitzen des Weiteren Lysosomen, welche antimikrobiell wirksame Enzyme und andere Proteine enthalten. Das Phagosom verschmilzt mit einem oder mehreren der Lysosomen zu einem Phagolysosom, in welchem dann der Inhalt der Lysosomen freigesetzt wird und die Krankheitserreger abgetötet werden (Janeway et al. 2002).

Neben inflammatorischen Zytokinen, welche zur Anlockung und Aktivierung anderer Immunzellen dienen, erzeugen Makrophagen und neutrophile Granulozyten (Janeway et al. 2002), sowie Mikroglia (Banati et al. 1993) noch eine Reihe weiterer toxischer Produkte, die direkt beim Abtöten des aufgenommenen Mikroorganismus mitwirken. Hierzu zählen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid  $O_2^{\cdot-}$ , Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$  und das Hydroxyl-Radikal  $OH^{\cdot}$ , sowie reaktive Stickstoffspezies (RNS), wie Stickstoffmonoxid NO und Peroxynitrit  $ONOO^-$  (Babior 2000). Diese Verbindungen werden während eines Vorgangs gebildet, welcher als „respiratory burst“ bezeichnet wird, da während dieser Zeit der Sauerstoffverbrauch der Zellen vorübergehend zunimmt (Janeway et al. 2002).

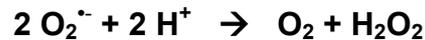
Die Generierung dieser Oxidantien erfolgt durch verschiedene Enzyme (Halliwell 1999, Babior 2000):

Die membrangebundene NADPH-Oxidase katalysiert die Bildung von Superoxid aus Sauerstoff und NADPH:



Das Enzym ist in ruhenden Phagozyten inaktiv. Durch verschiedene Stimuli, z. B. Bakterien, kommt es zum Zusammenbau der Untereinheiten und zur Bildung des aktiven Enzyms an der Plasmamembran und an der Membran der Phagosomen. Hierdurch kommt es zur Abgabe von  $O_2^{\cdot-}$  in die extrazelluläre Umgebung und ins Innere der Phagosomen (Kobayashi et al. 1998).

Superoxiddismutase katalysiert die Dismutation von Superoxid zu Wasserstoffperoxid:



Die Dismutation von Superoxid geschieht auch ohne enzymatische Katalysation. Durch die Superoxiddismutase wird diese Reaktion jedoch 10000-fach beschleunigt.

Die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid aus Arginin, Sauerstoff und NADPH:



Auf dieses Enzym wird in Kapitel 1.5 genauer eingegangen.

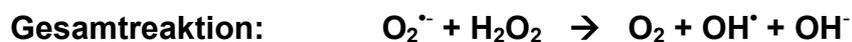
Die Myeloperoxidase katalysiert die Oxidation von Halogeniden ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ) zu hypohalogenigen Säuren in der Gegenwart von Wasserstoffperoxid (Hampton et al. 1998):



Das für diese Reaktion benötigte  $\text{H}_2\text{O}_2$  stammt aus der Dismutation von  $\text{O}_2^{\cdot -}$ . Das am häufigsten gebildete Produkt ist aufgrund der hohen Chlorid-Konzentration der Körperflüssigkeiten die hypochlorige Säure HOCl. Sie stellt ein stark wirksames Mikrobizid dar.

Durch enzymatische Reaktionen entstehen somit  $\text{O}_2^{\cdot -}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , NO und HOCl. Weitere Oxidantien werden durch nicht-enzymatische Reaktionen der oben aufgeführten Produkte gebildet.

Über die Übergangsmetall-katalysierte „Haber-Weiss-Reaktion“ wird das hochreaktive Hydroxyl-Radikal  $\text{OH}^{\cdot}$  generiert (Halliwell und Gutteridge 1999):



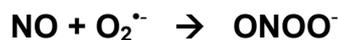
Hypochlorige Säure kann an schwefelsäurehaltige Amine, wie das Taurin, binden. Es kommt zur Entstehung von Chloraminsäuren, welche relativ langlebige und selektive Bakterizide darstellen (Elstner 1990).



Durch die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit einem Hypohalogenit kommt es zur Bildung von Singulett-Sauerstoff (Steinbeck et al. 1992):



Die Reaktion des durch die NO-Synthase gebildeten NO mit Superoxid führt zur Bildung von Peroxynitrit (Pryor und Squadrito 1995):



Die Generierung all dieser Substanzen soll eigentlich der Abtötung eingedrungener Mikroorganismen dienen. Die reaktiven Oxidantien können aber auch umgebendes Gewebe schädigen (Babior 2000) und somit Nebeneffekte wie Entzündung, Ödeme und Schmerzen hervorrufen (Elstner 1990). Sie werden als wichtige Faktoren bei der Pathogenese verschiedener Krankheiten gesehen. Hierzu zählen unter anderem rheumatoide Arthritis, Atherosklerose, zystische Fibrose, Reperfusionsschäden, akute respiratorische Insuffizienz, sowie auch die Karzinogenese (Halliwell und Gutteridge 1999, Babior 2000).

Die Bildung von ROS und RNS stellt die Ursache für oxidativen Stress im ZNS dar (Emerit et al. 2004). Die Bildung dieser Substanzen erfolgt zu einem großen Anteil durch aktivierte Mikroglia. Gleichzeitig sind aktivierte Mikroglia ein Kennzeichen vieler neurodegenerativer Krankheiten. Es wird angenommen, dass die von ihnen gebildeten ROS und RNS maßgeblich an der Pathogenese dieser neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sind (Boje und Arora 1992, Chao et al. 1996).

## 1.5 NO-Synthasen und NO als Signalmolekül

In den siebziger Jahren wurden Bilanzierungsstudien durchgeführt, welche ergaben, dass der Mensch mehr Nitrit und Nitrat ausscheidet, als er zu sich nimmt. Für die Mehrproduktion wurde damals allerdings die Darmflora verantwortlich gemacht. 1981 musste diese Vorstellung jedoch revidiert werden, da eine Forschergruppe zeigte, dass auch keimfrei gezogene Ratten, die keine Darmflora hatten, ebenfalls mehr Nitrat ausschieden, als ihnen zugeführt wurde (Green et al. 1981).

Daraufhin begannen viele Forschergruppen die Suche nach endogenen Systemen, welche Stickstoff zu Nitrit und Nitrat oxidieren können. In den achtziger Jahren fanden mehrere Forschergruppen, unabhängig und relativ gleichzeitig, in drei Zelltypen Nitrat- bzw. Nitritquellen.

1985 fand eine Gruppe, dass Makrophagen nach Behandlung mit Lipopolysaccharid aus Bakterien Nitrat und Nitrit bilden (Stuehr und Marletta 1985). Zwei Jahre später konnte NO als primäres Syntheseprodukt dieser Zellen nachgewiesen werden. Als Stickstoffquelle für die NO-Synthase wurde einer der Guanidinostickstoffe von L-Arginin identifiziert (Hibbs et al. 1987).

Unabhängig davon entdeckte eine andere Gruppe Anfang der achtziger Jahre, dass aus dem Endothel von Blutgefäßen eine gefäßerweiternde Substanz ausgeschüttet wird (Furchgott et al. 1984). Diese Substanz wurde als „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet und konnte 1987 von einer englischen Gruppe als NO identifiziert werden (Palmer et al. 1987). Analog zum Makrophagensystem wurde die Aminosäure L-Arginin als Substrat der NO-Synthase in Endothelzellen identifiziert.

Wiederum unabhängig davon wurde 1982 entdeckt, dass für die Bildung des zyklischen Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) im Gehirn L-Arginin benötigt wird (Deguchi und Yoshioka 1982). Die Erklärung dafür lieferte später die Entdeckung, dass Nervenzellen im Gehirn aus L-Arginin NO produzieren.

Die Bedeutung von NO als biologischer Vermittler wurde 1998 durch einen Nobelpreis anerkannt. Furchgott, Ignarro und Murad erhielten den Preis für ihre Arbeiten, die zur Entdeckung von NO als biologisches Signalmolekül in Säugetierzellen führten (Alderton et al. 2001).

Bei Säugetieren sind heute drei gut charakterisierte Isoformen der NO-Synthasen bekannt. Die neuronale NOS (nNOS bzw. NOS1) mit 160 kDa, die induzierbare NOS (iNOS bzw. NOS2) mit 130 kDa und die endotheliale NOS (eNOS oder NOS3) mit

133 kDa. Die Namen sagen entweder etwas über ihre Charakteristik bzw. über das Gewebe aus, in welchem sie ursprünglich als erstes nachgewiesen wurden. Mittlerweile ist aber bekannt, dass die drei Isoformen in unterschiedlichsten Geweben und Zellen exprimiert werden (Stuehr 1999, Titheradge 1999, Kleinert et al. 2003). Die drei Isoformen weisen die gleiche genetische Struktur auf und besitzen fast identische katalytische Mechanismen. Alle benötigen eine Reihe von Cofaktoren und prosthetischen Gruppen für ihre Aktivität, nämlich FAD, FMN, Häm, Calmodulin und Tetrahydrobiopterin.

Für die katalytische Aktivität werden drei verschiedene Domänen benötigt (Abb. 1):

- die Reduktase Domäne
- die Calmodulin-bindende Domäne
- die Oxygenase Domäne

Die Reduktase Domäne beinhaltet die Bindestellen für FMN, FAD und NADPH. Diese Domäne transferiert Elektronen vom NADPH zur Oxygenase Domäne. Die Oxygenase Domäne beinhaltet die Bindestellen für Häm, Tetrahydrobiopterin und Arginin. Sie katalysiert die Umsetzung von Arginin unter Verbrauch von O<sub>2</sub> zu Citrullin und NO.

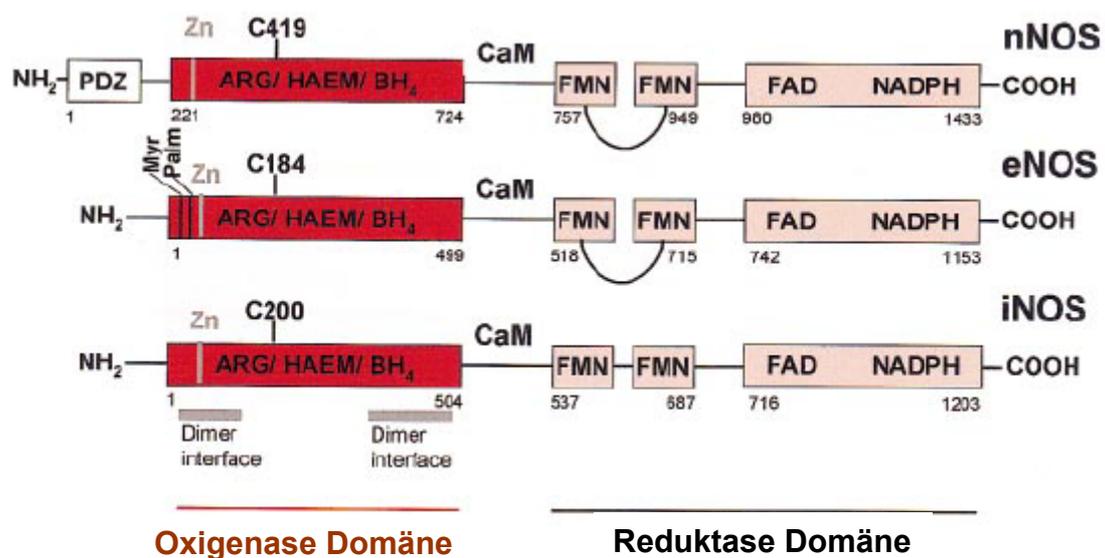


Abb. 1: Domänenstruktur der nNOS, eNOS und iNOS (aus Alderton et al. 2001).

Die Calmodulin Bindestelle wird für die Aktivität aller NOS-Isoformen benötigt. Calmodulin dient normalerweise als Sensor für die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und reagiert auf erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Im Falle der NO-Synthasen sorgt Calmodulin für die Bildung von Homodimeren. Diese dimere Form wird für die Aktivität und somit zur NO-Bildung benötigt. Die Funktion des Calmodulins unterscheidet sich jedoch bei den verschiedenen Isoformen der NOS ein wenig (Alderton et al. 2001, Stuehr 1999).

NO-Synthasen katalysieren die Bildung von NO und L-Citrullin aus L-Arginin,  $\text{O}_2$  sowie aus NADPH stammenden Elektronen (Abb. 2). Als Zwischenstufe tritt hierbei Hydroxyl-L-Arginin auf (Stuehr 1999, Grooves und Wang 2000).

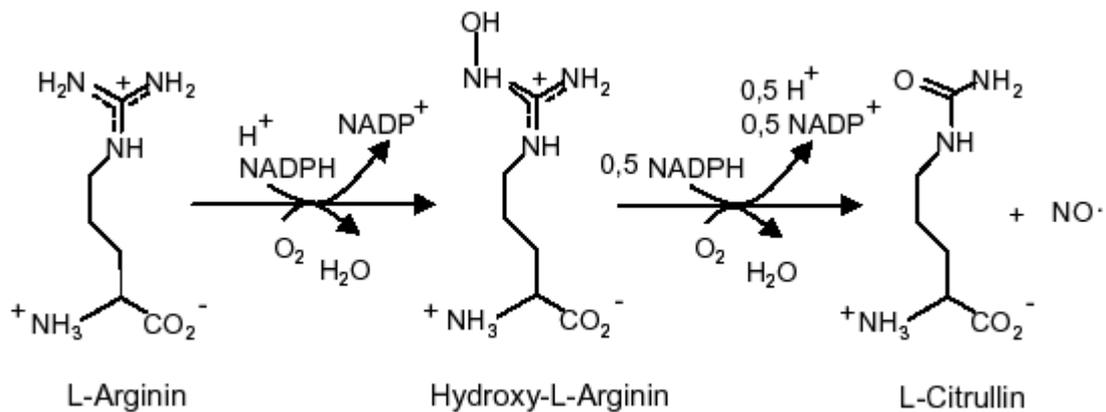


Abb. 2: Biosynthese von Stickstoffmonoxid (Groves und Wang 2000).

Die NO-Synthasen können die Umwandlung von Arginin in Citrullin nur im aktiven dimeren Zustand katalysieren. Dabei bindet die Oxygenase Domäne eines Monomers an die Reduktase Domäne des anderen Monomers, vermittelt durch Calmodulin. Die Elektronen werden dann in Form einer Elektronentransportkette von der Reduktase Domäne des einen Monomers zur Oxygenase Domäne des anderen Monomers übertragen (Abb. 3). Dabei werden die Elektronen von der Elektronenquelle NADPH über FAD und FMN zur Oxygenase Domäne transferiert, wo dann über Häm mit Hilfe von Tetrahydrobiopterin L-Arginin in L-Citrullin umgesetzt wird (Alderton et al. 2001, Stuehr 1999).

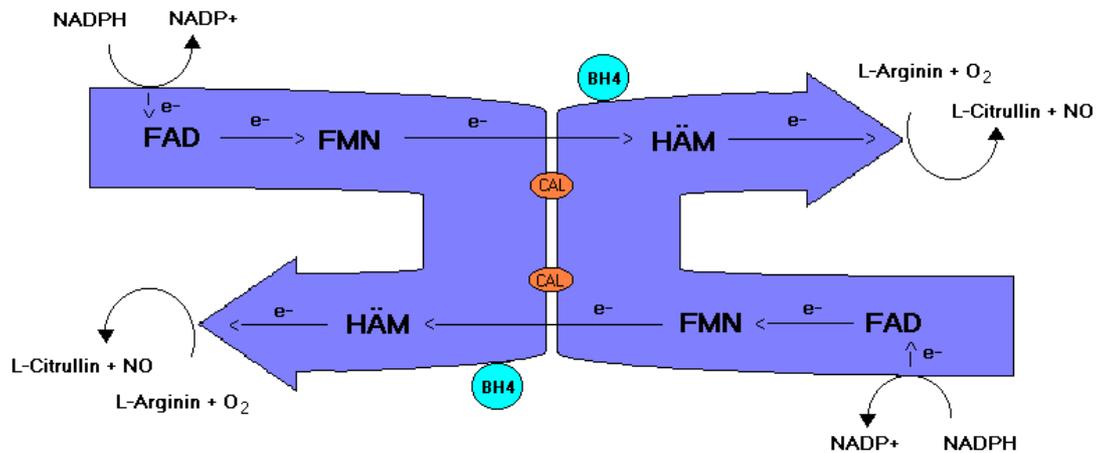


Abb. 3: NO-Synthase im dimeren, funktionsfähigen Zustand.

Calmodulin (CAL) vermittelt die Bildung eines Homodimers, wodurch es zur Ausbildung der Elektronentransportkette kommen kann. BH4 = Tetrahydrobiopterin

### Neuronale NO-Synthase (nNOS)

nNOS wird in den Nervenzellen des zentralen und peripheren Nervensystems und des Skelettmuskels exprimiert (Michel und Feron 1997).

Im Gehirn fungiert NO als Neuromodulator, welcher Funktionen wie Verhalten und Gedächtnis beeinflusst (Dawson und Dawson 1996). Im peripheren Nervensystem dient NO als Neurotransmitter. Es beeinflusst unter anderem die Kontraktion der glatten Muskulatur, die Motilität des Gastrointestinaltraktes und besitzt neuroendokrine Funktion. Im Skelettmuskel fungiert NO als Signalmolekül, welches den Muskelmetabolismus erhöht und die Kontraktilität erniedrigt (Christophersen und Bredt 1997).

Die nNOS wird konstitutiv gebildet, ihre Expression kann aber durch bestimmte physiologische und pathophysiologische Faktoren beeinflusst werden. Die Funktionen, welche der nNOS zugeschrieben werden, erfordern eine schnelle, an einem bestimmten Ort lokalisierte und zeitlich begrenzte NO Produktion. Die Regulation erfolgt in erster Linie durch die obligate Bindung des Calmodulins, welche nur durch vorübergehende Erhöhung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels erfolgt. Die

nNOS generiert in Folge eines entsprechenden Reizes einen kurzen NO Burst. Die physiologische Konzentration des hierbei gebildeten NOs liegt im picomolaren Bereich (Änggard 1994).

Fehler in der Regulation der nNOS werden für eine Anzahl an neurologischen Krankheiten, wie z. B. Huntington und Parkinson, verantwortlich gemacht (Christophersen und Bredt 1997).

### **Endotheliale NO-Synthase (eNOS)**

Zu den Zellen, die eNOS exprimieren, zählen unter anderem vaskuläre endotheliale Zellen und Kardiomyozyten (Michel und Feron 1997).

In den Blutgefäßen dient das gebildete NO als Vasodilator, indem es auf die glatte Muskulatur der Blutgefäße wirkt und somit Blutdruck und Blutfluss reguliert. Das in das Lumen der Blutgefäße abgegebene NO wirkt hemmend auf die Thrombozyten-Aggregation und die Leukozytenadhäsion (Li und Förstermann 2000).

Die eNOS wird konstitutiv exprimiert und durch vorübergehende Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels aktiviert, kann aber ebenfalls, wie die nNOS, durch bestimmte physiologische und pathophysiologische Faktoren beeinflusst werden (Stuehr 1999). Die eNOS produziert, wie die nNOS, einen relativ kurzen NO Burst. Die physiologische Konzentration des gebildeten NO liegt im picomolaren Bereich (Änggard 1994).

Die eNOS besitzt an ihrem N-terminalen Ende je eine Myristinylierungs- und eine Palmitoylierungsstelle, d. h. Modifikationsstellen für Myristin- und Palmitinsäure, zwei Fettsäuren, welche zur Bindung der eNOS an Membranen dienen (Alderton et al. 2001).

Im kardiovaskulären System hat die eNOS allgemein einen protektiven Effekt. Bei Entzündungen bzw. Atherosklerose verhindern niedrige Konzentrationen an NO den apoptotischen Tod der endothelialen Zellen und bewahren die Integrität des endothelialen Zellmonolayers. Eine gestörte NO Bildung durch die eNOS wird mit Funktionsstörungen wie Bluthochdruck, erhöhtem Cholesterinspiegel, Diabetes und Herzfehlern in Verbindung gebracht (Li und Förstermann 2000).

### **Induzierbare NO-Synthase (iNOS)**

Die iNOS wurde als erstes in Makrophagen entdeckt, man findet sie jedoch auch in anderen Zellen des Immunsystems wie Granulozyten und Mikroglia. Mittlerweile wurde festgestellt, dass iNOS in sehr vielen Zelltypen induzierbar ist (Michel und Feron 1997).

Die Expression der iNOS wird induziert als Antwort auf Stimuli wie infektiöse Agenzien und Pathogene, Endotoxin und proinflammatorische Zytokine (Kleinert et al. 2003). NO dient als Effektormolekül, welches bestimmte Zielzellen (auch Bakterien) abtötet oder zumindest inaktiviert. Dies geschieht durch eine Anzahl hochreaktiver Stickstoff-Intermediate. Das durch die NADPH-Oxidase produzierte Superoxid reagiert mit NO zu Peroxynitrit und anderen toxischen Produkten. Diese reaktiven Intermediate führen unter anderem zu DNA Desaminierungen und Strangbrüchen. Die reaktiven Stickstoff-Intermediate verursachen außerdem Proteinmodifikationen wie Nitrosylierung von Cystein- und Tyrosinresten, sowie die Inaktivierung von metallhaltigen Enzymen. Dies führt wiederum zu zytostatischen oder zytotoxischen Effekten gegenüber eindringenden Pathogenen. Ein zytotoxischer Effekt wurde auch gegenüber Tumorzellen festgestellt. Der Tod geschieht durch einen apoptotischen Mechanismus, wobei der genaue, zum Zelltod führende, Signalweg noch nicht ganz verstanden ist (Fang 1997, Nathan 1997).

Die iNOS unterscheidet sich in ihrer Regulierung ein wenig von den beiden anderen NO-Synthasen. Das iNOS Gen steht unter transkriptioneller Kontrolle, d. h. die iNOS wird nicht konstitutiv exprimiert, sondern die Expression wird induziert. Außerdem wird die Aktivität noch durch andere Kontrollmechanismen beeinflusst, die auf mRNA Stabilität, Translation und Degradierung des Proteins einwirken, sowie durch die Verfügbarkeit von Substrat und Cofaktoren. Die iNOS unterscheidet sich weiterhin dadurch, dass sie Calmodulin schon bei sehr geringen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bindet und somit als aktives Dimer vorliegt. Sie ist also nicht von einer Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels abhängig. Somit ist ihr es im Gegensatz zu den beiden anderen Isoformen möglich, für einen hohen Output und eine langanhaltende Freisetzung von NO zu sorgen (Stuehr 1999).

Die iNOS produziert physiologische Konzentrationen von NO im nanomolaren Bereich (Änggard 1994).

Die Überproduktion von NO durch die iNOS steht im Zusammenhang mit einer Reihe von Symptomen und Krankheiten. Wird die iNOS in der falschen Zelle zur falschen

Zeit aktiviert, so kann das entstehende NO proinflammatorisch, zytotoxisch und proapoptotisch wirken. Beispielsweise wird der septische Schock durch eine Überaktivierung der Makrophagen durch eine Bakterieninfektion im Blut ausgelöst (Titheradge 1999). Die dabei entstehende Überproduktion von NO führt zu einem extremen Abfall des Blutdrucks und nachfolgenden Funktionsstörungen mehrerer Organe. Außerdem wirkt am falschen Ort produziertes NO proinflammatorisch und führt zu Entzündungsprozessen. Hierdurch können wiederum Autoimmungeschehen wie z. B. Juveniler Diabetes, Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Asthma usw. entstehen (Nathan 1997, Moncada 1999).

## 1.6 Johanniskraut und Depression

Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) (Abb. 4) gehört zu den ältesten Arzneipflanzen Europas und war schon den Ärzten der Antike und des Mittelalters bekannt. In vielen alten Kräuterbüchern findet man die Bezeichnung „Fuga daemonum“, woran sein früherer Stellenwert als wichtiges Mittel gegen Teufel und Dämonen erkennbar ist (Czygan 1993). Aber auch wundheilende, diuretische und gegen Malaria wirkende Eigenschaften wurden dem Johanniskraut zugesprochen (Fuchs Kräuterbuch von 1543).



Abb. 4: Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.)

Die officinale Droge - *Hyperici herba* - besteht aus den während der Blütezeit geernteten und getrockneten oberirdischen Pflanzenteilen (Kaul 2000, Schneider und Hiller 1999).

In der offiziellen, 1984 von der Kommission E veröffentlichten, Monographie (Bundesanzeiger Nr. 228, 1984) von *Hyperici herba* werden als innerliches Anwendungsgebiet psychovegetative Störungen, depressive Verstimmungszustände, Angst und nervöse Unruhe angegeben, außerdem ölige *Hypericum*-Zubereitungen bei dyspeptischen Beschwerden.

Äußerlich dienen ölige *Hypericum*-Zubereitungen zur Behandlung und Nachbehandlung von scharfen und stumpfen Verletzungen, Myalgien und Verbrennungen 1. Grades.

Heutzutage nimmt Johanniskraut in der Therapie leichter bis mittelschwerer endogener Depressionen einen festen Platz ein. Weitere Anwendungsgebiete sind reaktive Depression, Angstzustände, Erschöpfungsdepression, Depressionszustände im Klimakterium und Depressionen mit psychovegetativen Begleiterscheinungen wie Herzschmerzen, Schlafstörungen, Schweißausbrüchen, Kopfschmerzen, Oberbauchbeschwerden und Abgeschlagenheit (Kaul 2000).

Das Inhaltsstoffmuster des Johanniskrauts wurde in den vergangenen Jahren intensiv analysiert. Zu seinen charakteristischen Inhaltsstoffen gehören die Naphthodianthrone Pseudohypericin und Hypericin. Das Inhaltsstoffspektrum umfasst weiterhin Flavonoide mit den Hauptkomponenten Rutin, Hyperosid, Isoquercitrin, Quercitrin und Quercetin, sowie die Biflavone I3,II8-Biapigenin und Amentoflavon. Des Weiteren zu finden sind die Phloroglucinverbindungen Hyperforin und Adhyperforin. Johanniskraut enthält außerdem Xanthonderivate, Catechingerbstoffe, Proanthocyanidine, Phenolsäuren wie Chlorogen- und Kaffeesäure, sowie ätherisches Öl. Weiterhin konnten Anthrachinone und Blütenfarbstoffe nachgewiesen werden (Kaul 2000, Butterweck 2003, Nahrstedt und Butterweck 1997). Bislang wurden mehr als 150 Inhaltsstoffe identifiziert (Saller et al. 2003). Eine Übersicht über die wichtigsten, pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffe findet sich in Abb. 5.

Die biochemische Grundlage für depressive Störungen wird in einer Verminderung der Katecholamin-Neurotransmitter Noradrenalin, Serotonin und Dopamin (Forth et al. 2001) und/oder einem Mangel an  $\beta$ -Endorphinen wie Methionin- und Leucin-Enkephalinen gesehen (Tejedor-Real et al. 1995, Darko et al. 1992). Die Behandlung depressiver Erkrankungen erfolgt mit Medikamenten, welche in den Neurotransmitter-Stoffwechsel eingreifen. Trizyklische und nicht-trizyklische Antidepressiva verursachen primär eine Hemmung der neuronalen Wiederaufnahme der Monoamine Noradrenalin und/oder Serotonin (Forth et al. 2001). Die Hemmung der Wiederaufnahme führt zu einer erhöhten Aktivität dieser Transmitter an den Synapsen (Richelson 1996). Monoaminoxidase-Hemmer (MAO-Inhibitoren) verhindern den Abbau der biogenen Amine durch die MAO. Wenn Noradrenalin und Serotonin in den Axonendigungen nicht mehr abgebaut werden, steigt der Gehalt in den Speichervesikeln und damit die Freisetzung in den synaptischen Spalt (Forth et al. 2001).

# Einleitung

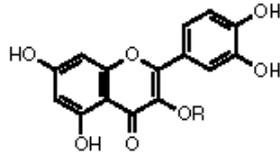
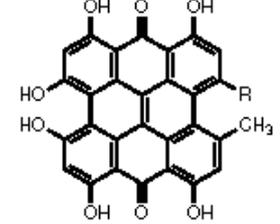
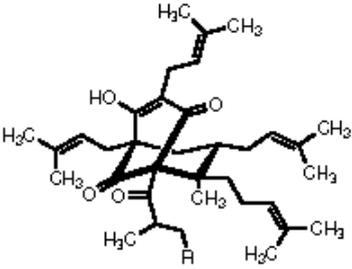
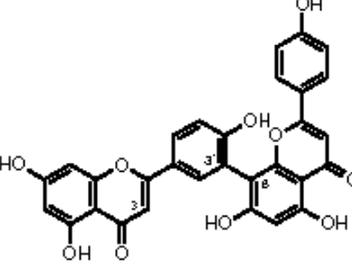
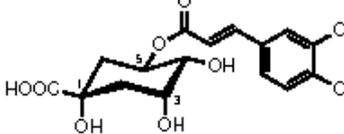
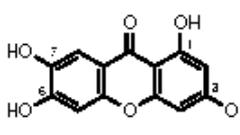
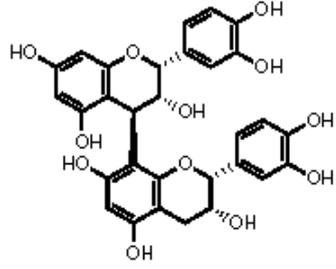
Substanzgruppe	Chemische Struktur	Substanzname	ungef. Gehalt im Pflanzenextrakt [%]
Flavonoide		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. R = H                    Quercetin</li> <li>2. R = <math>\alpha</math>-L-rhamnosyl    Quercitrin</li> <li>3. R = <math>\beta</math>-D-glucosyl     Isoquercitrin</li> <li>4. R = <math>\beta</math>-D-galactosyl    Hyperosid</li> <li>5. R = <math>\beta</math>-D-rutinosyl     Rutin</li> <li>6. R = <math>\alpha</math>-D-glucuronyl    Miquelianin</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0,2 – 0,6</li> <li>2. 0,2 – 0,4</li> <li>3. 0,5 – 0,8</li> <li>4. 2 – 4</li> <li>5. 2 – 3</li> <li>6. 0,4 – 0,5</li> </ol>
Naphthodianthrone		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. R = CH<sub>3</sub>                Hypericin</li> <li>2. R = CH<sub>2</sub>OH            Pseudohypericin</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0,08 – 0,20</li> <li>2. 0,15 – 0,40</li> </ol>
Phloroglucinole		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. R = H                    Hyperforin</li> <li>2. R = CH<sub>3</sub>                Adhyperforin</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0,9 – 5</li> </ol>
Biflavone		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 13', 118-Biapigenin (Amentoflavon)</li> <li>2. 13, 118-Biapigenin</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0,01 – 0,05</li> <li>2. 0,2 – 0,6</li> </ol>
Phenylpropane		z.B. Chlorogensäure	< 1
Xanthone		1,3,6,7 - Tetrahydroxyxanthon	< 0,0004
Proanthocyanidine		z. B. Procyanidin B2	Gesamtgehalt an Proanthocyanidinen einschließlich Procyanidin B2 - 10

Abb. 5: Übersicht über die in Johanniskraut enthaltenen, pharmakologisch relevanten Hauptinhaltsstoffe (Butterweck und Nahrstedt 2003).

Die Wirksamkeit von Johanniskraut als Antidepressivum wurde in vielen klinischen Studien belegt. Die Zuordnung des antidepressiven Wirkprinzips zu bestimmten Inhaltsstoffen war bis heute jedoch nicht eindeutig möglich (Kaul 2000).

Anfängliche Untersuchungen ließen vermuten, dass es sich bei der Hemmung der Monoaminoxidase (MAO) um den Hauptwirkungsmechanismus des Johanniskrauts, vermittelt durch Hypericin, handelt (Suzuki et al. 1984). Diese hemmende Wirkung wurde für den Gesamtextrakt und einzelne Flavonoide nachgewiesen. Der Hemmeffekt für Hypericin konnte nicht bestätigt werden (Thiede und Walper 1994).

Durch den Gesamtextrakt konnte auch eine Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) bewirkt werden (Thiede und Walper 1994). Diese ist, wie die MAO, am Abbau der Katecholamine beteiligt.

Des Weiteren erwies sich Johanniskraut als potenter Serotonin-, Noradrenalin- und Dopamin-Wiederaufnahmehemmer (Müller und Schäfer 1996). Diese Wirkung konnte auch für Hyperforin alleine nachgewiesen werden (Müller et al. 1998).

Andere Studien fanden verschiedene Wirkungen von Johanniskrautextrakten auf Monoamin-Rezeptoren. So konnte bei Ratten durch die 14-tägige Gabe eines methanolischen Extrakts aus *Hypericum* eine signifikante Herabregulation der corticalen  $\beta$ -Adrenorezeptoren bewirkt werden. Durch den selben Extrakt konnte, ebenfalls nach 14-tägiger Behandlung, eine Hochregulation der 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren im frontalen Cortex der Ratten beobachtet werden (Müller et al. 1997).

*Hypericum perforatum* ist eine der bestuntersuchten Medizinalpflanzen, trotzdem gibt es noch viele offene Fragen, was seine Pharmakologie und Wirkmechanismen betrifft (Butterweck 2003). Eine gute Übersicht über die bisher bekannten Wirkungsmechanismen von Johanniskraut findet sich bei Kaul (2000) und Butterweck (2003).

## 1.7 Ziel der Arbeit

Aktiviert Mikroglia sind bei einer Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen, wie z. B. Alzheimer, Parkinson, Multipler Sklerose oder HIV vermittelter Demenz zu finden. Diese aktivierten Mikroglia generieren substantielle Mengen an ROS, NO, Glutamat und anderen neurotoxisch wirkenden Substanzen (Chao et al. 1996). Das oxidative und neurotoxische Potential, der von den aktivierten Mikroglia abgegebenen Substanzen, spielt möglicherweise auch bei depressiven Erkrankungen eine Rolle. Der durch aktivierte Mikroglia hervorgerufene oxidative Stress könnte Auswirkungen auf Neurotransmitter und deren Funktion haben.

Die Wirksamkeit von Johanniskraut bei Depression wurde in vielen Studien belegt. Für Johanniskraut-Extrakte, sowie einzelne seiner Inhaltsstoffe, wurden verschiedenste Wirkungen auf Neuronen nachgewiesen (siehe Kapitel 1.5).

In der vorliegenden Arbeit wurde an Mikroglia-Zellkulturen die Wirkung von Johanniskraut-Extrakt auf verschiedene Funktionen von Mikroglia getestet. Interessant war hierbei vor allem der Einfluss auf Aktivitäten, welche Auswirkungen auf umgebenden Zellen, wie z. B. Neuronen, haben können. Untersucht wurden:

- die NO-Bildung durch die iNOS
- die Phagozytose verschiedener Partikel
- Struktur des Zytoskeletts
- die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies
- die Toxizität von Amyloid  $\beta$  auf Mikroglia

Bei auftretenden Effekten wurde überprüft, ob sich diese auf einen oder mehrere der Hauptinhaltsstoffe des Extraktes zurückführen ließen. Getestet wurden hierbei die Flavonoide Rutin, Hyperosid, Quercitrin und Quercetin, die Naphthodianthrone Pseudohypericin und Hypericin, sowie die Phloroglucinverbindung Hyperforin.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1. Verwendete Zelllinien

Für die Versuche wurden die murinen Mikroglia-Zelllinien **BV2** und **N11**, sowie die murine Makrophagen-Zelllinie **RAW 264.7** verwendet. Die Zelllinien BV2 und RAW 264.7 wurden von Dr. T. Grune, Humboldt Universität Berlin, die Zelllinie N11 von Dr. G. Münch, Universität Leipzig, zur Verfügung gestellt.

Die Mikroglia-Zelllinie BV2 wurde hergestellt aus einer primären Mikroglia-Kultur, welche mit einem v-raf / v-myc Onkogen tragenden Retrovirus (J2) infiziert wurde (Blasi et al. 1990).

Die Mikroglia-Zelllinie N11 stammt von einer Mikroglia-Kultur aus embryonalem Maushirn, welche mittels eines v-myc oder v-mil übertragenden Retrovirus (MH2) immortalisiert wurde (Righi et al. 1989).

Die Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 wurde aus einem Tumor gewonnen, welcher durch das Abelson Maus Leukämie Virus induziert wurde (Raschke et al. 1978).

Für die Untersuchungen zur Toxizität von Amyloid  $\beta$  Protein Fragment 25-35 wurde außerdem die humane Neuroblastom-Zelllinie **SK-N-SH** (ATCC Nr. HTB-11) verwendet, welche aus einem Knochenmarks-Neuroblastom eines weiblichen Individuums stammt. Diese Zelllinie wurde von Dr. H. Wolff, GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg, zur Verfügung gestellt.

### 2.1.2 Zellkulturmedien, Puffer und Reagenzien für die Zellkultur

Sämtliche Medien und Reagenzien für die Zellkultur wurden von Invitrogen GmbH, Karlsruhe bezogen.

Medium/Puffer/Reagenz	Bemerkung	Katalognummer
DMEM	mit Phenolrot und L-Glutamin	41965-039
DMEM	ohne Phenolrot, ohne L-Glutamin	31053-028
RPMI	mit Phenolrot und Glutamax-I	61870-044
RPMI	ohne Phenolrot, ohne L-Glutamin	32404-014
FCS	Lot Nr.: 40F1225K	10270-106
PBS		14040-091
L-Glutamin	100x	25030-024
Glutamax-I Supplement	100x	35050-038
Trypsin-EDTA	10x	35400-027

#### Hitzeinaktivierung des FCS:

Vor seiner Verwendung wurde das FCS bei 56°C für 30 min im Wasserbad hitzeinaktiviert.

Für die Kultur der Zellen und die Versuche wurden folgende Medien verwendet:

**Kulturmedium für die Zelllinien BV2 und N11**

500 ml DMEM mit Phenolrot

5 ml FCS

**Kulturmedium für die Zelllinie RAW 264.7**

500 ml RPMI mit Phenolrot

5 ml FCS

**Versuchsmedium farbloses DMEM mit 1 % FCS**

500 ml DMEM ohne Phenolrot

5 ml FCS

5 ml L-Glutamin

**Versuchsmedium farbloses RPMI mit 1 % FCS**

500 ml RPMI ohne Phenolrot

5 ml FCS

5 ml Glutamax-I Supplement

**Einfriermedium für die Zelllinien BV2 und N11**

20 % FCS

10 % DMSO

70 % DMEM (mit 10 % FCS)

**Einfriermedium für die Zelllinie RAW 264.7**

90 % FCS

10 % DMSO

### 2.1.3 Johanniskraut-Extrakte

Die Extrakte aus Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) wurden von Fr. Mann, Lehrstuhl für Phytopathologie, Weihenstephan, zur Verfügung gestellt. Alle vier Extrakte wurden aus Kraut aus der Ernte des Jahres 2001 hergestellt. Zur Gewinnung der Extrakte wurde getrocknetes Kraut von *Hypericum perforatum* mit 50 % Ethanol extrahiert (Mann 2003). Die Extrakte erhielten die Nummern 1 bis 4 und wurden alle auf eine Konzentration von 25 mg Trockensubstanz / ml EtOH (50 %) eingestellt. Die genaue *Hypericum*-Sorte sowie Bezeichnung der entsprechenden Extrakte lässt sich Tab. 1 entnehmen.

Tab. 1: Für die Extrakte verwendeten *Hypericum*-Sorten mit Standortbezeichnung (nach Mann 2003).

<b>Bezeichnung des Extraktes</b>	<b><i>Hypericum</i>-Sorte mit Standortbezeichnung (nach Mann 2003)</b>
Extrakt 1	Topas 2/III
Extrakt 2	Taubertal 5/III
Extrakt 3	SN 10/III
Extrakt 4	Einzelpflanze A

Von jedem Extrakt wurden verschiedene Verdünnungen (50 % EtOH) hergestellt. Die Bezeichnungen der verschiedenen Verdünnungen sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Bezeichnung der Verdünnungen der Extrakte und entsprechende Konzentration [mg Trockensubstanz / ml EtOH (50 %)].

<b>Bezeichnung der Verdünnung</b>	<b>Konzentration der Lösung</b>
A	20 mg/ml
B	15 mg/ml
C	10 mg/ml
D	5 mg/ml

## 2.1.4 Chemikalien

Name	Formel/ Abkürzung	M (g/mol)	Hersteller	Artikel- nummer
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid	MTT	414,3	Sigma	M-5655
5-(und-6)-Chloromethyl-2',7'- dichloro-dihydro-Fluorescein Diazetat, Azetyl Ester	CM-H <sub>2</sub> DCFDA, C <sub>27</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	577,80	Molecular Probes	C-6827
Acetonitril	CH <sub>3</sub> CN	41,05	Merck	113358
Amyloid β Protein Fragment 25-35	Aβ 25-35	1060	Sigma	A 4559
Amyloid β Protein Fragment 35-25	Aβ 35-25	1060	Sigma	A 2201
BisBenzimide H 33342	Hoechst 33342	616,0	Sigma	B 2261
Cytochalasin D		507,63	Sigma	C-8273
Dimethylsulfoxid	DMSO	78,13	Sigma	D-5879
<i>E. coli</i> , Bodipy FL Konjugat			Molecular Probes	E-2864
Essigsäure 100 %	CH <sub>3</sub> COOH	60,05	Merck	100063
Ethanol 96 %	EtOH, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	46,07	Merck	111727
Fluorescein-β-Amyloid (1-40)	Aβ 1-40	4689,2	Anaspec	23513
Hepes		238,3	Sigma	H-9136
Kaliumchlorid	KCl	74,56	Merck	4936
Kalziumchlorid	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	147,02	Merck	2382
Kalzium-Ionophor A23187	Calcimycin	523,6	Sigma	C-7522
Lipopolysaccharid Serotyp 055:B5	LPS 055:B5		Sigma	L-2880
LPS Serotyp 055:B5, Bodipy FL Konjugat			Molecular Probes	L23350
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	203,3	Merck	5833

## Material und Methoden

Methanol	CH <sub>3</sub> OH	32,04	Merck	106018
N-(1-Naphtyl)-ethylendiamin-Dihydrochlorid	NED C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> x 2HCl	259,2	Sigma	N-9125
N,N-Dimethylformamid	DMF	73,10	Fluka	40255
Natriumchlorid	NaCl	58,44	Merck	6400
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	177,99	Merck	106580
Natriumdodecylsulfat	SDS	288,4	Sigma	L-4509
Natriumnitrit	NaNO <sub>2</sub>	69,00	Merck	106549
N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin	fMLP, chemotaktisches Tripeptid	437,6	Sigma	F-3506
Opsonisierungsreagenz für Zymosan			Molecular Probes	Z-2850
Ortho-Phosphorsäure 99 %	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	98,00	Merck	100565
Paraformaldehyd	PFA (CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>		Sigma	P 6148
Phorbol 12-Myristat 13-Azetat	PMA	616,8	Sigma	P-8139
<i>S. aureus</i> , Bodipy FL Konjugat			Molecular Probes	S-2854
Sulfanilamid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	172,2	Sigma	S-9251
Zymosan, Bodipy FL Konjugat			Molecular Probes	Z-2844

Die Einzelsubstanzen Rutin, Hyperosid, Quercitrin, Quercetin, Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin wurden von der Firma Steigerwald, Darmstadt, zur Verfügung gestellt.

### 2.1.5 Verwendete Kits

Name	Katalognr.	Hersteller	Verwendeter Inhalt
Live/Dead-Viability/Cytotoxicity Kit	L-3224	Molecular Probes	Calcein AM (4 mM) Ethidium Homodimer 1 (2 mM)
Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion Staining Kit	FAK 100	Chemicon International	TRITC-konjugiertes Phalloidin, lyophilisiert (15 µg)

### 2.1.6 Herstellung von Puffern und anderen Lösungen

#### HPLC:

##### Laufmittel A für HPLC

4,9 g  $H_3PO_4$

6,9 g  $NaH_2PO_4$

ad 2 l  $H_2O$  bidest

vor Gebrauch entgasen

##### Laufmittel B für HPLC

59 % Acetonitril

40 % Methanol

1 % Laufmittel A

vor Gebrauch entgasen

#### Nitritnachweis mittels Griess:

##### Griess Reagenz

50 mg NED

500 mg Sulfanilamid

250 mg  $H_3PO_4$

ad 50 ml  $H_2O$  bidest

vor jedem Gebrauch frisch ansetzen

**LPS-Lösung**

200 µg/ml in PBS

**MTT-Test:**

**Lysepuffer für MTT-Test**

50 g SDS in 250 ml H<sub>2</sub>O bidest bei ca. 68°C lösen

225 ml DMF zugeben

mit Eisessig auf pH 4,1 einstellen

ad 500 ml H<sub>2</sub>O bidest

**MTT-Reagenz**

5 mg/ml in PBS

sterilfiltrieren

**Amyloid β Protein Toxizität:**

**Amyloid β Fragmente 25-35 und 35-25**

jeweils 1 mg Amyloid β Fragment in 943 µl PBS, vortexen

zu 100 µl aliquotieren und bei -20 °C lagern

**ROS-Nachweis:**

**CM-H<sub>2</sub>DCFDA - Lösung**

50 µg in 50 µl EtOH (80 %)

vor jedem Gebrauch frisch anlösen

### Zytoskelett-Untersuchung:

#### **Hoechst 33342**

1 mg/ml in H<sub>2</sub>O

Lagerung bei 4°C

#### **TRITC-konjugiertes Phalloidin**

15 µg in 250 µl Methanol lösen

Lagerung bei -20°C

#### **Cytochalasin D**

0,5 mg in 500 µl DMSO

bei -20°C lagern

### Phagozytose:

#### **Suspension von Zymosan, *E. coli*, *S. aureus*, LPS (Bodipy FL Konjugat)**

Je 1 mg Zymosan, *E. coli*, *S. aureus* bzw. LPS wurden in 1 ml PBS suspendiert, indem die Suspension erst ausgiebig gevortext und dann 3 x 20 sec im Ultraschallbad beschallt wurde. Die Suspension wurde nun zu 4 x 250 µl aliquotiert und zur Aufbewahrung bei -20°C (LPS bei -80°C) eingefroren.

#### **Opsonisieren von Zymosan (Bodipy FL Konjugat)**

1 mg Zymosan wurde in 50 µl PBS suspendiert, indem die Suspension erst ausgiebig gevortext und dann 3 x 20 sec im Ultraschallbad beschallt wurde. Anschließend wurden 50 µl Opsonierungsreagenz zugegeben, die Lösung gevortext und für 1 h bei 37°C inkubiert. Das opsonisierte Zymosan wurde für 20 min bei 1000 x g abzentrifugiert, zweimal mit 500 µl PBS gewaschen und schließlich in 1 ml PBS aufgenommen. Die Suspension wurde nun zu 4 x 250 µl aliquotiert und zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren.

### **Earl`s Puffer**

140 mM NaCl

5 mM KCL

1,8 mM CaCl<sub>2</sub>

0,9 mM MgCl<sub>2</sub>

25 mM Hepes

pH 7,4

### **Lösung des Fluorescein-β-Amyloids**

0,5 mg Fluorescein-β-Amyloid wurde in 0,5 ml Earl`s Puffer mit 2 % DMSO gelöst und anschließend für 3 h bei 37°C im Dunkeln auf einem Thermo-Mixer inkubiert.

### **Paraformaldehyd-Lösung**

2 % bzw. 4 % in PBS

filtrieren

### 2.1.7 Analysegeräte

Sicherheits-Werkbank	BDK-S 1200, BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Cellstar Serie 300 Kompakt, Nunc, Wiesbaden- Biebrich
Wasserbäder	Typ 3043 und Typ 3047, Köttermann Labortechnik, Uetze-Hänigsen
Titerplatten-Photometer	TitertekPlus MS 212, ICN
Waagen	Typ 2474, Sartorius Typ L310, Sartorius MC1 Analytic AC 210S, Sartorius
Zentrifugen	CS-15 Centrifuge, Beckmann Coulter mit Rotor S4180  Centrifuge 5810R, Eppendorf mit Rotor F 45-30-11
pH-Meter	Orion Research 701 A, Bachofer, Reutlingen
Flüssigstickstoff-Behälter	GT 11, Air Liquide
HPLC	System Gold, Fa. Beckmann, Pumpen: 126 NM Detektor: 168 NM Autosampler: Triathlon Auswertung mit Gold Nouveau 2.6 Software

Ultraschallbad	Sonorex RK 100H, Bandelin, Berlin
Schüttler	Vortex-Genie 2, Model G-560E, Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Mikroskop	Olympus CK40-F200, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan

Verbrauchsmaterial:

Zellkulturflaschen	Techno Plastic Products AG (TPP), Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	
96 Well Platten	
6 Well Platten	
Zählkammern	Fast Read 102, Hoyer-Madaus Urotech, München
Glasboden-Petrischalen	MatTek Corporation, Ashland, USA Ø 3,5 cm, Poly-D-Lysin beschichtet

An der GSF, Neuherberg, Institut für Molekulare Virologie:

Thermo-Mixer 9200, Eppendorf

Durchflußzytometer **FACScalibur**, BD Biosciences, Düren  
 Anregungslaser: 488 nm, 15 mW  
 Fluoreszenz-Detektoren: FL-1 (BP 530/30)  
 FL-2 (BP 585/30)  
 FL-3 (LP 650)  
 Angeschlossenes Sorting- und Konzentrierungs-Modul,  
 Software CellQuestPro

Mikroskopierstation **Cell Observer**  
 Mikroskop Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena  
 Software AxioVision 4.2, Carl ZeissVision, Hallbergmoos  
 AxioCam HRm CCD-Kamera, Carl Zeiss, Jena  
 (verwendete Filter und Objektive siehe Tab. 3 und Tab. 4)

Tab. 3: Verwendete Filtersätze im Zeiss CellObserver

<b>Filtersatz- Bezeichnung</b>	<b>Anregungsbereich und Strahlteiler in nm</b>	<b>Emissions- Bereich</b>
HOECHST 33342	360/40, FT400	BP 460/50
FITC, BODIPY FL	475/40, FT 500	BP 530/50
TEXAS ROT	545/25, FT 570	BP 605/70

Tab. 4: Verwendete Objektive am Zeiss CellObserver

<b>Objektiv</b>	<b>Numerische Apertur, Phase</b>	<b>Imersion</b>
Plan Neofluar 40x	1,3 Ph3	Öl
Plan Achromat 63x	1,4 Ph3	Öl
LD-Achroplan 20x	0,4 Ph2	Luft

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkulturtechniken**

#### **2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen und Zellzahlbestimmung**

Die Mikroglia-Zelllinien BV2 und N11 wurden in DMEM mit Phenolrot und 10 % FCS, die Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 in RPMI mit Phenolrot und 10 % FCS in Zellkulturflaschen (T 75) im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Es handelt sich bei allen drei Zelllinien um adhärenente Zellen. Das Medium wurde täglich gewechselt, die Zellen jeden zweiten Tag im Verhältnis 1:10 passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche in ein Volumen von 5 ml Medium abschabt, gut suspendiert und 0,5 ml dieser Zellsuspension, mit frischem Medium, weiter in Kultur genommen.

Für Experimente, in denen eine bestimmte Zellzahl eingesetzt werden sollte, wurden die Zellen gezählt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe einer Zählkammer. Hiermit wurde die Anzahl Zellen pro ml Zellsuspension bestimmt (Anzahl der Zellen in einem Kleinquadrat x 10<sup>4</sup>).

#### **2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen der eukaryotischen Zellen**

Etwa 1 x 10<sup>7</sup> Zellen wurden bei 4000 UpM (entspricht 2665 x g) für 4 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in jeweils 3,6 ml Einfrieremedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei Cryoröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden dann zunächst für mindestens 24 h bei -80°C eingefroren und anschließend in einem Flüssigstickstoff-Behälter über flüssigem Stickstoff gelagert. Um die eingefrorenen Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie bei RT aufgetaut, sofort mit 20 ml Medium in eine Zellkulturflasche (T 75) gegeben und für 3 - 6 h in den Brutschrank gestellt. Nach diesem Zeitraum waren die Zellen adhärenent und es erfolgte ein Mediumwechsel zum Entfernen des DMSO.

## 2.2.2 Extrakte und Einzelsubstanzen

### 2.2.2.1 Analytik der Inhaltsstoffe der Extrakte

Zur Analytik der pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffe wurden die Ausgangsextrakte 1:10 verdünnt und mittels HPLC analysiert.

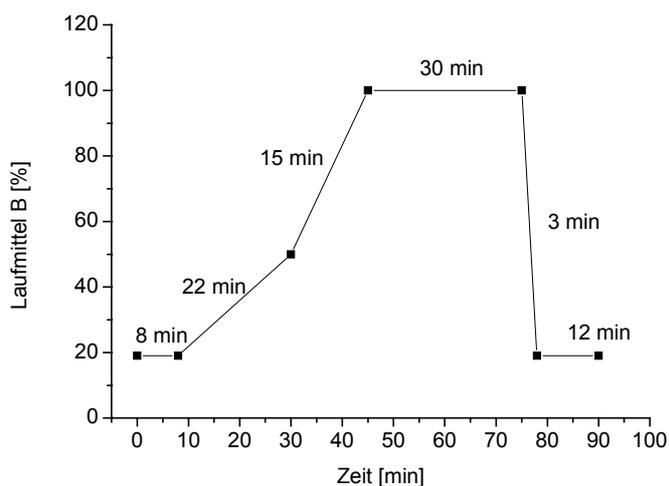
Um die Konzentration einzelner Inhaltsstoffe der Extrakte bestimmen zu können, wurden zuvor Kalibrationsgeraden verschiedener Reinsubstanzen erstellt. Hierbei wurden Rutin, Hyperosid, Isoquercitrin, Quercetin, I3, I18-Biapigenin, Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin verwendet.

Die Bestimmung der Konzentration dieser Substanzen in den Extrakten erfolgte über den Vergleich der Integrale der Peaks der jeweiligen Substanzen in den Extrakten mit denen der Einzelsubstanzen.

#### HPLC-Methode:

Gerät: HPLC, Beckman  
 Säule: Merck Superspher 60 RP select B 250 x 4,6 mm mit Vorsäule  
 Laufmittel A: Phosphatpuffer pH 2,1 (50 mM)  
 Laufmittel B: Acetonitril 59 %, Methanol 40 %, Laufmittel A 1 %

#### Laufprogramm:



Zeit [min]	Laufmittel B [%]
0	19
8	19
30	50
45	100
75	100
78	19
90	19

Flussrate: 0,8 ml / min

Injektionsvolumen: 20 µl

Wellenlängen zur Detektion: 254 nm, 275 nm, 340 nm, 585 nm

### 2.2.2.2 Einzelsubstanzen und Mischungen von Einzelsubstanzen

Um die Wirkungen des *Hypericum*-Extraktes auf einzelne oder einige wenige Inhaltsstoffe einschränken zu können, wurden Lösungen der häufigsten im Extrakt enthaltenen Einzelsubstanzen hergestellt. Die Konzentrationen der Substanzen entsprachen hierbei immer denen des *Hypericum*-Extraktes 1 in der Verdünnung B (kurz: Extrakt 1B).

Die Flavonoide wurden in 50 % EtOH angelöst und wie der Extrakt 1:200 im Ansatz verwendet. Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin wurden in 100 % EtOH in doppelt so hoher Konzentration angelöst und 1:400 im Ansatz verwendet (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Dem Extrakt 1B entsprechende Konzentrationen der Einzelsubstanzen mit verwendetem Lösungsmittel und Verdünnung im Ansatz.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration entspr. <i>Hypericum</i>-Extrakt 1B [µM]</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Verdünnung im Ansatz</b>
Rutin	173,67	50 % EtOH	1:200
Hyperosid	403,82	50 % EtOH	1:200
Quercitrin	39,23	50 % EtOH	1:200
Quercetin	27,54	50 % EtOH	1:200
Pseudohypericin	28,26 x 2	100 % EtOH	1:400
Hypericin	13,89 x 2	100 % EtOH	1:400
Hyperforin	46,31 x 2	100 % EtOH	1:400

Außerdem wurden drei verschiedene Mischungen (Mix 1, Mix 2, Mix 3) dieser Substanzen hergestellt. Mix 1 enthielt nur die Flavonoide Rutin, Hyperosid, Quercitrin und Quercetin. Mix 2 bestand aus Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin. Mix 3 war eine Mischung aus allen 7 Substanzen. Mix 1 und 3 wurden mit 50 % EtOH hergestellt und 1:200 im Ansatz verwendet. Für Mix 2 wurde 100 % EtOH verwendet, die Einzelsubstanzen doppelt so hoch konzentriert und der Mix 1:400 im Ansatz

verwendet (siehe Tab. 6). Die Lösungen wurden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und alle 1-2 Wochen neu erstellt.

Tab. 6: In den Mischungen Mix 1, 2 und 3 enthaltene Einzelsubstanzen, verwendetes Lösungsmittel und Verdünnung im Ansatz.

<b>Mix</b>	<b>enthaltene Substanzen (Konzentration entspr. <i>Hypericum</i>-Extrakt 1B)</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Verdünnung im Ansatz</b>
1	Rutin, Hyperosid, Quercitrin, Quercetin	50 % EtOH	1:200
2	Pseudohypericin, Hypericin, Hyperforin (jeweils doppelte Konzentration)	100 % EtOH	1:400
3	Rutin, Hyperosid, Quercitrin, Quercetin, Pseudohypericin, Hypericin, Hyperforin	50 % EtOH	1:200

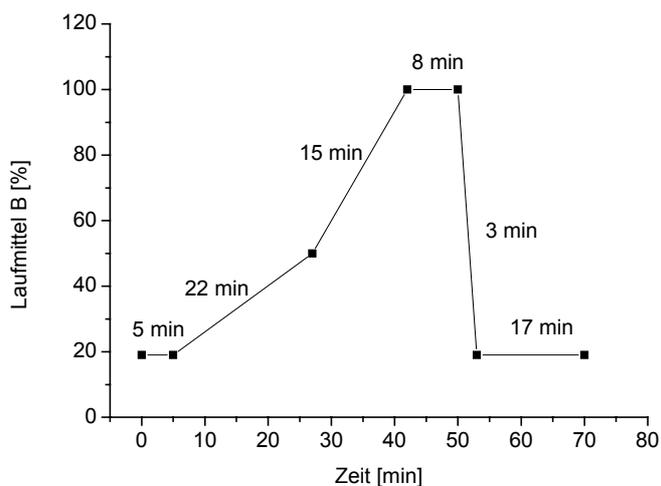
### 2.2.2.3 Kontrolle der Konzentrationen der Einzelsubstanzen mittels HPLC

Zur Kontrolle der Konzentrationen der selbst hergestellten Lösungen und Mischungen aus den Einzelsubstanzen auf ihre Übereinstimmung mit den im *Hypericum*-Extrakt enthaltenen Konzentrationen, wurden diese mittels HPLC analysiert und mit dem *Hypericum*-Extrakt verglichen.

#### HPLC-Methode:

Gerät: HPLC, Beckman  
 Säule: Merck LiChrospher 60 RP select B 125 x 4 mm mit Vorsäule  
 Laufmittel A: Phosphatpuffer pH 2,1 (50 mM)  
 Laufmittel B: Acetonitril 59 %, Methanol 40 %, Laufmittel A 1 %

#### Laufprogramm:



Zeit [min]	Laufmittel B [%]
0	19
5	19
27	50
42	100
50	100
53	19
70	19

Flussrate: 0,8 ml / min

Injektionsvolumen: 20 µl

Wellenlängen zur Detektion: 254 nm, 275 nm, 340 nm, 585 nm

### 2.2.3 MTT-Test

Der Nachweis der Toxizität von Substanzen auf die Zellen erfolgte mittels MTT-Test. Hierbei handelt es sich um einen kolorimetrischen Test, der auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) zu lila Formazankristallen durch zelluläre Dehydrogenasen beruht (Abb. 6). Da Dehydrogenasen nur in lebenden Zellen aktiv sind, dient die Umwandlung von MTT als Maß für die Lebensfähigkeit der Zellen (Mosmann et al. 1983). Die Absorption des entstandenen Formazans wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 - 600 nm bestimmt.

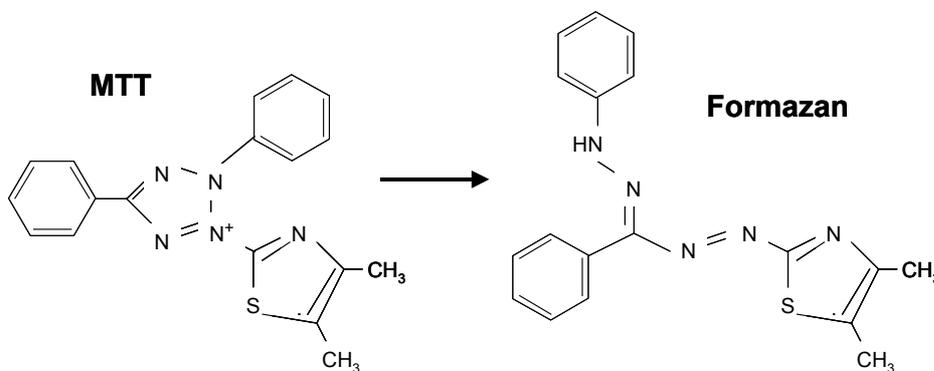


Abb. 6: Reduktion des gelben MTTs zum violetten Formazan.

Um die Toxizität einer Substanz zu testen, wurden in eine 96 Well Platte pro Well 5000 Zellen in einem Volumen von 200  $\mu$ l angesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch 200  $\mu$ l Medium ohne Phenolrot mit nur 1 % FCS ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Medium wiederum abgenommen und 100  $\mu$ l frisches Medium ohne Phenolrot mit 1 % FCS zugegeben, welches zusätzlich die zu testende Substanz enthielt. Nach einer festgelegten Inkubationszeit der Zellen mit der zu testenden Substanz wurden pro Well 10  $\mu$ l MTT-Lösung (5 mg/ml) zugegeben und die Zellen für 3 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l MTT-Lysepuffer pro Well aufgeschlossen und den entstandenen Formazankristallen wurde Zeit gegeben sich über Nacht zu lösen. Dann wurde mittels eines Titerplatten-Photometers die Extinktion jedes Wells bei 550 nm bestimmt.

## **2.2.4 Toxizitätsbestimmung von Amyloid $\beta$ Fragment 25-35 und 35-25**

### **2.2.4.1 Toxizitätsbestimmung mittels MTT-Test**

Für die Toxizitätsbestimmungen der Amyloid  $\beta$  Fragmente wurden in eine 96 Well Platte pro Well 5000 Zellen in einem Volumen von 200  $\mu$ l angesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch 200  $\mu$ l Medium ohne Phenolrot mit nur 1 % FCS ersetzt. Diesem Medium wurden zusätzlich 0,5 % *Hypericum*-Extrakt 1B oder einzelne Inhaltsstoffe des Extraktes in entsprechender Konzentration zugegeben. Nach weiteren 24 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und pro Well 100  $\mu$ l farbloses DMEM ohne FCS und ohne Glutamin zugegeben, in welchem die zu testenden Konzentrationen der Amyloid  $\beta$  Fragmente gelöst waren. Nach einer Stunde Inkubation der Zellen mit den Amyloid  $\beta$  Fragmenten wurden pro Well 10  $\mu$ l MTT-Lösung zugegeben und der MTT-Test wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben durchgeführt.

### **2.2.4.2 Fluorimetrische Bestimmung der Lebensfähigkeit von Zellen**

Die fluorimetrische Bestimmung der Lebensfähigkeit erfolgte mit Hilfe des Live/Dead-Viability/Cytotoxicity Kits (L-3224) von Molecular Probes. Die gleichzeitige Unterscheidung von toten und lebenden Zellen mit diesem Assay basiert auf zwei Parametern der Zell-Lebensfähigkeit, nämlich der intrazellulären Esteraseaktivität und der Zellmembran-Integrität, welche durch verschiedenfarbige Fluoreszenz dargestellt werden (Produkt Information Live/Dead-Viability/Cytotoxicity Kit (L-3224), Molecular Probes).

Lebende Zellen werden durch ihre intrazelluläre Esteraseaktivität erkennbar gemacht. Das nicht fluoreszierende zellpermeable Calcein AM (Abb. 7) wird durch enzymatische Veränderungen in den Zellen zu intensiv grün fluoreszierendem Calcein, welches in den Zellen verbleibt und somit lebende Zellen grün fluoreszieren lässt.

Ethidium Homodimer (EthD-1) (Abb. 7) dringt in Zellen mit beschädigter Zellmembran ein und bindet dort an Nukleinsäuren. Hierdurch kommt es zur Ausbildung einer leuchtend roten Fluoreszenz in toten Zellen.

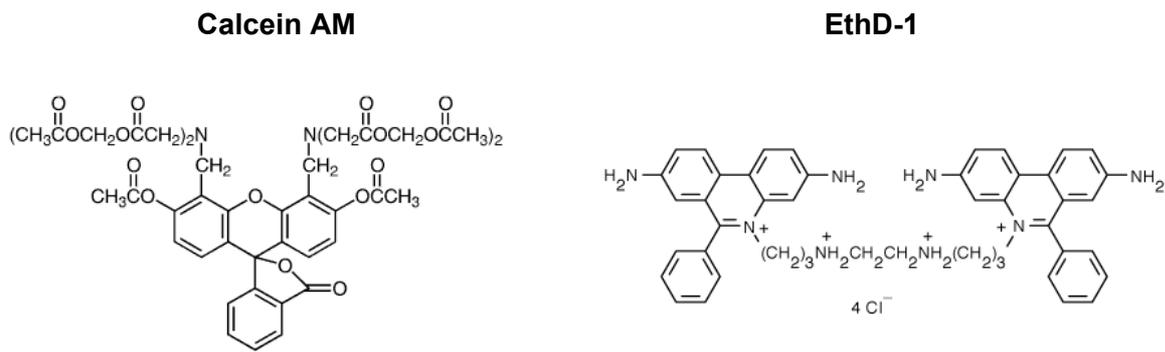


Abb. 7: Strukturformeln von Calcein AM und EthD-1.

Für diesen Assay wurden in Glasboden-Petrischalen pro Petrischale  $5 \times 10^4$  Zellen in einem Volumen von 2 ml angesät. Die Behandlung der Zellen erfolgte analog zum MTT-Test. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch 200  $\mu$ l Medium ohne Phenolrot mit nur 1 % FCS ersetzt. Diesem Medium wurden zusätzlich 0,5 % *Hypericum*-Extrakt 1B oder einzelne Inhaltsstoffe des Extraktes in entsprechender Konzentration zugegeben. Nach weiteren 24 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und pro Well 100  $\mu$ l farbloses DMEM ohne FCS und ohne Glutamin zugegeben, in welchem die zu testenden Konzentrationen der Amyloid  $\beta$  Fragmente gelöst waren.

Nach 4 h Inkubation mit den Amyloid  $\beta$  Fragmenten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Lösung aus 4  $\mu$ M Ethidium Homodimer (EthD-1) und 2  $\mu$ M Calcein AM in PBS für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder mit PBS gewaschen und Medium ohne Phenolrot und FCS zugegeben. Die Auswertung und die Bildaufnahmen erfolgten mit Hilfe des Computer-gesteuerten inversen Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200M und einem 20x LD-Achroplan Objektiv.

Die Aufnahmen für grüne und rote Fluoreszenz wurden mit geeigneten Filtern für Calcein AM (Ex: BP 475/40, FT 500, Em: P 530/50) und EthD-1 (Ex: BP 545/25, FT 570, Em: BP 605/70) gemacht.

## **2.2.5 Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch iNOS**

### **2.2.5.1 Nitrit Nachweis mittels Griess Reagenz**

Der Nachweis des von den Zellen gebildeten NO erfolgte indirekt, über den Nachweis von Nitrit. Das von den Zellen abgegebene NO wird extrazellulär zu  $\text{NO}_2^-$  oxidiert, welches im Medium akkumuliert, wo es mittels Griess Reagenz leicht nachgewiesen werden kann.

Für den Griess Test wurden pro Well einer 96 Well Platte  $8 \times 10^4$  Zellen in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  angesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch 200  $\mu\text{l}$  Medium ohne Phenolrot mit nur 1 % FCS ersetzt. Zusätzlich wurden dem Medium die Substanzen beigegeben, welche auf ihren Einfluss auf die NO Produktion getestet werden sollten.

Nach 24 h wurde das Medium wieder abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und 200  $\mu\text{l}$  frisches Medium zugegeben, welches zur Induktion der Expression der iNOS 1  $\mu\text{g/ml}$  (N11, BV2) bzw. 10  $\text{ng/ml}$  (RAW 264.7) LPS enthielt.

Nach weiteren 24 h wurden pro Well 100  $\mu\text{l}$  Medium abgenommen und in eine neue 96 Well Platte überführt. Nach Zugabe von jeweils 100  $\mu\text{l}$  Griess Reagenz pro Well erfolgte eine Inkubation von 15 min bei RT. Anschließend wurde mit Hilfe eines Titerplatten-Photometers die Extinktion bei 550 nm bestimmt. Zur Berechnung der entsprechenden Konzentrationen an  $\text{NO}_2^-$  wurde eine Eichgerade mit in Medium gelöstem  $\text{NaNO}_2$  erstellt.

### **2.2.5.2 Zeitlicher Verlauf der Nitrit-Akkumulation**

Um einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der NO-Bildung zu bekommen, erfolgte eine Behandlung der Zellen wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben. Allerdings wurde die Nitritkonzentration des Mediums nach 0, 3, 6, 9, 12 und 24 h ab dem Zeitpunkt der Zugabe des LPS-haltigen Mediums bestimmt.

## **2.2.6 Untersuchung der Phagozytoseaktivität**

### **2.2.6.1 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)**

Bei einem „Fluorescence Activated Cell Sorter“ (FACS) handelt es sich um ein Durchflußzytometer, mit welchem einzelne Zellen auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht werden können.

In dem FACS-Gerät befindet sich ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit (sheath fluid). In diese Trägerflüssigkeit wird die Probe in Form einer Zellsuspension eingebracht. Durch die höhere Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit werden die Zellen vereinzelt und in einer fixen Position am Laserlicht vorbeigeführt (Abb. 8).

Das von der Zelle in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht wird vom FSC-Detektor (Forward Scatter), das Seitwärtsstreulicht (SSC, Sideward Scatter) und verschiedene Fluoreszenzfarben rechtwinklig zum Laserstrahl aufgenommen und durch ein Objektivsystem, Farbfilter und Teilerspiegel auf die verschiedenen Detektoren gelenkt. Die Signale der Photomultiplier werden verstärkt und können im Computer ausgewertet und dargestellt werden.

Jede der aufgezeichneten optischen Eigenschaften (Streu- und Fluoreszenzlicht) steht für eine bestimmte Charakteristik der gemessenen Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC), d. h. das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht, korreliert mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (in rechtem Winkel zum Laserstrahl gestreutes Licht) zur internen Struktur der Zelle (Granularität). Falls benötigt, ist eine Sortierung der Zellen nach gewünschten Parametern möglich.

Die so ermittelten Daten können als Histogramme oder als Punkt-Plots in der Auswertungs- und Aufnahme-Software dargestellt werden. Mit der Information der Größe und Granularität der Zellen kann eine homogene Zellpopulation zur Auswertung ausgewählt werden. In der so bestimmten Population werden die Fluoreszenzeigenschaften einzelner Zellen gemessen und nach unterschiedlichen Kriterien, wie Gesamt-Fluoreszenz oder Fluoreszenz-Verteilung, ausgewertet.

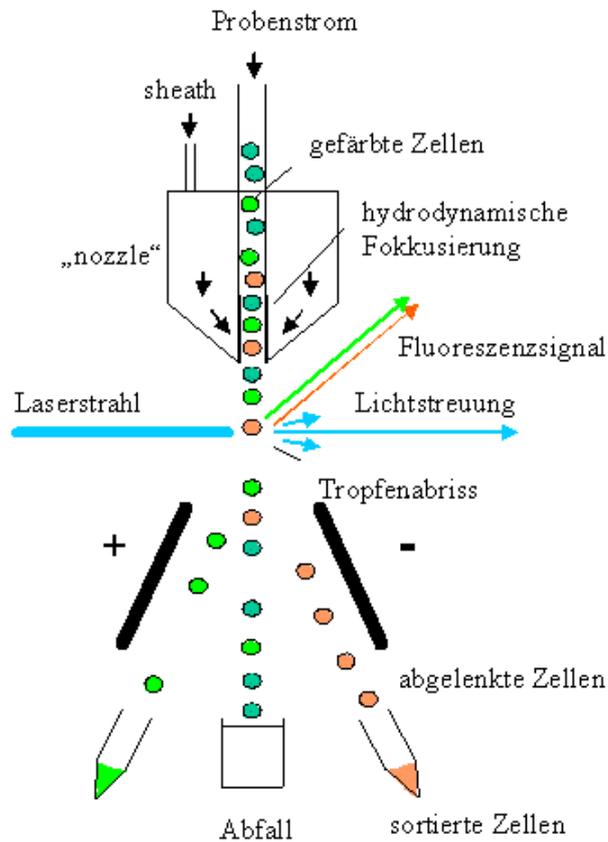


Abb. 8: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines FACS.

Die Zellen werden mittels einer Trägerflüssigkeit einzeln am Laserstrahl vorbeigeführt. Hierbei werden Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzsignale detektiert. Falls gewünscht, können die Zellen anschließend nach ihren Eigenschaften sortiert werden.

### 2.2.6.2 Auswertung der FACS-Analysen

Zur Auswertung der Versuche wurde jede Zelle in einem Punkt-Plot nach ihrer Größe (Forward Scatter, FSC) und Granularität (Sideward Scatter, SSC) aufgetragen und eine gesunde einheitliche Population R1 definiert (Abb. 9 oben).

Die Zellen dieser Population wurde wiederum nach ihrer Granularität und Intensität der Fluoreszenz (FL1-H) aufgetragen (Abb. 9 unten).

Auf der Fluoreszenzscala (X-Achse) wurde ein Grenzwert festgelegt, ab dem eine Zelle als fluoreszierend (z. B. hervorgerufen durch fluoreszierende phagozytierte Partikel, im Vergleich zur eventuell vorhandenen geringen Autofluoreszenz) gezählt wurde. Nun konnten die verschiedenen Experimente auf ihre Anteile an fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Zellen an der Gesamtpopulation untersucht werden und so eine, durch verschiedene Behandlung der Zellen hervorgerufene, Verschiebung der Anteile erkannt werden.

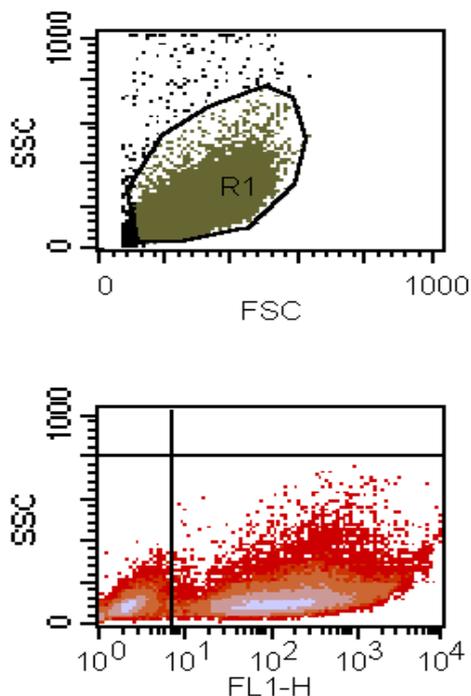


Abb. 9: Typische Darstellung und Auswertung der FACS Daten in Punkt-Plots.

*oben:* Alle Zellen eines Experimentes werden nach ihrer Größe (Foreward Scatter, FSC) und ihrer Granularität (Sideward Scatter, SSC) aufgetragen und eine einheitliche Population R1 definiert.

*unten:* Die Zellen der Population R1 werden nach der Stärke ihrer Fluoreszenz (FL1-H) und ihrer Granularität (SSC) in einem Punkt-Dichte-Plot dargestellt. Die Zellen im rechten unteren Quadranten zeigen im Kanal FL-1 (grün) deutliche Fluoreszenz gegenüber den Zellen im linken unteren Quadranten.

### 2.2.6.3 Phagozytose verschiedener Partikel

Die Phagozytoseaktivität der Zellen wurde mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Partikeln untersucht. Verwendet wurden hierbei Bodipy FL Konjugate der Firma Sigma von Zymosan, LPS, *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*, sowie opsonisierte Zymosan-Partikel (Opsonisierung siehe Kapitel 2.1.6), des weiteren Fluorescein- $\beta$ -Amyloid 1-40 der Firma Anaspec.

Für die Phagozytose-Versuche wurden in eine 6 Well Platte pro Well  $5 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von 2 ml Medium angesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch 2 ml frisches Medium ohne Phenolrot mit 1 % FCS ersetzt. Das Medium enthielt entweder keine Zusätze, *Hypericum*-Extrakt 1B oder verschiedene Einzelsubstanzen. Nach weiteren 24 h wurde das Medium wieder abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und 2 ml frisches Medium ohne Phenolrot mit 1 % FCS, welches diesmal 10  $\mu\text{g/ml}$  fluoreszenzmarkierte Partikel enthielt, zugegeben. Nach 2 h Inkubation (bei Amyloid  $\beta$  nach 18 h) wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 500  $\mu\text{l}$  PBS geerntet, welchem zur Fixierung der Zellen 500  $\mu\text{l}$  PFA (4 %) zugesetzt wurden. Die FACS Analyse (siehe Kapitel 2.2.5.1) der so vorbereiteten Zellen erfolgte an der GSF Zentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg. Hierbei wurde untersucht, wie viele Zellen mindestens einen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Partikel aufgenommen hatten und somit fluoreszierten. Pro Experiment wurden ca. 100.000 Zellen betrachtet.

Um einen Quenching-Effekt des *Hypericum*-Extraktes auf die Fluoreszenz der Partikel ausschließen zu können, und somit falsch positive Ergebnisse zu erzielen, wurde folgende Kontrolle durchgeführt:

Die Zellen erhielten keinen *Hypericum*-Extrakt und wurden nach der Phagozytose der Partikel fixiert. Erst nach dieser Fixierung wurden sie für 24 h mit dem Extrakt inkubiert und anschließend im FACS analysiert.

Die Behandlung der bereits fixierten Zellen sollte keinerlei Einfluss auf die Phagozytoseaktivität und somit auf die Fluoreszenz der Zellen zeigen, da sonst eine physikalische Verminderung der Fluoreszenz (Quenching) durch den Extrakt vorliegen würde.

### 2.2.7 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf Zellebene

Für den Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies auf Zellebene wurde ein Dichloro-dihydro-fluorescein Diazetat Derivat (5-(und-6)-Chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein Diazetat Acetyl Ester = CM-H<sub>2</sub>DCFDA) verwendet (Abb. 10).

Dichloro-dihydro-fluorescein Diazetat wird häufig verwendet, um die Generierung reaktiver Sauerstoff-Intermediate in Neutrophilen und Makrophagen zu detektieren. Hierfür werden die zu untersuchenden Zellen mit der nicht fluoreszierenden zellpermeablen Substanz inkubiert. Innerhalb der Zelle werden die am Molekül befindlichen Acetatgruppen durch Esterasen abgespalten und die Thiol-reaktive Chloromethylgruppe reagiert mit intrazellulärem Glutathion und anderen Thiolen (Haugland 2002).

Durch eine anschließende Oxidation, z. B. hervorgerufen durch oxidativen Stress, kommt es nun zur Bildung eines, in der Zelle eingeschlossen, fluoreszierenden Produktes, welches mittels FACS detektiert und analysiert werden kann.

Für den Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels CM-H<sub>2</sub>DCFDA wurden in eine 6 Well Platte pro Well 5 x 10<sup>5</sup> Zellen in einem Volumen von 2 ml angesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch Phenolrot freies Medium mit 1 % FCS ersetzt, welchem zusätzlich 0,5 % *Hypericum*-Extrakt 1B zugesetzt wurde. Die Kontrollen erhielten keinen Zusatz. Nach weiteren 24 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und farbloses Medium mit 1 % FCS zugegeben, welches 1 µM CM-H<sub>2</sub>DCFDA enthielt. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und 1 ml farbloses Medium ohne FCS und Glutamin, welches 10 µM Amyloid β 25-35 enthielt, zugegeben. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen trypsinisiert und in 500 µl PBS resuspendiert. Alle Arbeitsschritte wurden bei möglichst wenig Licht durchgeführt, um eine Hypericin-vermittelte, lichtinduzierte Generierung von ROS zu minimieren.

Die Zellen konnten nun im FACS analysiert werden (siehe Kapitel 2.2.6.2). Die grüne Fluoreszenz des CM-H<sub>2</sub>DCFDA wurde mit Kanal FL-1 detektiert. Pro Experiment wurden ca. 100.000 Zellen betrachtet.

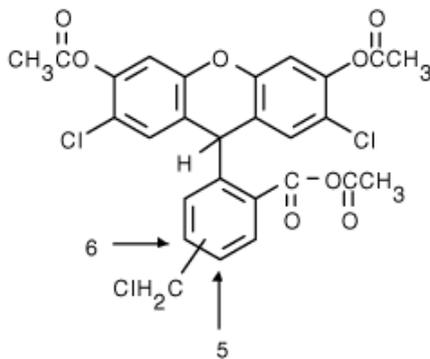


Abb. 10: Strukturformel von CM-H<sub>2</sub>DCFDA.

### 2.2.8 Beeinflussung des Zytoskeletts

Das Zytoskelett spielt eine wichtige Rolle beim Ablauf der Phagozytose. Eine Beeinflussung des Aktin-Gerüsts der Zellen durch den *Hypericum*-Extrakt könnte auch Auswirkungen auf die Phagozytoseaktivität haben.

Zur Untersuchung des Zytoskeletts wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von 2 ml Medium in eine Glasboden-Petrischale gesät. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel zu Phenolrot freiem Medium mit 1 % FCS, welches zusätzlich 0,5 % *Hypericum*-Extrakt 1B enthielt. Die Kontrollen erhielten nur frisches Medium ohne *Hypericum*-Extrakt. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und 2 ml farbloses Medium mit 1 % FCS, welches 10 µg/ml fluoreszenzmarkierte Partikel enthielt, zugegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation, dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

Zur Fixierung der Zellen wurden pro Petrischale 1 ml PFA (2 %) zugesetzt. Nach 30 min bei 37°C wurde die PFA-Lösung abgenommen, die Zellen gewaschen, mit 2 ml PBS überschichtet und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Als Positiv-Kontrolle für Zytoskelett-Schädigung wurden Zellen statt mit *Hypericum*-Extrakt 15 min mit 0,5 µM Cytochalasin D behandelt. Cytochalasin D führt zur Zerstörung der Aktin-Fibrillen des Zytoskeletts und hemmt die Aktin-Polymerisierung (Flanagan und Lin 1980).

Um die Struktur des Zytoskeletts sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin behandelt, welches an die Aktin-Filamente der

Zellen bindet. Verwendet wurden hierfür Komponenten des „Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion Staining Kit“ von Chemicon International.

Die vorbereiteten, fixierten Zellen wurden mit 1 ml 1:500 in PBS verdünnter Phalloidin-Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei RT mit 1 ml PBS, welchem 5 µl Hoechst 33342 - Lösung zugesetzt waren. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und konnten nun im Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

### **2.2.9 Statistische Auswertung der Daten**

Die Versuche wurden mit mindestens drei Parallelen durchgeführt und in wenigstens zwei unabhängigen Versuchen wiederholt. Im Ergebnisteil dieser Arbeit ist jeweils ein typisches Versuchsergebnis, stellvertretend für alle unabhängigen Versuche, dargestellt. Die genaue Anzahl  $n$  der Parallelen ist bei den einzelnen Versuchen angegeben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch die Bildung des arithmetischen Mittelwertes aus den Parallelen mit zugehöriger Standardabweichung ( $\sigma_{n-1}$ ).

Für die Phagozytose-Daten wurde die Darstellung in Box-Plots gewählt. Der Boxbereich erstreckt sich von 25-75 % der Werte, die Whiskers markieren den Maximal- und Minimalwert. Der Mittelwert ist als kleines Quadrat erkennbar gemacht.

Ergaben sich beim Vergleich zweier Werte keine eindeutigen Unterschiede, wurde unter Verwendung des ungepaarten Student's t-Tests geprüft, ob sie sich signifikant unterscheiden. Hierbei wurden die Signifikanzniveaus  $\alpha < 0,05$  (\*),  $\alpha < 0,01$  (\*\*) und  $\alpha < 0,001$  (\*\*\*) gewählt. Dies bedeutet für die berechneten Unterschiede, dass sie mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 %, 99 % oder 99,9 % signifikant sind.

Zum Vergleich der Mittelwerte mehrerer Gruppen wurde eine Varianzanalyse mittels ANOVA durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden analog dem t-Test verwendet.

Die Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte rechnergestützt mit folgender Software: Microsoft Excel 2000, Microsoft Powerpoint 2000, Microcal Origin 6.1, CellQuestPro, AxioVision 4.2.

### **3 Ergebnisse**

In dieser Arbeit wurden die murinen Mikroglia-Zelllinien BV2 und N11 und die murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 verwendet, um den Einfluss von Johanniskraut-Extrakt auf verschiedene immunologische Funktionen zu untersuchen. Die Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 wird häufig als Model für gewebständige Monozyten, wie auch Mikroglia, benutzt. Da keine gut charakterisierten humanen Mikroglia-Zelllinien zur Verfügung stehen, wurden die schon länger etablierten murinen Mikroglia-Zelllinien N11 und BV2 verwendet. Die Versuche wurden mit allen drei Zelllinien durchgeführt. Hierdurch konnten einerseits Makrophagen und Mikroglia in ihrem Verhalten verglichen, andererseits die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse verstärkt werden.

### 3.1 Extrakte und Einzelsubstanzen

#### 3.1.1 Analyse der Extrakte aus *Hypericum perforatum* mittels HPLC

Bei der Analyse der vier Extrakte wurden die mittels HPLC nachweisbaren Hauptinhaltsstoffe betrachtet. Hierbei handelt es sich um die Flavonoide Rutin, Hyperosid, Isoquercitrin, Quercitrin und Quercetin, das Biflavonoid I3, I18-Biapigenin, die Naphthodianthrone Pseudohypericin und Hypericin, sowie das Phloroglucinderivat Hyperforin. Alle diese Inhaltsstoffe lagen in den vier Extrakten in verschiedenen Konzentrationen vor, in Extrakt 3 fehlte Rutin komplett.

In Abb. 11 ist ein typisches HPLC-Chromatogramm der Extrakte, in diesem Fall des Extraktes 1, zu sehen.

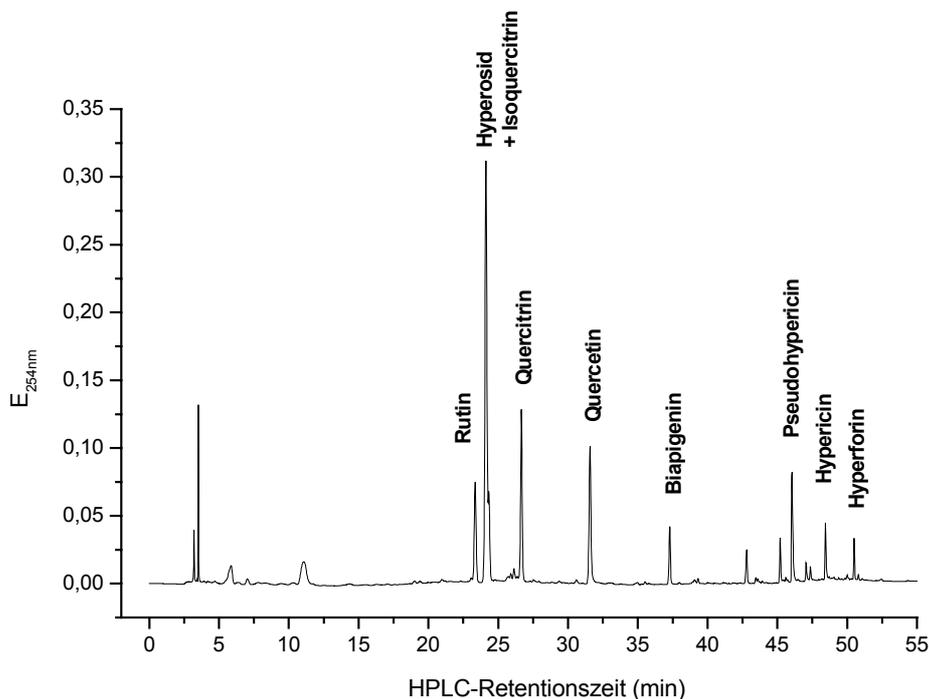


Abb. 11: HPLC-Chromatogramm des *Hypericum*-Extraktes 1.

Die bestimmten Konzentrationen der einzelnen Inhaltsstoffe der Extrakt-Stammlösungen sind in Tab. 7 aufgeführt.

Die Peaks von Hyperosid und Isoquercitrin konnten nicht genügend getrennt werden, weshalb die Gesamtfläche als Hyperosid berechnet und in den Experimenten dann als Hyperosid-Konzentration verwendet wurde.

Wie aus Tab. 7 zu ersehen, enthält Extrakt 2 deutlich mehr Flavonoide als die restlichen Extrakte. Außerdem fällt auf, dass die Konzentrationen an Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin von Extrakt 3 und 4 wesentlich über denen der Extrakte 1 und 2 liegt. Extrakt 4 enthält die höchsten Konzentrationen an Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin.

Tab. 7: Konzentrationen einzelner Inhaltsstoffe [ $\mu\text{M}$ ] in den vier verschiedenen Extrakt-Stammlösungen [25 mg Trockensubstanz / ml EtOH (50 %)].

Inhaltsstoff	Konzentration der Inhaltsstoffe [ $\mu\text{M}$ ]			
	Extrakt 1	Extrakt 2	Extrakt 3	Extrakt 4
Rutin	295,2	425,6	0,0	97,2
Hyperosid + Isoquercitrin	686,5	1453,3	1025,5	537,1
Quercitrin	66,7	124,9	116,3	186,4
Quercetin	46,8	98,5	106,8	140,9
Biapigenin	47,9	92,0	50,6	39,3
Pseudohypericin	48,0	61,9	141,5	176,5
Hypericin	23,6	42,6	58,7	80,8
Hyperforin	78,7	59,6	138,1	178,9
<b>Zusammenfassung</b>				
<b>Flavonoide</b>	<b>1143,1</b>	<b>2194,2</b>	<b>1299,2</b>	<b>1000,9</b>
<b>Hypericin + Pseudohypericin</b>	<b>71,7</b>	<b>104,5</b>	<b>200,2</b>	<b>257,3</b>
<b>Hyperforin</b>	<b>78,7</b>	<b>59,6</b>	<b>138,1</b>	<b>178,9</b>

### 3.1.2 Toxizität der Extrakte aus *Hypericum perforatum*

Zur Bestimmung der Toxizität wurden die Verdünnungen A = 20 mg/ml, B = 15 mg/ml, C = 10 mg/ml, D = 5 mg/ml (siehe Kapitel 2.1.3) der vier Extrakte im Verhältnis 1:200 zum Zellmedium zugegeben und die Lebensfähigkeit der Zellen nach 24 h Inkubation mittels MTT-Test ermittelt.

Extrakt 1 zeichnete sich als der verträglichste Extrakt aus und wies auch in der höchsten verwendeten Konzentration A (= 100 µg/ml i. A.) keine signifikante Toxizität auf die drei Zelllinien auf (Abb. 12, Abb. 13, Abb. 14). Nur bei der Zelllinie N11 ließ sich eine leichte Tendenz zu einem toxischen Effekt der Verdünnung A beobachten (Abb. 13). Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde hier um etwa 10 % verringert.

Extrakt 2 bewirkte bei den Zelllinien N11 (Abb. 13) und RAW 264.7 (Abb. 14) in der Konzentration A (= 100 µg/ml i. A.) eine signifikante Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit um etwa 20 %. Bei der Zelllinie BV2 konnte bereits ab der Konzentration B (= 75 µg/ml i. A.) ein signifikant toxischer Effekt beobachtet werden (Abb. 12). Die Lebensfähigkeit der BV2-Zellen wurde durch diese Extrakt-Konzentration um etwa 25 % verringert.

Extrakt 3 zeigte ähnliche Toxizität wie Extrakt 2. Für die Zelllinien N11 (Abb. 13) und RAW 264.7 (Abb. 14) erwies sich die Konzentration A (= 100 µg/ml i. A.) als signifikant toxisch. Durch sie wurde die Lebensfähigkeit der N11 Zellen um durchschnittlich 40 %, die der RAW 264.7 Zellen um 30 % verringert. Für die Zelllinie BV2 (Abb. 12) zeigte sich bereits die Konzentration B (= 75 µg/ml i. A.) als signifikant toxisch. Sie führte zu einer Abnahme der Lebensfähigkeit der BV2 Zellen um 25 %.

Extrakt 4 zeichnete sich als der unverträglichste Extrakt für alle Zelllinien aus. Er war für die Zelllinien BV2 (Abb. 12) und N11 (Abb. 13) bereits ab der Verdünnung C signifikant (= 50 µg/ml i. A.) toxisch. Die Lebensfähigkeit der BV2 Zellen, sowie der N11 Zellen, wurde hierdurch um jeweils 25 % herabgesetzt. Bei der Zelllinie RAW 264.7 (Abb. 14) zeigte sich nur in der Konzentration A (= 100 µg/ml) eine signifikante Verringerung der Lebensfähigkeit der Zellen um 40 %.

Die Ethanolkontrolle zeigte keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der drei Zelllinien.

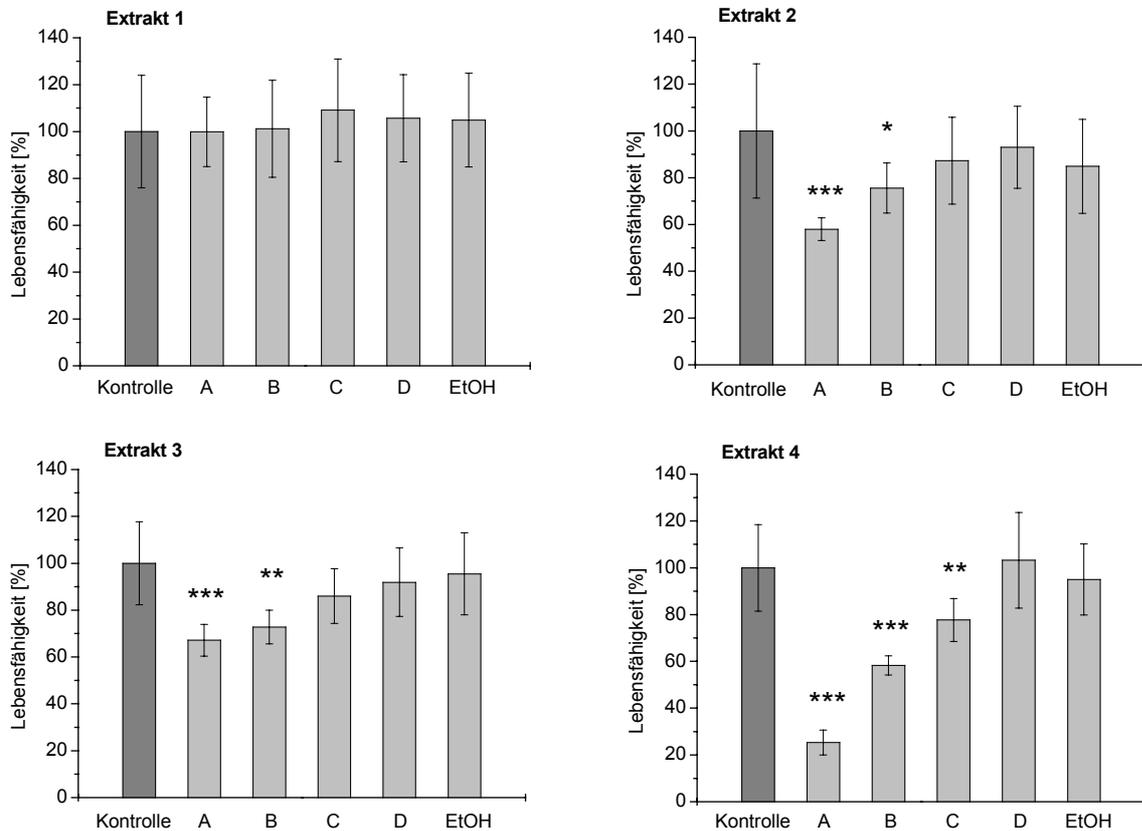


Abb. 12: Zytotoxische Wirkung der *Hypericum*-Extrakte 1-4 auf die Zelllinie **BV2**.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Als Kontrolle dienen jeweils unbehandelte Zellen, sowie Zellen, welche nur mit 0,5 % EtOH (50 %) vorbehandelt wurden. Die Extrakte wurden jeweils in 4 verschiedenen Konzentrationen verwendet: A = 100 µg/ml, B = 75 µg/ml, C = 50 µg/ml, D = 25 µg/ml im Ansatz. Die Extinktion der unbehandelten Zellen wurde 100 % gesetzt, die restlichen Werte prozentual darauf bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 8 Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle.

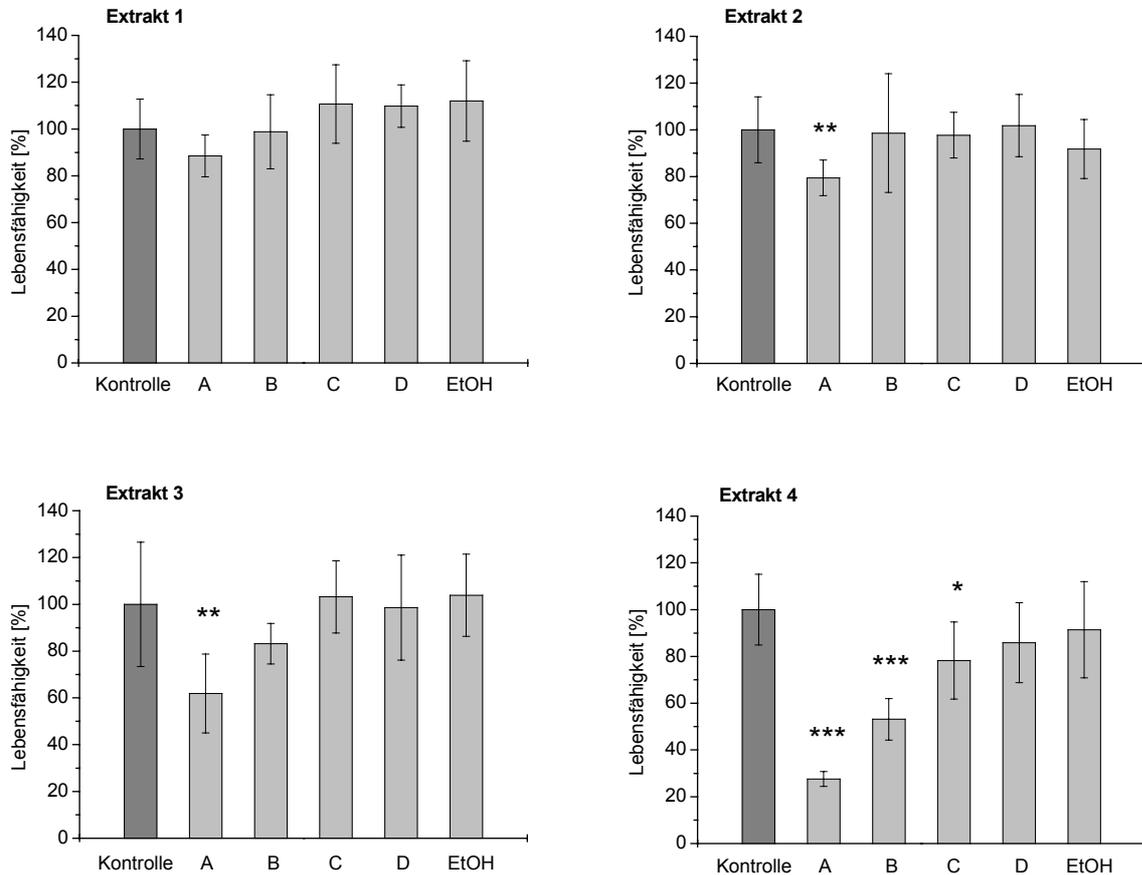


Abb. 13: Zytotoxische Wirkung der *Hypericum*-Extrakte 1-4 auf die Zelllinie **N11**.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen, sowie Zellen, welche nur mit 0,5 % EtOH (50 %) vorbehandelt wurden. Die Extrakte wurden jeweils in 4 verschiedenen Konzentrationen verwendet: A = 100 µg/ml, B = 75 µg/ml, C = 50 µg/ml, D = 25 µg/ml im Ansatz. Die Extinktion der unbehandelten Zellen wurde 100 % gesetzt, die restlichen Werte prozentual darauf bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 8 Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle.

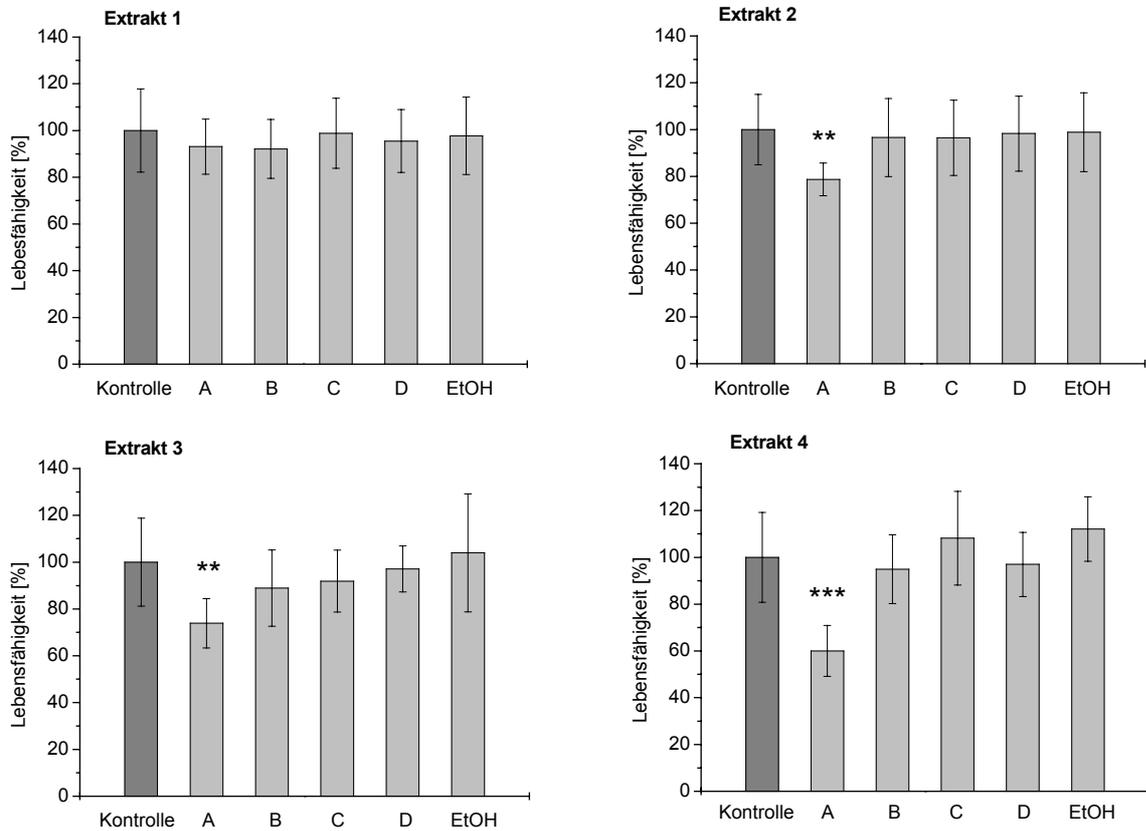


Abb. 14: Zytotoxische Wirkung der *Hypericum*-Extrakte 1-4 auf die Zelllinie **RAW 264.7**.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Als Kontrolle dienen jeweils unbehandelte Zellen, sowie Zellen, welche nur mit 0,5 % EtOH (50 %) vorbehandelt wurden. Die Extrakte wurden jeweils in 4 verschiedenen Konzentrationen verwendet: A = 100 µg/ml, B = 75 µg/ml, C = 50 µg/ml, D = 25 µg/ml im Ansatz. Die Extinktion der unbehandelten Zellen wurde 100 % gesetzt, die restlichen Werte prozentual darauf bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 8 Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle.

### 3.1.3 Toxizität der Einzelsubstanzen

Die Bestimmung der Toxizität der Einzelsubstanzen erfolgte, analog zu den Extrakten, durch Zugabe verschiedener Konzentrationen der Substanzen zum Zellmedium und Ermittlung der Lebensfähigkeit der Zellen nach 24 h Inkubation mittels MTT-Test. Getestet wurden hierbei Konzentrationen in der Größenordnung, wie sie in den verschiedenen Extrakten vorlagen.

Bei allen drei Zelllinien wiesen die getesteten Konzentrationen der Flavonoide Rutin, Hyperosid, Quercitrin und Quercetin keinerlei toxischen Effekt auf (Abb. 15, Abb. 17, Abb. 19).

Für Pseudohypericin ließ sich keine Toxizität der getesteten Konzentrationen auf die Zellen der Zelllinien BV2 (Abb. 16) und RAW 264.7 (Abb. 20) feststellen. Bei der Zelllinie N11 konnte ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Pseudohypericin eine signifikant toxische Wirkung beobachtet werden. Die Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen durch Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Pseudohypericin betrug 15 % (Abb. 18).

Hypericin erwies sich für alle drei Zelllinien ab einer Konzentration von 0,75  $\mu\text{M}$  i. A. als toxisch. Diese Hypericin-Konzentration verringerte die Lebensfähigkeit der BV2 Zellen um 15 %, der N11 Zellen um 12 % und der RAW 264.7 Zellen um 20 %.

Hyperforin wirkte auf die Zelllinie BV2 (Abb. 16) ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ , auf die Zelllinie N11 (Abb. 18) ab 1,5  $\mu\text{M}$  und auf die Zelllinie RAW 264.7 (Abb. 20) ab 0,75  $\mu\text{M}$  signifikant toxisch. In diesen Konzentrationen bewirkte Hyperforin eine durchschnittliche Abnahme der Lebensfähigkeit der BV2 Zellen um 15 %, der N11 Zellen um 20 % und der RAW 264.7 Zellen um 10 %.

Die nachgewiesene Toxizität der Inhaltsstoffe Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin legt nahe, dass die Toxizität des Gesamt-Extraktes, zumindest teilweise, auf den Gehalt an diesen drei Substanzen zurückzuführen ist.

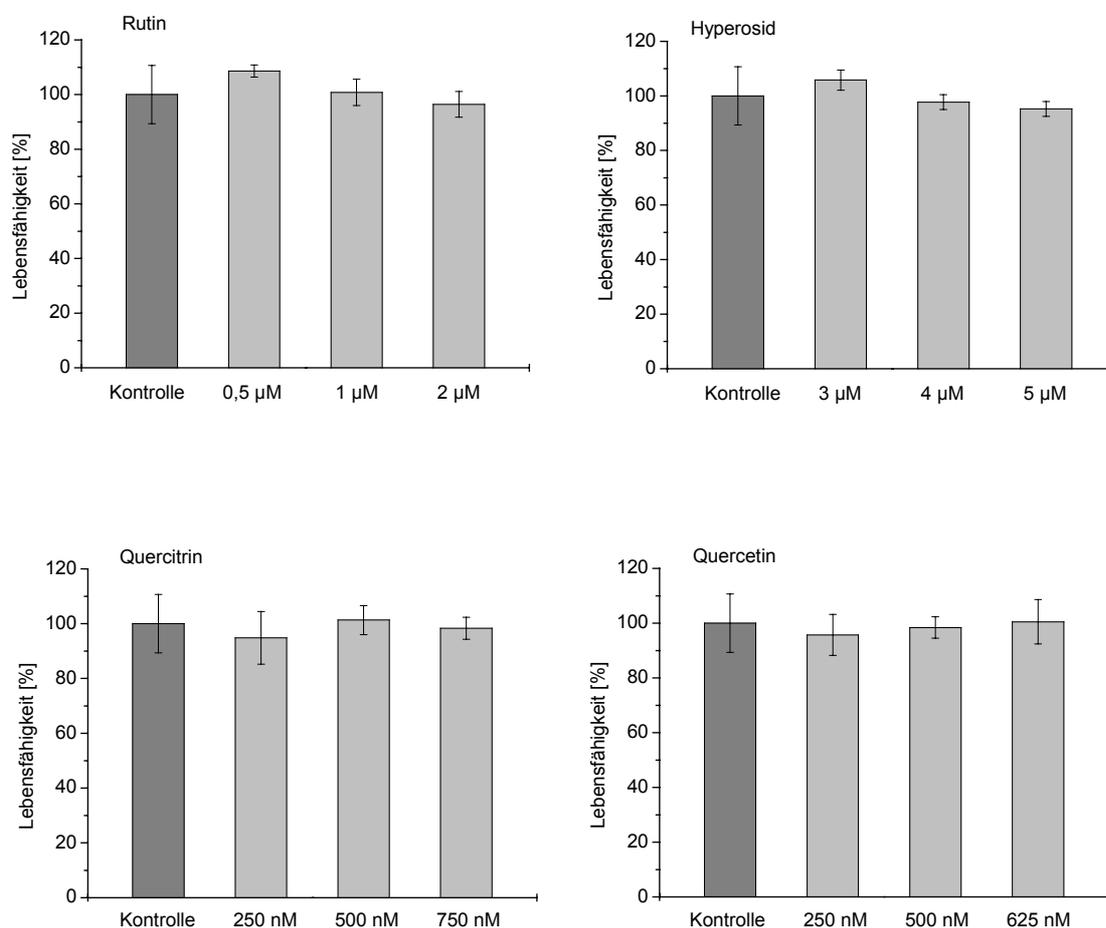


Abb. 15: Zytotoxische Wirkung verschiedener Konzentrationen der Flavonoide Rutin, Hyperosid, Quercitrin und Quercetin auf die Zelllinie **BV2**.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Die Extinktion der unbehandelten Zellen wurde 100 % gesetzt, die restlichen Werte prozentual darauf bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus  $n = 8$  Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle.

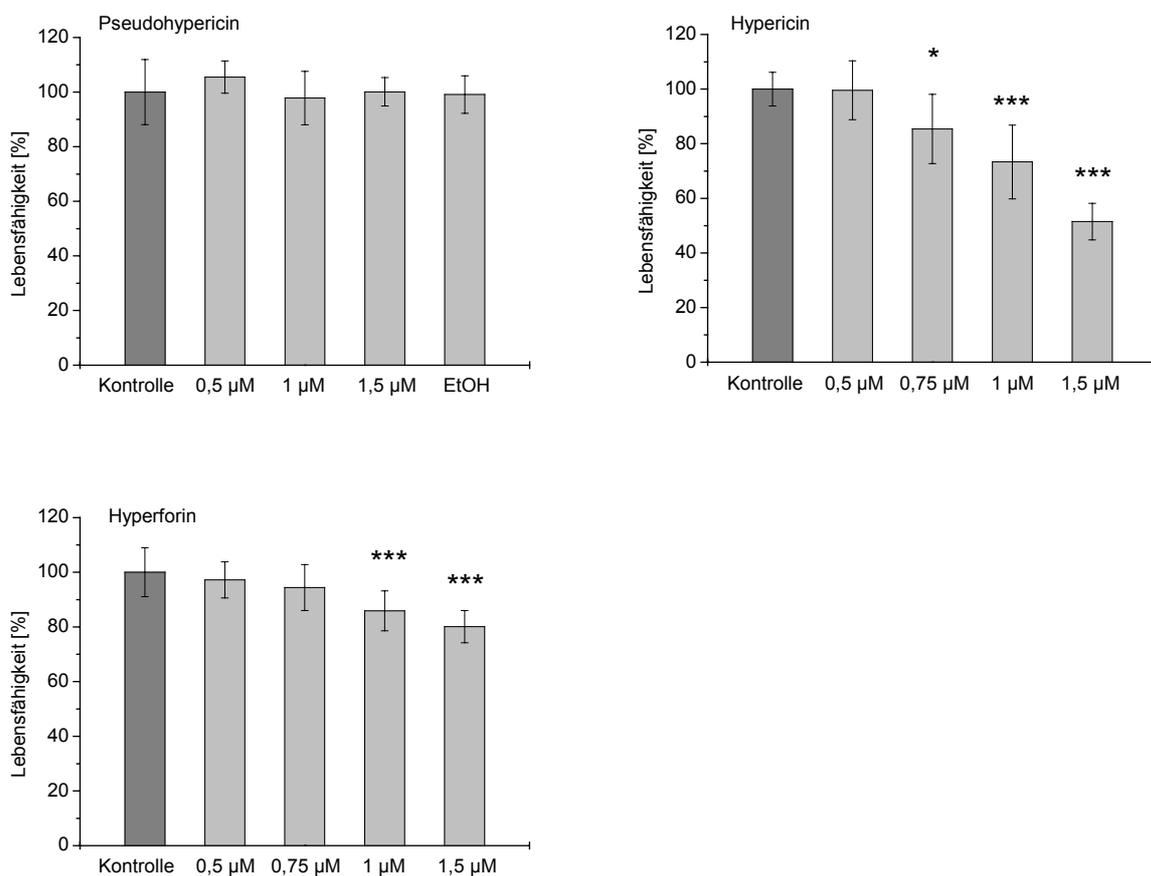


Abb. 16: Zytotoxische Wirkung verschiedener Konzentrationen von Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin auf die Zelllinie **BV2**.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen, sowie Zellen, welche nur mit 0,5 % EtOH (50 %) vorbehandelt wurden. Die Extinktion der unbehandelten Zellen wurde 100 % gesetzt, die restlichen Werte prozentual darauf bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus  $n = 8$  Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle.

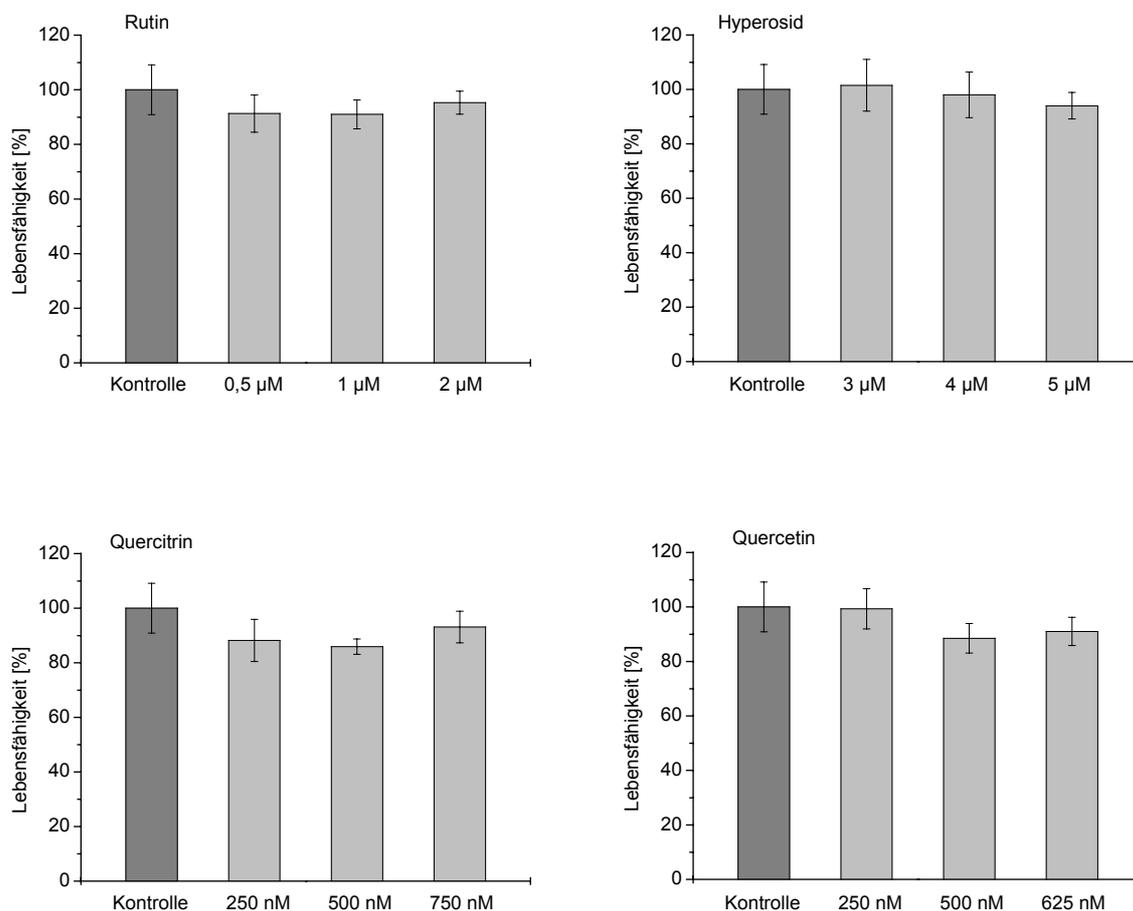


Abb. 17: Zytotoxische Wirkung verschiedener Konzentrationen der Flavonoide Rutin, Hyperosid, Quercitrin und Quercetin auf die Zelllinie **N11**.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Die Extinktion der unbehandelten Zellen wurde 100 % gesetzt, die restlichen Werte prozentual darauf bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus  $n = 8$  Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle.

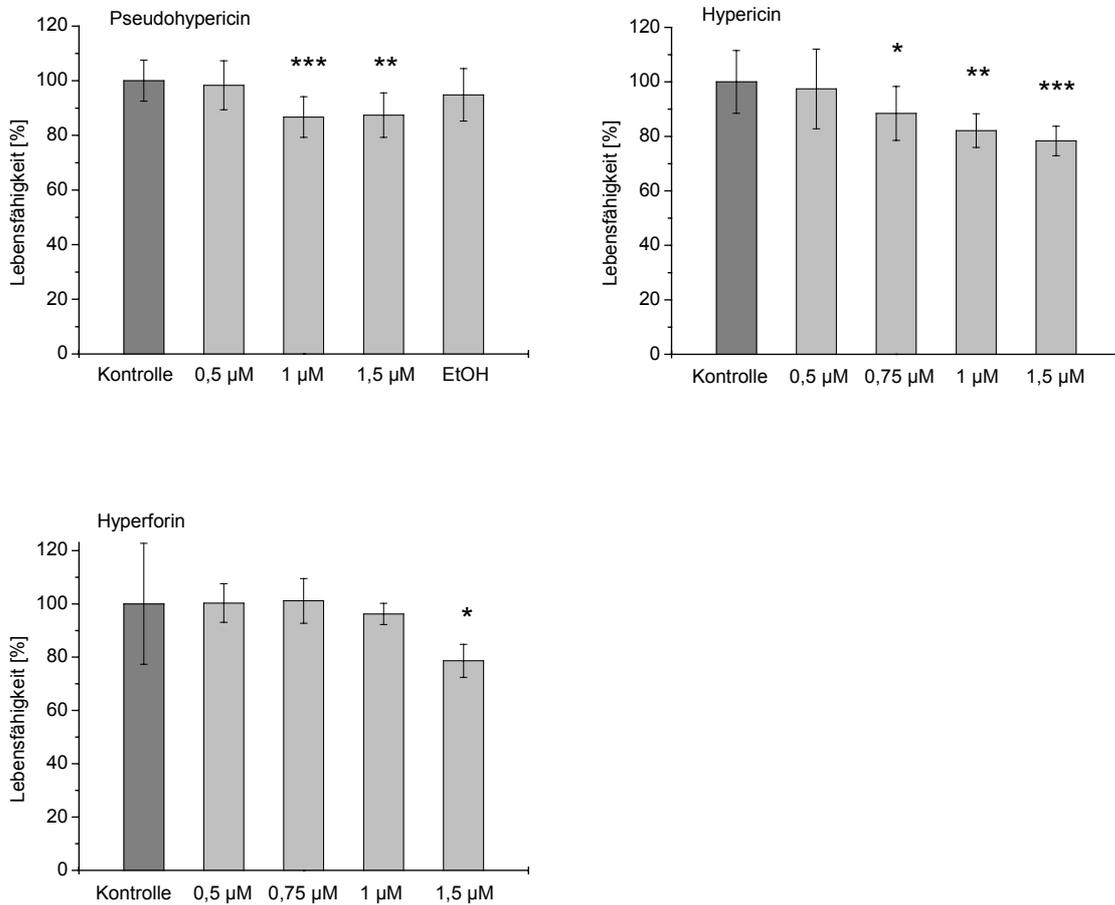


Abb. 18: Zytotoxische Wirkung verschiedener Konzentrationen von Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin auf die Zelllinie **N11**.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen, sowie Zellen, welche nur mit 0,5 % EtOH (50 %) vorbehandelt wurden. Die Extinktion der unbehandelten Zellen wurde 100 % gesetzt, die restlichen Werte prozentual darauf bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus  $n = 8$  Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle.

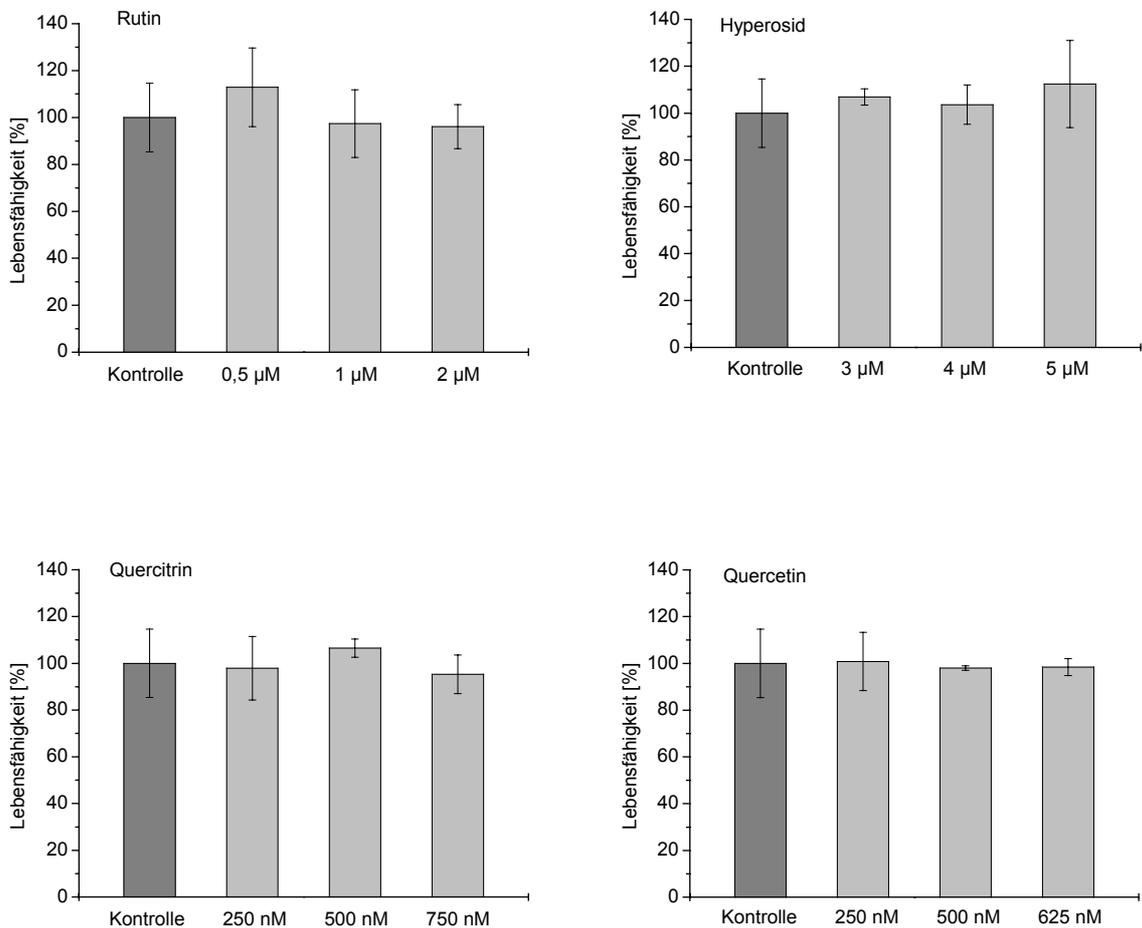


Abb. 19: Zytotoxische Wirkung verschiedener Konzentrationen der Flavonoide Rutin, Hyperosid, Quercitrin und Quercetin auf die Zelllinie **RAW 264.7**.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Die Extinktion der unbehandelten Zellen wurde 100 % gesetzt, die restlichen Werte prozentual darauf bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus  $n = 8$  Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle.

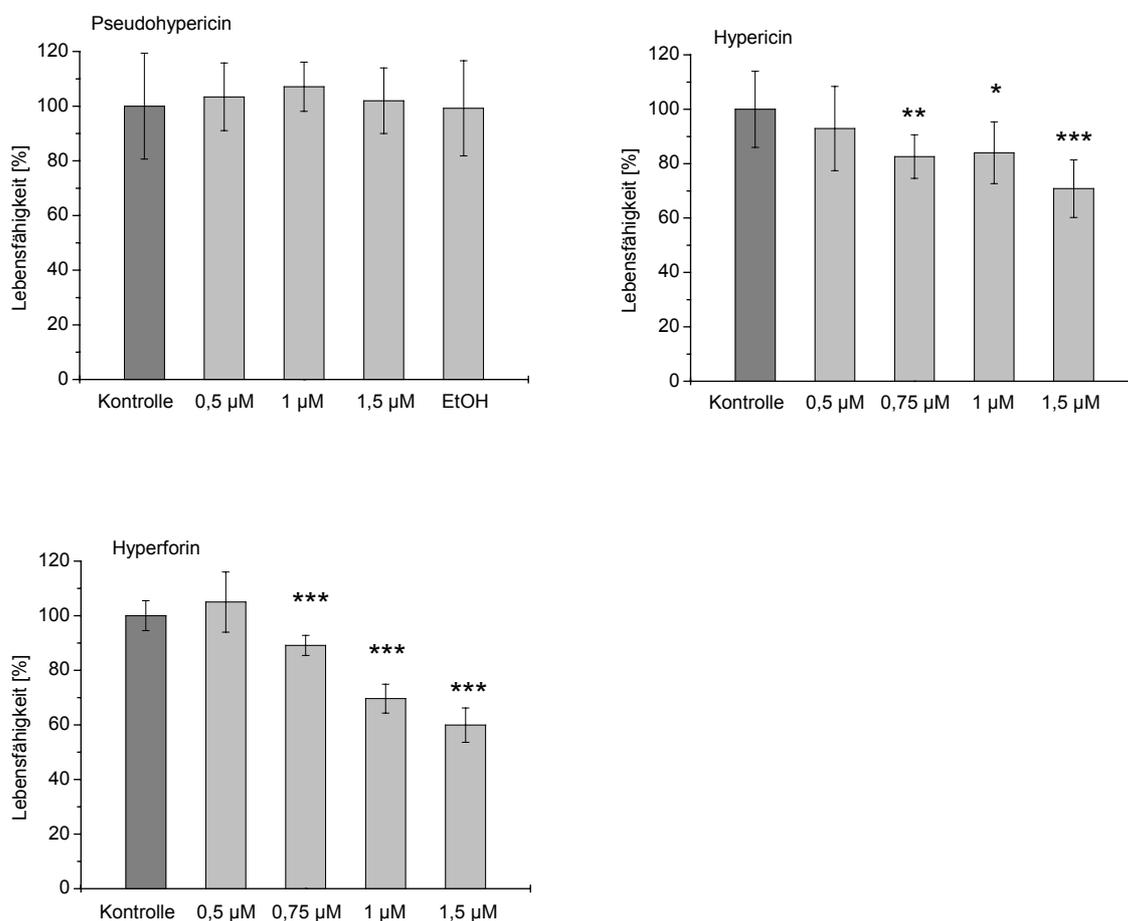


Abb. 20: Zytotoxische Wirkung verschiedener Konzentrationen von Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin auf die Zelllinie **RAW 264.7**.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen, sowie Zellen, welche nur mit 0,5 % EtOH (50 %) vorbehandelt wurden. Die Extinktion der unbehandelten Zellen wurde 100 % gesetzt, die restlichen Werte prozentual darauf bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus  $n = 8$  Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle.

## **3.2 Einfluss von *Hypericum*-Extrakt und einzelnen Inhaltsstoffen auf die NO-Bildung durch die induzierbare NO Synthase**

### **3.2.1 Toxizität von LPS, PMA, FMLP und Calcimycin**

Es ist bekannt, dass verschiedenen Substanzen Einfluss auf die Aktivität von Zellen des Immunsystems haben. Hierzu zählen unter anderem:

- Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand gram-negativer Bakterien
- Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA)
- N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP)
- Calcimycin, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor

Bevor diese Substanzen zur Aktivierung der Mikroglia verwendet werden konnten, mussten toxische Effekte der Stoffe auf die Zellen ausgeschlossen werden. Dies geschah mittels MTT-Test.

LPS (Abb. 21) zeigte auf die Zelllinie BV2 in den verwendeten Konzentrationen keine Toxizität. Bei der Zelllinie N11 konnte bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS eine tendenzielle Abnahme der Lebensfähigkeit um 10 % beobachtet werden. Die Zelllinie RAW 264.7 reagierte empfindlicher auf LPS, hier wurde ein signifikant toxischer Effekt schon bei 1  $\mu\text{g/ml}$  festgestellt. Diese Konzentration führte zu einer Abnahme der Lebensfähigkeit der RAW 264.7 Zellen um etwa 15 %.

Auch PMA (Abb. 22) zeigte auf die Zelllinie BV2 in den verwendeten Konzentrationen keine Toxizität. Bei der Zelllinie N11 ließ sich bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  PMA eine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen um 15 % beobachten. Auf die Zelllinie RAW 264.7 wirkte PMA ab einer Konzentration von 10  $\text{ng/ml}$  signifikant toxisch. Diese Konzentration verursachte eine Verringerung der Lebensfähigkeit um 12 %.

Durch fMLP (Abb. 23) kam es zu keiner Beeinträchtigung der Zelllinien BV2 und N11. Auf die Zelllinie RAW 264.7 wirkte fMLP jedoch ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M signifikant toxisch. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch diese Konzentration um 15 % verringert.

Durch Calcimycin (Abb. 24) konnte bei allen drei Zelllinien ab einer Konzentration von 100 nM eine signifikant toxische Wirkung festgestellt werden. Die Abnahme der Lebensfähigkeit bei dieser Konzentration betrug bei den BV2 Zellen 20%, bei den N11 Zellen 15 % und bei den RAW 264.7 Zellen 25 %.

LPS

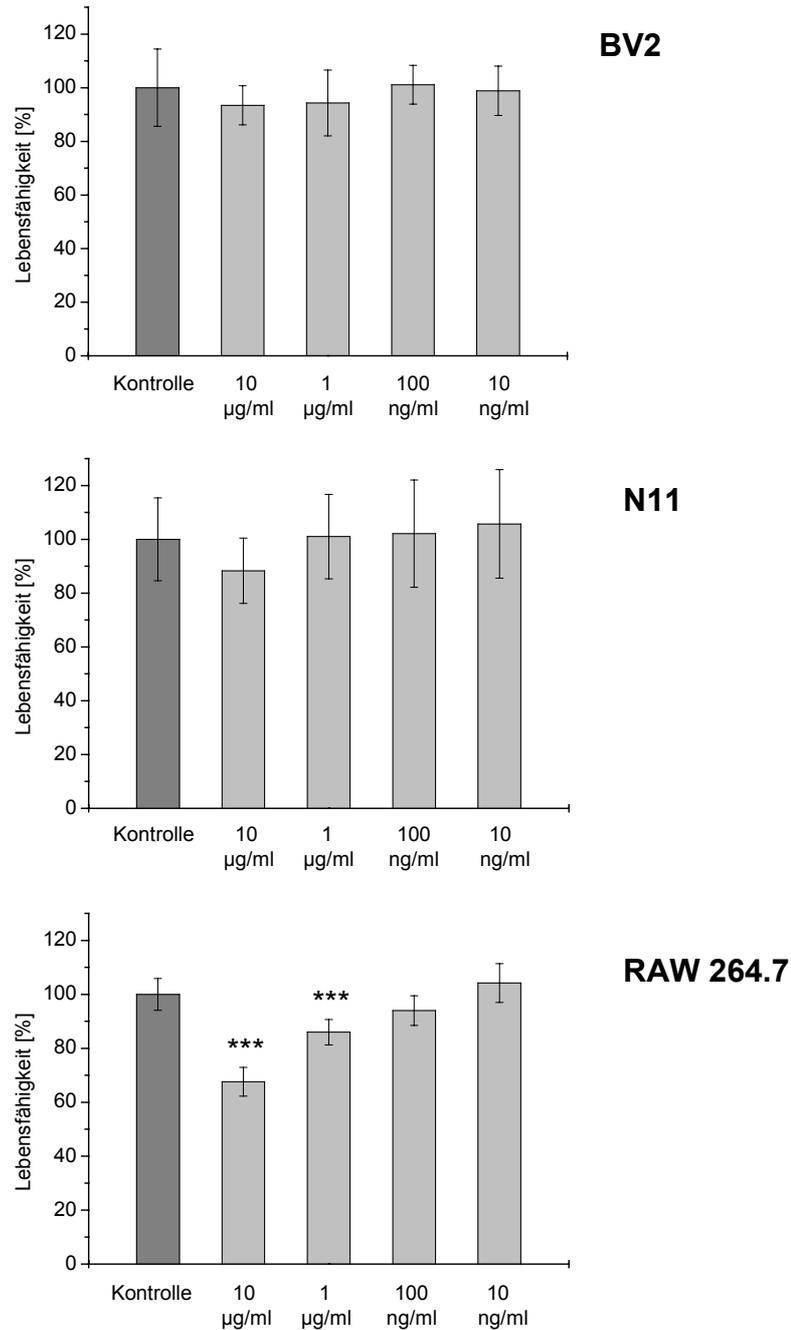


Abb. 21: Zytotoxische Wirkung von LPS in verschiedenen Konzentrationen auf die Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt, als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 8 Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle.

**PMA**

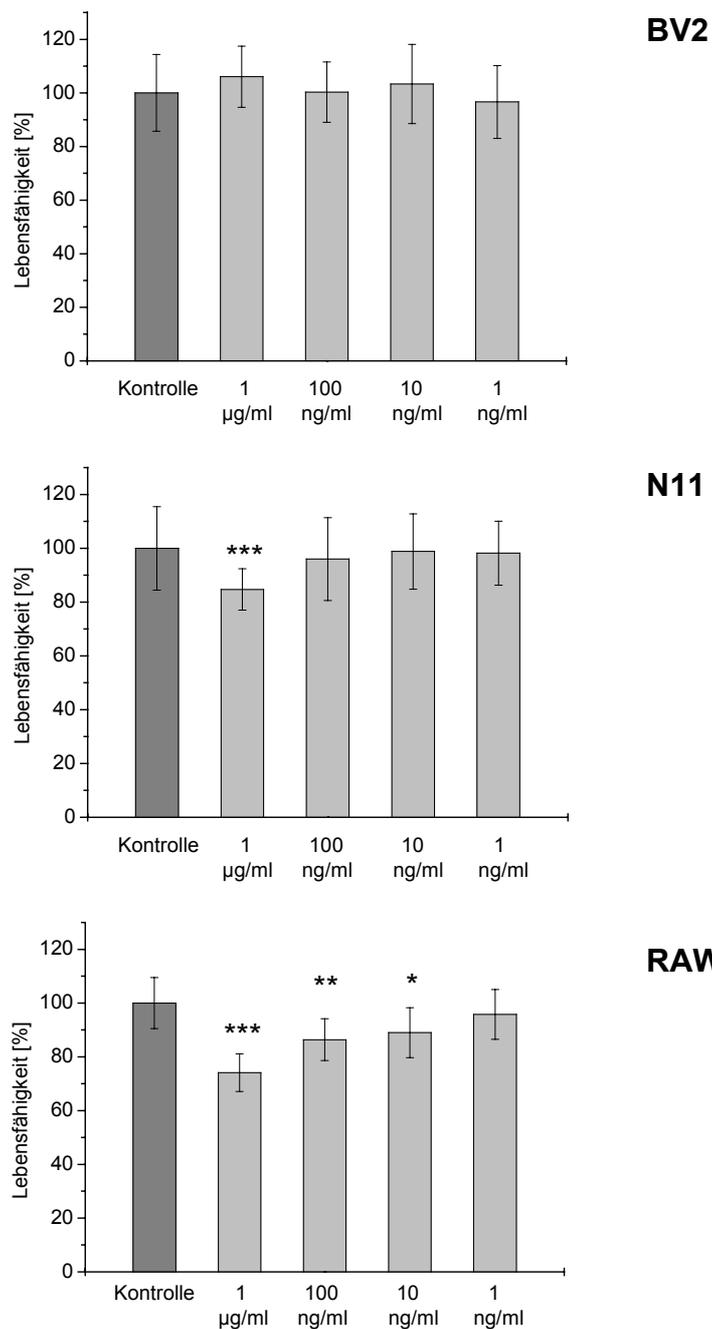


Abb. 22: Zytotoxische Wirkung von PMA in verschiedenen Konzentrationen auf die Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt, als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 8 Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle.

## fMLP

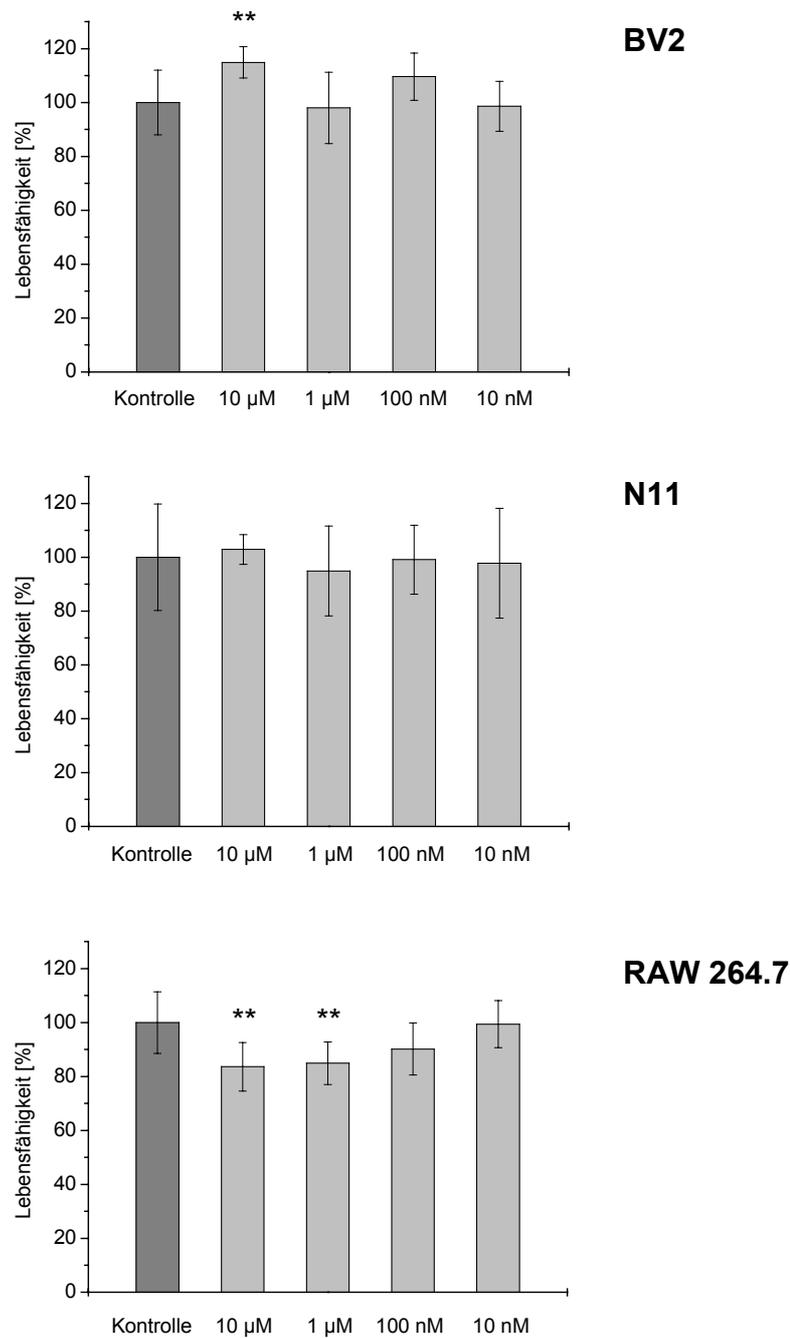


Abb. 23: Zytotoxische Wirkung von fMLP in verschiedenen Konzentrationen auf die Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt, als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus  $n = 8$  Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle.

**Calcimycin**

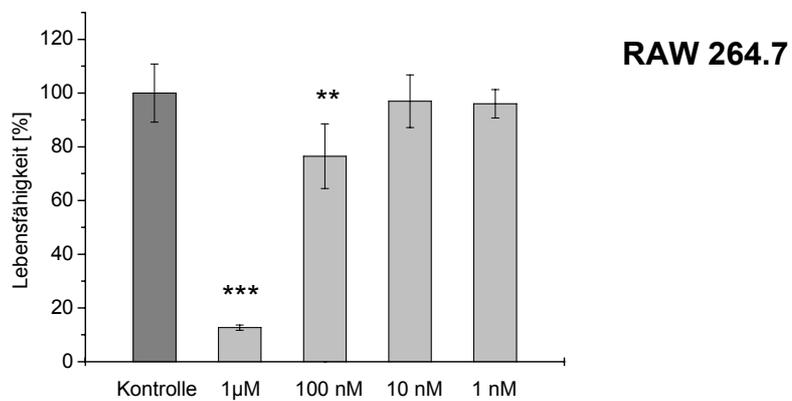
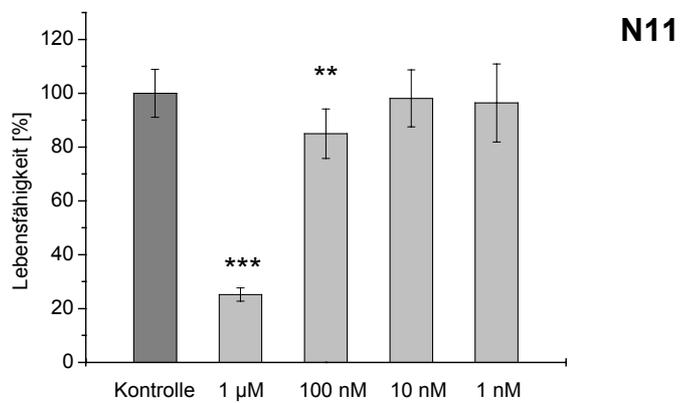
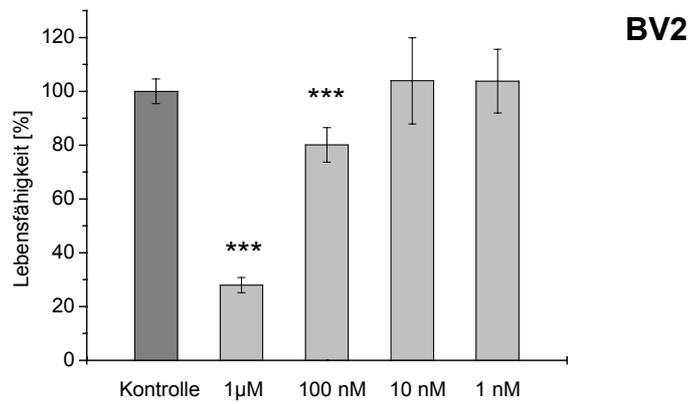


Abb. 24: Zytotoxische Wirkung von Calcimycin in verschiedenen Konzentrationen auf die Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt, als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus  $n = 8$  Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle.

Eine Übersicht über die Konzentrationen von LPS, PMA, fMLP und Calcimycin, welche für weitere Experimente verwendet wurden, gibt Tab. 8.

Tab. 8: Übersicht über die in den weiteren Experimenten verwendeten Konzentrationen von LPS, PMA, fMLP und Calcimycin.

	<b>BV2</b>	<b>N11</b>	<b>RAW</b>
<b>LPS 055:B5</b>	1 µg/ml	1 µg/ml	10 ng/ml
<b>PMA</b>	100 ng/ml	100 ng/ml	1 ng/ml
<b>fMLP</b>	1 µM	1 µM	100 nM
<b>Calcimycin</b>	10 nM	10 nM	10 nM

### 3.2.2 Induzierte NO-Bildung durch LPS, fMLP, PMA und Calcimycin

Es wurde getestet inwieweit eine Behandlung der Zellen mit LPS, fMLP, PMA bzw. Calcimycin zur NO-Bildung und somit zur Nitrit-Akkumulation im Medium führt. Dazu wurden dem Medium die in Tab. 8 angegebenen Konzentrationen an LPS, fMLP, PMA bzw. Calcimycin zugegeben und die Zellen 24 h damit inkubiert. Hierbei ließ sich feststellen, dass die Zelllinie BV2 eine Voraktivierung aufwies, d. h. es ohne jegliche Vorbehandlung der Zellen zur NO-Produktion und somit zur Nitrit-Anreicherung im Medium kam (Abb. 25). Diese Voraktivierung konnte durch Zugabe von LPS bzw. PMA noch ein wenig verstärkt werden. fMLP und Calcimycin hatten keinerlei Einfluss. Die Zelllinien N11 und RAW 264.7 wiesen keine Voraktivierung auf. Bei ihnen bewirkte nur eine Behandlung mit LPS eine Induktion der NO-Bildung. Zur Untersuchung der NO-Bildung wurde deshalb LPS als Aktivator verwendet.

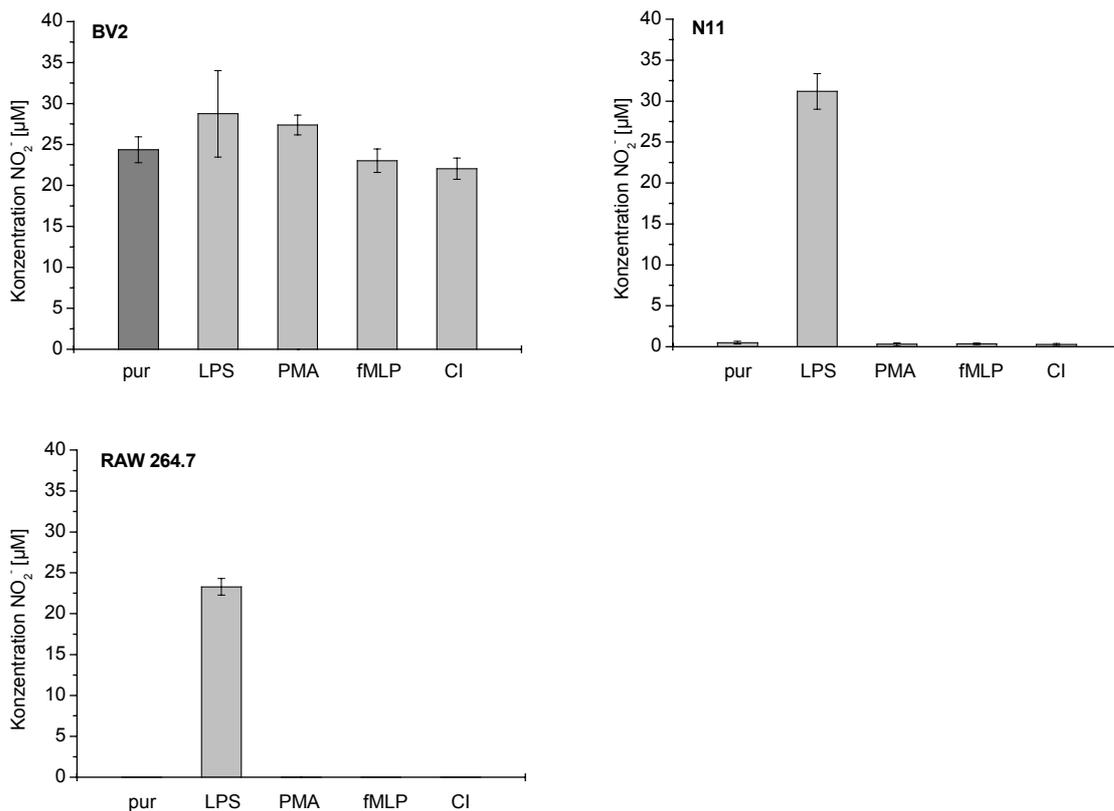


Abb. 25: Nitrit-Gehalt des Mediums nach 24-stündiger Inkubation der verschiedenen Zelllinien mit LPS, PMA, fMLP bzw. Calcimycin (CI). Die Bestimmung der Nitrit-Konzentration erfolgte mittels Griess-Reaktion. Dargestellt ist der Mittelwert aus  $n = 8$  Parallelen mit Standardabweichung.

### **3.2.3 Zeitlicher Verlauf der Nitrit-Akkumulation und Einfluss verschiedener Konzentrationen der Extrakte 1, 2 und 3**

Durch eine Bestimmung des Nitrit-Gehaltes des Mediums zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 9, 12 und 24 h nach Zugabe von 1 µg/ml (BV2, N11) bzw. 10 ng/ml (RAW 264.7) LPS konnte die zeitliche Entwicklung der NO-Bildung verfolgt werden. Hierdurch sollte auch der optimale Zeitpunkt für die Untersuchung der NO-Bildung für weitere Versuche festgelegt werden.

Wie schon in Kapitel 3.2.2 festgestellt, wies die Zelllinie BV2 eine Voraktivierung auf, wodurch es auch ohne LPS Behandlung schon ab dem Zeitpunkt 0 zu einem stetigen Anstieg des Medium-Nitrit-Gehaltes kam. Durch Inkubation der Zellen mit LPS wurde eine leichte Erhöhung der NO-Produktion und somit des Nitrit-Gehaltes des Mediums bewirkt (Abb. 26).

Die Zelllinien N11 und RAW wiesen keine Voraktivierung auf, ohne LPS Behandlung konnte kein Nitrit im Medium nachgewiesen werden. Bei ihnen wurde der Beginn der NO-Produktion ca. 3-6 h nach Gabe des LPS beobachtet (Abb. 27 und Abb. 28). Die EtOH Kontrolle zeigte keinerlei Beeinflussung der NO-Bildung. Bis zum 24 h Messwert konnte bei allen drei Zelllinien ein stetiger Anstieg der Nitritkonzentration des Mediums beobachtet werden.

Durch eine Vorbehandlung der Zellen mit den Extrakten 1B, 1C, 2C, 2D, 3C und 3D (siehe Kapitel 2.1.3) konnte eine verschieden starke Hemmung der NO-Bildung bewirkt werden. Bei der Zelllinie BV2 wurde durch alle verwendeten Extrakte und Verdünnungen eine deutliche Reduktion der NO-Bildung bewirkt (Abb. 26). Ebenso gut ließ sich auch die Voraktivierung der Zellen hemmen. Bei den Zelllinien N11 (Abb. 27) und RAW 264.7 (Abb. 28) kam es nur durch eine Vorbehandlung der Zellen mit den Extrakten 1B, 1C, 2C und 3C zu einer Hemmung der NO-Bildung. Die Extrakte 2D und 3D zeigten keinen Einfluss. Bei allen Zelllinien brachte die Vorbehandlung mit Extrakt 1B die stärkste Hemmung der NO-Bildung und somit der Nitrit-Akkumulation.

Aufgrund seiner guten Verträglichkeit und Wirksamkeit wurde der Extrakt 1B für alle weiteren Versuche verwendet. Die Bestimmung der NO-Bildung erfolgte in den restlichen Versuchen nach 24 h. Für diesen Zeitpunkt ergaben sich die größten Werte für die Hemmung der NO-Bildung.

# Ergebnisse

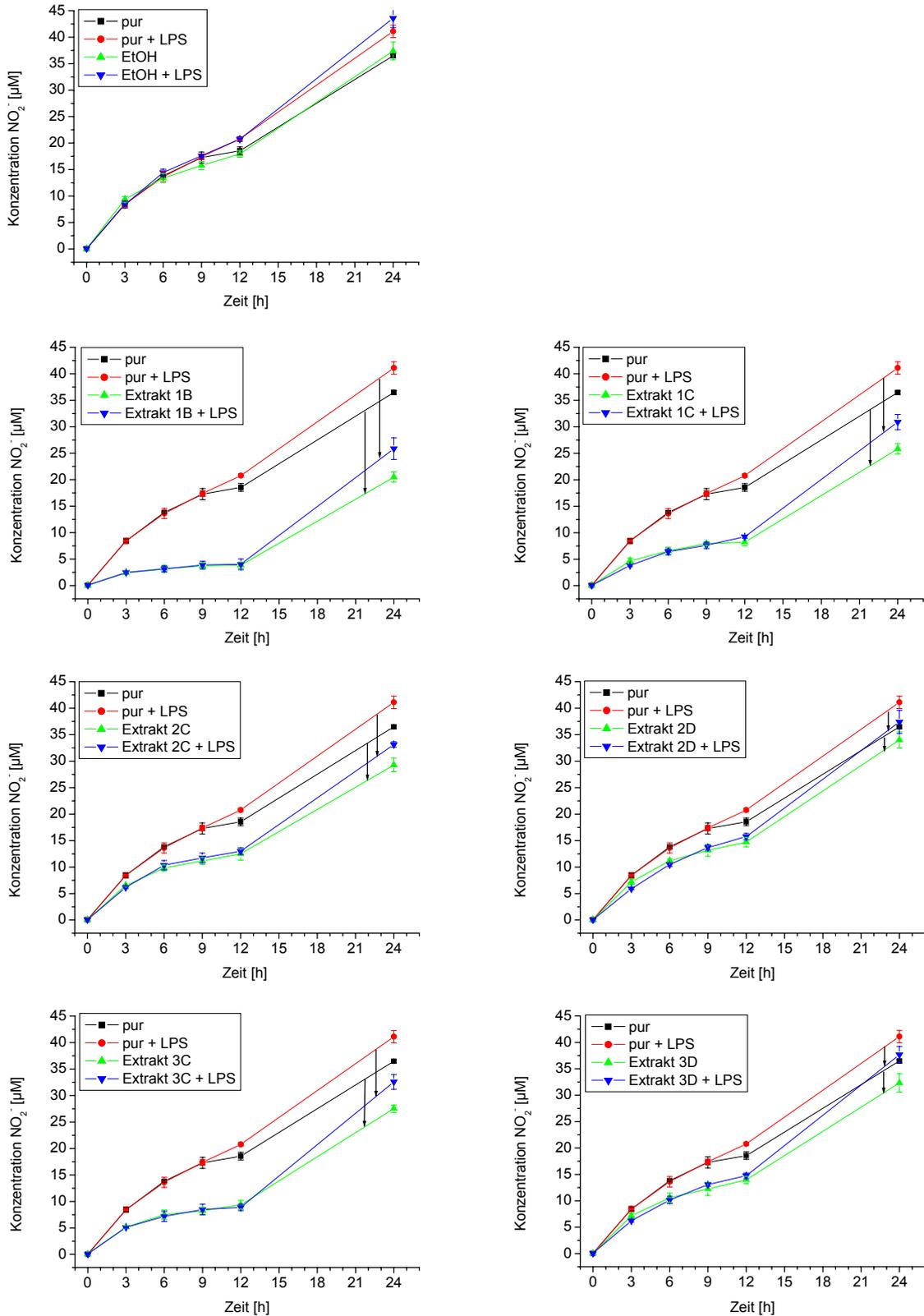


Abb. 26: Zeitlicher Verlauf der Nitrit-Akkumulation im Medium der Zelllinie **BV2** und deren Hemmung durch die Extrakte 1B, 1C, 2C, 2D, 3C, 3D. Die Messdaten bei 0, 3, 6, 9, 12 h berechnen sich aus  $n = 8$  Parallelen und sind dargestellt mit Standardabweichung. Die schwarzen Pfeile wurden zur Verdeutlichung der Abnahme eingezeichnet.

# Ergebnisse

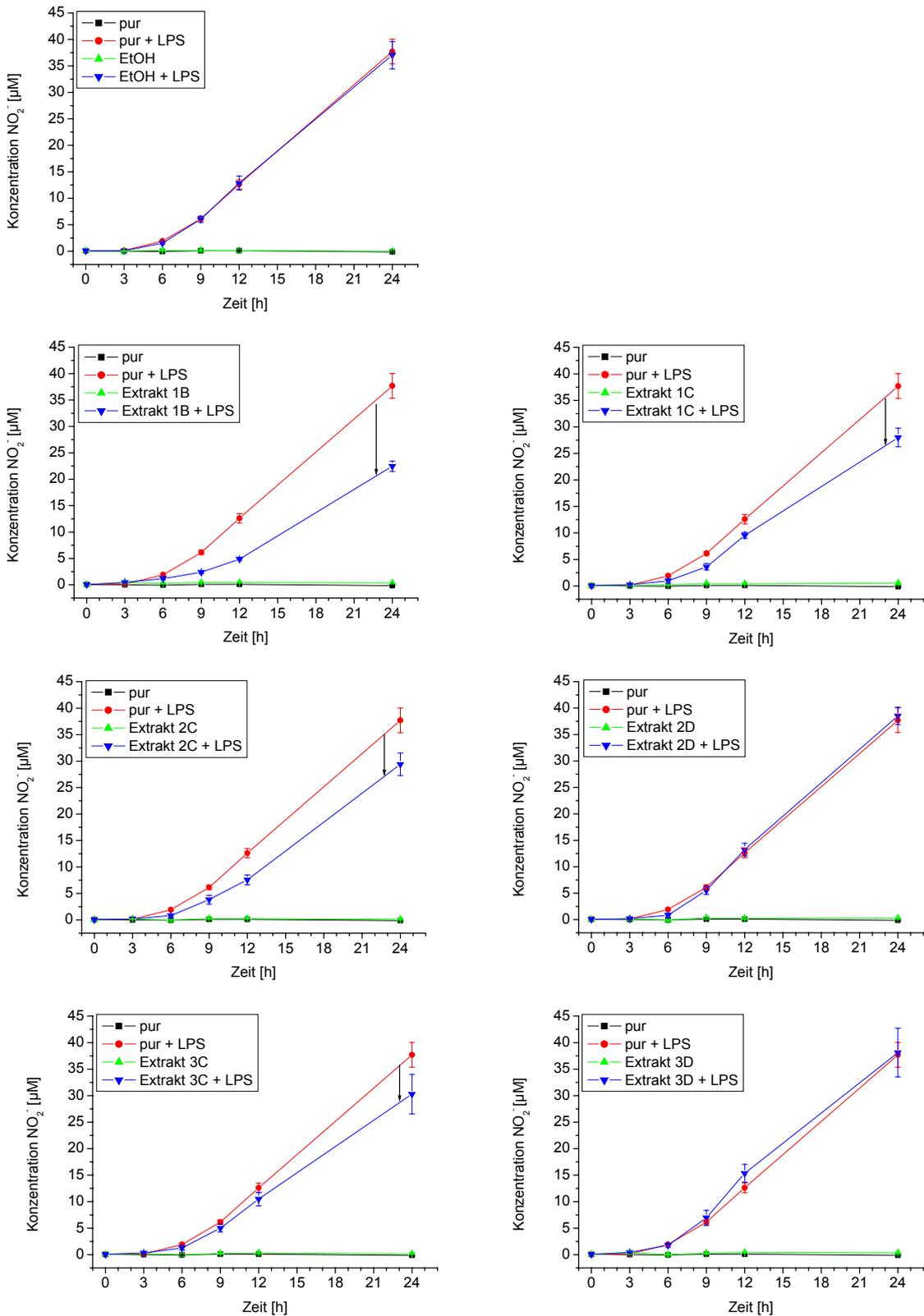


Abb. 27: Zeitlicher Verlauf der Nitrit-Akkumulation im Medium der Zelllinie **N11** und deren Hemmung durch die Extrakte 1B, 1C, 2C, 2D, 3C, 3D. Die Messdaten bei 0, 3, 6, 9, 12 h berechnen sich aus  $n = 8$  Parallelen und sind dargestellt mit Standardabweichung. Die schwarzen Pfeile wurden zur Verdeutlichung der Abnahme eingezeichnet.

# Ergebnisse

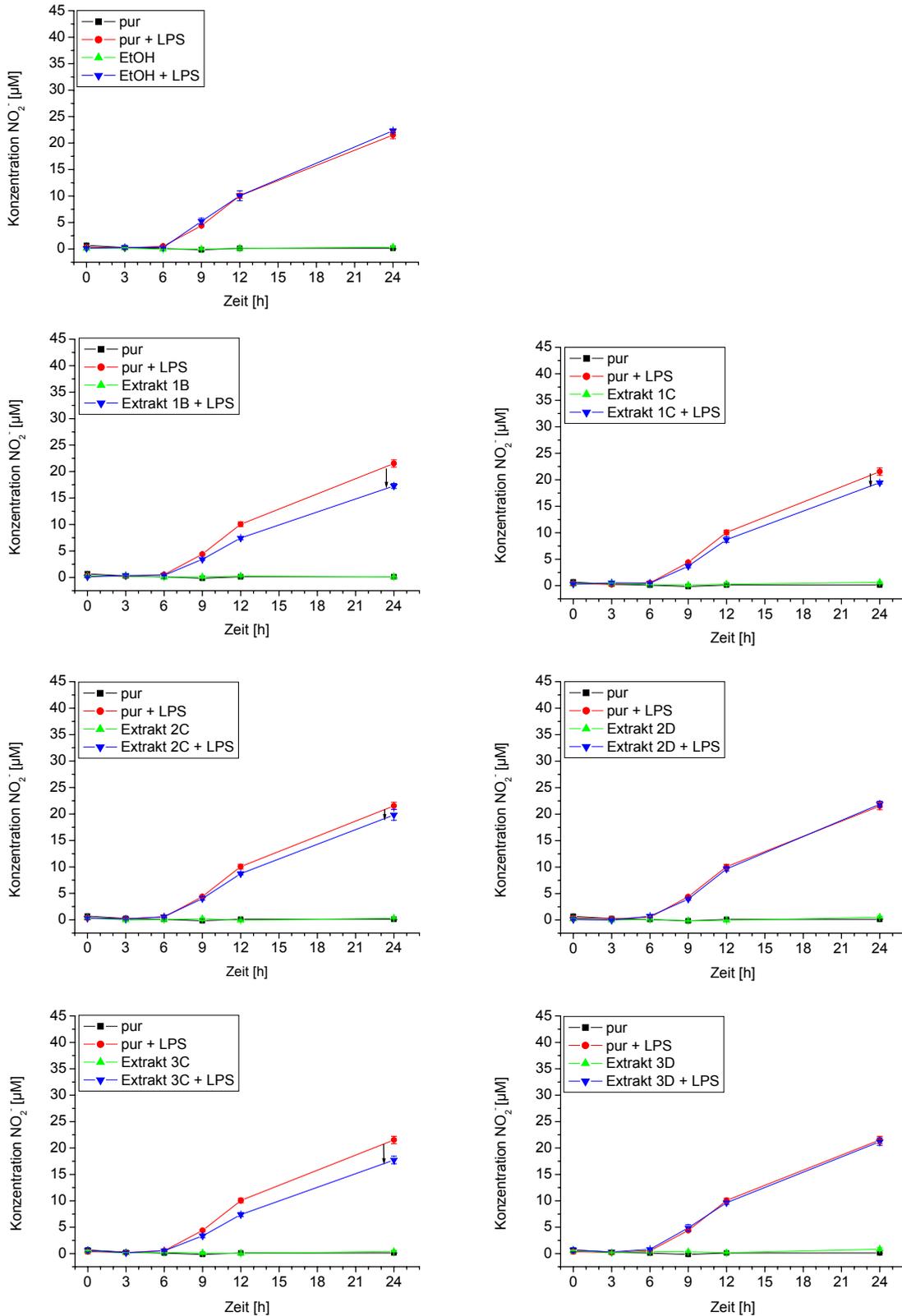


Abb. 28: Zeitlicher Verlauf der Nitrit-Akkumulation im Medium der Zelllinie **RAW 264.7** und deren Hemmung durch die Extrakte 1B, 1C, 2C, 2D, 3C, 3D. Die Messdaten bei 0, 3, 6, 9, 12 h berechnen sich aus  $n = 8$  Parallelen und sind dargestellt mit Standardabweichung. Die schwarzen Pfeile wurden zur Verdeutlichung der Abnahme eingezeichnet.

### 3.2.4 Einfluss einzelner Inhaltsstoffe auf die NO-Bildung

Um herauszufinden, ob der hemmende Einfluss von Johanniskraut-Extrakt auf bestimmte Inhaltsstoffe zurückzuführen ist, wurde die hemmende Wirkung des Extraktes 1B auf die durch LPS induzierte NO-Bildung mit der Wirkung von einzelnen Inhaltsstoffen verglichen. Verwendet wurden die Einzelsubstanzen Rutin, Hyperosid, Quercitrin, Quercetin, Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin in dem Extrakt 1B entsprechenden Konzentrationen. Die verwendeten Konzentrationen sind Tab. 9 zu entnehmen.

Tab. 9: Konzentrationen einzelner Inhaltsstoffe des *Hypericum*-Extraktes 1B.

<b>Einzelsubstanz</b>	<b>Konzentration Extrakt 1B [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>entspricht Konzentration im Ansatz [<math>\mu\text{M}</math>]</b>
Rutin	173,7	0,87
Hyperosid + Isoquercitrin	403,8	2,42
Quercitrin	39,2	0,20
Quercetin	27,5	0,14
Pseudohypericin	28,3	0,14
Hypericin	13,9	0,07
Hyperforin	46,3	0,23

Bei der Zelllinie BV2 kam es durch eine 24-stündige LPS-Behandlung zu einer durchschnittlichen Nitritkonzentration des Mediums von 35-40  $\mu\text{M}$ . Diese konnte durch eine Vorbehandlung der Zellen mit *Hypericum*-Extrakt 1B auf durchschnittlich 15-25  $\mu\text{M}$  reduziert werden (Abb. 29-31).

Bei der Zelllinie N11 wurde durch die LPS-Behandlung eine durchschnittliche Nitritkonzentration von 55-60  $\mu\text{M}$  erreicht. Durch die Vorbehandlung mit *Hypericum*-Extrakt 1B konnte eine Reduktion auf durchschnittlich 35-45  $\mu\text{M}$  erreicht werden (Abb. 29-31).

Die LPS-Gabe führte bei der Zelllinie RAW 264.7 zu einer durchschnittlichen Medium-Nitritkonzentration von 25-30  $\mu\text{M}$ , welche durch *Hypericum*-Extrakt 1B auf durchschnittlich 15-20  $\mu\text{M}$  gehemmt werden konnte (Abb. 29-31).

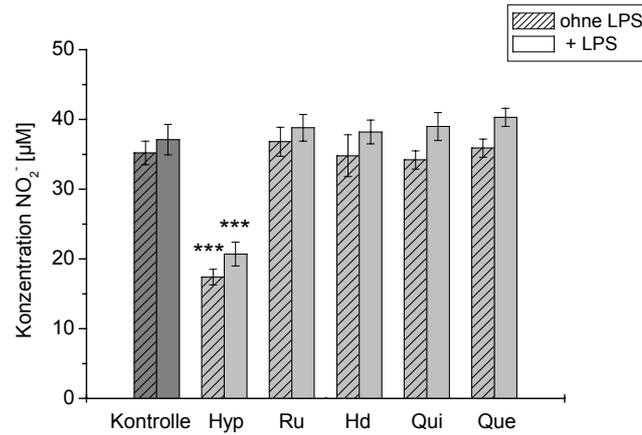
Die Vorbehandlung der Zellen mit den Flavonoiden Rutin, Hyperosid, Quercitrin und Quercetin zeigte bei keiner der Zelllinien einen Einfluss auf die NO-Bildung (Abb. 29). Auch Pseudohypericin, Hypericin und EtOH hatten keine Auswirkungen auf die NO-Bildung der drei Zelllinien (Abb. 30).

Eine Vorbehandlung der Zellen mit Hyperforin bewirkte bei allen Zelllinien eine signifikante Reduktion der Medium-Nitritkonzentration, wobei die dem Extrakt 1B entsprechende Konzentration (0,25  $\mu\text{M}$ ) jedoch nicht ebenso stark hemmend wirkte wie der Extrakt 1B selbst (Abb. 31). Die hemmende Wirkung des *Hypericum*-Extrakts auf die NO-Bildung kann demnach nicht auf die alleinige Wirkung von Hyperforin zurückgeführt werden.

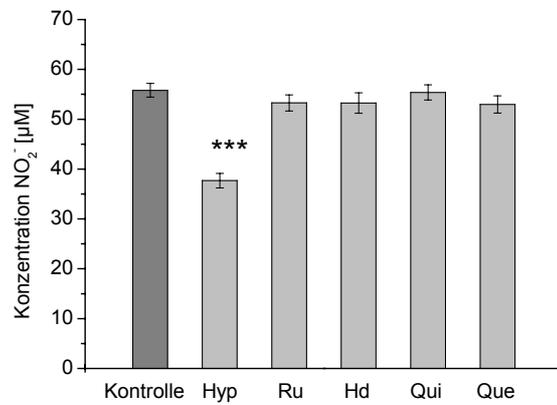
Die NO-Bildung konnte durch Hyperforin konzentrationsabhängig gehemmt werden. Der  $\text{IC}_{50}$  (die Konzentration, bei welcher die NO- und somit die Nitrit-Bildung der Zellen um 50 % gehemmt wird) betrug für die nicht mit LPS vorbehandelten BV2 Zellen 0,521  $\mu\text{M}$ , für die mit LPS aktivierten BV2 Zellen 0,616  $\mu\text{M}$  Hyperforin. Für die Zelllinie N11 ließ sich ein  $\text{IC}_{50}$  Wert von 0,717  $\mu\text{M}$  und für die Zelllinie RAW 264.7 von 0,428  $\mu\text{M}$  Hyperforin berechnen.

Die Nitrit-Konzentration des Mediums wurde durch die höchste verwendete Hyperforin-Konzentration von 0,75  $\mu\text{M}$  bei der Zelllinie BV2 von ca. 40  $\mu\text{M}$  auf ca. 15  $\mu\text{M}$ , bei der Zelllinie N11 von ca. 60  $\mu\text{M}$  auf ca. 37  $\mu\text{M}$  und bei der Zelllinie RAW 264.7 von ca. 32  $\mu\text{M}$  auf ca. 8  $\mu\text{M}$  reduziert (Abb. 31).

BV2



N11



RAW 264.7

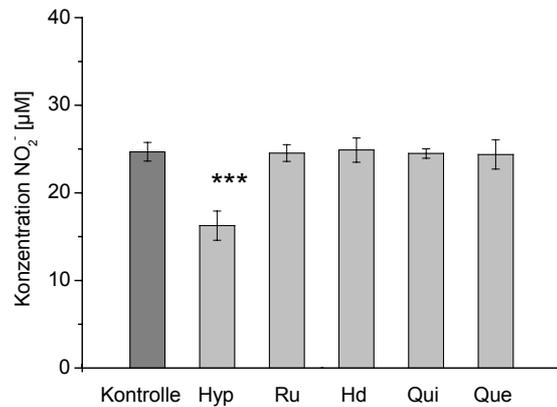
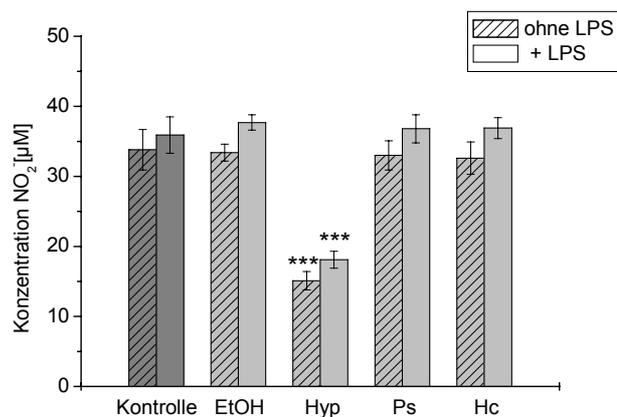
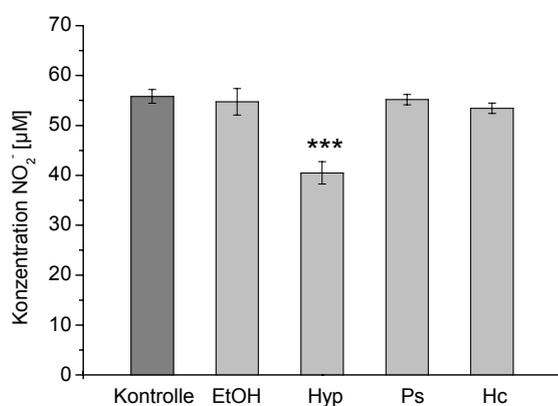


Abb. 29: Einfluss der Flavonoide Rutin (Ru), Hyperosid (Hd), Quercitrin (Qui) und Quercetin (Que) auf die durch LPS induzierte NO-Bildung und daraus resultierende Nitrit-Akkumulation im Medium der Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7, im Vergleich zu *Hypericum*-Extrakt 1B (Hyp). Die Werte berechnen sich aus n = 8 Parallelen und sind dargestellt mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle.

BV2



N11



RAW 264.7

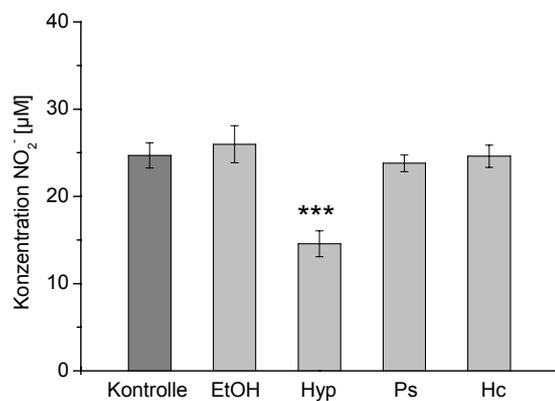
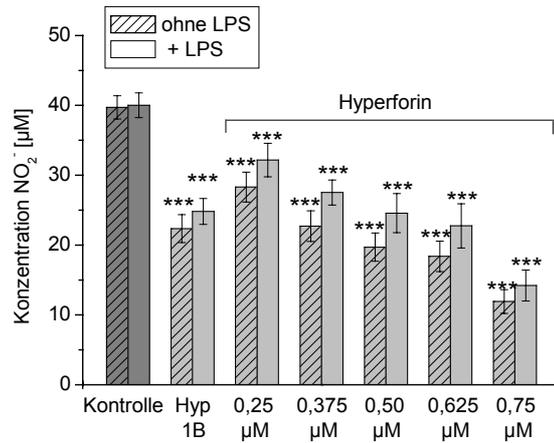
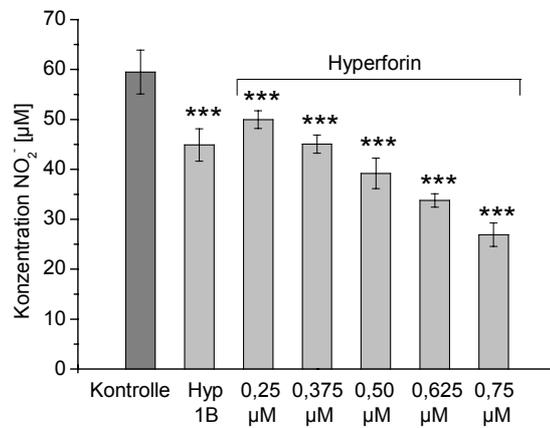


Abb. 30: Einfluss von Pseudohypericin (Ps), Hypericin (Hc) und EtOH auf die durch LPS induzierte NO-Bildung und daraus resultierende Nitrit-Akkumulation im Medium der Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7, im Vergleich zu *Hypericum*-Extrakt 1B (Hyp). Die Werte berechnen sich aus n = 8 Parallelen und sind dargestellt mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle.

BV2



N11



RAW 264.7

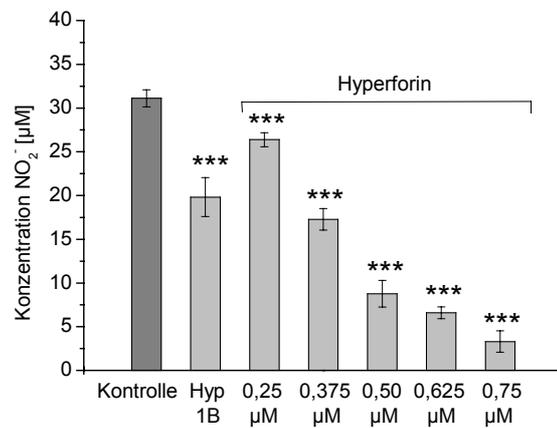


Abb. 31: Einfluss von Hyperforin in verschiedenen Konzentrationen auf die durch LPS induzierte NO-Bildung und daraus resultierende Nitrit-Akkumulation im Medium der Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7, im Vergleich zu *Hypericum*-Extrakt 1B (Hyp 1B). Die Werte berechnen sich aus n = 8 Parallelen und sind dargestellt mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle.

### 3.2.5 Einfluss der Einzelsubstanz-Mischungen

Zur Erfassung möglicher synergistischer Effekte der Einzelsubstanzen wurden die Einzelsubstanz-Mischungen Mix 1 (Rutin, Hyperosid, Quercitrin, Quercetin), Mix 2 (Pseudohypericin, Hypericin, Hyperforin) und Mix 3 (Flavonoide, Pseudohypericin, Hypericin, Hyperforin) auf ihre Wirkung auf die NO-Bildung, und somit die Nitrit-Akkumulation im Medium, untersucht (Abb. 32).

Mix 1 führte bei keiner der Zelllinien zu einer Verringerung der Nitrit-Konzentration des Mediums. Bei den Zelllinien BV2 und RAW 264.7 kam es sogar zu einer signifikant verstärkten Nitrit-Bildung. Die Nitrit-Konzentration des Mediums wurde bei den BV2 Zellen um durchschnittlich 10 %, bei den RAW 264.7 Zellen um 15 % erhöht.

Mix 2 und Mix 3 bewirkten bei allen drei Zelllinien eine signifikante Reduktion der durch LPS induzierten NO-Bildung. Die durch die Voraktivierung der Zelllinie BV2 hervorgerufene Nitrit-Bildung konnte jedoch durch keine der Einzelsubstanz-Mischungen signifikant beeinflusst werden. Nur Mix 2 zeigte hier eine leichte Tendenz zur Hemmung der NO-Bildung von etwa 8 %.

Die durch LPS induzierte NO-Produktion der Zelllinie BV2 wurde durch Mix 2 besser gehemmt als durch Mix 3. Es erfolgte eine Verringerung der Nitrit-Konzentration um 30 % durch Mix 2 und um 20 % durch Mix 3.

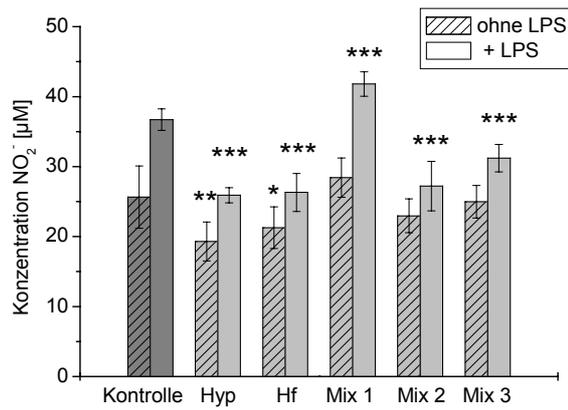
Mix 2 und Mix 3 wiesen in ihrer Wirkung auf die Medium-Nitritkonzentration der Zelllinien N11 und RAW 264.7 keine signifikanten Unterschiede auf. Bei den N11 Zellen erfolgte durch beide Mischungen eine Verringerung der Nitrit-Konzentration um 20-25 %, bei den RAW 264.7 Zellen um 25-30%.

Betrachtet man die Wirkungen der Mischungen Mix 2 und Mix 3, verglichen mit der des Hyperforins, so lassen sich keine signifikanten Unterschiede oder eine geringere Hemmung der NO-Produktion als durch Hyperforin feststellen.

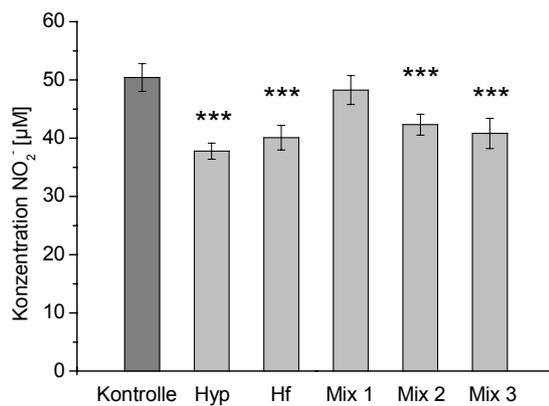
Die hemmende Wirkung des Hyperforins auf die NO-Produktion der Zellen wird demnach von keiner der verwendeten Einzelsubstanzen verstärkt, es kommt teilweise sogar eher zu einer Verringerung der Wirkung.

## Ergebnisse

BV2



N11



RAW 264.7

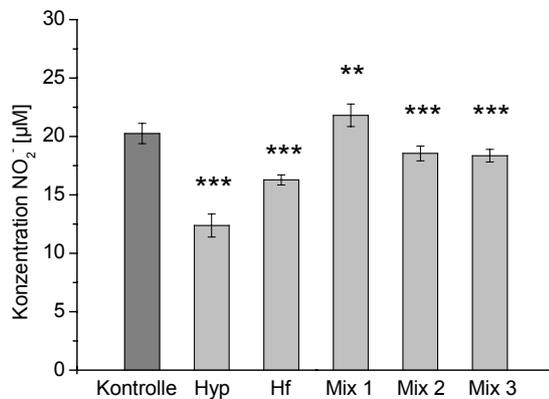


Abb. 32: Einfluss der Einzelsubstanz-Mischungen Mix 1, Mix 2 und Mix 3 auf die durch LPS induzierte NO-Bildung und daraus resultierende Nitrit-Akkumulation im Medium der Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7, im Vergleich mit *Hypericum*-Extrakt 1B (Hyp) und der dem Extrakt 1B entsprechenden Hyperforin-Konzentration (Hf). Die Werte berechnen sich aus  $n = 8$  Parallelen und sind dargestellt mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle.

### 3.3 Beeinflussung der Phagozytose

#### 3.3.1 Absolute Phagozytoseaktivität

Für die Untersuchung der Phagozytoseaktivität wurden den Zellen verschiedene Fluoreszenzfarbstoff-markierte Partikel zur Phagozytose angeboten. Verwendet wurden hierbei Zymosan, opsonisiertes Zymosan, LPS, *E. coli* und *S. aureus* Partikel, welche dem Medium zugegeben und für 2 h von den Zellen aufgenommen werden konnten. Außerdem wurde die Phagozytose von Amyloid  $\beta$  1-40 untersucht, welches für 18 h mit den Zellen inkubiert wurde.

Durch die Phagozytose der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Partikel kommt es zur Fluoreszenz der Zellen. Die Auswertung erfolgte anhand der Fluoreszenz der Zellen im FACS. Hierbei wurden der Anteil der fluoreszierenden Zellen, welche Partikel aufgenommen hatten, und der Anteil der nicht fluoreszierenden Zellen, welche keine Partikel aufgenommen hatten, betrachtet. Die Abbildungen 33 bis 36 zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Zelllinien nach Phagozytose der angebotenen Partikel.

**N11**

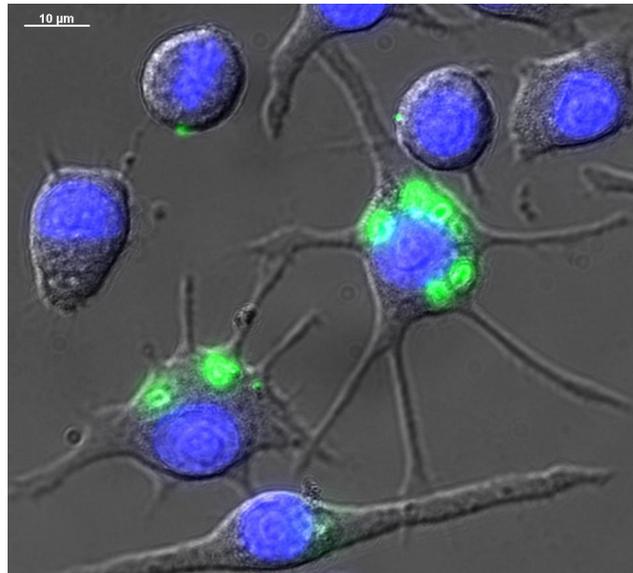
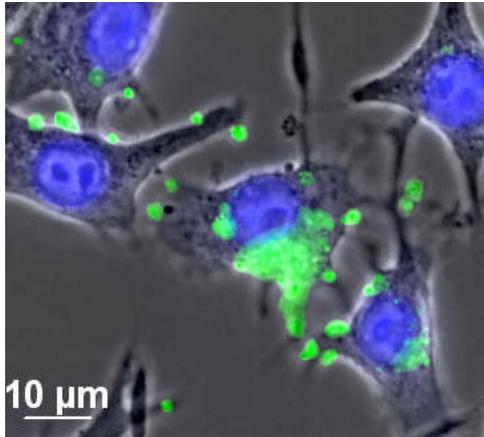


Abb. 33: Phagozytose von Zymosan Bodipy FL Konjugat (grün). Die Zellkernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Überlagerung von Interferenzkontrast, grüner und blauer Fluoreszenz.

**N11**



**RAW 264.7**

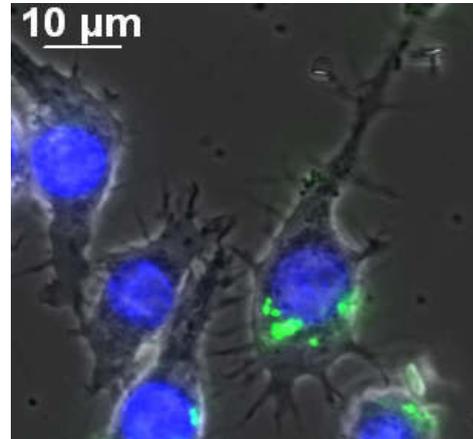
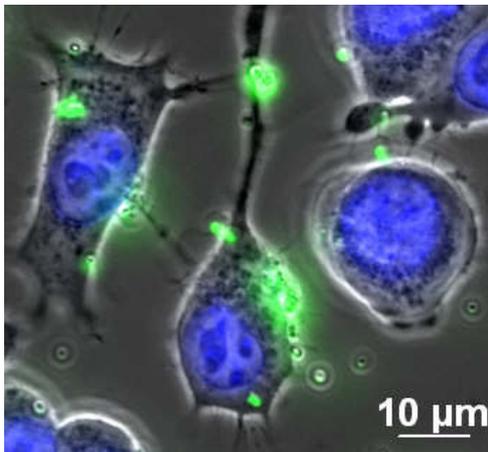


Abb. 34: Phagozytose von *E. coli* Bodipy FL Konjugat (grün). Die Zellkernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Überlagerung von Phasenkontrast, grüner und blauer Fluoreszenz.

**BV2**



**N11**

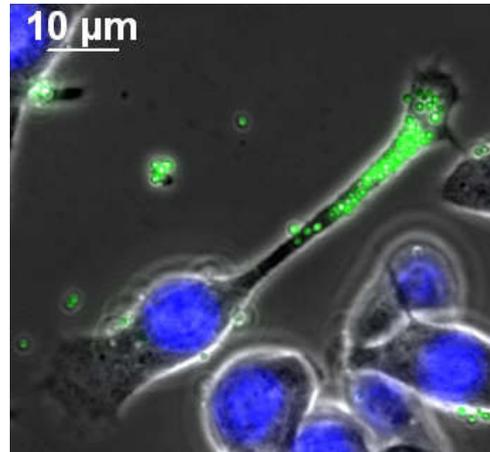
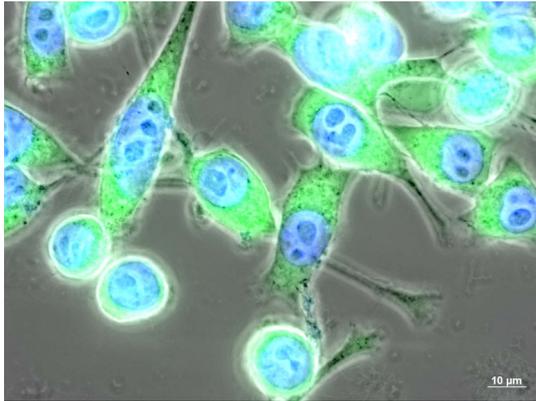
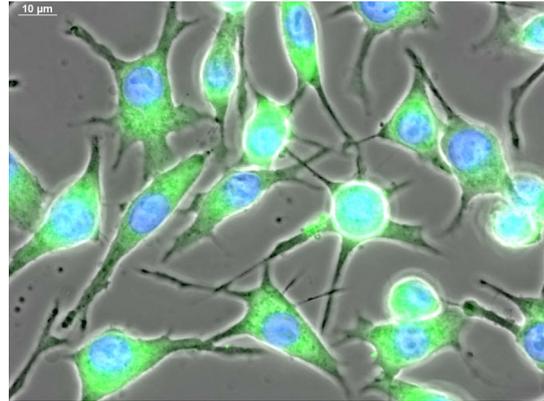


Abb. 35: Phagozytose von *S. aureus* Bodipy FL Konjugat (grün). Die Zellkernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Überlagerung von Phasenkontrast, grüner und blauer Fluoreszenz.

**BV2**



**N11**



**RAW 264.7**

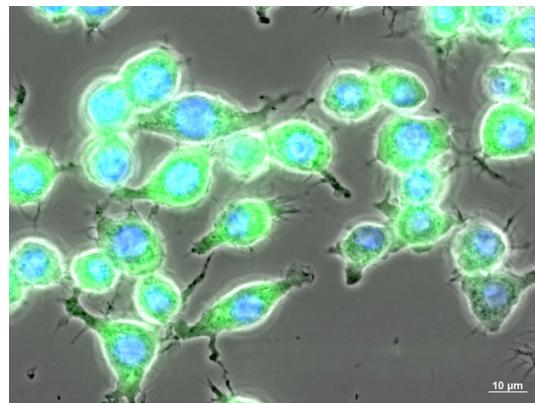


Abb. 36: Phagozytose von LPS Bodipy FL Konjugat (grün). Die Zellkernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Überlagerung von Phasenkontrast, grüner und blauer Fluoreszenz.

**N11**

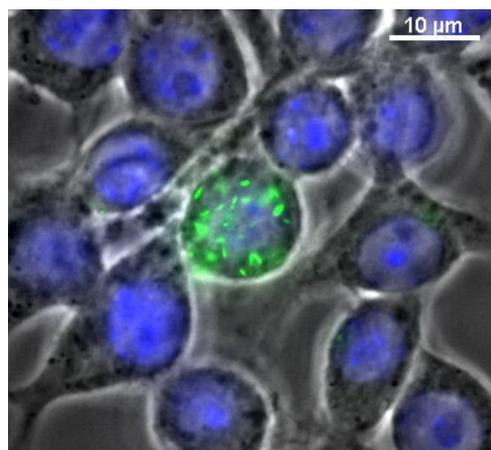


Abb. 37: Phagozytose von Fluorescein-Amyloid  $\beta$  1-40 (grün). Die Zellkernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Überlagerung von Phasenkontrast, grüner und blauer Fluoreszenz.

Wie der Abb. 38 zu entnehmen ist, wurden die verschiedenen Partikel von den drei Zelllinien unterschiedlich gut aufgenommen. Der Anteil an Zellen, welche nach 2 h mindestens einen Partikel phagozytiert hatten, war bei allen Zelllinien bei der Phagozytose der Zymosan-Partikel am geringsten, gefolgt von opsonisiertem Zymosan, den *E. coli* Partikeln und den *S. aureus* Partikeln.

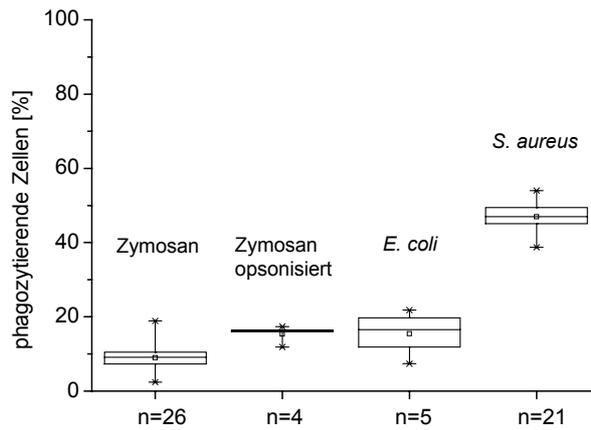
Die LPS-Partikel waren nach 2 h Inkubation immer von 100 % der betrachteten Zellen aller drei Zelllinien phagozytiert worden. Diese Daten sind deshalb in den Graphiken nicht enthalten.

Der Anteil an Zellen der Zelllinie BV2 (Abb. 38 oben), welche nach 2 h mindestens einen Partikel phagozytiert hatten, lag bei Zymosan durchschnittlich bei 8-10 %, bei opsonisiertem Zymosan bei 17 %, bei den *E. coli* Partikeln bei 12-20 % und bei den *S. aureus* Partikeln bei 45-50 %.

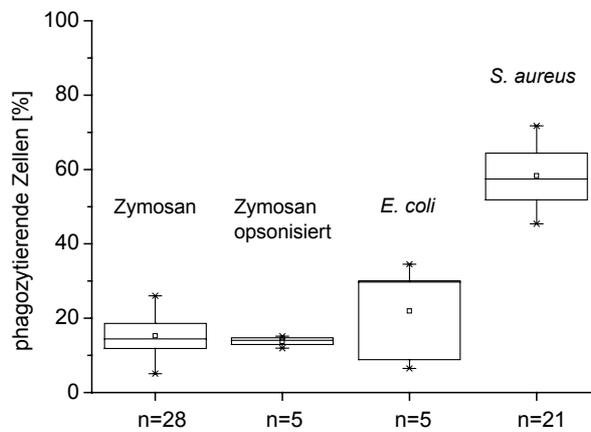
Der Anteil der phagozytotisch aktiven Zellen der Zelllinie N11 (Abb. 38 Mitte) lag bei Zymosan durchschnittlich bei 12-19 %, bei opsonisiertem Zymosan bei 13-16 %, bei den *E. coli* Partikeln bei 10-30 % und bei den *S. aureus* Partikeln bei 52-65 %.

Der Anteil an Zellen der Zelllinie RAW 264.7 (Abb. 38 unten), welche während der Inkubationszeit Partikel phagozytierten, lag bei Zymosan durchschnittlich bei 9-13 %, bei opsonisiertem Zymosan bei 11-14 %, bei den *E. coli* Partikeln bei 38-52 % und bei den *S. aureus* Partikeln bei 75-82 %.

BV2



N11



RAW 264.7

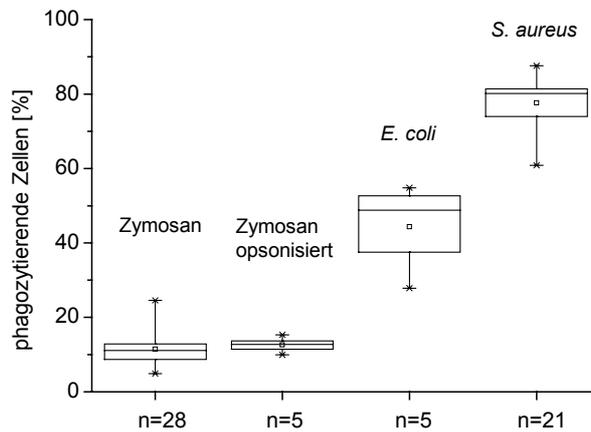


Abb. 38: Anteil der Zellen [%] der Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7, welcher nach 2 h Inkubationszeit mindestens einen fluoreszenzmarkierten Partikel phagozytiert hatte. Die Ergebnisse sind dargestellt als Box-Plots mit einem Box-Bereich von 25-75 %, die Whiskers zeigen den Maximal- und Minimalwert an. Die Anzahl n der unabhängigen Versuche findet sich unter dem jeweiligen Box-Plot.

### **3.3.2 Einfluss von *Hypericum*-Extrakt auf die Phagozytoseaktivität**

Um die Wirkung von *Hypericum*-Extrakt auf die Phagozytose zu untersuchen, wurden die Zellen vor der Inkubation mit den verschiedenen Partikeln für 24 h mit *Hypericum*-Extrakt 1B behandelt. Durch diese Vorbehandlung wurde die Phagozytoseaktivität der Zellen unterschiedlich stark beeinflusst.

Bei der Zelllinie BV2 (Abb. 39 oben) konnte die Phagozytose von Zymosan Partikeln, verglichen mit nicht vorbehandelten Zellen, um durchschnittlich 28-68 %, von opsonisierten Zymosan Partikeln um 8-12 %, von *E. coli* Partikeln um 15-25 % und von *S. aureus* Partikeln um 12-27 % verringert werden. Die Phagozytose der LPS Partikel ließ im Mittel keine Beeinflussung erkennen.

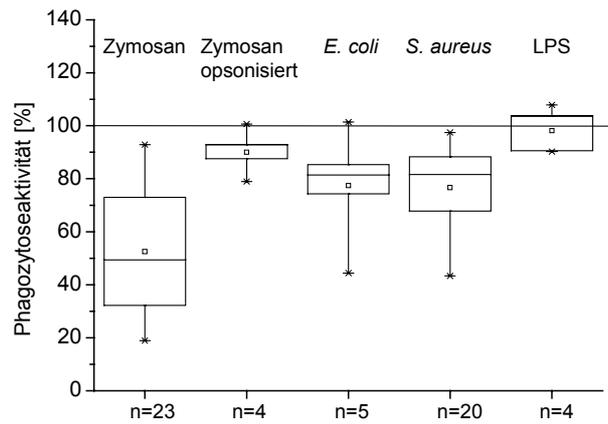
Bei der Zelllinie N11 (Abb. 39 Mitte) ließ sich eine Hemmung der Phagozytose der Zymosan Partikel um durchschnittlich 2-22 %, der *E. coli* Partikel um 24-44 % und der *S. aureus* Partikel um 3-14 % erreichen. Die Phagozytose des opsonisierten Zymosans und der LPS Partikel konnte nicht gehemmt werden.

Bei der Zelllinie RAW 264.7 (Abb. 39 unten) konnte die Phagozytose der Zymosan Partikel durchschnittlich um 43-61 %, der *E. coli* Partikel um 22-25 %, der *S. aureus* Partikel um 10-16 % und der LPS Partikel um 5-10 % gemindert werden. Die Phagozytose der opsonisierten Zymosan Partikel wurde nicht beeinflusst.

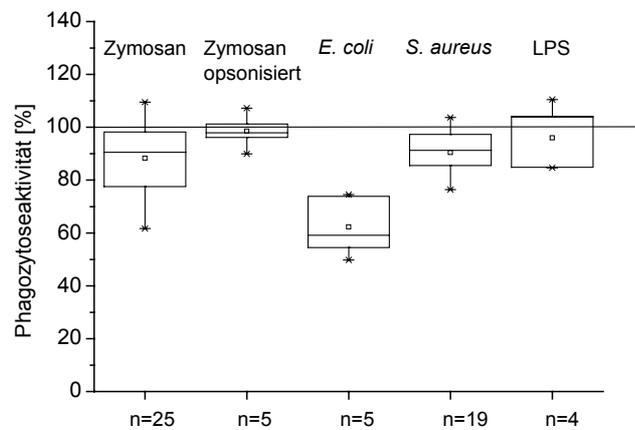
Der *Hypericum*-Extrakt zeigte keinerlei hemmende Wirkung (Quenching) auf die Fluoreszenz der angebotenen Partikel (Daten nicht dargestellt). Diese Fehlerquelle konnte somit ausgeschlossen werden.

## Ergebnisse

BV2



N11



RAW 264.7

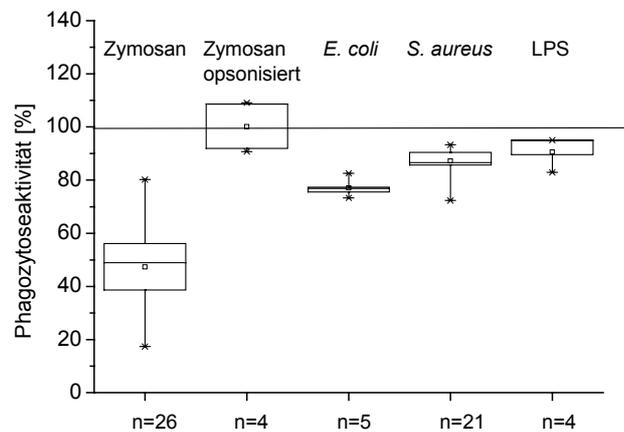


Abb. 39: Verbleibende Phagozytoseaktivität [%] der Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7 nach Vorbehandlung mit *Hypericum*-Extrakt 1B, bezogen auf nicht vorbehandelte Zellen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Box-Plots mit einem Box-Bereich von 25-75 %, die Whiskers zeigen den Maximal- und Minimalwert an. Die Anzahl n der unabhängigen Versuche findet sich unter dem jeweiligen Box-Plot.

### 3.3.3 Einfluss der Einzelsubstanzen auf die Phagozytose von Zymosan und *S. aureus*

Der Einfluss einzelner Inhaltsstoffe wurde nur auf die Phagozytose von Zymosan und *S. aureus* Partikel untersucht. Getestet wurden die Einzelsubstanzen Rutin, Hyperosid, Quercitrin, Quercetin, Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin, jeweils in den dem Extrakt 1B entsprechenden Konzentrationen. Für Hyperforin wurden auch höhere, nicht toxische Konzentrationen getestet, da sich Hyperforin bei der Hemmung der NO Bildung als effektiv erwiesen hatte.

Die Flavonoide und die EtOH Kontrolle zeigten bei allen drei Zelllinien keinerlei Einfluss auf die Phagozytose von Zymosan (Abb. 40) und *S. aureus* Partikeln (Abb. 42).

Bei der Phagozytose von Zymosan konnte bei der Zelllinie BV2 (Abb. 41 oben) durch Pseudohypericin und Hypericin keine Hemmung erreicht werden. Es erfolgte statt dessen eine Anregung der Phagozytose von 20 % durch Pseudohypericin und von 10-15 % durch Hypericin.

Durch Hyperforin konnte in der dem Extrakt entsprechenden Konzentration von 0,25  $\mu\text{M}$  kein Einfluss beobachtet werden. Allerdings ließ sich bei höheren Konzentrationen (0,5-0,75  $\mu\text{M}$ ) eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phagozytose erreichen. Eine Hyperforin-Konzentration von 0,625  $\mu\text{M}$  bewirkte im Mittel die gleiche Wirkung wie der *Hypericum*-Extrakt. Bei einer Konzentration von 0,75  $\mu\text{M}$  Hyperforin konnte die Phagozytose sogar, stärker als durch den Gesamt-Extrakt, um durchschnittlich bis zu 60-72 % reduziert werden.

Bei der Zelllinie N11 hatten Pseudohypericin und Hypericin keinen Einfluss auf die Phagozytose von Zymosan (Abb. 41 Mitte).

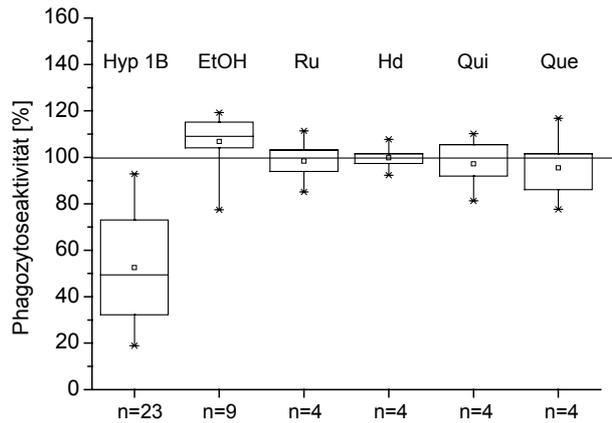
Auch Hyperforin zeigte in den Konzentrationen 0,25  $\mu\text{M}$  und 0,5  $\mu\text{M}$  keinen Effekt. Bei einer Konzentration von 0,625  $\mu\text{M}$  und 0,75  $\mu\text{M}$  ließ sich eine leichte Hemmung von durchschnittlich 8 % bzw. 12 % erkennen.

Bei der Phagozytose von Zymosan ergab sich bei der Zelllinie RAW 264.7 (Abb. 41 unten) eine schwache Hemmung von durchschnittlich 7-10 % durch Pseudohypericin und eine leichte Anregung von 2-10 % durch Hypericin.

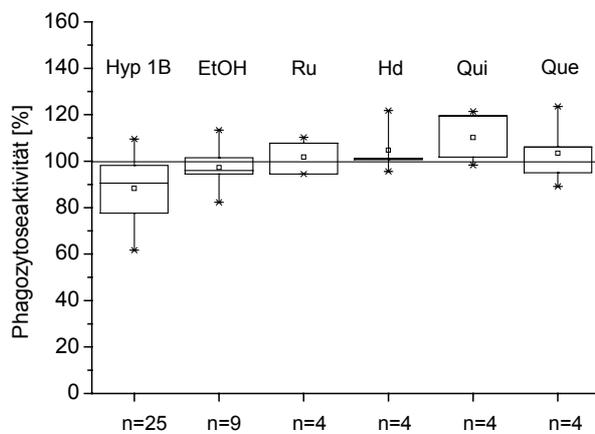
Durch Hyperforin konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phagozytose von Zymosan Partikeln bewirkt werden. Die dem Extrakt entsprechende Konzentration an Hyperforin zeigte eine leichte Hemmung der Phagozytose bis zu 10 %. Eine dem *Hypericum*-Extrakt entsprechende Hemmung der Phagozytose wurde durch eine Hyperforin-Konzentration von 0,625  $\mu\text{M}$  erreicht. Eine Konzentration von 0,75  $\mu\text{M}$  Hyperforin führte zu einer Hemmung von 85-90 %, und war somit stärker wirksam als der Gesamt-Extrakt.

## Ergebnisse

BV2



N11



RAW 264.7

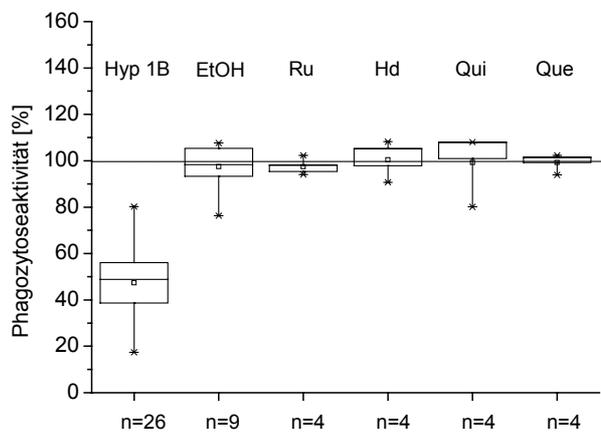
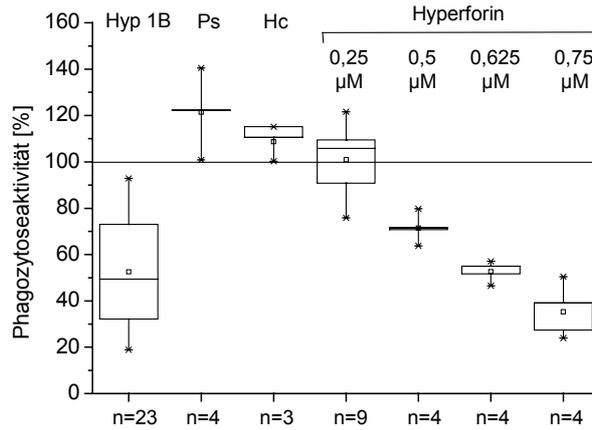
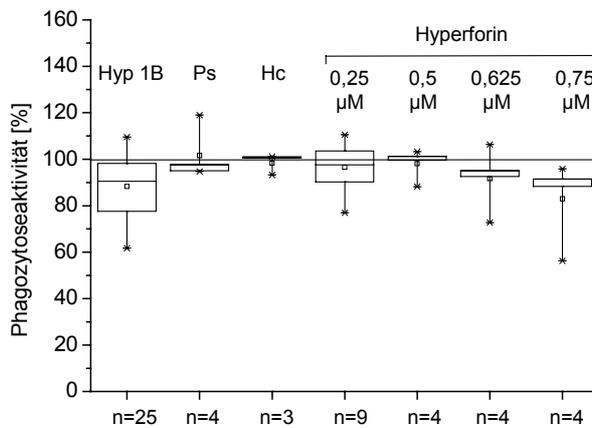


Abb. 40: Verbleibende Phagozytoseaktivität [%] bei der Phagozytose von **Zyмосan** nach Vorbehandlung der Zellen mit den Flavonoiden Rutin (Ru), Hyperosid (Hd), Quercitrin (Qui) und Quercetin (Que) bezogen auf nicht vorbehandelte Zellen, im Vergleich zu mit Extrakt 1B (Hyp 1B) behandelten Zellen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Box-Plots mit einem Box-Bereich von 25-75 %, die Whiskers zeigen den Maximal- und Minimalwert an. Die Anzahl n der unabhängigen Versuche findet sich unter dem jeweiligen Box-Plot.

BV2



N11



RAW 264.7

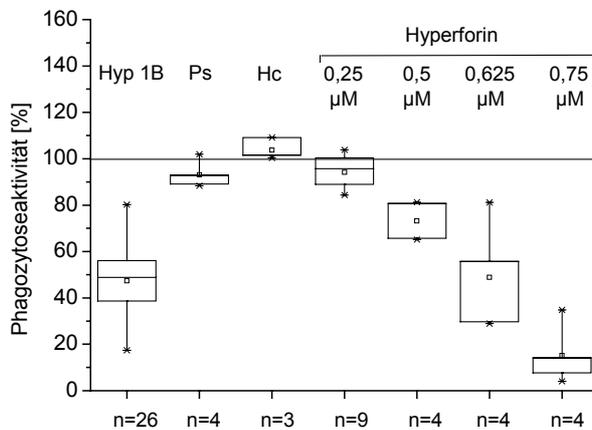


Abb. 41: Verbleibende Phagozytoseaktivität [%] bei der Phagozytose von **Zymosan** nach Vorbehandlung der Zellen mit Pseudohypericin (Ps), Hypericin (Hc) und Hyperforin (Hf) bezogen auf nicht vorbehandelte Zellen, im Vergleich zu mit Extrakt 1B (Hyp 1B) behandelten Zellen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Box-Plots mit einem Box-Bereich von 25-75 %, die Whiskers zeigen den Maximal- und Minimalwert an. Die Anzahl n unabhängigen Versuche findet sich unter dem jeweiligen Box-Plot.

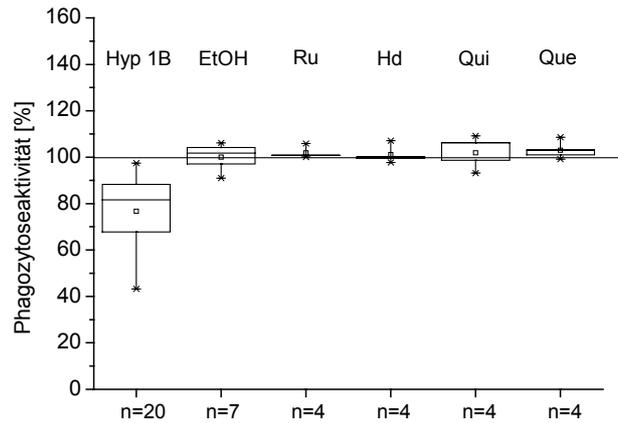
Die Phagozytose der *S. aureus* Partikel konnte bei der Zelllinie BV2 durch Pseudohypericin und Hypericin nicht beeinflusst werden (Abb. 43 oben). Auch durch Hyperforin konnte in den Konzentrationen 0,25-0,625  $\mu\text{M}$  kein Effekt beobachtet werden. Die Hyperforin-Konzentration von 0,75  $\mu\text{M}$  wies eine hemmende Tendenz von 10 % auf.

Bei der Zelllinie N11 konnte weder durch Pseudohypericin, noch durch Hypericin, eine Beeinflussung der Phagozytose von *S.aureus* Partikeln nachgewiesen werden (Abb. 43 Mitte). Auch Hyperforin zeigte in keiner der verwendeten Konzentrationen einen Effekt.

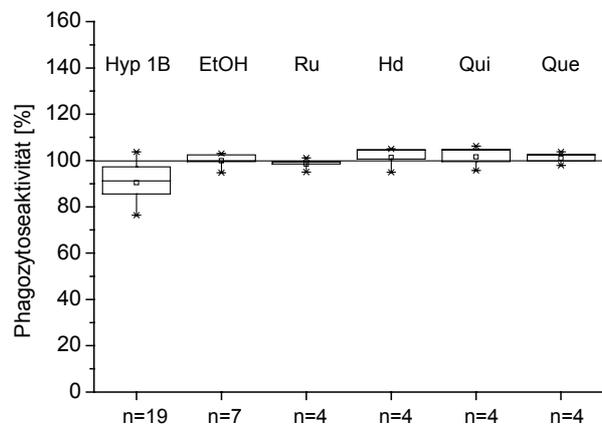
Die Phagozytose der *S. aureus* Partikel konnte auch bei der Zelllinie RAW 264.7 durch Pseudohypericin und Hypericin nicht beeinflusst werden (Abb. 43 unten). Ebenso konnte durch eine Vorbehandlung der Zellen mit 0,25-0,625  $\mu\text{M}$  Hyperforin kein Einfluss beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 0,75  $\mu\text{M}$  Hyperforin ergab sich eine Hemmung von 8-10 %.

## Ergebnisse

BV2



N11



RAW 264.7

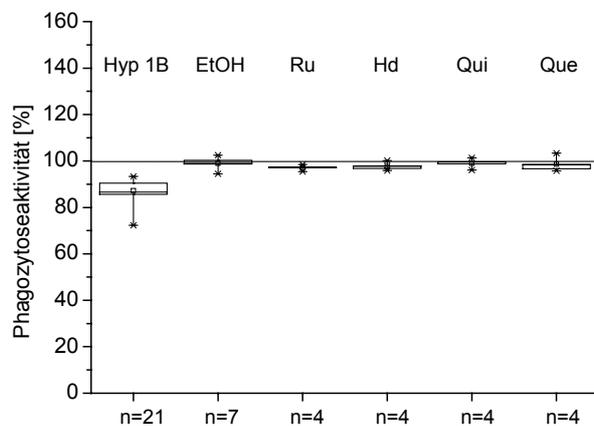
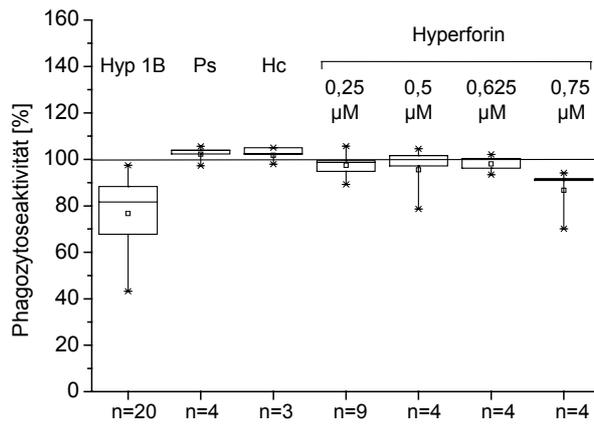


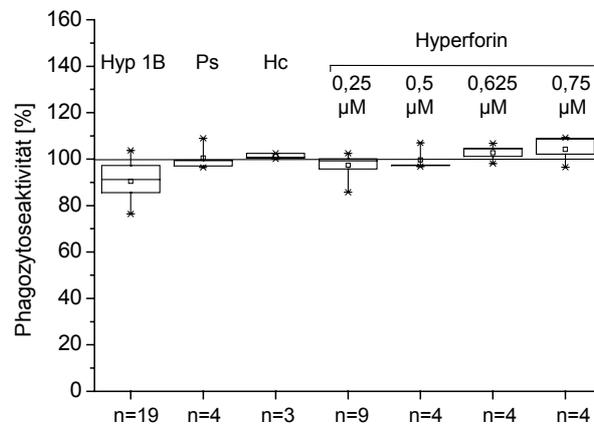
Abb. 42: Verbleibende Phagozytoseaktivität [%] bei der Phagozytose von *S. aureus* nach Vorbehandlung der Zellen mit den Flavonoiden Rutin (Ru), Hyperosid (Hd), Quercitrin (Qui) und Quercetin (Que) bezogen auf nicht vorbehandelte Zellen, im Vergleich zu mit Extrakt 1B (Hyp 1B) behandelten Zellen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Box-Plots mit einem Box-Bereich von 25-75 %, die Whiskers zeigen den Maximal- und Minimalwert an. Die Anzahl n der unabhängigen Versuche findet sich unter dem jeweiligen Box-Plot.

## Ergebnisse

BV2



N11



RAW 264.7

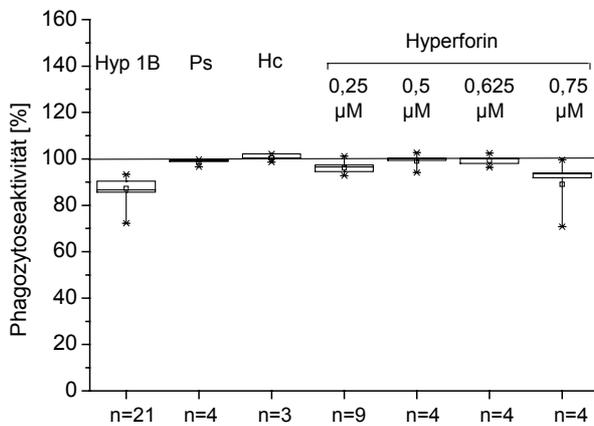


Abb. 43: Verbleibende Phagozytoseaktivität [%] bei der Phagozytose von *S. aureus* nach Vorbehandlung der Zellen mit Pseudohypericin (Ps), Hypericin (Hc) und Hyperforin (Hf) bezogen auf nicht vorbehandelte Zellen, im Vergleich zu mit Extrakt 1B (Hyp 1B) behandelten Zellen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Box-Plots mit einem Box-Bereich von 25-75 %, die Whiskers zeigen den Maximal- und Minimalwert an. Die Anzahl n der Parallelen findet sich unter dem jeweiligen Box-Plot.

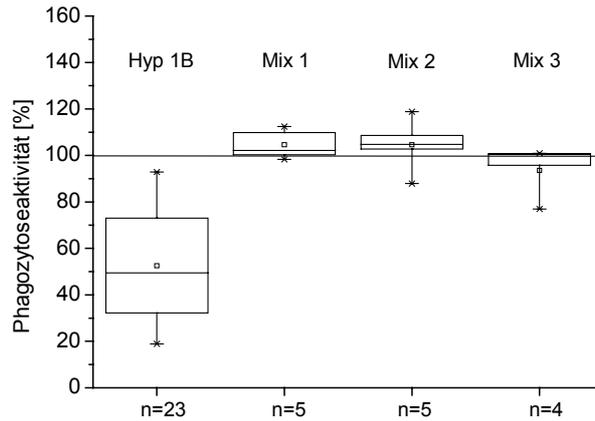
### **3.3.4 Einfluss der Einzelsubstanz-Mischungen auf die Phagozytose von Zymosan und *S. aureus***

Um eventuelle synergistische Effekte der Einzelsubstanzen zu erfassen, wurde der Einfluss drei verschiedener Mischungen auf die Phagozytose von Zymosan und *S. aureus* Partikel untersucht. Mix 1 enthielt die Flavonoide Rutin, Hyperosid, Quercitrin und Quercetin. Mix 2 setzte sich zusammen aus Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin. In Mix 3 waren alle 7 Einzelsubstanzen enthalten. Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen entsprachen jeweils der Konzentration in der sie im *Hypericum*-Extrakt 1B enthalten waren.

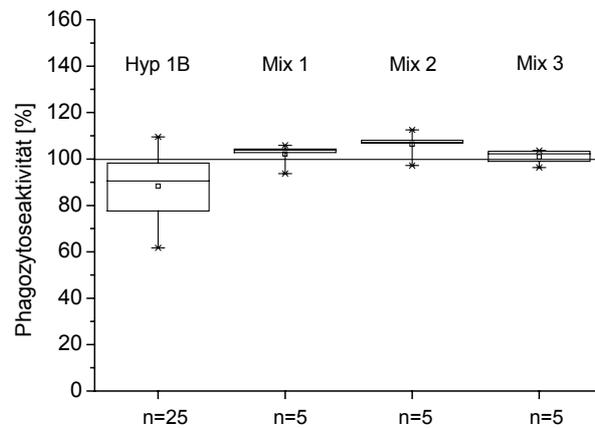
Keine der Mischungen zeigte Einfluss auf die Phagozytose von Zymosan (Abb. 44) bzw. *S. aureus* Partikeln (Abb. 45). Lediglich bei der Zelllinie RAW 264.7 konnte nach einer Behandlung der Zellen mit Mix 3 eine geringe Hemmung der Phagozytoseaktivität von Zymosan um durchschnittlich 9-15 % beobachtet werden (Abb. 44 unten).

## Ergebnisse

BV2



N11



RAW 264.7

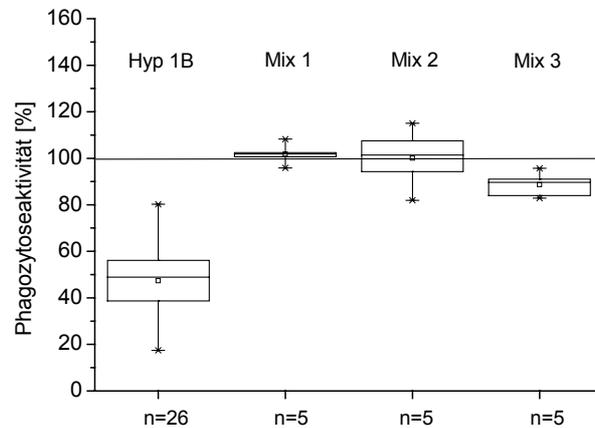
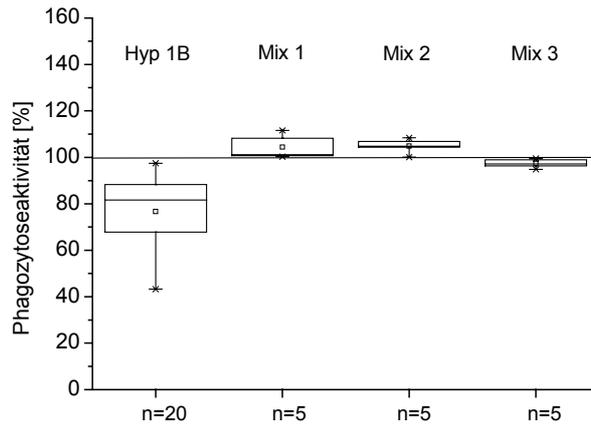


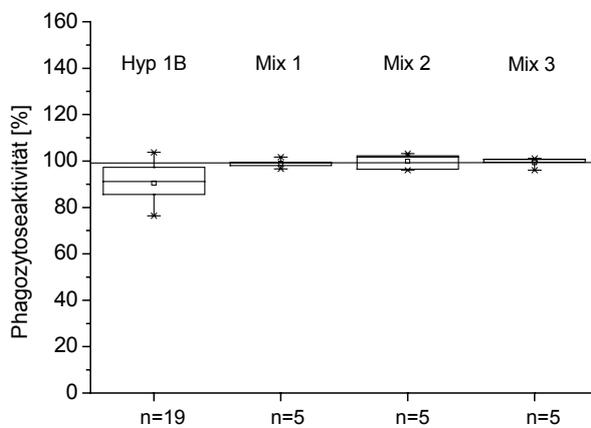
Abb. 44: Verbleibende Phagozytoseaktivität [%] bei der Phagozytose von **Zymosan** nach Vorbehandlung der Zellen mit den Einzelsubstanz-Mischungen Mix 1, Mix 2 und Mix 3 bezogen auf nicht vorbehandelte Zellen, im Vergleich zu mit Extrakt 1B (Hyp 1B) behandelten Zellen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Box-Plots mit einem Box-Bereich von 25-75 %, die Whiskers zeigen den Maximal- und Minimalwert an. Die Anzahl n der unabhängigen Versuche findet sich unter dem jeweiligen Box-Plot.

## Ergebnisse

BV2



N11



RAW 264.7

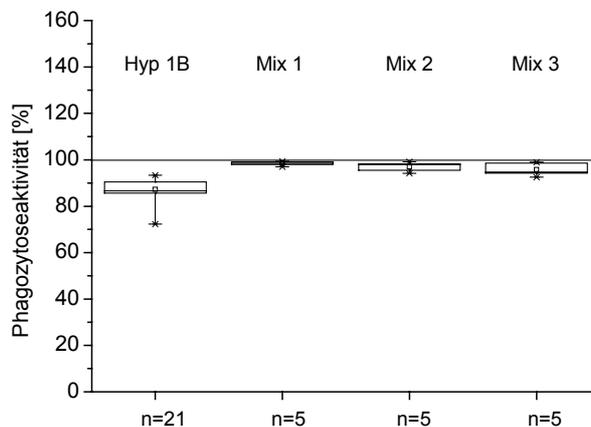


Abb. 45: Verbleibende Phagozytoseaktivität [%] bei der Phagozytose von *S. aureus* nach Vorbehandlung der Zellen mit den Einzelsubstanz-Mischungen Mix 1, Mix 2 und Mix 3 bezogen auf nicht vorbehandelte Zellen, im Vergleich zu mit Extrakt 1B (Hyp 1B) behandelten Zellen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Box-Plots mit einem Box-Bereich von 25-75 %, die Whiskers zeigen den Maximal- und Minimalwert an. Die Anzahl n der unabhängigen Versuche findet sich unter dem jeweiligen Box-Plot.

### 3.3.5 Phagozytose von Amyloid $\beta$ 1-40 und Einfluss von *Hypericum*-Extrakt

Die Phagozytose von Amyloid  $\beta$  1-40 wurde nur an der Zelllinie N11 untersucht. Die Inkubation mit A $\beta$  1-40 erfolgte für 18 h. Nach dieser Zeit hatten 3,5-4,5 % der Zellen A $\beta$  1-40 phagozytiert (Abb. 46).

Durch eine 24-stündige Vorbehandlung der Zellen mit *Hypericum*-Extrakt 1B konnte keine Hemmung der Phagozytoseaktivität festgestellt werden (Abb. 47).

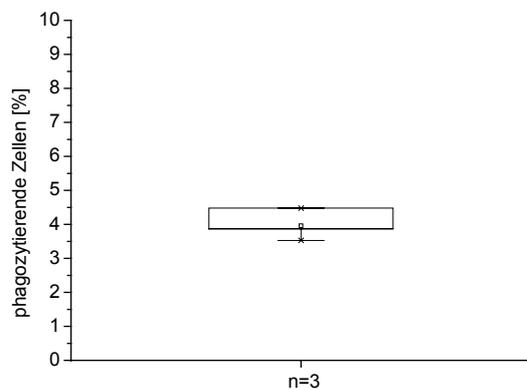


Abb. 46: Anteil der Zellen [%] der Zelllinie N11, welcher nach 18 h Inkubationszeit mindestens einen fluoreszenzmarkierten Partikel phagozytiert hatte. Der Box-Bereich beträgt 25-75 %, die Whiskers zeigen den Maximal- und Minimalwert an. n = 3 unabhängige Versuche.

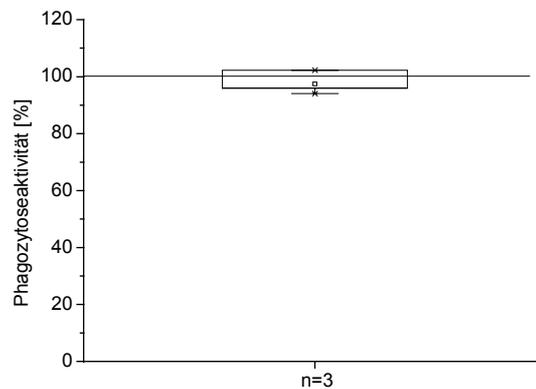


Abb. 47: Verbleibende Phagozytoseaktivität der N11 Zellen nach Vorbehandlung mit *Hypericum*-Extrakt 1B. Der Box-Bereich beträgt 25-75 %, die Whiskers zeigen den Maximal- und Minimalwert an. n = 3 unabhängige Versuche.

### 3.4 Zytotoxizität von Amyloid $\beta$

#### 3.4.1 Einfluss des *Hypericum*-Extraktes auf die Zytotoxizität von Amyloid $\beta$ Protein Fragment 25-35 und Fragment 35-25

Das Amyloid  $\beta$  Protein Fragment 25-35 gilt als die funktionelle Domäne des Amyloid  $\beta$  Proteins, welche für den neurotoxischen Effekt verantwortlich ist (Yankner et al. 1990). Dieses Fragment wurde mittels MTT-Test auf seine Toxizität gegenüber den Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7 getestet.

Bei der Zelllinie BV2 (Abb. 48 oben) traten ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikant toxische Effekte auf. Durch 10  $\mu\text{M}$  A $\beta$  25-35 wurde die Lebensfähigkeit der BV2 Zellen um 30 % reduziert. Die Vorbehandlung der Zellen mit *Hypericum*-Extrakt 1B konnte die Lebensfähigkeit der Zellen zu 100 % erhalten. Durch 50  $\mu\text{M}$  A $\beta$  25-35 wurde die Lebensfähigkeit um etwa 37 % reduziert, nach Vorbehandlung mit *Hypericum*-Extrakt um 30 %.

Auf die Zelllinie N11 (Abb. 48 Mitte) wies A $\beta$  25-35 schon ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  eine signifikante Toxizität auf. Durch 1  $\mu\text{M}$  A $\beta$  25-35 wurde die Lebensfähigkeit der Zellen um 15 %, durch 10  $\mu\text{M}$  um 47 % und durch 50  $\mu\text{M}$  um 60 % verringert. Nach Vorbehandlung mit *Hypericum*-Extrakt konnte die Lebensfähigkeit bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  A $\beta$  25-35 zu 100 % erhalten werden, bei 50  $\mu\text{M}$  A $\beta$  25-35 kam es zu einer Verringerung der Lebensfähigkeit um 40 %.

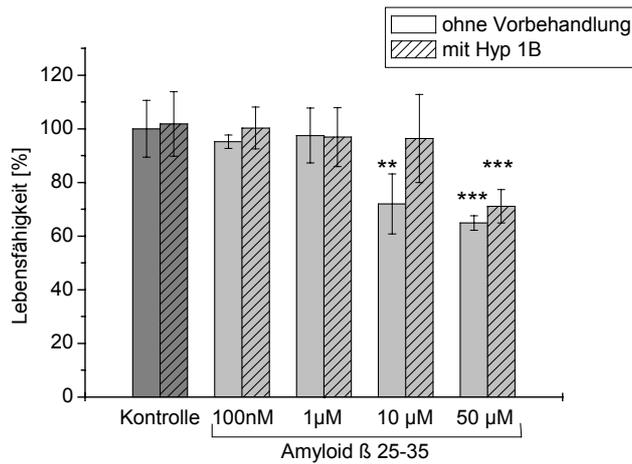
Bei der Zelllinie RAW 264.7 (Abb. 48 unten) traten ebenfalls ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  signifikant toxische Effekte auf. Durch 1  $\mu\text{M}$  A $\beta$  25-35 kam es zu einer Verringerung der Lebensfähigkeit der Zellen um 25 %, durch 10  $\mu\text{M}$  um 50 % und durch 50  $\mu\text{M}$  um 52 %. Nach Vorbehandlung der Zellen mit *Hypericum*-Extrakt konnte die Lebensfähigkeit bei 1  $\mu\text{M}$  A $\beta$  25-35 zu 100 % erhalten werden, bei 10  $\mu\text{M}$  A $\beta$  25-35 kam es zu einer Verringerung um 12 %, bei 50  $\mu\text{M}$  um 50%.

Um auszuschließen, dass es sich bei der festgestellten Toxizität des Amyloid  $\beta$  25-35 nicht um einen unspezifischen Effekt der hohen verwendeten Konzentration des Peptides handelte, wurden die Zellen in gleicher Weise mit den gleichen Mengen des Amyloid  $\beta$  Fragmentes 35-25 behandelt. Hierbei handelt es sich um das Antisense-Peptid, bei dem die gleichen Aminosäuren in umgekehrter Reihenfolge verknüpft vorliegen.

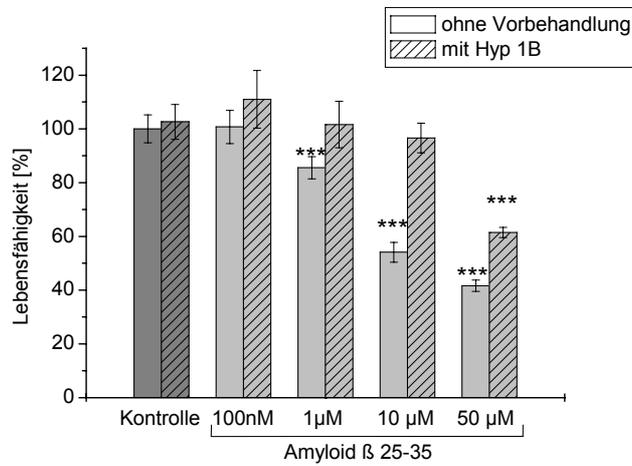
Nach der Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen dieses Peptides konnten bei keiner der Zelllinien toxische Effekte festgestellt werden (Abb. 49). Die Vorinkubation mit *Hypericum*-Extrakt hatte keine Auswirkungen.

## Ergebnisse

BV2



N11



RAW 264.7

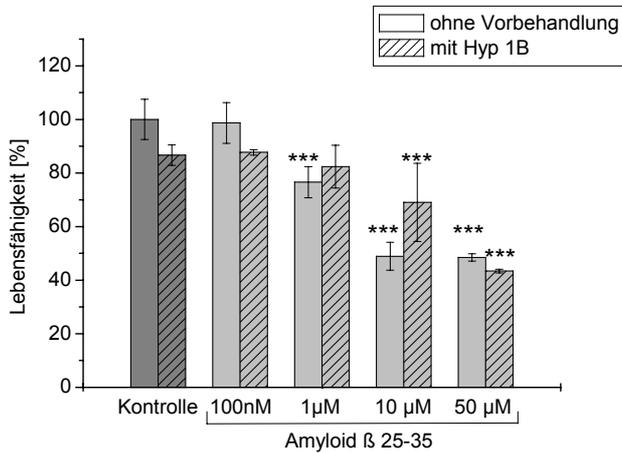
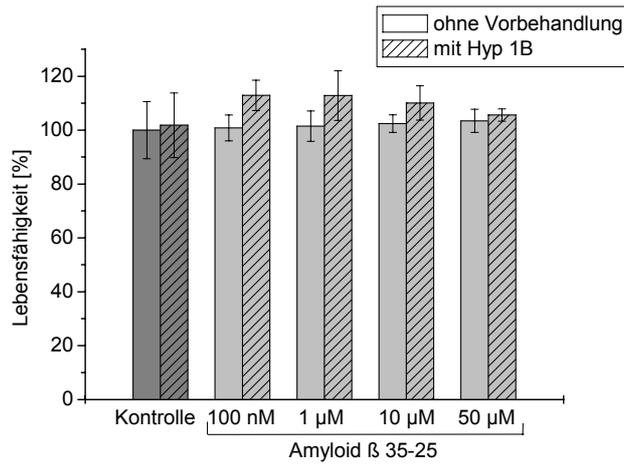


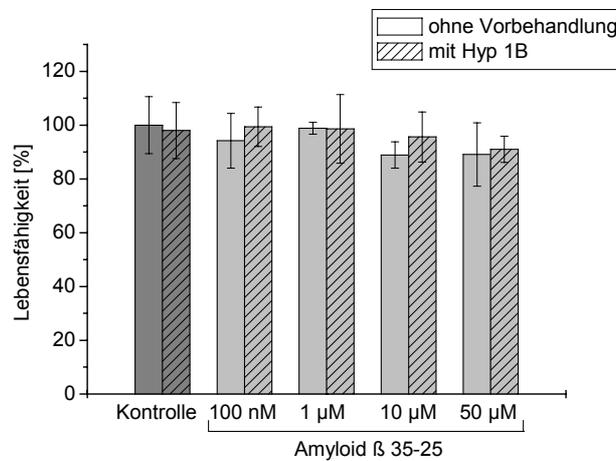
Abb. 48: Zytotoxizität des Amyloid  $\beta$  Protein Fragments 25-35 auf die Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7 und Einfluss des *Hypericum*-Extrakts 1B (Hyp 1B) auf die Toxizität. Die Bestimmung erfolgte mittels MTT-Test. Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 4 Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle.

## Ergebnisse

BV2



N11



RAW 264.7

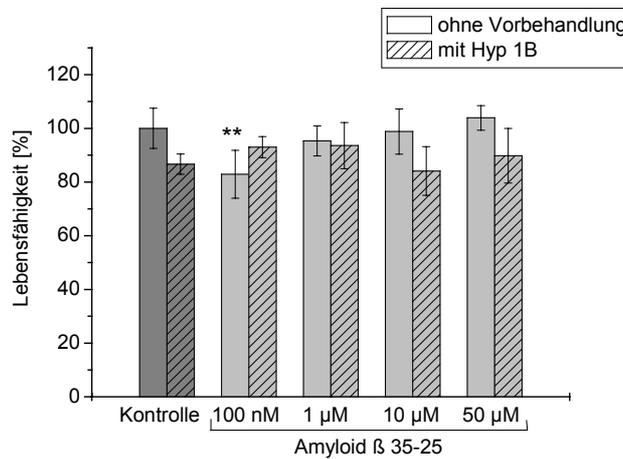


Abb. 49: Zytotoxizität des Amyloid  $\beta$  Protein Fragments 35-25 auf die Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7 und Einfluss des *Hypericum*-Extrakts 1B (Hyp 1B) auf die Toxizität. Die Bestimmung erfolgte mittels MTT-Test. Dargestellt ist der Mittelwert aus  $n = 4$  Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle.

### 3.4.2 Einfluss der Einzelsubstanzen und Einzelsubstanz-Mischungen auf die Toxizität von Amyloid $\beta$ 25-35 auf die Zelllinie N11

Der Einfluss der Einzelsubstanzen und Einzelsubstanz-Mischungen wurde nur an der Zelllinie N11 untersucht. Für diese Versuche wurde eine Amyloid  $\beta$  25-35 Konzentration von 10  $\mu$ M verwendet, da sich für diese Konzentration die Schutzwirkung durch eine Vorbehandlung der Zellen mit *Hypericum*-Extrakt 1B als am effektivsten herausgestellt hatte (siehe Kapitel 3.4.1). Getestet wurden die Flavonoide Rutin, Hyperosid, Quercitrin und Quercetin, außerdem Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin, jeweils in der im Extrakt 1B vorliegenden Konzentration. Hierbei konnte festgestellt werden, dass nur der Gesamt-Extrakt zu einer signifikanten Erhöhung der lebensfähigen Zellen, gegenüber der nicht mit *Hypericum*-Extrakt 1B behandelten Kontrolle, führte. Die hierdurch erreichte Lebensfähigkeit entsprach durchschnittlich 90-100 %, bezogen auf die nicht mit Amyloid  $\beta$  25-35 behandelten Zellen (Abb. 51).

Die Einzelsubstanzen und auch die Einzelsubstanz-Mischungen zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Toxizität von Amyloid  $\beta$  25-35 (Abb. 51), ebenso wenig wie die EtOH Kontrolle (Abb. 50).

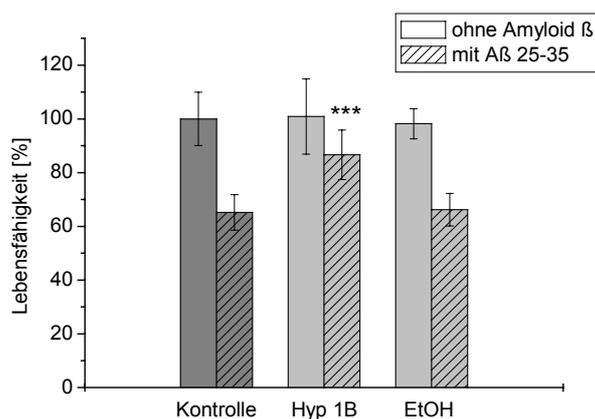


Abb. 50: Einfluss von EtOH auf die Zytotoxizität des Amyloid  $\beta$  Protein Fragments 25-35 (10  $\mu$ M) auf die Zelllinie N11, verglichen mit der Wirkung des *Hypericum*-Extraktes 1B (Hyp 1B). Die Bestimmung erfolgte mittels MTT-Test. Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 4 Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle.

## Ergebnisse

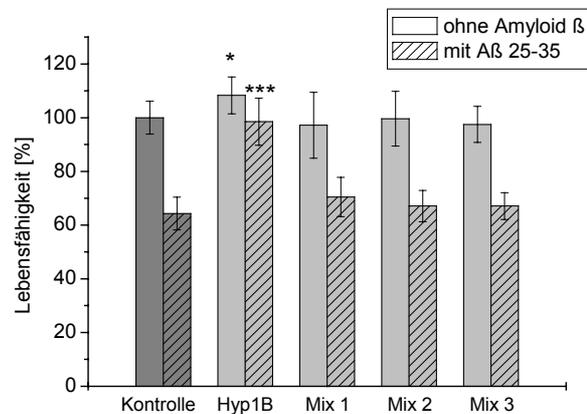
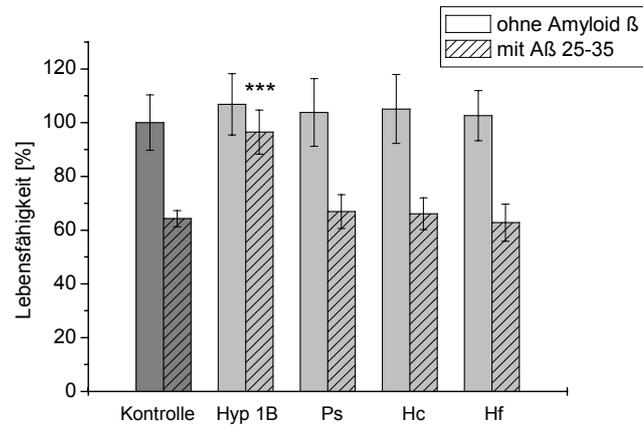
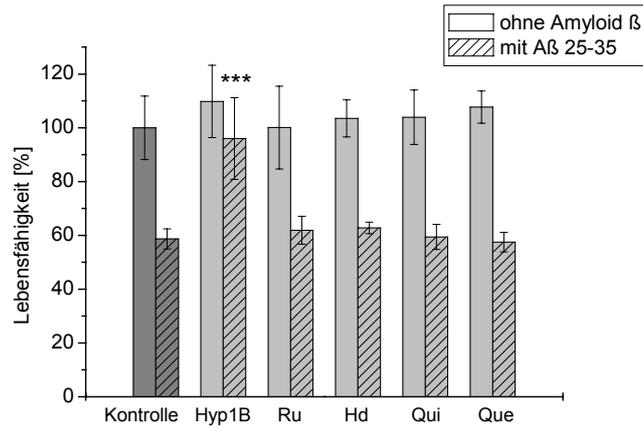


Abb. 51: Einfluss der Einzelsubstanzen und Einzelsubstanz-Mischungen auf die Zytotoxizität des Amyloid  $\beta$  Protein Fragments 25-35 (10  $\mu$ M) auf die Zelllinie N11. Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 4 Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle.

Mix 1: Flavonoide; Mix 2: Pseudohypericin, Hypericin, Hyperforin; Mix 3: Flavonoide, Pseudohypericin, Hypericin, Hyperforin

### 3.4.3 Toxizität von Amyloid $\beta$ Protein Fragment 25-35 auf die humane Neuroblastomzelllinie SK-N-SH

Der Einfluss des *Hypericum*-Extraktes 1B auf die Toxizität von Amyloid  $\beta$  Protein Fragment 25-35 wurde auch an der humanen Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH mittels MTT-Test untersucht. Die Neuroblastom-Zellen wurden, wie die Zellen der Zelllinie N11, mit 10  $\mu$ M Amyloid  $\beta$  25-35 behandelt.

Die Toxizität des Peptides zeigte sich bei diesen neuronalen Zellen ebenfalls in einem Verlust der Lebensfähigkeit, welche um ca. 15 % vermindert wurde (Abb. 52). Durch eine Vorinkubation mit *Hypericum*-Extrakt 1B konnte auch hier die Lebensfähigkeit der Zellen signifikant erhöht bzw. auf nahezu 100 %, bezogen auf die nicht mit Amyloid  $\beta$  25-35 behandelten Zellen, gehalten werden. Die EtOH-Kontrolle zeigte keinerlei Einfluss.

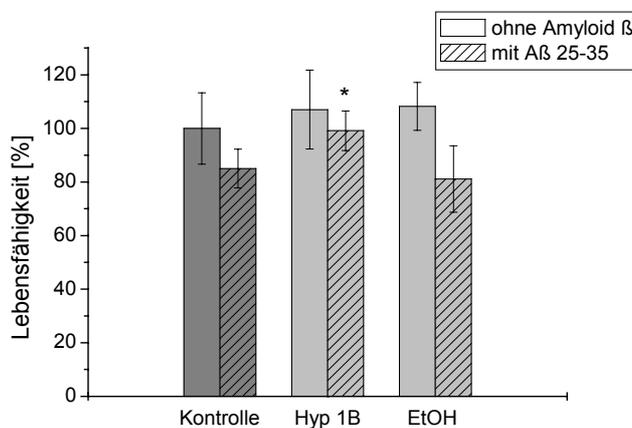


Abb. 52: Zytotoxizität des Amyloid  $\beta$  Protein Fragments 25-35 (10  $\mu$ M) auf die humanen Neuroblastomzellen SK-N-SH und Einfluss des *Hypericum*-Extrakts (Hyp 1B). Als Kontrolle diente 0,5 % EtOH (50 %). Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 4 Parallelen mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle.

### 3.4.4 Fluorimetrische Bestimmung der Lebensfähigkeit

Dieser fluorimetrische Test wurde zur Bestätigung der Daten des MTT-Test durchgeführt. Die Zellen wurden mit Calcein AM und Ethidium Homodimer (EthD-1) behandelt. Lebende Zellen erhalten durch enzymatische Umsetzung des Calcein AM eine grüne Fluoreszenz. EthD-1 dringt durch die beschädigte Zellwand toter Zellen, bindet an deren DNA und ruft eine intensiv rote Fluoreszenz hervor.

In Abb. 53 sind Zellen der Zelllinie N11 nach Behandlung mit A $\beta$  25-35 (links) und mit A $\beta$  35-25 (Mitte) gegenübergestellt. Außerdem sind Zellen gezeigt, welche mit *Hypericum*-Extrakt vorinkubiert und dann mit A $\beta$  25-35 behandelt wurden (rechts).

In der obersten Reihe sind die lebenden, grün fluoreszierenden Zellen zu sehen. In der zweiten Reihe ist die rote Fluoreszenz der Zellkerne toter Zellen zu erkennen. In der dritten Reihe wurden der grüne und rote Fluoreszenzkanal überlagert. In der Abbildung ganz unten ist zum Vergleich ein Phasenkontrastbild der betrachteten Zellen gezeigt.

Schon im Phasenkontrastbild ist zu sehen, dass A $\beta$  25-35 toxisch auf die Zellen wirkt. Die Zellen ziehen ihre Fortsätze ein und nehmen kugelige Gestalt an. Schließlich lösen sie sich vom Boden und schwimmen ab. Die mit A $\beta$  35-25 oder mit *Hypericum*-Extrakt vorbehandelten Zellen weisen keine auf die Toxizität des A $\beta$  zurückzuführenden Veränderungen auf. Beide zeigen eine durchgehende, gleichmäßige Lage adhärenter Zellen. Es ist kein Abkugeln der Zellen zu beobachten.

Im grünen Fluoreszenzkanal ergibt sich ein ähnliches Bild. Die mit A $\beta$  35-25 behandelten Zellen, sowie die mit *Hypericum*-Extrakt vorinkubierten Zellen, die mit A $\beta$  25-35 behandelt wurden, zeigen eine gleichmäßige grüne Fluoreszenz und Verteilung entsprechend dem Phasenkontrastbild. Die mit A $\beta$  25-35 behandelten Zellen erscheinen, ebenfalls dem Phasenkontrastbild entsprechend, ungleichmäßig und durch das Abkugeln der Zellen etwas größer.

Im roten Fluoreszenzkanal zeigt sich bei den mit A $\beta$  25-35 behandelten Zellen eine große Anzahl rot fluoreszierender Kerne toter Zellen. Bei den mit A $\beta$  35-25 behandelten Zellen sind keine toten Zellen zu erkennen. Und auch bei den mit *Hypericum*-Extrakt vorinkubierten Zellen, die mit A $\beta$  25-35 behandelt wurden, sind so gut wie keine (in dem gewählten Bereich eine) toten Zellen zu erkennen.

Mit diesem fluorimetrischen Test konnte wie im MTT-Test festgestellt werden, dass A $\beta$  25-35 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M toxisch auf die Zellen der Zelllinie N11 wirkt. Bestätigt werden konnte auch, dass A $\beta$  35-25 keine Toxizität aufweist. Durch eine 24-stündige Vorbehandlung der Zellen mit *Hypericum*-Extrakt 1B konnte die toxische Wirkung des A $\beta$  25-35 verhindert werden.

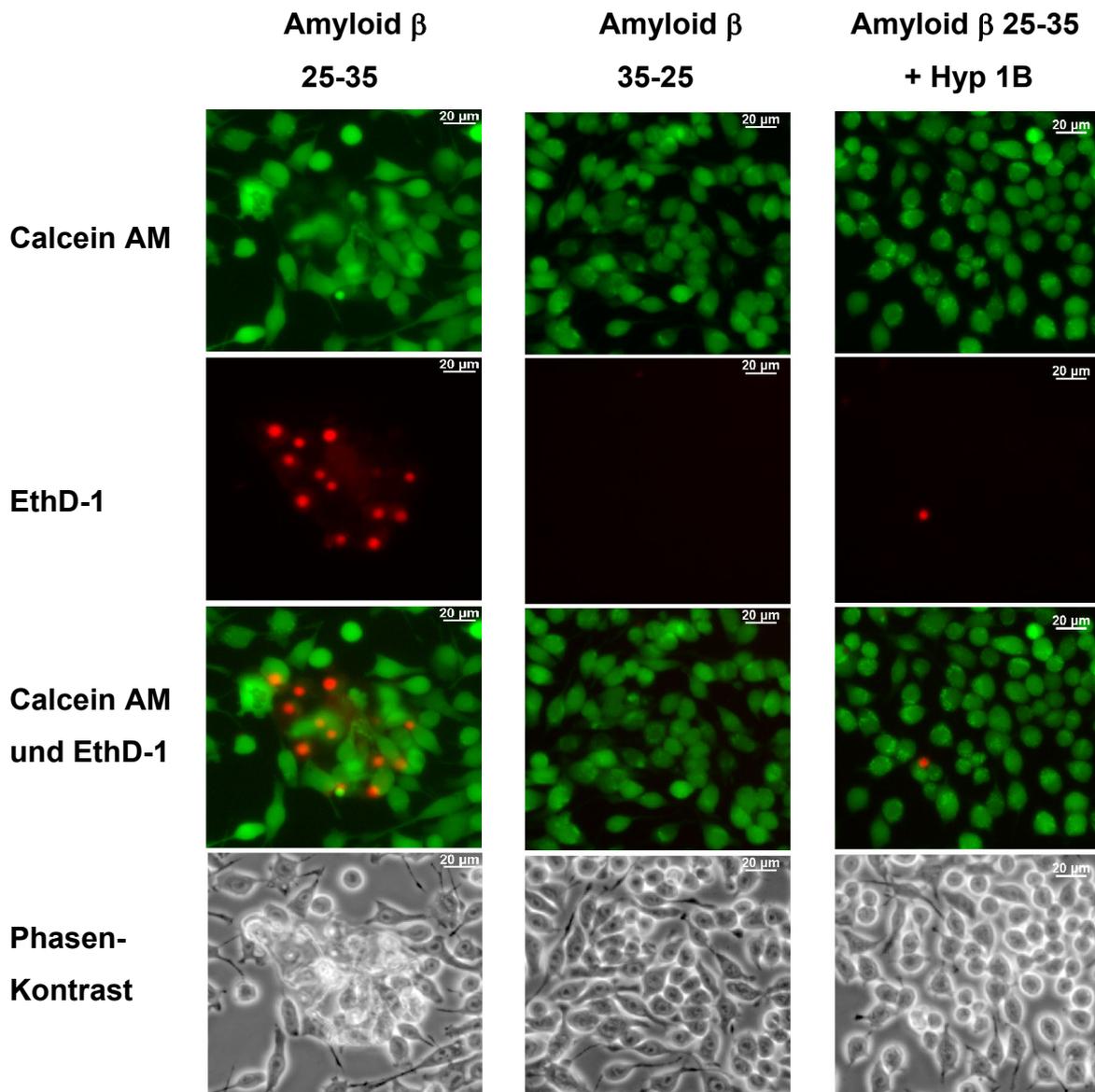


Abb. 53: Toxizität der Amyloid  $\beta$  Fragmente 25-35 und 35-25 (jeweils 10  $\mu$ M) auf die Zelllinie N11 und Einfluss des *Hypericum*-Extrakts 1B (Hyp 1B) auf die Toxizität von Amyloid  $\beta$  25-35. Lebende Zellen erhielten durch Calcein AM eine grüne Fluoreszenz. Die DNA toter Zellen wurde durch EthD-1 rot gefärbt. Unten zum Vergleich die Zellen im Phasenkontrast.

### 3.5 Einfluss von *Hypericum*-Extrakt und Einzelsubstanz-Mischungen auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Die ROS-Produktion der Zellen wurde durch die Verwendung eines Dichloro-dihydro-Fluorescein Diazetat Derivates (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) untersucht. Diese Substanz wird innerhalb der Zellen durch Reaktion mit ROS zu einem in der Zelle eingeschlossenen, fluoreszierenden Produkt umgebaut, welches im FACS detektiert und analysiert werden kann. Die ROS-Bildung wurde durch eine Behandlung der Zellen mit Amyloid  $\beta$  25-35 angeregt. Zur Auswertung wurde die sehr geringe schon vorhandene ROS-Produktion der unbehandelten Zellen gleich eins gesetzt, die restlichen Werte als x-faches darauf bezogen.

Bei der Zelllinie BV2 führte die Behandlung mit A $\beta$  25-35 nach 1 h zu einem 3-fachen Anstieg der ROS-Produktion (Abb. 54 oben). Nach Inkubation mit *Hypericum*-Extrakt 1B konnte ein weiterer Anstieg auf das 5-fache der Kontrolle beobachtet werden. Auch Mix 2 und Mix 3 führten zu einem weiteren Anstieg der ROS-Produktion. Durch Mix 2 kam es durchschnittlich zur 4,5-fachen und durch Mix 3 zur 4-fachen ROS-Produktion bezogen auf die Kontrolle.

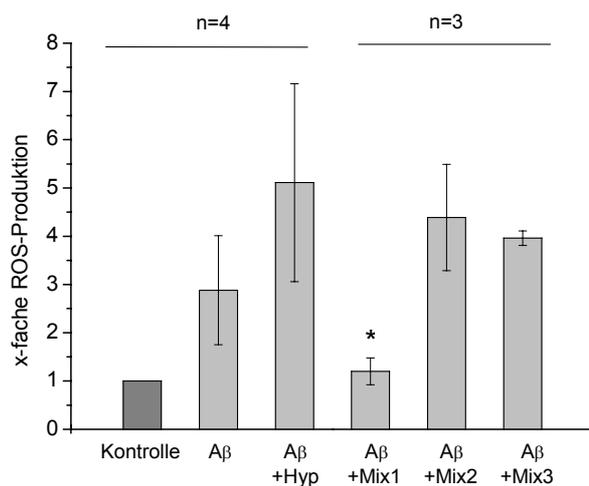
Die Behandlung der N11 Zellen mit A $\beta$  25-35 bewirkte einen 1,5-fachen Anstieg der ROS-Produktion (Abb. 54 Mitte). Nach Inkubation mit *Hypericum*-Extrakt konnte ein Anstieg auf die 3-fache, mit Mix 2 und Mix 3 auf die 3,2-fache ROS-Produktion, bezogen auf die Kontrolle, festgestellt werden.

Die Zelllinie RAW 264.7 wurde durch die Behandlung mit A $\beta$  25-35 zu einer durchschnittlich 2,5-fachen Bildung an ROS angeregt (Abb. 54 unten). Durch Vorinkubation mit *Hypericum*-Extrakt 1B wurde die 7-fache ROS-Produktion erreicht. Durch Mix 2 und Mix 3 kam es sogar zu einer signifikanten Erhöhung. Die ROS-Bildung betrug nach Inkubation mit Mix 2 das 18-fache und mit Mix 3 das 23-fache der Kontrolle.

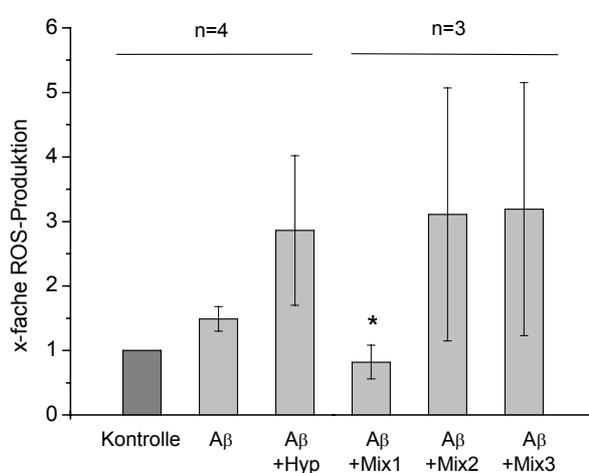
Mix 1 hingegen, die Mischung welche nur Flavonoide enthielt, bewirkte bei allen drei Zelllinien eine Hemmung der ROS-Produktion auf das Niveau der unaktivierten Kontrollen.

## Ergebnisse

BV2



N11



RAW 264.7

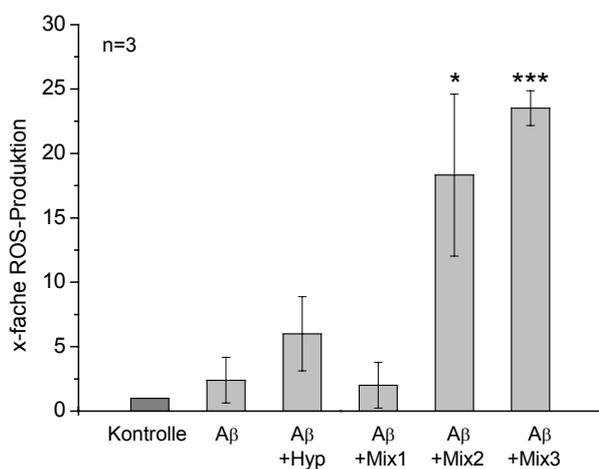


Abb. 54: ROS-Produktion der Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7, hervorgerufen durch Amyloid  $\beta$  25-35 und Einfluss des *Hypericum*-Extraktes, sowie der Einzelsubstanz-Mischungen Mix 1, Mix 2 und Mix 3. Die Ergebnisse sind als x-fache ROS-Produktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl n der Parallelen ist bei der jeweiligen Graphik zu finden. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit A $\beta$ .

### 3.6 Beeinflussung des Zytoskeletts durch *Hypericum*-Extrakt

Die Struktur des Zytoskeletts wurde durch Behandlung der Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin sichtbar gemacht. Phalloidin bindet an die Aktin-Filamente der Zellen. Die Untersuchung auf Beeinflussung des Zytoskeletts wurde mit den Zelllinien N11 und RAW 264.7 durchgeführt.

In Abb. 55 sind zum direkten Vergleich unbehandelte Zellen (oben), mit Cytochalasin D behandelte Zellen (Mitte) und mit *Hypericum*-Extrakt vorbehandelte Zellen (unten) der Zelllinie N11 gezeigt.

Durch das Phalloidin wurde die sehr feine fibrilläre Struktur des Aktin-Gerüsts der nicht vorbehandelten Zellen sichtbar gemacht. Bei den mit Cytochalasin D behandelten Zellen waren diese feinen Fibrillen nicht mehr vorhanden. Die Zellen zeigten eine grieselige Struktur. Cytochalasin D führt zur Zerstörung der Aktin-Filamente und verhindert die Aktin-Polymerisation (Flanagan und Lin 1980).

Die mit *Hypericum*-Extrakt 1B behandelten Zellen wiesen die gleiche feine fibrilläre Aktin-Struktur auf wie nicht behandelte Zellen. Auch bei den Zellen der Zelllinie RAW 264.7 zeigte sich kein Unterschied in der Struktur des Aktin-Skeletts zwischen unbehandelten (Abb. 56) und mit *Hypericum*-Extrakt vorbehandelten (Abb. 57) Zellen.

Die eigentlich orange Fluoreszenz des Phalloidins wurde in Abb. 55 bis 57 cyanfarben dargestellt, um sie besser von der roten Autofluoreszenz des *Hypericum*-Extraktes (Abb. 57) zu unterscheiden.

Durch eine Behandlung der Zellen mit *Hypericum*-Extrakt 1B konnte fluoreszenzmikroskopisch keinerlei Beeinflussung bzw. Veränderung des Zellskeletts gegenüber nicht behandelten Zellen beobachtet werden.

Es ist davon auszugehen, dass eine Behandlung der Zellen mit *Hypericum*-Extrakt nicht zu einer Veränderung im Aufbau des Aktin-Gerüsts führt.

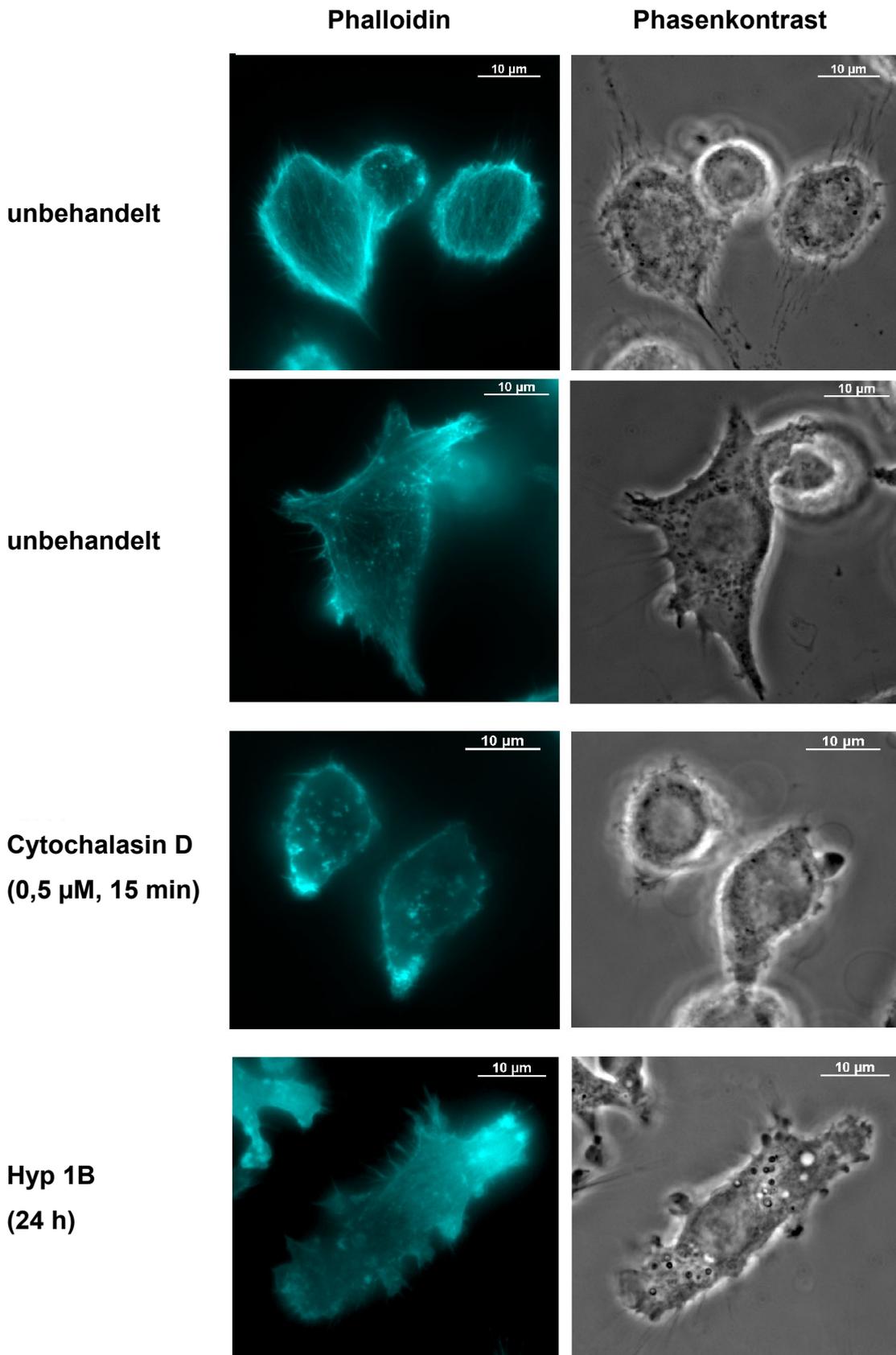


Abb. 55: Darstellung des Zytoskeletts von Zellen der Zelllinie N11, unbehandelt (oben), nach Behandlung mit Cytochalasin D (Mitte) bzw. *Hypericum*-Extrakt 1B (unten). Das Aktin-Gerüst wurde mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin sichtbar gemacht.

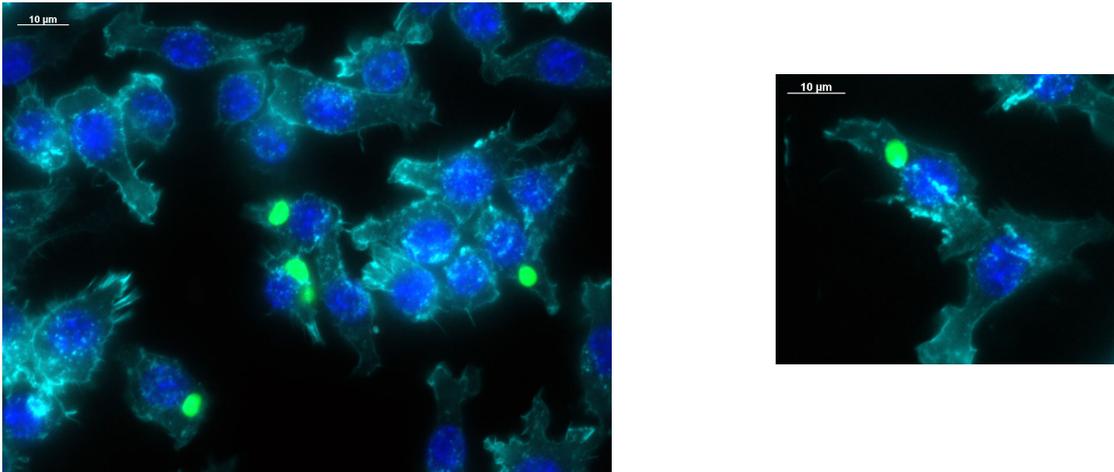


Abb. 56: Zellen der Zelllinie RAW 264.7 ohne Vorbehandlung mit *Hypericum*-Extrakt 1B. Das Zytoskelett wurde durch Bindung von fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (cyan) sichtbar gemacht, die Zellkernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Die grün fluoreszierenden Partikeln sind phagozytiertes Zymosan Bodipy FL Konjugat.

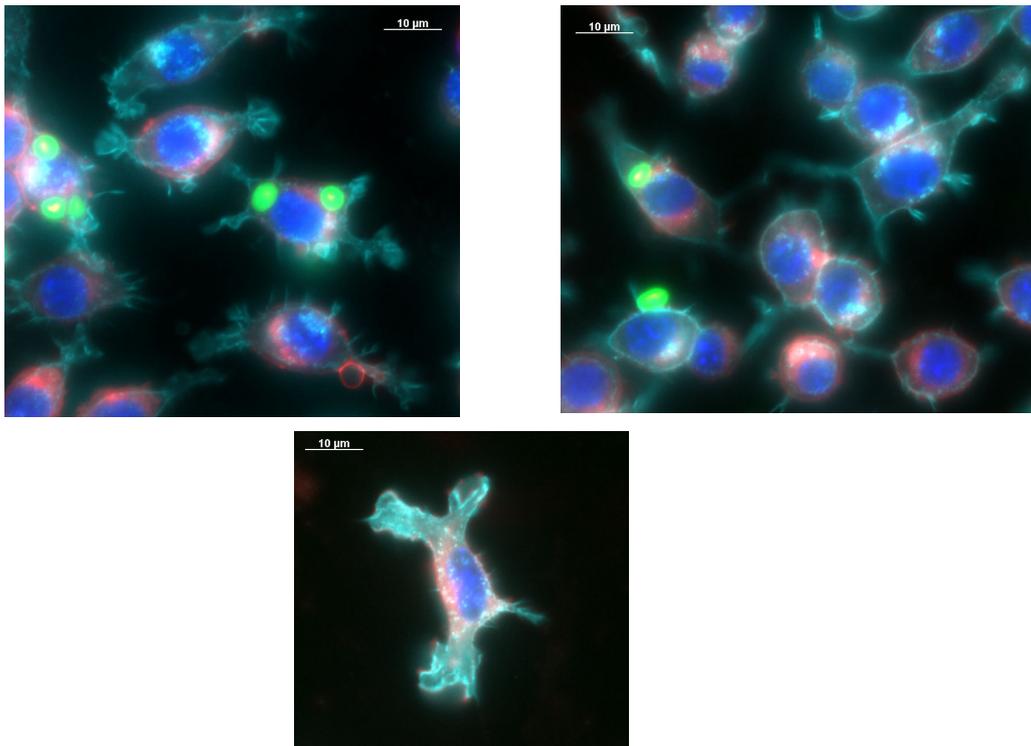


Abb. 57: Zellen der Zelllinie RAW 264.7 nach Vorinkubation mit *Hypericum*-Extrakt 1B. Das Zytoskelett wurde durch Bindung von fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (cyan) sichtbar gemacht, die Zellkernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Die grün fluoreszierenden Partikeln sind phagozytiertes Zymosan Bodipy FL Konjugat. Bei der roten Färbung der Zellen handelt es sich um die Eigenfluoreszenz des *Hypericum*-Extrakts.

## 4 Diskussion

Mikroglia spielen als Immunzellen des Gehirns eine wichtige Rolle für die Gesunderhaltung des ZNS. Aktivierte Mikroglia vernichten eingedrungene Mikroorganismen, entfernen potentiell schädlichen Debris und fördern die Gewebsreparatur und somit die Rückkehr zur Gewebshomöostase (Kreutzberg 1996). Die Aktivierung von Mikroglia beinhaltet deren Transformation zu Phagozyten und die Generierung und Abgabe potentiell zytotoxischer Substanzen wie reaktiver Sauerstoffspezies, NO, Proteasen und proinflammatorischer Zytokine (Colton und Gilbert 1987, Banati et al. 1993). Die von aktivierten Mikroglia abgegebenen Substanzen können aber bei mangelhafter Kontrolle auch neurotoxisch wirken (Thery et al. 1991, Chao et al. 1996) und eventuell Einfluss auf die Transmitteraktivität im Gehirn nehmen (Turkall et al. 1982, Heinecke et al. 1993).

Es wurde bereits für verschiedene Pflanzenextrakte oder deren Inhaltsstoffe nachgewiesen, dass sie eine Wirkung auf unterschiedliche Funktionen von Immunzellen wie Neutrophile, Makrophagen und Mikroglia haben (Carini et al. 2001, Ryu et al. 2003, Lee et al. 2003).

Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) wird seit langem zur Behandlung leichter bis mittelschwerer depressiver Erkrankungen verwendet und es ist eine Vielzahl von Wirkungen auf Neuronen bekannt (Butterweck 2003).

In den folgenden Abschnitten werden die Effekte von Johanniskraut-Extrakt, sowie einzelner seiner Inhaltsstoffe, auf verschiedene Funktionen der Mikroglia diskutiert.

#### 4.1 Inhaltsstoffmuster und Toxizität der *Hypericum*-Extrakte

Die Qualität und Wirksamkeit von Phytopharmaka korreliert mit dem Wirkstoffgehalt der verwendeten pflanzlichen Rohstoffe, sowie deren Verarbeitung. Der Wirkstoffspiegel der Pflanzen ist abhängig vom verwendeten Saatgut, von den Anbaubedingungen, wie Lage und Beschaffenheit des Bodens, von Klima und Wasserverfügbarkeit, sowie von Ernte- und Verarbeitungsbedingungen. Die letztendliche Zusammensetzung des fertigen Präparats wird außerdem durch dessen Herstellungsverfahren und verwendete Auszugsmittel beeinflusst. Man kann deshalb davon ausgehen, dass sich Präparate verschiedener Hersteller im Inhaltsstoffgehalt und somit in ihrer Wirksamkeit unterscheiden (Kaul 2000).

Um die Wirksamkeit eines Präparats erklären zu können, muss dessen Zusammensetzung bekannt sein. Aus diesem Grund wurden die vier zur Verfügung stehenden Extrakte zuerst auf ihr Inhaltsstoffmuster hin untersucht.

Die HPLC-Analyse ergab Unterschiede zwischen den betrachteten Extrakten bezüglich der Zusammensetzung und der Konzentration einzelner Inhaltsstoffe (siehe Kapitel 3.1.1, Übersicht in Tab. 10).

Tab. 10: Konzentrationen einzelner Inhaltsstoffe [ $\mu\text{M}$ ] in den vier verschiedenen Extrakt-Stammlösungen [25 mg Trockensubstanz / ml EtOH (50 %)].

	<b>Konzentration der Inhaltsstoffe [<math>\mu\text{M}</math>]</b>			
	<b>Extrakt 1</b>	<b>Extrakt 2</b>	<b>Extrakt 3</b>	<b>Extrakt 4</b>
<b>Flavonoide</b>	1143,1	2194,2	1299,2	1000,9
<b>Hypericin + Pseudohypericin</b>	71,7	104,5	200,2	257,3
<b>Hyperforin</b>	78,7	59,6	138,1	178,9

Die Ernte der verwendeten Pflanzen und die Extrakt-Herstellung erfolgten für alle Extrakte in der selben Weise. Die Unterschiede in der Zusammensetzung lassen sich demnach darauf zurückführen, dass die Extrakte aus verschiedenen Johanniskraut-Sorten unterschiedlicher Standorte hergestellt wurden (Mann 2003).

Das sich unterscheidende Inhaltstoffprofil bedingt auch die unterschiedlich gute Verträglichkeit der Extrakte (siehe Kapitel 3.1.2). Die durchgeführten Toxizitätstest lassen darauf schließen, dass die Toxizität der Extrakte unter anderem mit dem Gehalt an Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin zusammenhängt (siehe Kapitel 3.1.3, Abb. 16, 18, 20).

In Tab. 11 sind die Konzentrationen von Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin in den verschiedenen Verdünnungen der vier Extrakte aufgeführt und zusätzlich deren jeweilige Toxizität auf die Zellen deutlich gemacht. Je höher der Gesamtgehalt dieser drei Inhaltsstoffe im Extrakt war, desto toxischer wirkte der Extrakt auf die Zellen. Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin liegen in den Extrakten einzeln zwar nicht in den Konzentration vor, welche sich im MTT-Test als toxisch herausgestellt hatten, zusammen wirken sie sich wahrscheinlich aber durch additive oder synergistische Effekte, wahrscheinlich auch in Zusammenspiel mit anderen Inhaltsstoffen, schon in geringerer Konzentration negativ auf die Lebensfähigkeit der Zellen aus.

Die für Hypericin gefundene toxische Konzentration von 0,75  $\mu\text{M}$  liegt im Bereich der von Roscetti et al. (2004) gefundenen toxischen Konzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  (entspricht 0,99  $\mu\text{M}$ ) für erythroleukämische Zellen. Die toxische Wirkung von Hypericin scheint sich jedoch von Zelllinie zu Zelllinie stark zu unterscheiden. Es gibt Angaben über eine Verträglichkeit von 50  $\mu\text{g/ml}$  (entspricht 99  $\mu\text{M}$ ) Hypericin über mehrere Tage, aber auch von 10  $\mu\text{g/ml}$  (entspricht 20  $\mu\text{M}$ ) und geringeren Konzentrationen, jeweils abhängig von der betrachteten Zelllinie (Meruelo et al. 1988). Vandenbogaerde et al. (1997) berichten, dass sie für Hypericin im Dunkeln bis zu 25  $\mu\text{M}$  keinen toxischen Einfluss auf die betrachteten humanen und murinen Zelllinien (A431, HeLa, MCF7) beobachten konnten.

Es wäre möglich, dass die beobachtete Toxizität des Hypericins schon in geringerer Konzentration auf lichtinduzierte ROS-Bildung zurückzuführen ist, welche zur Schädigung der Zellen und zum Verlust deren Lebensfähigkeit führt. Ein Hinweis hierauf ist der zu beobachtende Anstieg der ROS-Bildung bei den Zellen, welche mit Hypericin-haltigen Einzelsubstanz-Mischungen oder Extrakt behandelt wurden (siehe Kapitel 3.5, Abb. 54).

Hostanska et al. (2003) untersuchte die Toxizität von Hyperforin auf zwei leukämische Zelllinien (K562, U937), eine Glioblastom Zelllinie (LN229) und humane Astrozyten (NHA). Hierbei bewirkte eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Hyperforin eine

Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen um 20-30 %. Dieser toxische Einfluss auf die Lebensfähigkeit konnte bei den drei in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien schon bei einer 6- bis 7-fach geringeren Konzentration an Hyperforin beobachtet werden (siehe Kapitel 3.1.3, Abb. 16, 18, 20). Die nicht toxische Wirkung der Flavonoide Rutin und Quercetin auf die Zelllinie RAW 264.7, auch für wesentlich höhere Konzentrationen (40  $\mu\text{M}$ ) als die hier verwendeten, wurde bereits von Chen et al. (2001) beschrieben.

Tab. 11: Konzentrationen von Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin der Extrakte 1 bis 4 in den Verdünnungen A bis D wie sie im Ansatz vorlagen. Die grau hinterlegten Felder zeigen an, welche der Verdünnungen sich für wie viele der Zelllinien als toxisch erwiesen.

		Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] der Verdünnungen i.A.			
<b>Extrakt 1</b>		A	B	C	D
Pseudohypericin		0,192	0,141	0,096	0,048
Hypericin		0,094	0,069	0,047	0,024
Hyperforin		0,315	0,232	0,157	0,079

	für 1 Zelllinie toxisch
	für 2 Zelllinien toxisch
	für 3 Zelllinien toxisch

		Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] der Verdünnungen i.A.			
<b>Extrakt 2</b>		A	B	C	D
Pseudohypericin		0,247	0,182	0,124	0,062
Hypericin		0,170	0,125	0,085	0,043
Hyperforin		0,238	0,175	0,119	0,060

		Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] der Verdünnungen i.A.			
<b>Extrakt 3</b>		A	B	C	D
Pseudohypericin		0,566	0,416	0,283	0,142
Hypericin		0,235	0,173	0,117	0,059
Hyperforin		0,552	0,406	0,276	0,138

		Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] der Verdünnungen i.A.			
<b>Extrakt 4</b>		A	B	C	D
Pseudohypericin		0,706	0,519	0,353	0,176
Hypericin		0,323	0,238	0,162	0,081
Hyperforin		0,716	0,526	0,358	0,179

## 4.2 Hemmung der NO-Bildung

Eine erhöhte NO-Produktion durch die iNOS wird mit vielen pathophysiologischen Geschehen in Zusammenhang gebracht. Die Induktion der iNOS wird z. B. bei septischem Schock, Arthritis, Asthma (Nathan 1997, Moncada 1999), sowie bei neurodegenerativen Krankheiten und zerebralen Entzündungsgeschehen (Vallance und Leiper 2002) beobachtet. Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen ist NO, welches durch die iNOS in Zellen des Immunsystems und ortständigen Zellen des entzündeten Gewebes gebildet wird, nicht nur Marker der Entzündung, sondern auch ein schädigender, proinflammatorischer Mediator (Stichtenoth 1997). Eine Möglichkeit der Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen besteht in der gezielten Hemmung der gesteigerten NO-Produktion. Dies wird beispielsweise bei einer Behandlung mit Glukokortikoiden bewirkt (Pfeilschifter et al. 1996).

Für eine Reihe von verschiedenen Pflanzen-Extrakten bzw. deren Inhaltsstoffe wurde ein hemmender Effekt auf die iNOS von Makrophagen (Ryu et al. 2003, Kim et al. 2003, Autore et al. 2001, Lee et al. 2000) und Mikroglia (Lee et al. 2003) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob *Hypericum*-Extrakt einen Einfluss auf die NO-Bildung durch die iNOS der Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 und der Mikroglia-Zelllinien BV2 und N11 aufweist.

Zu Beginn wurden verschiedene Substanzen auf ihre Fähigkeit getestet, die NO-Bildung durch die iNOS zu induzieren (siehe Kapitel 3.2.2). Hierbei wurden Substanzen verwendet von denen aus der Literatur bereits bekannt ist, dass sie Einfluss auf die NO-Produktion von Zellen haben. Verwendet wurden Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand von *E. coli*, das chemotaktische Tripeptid N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA) und der Kalzium-Ionophor Calcimycin. LPS ist ein bekannter Induktor der iNOS in murinen Makrophagen (Kleinert et al. 2003). Das bakterielle Peptid fMLP regt die Chemotaxis von Leukozyten zur Stelle der Infektion an. Es führt zur Aktivierung von Makrophagen und vermittelt die Bildung von ROS und NO (Dasgupta et al. 2000, Sodhi und Biswas 2002). Für Phorbol-Ester wie PMA ist bekannt, dass sie die Expression der iNOS in Ratten-Hepatozyten induzieren (Hortelano et al. 1992). Der Kalzium-Ionophor Calcimycin führt zu einer Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Indem es in der Zelle den Effekt von  $IFN-\gamma$  nachahmt, aktiviert es

die mikrobizide und tumorizide Aktivität von Makrophagen (Buchmüller-Rouiller und Mauel 1991, Weiel et al. 1985).

Nur LPS erwies sich als potenter Induktor der iNOS in den drei verwendeten Zelllinien. Außerdem stellte sich heraus, dass die Zelllinie BV2 voraktiviert war und auch ohne LPS-Behandlung NO produzierte (siehe Kapitel 3.2.2, Abb. 25). Diese Voraktivierung könnte auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein. Jede Inkulturnahme von Zellen führt zum Verlust deren physiologischer Umgebung. Dies bedeutet Stress für die Zellen und ist möglicherweise schon genug um eine Aktivierung hervorzurufen. Es ist außerdem möglich, dass die Zellen das verwendete Medium oder FCS nicht optimal vertragen und es deshalb zur Induktion der iNOS kommt. Eine Infektion der Zellen mit Bakterien oder Mykoplasmen führt ebenfalls zur Aktivierung. Die Untersuchung der Kultur auf Mykoplasmen ergab jedoch ein negatives Ergebnis. Trotz der Voraktivierung ließ sich die NO-Produktion bei dieser Zelllinie durch LPS noch etwas erhöhen (siehe Kapitel 3.2.2, Abb. 25).

Bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufes der NO-Bildung konnte bei den nicht voraktivierten Zelllinien N11 und RAW 264.7 der Beginn der NO-Bildung (3-) 6 h nach Zugabe des LPS beobachtet werden (siehe Kapitel 3.2.3, Abb. 27 und 28). Dies lässt sich dadurch erklären, dass das iNOS Protein im Gegensatz zur eNOS und nNOS nicht bereits im inaktiven Zustand in den Zellen vorliegt, sondern die Expression der iNOS erst induziert wird (Kleinert et al. 2003). Der Beginn der Nitrit-Akkumulation (und somit das Vorhandensein von aktiver iNOS) etwa ab dem 6 h Messwert, steht im Einklang mit den Untersuchungen von Taylor und Geller (2000), welche in humanen Hepatozyten 4 h nach LPS-Stimulation iNOS mRNA nachweisen konnten.

Durch die Vorbehandlung der Zellen mit jeweils zwei nicht toxischen Konzentrationen der Extrakte 1, 2 und 3 wurden unterschiedlich starke Reduktionen der NO-Produktion erreicht. Durch den Extrakt 1B ergab sich bei allen Zelllinien die stärkste Hemmung. Diese betrug bei der Zelllinie BV2 durchschnittlich 40-60 %, bei der Zelllinie N11 25-35 % und bei der Zelllinie RAW 264.7 30-40 %. Auch die Voraktivierung der Zelllinie BV2 ließ sich hemmen (siehe Kapitel 3.2.3 und 3.2.4).

Um die Wirkung dieses Extraktes eventuell auf einen oder einige Inhaltsstoffe einschränken zu können, wurden die Zellen mit den Einzelsubstanzen Rutin, Hyperosid, Quercitrin, Quercetin, Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin in den

dem Extrakt 1B entsprechenden Konzentrationen behandelt und die Wirkungen mit der des Gesamt-Extraktes verglichen.

Die Flavonoide hatten in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die NO-Bildung (siehe Kapitel 3.2.4, Abb. 29). Auch die Mischung aller vier Flavonoide (Mix 1) bewirkte keine Reduktion der NO-Bildung, teilweise kam es sogar zu einer leichten Zunahme (siehe Kapitel 3.2.5, Abb. 32).

In der Literatur wird allerdings über die Hemmung der iNOS durch Flavonoide berichtet. Luo et al. (2004) untersuchten den Einfluss von Quercetin und Hyperosid auf NO-Synthase, welche aus Rattenblut (eNOS) und Rattenhirn (nNOS) isoliert wurde. Sie fanden eine Hemmung der NO-Bildung durch Quercetin und Hyperosid. Die dabei ermittelten  $IC_{50}$  Werte von 57,54  $\mu$ M (Quercetin) und 158,49  $\mu$ M (Hyperosid) liegen jedoch 411-fach bzw. 65,5-fach über den in der vorliegenden Arbeit verwendeten, im Extrakt enthaltenen, Konzentrationen (siehe Kapitel 3.2.4, Tab. 9). Chen et al. (2001) ermittelten für die Zelllinie RAW 264.7 einen  $IC_{50}$  Wert von 41,5  $\mu$ M für Rutin und von 17,1  $\mu$ M für Quercetin. Shen et al. (2002) untersuchten den Einfluss der Flavonoide Rutin, Wogonin und Quercetin auf die LPS-induzierte NO-Produktion durch die Zelllinie RAW 264.7. Sie fanden für Rutin bei einer Konzentration von 80  $\mu$ M eine sehr schwache Hemmung. Eine deutliche Hemmung wurde durch 20  $\mu$ M Wogonin bzw. Quercetin erreicht.

Alle Autoren verwendeten die Flavonoide in Konzentrationen, die um ein Vielfaches höher waren als die Konzentrationen der Flavonoide des in dieser Arbeit verwendeten Johanniskraut-Extraktes (siehe Tab. 9).

Der Einfluss des Extraktes auf die NO-Bildung ist also nicht auf die untersuchten Flavonoide zurückzuführen. Es wäre allerdings möglich, dass die Flavonoide auch in den vorliegenden geringen Konzentrationen einen Beitrag zu einem synergistischen Effekt mehrerer Inhaltsstoffe leisten.

Auch Pseudohypericin und Hypericin zeigten keine Beeinflussung der NO-Bildung (siehe Kapitel 3.2.4, Abb. 30). Hingegen konnte durch die Vorbehandlung der Zellen mit Hyperforin eine konzentrationsabhängige Reduktion mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 0,428  $\mu$ M und 0,717  $\mu$ M erreicht werden (siehe Kapitel 3.2.4, Abb. 31).

Die dem Extrakt entsprechende Konzentration an Hyperforin führte jedoch nicht zu einer gleich starken Hemmung wie der Extrakt selbst, was nahe legt, dass noch andere Inhaltsstoffe mit an der Hemmung beteiligt sind. Dies wird bestätigt durch die Versuche, in welchen der zeitliche Verlauf der NO-Bildung betrachtet wurde (siehe

Kapitel 3.2.3, Abb. 26-28). Hier zeigte der Extrakt 1B einen stärkeren Effekt als der Extrakt 3C, welcher einen höheren Hyperforin-Gehalt besitzt (siehe Kapitel 4.1, Tab. 11). Durch eine Behandlung der Zellen mit den Einzelsubstanz-Mischungen Mix 2 (Pseudohypericin, Hypericin, Hyperforin) und Mix 3 (Flavonoide, Pseudohypericin, Hypericin, Hyperforin) konnte eine dem Hyperforin entsprechende bzw. nur eine geringere Hemmung der NO-Bildung bewirkt werden (siehe Kapitel 3.2.5, Abb. 32). Die Wirkung des Hyperforins wird demnach von keinem der getesteten Inhaltsstoffe verstärkt, es müssen folglich noch ein oder mehrere andere wirksame Inhaltsstoffe im Extrakt vorliegen.

Der *Hypericum*-Extrakt, sowie sein Inhaltsstoff Hyperforin, stellten sich also als potente Hemmer der NO-Produktion der verwendeten Makrophagen- und Mikroglia-Zelllinien heraus, wobei die Wirkung des Gesamt-Extraktes sich nicht alleine auf Hyperforin zurückführen lässt. Die für die beobachtete Wirkung verwendete nötige Konzentration von Hyperforin liegt mit 250-750 nM in einem Bereich, der durch orale Einnahme von *Hypericum*-Extrakt mit entsprechend hohem Hyperforin-Gehalt erreicht werden kann. Humanstudien von Agrosí et al. (2000) zeigten, dass durch die einmalige Zufuhr von nur 300 mg *Hypericum*-Extrakt mit 5 % Hyperforin-Gehalt eine Plasmakonzentration von 168,35 +/- 57,79 ng/ml (entspricht 314 +/- 107 nM) erreicht werden kann.

Der Einfluss von *Hypericum*-Extrakt auf die durch einen Zytokin-Mix hervorgerufene NO-Bildung durch die iNOS wurde bereits von Tedeschi et al. (2003) nachgewiesen. Sie untersuchten die Wirkung auf die iNOS von humanen epithelialen Zelllinien und fanden eine durch den *Hypericum*-Extrakt hervorgerufene Reduktion der Janus Kinase 2 Aktivität. Dies führte wiederum zu einer reduzierten Tyrosin-Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT-1 $\alpha$ . Die reduzierte Phosphorylierung von STAT-1 $\alpha$  bewirkte eine Verringerung der Bindungsaffinität des Transkriptionsfaktors und somit eine Reduktion der Expression der iNOS.

Dieser Wirkungsmechanismus von Johanniskraut-Extrakt muss jedoch nicht für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien zutreffen. Es ist bekannt, dass die Regulation der iNOS zell- und speziesspezifisch ist (Kleinert et al. 2003). Außerdem wird die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-1 $\alpha$  durch IFN- $\alpha$  vermittelt (Darnell et al. 1994). LPS hingegen bewirkt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Adcock 1997). Eine Hemmung der LPS-vermittelten NO-Bildung durch iNOS

der Zelllinie BV2 wurde von Wang et al. (2002) durch die Behandlung der Zellen mit dem Flavanoid Silimarin aus der Mariendistel beobachtet. Sie stellten eine Verringerung der Bindungsaffinität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B fest, worauf eine Reduktion der Expression der iNOS folgte.

Es gibt eine ganze Reihe verschiedener Möglichkeiten, wie *Hypericum*-Extrakt auf die NO-Produktion durch die iNOS Einfluss nehmen kann. Die Expression der iNOS steht unter transkriptioneller und post-transkriptioneller Kontrolle (Kleinert et al. 2003), d. h. der Extrakt könnte, wie oben angesprochen, auf verschiedene Weise in die Regulation der Transkription oder in die Transkription selbst eingreifen. Außerdem wäre es möglich, dass die mRNA Stabilität oder die Translation beeinflusst wird. Der *Hypericum*-Extrakt könnte auch einen Einfluss auf die Verfügbarkeit von Substrat und Cofaktoren haben (Stuehr 1999). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der in die Zellen eingedrungene Extrakt das gebildete NO sofort am Ort der Bildung abfängt.

Um den genauen Angriffspunkt näher zu lokalisieren, müsste eine Quantifizierung des iNOS Proteins mittels Westernblot durchgeführt werden. Die Expression der mRNA könnte mittels RT-PCR semiquantitativ im Agarosegel oder quantitativ mit Realtime-PCR untersucht werden.

Um festzustellen, ob es sich bei der Hemmung der NO-Bildung um eine spezifische Wirkung auf die iNOS handelt, müsste auch der Einfluss von *Hypericum*-Extrakt bzw. Hyperforin auf die anderen beiden NOS Formen untersucht werden. Luo et al. (2004) zeigten, dass Quercetin und Hyperosid auf NO-Synthasen, welche aus Rattenblut (eNOS) und Rattenhirn (nNOS) isoliert wurden, einen hemmenden Effekt haben. Es wäre also durchaus möglich, dass *Hypericum*-Extrakt auch die NO-Bildung durch die eNOS und die nNOS beeinflusst.

NO ist ein wichtiger physiologischer Botenstoff und vermittelt viele Funktionen in Körper und Gehirn (siehe Kapitel 1.4). Eine unselektive Hemmung der NO-Bildung durch die eNOS und nNOS führt zwangsläufig zu Funktionsstörungen des Körpers. Andererseits kann auch das durch diese NOS-Formen gebildete NO bei Fehlern in der Regulation zu Schäden führen (Christophersen und Bredt 1997, Li und Förstermann 2000). Hierbei könnte eine Hemmung der NO-Bildung durch die eNOS und nNOS analog zur Hemmung der iNOS antiinflammatorisch und entzündungshemmend wirken.

### 4.3 Hemmung der Phagozytose

Die Phagozytose durch Makrophagen spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme und dem Abbau infektiöser Partikel und seneszenten Zellen. Sie ist beteiligt an der Entwicklung und am Umbau von Geweben und stellt einen wichtigen Mechanismus der Immunantwort und bei Infektionen dar. Phagozytose ist ein komplexer Mechanismus. Diese Komplexität kommt zum einen durch die Diversität an Rezeptoren zustande, welche an der Partikelerkennung und deren Aufnahme beteiligt sind. Zum anderen werden die meisten Partikel durch mehr als einen Rezeptor erkannt und die Rezeptoren sind fähig miteinander zu kommunizieren. Außerdem haben viele Rezeptoren eine doppelte Funktion und vermitteln Zelladhäsion und Partikelaufnahme (Aderem und Underhill 1999).

Die Erkennung und Phagozytose von Pathogenen führt zur Bildung proinflammatorischer Mediatoren und zur Generierung von ROS und NO (Aloisi 2001). Dies ist wichtig für eine funktionierende Immunabwehr und zur Abtötung eingedrungener Mikroorganismen. Die gebildeten reaktiven Oxidantien können aber auch umgebendes Gewebe schädigen und werden für die Pathogenese einer Vielzahl von Krankheiten verantwortlich gemacht (Babior 2000). Überschüssige Phagozytose und Produktion gewebsschädigender Oxidantien sind beispielsweise Grund der Myelin-Degradation bei Multipler Sklerose (Nagra et al. 1997).

Hendriks et al. (2003) konnten zeigen, dass die Behandlung der Zelllinie RAW 264.7 mit 30-300  $\mu\text{M}$  Quercetin zu einer signifikanten Reduktion der Phagozytose von Myelin und Bildung von ROS führt.

Durch Hemmung der Phagozytose wird auch die darauf folgende immunologische Reaktion der Phagozyten und die Bildung der potentiell gewebsschädigenden Oxidantien verringert. Deshalb wurden *Hypericum*-Extrakt, sowie einzelne Inhaltsstoffe, auf ihren Einfluss auf die Phagozytose verschiedener Substanzen durch die Zelllinien BV2, N11 und RAW 264.7 untersucht.

Durch die Untersuchung der Zellen im FACS konnte nicht bestimmt werden, ob die fluoreszenzmarkierten Partikel von den Zellen komplett inkorporiert worden waren. Ein positives Signal ergibt sich auch, wenn die Partikel fest an die Zelloberfläche gebunden sind. Dies bedeutet aber wiederum auch, dass der Partikel von der Zelle erkannt wurde, fest an einen Rezeptor gebunden ist und zur Aktivierung der Zelle beiträgt.

Für die Untersuchung der Phagozytose wurden den Zellen verschiedene Partikel angeboten, die durch unterschiedliche Rezeptoren erkannt werden. Verwendet wurden Zymosan, opsonisiertes Zymosan, *E. coli*, *S. aureus* und LPS. Es konnte festgestellt werden, dass die verschiedenen Partikel unterschiedlich gut von den Zellen aufgenommen wurden. Der Anteil der Zellen, welcher innerhalb eines zweistündigen Zeitraums Partikel aufgenommen haben, erhöht sich in dieser Reihenfolge der angebotenen Partikel (siehe Kapitel 3.3.1, Abb. 38):

Zymosan  $\leq$  opsonisiertes Zymosan < *E. coli* < *S. aureus* < LPS

Dies könnte sich auf die Größe der Partikel zurückführen lassen. Die Partikelgröße nimmt in folgender Reihenfolge zu:

LPS < *S. aureus* < *E. coli* < Zymosan  $\leq$  opsonisiertes Zymosan

Die Aufnahme der Partikel scheint unter anderem von deren Größe abzuhängen. Je kleiner die Partikel, desto leichter können sie von den Zellen aufgenommen werden und desto mehr Partikel können pro Zelle phagozytiert werden. Ein anderer Aspekt ist, dass die Zellen wahrscheinlich auch eine unterschiedlich große Anzahl an Rezeptoren für die Erkennung der verschiedenen Partikel aufweisen.

Durch die Opsonisierung mit IgG-Antikörpern wird das Zymosan zusätzlich als Fremdkörper markiert. Der konstante sogenannte Fc-Teil des gebundenen Antikörpers kann durch den Fc-Rezeptor der Phagozyten erkannt werden (Aderem und Underhill 1999). Es sollte folglich eine bessere Erkennung durch die Zellen erfolgen.

Bei der Zelllinie BV2 konnte für die opsonierten Zymosan-Partikel eine Erhöhung der Phagozytoseaktivität gegenüber normalem Zymosan von durchschnittlich 90 % festgestellt werden. Bei der Zelllinie N11 konnte im besten Fall eine leichte Tendenz zur Erhöhung der Phagozytoseaktivität beobachtet werden und bei der Zelllinie RAW 264.7 ergaben sich keine Unterschiede (siehe Kapitel 3.3.1, Abb. 38).

Die geringen Unterschiede zwischen Zymosan und opsoniertem Zymosan bei den Zelllinien N11 und RAW 264.7 lassen sich wahrscheinlich wiederum auf die Anzahl vorhandener Rezeptoren, sowie auf die Größe der Partikel, zurückführen. Möglicherweise ist die Anzahl der von diesen Zelllinien exprimierten Fc-Rezeptoren geringer als bei der Zelllinie BV2. Hinzu kommt, dass selbst wenn die Erkennung der opsonierten Partikel etwas schneller erfolgt, beide Partikel durch ihre Größe aber relativ langsam phagozytiert werden. Würde man die Zellen länger mit den Partikeln

inkubieren, so könnte man eventuell doch einen Unterschied in der Phagozytoseaktivität der Zellen von Zymosan und opsonisiertem Zymosan beobachten.

Durch die Vorbehandlung der Zellen mit *Hypericum*-Extrakt konnte die Phagozytoseaktivität der Zellen für Zymosan, *E. coli* und *S. aureus* in unterschiedlichem Maße gehemmt werden. Die Phagozytose von LPS ließ sich hingegen gar nicht (BV2, N11) oder nur sehr gering (RAW 264.7) vermindern (siehe Kapitel 3.3.2, Abb. 39). Die LPS-Partikel werden von einer großen Anzahl an Rezeptoren erkannt und gelangen aufgrund ihrer sehr geringen Größe vermutlich auch durch Rezeptor-unabhängige Endozytose in die Zellen. Sie können deshalb in großer Anzahl von den Zellen aufgenommen werden. Dies wird durch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen nach Phagozytose bestätigt (siehe Kapitel 3.3.1, Abb. 36). Die Aufnahme von LPS ist deshalb nicht so leicht beeinflussbar wie die Phagozytose der größeren Zymosan-, *E. coli*- und *S. aureus*-Partikel, welche aufgrund ihrer Größe nur in geringerer Anzahl die Zelle erreichen und auch langsamer phagozytiert werden.

Einen weiteren Einfluss könnte die verwendete Konzentration der verschiedenen Partikel haben. Für die verwendeten Partikel liegen keine genauen Angaben über die Molekulargewichte vor, da es sich um komplexe Strukturen handelt. Deshalb wurde für alle Partikel eine Konzentration von 10 µg/ml i. A. gewählt. Da LPS sehr viel kleiner ist und somit ein viel geringeres durchschnittliches Molekulargewicht als die anderen Partikel aufweist, waren in den Ansätzen mit LPS auch wesentlich mehr Partikel vorhanden als in den Ansätzen mit Zymosan, *E. coli* und *S. aureus*. Den Zellen standen somit mehr Partikel zur Phagozytose zur Verfügung.

Auch die Phagozytose von opsonisiertem Zymosan ließ sich nicht (N11, RAW 264.7) oder nur sehr geringfügig (BV2) hemmen (siehe Kapitel 3.3.2, Abb. 39). Die Opsonisierung von Partikeln erfolgt im Körper durch, von Plasmazellen gebildete, Antikörper. Diese Antikörper richten sich spezifisch gegen Strukturen, die vom Immunsystem bereits als nicht körpereigen erkannt wurden (Janeway et al. 2002). Es könnte durchaus als positiv betrachtet werden, wenn diese spezifische Immunantwort nicht oder nur gering durch den Extrakt beeinflusst wird.

Der Einfluss der Einzelsubstanzen wurde nur an der Phagozytose von Zymosan und *S. aureus* untersucht. Von den getesteten Substanzen zeigte nur Hyperforin einen Einfluss auf die Phagozytose. Die Phagozytose von Zymosan konnte durch Hyperforin konzentrationsabhängig gehemmt werden, wobei die dem Extrakt entsprechende Konzentration an Hyperforin keine bis nur eine sehr geringe Hemmung der Phagozytose bewirkte (siehe Kapitel 3.3.3, Abb. 41). Eine dem Extrakt ungefähr entsprechende Hemmung konnte durch die 2,5-fache Hyperforin-Konzentration (entspricht 0,625 µM) erreicht werden.

Die Phagozytose von *S. aureus* ließ sich nur bei den Zelllinien BV2 und RAW 264.7 und nur durch die höchste getestete Hyperforin-Konzentration geringfügig reduzieren (siehe Kapitel 3.3.3, Abb. 43).

Die Behandlung der Zellen mit Hyperforin brachte nicht dieselbe Wirkung wie der Gesamt-Extrakt, Hyperforin ist also nicht allein für die Hemmung verantwortlich. Bei der Testung der Einzelsubstanz-Mischungen ließ sich kein synergistischer Effekt des Hyperforins mit den anderen verwendeten Substanzen feststellen. Nur bei der Zelllinie RAW 264.7 konnte eine Tendenz zur Hemmung der Phagozytose von Zymosan durch Mix 3 beobachtet werden (siehe Kapitel 3.3.4, Abb. 44 und 45). Es müssen folglich noch ein oder mehrere andere Inhaltsstoffe des *Hypericum*-Extrakts auf die Phagozytose einwirken. Die unterschiedlich gute Hemmung der Phagozytose von Zymosan und *S. aureus* ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Partikel durch unterschiedliche Rezeptoren erkannt und diese unterschiedlich durch Hyperforin beeinflusst werden.

Die Phagozytoseaktivität der Zellen kann über verschiedene Wege gehemmt werden:

- Inhaltsstoffe des Extraktes können mit den eigentlichen Liganden der Rezeptoren konkurrieren, an deren Stelle an die Rezeptoren binden und somit die Phagozytose mindern.
- Die Expression der zur Erkennung und Phagozytose der Partikel erforderlichen Rezeptoren kann durch den Extrakt reduziert werden.
- Der Mechanismus der Ingestion der Partikel ins Innere der Zellen kann beeinflusst werden.

Es ist bekannt, dass Hyperforin einen Einfluss auf die Fluidität von Zellmembranen hat (Eckert et al. 2004). Änderungen des physiko-chemischen Zustands von Membranen können die Aktivität von Membranproteinen beeinflussen, was wiederum zu Störungen verschiedener Zellfunktionen führen kann (Wood et al. 2003). Es wäre möglich, dass der *Hypericum*-Extrakt Einfluss auf die Oberflächenrezeptoren der Zellen nimmt und somit die Erkennung oder Aufnahme von Partikeln hemmt.

Die Aufnahme von Partikeln außerdem ist ein Aktin-abhängiger Prozess und eng mit dem Zytoskelett verknüpft (Aderem und Underhill 1999). Aus diesem Grund wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht, ob die Behandlung der Zellen mit *Hypericum*-Extrakt einen Einfluss auf die Struktur des Zytoskeletts hat. Hierbei konnte kein offensichtlicher Einfluss von *Hypericum*-Extrakt auf die Anordnung der Aktin-Filamente des Zytoskeletts beobachtet werden (siehe Kapitel 3.6, Abb. 55-57).

Der *Hypericum*-Extrakt und Hyperforin scheinen folglich auf die Expression von Rezeptoren oder deren Bindungsvermögen für ihre eigentlichen Liganden zu wirken.

Die Hemmung der Phagozytose durch *Hypericum*-Extrakt könnte eine gute Möglichkeit darstellen, eine überschießende Aktivierung der Mikroglia und die damit verbundene Generierung potentiell neurotoxischer Substanzen zu beeinflussen.

#### 4.4 Einfluss auf die Bildung von ROS

Makrophagen, neutrophile Granulozyten (Janeway et al. 2002) und Mikroglia (Colton und Gilbert 1987, Banati et al. 1993) erzeugen zur Abtötung von Pathogenen eine Vielfalt an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die während des sogenannten „respiratory burst“ gebildet werden (Janeway et al. 2002). Die gebildeten Oxidantien können aber auch umgebendes Gewebe schädigen und werden mit der Pathogenese einer Vielzahl von Krankheiten in Verbindung gebracht (Babior 2000, Halliwell und Gutteridge 1999). Durch die von Mikroglia gebildeten ROS kann es im zentralen Nervensystem zur Schädigung von Neuronen und Gliazellen kommen (They et al. 1991). Wie in anderen Geweben auch, führt oxidativer Stress hier zu erhöhter Lipidperoxidation, oxidativer Schädigung von DNA, Protein-Schädigung und Induktion von Apoptose bzw. Nekrose. Die gebildeten ROS sollen an zerebralen Entzündungsgeschehen und neurodegenerativen Krankheiten, wie Parkinson, Alzheimer, Multipler Sklerose und amyotropher Lateralsklerose beteiligt sein (Halliwell und Gutteridge 1999, Nagra et al. 1997).

Der durch aktivierte Mikroglia hervorgerufene oxidative Stress könnte aber auch Auswirkungen auf Neurotransmitter und deren Funktion haben und somit eine Rolle bei der Entstehung depressiver Erkrankungen spielen. Die Monoaminmangel-Hypothese geht davon aus, dass Depressionen auf einer Verminderung der noradrenergen und/oder serotoninerger Neurotransmission im ZNS beruht (Forth et al. 2001). Hierauf beruht die Behandlung mit MAO-Hemmern sowie Serotonin- bzw. Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitoren.

Es gibt Hinweise, dass bei depressiven Erkrankungen auch eine Verringerung der  $\beta$ -Endorphine bzw. der Enkephaline festzustellen ist (Tejedor-Real et al. 1995, Darko et al. 1992). Durch die von Mikroglia gebildeten ROS könnte es zu einer oxidativen Deaktivierung von  $\beta$ -Endorphin oder Enkephalinen kommen, was zum Verlust deren Transmitteraktivität führen würde (Turkall et al. 1982).

Rosei et al. (1991) zeigten, dass in Gegenwart von  $H_2O_2$  eine Peroxidase-katalysierte Dimerisierung von Leukenkephalin und Metenkephalin erfolgen kann. Die Dimerbildung erfolgt hierbei über die Verbindung der N-terminalen Tyrosine, was den Verlust der biologischen Aktivität zur Folge hat.

Aktivierte 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). Da auch Mikroglia MPO exprimieren (Nagra et al. 1997) und zur Synthese von  $H_2O_2$  fähig sind, wäre dies ein möglicher Mechanismus für eine oxidative Beeinflussung der Transmitteraktivität im Gehirn. Dityrosin wurde auch in erhöhtem Maß in Gehirnen von Alzheimer betroffenen Patienten vorgefunden (Hensley et al. 1998).

Der Nachweis der ROS erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung eines Dichloro-dihydro-fluorescein Diazetat Derivates (CM-H<sub>2</sub>DCFDA). Diese Substanz wird innerhalb der Zelle durch Reaktion mit ROS zu einem in der Zelle eingeschlossenen fluoreszierenden Produkt umgewandelt, welches im FACS detektiert werden kann. Mit CM-H<sub>2</sub>DCFDA können folgende ROS nachgewiesen werden: Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$ , Hydroxyl Radikal  $HO^\bullet$ , Peroxyl Radikal  $RHOO^\bullet$  und Peroxynitrit  $ONOO^-$  (Haugland 2002).

Die Bildung der erfassten ROS wurde durch die Behandlung der Zellen mit A $\beta$  25-35 (Kang et al. 2001) 1,5-fach (N11), 3-fach (BV2) bzw. 2,5-fach (RAW) erhöht (siehe Kapitel 3.5, Abb. 54).

Die relativ geringe ROS Bildung ist eventuell auf die kurze, nur einstündige Inkubation der Zellen mit A $\beta$  25-35 zurückzuführen, während der es nur zu einer sehr geringfügigen Aufnahme von A $\beta$  kam. Aber auch El Khoury et al. (1998) fanden nach der Behandlung muriner Mikrogliazellen mit A $\beta$  25-35 eine nur 4-fache Erhöhung der ROS-Bildung.

Die ROS-Produktion der Zellen konnte nur durch die Vorbehandlung mit der Flavonoid-Mischung gehemmt werden. Der Gesamtextrakt, sowie Mix 2 (Pseudohypericin, Hypericin, Hyperforin) und Mix 3 (Flavonoide, Pseudohypericin, Hypericin, Hyperforin) führten zu einer verstärkten ROS-Bildung (siehe Kapitel 3.5, Abb. 54).

Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass es hier trotz weitmöglicher Lichtabschirmung zu einer Licht-induzierten ROS-Bildung durch Hypericin gekommen ist (Vandenbogaerde et al. 1998). Dies sollte *in vivo* im menschlichen Gehirn jedoch nicht passieren, so dass dort nur die antioxidative Kapazität der Flavonoide zur Geltung kommt.

Denke et al. (1999) verwendeten ein vereinfachtes Modell für die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und MPO vermittelte Dimerisierung von Metenkephalin, indem die Enkephaline durch Tyrosin und die MPO durch Meerrettich-Peroxidase ersetzt wurden. An diesem Model konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung von Tyrosin durch *Hypericum*-Extrakt gehemmt werden konnte.

In einer Reihe von *in vitro* Tests zeigte Flavonoid-angereicherter *Hypericum*-Extrakt starke antioxidative Aktivität (Zou et al. 2004). Versuche, bei denen die stufenweise Entfernung von Hypericinen und Hyperforin aus *Hypericum*-Extrakt erfolgte, lassen darauf schließen, dass die enthaltenen Flavonoide einen wichtigen Beitrag zur antidepressiven Wirksamkeit von *Hypericum*-Extrakt leisten (Butterweck et al. 2003). *Hypericum*-Extrakt könnte demnach aufgrund der antioxidativen Wirkung der enthaltenen Flavonoide zur Minderung von oxidativem Stress und seinen Folgen im Gehirn beitragen.

## 4.5 Toxizität von Amyloid $\beta$

Die für Alzheimer charakteristischen Plaques werden durch Ablagerungen von Amyloid  $\beta$  Protein gebildet. Der Mechanismus, welcher zu diesen Ablagerungen führt, ist nicht geklärt (Ard et al. 1998). Es ist bekannt, dass A $\beta$  einerseits unmittelbar apoptotisch auf Neuronen wirkt (Brown et al. 1997). Andererseits induziert A $\beta$  eine entzündliche Reaktion im Gehirn, welche ebenfalls zu neuronalem Zellverlust führen kann (Bamberger und Landreth 2002). Mikroglia spielen bei dieser Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle. Sie sind fähig A $\beta$  zu phagozytieren (Paresce et al. 1996) und produzieren als Reaktion darauf neurotoxische Substanzen, wie ROS, NO und Zytokine (Giulian 1999, Rogers und Lue 2001).

Es ist bekannt, dass A $\beta$  in Mikroglia die ROS-Produktion durch die NADPH Oxidase aktiviert (Bianca et al. 1999). Bei der Betrachtung des Einflusses von *Hypericum*-Extrakt auf die durch A $\beta$  25-35 induzierte ROS-Bildung stellte sich heraus, dass das Peptid toxisch auf die Zellen wirkte.

Weitere Untersuchungen zeigten eine konzentrationsabhängige Toxizität von Amyloid  $\beta$  25-35 auf die Zellen. Die Behandlung mit Antisense-Peptid A $\beta$  35-25 zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit (siehe Kapitel 3.4.1, Abb. 48 und 49). Somit konnte sichergestellt werden, dass es sich um einen spezifischen Effekt des A $\beta$  25-35 Peptides handelt.

Die toxische Wirkung von A $\beta$  25-35 konnte bei allen drei Zelllinien durch eine Vorbehandlung mit *Hypericum*-Extrakt signifikant verringert werden. Die Behandlung der Zellen mit den Einzelsubstanzen und den Einzelsubstanz-Mischungen hatte keinen Einfluss auf die Toxizität (siehe Kapitel 3.4.2, Abb. 51). Es stellte sich die Frage, wodurch diese Toxizität bewirkt wird und wie der *Hypericum*-Extrakt hier eingreift.

Die durch A $\beta$  25-35 hervorgerufene ROS-Produktion konnte zwar durch die Flavonoid-Mischung (Mix 1) gehemmt werden, der Gesamt-Extrakt und die beiden anderen Mischungen führten aber zu einem vermutlich Licht-induzierten Hypericin-abhängigen Anstieg der ROS-Bildung (siehe Kapitel 3.5, Abb. 54). Die Hemmung der Toxizität von A $\beta$  durch *Hypericum*-Extrakt ist demnach nicht auf die Hemmung der ROS-Bildung zurückzuführen.

Es wäre möglich, dass durch den Extrakt die Aufnahme von A $\beta$  in die Zellen gehemmt wird. Dies würde nachfolgende zelluläre immunologische Reaktionen, wie die Generierung zytotoxischer Substanzen, ebenso unterdrücken. Bei der Untersuchung der Phagozytoseaktivität stellte sich heraus, dass *Hypericum*-Extrakt jedoch keinerlei Einfluss auf die Phagozytose von A $\beta$  1-40 hat (siehe Kapitel 3.3.5, Abb. 47).

Hierbei muss erwähnt werden, dass es sich bei dem für die MTT- und ROS-Versuche verwendeten A $\beta$  25-35 nur um ein Fragment des für die Phagozytose-Untersuchung verwendeten Amyloid  $\beta$  1-40 handelt. Das Amyloid  $\beta$  Protein Fragment 25-35 gilt als die funktionelle Domäne des Amyloid  $\beta$  Proteins, welche für den neurotoxischen Effekt verantwortlich ist (Yankner et al. 1990). Dieses Fragment wird deshalb häufig in der Amyloid-Forschung verwendet, zudem sind die Kosten für das kurze Fragment um ein Vielfaches geringer als für das gesamte Peptid.

Da die durchgeführten Experimente weder Aufschluss darüber gaben, über welchen Mechanismus A $\beta$  25-35 toxisch auf die Zellen wirkt, noch wie der *Hypericum*-Extrakt die Toxizität verringert, kann über mögliche Mechanismen nur spekuliert werden. Es gibt mehrere Hypothesen über den toxischen Einfluss von A $\beta$  Peptid.

A $\beta$  kann an eine Vielzahl von Strukturen, wie Lipide, Proteine und Proteoglykane binden (Verdier et al. 2004) und somit mit Zellmembranen interagieren (Wood et al. 2003). Es wurde nachgewiesen, dass A $\beta$  25-35 und A $\beta$  1-40, aber nicht das Antisense-Peptid A $\beta$  35-25, die Fähigkeit besitzen, an Zellmembran von Neuronen und Astrozyten zu binden und dort Ionenkanäle zu bilden (Arispe 2004, Abramov et al. 2004). Die durch A $\beta$  25-35 bzw. durch A $\beta$  1-40 gebildeten Poren scheinen unterschiedliche Eigenschaften zu besitzen, durch beide Kanäle kommt es aber zum unkontrollierten Einstrom von Ionen, vor allem von Ca<sup>2+</sup>, und somit zur Störung der Homöostase in den Zellen (Arispe 2004). Die Interaktion von A $\beta$  mit der Zellmembran führt außerdem zur Destabilisierung deren Struktur (Müller et al. 1995). Es ist bekannt, dass Änderungen der physiko-chemischen Eigenschaften von Membranen die Aktivität verschiedener Membranproteine deutlich beeinflussen können. Der Einfluss von A $\beta$  auf die Fluidität von Membranen kann zur Störung verschiedener Zellfunktionen (z. B. durch Kalzium-Einstrom usw.) führen (Wood et al. 2003).

Die Zellen wurden außerdem während der Behandlung mit A $\beta$  für einige Stunden in Serum-freiem Medium gehalten um Interaktionen auszuschließen. Es gibt Anhaltspunkte, dass der Entzug von Serum eventuell zur Einleitung der Apoptose führen kann (Yenari und Giffard 2001). Es wäre also möglich, dass A $\beta$  den proapoptischen Effekt des Serum-Entzugs verstärkt. Um diese Theorie näher zu beleuchten, müsste untersucht werden, ob die Behandlung der Zellen mit A $\beta$  zur Apoptose führt.

Möglicherweise lässt sich die schützende Wirkung von *Hypericum*-Extrakt gegen die Toxizität von A $\beta$  auf den Einfluss Membran-aktiver Substanzen zurückführen. Es existieren mehrere Hinweise darauf, dass Johanniskraut Membran-aktive Inhaltsstoffe aufweist. Eckert et al. (2004) zeigten, dass *Hypericum*-Extrakt und sein Inhaltsstoff Hyperforin die Fluidität von neuronalen Zellmembranen beeinflusst. Von Neagoe et al. (2004) wurde beobachtet, dass die Behandlung künstlicher Lipid-Bilayer mit *Hypericum*-Extrakt Einfluss auf deren Ladung und Leitfähigkeit hatte. Außerdem gibt es Berichte, dass Hyperforin in  $\mu$ M Konzentrationen einen hemmenden Effekt auf Ionenkanäle von Ratten-Neuronen aufweist (Fisunov et al. 2000, Krishtal et al. 2001).

Durch die Behandlung der Mikroglia mit *Hypericum*-Extrakt wird die Zellmembran möglicherweise so beeinflusst, dass die Bildung der A $\beta$  Poren komplett verhindert wird oder es nicht zur Ausbildung funktionsfähiger Kanäle kommen kann. Diese Wirkung kann im vorliegenden Fall jedoch nicht (nur) auf Hyperforin zurückzuführen sein, da dieser Inhaltsstoff im MTT-Test keinen Einfluss auf die Toxizität von A $\beta$  zeigte (siehe Kapitel 3.4.2, Abb. 51). Auch die restlichen getesteten Inhaltsstoffe, sowie die Einzelsubstanz-Mischungen, wiesen keine Wirkung auf, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass noch andere hochwirksame Substanzen im Extrakt vorliegen müssen.

Eine mögliche Rolle könnte hier die Gruppe der Gerbstoffe spielen, welche in etwa zu 8-9 % in Johanniskraut zu finden sind (Barnes et al. 2001). Labieniec und Gabryelak (2003) zeigten, dass die Behandlung von B14-Zellen (aus Chinese Hamster) mit den Gerbstoffen Gallotannin, Ellagsäure und Gallussäure zu einer Verringerung der durchschnittlichen Lipid-Packungsdichte und somit zu einer Zunahme der Membran-Fluidität führte. Gallotannin, Ellagsäure und Gallussäure kommen in Johanniskraut nicht vor, die hier enthaltenen Gerbstoffe gehören alle zum

Catechin-Typ (Kaul 2000). Trotzdem ist ein ähnlicher Effekt dieser Substanzen nicht ausgeschlossen.

Einen weiteren Hinweis auf mögliche Membran-aktive Komponenten von *Hypericum*-Extrakt lieferte Breyer (2004). Sie konnte beobachten, dass eine Behandlung von Neuronen mit *Hypericum*-Extrakt den Glutamat-vermittelten Zelltod verhinderte. Diese Wirkung konnte jedoch nicht auf die antioxidative Wirkung der im Extrakt enthaltenen Flavonoide Hyperosid, Quercitrin und Isoquercitrin, noch auf Hypericin, zurückgeführt werden. Möglicherweise wurden auch hier Eigenschaften der Zellmembran und somit die Funktion von Kanälen oder Rezeptoren beeinflusst.

Die normale Phagozytose und der Abbau von A $\beta$  im Gehirn scheint bei Alzheimer gestört zu sein. Die die Amyloid Plaques umgebenden Mikroglia sind nicht mehr fähig das angesammelte A $\beta$  komplett und effektiv zu entfernen (Streit 2004).

Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass nicht nur die Neuronen durch A $\beta$  geschädigt werden, sondern auch die Mikroglia durch A $\beta$  in ihrer Funktionsweise beeinträchtigt werden. Durch die Beeinträchtigung der Mikroglia können diese einerseits ihre Phagozytosefunktion nicht mehr vollständig aufrechterhalten und es kommt zur weiteren Ansammlung von neurotoxischem A $\beta$ . Andererseits führt A $\beta$  durch Schädigung der Mikroglia zu deren zunehmenden Aktivierung, welche mit Bildung neurotoxischer Substanzen verbunden ist (Streit 2004).

Durch die Behandlung der Mikroglia mit *Hypericum*-Extrakt wurde der toxische Effekt von A $\beta$  auf die Zellen vermindert, die Phagozytose jedoch nicht eingeschränkt. Auf diese Weise könnte die physiologische Phagozytosefunktion der Mikroglia im Gehirn erhalten und die schädigende Wirkung von A $\beta$  vermindert werden. Die Pathogenese von Alzheimer könnte somit unterdrückt oder die Symptomatik zumindest gemindert werden.

Zudem wurde vor kurzem berichtet, dass *Hypericum*-Extrakt *in vitro* auch Neuronen direkt gegenüber A $\beta$ -induzierter Neurotoxizität schützt (Silva et al. 2004). Diese neuroprotektive Wirkung von *Hypericum*-Extrakt konnte in der vorliegenden Arbeit für die humane neuronale Zelllinie SK-N-SH bestätigt werden (siehe Kapitel 3.4.2, Abb. 50).

## 4.6 Wirksamkeit von *Hypericum*-Extrakt

*Hypericum perforatum* findet seit langem Gebrauch bei der Behandlung depressiver Erkrankungen. Viele Wirkungen auf Neuronen sind bekannt und lassen sich teilweise auf einzelne Inhaltsstoffe zurückführen. Gute Zusammenfassungen hierzu finden sich bei Butterweck (2003), Mennini und Gobbi (2004), sowie Kaul (2000).

Über die Wirkungen von Johanniskraut und seinen Inhaltsstoffen auf Mikroglia ist hingegen kaum etwas bekannt. Sie wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Reaktionen der hierbei verwendeten Mikroglia-Zelllinien BV2 und N11, sowie der Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7, waren vergleichbar. Durch das ähnliche Verhalten der drei Zelllinien sind die beobachteten Effekte gut abgesichert.

Es stellte sich heraus, dass eine Behandlung der Mikroglia mit *Hypericum*-Extrakt zu einer Hemmung der LPS-induzierten NO-Bildung führt. Dieser Effekt konnte im Wesentlichen auf die Wirkung von Hyperforin zurückgeführt werden, wobei aber der Extrakt zu einer stärkeren Hemmung führte als die ihm entsprechende Konzentration an Hyperforin (siehe Kapitel 3.2.3. und 3.2.4). Albert et al. (2002) berichten, dass Hyperforin außerdem zu einer effektiven Hemmung der Cyclooxygenase-1 und der 5-Lipoxygenase führt. Hyperforin scheint demnach einen wichtigen Beitrag zur antiphlogistische Wirkung des *Hypericum*-Extraktes zu leisten.

Des Weiteren stellte sich heraus, dass *Hypericum*-Extrakt teilweise Einfluss auf die Phagozytoseaktivität der Mikroglia hat (siehe Kapitel 3.3.2, Abb. 39). Auch hier erwies sich Hyperforin zumindest bei der Phagozytose von Zymosan als wirksamer Inhaltsstoff (siehe Kapitel 3.3.3, Abb. 41). Der Gesamt-Extrakt hatte jedoch wieder eine stärkere und breitere Wirkung.

Für Hyperforin sind viele Wirkungen auf Neuronen bekannt (Chatterjee et al. 1998, Eckert et al. 2004, Hostanska et al. 2003, Kaehler et al. 1999, Roz und Rehavi 2003, Wonnemann et al. 2000). Hyperforin wird deshalb als wichtige antidepressiv wirksame Komponente des Johanniskrauts diskutiert.

Aber auch andere Inhaltsstoffe zeigten Wirksamkeit: So konnte die durch A $\beta$  25-35 induzierte ROS-Bildung nur durch die Flavonoid-Mischung gehemmt werden (siehe Kapitel 3.5, Abb. 54). Auch Zou et al. (2004) berichten über die antioxidative Wirkung von Flavonoid-angereichertem *Hypericum*-Extrakt. Flavonoide sind bekannt als

Antioxidantien (Youdim et al. 2002) und stellen vermutlich die Hauptkomponenten der antioxidativen Wirkung des Extrakts dar.

Die Minderung des negativen Einflusses von A $\beta$  auf die Lebensfähigkeit von Mikroglia konnte hingegen auf keinen der getesteten Inhaltsstoffe zurückgeführt werden (siehe Kapitel 3.4.2, Abb. 51). Hier zeigte nur der Gesamt-Extrakt eine Wirkung. Es liegen demnach noch weitere wirksame, aber noch unbekannte, Inhaltsstoffe im Extrakt vor.

Durch *Hypericum*-Extrakt lassen sich also auch Funktionen der Mikroglia beeinflussen. Diese Wirkung trägt möglicherweise genauso zur Wirksamkeit von Johanniskraut bei depressiven Erkrankungen bei, wie die Wirkungen auf Neuronen. Die beobachteten Effekte lassen sich jedoch nicht oder nicht komplett auf einzelne der getesteten Inhaltsstoffe des Gesamt-Extrakts zurückführen. Außerdem zeigten verschiedene Inhaltsstoffe verschiedene Wirkungen. Eine umfassende Wirkung kann demnach nur durch den Gesamt-Extrakt erreicht werden.

Ein weiterer Punkt, der bei allen *in vitro* Versuchen zu beachten ist, ist die Aufnahme in den Körper und die Verfügbarkeit der Substanzen dort, wo sie wirken sollen. Wird ein Präparat oral zugeführt, so stellt die Aufnahme durch den Magen oder Darm die erste Hürde dar, die Metabolisierung durch die Leber die nächste. Das letzte Hindernis liegt in der Blut-Hirn-Schranke. Es ist also unklar, ob alle *in vitro* verwendeten und vielleicht wirksamen Inhaltsstoffe auch in dieser Form und in der nötigen Konzentration im Gehirn ankommen.

Im Rattenmodell konnte nachgewiesen werden, dass Hyperforin und Hypericin bis ins Gehirn gelangen können (Mennini und Gobbi 2004). Für die in *Hypericum* enthaltenen Flavonoide Quercetin und Miquelianin, sowie für das Biflavonoid Amentoflavon konnte *in vitro* an Blut-Hirn-Schranken-Modellen aus endothelialen Zellen nachgewiesen werden, dass sie theoretisch in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Youdim et al. 2004, Gutmann et al. 2002, Juergenliemk et al. 2003).

Des Weiteren ist zu beachten, dass die Versuche in dieser Arbeit mit murinen Zellen durchgeführt wurden und die gefundenen Ergebnisse deshalb nur bedingt auf humane Zellen übertragbar sein könnten.

### **Schlussfolgerung:**

Zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen werden derzeit hauptsächlich zwei Therapiekonzepte diskutiert.

Einerseits zeigen immunsuppressiv und antiinflammatorisch wirkende Substanzen gute Erfolge bei der Behandlung solcher Erkrankungen (Kaminska et al. 2004). Beispiele hierfür sind Multiple Sklerose (Gebicke-Haerter et al. 1998), Alzheimer (Nakamura 2002) und Parkinson (Liu und Hong 2003).

Da andererseits auch oxidativer Stress eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielt (Emerit et al. 2004, Sun und Chen 1998), finden ebenfalls antioxidativ wirkende Mittel Anwendung (Behl und Moosmann 2002, Youdim et al. 2002).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass *Hypericum*-Extrakt beide Mechanismen abdeckt. Die immunsuppressive bzw. antiinflammatorische Wirkung wird gewährleistet durch die Unterdrückung der NO-Produktion und die Reduktion der Phagozytoseaktivität durch den Extrakt. Die enthaltenen Flavonoide sorgen für die antioxidative Eigenschaften. Darüber hinaus zeigte *Hypericum*-Extrakt zytoprotektive Wirkung, welche über einen bisher nicht geklärten Mechanismus vermittelt wird.

Abgesehen von seinem direkten Einfluss auf Neuronen, könnten auch die vielfältigen Wirkungen von *Hypericum*-Extrakt auf Funktionen der Mikroglia bei der Wirksamkeit von Johanniskraut bei depressiven Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen.

Die Gabe von *Hypericum*-Extrakt könnte somit eine Möglichkeit zur Behandlung bzw. Vorbeugung neurodegenerativer Erkrankungen und anderer Krankheiten, die im Zusammenhang mit aktivierten Mikroglia stehen, darstellen.

## 5 Zusammenfassung

Mikroglia stellen die immunkompetenten Zellen des zentralen Nervensystems dar. Durch die Aktivierung der Mikroglia kommt es zur Freisetzung von zytoprotektiven, zytotoxischen und inflammatorischen Mediatoren, außerdem werden die Zellen zu Phagozyten. Aktivierte Mikroglia können eindringende Mikroorganismen zerstören, potentiell schädlichen Debris entfernen, sowie die Gewebereparatur durch Abgabe von Wachstumsfaktoren fördern und somit die Rückkehr zur Gewebshomöostase vereinfachen. Die von aktivierten Mikroglia gebildeten Substanzen wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), NO, Glutamat und Zytokine können aber auch neurotoxische Wirkung haben. Das durch die induzierbare NO-Synthase gebildete NO wirkt proinflammatorisch, zytotoxisch und proapoptotisch. Durch die gebildeten ROS kann es im zentralen Nervensystem zur Schädigung von Neuronen und Gliazellen kommen. Aktivierte Mikroglia werden deshalb als wichtige Faktoren bei der Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Krankheiten gesehen. Der durch aktivierte Mikroglia hervorgerufene oxidative Stress könnte aber auch Auswirkungen auf Neurotransmitter und deren Funktion haben und somit eine Rolle bei der Entstehung depressiver Erkrankungen spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von *Hypericum*-Extrakt und einzelner seiner Inhaltsstoffe auf verschiedenen Funktionen von Mikroglia untersucht. Verwendet wurden hierfür die murinen Mikroglia-Zelllinien BV2 und N11, sowie die murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7.

Es stellte sich heraus, dass eine Behandlung der Zellen mit *Hypericum*-Extrakt zur Hemmung der LPS-induzierten NO-Bildung führt. Dieser Effekt konnte zum Großteil auf die Wirkung von Hyperforin zurückgeführt werden.

Des Weiteren zeigte sich, dass *Hypericum*-Extrakt Einfluss auf die Phagozytoseaktivität der Mikroglia hat. Auch hier erwies sich Hyperforin, zumindest bei der Phagozytose von Zymosan, als wirksamer Inhaltsstoff.

Außerdem konnte festgestellt werden, dass der zytotoxische Einfluss von A $\beta$  25-35 auf Mikroglia durch *Hypericum*-Extrakt effektiv verringert werden kann. Die Minderung des negativen Einflusses von A $\beta$  25-35 auf die Lebensfähigkeit konnte jedoch auf keinen der getesteten bekannten Inhaltsstoffe zurückgeführt werden.

Die durch A $\beta$  25-35 hervorgerufene ROS-Bildung wurde durch *Hypericum*-Extrakt verstärkt. Dies ist vermutlich auf eine licht-induzierte Hypericin-vermittelte ROS-Bildung zurückzuführen. Durch die Flavonoid-Mischung konnte hingegen eine Hemmung erzielt werden.

Die Untersuchungen zeigten, dass *Hypericum*-Extrakt antiinflammatorische, immunsuppressive und antioxidative Eigenschaften vereint, und potentiell neurotoxischen Wirkungen von Mikroglia entgegenwirken kann. Die Gabe von *Hypericum*-Extrakt könnte somit eine Möglichkeit zur Behandlung bzw. Vorbeugung neurodegenerativer Erkrankungen und anderer Krankheiten, die im Zusammenhang mit aktivierten Mikroglia stehen, darstellen.

## 6 Literatur

- Abramov A. Y., Canevali L., Duchen M. R. (2004) Calcium signals induced by amyloid  $\beta$  peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochimica et Biophysica Acta* 1742, 81-87
- Adcock I. M. (1997) Transcription factors as activators of gene transcription: AP-1 and NF-kappa B. *Monaldi Arch. Chest. Dis.* 52, 178-186
- Aderem A. und Underhill D. M. (1999) Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593-623
- Agrosí M., Mischiatti S., Harrasser P. C., Savio D. (2000) Oral bioavailability of active principles from herbal products in humans. A study on Hypericum perforatum extracts using the soft gelatin capsule technology. *Phytomedicine* 7 (6), 455-462
- Albert D., Zündorf I., Dingermann T., Müller W. E., Steinhilber D., Werz O. (2002) Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochemical Pharmacology* 64, 1767-1775
- Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593-615
- Aloisi F. (2001) Immune Function of Microglia. *Glia* 36, 165-179
- Alzheimer Forschung Initiative e. V. (2004)  
([www.alzheimer-forschung.de/web/alzheimerkrankheit/index.htm](http://www.alzheimer-forschung.de/web/alzheimerkrankheit/index.htm))
- Änggard E. (1994) Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *The Lancet* 343 (8907), 1199-1206

- Arispe N. (2004) Architecture of the Alzheimer's A $\beta$ P Ion Channel Pore. *J. Membrane Biol.* 197, 33-48
- Autore G., Rastrelli L., Lauro M. R., Marzocco S., Sorrentino R., Sorrentino U., Pinto A., Aquino R. (2001) Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonoles. *Life Sciences* 70, 523-534
- Ard M. D., Cole G. M., Mehrle A. P., Fratkin J. D. (1998) Scavenging of Alzheimer's amyloid  $\beta$ -protein by microglia in culture. *Journal of Neuroscience Research* 43 (2) 190-202
- Babior B. M. (2000) Phagocytes and Oxidative Stress. *The American Journal of Medicine* 109, 33-44
- Bamberger M. E. und Landreth G. E. (2002) Inflammation, apoptosis, and Alzheimer's Disease. *Neuroscientist* 8, 276-283
- Banati R. B., Gehrmann J., Schubert P., Kreutzberg G. W. (1993) Cytotoxicity of Microglia. *Glia* 7, 111-118
- Barnes J., Anderson L. A., Phillipson J. D. (2001) St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 583-600
- Behl C. und Moosmann B. (2002) Oxidative Nerve Cell Death in Alzheimer's Disease and Stroke: Antioxidants as Neuroprotective Compounds. *Biol. Chem.* 383, 521-536
- Bianca V. D., Dusi S., Bianchini E., Dal Pra I., Rossi F. (1999) Beta-amyloid activates the O<sub>2</sub>- forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 274, 15493-15499

- Blasi E., Barluzzi R., Bocchini V., Mazzolla R., Bistoni F. (1990) Immortalisation of murine microglial cells by a *v-raf / v-myc* carrying retrovirus. *Journal of Neuroimmunology* 27, 229-237
- Boje K. M. und Arora P. K. (1992) Microglia-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* 587, 250-256
- Bossy-Wetzel E., Schwarzenbacher R., Lipton S. A. (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature medicine*, Juli 2004, S2-S9
- Breyer A. (2004) Einfluss von Johanniskraut-Extrakt auf die Glutamat-induzierte Toxizität neuronaler Zellen. Dissertation am Lehrstuhl für Phytopathologie der Technischen Universität München
- Brown D. R., Herms J. W., Schmidt B., Kretzschmar H. A. (1997) PrP and amyloid fragments activate different neurotoxic mechanisms in cultured mouse cells. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1162-1169
- Buchmüller-Rouiller Y. und Mael J. (1991) Macrophage Activation For Intracellular Killing As Induced By Calcium Ionophore. Correlation with Biologic and Biochemical Events. *The Journal of Immunology* 146 (1), 217-223
- Bundesanzeiger Nr. 228 vom 5. Dezember 1984, Monographie Kommission E, BGA Berlin (Korrektur 1989)
- Butterweck V. (2003) Mechanism of Action of Saint John's Wort in Depression. *CNS Drugs* 17 (8), 539-562
- Butterweck V. und Nahrstedt A. (2003) Was ist bekannt über Johanniskraut? Phytochemie und Pharmakologie. *Pharmazie in unserer Zeit* 32 (3), 212-219

- Butterweck V., Christoffel V., Nahrstedt A., Petereit F., Spengler B., Winterhoff H. (2003) Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different *Hypericum* preparations in behavioral models. *Life Sciences* 73, 627-639
- Carini M., Stefani R., Aldini G., Ozioli M., Facino R. M. (2001) Procyanidins from *Vitis vinifera* Seeds Inhibit the Respiratory Burst of Activated Human Neutrophils and Lysosomal Enzyme Release. *Planta Med.* 67, 714-717
- Chao C. C., Hu S., Peterson P. K. (1996) Glia: the not so innocent bystanders. *Journal of NeuroVirology* 2, 234-239
- Chatterjee S. S., Bhattacharya 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
- Chen Y. C., Shen S. C., Lee W. R., Hou W. C., Yang L. L., Lee T. J. F. (2001) Inhibition of Nitric Oxide Synthase Inhibitors and Lipopolysaccharide Induced Inducible NOS and Cyclooxygenase-2 Gene Expressions by Rutin, Quercetin, and Quercetin Pentaacetate in RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Cellular Biochemistry* 82, 537-548
- Christopherson K. S. und Bredt D. S. (1997) Nitric Oxide in Excitable Tissues: Physiological Roles and Disease. *J. Clin. Invest.* 100, 2424-2429
- Colton C. A. und Gilbert D. L. (1987) Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Letters* 223 (2), 284-288
- Czygan F.-C. (1993) Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrautes. *Zeitschrift für Phytotherapie* 14, 272-278
- Darko D. F., Risch S. C., Gillin J. C., Golshan S. (1992) Association of  $\beta$ -endorphin with specific clinical symptoms of depression. *Am. J. Psychiatry* 149, 1162-1167

- Darnell J. E. Jr., Ken I. M., Stark G. R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science (Wash DC)* 264, 1415-1421
- Dasgupta D., Chakraborty P., Basu M. K. (2000) fMLP Receptor Stimulated Activation of Macrophage: Its Effect on Killing of Intracellular *Leishmania donovani*. *Bioscience Reports* 20 (5), 345-354
- Dawson V. L. und Dawson T. M. (1996) Nitric Oxide Actions In Neurochemistry. *Neurochem. Int.* 29 (2), 97-110
- Deguchi T. und Yoshioka M. (1982) L-Arginine Identified as an Endogenous Activator for Soluble Guanylate Cyclase From Neuroblastoma Cells. *J. Biol. Chem.* 257, 10147-10151
- Del Rio-Hortega P. (1932) Microglia. In: *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, Vol. 2, (Penfield W, ed.), Paul P Hocker, New York, 481-534
- Denke A., Schneider W., Elstner E. F. (1999) Biochemical Activities of Extracts from *Hypericum perforatum* L. 2nd Communication: Inhibition of metenkephaline- and tyrosine-dimerization. *Arzneimittel-Forschung / Drug Research* 49 (1), 109-114
- Eckert G. P., Keller J. H., Jourdan C., Karas M., Volmer D. A., Schubert-Zsilavec M., Müller W. E. (2004) Hyperforin modifies neuronal membrane properties in vivo. *Neurosci. Lett.* 367, 139-143
- El Khoury J., Hickman S. E., Thomas C. A., Loike J. D., Silverstein S. C. (1998) Mikroglia, Scavenger Receptors, and the Pathogenesis of Alzheimer`s Disease. *Neurobiology of Aging* (19) suppl.1, S81-S84
- Elstner E. F. (1990) Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin. BI Verlagsgesellschaft, Mannheim-Wien-Zürich, 529 S.

- Emerit J., Edeas M., Bricaire F. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58, 39-46
- Fang F. C. (1997) Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. *J. Clin. Invest.* 99 (12), 2818-2825
- Flanagan M. D. und Lin S. (1980) Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. *J. Biol. Chem.* 255 (3), 835-838
- Forth W., Henschler D., Rummel W., Förstermann U., Starke K. (2001) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 1258 S.
- Fraser I. P., Koziel H., Ezekowitz R. A. B. (1998) The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunology* 10, 363-372
- Fuchs L. (1543) New Kreüterbuch. Nachdruck 2001, Taschen GmbH, 960 S.
- Furchgott R. F., Cherry P. D., Zawadzki J. V., Jothianandan D. (1984) Endothelial Cells As Mediators of Vasodilation of Arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6 Suppl 2, S336-S343
- Gebicke-Haerter P. J. (2001) Microglia in Neurodegeneration: Molecular Aspects. *Microscopy Research and Technique* 54, 47-58
- Gebicke-Haerter P. J., Lieb K., Illes P., Berger M. (1998) Mikroglia: Mechanismen der Aktivierung und Bedeutung bei der Pathogenese neuro-psychiatrischer Erkrankungen. *Nervenarzt* 69, 752-762

- Gehrmann J., Matsumoto Y., Kreutzberg G. W. (1995) Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Research Reviews* 20, 269-287
- Giulian D. (1999) Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 13-18
- Green L. C., Tannenbaum S. R., Goldman P. (1981) Nitrate Synthesis in the Germfree and Conventional Rat. *Science* 212, 56-58
- Groves J. T. und Wang C. C. (2000) Nitric Oxide Synthase: Models and Mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 687-695
- Gutmann H., Bruggisser R., Schaffner W., Bogman K., Botomino A., Drewe J. (2002) Transport of Amentoflavon Across the Blood-Brain Barrier in vitro. *Planta Med.* 68, 804-807
- Halliwell B. und Gutteridge J. M. C. (1999) Free radicals in biology and medicine. Third edition. Oxford University Press, Oxford, 936 S.
- Hampton M. B., Kettle A. J., Winterbourn C. C. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007-3017
- Haugland R. P. (2002) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Ninth Edition, Molecular Probes, Inc.
- 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
- Hendriks J. J. A., de Vries H. E., van der Pol S. M. A., van den Berg T. K., van Tol E. A. F., Dijkstra C. D. (2003) Flavonoids inhibit myelin phagocytosis by macrophages; a structure-activity relationship study. *Biochemical Pharmacology* 65, 877-885

- Hensley K., Maidt M. L., Yu Z., Shang 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
- Hibbs J. B. Jr., Taintor R. R. and Vavrin Z. (1987) Macrophage Cytotoxicity: Role for L-Arginine Deiminase and Imino Nitrogen Oxidation to Nitrite. *Science* 235, 473-476
- Hortelano S., Genaro A. M., Boscá L. (1992) Phorbol Esters Induce Nitric Oxide Synthase Activity in Rat Hepatocytes. *The Journal Of Biological Chemistry* 267 (35), 24937-24940
- Hostanska K., Reichling J., Bommer S., Weber M., Saller R. (2003) Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 56, 121-132
- Husemann J., Loike J. D., Anankov R., Febbraio M., Silverstein S. C. (2002) Scavenger Receptors in Neurobiology and Neuropathology: Their Role on Microglia and Other Cells of the Nervous Systems. *Glia* 40, 195-205
- Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. (2002) Immunologie. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, 777 S.
- Juergenliemk G., Boje K., Huewel S., Lohmann C., Galla H.-J., Nahrstedt A. (2003) In Vitro Studies Indicate that Miquelianin (Quercetin 3-O- $\beta$ -D-Glucuronopyranosid) is Able to Reach the CNS from the Small Intestine. *Planta Med.* 69, 1013-1017
- Kaehler S. T., Sinner C., Chatterjee S. S., Philippu A. (1999) Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleus. *Neuroscience Letters* 262, 199-202

- Kaminska B., Gaweda-Walerych K., Zawadzka M. (2004) Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants – facts and hypothesis. *J. Cell. Mol. Med.* 8 (1), 45-58
- Kang J., Park E. J., Jou I., Kim J.-H., Joe E.-H. (2001) Reactive oxygen species mediate A $\beta$ (25-35)-induced activation of BV-2 microglia. *NeuroReport* 12 (7), 1449-1452
- Kaul R. (2000) Johanniskraut. Botanik, Inhaltsstoffe, Qualitätskontrolle, Pharmakologie, Toxikologie und Klinik. Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 187 S.
- Kim R. G., Shin K. M., Kim Y. K., Jeong H. J., Ha J., Choi J. W., Park H. J., Lee K. T. (2003) Inhibition of Methanol Extract from the Aerial Parts of *Saururus chinensis* on Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide and Prostaglandin E<sub>2</sub> Production from Murine Macrophage RAW 164.7 Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 481-486
- Kleinert H., Schwarz P. M., Förstermann U. (2003) Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide. *Biol. Chem.* 384, 1343-1364
- Kobayashi T., Robinson J. M., Seguchi H. (1998) Identification of intracellular sites of superoxide production in stimulated neutrophils. *J. Cell. Sci.* 111, 81-91
- Kreutzberg G. W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312-318
- Krishtal O., Lozovaya N., Fisunov A., Tsintsadze T., Pankratov Y., Kopanitsa M., Chatterjee S. (2001) Modulation of ion channels in rat neurons by the constituents of *Hypericum perforatum*. *Pharmacopsychiatry* 34, Suppl 1, S74-S82
- Labieniec M. und Gabryelak T. (2003) Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. *Mutat. Res.* 539, 127-135

- Lee H., Kim Y. O., Kim H., Kim S. Y., Noh H. S., Kang S. S., Cho G. J., Choi W. S., Suk K. (2003) Flavonoid wogonin from medical herb is neuroprotective by inhibiting inflammatory activation of microglia. *The FASEB Journal* 17, 1943-1944
- Lee H. S., Lee S. H., Kim Y. S., Song C. G., Kim M. K. (2000) Effect of Oriental Medicinal Plants on Nitric Oxide Synthase Activity. *Food Sci. Biotechnol.* 9 (2), 77-82
- Li H. und Förstermann U. (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J. Pathol.* 190, 244-254
- Liu B. und Hong J.-S. (2003) Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. *JPET* 304 (1), 1-7
- Luo L., Sun Q., Mao Y. Y., Lu Y. H., Tan R. X. (2004) Inhibitory effects of flavonoids from *Hypericum perforatum* on nitric oxide synthase. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 221-225
- Mann E. (2003) Selektion von Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) anhand biologischer Testsysteme. Dissertation am Lehrstuhl für Phytopathologie der Technischen Universität München
- Medzhitov R. und Janeway C. Jr. (2000 a) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews* 173, 89-97
- Medzhitov R. und Janeway C. Jr. (2000 b) Innate Immunity. *The New England Journal of Medicine* 343 (5), 338-344
- Mennini T. und Gobbi M. (2004) The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. *Life Science* 75, 1021-1027

- Meruelo D., Lavie G., Laviet D. (1988) Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5230-5234
- Michel T. und Feron O. (1997) Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, and Why? *J. Clin. Invest.* 100 (9), 2146-2152
- Moncada S. (1999) Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J. Roy. Soc. Med.* 92, 164-169
- Mosmann T. (1983) Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63
- Müller W. E., Rolli M., Schäfer C., Hafner U. (1997) Effects of *Hypericum* extrakt (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl. 2, 102-107
- Müller W. E., Koch S., Eckert A., Hartmann H., Scheuer K. (1995)  $\beta$ -amyloid peptide decreases membrane fluidity. *Brain Res.* 674, 133-136
- Müller W. E. und Schäfer C. (1996) Johanniskraut: in-vitro Studie über *Hypericum*-Extrakt (LI 160), Hypericin und Kämpferol als Antidepressiva. *Dtsch. Apoth. Ztg* 136, 17-24
- Müller W. E., Singer A., Wonnemann M., Hafner U., Rolli M., Schäfer C. (1998) Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of *Hypericum* extract. *Pharmakopsychatry* 31 Suppl. 1, 16-21
- Nagra R. M., Becher B., Antel J. P., Gold D., Paladino T., Smith R. A., Nelson J. R., Reynolds W. F. (1997) Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 78, 97-107

- Nahrstedt A. und Butterweck V. (1997) Biological Active and Other Chemical Constituents of the Herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychatry* 30, 129-134
- Nakajima K. und Kohsaka S. (2001) Microglia: Activation and Their Significance in the Central Nervous System. *J. Biochem.* 130, 169-175
- Nakamura Y. (2002) Regulating Factors for Microglial Activation. *Biol. Pharm. Bull.* 25 (8), 945-953
- Nathan C. (1997) Inducible Nitric Oxide Synthase: What Difference Does It Make? *J. Clin. Invest.* 100 (10), 2417-2423
- Neagoe I., Macri B. M., Flonta M. L. (2004) Hyperici herba extract interaction with artificial lipid bilayers. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 1283-1289
- Palmer R. M., Ferrige A. G., Moncada S. (1987) Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature* 327, 524-526
- Paresce D. M., Gosh R. N., Maxfield F. R. (1996) Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* 17 (3), 553-565
- Pfeilschifter J., Eberhardt W., Hummel R., Kunz D., Mühl H., Nitsch D., Plüss C., Walker G. (1996) Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase – potential for a novel class of anti-inflammatory agents. *Cell. Biol. Int.* 20, 51-58
- Product Information Live/Dead-Viability/Cytotoxicity Kit (L-3224), Molecular Probes
- Pryor W. A. und Squadrito G. L. (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 268, L699-L722

- Raschke W. C., Baird S., Ralph P., Nakoinz I. (1978) Functional Macrophage Cell Lines Transformed by Abelson Leukemia Virus. *Cell* 15, 261-267
- Richelson E. (1996) Synaptic effects of antidepressants. *J. Clin. Psychopharmacol.* 16 Suppl. 2, 1S-7S
- Righi M., Mori L., De Liberto G., Sironi M., Biondi A., Mantovani A., Donini S. D., Ricciardi-Castagnoli P. (1989) Monokine production by microglial cell clones. *Eur. J. Immunol.* 19, 1443-1448
- Rogers J. und Lue L.-F. (2001) Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid  $\beta$ -peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* 39, 333-340
- Rosei M. A., Blarzino C., Foppoli C., Coccia R., De Marco C. (1991) The peroxidase-catalyzed oxidation of enkephalins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179 (1), 147-152
- Roscetti G., Franzese O., Comandini A., Bonmassar E. (2004) Cytotoxic Activity of *Hypericum perforatum* L. on K562 Erythroleukemic Cells: Differential Effects between Methanolic Extract and Hypericin. *Phytother. Res.* 18, 66–72
- Roz N. und Rehavi M. (2003) Hyperforin inhibits vesicular uptake of monoamines by dissipating pH gradient across synaptic vesicle membrane. *Life Sciences* 73, 461-470
- Ryu J.-H., Ahn H., Kim J. Y., Kim Y.-K. (2003) Inhibitory Activity of Plant Extracts on Nitric Oxide Synthesis in LPS-Activated Macrophages. *Phytotherapy Research* 17, 485-489
- Saller R., Melzer J., Reichling J. (2003) Johanniskraut (*Hypericum perforatum*): ein plurivalenter Rohstoff für traditionelle und moderne Therapien. *Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd* 10 (suppl 1), 33-40

- Schneider G. und Hiller K. (1999) *Arzneidrogen*. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, 578 S.
- Selkoe D. J. (2001) Alzheimer`s Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological Reviews* 81 (2), 741-766
- Shen S. C., Lee W. R., Lin H. Y., Huang H. C., Ko C. H., Yang L. L., Chen Y. C. (2002) In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> production. *European Journal of Pharmacology* 446, 187-194
- Silva B. A., Dias A. C. P., Ferreres F., Malva J. O., Oliveira C. R. (2004) Neuroprotective Effect of *H. perforatum* Extracts on  $\beta$ -Amyloid-induced Neurotoxicity. *Neurotoxicity Report* 6 (2), 119-130
- Sodhi A. und Biswas S. K. (2002) fMLP-induced in vitro nitric oxide production and its regulation in murine peritoneal macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 71, 262-270
- Steinbeck M. J., Khan A. U., Karnovsky M. J., Hegg G. G. (1992) Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J. Biol. Chem.* 267, 13425-13433
- Stichtenoth D. O. (1997) Stickstoffmonoxid. Mediator oder Marker der chronischen Entzündung? *Internist* 38, 420-426
- Streit W. J. (2002) Microglia as Neuroprotective, Immunocompetent Cells of the CNS. *Glia* 40, 133-139
- Streit W. J. (2004) Microglia and Alzheimer`s Disease Pathogenesis. *Journal of Neuroscience Research* 77, 1-8
- Stuehr D. J. (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411, 217-230

- Stuehr D. J. und Marletta M. A. (1985) Mammalian Nitrate Biosynthesis: Mouse Macrophages Produce Nitrite and Nitrate in Response to Escherichia Coli Lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7738-7742
- Sun A. Y. und Chen Y.-M. (1998) Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. *J. Biomed. Sci.* 5, 401-414
- Suzuki O., Katsumata Y., Oya M. (1984) Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med.* 50, 272-274
- Taylor B. S. und Geller D. A. (2000) Molecular Regulation Of The Human Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Gene. *Shock* 13 (6), 413-424
- Tedeschi E., Menegazzi M., Margotto D., Suzuki H., Förstermann U., Kleinert H. (2003) Anti-Inflammatory Actions of St. John's Wort: Inhibition of Human Inducible Nitric-Oxide Synthase Expression by Down-Regulating Signal Transducer and Activator of Transcription-1a (STAT-1 $\alpha$ ) Activation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 207, 254-261
- 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
- They C., Chamak B., Mallat M. (1991) Cytotoxic Effect of Brain Macrophages on Developing Neurons. *Eur. J. Neurosci.* 3 (11), 1155-1164
- Thiede H. M. und Walper A. (1994) Inhibition of MAO and COMT by *Hypericum* extracts and hypericin. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 7, S54-S56
- Titheradge M. A. (1999) Nitric oxide in septic shock. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411, 437-455
- Turkall R. M., Denison R. C., Tsan M. F. (1982) Degradation and oxidation of methionine enkaphalin by human neutrophils. *J. Lab. Clin. Med.* 99 (3), 418-427

- Vallance P. und Leiper J. (2002) Blocking NO Synthesis: How, Where and Why? *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 939-950
- Vandenbogaerde A. L., Kamuhabwa A., Delaey E., Himpens B. E., Merlevede W. J., de Witte P. A. (1998) Phototoxic effect of pseudohypericin versus hypericin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 45, 87-94
- Vandenbogaerde A. L., Proot P., Himpens B. E., Merlevede W. J., de Witte P. A. (1997) Differential cytotoxic Effects induced after photosensitization by hypericin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 38, 136-142
- Van Rossum D. und Hanisch U.-K. (2004) Microglia. *Metabolic Brain Disease* 19 (3/4), 393-411
- Verdier Y., Zarándi M., Penke B. (2004) Amyloid  $\beta$ -Peptide Interaction with Neuronal and Glial Cell Plasma Membrane: Binding Sites and Implications for Alzheimer`s Disease. *Journal of Peptide Science* 10, 229-248
- Vilhardt F. (2005) Cells in Focus - Microglia: phagocyte and glia cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 17-21
- Wang M. J., Lin W. W., Chen H. L., Chang Y. H., Ou H. C., Kuo J. S., Hong J. S., Jeng K. C. G. (2002) Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *European Journal of Neuroscience* 16, 2103-2112
- Weiel J. E., Adams D. O., Hamilton T. A. (1985) Biochemical Models Of  $\gamma$ -Interferon Action: Altered Expression Of Transferrin Receptors On Murine Peritoneal Macrophages After Treatment In Vitro With PMA Or A23187. *The Journal of Immunology* 134 (1), 293-298

- Wonnemann M., Singer A., Müller W. E. (2000) Inhibition of Synaptosomal Uptake of  $^3\text{H}$ -L-glutamate and  $^3\text{H}$ -GABA by Hyperforin, a Major Constituent of St. John's Wort: The Role of Amiloride Sensitive Sodium Conductive Pathways. *Neuropsychopharmacology* 23 (2), 188-197
- Wood W. G., Eckert G. P., Igbavboa U., Müller W. E. (2003) Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1610, 281-290
- Yenari M. A. und Giffard R. G. (2001) Ischemic vulnerability of primary murine microglia cultures. *Neurosci. Lett.* 298, 5-8
- Yankner B. A., Duffy L. K., Kirschner D. A. (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250, 279-282
- Youdim K. A., Spencer J. P. E., Schroeter H., Rice-Evans C. (2002) Dietary Flavonoids as Potential Neuroprotectants. *Biol. Chem.* 383, 503-519
- Youdim K. A., Qaiser M. Z., Begley D. J., Rice-Evans C. A., Abbott N. J. (2004) Flavonoid Permeability Across An In Situ Model Of The Blood-Brain Barrier. *Free Radical Biology & Medicine* 36 (5), 592-604
- Zou Y., Lu Y., Wei D. (2004) Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. in Vitro. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5032-5039

Wenn ein Experiment funktioniert,  
ist vorher etwas schiefgegangen.

*Finagle`s erstes Gesetz.  
Murphy`s neue Gesetze III*

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. E. F. Elstner möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit der Arbeit am Lehrstuhl für Phytopathologie und die Übernahme meiner Betreuung danken.

Weiter danke ich der Firma Steigerwald, ohne deren finanzielle Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein Dank gilt hierbei vor allem Herrn Dr. D. Weiser als persönlicher Ansprechpartner der Firma.

Dr. Elke Mann danke ich für die Bereitstellung der *Hypericum*-Extrakte und ihre Hilfe vor allem am Anfang meiner Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an Dr. Sandra Kern für die Hilfe bei der Analyse der Extrakte mittels HPLC, für ihre Anregungen und die stete Diskussionsbereitschaft.

Dr. Harald Schempp danke ich ebenfalls für die Hilfe bei den Arbeiten an der HPLC und sein offenes Ohr für alle Fragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Anja Breyer bedanken. Sie teilte mit mir die Zellkultur und alles Freud und Leid, was die Arbeit mit Zellen betrifft.

Für die freundschaftliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre möchte mich ganz herzlich bei allem Mitarbeitern des Lehrstuhls für Phytopathologie danken. Besonderer Dank geht an Dr. Dieter Hecht, Dr. Kerstin Janisch, Dr. Wiebke Sauter, Dr. Julia Koehl und Dr. Susanne Hippeli.

Ein ganz besonders großes Dankeschön gebührt Dr. Horst Wolff. Er half mir nicht nur praktisch bei den FACS-Analysen und den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Zellen an der GSF, sondern hat auch durch seine Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen, aber auch durch Kritik, wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Seine Liebe und Geduld hat mich vor allem in der Endphase der Arbeit sehr aufgebaut und mein Durchhaltevermögen gestärkt.

Zu guter letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Tante Ute Copeland und meinen Eltern bedanken!

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Birgit Kraus  
Geburtstag 16.10.1976  
Geburtsort Landsberg am Lech  
Familienstand ledig

## Schulbildung

09/82 – 07/86 Grundschule in Igling  
09/86 – 07/95 Dominikus-Zimmermann-Gymnasium, Landsberg  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig)  
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

## Hochschulausbildung

11/95 – 04/01 Studium der Biologie an der Technischen Universität München,  
Erlangung des Grades eines Diplom-Biologen

05/00 – 04/01 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Vegetationsökologie der  
Technischen Universität München mit dem Thema:  
„Untersuchungen zur Bedeutung von Ammenpflanzen bei der  
Renaturierung von Kalkmagerrasen am Beispiel der Garchingener  
Heide“

09/01 – 12/01 Hilfwissenschaftler an der GSF Forschungszentrum für Umwelt  
und Gesundheit, Institut für Molekulare Virologie

## Promotion

02/02 – 06/05 Promotion am Lehrstuhl für Phytopathologie der Technischen  
Universität München, mit dem Thema: „Einfluss von  
Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) – Extrakt auf  
immunologische Prozesse in Mikroglia-Zellkulturen“

02/02 – 12/04 Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Phytopathologie  
der Technischen Universität München, Freising-Weihenstephan