

Untersuchungen zur Hemmung des Serotonintransportes durch Hyperforin

-Die Beeinflussung intrazellulärer Ionenkonzentrationen-



Meinen Eltern
&
meinem Kater Panty †

**Untersuchungen zur Hemmung des Serotonintransportes
durch Hyperforin**

-Die Beeinflussung intrazellulärer Ionenkonzentrationen-

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Andrea Singer
aus Stuttgart

Frankfurt 2001
(D F 1)¹

¹ (D F 1: D = Dissertation / F 1 = Bibliothekskennzeichen)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. J. Engels

Gutachter: Prof. Dr. W.E. Müller
Prof. Dr. T. Dingermann

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG.....	6
1.1	Depressionen.....	6
1.1.1	Allgemeines.....	6
1.1.2	Biochemische Grundlagen.....	7
1.1.3	Medikamentöse Behandlung mit Antidepressiva.....	9
1.2	Der Serotonin-Transporter.....	11
1.2.1	Regulation der Serotoninaufnahme.....	11
1.2.2	Natriumabhängigkeit des Serotonintransportes.....	13
1.2.3	Einfluß von Protonen auf den Neurotransmittertransport.....	14
1.3	Thrombozyten.....	16
1.3.1	Physiologie der Thrombozyten.....	16
1.3.2	Der Serotonintransporter in Thrombozyten.....	17
1.4	Johanniskraut (<i>Hypericum perforatum</i> L.).....	19
1.4.1	Inhaltsstoffe.....	19
1.4.2	Pharmakokinetik.....	24
1.4.3	Experimentelle Pharmakodynamik relevanter Inhaltsstoffe.....	25
1.4.4	Klinische Studien zur antidepressiven Wirksamkeit von Johanniskraut.....	29
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	37
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	38
2.1	Versuchstiere.....	38
2.2	Thrombozyten.....	38

2.3	Material	38
2.3.1	<i>Besondere Substanzen</i>	39
2.3.2	<i>Statistische Auswertung</i>	41
2.3.3	<i>Proteinbestimmungen</i>	42
2.4	Spektralphotometrische Bestimmung intrazellulärer Ionenkonzentrationen	43
2.4.1	<i>Allgemeine Grundlagen</i>	43
2.4.2	<i>Ratiometrische Messungen</i>	45
2.4.3	<i>Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe</i>	46
2.4.4	<i>Durchführung der Messungen</i>	50
2.5	Radiorezeptormessungen	56
2.5.1	<i>Synaptosomale Aufnahme von ³H-Serotonin</i>	59
2.5.2	<i>Aufnahme von ³H-Serotonin in Thrombozyten</i>	62
2.5.3	<i>³H-Paroxetin-Bindung</i>	64
3.	ERGEBNISSE	68
3.1	Johanniskrautextrakt und Hyperforin hemmen die synaptosomale Aufnahme von ³H-Serotonin	68
3.2	Johanniskrautextrakt und Hyperforin beeinflussen die ³H-Paroxetinbindung nicht	71
3.3	Hyperforin zeigt nicht-kompetitive Eigenschaften am Serotonintransporter	74
3.4	Hyperforin hemmt die Aufnahme von ³H-Serotonin in Thrombozyten	76
3.5	Hyperforin erhöht die intrazelluläre Natriumkonzentration in Thrombozyten	78
3.6	Biphasischer Effekt von Hyperforin auf den intrazellulären pH-Wert	82
3.7	Veränderte Ionenhomöostase und Hemmung der ³H-Serotoninaufnahme in Thrombozyten	85

3.8	Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Hyperforin.....	87
3.9	Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse.....	91
4.	NÄHERE CHARAKTERISIERUNG DER EINZELEFFEKTE.....	93
4.1	Untersuchungen zur ³H-Serotoninaufnahmehemmung in Synaptosomen und Thrombozyten.....	93
4.1.1	Variation der Vorinkubation in Synaptosomen.....	93
4.1.2	Zeitabhängigkeit der ³ H-Serotoninaufnahmehemmung in Blutplättchen.....	95
4.1.3	Zeitverlauf der Fluoreszenzmessungen.....	97
4.1.4	Beeinflussung der ³ H-Serotoninaufnahme in Thrombozyten durch [Ca ²⁺] _i	98
4.1.5	Amiloridsensitivität der ³ H-Serotoninuptake-Hemmung in Thrombozyten.....	101
4.2	Untersuchungen zum Mechanismus der erhöhten intrazellulären Natriumkonzentration durch Hyperforin.....	104
4.2.1	Abhängigkeit des Effektes von der extrazellulären Na ⁺ - und Ca ²⁺ -Konzentration.....	104
4.2.2	Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration.....	105
4.2.3	pH-Abhängigkeit der [Na ⁺] _i -Erhöhung.....	105
4.2.4	Amiloridsensitivität der Hyperforineffekte auf [Na ⁺] _i	107
4.2.5	Beteiligung nicht-selektiver Kationenkanäle.....	108
4.3	Charakterisierung des Effektes von Hyperforin auf pH_i.....	110
4.3.1	Abhängigkeit des hyperforininduzierten pH-Effektes von der extrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration.....	110
4.3.2	Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration.....	110
4.3.3	pH-Abhängigkeit der Hyperforineffekte.....	112
4.3.4	Amiloridsensitivität der hyperforininduzierten pH-Wert Beeinflussung.....	114
4.3.5	Natriumabhängigkeit des pH-Effektes.....	120
4.3.6	Beruhet die Ansäuerung auf einem reserpinähnlichen Effekt?.....	121
4.3.7	Induziert Hyperforin eine gesteigerte Glykolyse?.....	123

4.4 Experimente zur hyperforininduzierten Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$	125
4.4.1 <i>Hyperforineffekte auf die Thrombinstimulation</i>	125
4.4.2 <i>Natriumabhängigkeit der hyperforininduzierten $[Ca^{2+}]_i$-Erhöhung</i>	128
4.4.3 <i>Kalziumeinstrom durch nicht-selektive Kationenkanäle</i>	129
4.5 Zusammenfassung	131
5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	132
5.1 Serotoninaufnahme in Synaptosomen und Blutplättchen	132
5.1.1 <i>Hemmung der Neurotransmitteraufnahme</i>	132
5.1.2 <i>Interaktion mit SERT1</i>	132
5.1.3 <i>Schlußfolgerung</i>	133
5.2 Regulierung der intrazellulären Natriumkonzentration	135
5.2.1 <i>Na^+/H^+-Exchanger (NHE)</i>	136
5.2.2 <i>Na^+/Ca^{2+}-Austausch</i>	137
5.2.3 <i>Brain Sodium Channels (BNaCs) & Epitheliale Natriumkanäle (ENaCs)</i>	138
5.2.4 <i>Unspezifische Kationenkanäle (NSC)</i>	139
5.3 Regulation des intrazellulären pH-Wertes	140
5.3.1 <i>Ursachen einer intrazellulären Ansäuerung</i>	140
5.3.2 <i>Der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE)</i>	142
5.3.3 <i>Cl^-/HCO_3^--Exchanger und andere Mechanismen</i>	144
5.3.4 <i>Schlußfolgerung</i>	145
5.4 Kalziumtransportmechanismen	147
5.4.1 <i>Ca^{2+}-ATP'asen</i>	147
5.4.2 <i>Na^+/Ca^{2+}-Exchanger</i>	148
5.4.3 <i>Unspezifische Kationenkanäle (NSC)</i>	148
5.4.4 <i>Schlußfolgerung</i>	149

5.5 Zusammenhang zwischen pH-Wert, intrazellulären Kalzium- und Natriumkonzentrationen.....	151
5.6 Beeinflussung der Membranviskosität.....	154
5.6.1 Einfluß der Membranviskosität auf pH_i	155
5.6.2 Beeinflussung von Natriumtransportern.....	156
5.6.3 Beeinflussung der $[Ca^{2+}]_i$ durch Membranviskositäts-Änderungen.....	156
5.6.4 Schlußfolgerung.....	156
5.7 Bedeutung der hyperforininduzierten Effekte für das serotonerge System.....	158
5.7.1 Neurotransmitter-Freisetzung.....	158
5.7.2 Neurotransmitter-Aufnahmehemmung.....	159
5.8 Fazit.....	163
6. ZUSAMMENFASSUNG	166
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	169
8. VERÖFFENTLICHUNGEN.....	187
Originalarbeiten.....	187
Übersichtsarbeiten.....	187
Posterpräsentationen mit publiziertem Abstract.....	188
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	191
10. DANKSAGUNG	193
11. LEBENS LAUF.....	195

1. EINLEITUNG

1.1 Depressionen

1.1.1 Allgemeines

Unter einer Depression versteht man eine länger anhaltende traurige oder dysphorische Verstimmung, die nicht mehr den normalen Affektschwankungen entspricht. Wurden Depressionen noch vor einigen Jahren nach möglichen Ursachen klassifiziert (endogene, neurotische, reaktive Depression), wird die Erkrankung heute nur noch nach der Häufigkeit (erste oder rezidivierende depressive Episode) und dem Schweregrad (leicht, mittelgradig, schwer) unterteilt. Eine Depression liegt dann vor, wenn zwei bis drei der sogenannten Hauptsymptome (gedrückte Stimmung, Interessen-/Freudlosigkeit, Antriebsstörung) oder zwei bis vier der anderen häufigen Symptome wie mangelnde Konzentration, vermindertes Selbstwertgefühl, Schuldgefühl, Hemmung/Unruhe, Selbstschädigung, Schlafstörung sowie Appetitminderung mindestens zwei Wochen andauern. Je nach Anzahl der Symptome werden Depressionen aufgrund der ICD 10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems der WHO; die Ziffer 10 bezeichnet deren 10. Revision) in leichte, mittelgradige und schwere Verlaufsformen eingeteilt (Kasper, 2000).

Depressionen gehören zu den häufigsten psychiatrischen Störungen. Epidemiologische Studien in verschiedenen Ländern haben gezeigt, daß die Lebenszeitprävalenz etwa 17% beträgt. Hiervon entfallen ca. 4% auf schwere, 7% auf mittelgradige und 6% auf leichte Depressionen. Weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, daß 12-25% der Patienten, die einen praktischen Arzt aufsuchen, an Depressionen unterschiedlichen Schweregrades leiden, und daß bei mehr als 50% dieser Patienten das Krankheitsbild der Depression unerkannt bleibt (Kasper, 2000). Die Betroffenen sind in ihrem persönlichen oder beruflichen Umfeld beeinträchtigt und es wird vermutet, daß die in Deutschland erschreckend hohe Suizidrate wahrscheinlich zu zwei Dritteln auf depressive Störungen zurückgeht. Damit ist auch die leichte Depression keine Befindlichkeitsstörung, sondern eine ernstzunehmende Erkrankung, die behandelt werden sollte.

In empirischen Untersuchungen konnten verschiedene Ursachen für depressive Erkrankungen nachgewiesen werden. Neben einer genetischen Disposition werden psychosomatisch/exogene, psychologische und chronobiologische Ursachen sowie Persönlichkeitsfaktoren diskutiert. Im Sinne einer gemeinsamen Endstrecke kommt es zu einer gestörten Neurotransmission bzw. Neuroendokrinologie. Diese als "Monoaminmangel-Hypothese" bezeichnete Theorie beschreibt einen Katecholamin- und/oder Serotonin-Mangel

an spezifischen Rezeptoren im ZNS als Ursache für die Entstehung einer Depression. Diese Hypothese wird durch mehrere Studien unterstützt, in denen zum einen belegt werden konnte, daß die Neurotransmission bei depressiven Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten tatsächlich gestört ist, und zum anderen gezeigt wurde, daß der Wirkmechanismus verschiedener Antidepressiva unter anderem auf einer initialen Erhöhung der Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt beruht. Antidepressiva hemmen entweder die Wiederaufnahme der Neurotransmitter in die Präsynapse oder verhindern deren enzymatischen Abbau, z.B. durch Hemmung der Monoaminoxidase. Beide Effekte führen zu einem erhöhten Angebot an Neurotransmittern im synaptischen Spalt, was sich positiv auf depressive Patienten auswirkt. Die genauen Zusammenhänge sind allerdings bisher unklar.

In letzter Zeit wurde die "Monoaminmangel-Hypothese" um die sogenannte "Neuordnungs-Hypothese" erweitert, wonach die Beeinflussung eines einzigen Systems, wie z.B. das der bekannten Monoamine Serotonin, Dopamin oder Noradrenalin, aber auch der Aminosäuren (L-Glutamat und GABA), einen Anstoß für eine Neuordnung verschiedener Bereiche der Neurotransmission sein kann. Auch die Elektrokrampftherapie könnte auf diesem Wege ihre antidepressive Wirksamkeit entfalten. Wird ein System durch medikamentöse oder andere Einflüsse "angestoßen", können dadurch auch andere Systeme positiv beeinflusst werden. Besonders dem serotonergen und dem noradrenergen System wird eine wichtige Rolle bei der Pathobiochemie und Pharmakologie der Depression zugeschrieben.

1.1.2 Biochemische Grundlagen

5-Hydroxytryptamin (5-HT, Serotonin) wird in den enterochromaffinen Zellen des Darmepithels sowie in Nervenzellen des Plexus myentericus und des zentralen Nervensystems (ZNS) synthetisiert. In Abhängigkeit von der Art des 5-HT-Rezeptors an den 5-HT bindet, übt es an verschiedenen Orten zum Teil gegensätzliche Wirkungen aus. Eine besondere Bedeutung kommt Serotonin als Neuromodulator im ZNS zu. Eine verminderte Aktivität serotoninergischer Neurone wurde von Coppen (1967) für die Pathogenese affektiver Erkrankungen postuliert. Grundlage dieser „Serotoninhypothese der Depression“, welche einen Serotoninmangel im Gehirn postuliert, und auch der „Katecholaminmangel-Hypothese“, die einen Mangel an Katecholaminen zugrunde legt, war ursprünglich die depressiogene Wirkung von Reserpin. Reserpin wurde als Antihypertonikum verwendet und führte bei ca. 15% der behandelten Patienten zu einer Depression, die vermutlich auf ein Defizit an 5-HT und/oder Noradrenalin zurückzuführen war. Reserpin bindet in den Nervenendigungen an die vesikulären Monoamintransporter (VMAT), was in einer Entleerung der Neurotransmitterspeicher resultiert. Die Gabe der Serotoninvorstufen Tryptophan und 5-Hydroxytryptophan in Kombination mit MAO-Hemmern dagegen kann

die Konzentration des zur Verfügung stehenden Serotonin erhöhen und auch bei Depressionen stimmungsaufhellend wirken (Schloss, 1996).

Nervenzellen synthetisieren durch Decarboxylierung oder Hydroxylierung aus den Aminosäuren Tyrosin bzw. Tryptophan, die sie aus dem Blut aufnehmen **1**, über verschiedene Zwischenstufen unter anderem die Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin und Serotonin. Serotonin wird aus Tryptophan über die Zwischenstufe des 5-Hydroxytryptophans gebildet. Diese Neurotransmitter werden in Vesikeln in der Zelle gespeichert **2**. Bei der Erregungsübertragung zwischen zwei Neuronen durch die Depolarisierung der präsynaptischen Membran **3** erfolgt ein Einstrom von Kalzium in die Zelle über spannungsabhängige Kalziumkanäle **4**. Dies führt zur Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran und damit zur Exozytose von Serotonin in den synaptischen Spalt **5**. Durch Aktivierung ionotroper **6** bzw. metabotroper Rezeptoren **7** in der postsynaptischen Membran wird ein Signal ausgelöst und damit die Erregung über den synaptischen Spalt auf die Postsynapse übertragen (siehe auch Abbildung 1.1).

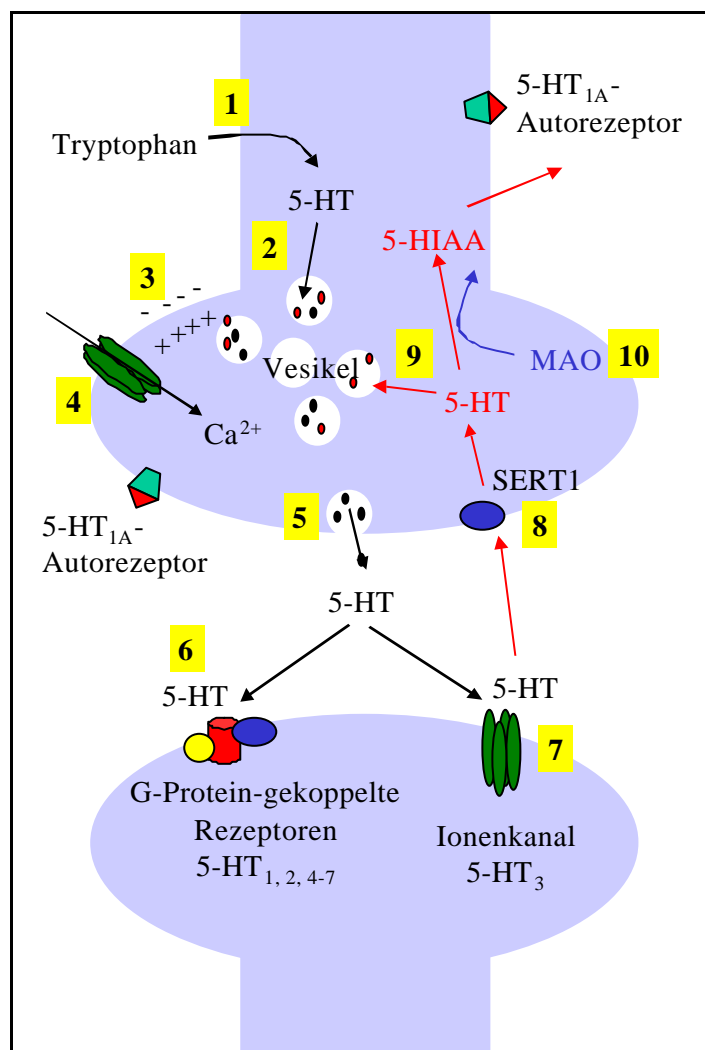


Abbildung 1.1: Erregungsübertragung an der serotonergen Synapse sowie nachfolgende **Inaktivierung des Neurotransmitters** (Erläuterung siehe Text).

Präsynaptische 5-HT_{1A}-Autorezeptoren kontrollieren die Konzentration von Serotonin und verringern beim nächsten Impuls dessen Freisetzung, wenn die Konzentration im synaptischen Spalt zu hoch wird.

Zwei Mechanismen sind für die Inaktivierung der Neurotransmitter verantwortlich: Zum einen können sie durch die Monoaminoxidase enzymatisch gespalten werden, zum anderen erfolgt nach Wiederaufnahme (engl. Reuptake) in die präsynaptischen Nervenendigungen **8** abermals Speicherung in Vesikel **9**. Serotonerge Neurone enthalten sowohl MAO-A als auch MAO-B. Serotonin wird über den entsprechenden Aldehyd zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) metabolisiert, welche im Harn ausgeschieden wird **10**.

1.1.3 Medikamentöse Behandlung mit Antidepressiva

Wie oben bereits erwähnt, wird die Wirkung der Antidepressiva hauptsächlich durch Beeinflussung des noradrenergen und/oder serotonergen Systems erklärt. Möglicherweise sind teilweise auch Effekte auf das Dopamin-System an der depressiven Wirksamkeit beteiligt. Aus diesem Wirkungsmechanismus leiten sich die verschiedenen Gruppen antidepressiv wirkender Pharmaka ab:

SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
SNRI	Selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
SSNRI	Selektive Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
RIMA	Reversible Inhibitoren der MAO-A
TCA	Trizyklische Antidepressiva
DSA	Duale serotonerge Antidepressiva
TeCA	Tetrazyklische Antidepressiva
NaSSA	Noradrenalin- und Serotonin-spezifische Antidepressiva

Da es eine Beziehung zwischen dem pharmakodynamischen Wirkprofil und den unerwünschten Nebenwirkungen gibt, haben Medikamente mit pharmakologischer Mehrfachwirkung, wie tri- und tetrazyklische Antidepressiva, ein größeres Nebenwirkungsspektrum, als solche, die selektiv auf das eine oder andere System wirken. Nach heutigen Vorstellungen gehen diese Nebenwirkungen nicht so sehr auf die für die antidepressive Wirkung relevanten Wirkmechanismen zurück, sondern scheinen sich von pharmakologischen Eigenschaften dieser Substanzen abzuleiten, die für die antidepressive Wirkung überflüssig sind. Gerade die zusätzlichen Rezeptorprofile der unselektiven Tri- und Tetrazyklika, die teilweise Effekte auf α_1 -, α_2 -, 5-HT₂-, H₁-, Acetylcholin- und Dopamin-Rezeptoren haben, sind problematisch (Kasper, 2000; Müller et al., 1999).

Die neueren selektiveren Antidepressiva zeigen deshalb ein Wirkprofil, bei dem die für die antidepressive Wirksamkeit relevanten Mechanismen vorhanden, aber die nebenwirkungs-

trächtigen, nicht benötigten Rezeptorprofile eliminiert sind. Trotz allem treten auch bei diesen Substanzen noch unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf, die dazu führen können, daß Patienten die Einnahme des Arzneimittels ablehnen oder eigenmächtig beenden.

1.2 Der Serotonin-Transporter

1.2.1 Regulation der Serotoninaufnahme

Zur Familie der Transporterproteine des GAT-Types gehören neben dem Namensgeber dieser Transporterfamilie dem GABA-Transporter GAT1 die anderen GABA-Transporter GAT2, GAT3 und GAT4 sowie der Dopamin- (DAT1), der Noradrenalin- (NET1) und der Serotonin-Transporter (SERT1). Die GAT1-Gefamilie wird in vier Unterfamilien eingeteilt (Jursky et al., 1994; Kanner, 1994):

1. Unterfamilie: GAT1, Betain- und Kreatinin-Transporter
2. Unterfamilie: NET1, DAT1, SERT1
3. Unterfamilie: Prolin- und Glycin-Transporter
4. Unterfamilie: Orphan-Transporter

Für die Orphan-Transporter konnten bisher noch keine Substrate identifiziert werden, ihnen wird aber eine wichtige Rolle bei der Regulation wichtiger Hirnfunktionen zugeschrieben (Schloss et al., 1994; Masson et al., 1995). Sie sind vor allem im ZNS lokalisiert und unterscheiden sich von den drei oben genannten Unterfamilien nur durch größere extrazelluläre Loops (Schloss et al., 1994, Masson et al., 1995, Inoue et al., 1996). Einer der bereits klonierte Orphan-Transporter weist eine hohe Homologie zum Kreatinintransporter auf, so daß angenommen wird, das Kreatinin möglicherweise ein Substrat dieses Transporters sein könnte (Schloss et al., 1994).

Die bekannten Glutamat-Transporter GLT1 (573 Aminosäuren, 8 Transmembran-Domänen), GLAST1 (543 AS, 6 TMD) und EAAC1 (542 AS, 10 TMD) gehören zu einer anderen Genfamilie und haben keine molekulare Verwandtschaft bzw. Sequenzhomologie zu den oben genannten Transportproteinen. Nur die ersten vier TMD sind homolog. Auch sie benötigen den Kotransport von Natrium, sind jedoch auch auf die Anwesenheit von Kalium, Hydroxy- oder Bicarbonat-Ionen angewiesen. Hier nimmt man an, daß im Transportverlauf zwei Natrium-Ionen, ein Proton und ein Glutamatmolekül in die Zelle transportiert werden (Lester et al., 1994).

Unter den oben genannten Unterfamilien weist sich der Serotonintransporter als besonders heterogen aus. Die Homologie von SERT1 zu GAT1 wird mit 38%, zu NAT1 mit 47% angegeben (Worrall & Williams, 1994; Schloss, 1996).

Der Serotonintransporter SERT ist ein membranständiges Polypeptid, das für die Beendigung der Neurotransmission durch die schnelle Wiederaufnahme des Neurotransmitters Serotonin verantwortlich ist. Er weist, wie alle Mitglieder der Na^+/Cl^- -abhängigen Neurotransmitter-

transporter 12 Transmembrandomänen (TDM) auf. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen liegt der Transporter als Homotetramer vor, wobei die einzelnen Untereinheiten beim Substrattransport kooperativ interagieren. Diese Adduktionformation beruht auf der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei SERT1 Dimeren. Unter reduzierenden Bedingungen dissoziiert SERT1 in zwei Dimere, was zu einer Reduktion der Transportaktivität und einem Verlust der positiven Kooperativität führt, jedoch SERT1 nicht völlig inaktiviert (Abbildung 1.2).

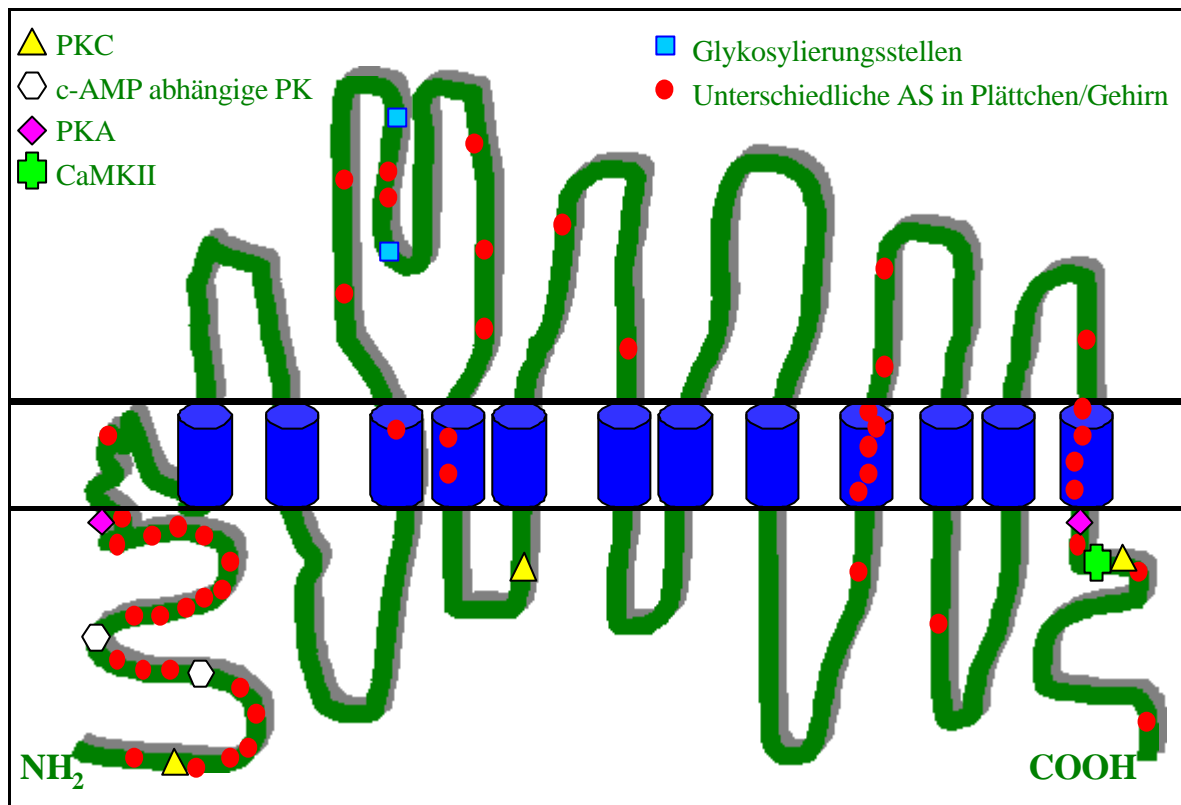


Abbildung 1.2: Transmembrantopologie von SERT1 (nach Schloss, 1996; Lesch et al., 1993; Jess, 2000). Dargestellt sind konservierte Glykosylierungsstellen, potentielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C bzw. A (PKC, PKA) sowie der c-AMP abhängigen Proteinkinase oder für die Calmodulin (CaM)-abhängige Kinase (CaMKII). Rote Punkte stellen diejenigen Aminosäuren dar, die im SERT1 im Gehirn der Ratte und im SERT1 in humanen Thrombozyten unterschiedlich sind.

Von den sieben zytoplasmatischen Domänen stellen die N- und C-terminale Region mit 10 kDa bzw. 3 kDa Größe die majoritären intrazellulären Domänen dar. Im übrigen befinden sich hier, mit einer Ausnahme in der zweiten intrazellulären Schlaufe, auch die Phosphorylierungs-Konsensusmotive für die PKC und PKA (Lesch et al., 1993; Schloss, 1996). Der Substrattransport selbst unterliegt der Kontrolle des Ca^{2+} /Calmodulin-, des Stickoxid- und des PKC-Signaltransduktionsweges. Letztere bestimmen die Oberflächenverfügbarkeit des SERT durch dessen Sequestrierung. Eine von Jess (2000) aufgestellte Arbeitshypothese geht von der Interaktion zytoplasmatischer Proteine mit SERT

aus. Demnach führt die Aktivierung der PKC zur Phosphorylierung von MacMARCKS und SERT. MacMARCKS übertragen vermutlich die PKC- und Ca^{2+} /CaM-vermittelten Signale auf das Zytoskelett und induzieren so Vesikelsekretion in Neuronen und Thrombozyten, die Zellmigration und das Membranrecycling. Durch die negative Ladung der Phosphatreste verliert MacMARCKS die Fähigkeit, Phosphoinositoldiphosphat (PIP_2) anzureichern, so daß das Phospholipid freigesetzt und der PLC zugänglich wird. Diese hydrolysiert PIP_2 zu (Diacylglycerol) DAG, welches membranstabilisierende Eigenschaften hat. MacMARCKS dissoziiert von der Plasmamembran und vom Zytoskelett. Die fluidere Membranstruktur ermöglicht nun Vesikelbewegungen, so daß SERT sequestriert werden kann. Durch die Beendigung des extrazellulären Signals sinkt der intrazelluläre Kalziumspiegel und die Proteinphosphatasen 1 und 2A dephosphorylieren den MacMARCKS und SERT. Diese Arbeitshypothese könnte eventuell die PKC-induzierte Regulation des SERT durch dessen Sequestrierung in Abwesenheit von Substrat plausibel machen (Jess, 2000).

Die Anwesenheit von Serin- und Threoninresten im Carboxy- oder Aminoterminus des Transporters macht eine Phosphorylierung wahrscheinlich, so daß „second messenger“ die Funktion verschiedener Neurotransmittertransporter dynamisch regulieren dürften. Sowohl der DA-Uptake in primäre Hippocampuszellen als auch die 5-HT-Aufnahme in JAR-Zellen wird durch c-AMP stimuliert (Cool et al., 1991). Desweiteren führen Inhibitoren des Arachidonsäure-Metabolismus zu einer potenten Hemmung der Dopaminaufnahme in Schnitten des Rattenstriatums. Dies untermauert die Annahme, daß Metabolite aus dem Arachidonsäurestoffwechsel eine wichtige Rolle bei der Regulation des Dopaminuptakes spielen (Amara & Kuhar, 1993).

1.2.2 Natriumabhängigkeit des Serotonintransportes

Die Abhängigkeit der Neurotransmitteraufnahme vom Natriumgradienten wurde für alle fünf Neurotransmitter (Serotonin, Dopamin, GABA, Noradrenalin und L-Glutamat) gezeigt (Lester et al., 1994). Der Serinrest 545 in der Transmembrandomäne elf des Serotonintransporters ist für die Natriumabhängigkeit des Transporters wichtig. Durch den Verlust dieses Restes wird auch die Affinität der Imipramin-Bindung erniedrigt, die des SSRI Citalopram wird jedoch nicht beeinflusst (Sur et al., 1997). Man nimmt daher an, daß es zwei unterschiedliche Bindungsstellen am Serotonintransporter gibt. Es wurde postuliert, daß das Transportprotein Ähnlichkeit mit einem Ionenkanal hat: **A:** In Ruhe ist der Transporter leicht geöffnet; Natrium, Kalium und Lithium können hindurchdiffundieren. **B:** Das Binden von Natrium und Serotonin führt zu einer Konformationsänderung (Voraktivierung), wodurch ein weiteres Serotoninmolekül zusammen mit Natrium- und Chloridionen an die Translokationsstelle binden kann (**C**). Hier bindet wahrscheinlich auch Citalopram. **D:** Die dem Außenmedium zugewandte Seite schließt sich, während sich die nach innen gerichtete

Seite öffnet, und Serotonin, Natrium- und Chloridionen werden ins Zytoplasma entlassen. Daraufhin verläßt nun ein Kaliumion die Zelle (Abbildung 1.3) (Sur et al., 1997, Schloss, 1996).

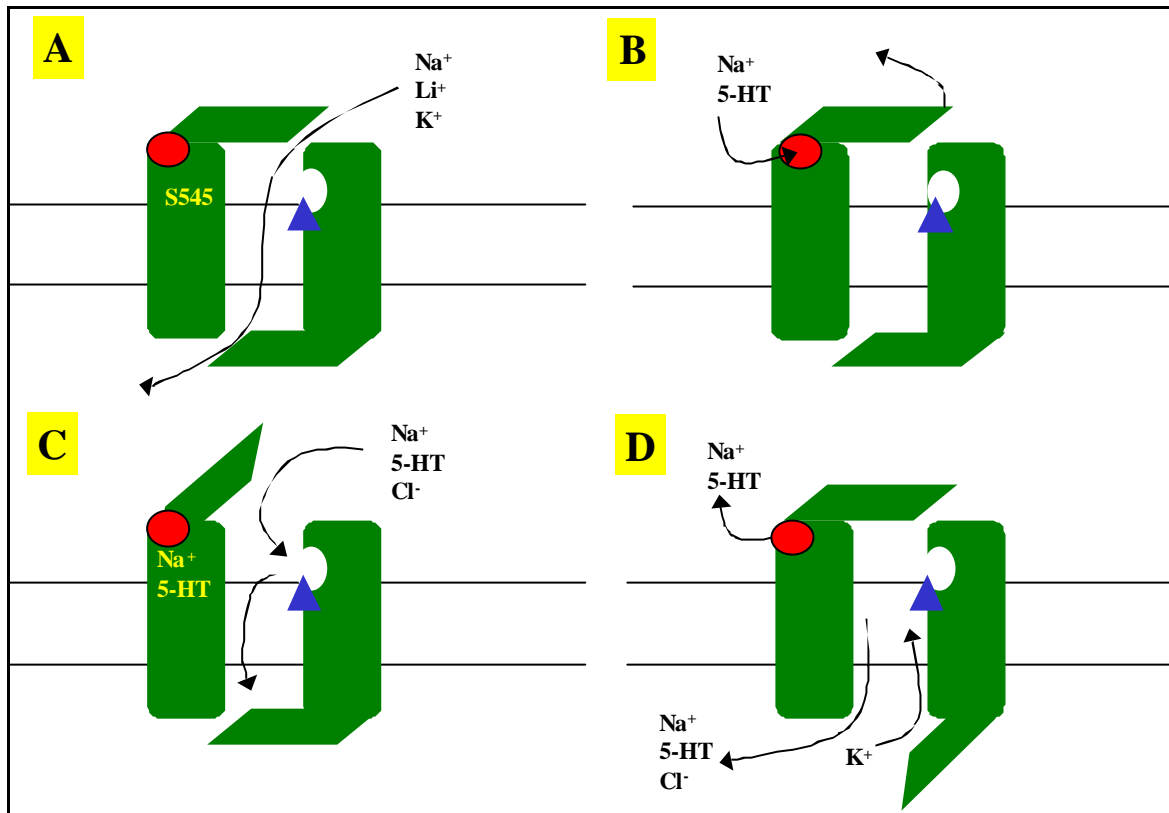


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Serotonintransports durch SERT1 der Ratte. Erläuterung siehe Text.

Die Aminosäureidentität von SERT1 bei Ratte und Mensch beträgt 92%. Die verbleibenden 51 Aminosäuren, die in beiden Spezies nicht identisch sind, liegen hauptsächlich in der N-terminalen zytoplasmatischen Region. Die Affinität des Transporters für sein natürliches Substrat ist in vielen Spezies gleich (Schwein, Ratte, Maus, Mensch), da die AS-Sequenz, die für die Bindung von Serotonin verantwortlich ist, wahrscheinlich in allen vier Spezies identisch ist (Lesch et al., 1993).

1.2.3 Einfluß von Protonen auf den Neurotransmittertransport

Kalium beeinflusst den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Bei diesem wird das Transportprotein aus der Form, in der internes Substrat freigesetzt wird, in die Form, in der externes Substrat gebunden wird, konvertiert. Es konnte gezeigt werden, daß in Thrombozyten interne Protonen intrazelluläres Kalium ersetzen können (Keyes & Rudnick,

1982). Somit kann eine pH-Differenz (innen sauer) an der Plasmamembran als treibende Kraft für die Serotoninanreicherung in Plasmamembranvesikeln aus Plättchen dienen. Zudem soll auch der Uptake von Dopamin, Noradrenalin und L-Glutamat an einen Protonen-Countertransport gekoppelt sein. Sogar bei einem Zusammenbruch des Natriumgradienten oder wenn keine anderen Energiequellen vorhanden sind, kann eine transmembranäre pH-Differenz als treibende Kraft fungieren. Dieser Effekt ist natriumabhängig und imipramin-sensitiv. Einer der Erklärungsversuche geht davon aus, daß die Verteilung zwischen der protonierten, kationischen Form und der neutralen Form des Serotoninmoleküls durch den pH-Gradienten beeinflußt wird. Serotonin als schwaches basisches Amin soll die Membran durch nicht-ionische Diffusion der lipophileren freien Base durchqueren, welche aufgrund der hohen Protonenkonzentration in der Zelle dort dann "gefangen" ist. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die neutrale Form des Serotoninmoleküls das eigentliche Substrat ist und nicht die bei physiologischem pH-Wert eher vorliegende kationische Form. Auf der Grundlage dieser Hypothese ist es denkbar, daß eine pH-Differenz die Transportrate durch Erhöhung der Substratkonzentration außerhalb und durch gleichzeitige Erniedrigung der Konzentration innerhalb der Zelle stimuliert.

Der von Keyes & Rudnick (1982) vermutete Mechanismus für die Stimulation des Serotonintransports durch Kalium oder Protonen soll hier kurz beschrieben werden.

Danach existiert der Transporter in zwei Formen und bindet nach der Freisetzung von Serotonin, Natrium und Protonen ins Zytosol entweder Kalium oder Protonen und kehrt damit in seine "externe Form" zurück. Kalium oder Protonen werden dann ins Außenmilieu abgegeben und dadurch wird die freie Transporterform gebildet. Diese Form kann aus dem Außenmedium wieder Serotonin, Natrium und Chlorid aufnehmen und ins Zytosol transportieren. Bei Abwesenheit von internem Kalium ist die Geschwindigkeit dieses Zykluses durch den intrazellulären pH-Wert bestimmt. Beim physiologischen pH-Wert bzw. alkalischeren pH-Werten, bei denen die protonierte interne Form des Transporters niedriger ist, stimuliert intrazelluläres Kalium über einen alternativen Weg den Transport (Keyes & Rudnick, 1982).

1.3 Thrombozyten

1.3.1 Physiologie der Thrombozyten

Thrombozyten entstehen durch Abschnürung aus dem Zytosol von Megakaryozyten des Knochenmarks. Das periphere Blut enthält 150000-450000 Thrombozyten pro μl . In der Milz können bis zu 30% der funktionsfähigen Thrombozyten gespeichert werden; durch entsprechende Reize (z.B. Blutverlust) kommt es zur Ausschwemmung. Thrombozyten besitzen neben Mitochondrien, die sie zur Ausführung der enzymatischen Schritte des Citratzyklus und der Elektronentransportphosphorylierung befähigen, die im Zytosol lokalisierten Enzyme der Glykolyse und des Pentosephosphatweges. Die Glykolyse wird nur teilweise durch Glucoseaufnahme aus der Umgebung gespeist. Der überwiegende Teil wird durch eigene Glykogenvorräte ermöglicht. Die aus dem Glucose- und Fettsäureabbau gewonnene Energie dient neben der Erhaltung der Thrombozytenstruktur und der Speicherung verschiedener Substanzen (z.B. Serotonin, Katecholamine) vor allem der Hauptfunktion der Thrombozyten, den plasmatischen Vorgängen der Blutstillung (Pauluhn, 1996; Sneddon, 1973).

Serotonin und andere Substanzen werden weder in den Megakaryozyten noch in den Thrombozyten synthetisiert und müssen deswegen durch aktiven Transport aufgenommen werden. In den Thrombozyten werden diese Substanzen in den dichten Granula (engl. dense granules) gespeichert. Wie in neuronalen Zellen ist für die Akkumulation von Monoaminen in den dichten Granula der Thrombozyten ein spezifisches Transportsystem verantwortlich. Dieser vesikuläre Monoamin-Transporter (VMAT) transportiert Monoamine im Austausch gegen Protonen in die Speicherorganellen (Rudnick et al., 1985). Daneben existieren α -Granula und Lysosomen. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über in Thrombozytengranula gespeicherte Moleküle.

Die Membran der Thrombozyten weist verschiedene Glykoproteine (GP Ia,b,c, GP IIa,b und GP III) auf, die Rezeptorfunktion für Wechselwirkungen des Thrombozyten mit Kollagen, Fibrinogen oder Thrombin besitzen.

Die Lebensdauer der Thrombozyten beträgt acht bis zehn Tage; ihr Abbau erfolgt vor allem in Leber und Milz.

1.3.2 Der Serotonintransporter in Thrombozyten

Thrombozyten werden seit vielen Jahren als peripheres Modell für die neuronale Serotonin-Aufnahme verwendet (Sneddon, 1969; Sneddon, 1973). Die Systeme besitzen die gleichen Charakteristika: Beide Transportmoleküle besitzen eine Primärstruktur, die sich aus 630 Aminosäuren zusammensetzt und zudem zwölf transmembranäre Domänen und drei PKC-Phosphorylierungsstellen besitzt. Das Molekulargewicht beträgt 70 kDa. Der Transporter kann in beiden Systemen durch SSRI und andere Antidepressiva inhibiert werden, und die Serotonin-Aufnahme ist in beiden Fällen natriumabhängig (Lesch et al., 1993). Nach Lesch et al. (1993) handelt es sich bei beiden Transportern um identische Moleküle, die beide durch dasselbe Gen codiert werden, das vermutlich auf Chromosom 17 liegt.

Eigenschaften	Thrombozyten	Synaptosomen
Begrenzende Membran	X	X
Mitochondrien	X	X
Monoaminoxidase	X	X
Serotonintransporter	X	X
Synthese biogener Amine	-	DA, 5-HT, NA, Histamin
Speicherung biogener Amine in subzellulären Granula	X	X
Größe der Granula	50-120 nm	50-300 nm
Granulamembran	X	X
Verhältnis biogene Amine/ATP	3	4,5
Aufnahme biogener Amine in isolierte Granula	5-HT>DA>NE>E	5-HT>DA>NE>E
Hemmung der Aufnahme durch Reserpin	X	X
Exozytotische Entleerung der Granula durch Stimuli, z.B. Thrombin/nervale Stimulation	X	X
Freisetzung gespeicherter biogener Amine durch:		
Reserpin	X	X
Sympathomimetische Amine	X	X

Tabelle 1.1: Wichtige Charakteristika von Thrombozyten und Synaptosomen. X = vorhanden (entnommen aus Sneddon, 1973)

Während die Thrombozytenpräparation ein minimal invasives Verfahren für die Zellen bedeutet, werden bei der Herstellung von Synaptosomen aus Mäusehirnen die Synapsenköpfchen abgetrennt, die sich dann wieder zu einem geschlossenen, von Plasmamembran umgebenen System zusammenlagern. In diesem System ist die Funktionalität der Serotonin-Transportproteine weiterhin gewährleistet. Über die Ähnlichkeit verschiedener Eigenschaften beider Systeme liegen mehrere Studien vor (Tabelle 1.1).

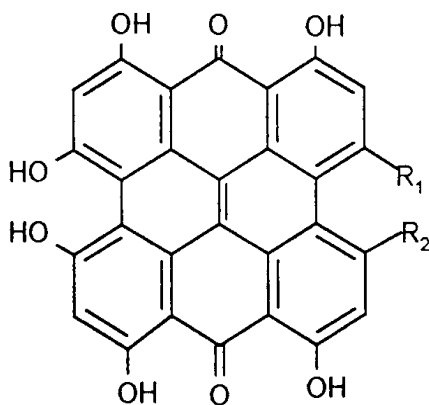
Der größte Teil des Serotonins im menschlichen Körper kommt in den enterochromaffinen Zellen und in den Thrombozyten vor. Die Thrombozyten nehmen es bei der Passage der intestinalen Blutgefäße auf. Demgegenüber ist die Menge an neuronalem Serotonin gering. Zentrale Serotonin-Neurone sind für die Regulation von Stimmung, Schlaf-Wach-Rhythmus, Schmerzwahrnehmung, Nahrungsaufnahme und Körpertemperatur verantwortlich. Eine Fehlfunktion wird, neben einer Fehlfunktion noradrenerger Neurone, seit langem bei der Depression diskutiert.

1.4 Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.)

Die Gattung *Hypericum* zählt zur Familie der Hypericaceae, Ordnung Guttiferales. Von ihren bisher bekannten 378 Arten kommen ca. 60 in Mitteleuropa vor. Die Blüte setzt Ende Juni, um den Johannistag, ein. Die therapeutische Anwendung der Pflanze Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) ist bereits aus der Antike und dem Mittelalter bekannt. Aus frischen Blüten hergestelltes Johanniskrautöl wird äußerlich bei Myalgie, Verbrennungen und Verletzungen zur Förderung der Wundheilung und desweiteren innerlich gegen dyspeptische Beschwerden eingesetzt. In der traditionellen Volksheilkunde wird das Kraut dieser Heilpflanze in Teezubereitungen, Extrakte daraus in Form von Fertigpräparaten sowie Preßsaft aus dem frischen Kraut innerlich bei nervöser Unruhe und Angst, psychovegetativen Störungen und depressiven Verstimmungen verwendet (Czygan, 1993).

1.4.1 Inhaltsstoffe

Naphthodianthrone



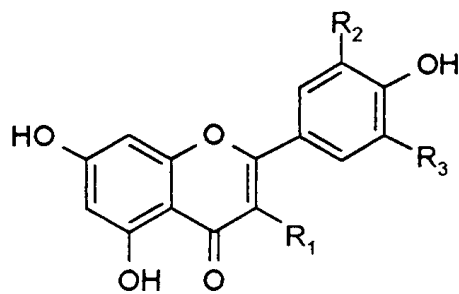
$R_1 = \text{CH}_3; R_2 = \text{CH}_3$ Hypericin
 $R_1 = \text{CH}_3; R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$ Pseudohypericin

Die rot fluoreszierenden Hypericine sind die auffälligsten Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum*. Hypericin (im Jahr 1939) und Pseudohypericin (1974) sind die beiden Hauptsubstanzen, die von Brockmann erstmals isoliert wurden. Neben diesen beiden Hypericinen kommen in geringer Menge noch die Vorstufen Protohypericin und Protopseudohypericin, weitere Naphthodianthrone, vor. Die Protoverbindungen setzen sich unter Lichteinwirkung durch Zyklisierung in Hypericin bzw. Pseudohypericin um (Brockmann et al., 1974).

Die erstmals von Meruelo et al. (1988) beschriebene antiretrovirale Wirkung von Hypericin wurde von Schinazi et al. (1990) bestätigt. Von großem Interesse sind die hierbei nachgewiesenen Effekte gegen HI-Viren (Schinazi et al., 1990). Desweiteren wird Hypericin und Pseudohypericin eine spezifische Hemmung der Proteinkinase C (PKC) zugeschrieben, die für die antiproliferative Wirkung gegen menschliche Krebszellen verantwortlich sein soll (Takahashi et al., 1989).

Die photodynamische Aktivität von Hypericin hat eine nachgewiesene toxikologische Bedeutung bei Weidetieren. Schafe und Rinder entwickelten nach dem Verzehr größerer Mengen von Johanniskraut unter anschließender Sonneneinstrahlung einen sogenannten „Hypericismus“, der sich in Ödemen, Ulzerationen und sogar Nekrosen von unpigmentierten Hautstellen äußert. Als Ursache konnte die Phototoxizität des Hypericins verantwortlich gemacht werden (Giese, 1980). Brockmöller et al. (1997) konnten jedoch auch nach sehr hohen, therapeutisch nicht mehr relevanten Dosen eines Johanniskrautextraktes (LI 160) von 3600 mg (entsprechend 11,25 mg Gesamthypericin) keine Phototoxizität beim Menschen beobachten. Übereinstimmend damit sind Fälle von Phototoxizität unter antidepressiver Therapie mit Hypericum-Extrakt, bei der die tägliche Gesamthypericindosis zwischen 0,4 und 2,7 mg beträgt (Linde et al., 1996), beim Menschen noch nie berichtet worden. Eine leichte Hautrötung bzw. Sensibilisierung gegen UV-Licht könnte dagegen auf die Wirkung der Hypericine zurückzuführen sein (Golsch et al., 1997).

Flavonoide und Biflavonoide



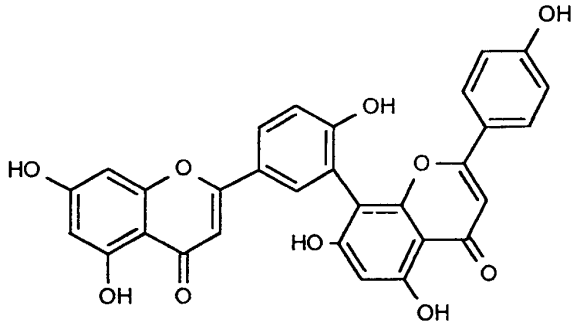
R ₁	R ₂	R ₃	
OH	OH	H	Quercetin
O- α -L-Rha	OH	H	Quercitrin
O- β -D-Glc	OH	H	Isoquercitrin
O- β -D-Glc(6 \leftarrow 1) α -L-Rha	OH	H	Rutin
O- β -D-Gal	H	H	Hyperoside
OH	H	H	Kampferol
H	OH	H	Luteolin
OH	OH	OH	Myricetin

Flavonolglykoside mit Quercetin als Aglykon stellen die größte Gruppe an pflanzlichen Sekundärstoffen in *Hypericum perforatum* dar. Das Quercetin mit seinen Glykosiden gilt als das Hauptflavonoid von Johanniskraut. 1937 wurde das Hyperosid isoliert, später folgten dann das Quercetin selbst und die Glykoside Quercitrin, Isoquercitrin und Rutin. 1987 wurden erstmals zwei Biflavonoide in *Hypericum perforatum* gefunden, und zwar das I3,II8 Biapigenin und, in erheblich geringeren Mengen, das

Amentoflavon (I3',II8 Biapigenin), welche ausschließlich in den Blütenständen vorkommen (Berghöfer & Hölzl, 1987). Weitere Flavonoide wie Luteolin, Kämpferol, Myricetin und Dihydroquercetin kommen offensichtlich nur in Spuren vor.

Den Flavonoiden wird allgemein ein sehr breites Wirkungsspektrum zugeschrieben. Unter anderem findet man Flavonoide mit antiphlogistischen, antioxidativen, gefäßabdichtenden, antimikrobiellen und tumorhemmenden Wirkungen (Schimmer, 1986). Besonders die Aglyka besitzen spasmolytische Aktivität. Zusätzlich konnte in vitro Versuchen auch für diese

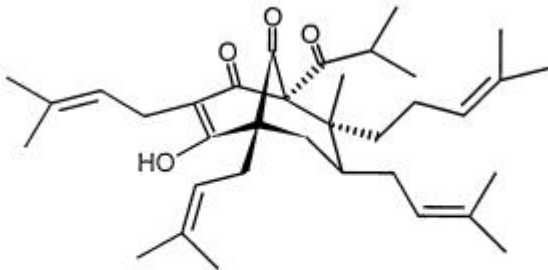
Substanzklasse MAO-A hemmende Eigenschaften festgestellt werden (Bladt & Wagner, 1994; Sparenberg et al., 1993). Thiede & Walper (1994) fanden zudem auch einen hemmenden Effekt auf die Catechol-O-Methyltransferase (COMT), die neben der MAO ein dominierendes Enzym im Katecholaminmetabolismus darstellt.



13', 118-Biapigenin (= Amentoflavon)

Von Bedeutung ist auch, daß Biapigenine aus *Taxus baccata* im Tierversuch eine Sedierung bewirken (Vohora et al., 1980), und für Amentoflavon wurde eine potente Bindung an die Benzodiazepin-Bindungsstelle am GABA A-Rezeptor gefunden (Baureithel et al., 1997).

Phloroglucinolderivate

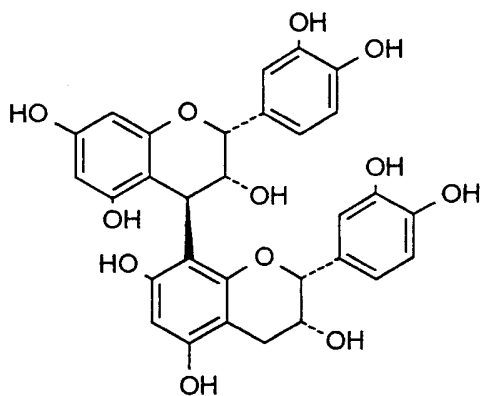


HYPERFORIN

Hyperforin und Adhyperforin sind Phloroglucinoderivate, die zunächst für die antimikrobielle Wirkung von *Hypericum*extrakten verantwortlich gemacht wurden (Hagenström, 1953). Diese Wirkung des Hyperforins könnte bei der äußerlichen Anwendung von Johanniskrautöl eine Rolle spielen. Im Jahr 1971 gelang Gurevic et al. (1971) die Isolierung und Charakterisierung des

Hyperforins. Beide Substanzen sind ausschließlich in frischen Blüten, Knospen und Früchten enthalten. 1995 konnte aus den Stengeln und Blättern des Johanniskrauts Hydroperoxycadiforin isoliert werden, welches chemisch ein Sesquiterpenderivat des Hyperforins mit einer Hydroperoxygruppe darstellt (Rücker et al., 1995). In dem Inhaltsstoff Hyperforin konnte kürzlich ein Neurotransmitteraufnahme-hemmendes Prinzip identifiziert werden, das für die antidepressive Wirksamkeit von *Hypericum*-Extrakten verantwortlich sein dürfte (Müller et al., 1998).

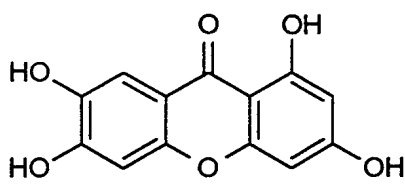
Gerbstoffe und Procyanidine

Procyanidin B₂

Während der Blütezeit ist der Gehalt an Gerbstoffen, die alle dem Catechintyp zugeordnet werden können, am höchsten. Sie sind vor allem in Achsenorganen, Blättern und unreifen Früchten lokalisiert (Brantner et al., 1994). Procyanidine wurden 1990 von Melzer (1990) isoliert und charakterisiert. Neben den bekannten adstringierenden Eigenschaften besitzen höhermolekulare Procyanidine auch antimikrobielle (Scalbert, 1991) und antivirale (Kakiuchi et al., 1991) Eigenschaften. Da die Procyanidine aus

Crataegus Arten denen aus *Hypericum perforatum* strukturell sehr ähnlich sind, zeigen mit oligomeren Procyanidinen (OPC) angereicherte Fraktionen aus Johanniskraut ähnliche Effekte, wie Procyanidin-Fractionen aus Crataegus-Arten. Melzer (1990, 1991) konnte zeigen, daß OPC-Fractionen aus Johanniskraut in vitro die Koronardurchblutung steigern und positiv inotrope Effekte besitzen. Schon eine Konzentration von 10 ng/ml bewirkt eine mehr als 20% Durchflusssteigerung. Unter 50 ng/ml wird eine Zunahme von maximal 75,4% und unter 100 ng/ml von 85,7% gegenüber dem Kontrollwert beobachtet.

Xanthone



1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthone

In den Wurzeln von *Hypericum perforatum* konnte das Xantholignoid Kielcorin nachgewiesen werden (Nielsen & Arends, 1978) und in den Stengeln und Blättern fand sich 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon (Sparenberg, 1993).

Auch für die Xanthone wurden MAO-hemmende Eigenschaften festgestellt (Sparenberg, 1993); da diese

Substanzen jedoch ebenfalls eine hohe Hemmkonstante von ca. 100 µmol/l haben und zudem in *Hypericum perforatum*-Extrakten nur in sehr geringen Mengen vorkommen, erscheint eine Beteiligung an der antidepressiven Aktivität der Gesamtextrakte fraglich. Für Xanthone wurden unter anderem auch fungistatische und tuberkulostatische Effekte beschrieben. Zudem weisen manche Xanthone antiinflammatorische Eigenschaften auf (Bennet & Lee, 1989).

Weitere Inhaltsstoffe

Einige andere Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* sind das überwiegend aus Kohlenwasserstoffen bestehende ätherische Öl, Anthocyane und Aminosäuren. Desweiteren finden sich in der Pflanze auch Pflanzensäuren wie die Kaffeesäure, die Chlorogensäure und die p-Cumarsäure. Für Chlorogensäure konnten Czok & Lang (1961) zentralstimulierende Effekte nachweisen, die jedoch von einer anderen Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden konnte. Ätherisches Öl wurde bisher in fast allen Pflanzenteilen, nicht jedoch in den Wurzeln nachgewiesen (Berghöfer, 1987). Typische Bestandteile des Öles sind insbesondere 2-Methyloctan, Undecan, Dodecanol, α -Pinen und Caryophyllen (Brondz et al., 1983; Mathis & Ourisson, 1964).

Desweiteren enthält der Extrakt freie Aminosäuren, wie z.B. γ -Aminobuttersäure (GABA) (Lapke et al., 1996), die allerdings nicht wirkungsrelevant ist, da GABA nicht ins ZNS übertritt.

Inhaltsstoffgruppe	Gehalt	Pharmakologische Eigenschaften
Flavonoide	2-4%	
Biflavonoide:		MAO-A-, COMT-Hemmung
Biapigenin	0,1-0,5%	Sedierung
Amentoflavon	0,01-0,05%	
Naphthodianthron	0,1%	MAO-Hemmung, antiviral, PKC-Hemmung
Phloroglucinolderivate		Sedierung, Neurotransmitter-
Hyperforin	4,5%	Wiederaufnahmehemmung, Beeinflussung
Adhyperforin	1,8%	intrazellulärer Ionenkonzentrationen (Na^+ , Ca^{2+} , H^+)
Gerbstoffe		
Procyanidine	6,5-15%	Antimikrobiell, antiviral, positiv inotrop, Koronardurchblutung \uparrow
Xanthone		Antiinflammatorisch, fungistatisch,
Kielcorin	0,01%	tuberkulostatisch, ACE-Hemmung, MAO-
1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon	0,0004%	Hemmung
GABA	0,7 mg/g	Neurotransmitter an inhibitorischen Neuronen, nicht ZNS-gängig

Tabelle 1.2: Zusammensetzung, Gehalt und pharmakologische Effekte der bekanntesten Johanniskrautinhaltsstoffe.

1.4.2 Pharmakokinetik

Die ersten pharmakokinetischen Daten wurden mit einem Hypericum-Extrakt, der auf 0,12% Gesamthypericin nach DAC standardisiert ist (Prüfbezeichnung LI 160, Handelspräparat Jarsin[®]), ermittelt. Dieser Extrakt enthält zudem 1,93% Hyperforin und wurde häufig für die Durchführung verschiedener Studien herangezogen, so daß die Datenlage für diesen Extrakt relativ ergiebig ist.

Generell liegen pharmakokinetische Untersuchungen sowohl für die Bestimmung der Hypericin- als auch der Hyperforinkonzentration im Blutplasma vor. Im Falle der Hypericinbestimmung nahmen 12 gesunde Probanden 600 mg, zwei weitere Probanden zusätzlich in Abständen von sieben Tagen 300 mg und 1200 mg des Extraktes in Form von Dragees ein. Im Mittel war nach der Einnahme von 600 mg ein maximaler Plasma-Hypericinspiegel von 4,3 ng/ml nach 2,5 Stunden erreicht. Nach der Resorptionsphase erfolgte eine typische exponentielle Elimination mit einer Halbwertszeit von etwa sechs Stunden. Die Maximalkonzentration im Plasma nach Einnahme von 300 mg, 600 mg und 1200 mg zeigt eine typische Dosisabhängigkeit (Weiser 1991). Nach Einnahme eines Hypericum-Extraktes, der radioaktiv markiertes ¹⁴C-Hypericin enthielt, wurden, bezogen auf die eingenommene Dosis, ähnliche Konzentrationen im Blutplasma gemessen (Stock und Hölzl, 1991).

In neueren Untersuchungen von Brockmöller et al. (1997) wurden in Einzeldosenexperimenten 13 Probanden jeweils Placebo oder 900, 1800 oder 3600 mg LI 160-Extrakt-Dragees, entsprechend 0, 2,81, 5,62 und 11,25 mg Gesamthypericin (Hypericin + Pseudohypericin) verabreicht. Nach vier Stunden wurden maximale Hypericin-Plasmaspiegel von 0, 0,028, 0,061 und 0,159 mg/l gemessen. Die kinetischen Parameter folgten einer linearen Pharmakokinetik. Hypericin wurde mit einer Halbwertszeit von ca. 28,13 h, Pseudohypericin mit einer Halbwertszeit von etwa 17,67 h eliminiert.

Weitere 50 Personen erhielten in den Mehrfachdosis-Experimenten 600 mg LI 160 für eine Dauer von zwei Wochen, was einer täglichen Dosis von 5,6 mg Gesamthypericin entspricht. Die ermittelte Gesamthypericin-Plasmakonzentration wurde mit 0,044 mg/l angegeben und entsprach der Messung 4 Stunden nach der letzten Einnahme an Tag 15. Im Steady State zeigte Hypericin eine terminale Halbwertszeit von 41,7 h, Pseudohypericin eine von 22,8 h (Brockmöller et al., 1997).

Hyperforin-Plasmaspiegel wurden in Ratten und Menschen nach oraler Verabreichung eines wässrigen-alkoholischen Hypericum-Extraktes, der 5% Hyperforin enthielt (WS 5572, Neuroplant 300), ermittelt. Ratten (n=5) erhielten 300 mg/kg/10 ml WS 5572, Menschen (n=6) nahmen 300, 600 oder 1200 mg WS 5572 ein (entsprechend 14,8, 29,6 und 59,2 mg Hyperforin). In einer weiteren Studie erhielten 54 Probanden 900 mg/d WS 5572 oder WS 5573 (0,5% Hyperforin) während einer Dauer von sieben Tagen. Nach Behandlung der Ratten konnte nach 3 Stunden ein mittlerer Hyperforin-Plasmaspiegel von 370 ng/ml (entsprechend 690 nM) gemessen werden. Die Halbwertszeit lag bei 6 Stunden. In der Humanstudie zeigte

sich, daß unabhängig von der verabreichten Extrakt-dosis ein maximaler Plasmaspiegel nach 3-3,5 Stunden erreicht werden konnte, obwohl Hyperforin mit einer Verzögerung von etwa einer Stunde resorbiert wurde. Die Pharmakokinetik kann am besten mit einem offenen 2-Kompartiment-Modell mit einer Verteilungshalbwertszeit von 3 Stunden und einer Eliminationshalbwertszeit von 9 Stunden erklärt werden. Zudem konnte festgestellt werden, daß Hyperforin eine lineare Pharmakokinetik bis zu einer Dosis von 600 mg WS 5572-Extrakt zeigt. Nach den jeweiligen Einzel-Dosierungen wurden maximale Hyperforin-Plasmaspiegel von 153,15 ng/ml (~280 nM), 301,8 ng/ml (550 nM) und 437,3 ng/ml (800 nM) ermittelt. In der Gruppe der Probanden, die eine Woche lang mit den beiden Extrakten behandelt worden waren, konnte keine Kumulation von Hyperforin beobachtet werden. Am achten Tag der WS 5572-Behandlung (n=9) wurde ein maximaler Hyperforin-Plasmaspiegel von 246 ng/ml gemessen, während der niedriger dosierte WS 5573-Extrakt zu einem maximalen Plasmaspiegel von 20,7 ng/ml Hyperforin führte (n=7) (Biber et al., 1998). Somit können therapeutische Dosen von Hyperforin in Plasma erreicht und aufrecht erhalten werden. Bei dem derzeit empfohlenen Dosisregime von 3 x 300 mg Hypericum-Extrakt kann für den 5%igen Hyperforin-Extrakt WS 5572 eine effektive Hyperforin-Plasmakonzentration von ca. 97 ng/ml (~180 nM) angenommen werden (Biber et al., 1998).

Einige wichtige in vivo-Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Amentoflavon und Hyperforin im ZNS wurden bereits 1988 von Ostrowski durchgeführt. Hierzu wurden die ¹⁴C-markierten Inhaltsstoffe per Schlundsonde in Mäuse appliziert. Allerdings mußte mit 0,5 g/kg Körpergewicht relativ viel Hyperforin verabreicht werden, da die spezifische Aktivität der Substanz zu gering war, um quantitative Aussagen zur Verteilung im Organismus zu machen. Nach der Untersuchung der verschiedenen Organe wurde Hyperforin unter anderem auch im Hirn der behandelten Tiere gefunden. Intaktes Hyperforin wurde vor allem über die Faeces und metabolisiertes Hyperforin überwiegend über den Urin ausgeschieden. Auch Amentoflavon konnte nach einer Beobachtungsdauer von drei Stunden im Gehirn der getöteten Tiere nachgewiesen werden. Die Substanz zeigte bereits im Magen eine sehr hohe Metabolisierungsrate (Ostrowski, 1988).

1.4.3 Experimentelle Pharmakodynamik relevanter Inhaltsstoffe

Naphthodianthrone

Als antidepressiv wirksame Inhaltsstoffe von Johanniskraut-Extrakt wurden lange Zeit die Naphthodianthrone Hypericin und Pseudohypericin angesehen, da ihnen eine Hemmung der Monoaminoxidase A und B zugeschrieben wurde (Suzuki et al., 1984). Neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, daß die halbmaximalen Hemmkonstanten zur

Hemmung der MAO-Enzyme im therapeutisch nicht mehr relevanten Dosisbereich von ca. 120-370 µg/ml Hypericum-Extrakt (LI 160) liegen (Müller et al., 1997; Cott, 1997; Bladt & Wagner, 1994; Sparenberg et al., 1993; Demisch et al., 1989). Sowohl reines Hypericin als auch einzelne Fraktionen des Extraktes zeigten sich schwach oder überhaupt nicht aktiv (Bladt & Wagner, 1994). Bei einer zusätzliche Untersuchung der Catecholamin-O-Methyl-Transferase-Hemmung durch Thiede und Walper (1994) konnten keine pharmakologisch relevanten Hemmeffekte für den Gesamtextrakt, reines Hypericin oder zwei flavonolreiche Fraktionen festgestellt werden. Für Hypericin gibt es darüber hinaus nur wenige Anhaltspunkte, die eine direkte antidepressive Wirksamkeit dieses Inhaltsstoffes wahrscheinlich machen. Auch die beobachtete Effektivität der Hypericine in tierpharmakologischen Verhaltensmodellen der Depression wie dem Porsolt-Test, kann erst nach relativ hohen Dosen festgestellt werden (Butterweck et al., 1997). Weder Hypericin noch Pseudohypericin sind nach Resuspendierung in Wasser alleine ausreichend aktiv im Porsolt-Test. Erst die Solubilisierung beider Naphthodianthrone in der Anwesenheit von Procyanidin B2, das auch im Gesamtextrakt vorhanden ist, führt zu einer gesteigerten in vivo Aktivität in diesem Verhaltensmodell (Butterweck et al., 1998). Hier ist zudem zu bemerken, daß auch Procyanidine antidepressive Aktivität in biochemischen in vitro Modellen für depressive Wirksamkeit zeigen (siehe Kapitel 3. Ergebnisse).

Phloroglucinole

Die therapeutisch vielversprechendsten Inhaltsstoffe des Johanniskrauts scheinen nach den bis dato vorliegenden Studien die Phloroglucinole Hyperforin und Adhyperforin zu sein. Initiale Untersuchungen fanden, daß ein Johanniskrautextrakt (LI 160), Hyperforin und Adhyperforin in nanomolaren Konzentrationen die Aufnahme von Noradrenalin, Dopamin, Serotonin, GABA und L-Glutamat in Synaptosomen von Nagern in verschiedenen biochemischen Modellen antidepressiver Aktivität hemmen (Müller et al., 1997; Chatterjee et al., 1998; Müller et al., 1998; Perovic & Müller, 1995). Die halbmaximalen Hemmkonstanten für Hyperforin liegen zwischen 100 und 300 nmol/l und für den Johanniskrautextrakt (LI 160) in einem Bereich von 0,8-4,47 µg/ml. Die Aufnahmehemmung verschiedener Johanniskrautextrakte korrelierte gut mit dem Hyperforingehalt in den Extrakten. Hypericine zeigen hier keinerlei Effektivität (Müller et al., 1998; Chatterjee et al., 1998; Wonnemann et al., 2001).

Hyperforin erhöht nach intraperitonealer Applikation die extrazelluläre Konzentration verschiedener Neurotransmitter wie Serotonin, Dopamin, Noradrenalin und L-Glutamat im Rattenhirn (Kaehler et al., 1999).

Zudem induzieren 3-10 µg/ml eines hydromethanolischen Hypericum-Extraktes sowie 0.3-1 µg/ml Hyperforin eine Serotoninfreisetzung aus mit ³H-Serotonin-beladenen Synaptosomen,

die kalziumunabhängig ist und nicht über den Serotonintransporter vermittelt wird. Die Autoren vermuten eine reserpinähnliche Entleerung von Speichervesikeln, die zu einem Anstieg der zytosolischen Serotoninkonzentration führt und damit indirekt die Serotinaufnahme in die Synaptosomen hemmt (Gobbi et al., 1999).

Hyperforin ist desweiteren auch in anderen Modellen effektiv. So konnten mehrere Studien eine gute Korrelation zwischen der Wirksamkeit verschiedener Johanniskrautextrakte in Tierverhaltensmodellen für antidepressive Wirksamkeit, wie dem Posolt-Test, der erlernten Hilflosigkeit oder dem passiven Vermeidungsverhalten, und deren Hyperforin Gehalt zeigen. In allen Modellen führten methanolischer sowie ethanolischer Hypericumextrakt, Hyperforin oder hyperforinreiche Extrakte zu ähnlichen Verhaltensänderungen wie unter der Gabe verschiedener Standardantidepressiva, wie z.B. Imipramin (Chatterjee et al., 1998; Bhattacharya et al., 1998; Misane & Ögren, 2001).

Zusätzlich führt sowohl ein Johanniskrautextrakt (LI 160) als auch reines Hyperforin zu spezifischen Adaptationen der Rezeptordichte im frontalen Kortex von Ratten, die teilweise auch von anderen Antidepressiva bekannt sind. Subchronische Gaben von Hyperforin und hyperforinhaltigen Extrakten führen zu einer signifikanten Down-Regulation von kortikalen β -Rezeptoren um ca. 16% (Müller et al., 1997), während nach hochdosierter Imipraminbehandlung eine Reduktion der Rezeptordichte um bis zu 25% beobachtet werden konnte (Müller et al., 1997; Duncan et al., 1994). Während die Down-Regulation der β -Rezeptoren eine häufige Eigenschaft vieler, wenn auch nicht aller antidepressiver Substanzen ist (Leonard 1993 + 1995; Baker & Greenshaw, 1989), führt die Behandlung mit einem Johanniskrautextrakt (LI 160) nicht, wie z.B. unter Imipramin, zu einer Erniedrigung der 5-HT₂-Rezeptoren. Unter subchronischer oraler Gabe von 240 mg/kg Johanniskrautextrakt (LI 160) wurde eine signifikante Erhöhung der 5-HT_{2A}-Rezeptordichte um bis zu 15% im frontalen Kortex von Ratten beobachtet (Müller et al., 1997). Nach einer 26 wöchigen Behandlung von Ratten mit 2700 mg/kg Johanniskrautextrakt (LI 160) fanden Teufel-Mayer & Gleitz (1997) eine signifikante Up-Regulation des postsynaptischen 5-HT_{2A}-Rezeptors und des 5-HT_{1A}-Autorezeptors um bis zu 50% im Vergleich zur Kontrolle. Die Empfindlichkeit der untersuchten Rezeptoren wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst. Ähnliche Veränderungen sind bisher nur für die Elektrokrampftherapie beschrieben worden, der „Ultima-Ratio“ der Depressionstherapie, die oft noch erfolgreich bei bereits austherapierten Fällen angewendet werden kann. Interessanterweise führte ein mit 40% Hyperforin angereicherter Extrakt zu einer nicht signifikanten Down-Regulation der 5-HT₂-Rezeptordichte, was ein Hinweis auf ein weiteres pharmakologisch wirksames Prinzip von Johanniskrautextrakten ist, da Hyperforin damit nicht für die Up-Regulation dieser Rezeptoren, wohl aber für die β -Down-Regulation verantwortlich gemacht werden kann (Müller et al., 1998). Johanniskraut-Extrakt und der Inhaltsstoff Hyperforin zeigen damit an noradrenergen und serotonergen Synapsen ähnliche biochemische Effekte wie andere Antidepressiva. Die maximalen Effekte der hier eingesetzten hydroalkoholischen Hypericum-Extrakte werden zudem bei Dosen gesehen, die

ca. 10 mal über den Dosen des Vergleichsantidepressivums Imipramin lagen. Dies stimmt recht gut mit den klinischen Studien überein, in denen die Dosierung der Extrakte ca. 10-20 mal höher lag, als die des trizyklischen Antidepressivums Imipramin.

Hyperforin weist außerdem noch eine weitere Ähnlichkeit mit anderen Antidepressiva, insbesondere den Selektiven Serotonin Reuptake Inhibitoren (SSRI's), auf. Der Inhaltsstoff führt zu einer schnellen Zunahme im alpha-Band-Bereich im EEG der Ratte, wie sie in ähnlicher Weise nach der Gabe von SSRI's gesehen wird. Vermutlich ist der initiale Effekt auf eine Beeinflussung des Serotonin-Uptakes durch Hyperforin zurückzuführen. Eine spätere Erhöhung der delta-Aktivität scheint dagegen nur mit einem Gesamtextrakt beobachtet werden zu können und wird auch durch NMDA-Antagonisten wie Memantine oder MK 801 hervorgerufen. Diese Änderung wird daher möglicherweise durch die Interaktion des Johanniskrautextraktes mit dem glutamatergen System hervorgerufen. Auch in Humanstudien konnten spezifische Änderungen des EEG auf die höhere Hyperforinkonzentration in den verschiedenen Extrakten zurückgeführt werden (Dimpfel et al., 1998; Schellenberg et al., 1998).

Sonstige Inhaltstoffe

Verschiedene Studien lassen darauf schließen, daß Hyperforin zwar einer der wichtigsten, aber nicht der einzige antidepressiv wirksame Inhaltsstoff von Johanniskraut-Extrakten ist. Neuere Untersuchungen zeigen auch für einen hyperforinfreien Extrakt (ZE 117) eine Hemmung der synaptosomalen Aufnahme der oben erwähnten Neurotransmitter. Allerdings sind die hier ermittelten halbmaximalen Hemmkonstanten, mit Ausnahme der für L-Glutamat, deutlich geringer als bei dem hyperforinhaltigen LI 160-Extrakt (Melzer et al., 1998; Müller et al., 1999). Darüber hinaus zeigen sowohl ZE 117 als auch eine hyperforinfreie Hypericum-Extrakt-Fraktion eine Aktivität im Porsolt-Test (Butterweck et al., 1998; De Vry et al., 1998) und eine Veränderung des EEG der Ratte und des Menschen nach oraler Applikation von ZE 117, die auch nach Verabreichung hyperforinhaltiger Extrakte gesehen wird (Schellenberg et al., 1998; Dimpfel & Schombert, 1997). Mittlerweile liegen auch Studien vor, welche die antidepressive Wirksamkeit hyperforinfreier Extrakte belegen (Woelk, 2000). Der Extrakt ZE 117 (Remotiv[®]) ist standardisiert auf einen Hypericin-Gehalt von 0,2%, extrahiert in 50% w/w Ethanol. Im übrigen konnten für hyperforinfreie Extrakte auch Effekte auf die extraneuronale Konzentration von Noradrenalin und Serotonin im ZNS beobachtet werden (Philippu, 2001). Ein mögliches, für die biochemischen Effekte der hyperforinfreien Extrakte verantwortliches Prinzip könnte die Fraktion der oligomeren Procyanidine sein; nähere Untersuchungen liegen hierzu jedoch noch nicht vor.

Für das Biflavonoid Amentoflavon, das vor allem in den Blüten von Johanniskraut zu finden ist, wurde eine starke Hemmung zentraler Benzodiazepin-Rezeptoren gefunden. Die

Johanniskraut-Blütenextrakte aus vier verschiedenen Arten zeigten eine Hemmung der ^3H -Flumazenil-Bindung mit halbmaximalen Hemmkonstanten von 6,14-13,2 $\mu\text{g/ml}$ an Rattenmembranen. Dieser Effekt korrelierte sehr gut mit dem Amentoflavongehalt in den Extrakten, und reines Amentoflavon zeigte hier eine sehr potente Hemmung mit einem IC_{50} -Wert von $14,9 \pm 1,9 \text{ nM}$ (Baureithel et al., 1997). Dennoch ist die Relevanz dieser Befunde fraglich, da Amentoflavon nur in den Blüten des Johanniskrautes und in sehr geringen Konzentrationen enthalten ist.

Eine weitere Inhaltsstoffgruppe, die eventuell an der antidepressiven Wirkung beteiligt sein könnte, sind nach Butterweck et al. (2000) die Flavonoide. Verschiedene flavonoidhaltige Fraktionen aus Johanniskrautgesamtextrakt zeigen nach akuter Gabe Aktivität im Porsolt-Test, allerdings konnten einige Inhaltsstoffe nicht einwandfrei identifiziert werden. Eine weitere Fraktionierung zeigte, daß die einzelnen Flavonoide Hyperosid, Isoquercitrin und Miquelianin ebenfalls wirksam waren (Butterweck et al., 2000). Desweiteren werden die Flavonoide für die Hemmung der MAO (Bladt & Wagner, 1994; Cott, 1997) und der COMT verantwortlich gemacht (Thiede & Walper, 1994).

1.4.4 Klinische Studien zur antidepressiven Wirksamkeit von Johanniskraut

Eine von Linde et al. (1996) durchgeführte Meta-Analyse gibt einen guten Überblick zur damaligen Datenlage bezüglich der antidepressiven Wirksamkeit von Johanniskraut-Extrakten. In dieser Auswertung wurden 1757 Patienten mit leichten bis mittelschweren Depressionen sowohl in placebokontrollierten Studien ($n=15$) als auch in Doppelblindstudien gegen ein Standard-Antidepressivum ($n=8$) erfasst. In der zusammenfassenden Bewertung konnte festgestellt werden, daß bei 60-70% der Patienten eine antidepressive Wirksamkeit von Johanniskraut-Extrakten beobachtet werden konnte. In derselben Größenordnung liegen die Responderraten bei der Behandlung von Patienten mit Depressionen aller Schweregrade mit klassischen Antidepressiva.

Volz et al. (1997) befaßte sich in einer Übersichtsarbeit mit zwölf placebokontrollierten und drei gegen ein Standardantidepressivum durchgeführten Studien zur Ermittlung der antidepressiven Wirksamkeit des Spezialextraktes LI 160 (Jarsin[®]). Besonders diesem Extrakt, der aus den gesamten oberirdischen Teilen des Johanniskrautes durch Extraktion in 80%igem methanolisch/wässrigem Medium bei einer Temperatur von 80°C hergestellt und anschließend auf einen Hypericingehalt von 0,4% eingestellt wird, bescheinigt Volz eine ausreichend dokumentierte antidepressive Wirksamkeit. Er empfiehlt, aufgrund der besonders guten Verträglichkeit des Johanniskrautextraktes, einen Therapieversuch bei leichten bis mittelschweren Depressionen zu unternehmen.

Auch im Vergleich mit dem sedierenden Trizyklikum Amitriptylin (75 mg/d) konnte nach einer sechswöchigen Behandlung kein Unterschied zwischen dem Standardantidepressivum und der Behandlung mit LI 160 (900 mg/d) beobachtet werden. In dieser kontrollierten, randomisierten Multizenterstudie wurden insgesamt 165 Patienten behandelt, 87 mit LI 160 und 78 mit Amitriptylin. Der Erfolg der Therapie wurde durch Ermittlung des HAMD-Scores (Hamilton Rating Scale for Depression) festgestellt. Beide Behandlungen waren gleich effektiv, während in der mit Johanniskrautextrakt behandelten Gruppe eine wesentlich bessere Verträglichkeit beobachtet wurde (Wheatley, 1997). Vorbach et al. (1997) fanden im Vergleich von LI 160 (1800 mg/d) mit Imipramin (150 mg/d) nach einer Behandlungsdauer von sechs Wochen bei insgesamt 209 Patienten mit schweren Depressionen eine therapeutisch äquivalente Wirksamkeit.

Mittlerweile sind auch Studien gegen den SSRI Fluoxetin durchgeführt worden. Verwendet wurde hierbei der Extrakt LoHyp-57, der auch in dysto-lux[®]-Dragees der Fa. Dr. Loges enthalten ist. 800 mg/d des Johanniskrautextraktes oder 20 mg/d Fluoxetin wurden im Rahmen einer randomisierten, doppelblinden Multizenterstudie an 149 Patienten mit leichten bis mittelschweren Depressionen verabreicht. Die Dauer der Behandlung betrug sechs Wochen. Nach Studienende war der Hamilton Gesamtscore in beiden Behandlungsgruppen in gleichem Ausmaß gesunken; unter Hypericumextrakt wurde eine Responderrate von 71,4%, unter Fluoxetin eine von 72,2% erreicht (Schmidt et al., 1998).

Bezüglich der Charakterisierung der antidepressiv relevanten Inhaltsstoffe des Gesamtextraktes wurde eine Vergleichstudie zwischen einem Extrakt mit einem 0,5%igen (WS 5573) und einem 5%igen hyperforinhaltigen Extrakt (WS 5572) (Neuroplant[®] 300) durchgeführt, der ansonsten eine völlig identische Zusammensetzung hatte. Das Studiendesign war eine randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Multizenterstudie an 147 Patienten mit leichten bis mittelschweren Depressionen. Die Patienten erhielten an 42 Tagen täglich 900 mg des jeweiligen Extraktes. Die Bewertungsparameter waren die Beurteilung mittels HAMD und mittels D-S (Depression self-Rating Scale) nach von Zerssen. Zusätzlich wurde der Schweregrad der Erkrankung an Tag 0 und 42 unter Verwendung der Clinical Global Impression Scale (CGI) festgestellt. Am Ende der Untersuchungsperiode konnte festgestellt werden, daß nur durch die Behandlung mit dem hyperforinreicheren WS 5572-Extrakt eine signifikante antidepressive Wirksamkeit erreicht werden konnte, während die WS 5573- und die Placebo-Gruppe sich nicht voneinander unterschieden. Es ist daher naheliegend, daß der Hyperforingehalt in den Extrakten eine wichtige Rolle bei der antidepressiven Wirksamkeit spielt (Laakmann et al., 1998).

Dem gegenüber steht eine Studie von Woelk (2000), der den hyperforinarmen Extrakt ZE 117 (Remotiv[®]) in einer Dosierung von 2x250 mg/d gegen die antidepressive Standardmedikation Imipramin (2x75 mg/d) verglich. In dieser randomisierten, doppelblinden Multizenterstudie wurden 324 Patienten in parallelen Gruppen entweder mit Imipramin (n=167) oder ZE 117 (n=157) über einen Zeitraum von sechs Wochen behandelt und die Ergebnisse nach HAMD

and CGI beurteilt. Es konnte gezeigt werden, daß der Extrakt ZE 117 therapeutisch äquivalent zu Imipramin war. Bemerkenswerterweise war die Johanniskrautextrakt-Behandlung bei Depressionen, die mit Angstzuständen einhergehen, der Imipramin-Behandlung signifikant überlegen. Allerdings wurde in dieser Studie keine Placebogruppe untersucht. Vermutlich können hier andere Inhaltsstoffe des Johanniskrautes, wie z.B. die oligomeren Procyanidine, für die antidepressive Wirkung verantwortlich gemacht werden, da auch diese in in vitro Untersuchungen eine Hemmung des Uptakes verschiedener Neurotransmitter zeigen. Neuere Studien mit dem Extrakt ZE 117 gegen Fluoxetin wurden kürzlich veröffentlicht. In einer dieser Studien, einer randomisierten Doppelblindstudie mit 260 leicht bis mittelschwer depressiven Patienten, die entweder mit 2x250 mg/d ZE 117 oder 2x10 mg/d Fluoxetin behandelt wurden, konnte nach einer sechswöchigen Behandlung eine vergleichbare klinische Wirksamkeit in beiden Gruppen festgestellt werden (Schrader et al., 2000). Zu erwähnen ist hier die schlechte Responderrate im Vergleich zur Studie von Schmidt et al. (1998).

Insgesamt ist die klinische Wirksamkeit von Johanniskrautextrakten bei leichten bis mittelschweren Depressionen gut belegt, wobei der Extrakt den klassischen Antidepressiva durchaus ebenbürtig ist. Von besonderer Bedeutung ist hierbei, daß in sämtlichen Studien immer ein deutlich geringeres Nebenwirkungspotential des Johanniskrautextraktes vorhanden war, welches bei den klassischen Antidepressiva oft zu Therapieabbrüchen oder einer geringen Compliance führt. Schon aus diesem Grunde sollte versucht werden, leichte bis mittelschwere Depressionen mit Johanniskrautextrakt zu behandeln.

Modellsystem	Antidepressive Parameter/Befunde	Literaturstelle
<p>Neurotransmitteraufnahme in Synaptosomen der Maus</p> <p>der Ratte</p> <p>in Astrozyten</p> <p>in Thrombozyten</p>	<p>Hemmung durch LI 160, CO₂-Extrakt und Hyperforin mit IC₅₀-Werten von 80-205 nM für Hyperforin, IC₅₀-Wert für L-Glutamat bei 830 nM. Potenz der Hemmung durch Hyperforin: NA ≥ DA > GABA ≥ 5-HT >> L-Glutamat; Hyperforin ist hauptverantwortlich für die Hemmung</p> <p>5-HT-Aufnahmehemmung durch Hyperforin ist nicht-kompetitiv</p> <p>5-HT- und DA-Aufnahme durch Hyperforin gehemmt; 5-HT-Aufnahmehemmung durch kalziumunabhängigen nicht-kompetitiven Mechanismus</p> <p>NA-Aufnahme kompetitiv, 5-HT-Aufnahme nicht-kompetitiv durch LI 160 gehemmt</p> <p>Hyperforin hemmt 5-HT-Aufnahme mit identischen IC₅₀-Werten wie in Synaptosomen</p>	<p>Müller et al., 1998 Chatterjee et al., 1998</p> <p>Singer et al., 1999</p> <p>Gobbi et al., 1999</p> <p>Neary & Bu, 1998</p> <p>Singer et al., 1999</p>

Rezeptorbindungs-Studien		
Serotonerge Innervation	<p>³H-Paroxetin-Bindung durch LI 160 und Hyperforin nur schwach gehemmt, keine direkte Bindung an 5-HT-Transporter</p> <p>Kaum Hemmung der ³H-Citalopram-Bindung durch Hyperforin, daher keine direkten Effekte auf 5-HT-Transporter</p> <p>Subchronische Behandlung von Ratten mit LI 160 führt zur Down-Regulation von β- und zur Up-Regulation von 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren; Hyperforin-Behandlung führt dagegen neben einer β-Down-Regulation zu einer tendenziellen 5-HT_{2A}-Down-Regulation</p>	<p>Singer et al., 1999</p> <p>Gobbi et al., 1999</p> <p>Müller et al., 1997; Teufel-Mayer & Gleitz, 1997 Müller et al., 1998</p>
GABA-Rezeptoren	<p>Amentoflavon und Hypericumblütenextrakt hemmen zentrale Benzodiazepin-Bindungsstelle des GABA-Rezeptors</p> <p>Hypericumextrakt hemmt GABA-Rezeptoren</p>	<p>Baureithel et al., 1997</p> <p>Cott, 1997</p>
Glutamat-Rezeptoren	<p>Hypericin hemmt NMDA-Rezeptoren</p>	<p>Cott, 1997</p>

<p>Tierverhaltensmodelle</p> <p>Porsolt-Test „Forced Swimming Test“ „Behavioural Despair Test”</p> <p>„Tail Suspension Test”</p> <p>Passives Vermeidungsverhalten „Passive Avoidance“</p> <p>Erlernte Hilflosigkeit „Learned Helplessness“</p>	<p>Hypericumextrakt (250-500 mg/kg KG) sowie Flavonoid- und Naphtodianthron-Fractionen verkürzen die Immobilitätszeit und weisen auf antidepressive Aktivität hin</p> <p>Wiederholte orale Verabreichung ethanolischer und hyperforinangereicherter CO₂-Johanniskrautextrakte sowie reines Hyperforin verkürzen die Immobilitätszeit und weisen auf antidepressive Aktivität hin; Hyperforingehalt ist hauptsächlich für die Wirkung verantwortlich</p> <p>Verkürzung der Immobilitätsphase durch Hypericumextrakt, was ein Hinweis auf antidepressive Wirksamkeit ist</p> <p>Einmalige Gabe von Hypericumextrakt (30 mg/kg i.p.) erniedrigt PA-Retentionszeit. Einzeldosierung von Hypericumextrakt (60 mg/kg i.p.) erhöht durch PCA verkürzte Retention im PA-Test ähnlich Paroxetin. Einmalige orale Verabreichung von hyperforinfreiem Extrakt zeigte ähnliche Effekte. Hinweis auf Beeinflussung der 5-HT-Aufnahme in vivo</p> <p>Hypericumextrakt und hyperforinreicher Extrakt verstärken scopolamininduzierte Erniedrigung der Retentionszeit im PA-Test, vergleichbar mit Imipramin und Paroxetin, durch NA-Uptake Hemmung in vivo</p> <p>Senkung der mißglückten Fluchtversuche durch 150-300 mg/kg/d ethanolischem Extrakt und 15-30 mg/kg/d CO₂-Extrakt, äquivalent zu Imipramin (10 mg/kg/d i.p.)</p>	<p>Butterweck et al., 1997 Butterweck et al., 2000</p> <p>Bhattacharya et al., 1998 Chatterjee et al., 1998</p> <p>Butterweck et al., 1997</p> <p>Misane & Ögren, 2001</p> <p>Chatterjee et al., 1998</p>
---	--	---

<p>Neurotransmitter Release</p>	<p>Hyperforin (10 mg/kg i.p.) erhöht die extrazellulären Konzentrationen von DA, NA, 5-HT und L-Glutamat im Locus Coeruleus der Ratte in vivo. Hyperforinfreier Extrakt erniedrigt dagegen die extrazelluläre Serotoninkonzentration, während DA, NA und L-Glutamat Spiegel erhöht sind. Bei konditionierter Furcht und Depressionen ist die Aktivität serotonerger Neuronen erniedrigt, daher scheint Hyperforin relevant für die antidepressive Wirksamkeit zu sein</p> <p>Hyperforin stimuliert Freisetzung von Glutamat aus kortikalen Rattensynaptosomen, dadurch gleichzeitiger Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$. Effekt auch in kalziumfreiem Medium vorhanden. GABA Release durch Hyperforin ebenfalls verstärkt.</p> <p>Hyperforininduzierte Freisetzung von Serotonin aus Synaptosomen des Rattenhirns scheint kalziumunabhängig zu sein</p>	<p>Kaehler et al., 1999; Philippu, 2001</p> <p>Chatterjee et al., 2001</p> <p>Gobbi et al., 1999</p>
<p>Ionenhomöostase</p>	<p>Hyperforin erhöht die intrazelluläre Konzentration von Natrium in Thrombozyten</p> <p>Hyperforin hemmt in nanomolaren Konzentrationen verschiedene spannungs- und liganden-gesteuerte Ionenkanäle in Rattenneuronen</p> <p>Hyperforin moduliert sowohl neuronale NMDA-, AMPA- und GABA-assoziierte als auch spannungsgesteuerte Natrium, Kalium und Kalziumströme in der Membran zentraler und peripherer Neuronen</p> <p>Hyperforin moduliert die Eigenschaften hochspannungsabhängiger Kalziumkanäle vom P-Typ in Purkinje-Zellen des Cerebellums</p>	<p>Singer et al., 1999</p> <p>Krishtal et al., 2001</p> <p>Chatterjee et al., 1999</p> <p>Fisunov et al., 2000</p>

	<p>Hyperforin erniedrigt intrazellulären pH-Wert in Rattensynaptosomen mit nachfolgender Regenerierung des Basalwertes unter bestimmten Inkubationsbedingungen</p> <p>Hyperforin führt vermutlich über einen Natrium-/Protonen-Austausch oder epitheliale Natriumkanäle zu einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration</p>	<p>Chatterjee et al., 2001</p> <p>Wonnemann et al., 2000</p>
<p>Sonstige Untersuchungen</p>	<p>LI 160 führt zur signifikanten Erhöhung des Kortisolspiegels im Speichel gesunder Probanden und der Wachstumshormonkonzentration im Plasma, während der Plasma-Prolactinspiegel erniedrigt ist. Akute Behandlung von Ratten mit LI 160, Hyperforin und Hypericin verursacht ebenfalls eine Erhöhung des Plasmakortikosterons, was mit einer erhöhten 5-HT-Konzentration im Frontalgewebe des Gehirns assoziiert war. Dagegen war die Prolactin-Beeinflussung von einer gleichzeitigen Zunahme der DA-Konzentration im frontalen Kortex begleitet. Hyperforin scheint für die Effekte nach akuter Gabe verantwortlich zu sein.</p>	<p>Franklin, 2000</p>

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Erst in den letzten Jahren wurde in mehreren Untersuchungen beobachtet, daß die Hypericin-induzierte MAO-Hemmung nicht, wie bislang angenommen, für den antidepressiven Effekt von Johanniskrautextrakten verantwortlich ist. Es war gelungen, ein weiteres aktives Prinzip im Gesamtextrakt zu entdecken, nämlich das Phloroglucinol-Derivat Hyperforin. Weitergehende Experimente zeigten, daß Hyperforin in der Lage war, bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich die neuronale Aufnahme verschiedener Neurotransmitter (Dopamin, Noradrenalin, Serotonin, L-Glutamat, GABA) zu hemmen (Müller & Schäfer, 1996). Dies war ein Befund, der nicht dem Wirkungsspektrum der klassischen Antidepressiva entsprach. Deshalb bestand ein großes Interesse, den vermutlich andersartigen Wirkungsmechanismus von Hyperforin näher zu untersuchen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Sämtliche Tierversuche wurden an Gehirnen junger (8-12 Wochen) weiblicher NMRI Mäuse durchgeführt. Die Tiere wurden von der Firma Harlan Winkelmann in Borcheln (Deutschland) geliefert. Die Mäuse wurden in Altrominkäfigen bei konstanter Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten und hatten in diesem freien Zugang zu Wasser und Futterpellets. Der Tages-Nacht-Rhythmus war auf 12 Stunden eingestellt.

Die Haltung und Tötung der Tiere wurden im Sinne der Bundesdeutschen Tierschutzgesetze und -verordnungen durchgeführt und durch das Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt.

2.2 Thrombozyten

Menschliche Blutplättchen wurden aus dem Blut freiwilliger gesunder männlicher und weiblicher Probanden im Alter von 25-30 Jahren isoliert, die zum Zeitpunkt der Abnahme keine Medikamente zu sich nahmen. Eine Ausnahme stellten einige weibliche Probanden dar, die orale Kontrazeptiva einnahmen.

2.3 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sowie einige andere Substanzen wie Gramicidin, BAPTA/AM und Nigericin wurden von der Firma Molecular Probes (Eugene/OR, USA) bezogen. Die tritiierten Radiochemikalien (^3H -Serotonin, ^3H -Paroxetin) wurden von NEN Life Science Products (Boston/MA, USA) geliefert. Citalopram war ein großzügiges Geschenk der Firma Lundbeck A/S (Valby, Dänemark) und Cariporid wurde freundlicherweise von der Firma Aventis Pharma (Frankfurt/M., Deutschland) zur Verfügung gestellt. Monensin wurde von Tocris (Bristol, Großbritannien) und Fluoxetin sowie SK&F 96365 von Calbiochem (Frankfurt, Deutschland) bezogen.

Die restlichen Standardlaborchemikalien und Wirksubstanzen, die hier verwendet wurden, wurden von Sigma-Aldrich Chemicals (Deisenhofen, Deutschland) bezogen oder von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

2.3.1 Besondere Substanzen

BAPTA, AM

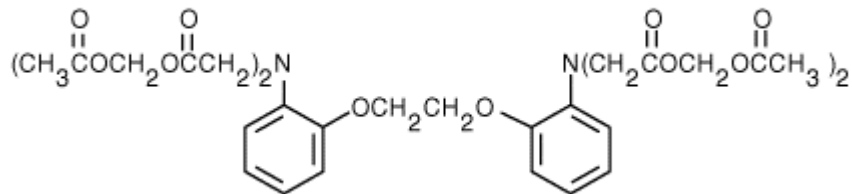


Abbildung 2.1: Struktur des intrazellulären Kalziumchelators BAPTA.

BAPTA/AM ist ein nicht-fluoreszierender Chelator, der eine wesentlich höhere Selektivität für Kalzium- als für Magnesiumionen besitzt und daher für die Beeinflussung sowohl der intra- als auch der extrazellulären Kalziumlevel verwendet werden kann. BAPTA besitzt gegenüber EGTA oder EDTA mehrere Vorteile: BAPTA ist selektiver für Kalziumionen, die Metallbindung ist weniger pH-abhängig und die Kalziumbindung sowie der Kalziumrelease erfolgen 50-400 mal schneller als durch EGTA. BAPTA/AM wird aufgrund seiner Membranpermeabilität zur Chelatierung von intrazellulärem Kalzium verwendet, um die Rolle der freien intrazellulären Kalziumkonzentration bei einer Anzahl verschiedener wichtiger Zellsysteme zu untersuchen.

Monensin

Monensin ist ein Na^+/H^+ -Ionophor, welches einem Konzentrationsgradienten folgend Natriumionen in und Protonen aus der Zelle transportiert (Nakazato & Hatano, 1991; Sandeaux et al., 1982). Daraus resultiert eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration sowie eine Alkalisierung des Zellinneren. Monensin übt hierbei keinen Einfluß auf Ionenkanäle oder Transportproteine in der Zellmembran aus, sondern bildet Poren in der Membran, durch die der Monensin-Natrium bzw. Monensin-Proton-Komplex diffundieren kann. Das stöchiometrische Verhältnis dieses Transports ist 1:1, d.h. pro Natriumion wird im Gegenzug ein Proton transportiert. Die Substanz wurde verwendet, um den Effekt von Hyperforin auf die Natrium- und Protonenkonzentration in Plättchen besser einordnen zu können und um eventuelle Parallelen zum Na^+/H^+ -Austausch durch Monensin zu finden.

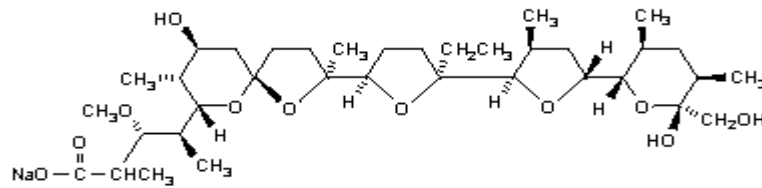


Abbildung 2.2: Strukturformel des Monensin-Natriumsalzes.

SK&F 96365

SK&F 96365 ist ein lipophiles Imidazolderivat, das den G-Protein-vermittelten Kalziuminflux in stimulierten Thrombozyten mit einem IC_{50} -Wert von 8-12 μ M und in Neutrophilen und endothelialen Zellen mit einem IC_{50} -Wert von 30 μ M (für humane Endothelzellen) hemmt (Schwarz et al., 1994; Merritt et al., 1990). Außerdem vermag die Substanz den Influx von Kalzium durch spannungsabhängige Kalziumkanäle in erregbaren Zellen zu inhibieren (Merritt et al., 1990). Bei den oben angegebenen Konzentrationen wird die intrazelluläre Kalziumfreisetzung dagegen nicht beeinflusst (Schwarz et al., 1994; Krautwurst et al., 1992; Merritt et al., 1990).

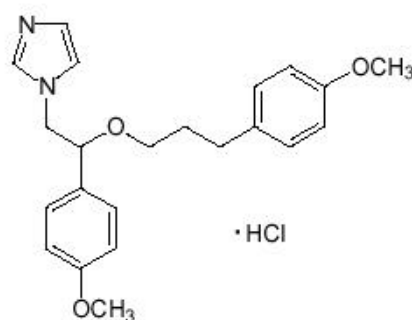


Abbildung 2.3: Strukturformel von 1- β [3-(4-Methoxyphenyl)propyl]-methoxyphenethyl-1H-imidazol HCl (SK&F 96365).

Desweiteren hemmt SK&F 96365 den Natrium- und Kalziuminflux durch unspezifische Kationenkanäle (engl. non-selective cation channels, NSC), die, wie in HL-60-Zellen beobachtet, über G-Protein-vermittelte Mechanismen aktiviert werden können (Krautwurst et

al., 1992). SK&F 96365 zeigt dagegen keine Effekte auf ATP-gesteuerte Kanäle in arteriellen glatten Muskelzellen, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Substanz nicht durch ihre bloße Anwesenheit an bzw. in der Membran eine generelle Hemmung von Kanälen verursacht (Merritt et al., 1990). Im Gegensatz dazu vermag die Substanz, ATP-regulierte Kanäle in Plättchen (Sage et al., 1990) und verschiedenen anderen Zellen (Merritt et al., 1990) zu hemmen.

Hypericum-Extrakte

In dieser Arbeit wurde unter anderem mit einem standardisierten Johanniskraut-Extrakt (LI 160) gearbeitet, der von der Herstellerfirma Lichtwer Arzneimittel AG (Berlin, Deutschland) bereitgestellt wurde. Gehaltsuntersuchungen bezüglich der wichtigsten Inhaltsstoffe dieses Extraktes wurden von Professor Dr. A. Nahrstedt der Wilhelms-Universität (Münster/Westf., Deutschland) durchgeführt (siehe Tabelle 2.1). Verschiedene isolierte Einzelsubstanzen wie oligomere Procyanidine (OPC) und Hyperforin/HyperforinNatriumsalz wurden von der Firma Dr. Willmar Schwabe (Karlsruhe, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Inhaltsstoffgruppe	Inhaltsstoffe	Extraktgehalt (%)
Phloroglucinole	Hyperforin	1,93
Hypericine	Hypericin	0,05
	Pseudohypericin	0,09
Flavonoide	Hyperosid	4,09
	Isoquercitrin	3,75
	Quercetin	0,48
	Quercitrin	0,37
	Rutin	2,27
Biflavonoide	Biapigenin	0,91
Pflanzensäuren	Chlorogensäure	0,55

Tabelle 2.1: Gehalt wichtiger Inhaltsstoffe des verwendeten Johanniskrautextraktes

2.3.2 Statistische Auswertung

Zur Darstellung und Auswertung der Ergebnisse wurden zusätzlich zu der üblichen Microsoft Office Excel Anwendung GraphPad Prism (Version 3.0 oder Version 2.0) benutzt. Bei den

statistischen Analysen wurde der ungepaarte Student t-test verwendet. Korrelationen wurden zweiseitig berechnet. Wenn nicht anders angegeben, wurden jeweils Mittelwerte \pm SD ermittelt.

2.3.3 Proteinbestimmungen

Proteinbestimmungen wurden entweder nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) oder nach Lowry (Lowry et al., 1951) durchgeführt. Die Methode nach Bradford mußte für die Bestimmung der Gewebekonzentration der Synaptosomen und Blutplättchen verwendet werden, da in den Puffern Glucose vorhanden war, welche die Messung nach Lowry stören würde. Die Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blue an das Protein. Durch diese Bindung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm verschoben und die Farbänderung des bräunlichen Reagenzes nach blau hängt hauptsächlich von der Protonenkonzentration ab. Aufgrund der einfachen Anwendung wurde hierzu der Bio-Rad Protein Assay verwendet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den verwendeten Gewebesuspensionen wurden Eichgeraden mit BSA hergestellt und die Tiefe des Farbstoffes spektroskopisch festgestellt. Es war erforderlich, die Gewebesuspension 1:10 zu verdünnen.

Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen für die Paroxetin-Bindung war mit der Methode nach Lowry möglich, da dem Medium keine reduzierenden oder oxidierenden Substanzen zugesetzt wurden. Die Proben konnten hierbei unverdünnt vermessen werden. Im ersten Schritt der Bestimmung reagiert das Protein mit einem alkalischen Kupfersulfat-Tartrat-Reagenz, welchem anschließend Folin-Ciocalteu-Phenol-Lösung zugesetzt wird. Die Reduktion dieses Bestandteils führt zur Bildung eines wasserlöslichen blaugefärbten Produktes, das bei 750 nm vermessen werden kann. Die Herstellung der Eichgeraden und die spektroskopische Vermessung erfolgte in Analogie zur Proteinbestimmung nach Bradford.

2.4 Spektralphotometrische Bestimmung intrazellulärer Ionenkonzentrationen

2.4.1 Allgemeine Grundlagen

Fluoreszenz kann als ein dreistufiger Prozeß beschrieben werden, der vor allem in Heterozyklen und polyaromatischen Hydrocarbonen entstehen kann. Der Prozeß, der für die Fluoreszenz dieser sogenannten Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Fluorophore verantwortlich ist, kann im Jablonski-Diagramm dargestellt werden (Abbildung 2.4). In Stufe 1, der Exzitation, wird ein Energiephoton $h\nu_{\text{EX}}$ einer externen Energiequelle (z.B. einem Laser oder einer Glühbirne) von dem Fluorophor absorbiert, wodurch ein angeregter elektronischer Singulett-Zustand S_1' erreicht wird. In der zweiten Stufe fallen die Elektronen zunächst strahlungslos in den Schwingungszustand des Anregungszustandes S_1 zurück. Erst von hier erfolgt der Übergang in den Schwingungszustand des Grundzustandes (S_0) durch Aussendung von Fluoreszenzlicht $h\nu_{\text{EM}}$ (Emission). Durch den Energieverlust in Stufe 2 ist die Energie dieses Photons geringer und liegt damit in einer längeren Wellenlänge als das Anregungsphoton $h\nu_{\text{EX}}$.

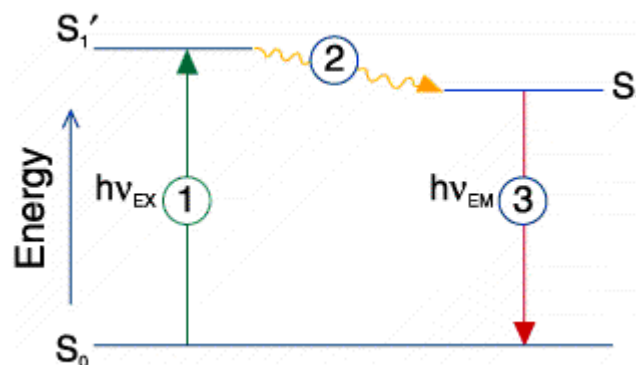


Abbildung 2.4: Jablonski Schema (Erklärung im Text)

Bei manchen Fluorophoren ist es möglich, eine sogenannte Ratiomessung durchzuführen. Dies liegt darin begründet, daß verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zwei verschiedene Energiephotonen emittieren können, da die Fluoreszenzintensität von der Bindung dieses Farbstoffes mit einem bestimmten Ion abhängt. Dadurch erfolgt eine Verschiebung zu verschiedenen Emissionswellenlängen.

Es gibt zwei wichtige Voraussetzungen für die Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen mit Fluoreszenzindikatoren. Erstens muß der Farbstoff nach der Beladung in dem Zellkompartiment (meist im Zytosol) vorhanden sein, in welchem die Messung der

intrazellulären Ionenkonzentration erfolgen soll. Zum anderen muß die Fluoreszenz des Indikators quantitativ mit der Konzentration des freien Ions zusammenhängen.

Eine Methode der Zellbeladung mit Fluoreszenzfarbstoffen ist die Verwendung der Acetoxymethylester der Fluorophore. Die Carboxygruppen der Ca^{2+} - und der meisten anderer Kationenfarbstoffe sowie die phenolischen Hydroxylgruppen der pH-Farbstoffe werden zu Acetoxymethylestern bzw. Acetatester derivatisiert, wodurch der Indikator zellpermeabel und insensitive für Ionen wird. Nachdem der derivatisierte Indikator in die Zelle gelangt ist, wird er durch intrazelluläre Esterasen gespalten und der Ionen-sensitive, polyanionische Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt (Abbildung 2.5). Aufgrund seiner Polarität ist der Indikator nun in der Zelle "gefangen". Bei der Beladung mit höheren Konzentrationen der Acetoxymethylester-Farbstoffe können bei der Beladung der Zellen auch potentiell toxische Produkte wie Formaldehyd und Essigsäure entstehen.

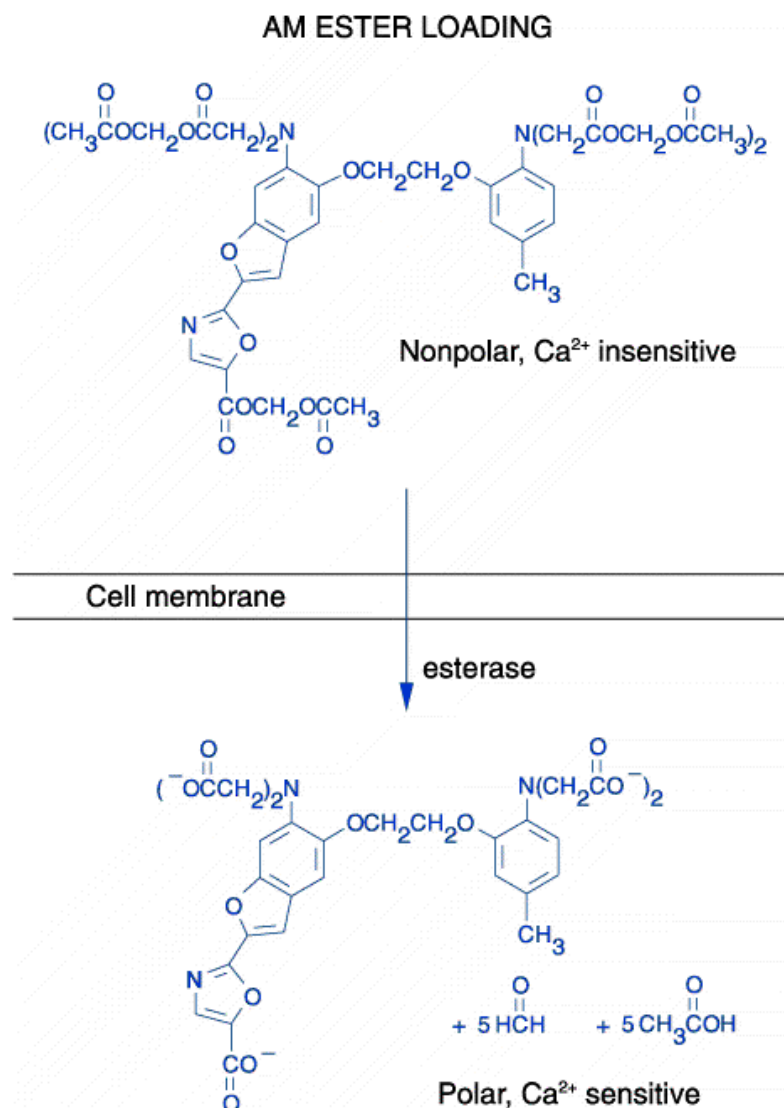


Abbildung 2.5: Prinzip der Beladung einer beliebigen Zelle mit einem Acetoxymethylester-Farbstoff.

In manchen Fällen, so z.B. bei der Beladung von Thrombozyten mit dem Na^+ -Farbstoff SBFI, muß dem Farbstoff das nicht-ionische und nicht-denaturierende Detergens Pluronic F-127 zugesetzt werden, damit sich das Fluorophor im Medium löst.

Die Dissoziationskonstante K_d ist der wichtigste Parameter für die Umrechnung des Fluoreszenzsignals in die korrespondierenden Ionenkonzentrationen. Üblicherweise wird K_d bei pH-Indikatoren als negativer Logarithmus ($\text{p}K_a$) angegeben. Der Konzentrationsbereich, in dem ein Indikator eine deutliche Response zeigt, liegt bei ca. 0,1 bis 10 K_d . Bei ratiometrischen Messungen hängt das Ausmaß der Response zudem von Wellenlängen-abhängigen Parametern ab. Untersuchungen bisher publizierter Daten zeigen, daß der K_d -Wert bei *in situ* Messungen bis zu fünffach höher sein kann, als bei *in vitro* ermittelten Werten.

2.4.2 Ratiometrische Messungen

Eine Besonderheit der in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe ist, daß die freie und die Ionen-gebundene Form des Indikators verschiedene Emissions- oder Exzitationswellenlängen haben. Daher können Farbstoffe, die durch Binden an ein Ion eine spektrale Verschiebung der Exzitation oder Emission erfahren, für die Ermittlung der Ratio der optischen Signale (S1 und S2 in Abbildung 2.6) verwendet werden, indem das Verhältnis (engl. Ratio) der Fluoreszenzintensitäten bei zwei verschiedenen Wellenlängen ermittelt wird.

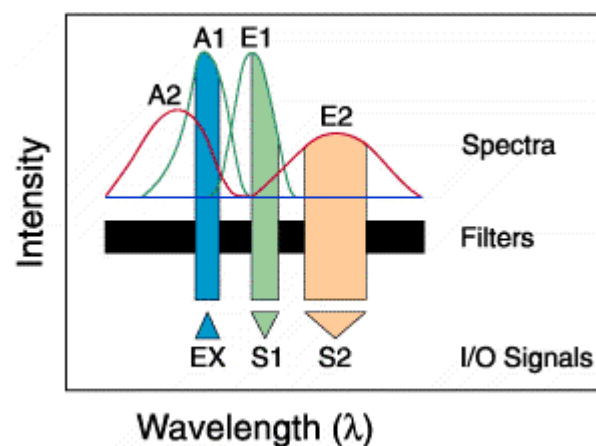


Abbildung 2.6: Die Exzitation (EX) zweier überlappender Absorptionsbanden (A1 und A2) erzeugt zwei Fluoreszenzspektren mit den Spektren E1 und E2. Optische Filter isolieren daraus die quantitativen Emissionssignale S1 und S2.

Dies führt dazu, daß durch Artefakte bedingte Unterschiede im Fluoreszenzsignal beseitigt werden, die ansonsten zu einer Fehlinterpretation der Änderung der Ionenkonzentration führen könnten. Durch dieses sogenannte ratiometrische Meßverfahren werden Schwankungen verschiedener entscheidender Faktoren der gemessenen Fluoreszenzintensität limitiert bzw. eliminiert. Dazu gehören sowohl Unterschiede in der Indikatorkonzentration, Exzitations-"Pathlength" und Intensität als auch in der Leistungsfähigkeit der Detektion. Artefakte die ebenfalls eliminiert werden, schließen Ausbleichen bzw. Ausströmen des Indikators aus der Zelle, unterschiedliche Zelldicke und ungleichmäßige Verteilung des Farbstoffes in der Zelle mit ein. Beispiele für Indikatoren, die bei zwei Exzitationsintensitäten gegensätzliches Ionen-sensitives Ansprechen zeigen, sind Fura-2 und BCECF. Alternativ kann auch die Ratio einer Ionen-sensitiven Intensität gegen eine Ionen-insensitive Intensität (gemessen an einem spektralen isobestischen Punkt) ermittelt werden. Durch ratiometrische Messungen wird die Verzerrung von Meßwerten verhindert, die eventuell durch Ausbleichen des Farbstoffes, Unterschiede in der Probenbeladung oder instrumentelle Faktoren wie z.B. der Strahlungsintensität, auftreten kann.

2.4.3 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Fura-2

(5-Oxazolcarboxylsäure, 2-(6-(bis(2-((acetyloxy)methoxy)-2-oxoethyl)amino)-5-(2-(2-((acetyloxy)methoxy)-2-oxoethyl)amino)-5-methylphenoxy) ethoxy)-2-benzofuranyl)-, (Acetyloxy)methylester

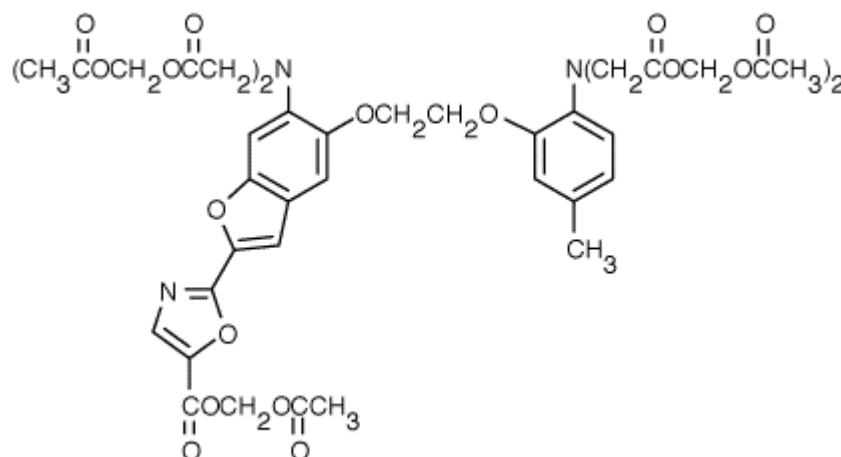


Abbildung 2.7: Struktur des Fluoreszenzindikators Fura-2 für die Bestimmung der Konzentration intrazellulärer Kalziumionen.

Nach Binden eines Ca^{2+} -Ions zeigt Fura-2 eine Absorptionsverschiebung, die durch Ermittlung des Exzitationsspektrums zwischen 300 und 400 nm beobachtet werden kann, während die Emission bei 510 nm gemessen wird. Üblicherweise wird die Ratio der Fluoreszenzintensitäten bei 340/380 nm bestimmt.

Fura-2 hat einen K_d -Wert, der in der Nähe des typischen basalen Kalziumlevels in Säugetierzellen liegt (~100 nM) und weist im Vergleich zur Mg^{2+} -Bindung eine hohe Selektivität für die Kalziumbindung auf. Trotzdem ist der K_d -Wert stark von den physiologischen Mg^{2+} -Konzentrationen abhängig; in magnesiumfreien Kalziumpuffern beträgt der K_d -Wert von Fura-2 für Kalzium ungefähr 135 nM, während er in Kalziumpuffern, die 1 mM Magnesium enthalten, bei ca. 224 nM liegt.

SBFI

(1,3-Benzenedicarboxylsäure, 4,4'-[1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecan-7,13-diylbis(5-methoxy-6,2-benzofurandiyl)]bis-, Tetraammonium Salz)

Obwohl die Selektivität des Fluoreszenzfarbstoffes SBFI für sein Ziel-Ion Na^+ geringer als die des Kalziumindikators Fura-2 ist, ist diese dennoch ausreichend, um physiologische Natrium-Konzentrationen auch in der Anwesenheit von anderem monovalenten Kationen zu detektieren. SBFI kann aufgrund seines spektralen Verhaltens auf die Ionenbindung zu ratiometrischen Messungen verwendet werden und zudem kann die Messung mit den gleichen optischen Filtern wie die Fura-2-Messung durchgeführt werden.

Strukturell setzt sich SBFI aus einem Benzofuranyl-Fluorophor, das mit einem Kronenether-Chelator verbunden ist, zusammen (Abbildung 2.8). Der Hohlraum des Kronenethers verleiht dem Molekül die Selektivität für Natriumionen. Wenn ein Ion an SBFI gebunden wird erhöht sich die Quantenausbeute, der Exzitationshöchstwert verschmälert sich und das Exzitationsmaximum verschiebt sich zu kürzeren Wellenlängen, wodurch sich eine signifikante Änderung der Ratio der Fluoreszenzintensitäten bei 345/385 nm ergibt. Dieses Fluoreszenzsignal ist in einem Bereich von 6,5 bis 7,5 geringfügig vom pH-Wert abhängig.

Obwohl SBFI relativ selektiv für Natrium-Ionen ist, übt Kalium einen Effekt auf die Affinität des Indikators für Natrium aus. Die Dissoziationskonstante K_d von SBFI für Natrium beträgt 3,8 mM in Abwesenheit von Kaliumionen, und 11,3 mM in Lösungen, die eine Gesamtkonzentration von 135 mM Natrium und Kalium haben. Zur Kalibration von intrazellulärem SBFI wird am besten das Poren-bildende Antibiotikum Gramacidin verwendet, welches sowohl die Natrium- als auch die Kaliumionenkonzentration innerhalb und außerhalb der Zellmembran ausgleicht.

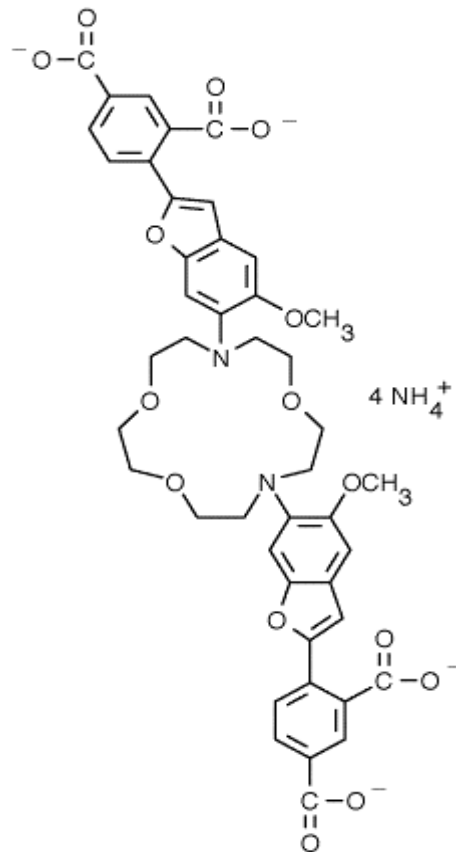


Abbildung 2.8: Struktur des Natriumindikators SBFI

BCECF

(2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, Acetoxymethylester) oder Spiro(isobenzofuran-1(3H), 9'-(9H)xanthen)-2',7'-dipropanoic Säure, 3',6'-bis(acetyloxy)-5(or 6)-[(acetyloxy)methoxy]carbonyl]-3-oxo-, bis[(acetyloxy)methyl] ester

Einige Fluorophore wie z.B. BCECF besitzen stark pH-abhängige Absorption- und Fluoreszenzcharakteristika, so daß diese Substanzen als physiologische pH-Indikatoren verwendet werden können. Strukturell steckt hinter dieser pH-Abhängigkeit eine Rekonfiguration des π -Elektronen-Systems des Fluorophores, die durch Protonierung verursacht wird.

Das polare Fluorescein-Derivat BCECF und sein membrangängiger Acetoxymethylester werden am häufigsten für die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes verwendet. Die vier bis fünf negativen Ladungen des Indikators bei pH 7-8 verbessern dessen Verweildauer in den beladenen Zellen und der pK_a von 6,98 ist ideal für typische intrazelluläre pH-Messungen.

Die Absorption der phenolischen-anionischen (basischen) Form von BCECF zeigt außer einer Rotverschiebung eine erhöhte molare Absorptionsfähigkeit im Gegensatz zur protonierten (sauerer) Form. Wenn überhaupt, zeigt das Fluoreszenzemissionsspektrum des Farbstoffes nur eine geringe pH-abhängige Verschiebung nach Exzitation bei 505 nm.

Intrazelluläre pH-Wert Messungen mit BCECF werden durch Bestimmung der pH-abhängigen Ratio der Emissionsintensität durch Detektion bei 535 nm durchgeführt. Der Farbstoff wird hierzu bei 490 nm angeregt und gegen die Intensität bei Anregung am isobestischen Punkt von 440 nm gemessen.

Ähnlich anderen intrazellulären pH-Indikatoren wird die *in situ* Kalibration der BCECF Fluoreszenz üblicherweise durch Zusetzen von Nigericin oder Triton X-100 in der Anwesenheit von 100-150 mM Kalium durchgeführt, um den internen und externen pH zu äquilibrieren. Da in dem hier verwendeten System, wie häufig in der Literatur beschrieben, dieser Ausgleich mit Nigericin teilweise unvollständig war, wurde hier vorzugsweise Triton X-100 verwendet.

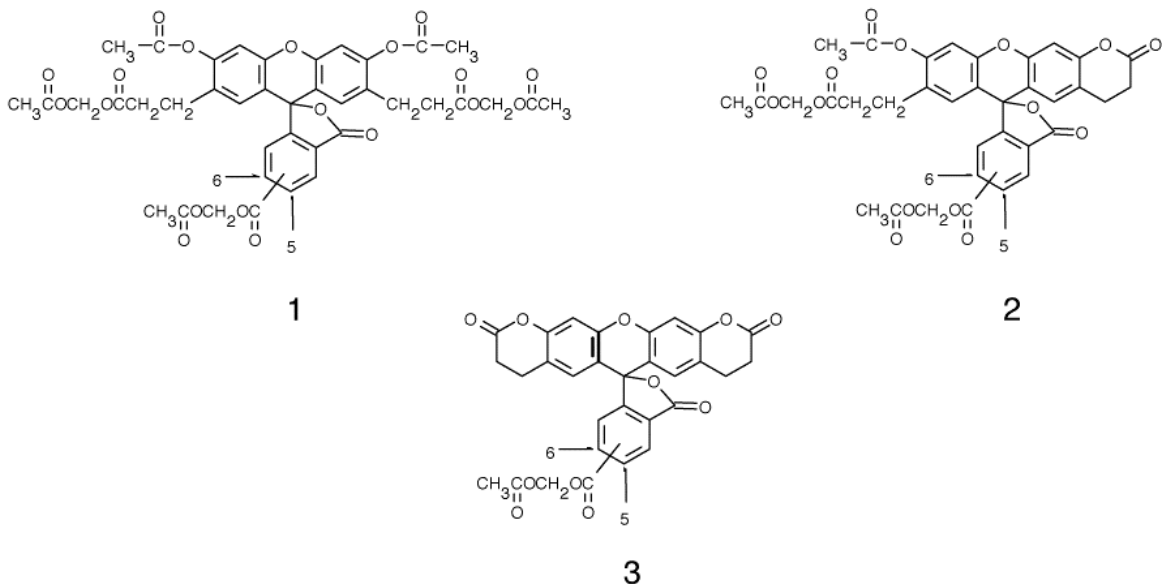


Abbildung 2.9: Struktur des pH-Indikators BCECF, welcher eine Mischung aus den drei oben abgebildeten Molekülspezies darstellt.

2.4.4 Durchführung der Messungen

Die Experimente wurden größtenteils nach von Negulescu & Machen (1990) beschriebenen Methoden durchgeführt und gegebenenfalls modifiziert.

Pufferlösungen

Natrium-HEPES-Puffer 1 (kalziumfrei): Beladungspuffer

Natriumchlorid	145 mM
Kaliumchlorid	5 mM
Kaliumdihydrogensulfat	5 mM
Magnesiumsulfat	1 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM

Natrium-HEPES-Puffer 2 (kalziumhaltig): Inkubationspuffer

Natriumchlorid	145 mM
Kaliumchlorid	5 mM
Kaliumdihydrogensulfat	5 mM
Magnesiumsulfat	1 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
Kalziumchlorid	1 mM

Die Einstellung des pH-Wertes auf 6,5 für Puffer 1 und 7,5 für Puffer 2 (jeweils bei 37°C) erfolgte mit Ammoniak und Salzsäure, um die eingestellte Natriumionenkonzentration nicht zu beeinflussen. Dies war vor allem bei der Messung der intrazellulären Natriumkonzentration zu beachten. Wenn es erforderlich war, in kalziumfreiem Medium zu messen, wurde der Inkubationspuffer (Puffer 2) ohne den Zusatz von Kalziumchlorid hergestellt.

Anmerkung: Der Beladungspuffer muß auf jeden Fall kalziumfrei sein, da die Thrombozyten sonst aggregieren. Zudem sollte so wenig wie möglich mit Glasoberflächen gearbeitet werden, da die Plättchen auch hierauf äußerst empfindlich reagieren.

Natrium-Kalibrationspuffer:

Natriumchlorid	150 mM
Kaliumdihydrogensulfat	5 mM
Magnesiumsulfat	1 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
Kalziumchlorid	1 mM

Kalium-Kalibrationspuffer:

Kaliumchlorid	150 mM
Kaliumdihydrogensulfat	5 mM
Magnesiumsulfat	1 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
Kalziumchlorid	1 mM

Beide Puffer werden wiederum mit Ammoniak und Salzsäure bei 37°C auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Durch Mischen beider Kalibrationspuffer kann jede beliebige

Natriumkonzentration zwischen 0 und 150 mM erreicht werden. Jeweils fünf verschiedene Natriumkonzentrationen wurden hergestellt und am Versuchstag zur Kalibrierung der SBFI-Fluoreszenz verwendet. Zum Ausgleich der intrazellulären Natrium- und Kaliumkonzentration wurde das Ionophor Gramicidin (1 μ M) benutzt.

BCECF-Kalibrationspuffer:

HEPES	10 mM
Kaliumchlorid	120 mM
Natriumchlorid	25 mM
Magnesiumchlorid	1 mM
Kalziumchlorid	1 mM
Glucose	10 mM

Zur Kalibration des BCECF Fluoreszenzsignals wird dieser Puffer bei 37°C mit Natronlauge und Salzsäure auf verschiedene pH-Werte zwischen 6,5 und 7,5 eingestellt. Aufgrund der sehr guten und reproduzierbaren Regressionsgeraden, die man dadurch erhält, daß man die Ratiowerte gegen die pH-Werte aufträgt, ist es ausreichend hier drei verschiedene Werte einzustellen.

Herstellung der Thrombozytensuspension

Venöses Blut wurde aus der Armvene freiwilliger gesunder männlicher und weiblicher Probanden entnommen und zur Antikoagulation in 10 ml-Citrat-Monovetten (1 ml Citratlösung) gesammelt. Das Gesamtblut wurde bei 359 x g für 10 min bei RT zentrifugiert (Beckman GS-15 Centrifuge) und anschließend die oberen 2/3 des PRP (Plättchen reiches Plasma) mit einer Pasteurpipette abgenommen und in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation des PRPs bei 1000 x g für 20 min (RT) wurde das Thrombozytenpellet in 1800 μ l Natrium-HEPES-Puffer 1; pH 6,5 resuspendiert, was einer Thrombozytenkonzentration von 3-4 x 10⁸ Zellen/ml entspricht. Dieser pH-Wert wurde gewählt, da Thrombozyten hier besonders stabil sind. Diese Suspension wurde nun jeweils mit den verschiedenen Farbstoffen beladen.

Die Anzahl der Thrombozyten wurde mittels Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt, indem das arithmetische Mittel aus mehreren Zählquadraten gebildet und mit dem Kammerfaktor sowie der Verdünnung multipliziert wird:

Bei 1:10 Verdünnung: $X/10 = \text{Zellzahl} \times 10^6/\text{ml}$

Bei 1:100 Verdünnung : $X = \text{Zellzahl} \times 10^6/\text{ml}$

Beladung von Thrombozyten mit den einzelnen Fluoreszenzfarbstoffen

Die Thrombozyten wurden jeweils mit den Acetoxymethylestern der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe bei 37°C im Schüttelwasserbad beladen. Tabelle 2.2 faßt die verschiedenen Parameter zusammen.

Intrazelluläres Ion	Natrium	H⁺/pH-Wert	Kalzium
Farbstoff	SBFI/AM	BCECF/AM	Fura-2/AM
Endkonzentration	10 µM	10 µM	5 µM
Beladungszeit bei 37°C	60 min	30 min	30 min
Ansatz	2 µl SBFI/AM 4 µl Pluronic F-127 194 µl Puffer 1 1800 µl Suspension	2 µl BCECF/AM 198 µl Puffer 1 1800 µl Suspension	10 µl Fura-2/AM 190 µl Puffer 1 1800 µl Suspension
Exzitation (Bandweite)	345/385 nm (5)	505/440 nm (5)	340/380 nm (5)
Emission (Bandweite)	490 nm (16)	530 nm (9)	510 nm (5)

Tabelle 2.2: Wichtigste Versuchbedingungen zur Bestimmung verschiedener intrazellulärer Ionenkonzentrationen in Thrombozyten

Nach der jeweiligen Beladungsdauer wurde die Suspension jeweils in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und 20 min bei 1000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Beckman Microfuge[®] R Centrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet abermals mit Natrium-HEPES-Puffer 1 resuspendiert, so daß eine Konzentration von 3-4 x 10⁹ Thrombozyten/ml erreicht wurde. Diese Thrombozytensuspension wurde solange bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis sie zur Fluoreszenzmessung eingesetzt wurde.

Fluoreszenzmessung

Alle Messungen wurden in Natrium-HEPES-Puffer 2 vorgenommen, wenn kalziumhaltiges Medium erforderlich war. Bei Verwendung des kalziumfreiem Mediums wurde der pH-Wert des Natrium-HEPES-Puffer 1 mit Ammoniak und Salzsäure auf 7,5 (37°C) eingestellt (nominell kalziumfrei) und teilweise zusätzlich noch vor jeder Messung EGTA (500 µM) zugesetzt (kalziumfrei). Alle Messungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer auf 37°C temperierten 1 ml-Glasküvette durchgeführt. Bei der Zugabe geringerer Mengen an

Substanzlösung (<10 μ l) wurde zusätzlich gerührt. Gemessen wurde an einem Fluoreszenzspektrometer der Firma Aminco Bowman (Luminescence Spectrometer Series 2, SLM-Aminco; Spectronic Instruments, Rochester/NY, USA).

Kalibration des Fluoreszenzsignals

Außer bei der Kalziummessung, bei der man am Ende der jeweiligen Messung direkt in der Meßküvette kalibrieren kann, wurden die Kalibrationen der pH- und Natriumsignale vor oder nach der eigentlichen Meßreihe in getrennten Küvetten durchgeführt, da hierbei ein Mediumwechsel notwendig war. Hierzu wurden die Thrombozyten in der gleichen Konzentration wie in den eigentlichen Messungen in verschiedenen Kalibrationspuffer suspendiert und dann mit Substanzen behandelt, die einen Ausgleich verschiedener relevanter Ionen zwischen Zelläußeren und -inneren bewirken.

BCECF

Die Kalibration des BCECF-Signals erwies sich als leicht reproduzierbar. Unter Verwendung des Kalibrationspuffers, der bei 37°C auf drei verschiedene pH-Werte eingestellt wurde und Behandlung der Zellen mit Triton X-100 erhält man eine Korrelation der Regressionsgeraden von 0,999 (Abbildung 2.10). Nach Erstellen der Regressionsgeraden in GraphPad Prism wurden die zuvor ermittelten Meßwerte extrapoliert.

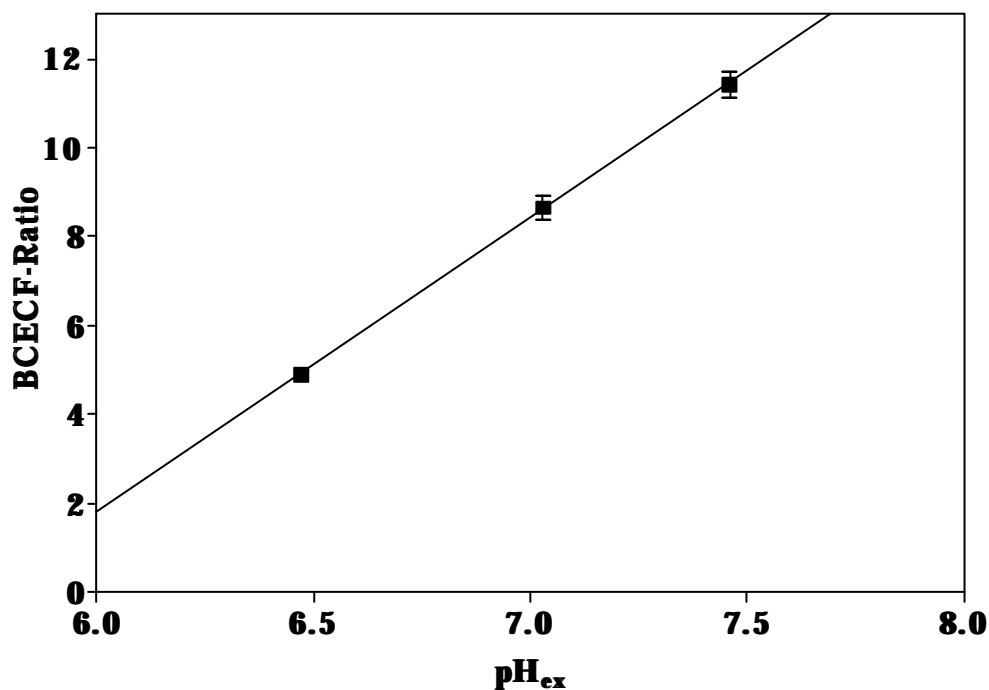


Abbildung 2.10: Kalibrationsgerade der pH-Wert-Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Messungen.

Fura-2

Wie zuvor erwähnt erfolgte die Kalibration des Fura-2 Signals direkt nach dem jeweiligen Versuch in der Meßküvette. Hierzu wurden die Thrombozyten zuerst mit 10%igem Triton X-100 lysiert, um einen vollständigen Ausgleich zwischen der intra- und extrazellulären Kalziumkonzentration zu erreichen. Dadurch steigt die Fluoreszenzintensität und damit die Ratio stark an und man erhält R_{max} , der die maximale Absättigung des Farbstoffes mit Kalziumionen ausdrückt. Nachdem sich dieses Signal auf einem Level stabilisiert hat, wird nun EGTA zugegeben. Das hat zur Folge, daß sämtliche Kalziumionen in der Zelle komplexiert werden und der Fluoreszenzfarbstoff ein kalziumarmes Signal R_{min} abgibt. Unter der Verwendung einer K_d von 224 nm ergibt sich in der sogenannten Grynkiewicz-Gleichung nach (Grynkiewicz et al., 1985)

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times [(R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times Sf2/Sb2]$$

jeweils die Konzentration der intrazellulären Kalziumionen in nM. Die Berechnung kann direkt durch das Programm des Fluoreszenzspektrometers durchgeführt werden.

SBFI

Die Kalibration der SBFI-Messung wird im Prinzip wie die Bestimmung zur Ermittlung der BCECF-Regressionsgeraden durchgeführt. Die Thrombozytensuspension wird in Küvetten mit Puffern verschiedener Natriumkonzentration eingebracht und die Zellen mit Gramacidin (1 μ M) behandelt, um einen Ausgleich der Kalium- und Natriumionen über die Zellmembran zu erreichen. Die Zusammensetzung dieses Kalibrationspuffers ist allerdings in der Literatur nicht sehr einheitlich beschrieben und auch die Firma Molecular Probes kann keine brauchbare Aussage zur Kalibration des SBFI-Signals machen. So hängt das Gelingen der Kalibration wohl von den verwendeten Zellen und vor allem von dem verwendeten Kalibrationspuffer ab. Es war festzustellen, daß das Signal nicht nur von der Natrium- und Kaliumkonzentration sondern auch von anderen Ionenkonzentrationen im Kalibrationspuffer abhängt. Letztendlich waren die besten Resultate mit einer dem Inkubationspuffer sehr ähnlichen Zusammensetzung des Kalibrationspuffers zu erzielen. Versuche mit anderen Pufferzusammensetzungen führten zum Teil zu einer Überbewertung des Fluoreszenzsignals oder einer nicht-linearen Abhängigkeit zwischen verschiedenen Natriumkonzentrationen im Kalibrationspuffer und der resultierenden Ratio.

Mit dieser Vorgehensweise konnten zumindest Regressionskoeffizienten von 0,89-0,98 erreicht werden. Auch auf diese Kalibrationsgeraden wurden die Meßwerte extrapoliert und in mM $[Na^+]_i$ angegeben. Wichtig ist vor allem die Bestimmung der Ratio bei einer natriumfreien Pufferlösung, da die Einschließung dieses Punktes in die Berechnung wesentlich bessere Korrelationskoeffizienten ergibt.

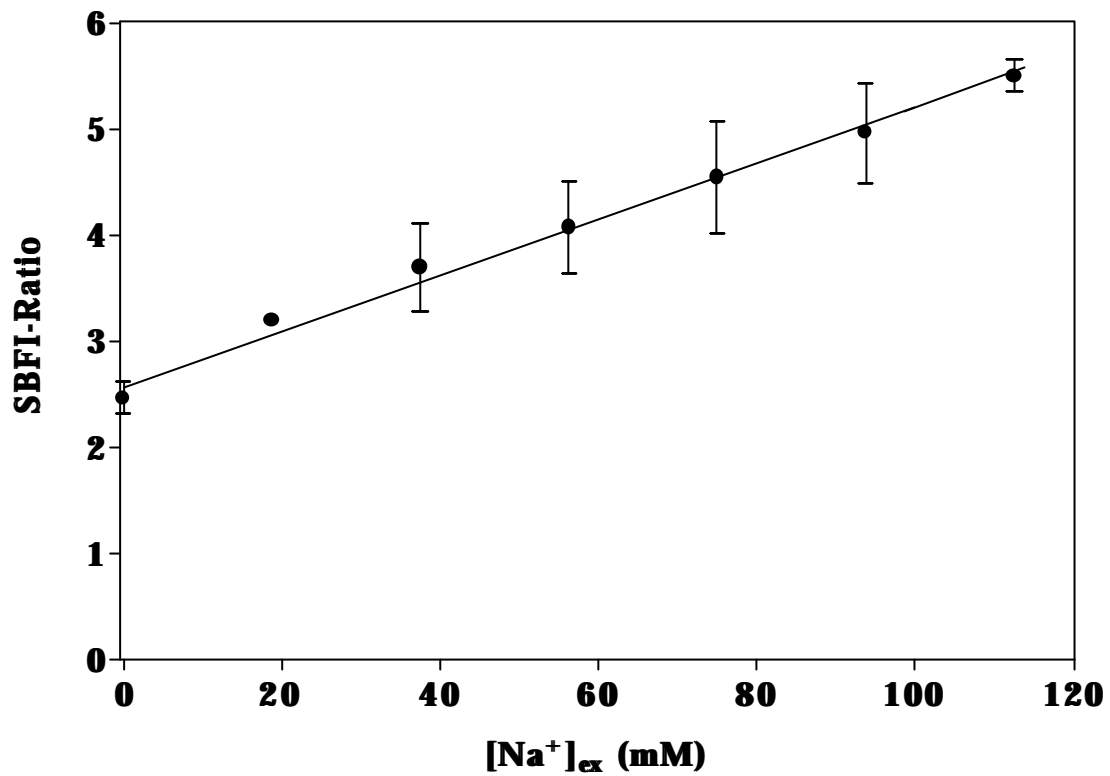


Abbildung 2.11: Darstellung der Regressionsgeraden zur Extrapolation der intrazellulären Natriumkonzentration bei der Messung mit SBFI. Besonders wichtig ist hierbei die Ermittlung der Ratio in natriumfreiem Medium. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus sechs gleichartigen Experimenten

2.5 Radiorezeptormessungen

Prinzipielle Grundlagen

Grundlage des Radiorezeptorassays (RRA) ist die Eigenschaft jeder biologische aktiven Substanz in reversiblen und in begrenztem Ausmaß an eine bestimmte Struktur zu binden. Mit dieser Technik lassen sich sowohl grundlegende Eigenschaften einer Bindungsstelle als auch eines Liganden charakterisieren. RRA werden verwendet, um die Bindung eines radioaktiv markierten Liganden an einer spezifischen Bindungsstelle bzw. an einem Rezeptor zu untersuchen.

Wichtige Voraussetzungen für die Durchführung eines RRA ist zum einen die Reversibilität der Ligand-Rezeptor-Bindung sowie die Sättigbarkeit des Rezeptors und zum anderen die lineare Dosisabhängigkeit der Ligandenbindung am Rezeptor. Desweiteren sollte der Radioligand eine hohe Affinität zum Rezeptor besitzen (Stoll & Müller, 1991).

Der radioaktiv markierte Ligand wird mit dem entsprechend aufbereiteten Homogenat des Untersuchungsgewebes bei bestimmten Temperaturen solange inkubiert, bis sich ein Bindungsgleichgewicht zwischen Ligand und Rezeptor eingestellt hat, welches dem Massenwirkungsgesetz folgt. Anschließend wird der freie (nicht gebundene) Radioligand von dem an Gewebestrukturen gebundenen Radioligand-Anteil getrennt, indem die Inkubationslösung filtriert oder zentrifugiert wird. Bei der hier verwendeten RRA-Methode handelt es sich um einen Filtrationsassay, d. h. das radioaktiv markierte Gewebe mit den zu untersuchenden Strukturen bzw. Rezeptoren bleibt auf dem Glasfaserfilter zurück. Hierbei wird das Bindungsgleichgewicht nicht gestört.

Der radioaktiv markierte Anteil auf den Filtern kann daraufhin mittels Szintillations-Spektrometrie quantifiziert werden. Im Falle der hier verwendeten tritiierten Liganden (^3H -) kann deren β -Strahlung gemessen und in Konzentrationen umgerechnet werden.

Bei diesen Untersuchungen ist es immer erforderlich, parallel einen Ansatz mit einem Überschuss an "kaltem" unmarkiertem Liganden zu messen. Dies ist nötig, da ein bestimmter Prozentsatz des Radioliganden auch unspezifisch an andere Gewebestrukturen, Behältnisse und Filter gebunden werden kann. Daher spiegelt die gemessene Radioaktivität nicht ausschließlich den am gewünschten Rezeptor gebundenen Ligandenanteil wider. Das Verhältnis zwischen unspezifischer und spezifischer Bindung wird mit höheren Konzentrationen des Radioliganden zunehmend ungünstiger, so daß dessen Konzentration möglichst gering gehalten werden sollte. Bedingt durch die begrenzte Rezeptoranzahl im Gewebehomogenat ist eine Sättigung der spezifischen Bindungsstellen trotz hoher Affinität des Radioliganden schon bei relativ geringen Ligandkonzentrationen erreicht. Dagegen steigt

die unspezifische Bindung linear mit der Konzentration des verwendeten Radioliganden an und ist nicht sättigbar, da die Anzahl der Bindungsstellen wesentlich höher ist.

Folglich wird ein zugesetzter Radioligand zunächst die hochaffinen Rezeptoren bis zum Erreichen der Sättigung besetzen und erst anschließend in verstärktem Maße unspezifisch binden. Durch Zusatz von "kaltem" Liganden, dem sogenannten "Blank" im Überschuß wird zunächst der Radioligand vollständig von den hochaffinen Rezeptoren verdrängt. Der nun noch zu messende Strahlungsanteil repräsentiert die unspezifische Bindung.

Die bei der Detektion ermittelte Ligandenbindung stellt somit die Gesamtbindung dar, die sich aus gewünschter spezifischer und unerwünschter unspezifischer Bindung zusammensetzt. Um die spezifische Bindung zu erhalten ist es also erforderlich, die zusätzlich ermittelte unspezifische Bindung von der Gesamtbindung zu subtrahieren.

$$\text{Spezifische Bindung} = \text{Gesamtbindung} - \text{Unspezifische Bindung (Blank)}$$

Alternativ ist es bei den Messungen zur Serotoninaufnahme auch möglich, die unspezifische Bindung durch Aufbewahren einiger Probenansätze bei 4°C zu bestimmen, da theoretisch nur bei einer physiologischen Temperatur von 37°C eine Neurotransmitteraufnahme in die Zelle stattfindet.

Radioaktive Messung

Scintillation Counter registrieren die radioaktiven Zerfallsereignisse eines Radioliganden innerhalb einer Minute (CPM = counts per minute). Zur Verstärkung dieses Signals in eine Szintillationsflüssigkeit erforderlich, deren konjugierte Doppelbindungen durch z.B. Tritiumzerfall in ein höheres Energieniveau angehoben werden. Diese Energie wird anschließend wieder in Form von Lichtblitzen abgegeben und durch den Counter registriert. Die Messung erfolgt grundsätzlich gegen einen externen ³H-Standard unter Angabe des Standardkanalverhältnisses. Die durch einen ³H-Toluol-Standard ermittelte Zählausbeute des Gerätes von 60% war über den gesamten Versuchszeitraum konstant. Unter Berücksichtigung dieser Zählausbeute läßt sich aus den CPM die eigentlich in der Probe vorhandene Radioaktivität rechnerisch ermitteln:

$$\text{CPM} \times 1,667 = \text{DPM (decays per minute)}$$

DPM lassen sich in die Einheiten Ci und Bq:

$$1 \mu\text{Ci} = 2,2 \times 10^6 \text{ DPM}$$

$$1 \mu\text{Ci} \times 0,037 = 1 \text{ MBq}$$

Im Beckman Counter folgt daraus:

$$1 \mu\text{Ci} = 2,2 / 1,667 \times 10^6 \text{ DPM}$$

$$1 \mu\text{Ci} = 1,337 \times 10^6 \text{ DPM}$$

Üblicherweise wird die spezifische Aktivität der Radioliganden in der Einheit Ci/mmol angegeben, was der Einheit $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$ entspricht. Eine Umrechnung in die erforderliche Konzentration im jeweiligen RRA ist mittels Dreisatz möglich und soll hier beispielhaft an der Berechnung der einzustellenden CPM = Aktivität für die Messungen mit ^3H -Serotonin gezeigt werden.

Da eine Konzentration von 2,94 nM ^3H -Serotonin im Assay eingesetzt werden soll, gilt:

$$30 \mu\text{Ci}/\text{nmol} \quad \text{P} \quad 88,2 \mu\text{Ci}/2,94 \text{ nmol}$$

Auf Liter bzw. ml bezogen gilt:

$$88,2 \mu\text{Ci}/1000 \text{ ml} = 0,0882 \mu\text{Ci}/\text{ml}$$

Durch Umrechnung in CPM erhält man:

$$0,0882 \mu\text{Ci} \times 2,2 \times 10^6 \text{ DPM} / 1,667 = 116424 \text{ CPM}/\text{ml}$$

Der Gesamtansatz beträgt jedoch nur 500 μl , so daß sich der für einen Ansatz von 1 ml berechnete Wert halbiert. Somit müssen 58212 CPM eingestellt werden, um eine ^3H -Serotoninkonzentration von 2,94 nmol zu erreichen. Üblicherweise wird eine "Stammlösung" mit den errechneten CPM des Radioliganden hergestellt, von der dann 50 - 100 μl im Assay eingesetzt werden. Diese wird im Falle des Serotonin-Bindungsassays in Pufferlösung angesetzt, da der Radioligand durch den Ascorbinsäure- und Pargylinzusatz stabiler bleibt.

Auf dem selben Rechenweg erhält man für die Bestimmung der Paroxetin-Bindung einen CPM-Wert von 4573 CPM/ml. Dieser Wert entspricht einem Gesamtansatz von 1 ml, bei einer benötigten Radioligandkonzentration von 0,2 nmol und einer spezifischen Aktivität von 17,10 Ci/mmol.

Anmerkung:

Tritium an sich hat eine relativ lange radioaktive Zerfallszeit. Trotzdem ist zu beachten, daß mit zunehmendem Alter des Radioliganden eine Korrektur der spezifischen Aktivität vorgenommen werden muß. Desweiteren ist die spezifische Aktivität des jeweiligen Radioliganden bei jeder neuen Lieferung zu überprüfen, da diese stark variieren kann und eventuelle Nachberechnungen erforderlich machen kann.

Allgemeiner Versuchsaufbau

Die Gewebehomogenate bzw. Plättchensuspensionen werden zusammen mit Radioligand, Blank bzw. Puffer und Verdrängersubstanzen in verschiedenen Konzentrationen in eine 96-deepwell Mikrotiterplatte (Dunn, Asbach/Deutschland) pipettiert und für einen bestimmten Zeitraum bei der gewünschten Temperatur inkubiert.

Währenddessen wird der Brandel 24-sample Cell-Harvester (Brandel, Gaithersburg/MD, USA) für die Filtration vorbereitet. Das System wird mit der eiskalten Spülpufferlösung beschickt, gespült und die Whatman GF/B bzw. GF/C Glasfaserfilterbögen (Whatman, Maidstone, UK) aufgelegt. Anschließend wird ein schwaches Vakuum von 300-500 mmHg angelegt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die sogenannte "Probe" mit der Ansaugvorrichtung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingeführt und die Inkubationslösung per Knopfdruck abgesaugt. Das radioaktiv markierte Gewebe wird dabei auf den Filtern zurückgehalten und noch mehrmals jeweils eine Sekunde mit eiskalter Pufferlösung gespült.

Nach dem Absaugen werden die Filter mit Hilfe einer Pinzette abgenommen, in Minivials (Zinsser Minis 200 Typ 01; Zinsser, Eschborn, Deutschland) überführt und 30 Minuten im Trockenschrank bei 60°C getrocknet. Nach der Trocknung werden die Minivials mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Zinsser Aquasafe 300[®] oder Lumasafe Plus[®], Packard, Dreieich, Deutschland) gefüllt und etwa eine Stunde geschüttelt. Abschließend wird der eluierte radioaktive Anteil im LS 6500-Scintillation Counter (Beckman) vermessen.

2.5.1 Synaptosomale Aufnahme von ³H-Serotonin

Pufferlösungen

Krebs-HEPES-Puffer

Natriumchlorid	150,0 mM
Kaliumchlorid	6,2 mM
Natriumdihydrogenphosphat	1,2 mM
HEPES	10,0 mM
Glucose	10,0 mM
Ascorbinsäure	0,1%
Pargylin	10 µM

Der pH-Wert der Pufferlösung wird mit Natronlauge und Salzsäure bei 37°C auf 7,5 eingestellt.

Da Serotonin ein in Lösung relativ instabiles Molekül darstellt, muß mit gewissen "Vorsichtsmaßnahmen" gearbeitet werden. Zum einen wird als Oxidationsschutz Ascorbinsäure zugegeben, zum anderen ist der MAO-Hemmer Pargylin im Puffer vorhanden, um den Abbau des Neurotransmitters durch eventuell im Gewebe vorhandene MAO zu verhindern.

Präparation von Synaptosomen

Zur Messung der synaptosomalen Aufnahme von ^3H -Serotonin wurde das Frontalhirn junger NMRI Mäuse nach zervikaler Dislokation entnommen und sofort nach dem Wiegen in 15 ml eiskalte 0,32 M Sucrose-Lösung überführt. Mit dem Potter Elvehjem-Homogenisator (Braun, Melsungen, BRD) wurde unter Verwendung eines Teflonpistills bei 300 U/min eine Homogenisierung vorgenommen. Die entstandene Suspension wurde nach Überführung in ein Zentrifugenröhrchen und Auffüllen auf ein Gesamtvolumen von 25 ml Sucrose-Gewebesuspension bei 2500 U/min (7500 x g) für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge). Der Überstand wurde nach der Zentrifugation vorsichtig in ein anderes Zentrifugenröhrchen dekantiert und nochmals bei 12000 U/min für 15 min (4°C) zentrifugiert. Das resultierende Pellet wird mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig vom Boden des Zentrifugenröhrchens gelöst und mit Hilfe des Teflonpistills manuell in ca. 11 ml Krebs-HEPES-Puffer resuspendiert. Diese Gewebesuspension wird bis zur Verwendung im Assay auf Eis aufbewahrt. Es ergibt sich eine Gewebekonzentration von 30 mg/ml Feuchtgewicht bezogen auf die Einwaage. Hierbei ist schnelles Arbeiten erforderlich, da die Synaptosomenpräparation nicht allzu lange aufbewahrt werden kann.

Durch die anfängliche Homogenisierung in 0,32 M Sucrose-Lösung werden abgetrennte Nervenendigungen gebildet, sogenannte Synaptosomen, die sich in hyperosmolarem Medium wieder zu kleinen Vesikeln zusammenlagern. Die Abtrennung der unerwünschten größeren Hirnbestandteile erfolgt durch die Zentrifugation bei geringen Umdrehungen, da diese Strukturen sich im Pellet sammeln und der Überstand mit den Synaptosomen weiterverarbeitet werden kann.

Versuchsdurchführung

Zunächst werden 300 µl eiskalter Puffer in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend 100 µl-Aliquote des Synaptosomenhomogenates pipettiert, gefolgt von jeweils 50 µl der Verdrängersubstanzen in verschiedenen Konzentrationen. Als Blank wurden 50 µl Serotonin in einer Endkonzentration von 1 mM benutzt. Um überall ein gleiches Probenvolumen zu erhalten, wurde in die entsprechenden Vertiefungen zur Ermittlung der Gesamtbindung 50 µl Puffer zugegeben. Der Gesamtansatz ist somit 500 µl.

Die gesamte Mikrotiterplatte wird, wenn nichts anderes angegeben, zur Inkubation für 15 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad erwärmt. Nach dieser Vorinkubationszeit wird der gesamte Probenansatz für 5 min auf Eis gestellt. Schließlich erfolgte das Starten der Serotoninaufnahme durch Zugabe von 2,94 nM ³H-Serotonin-Kreatininsulfat und abermaliges Erwärmen der Mikrotiterplatte im Wasserbad. Nach 4 min wird die Aufnahme durch Überführen der Platte in Eiswasser gestoppt und nach weiteren 5 min die Inkubationslösung durch den Harvester filtriert, der mit Whatman GF/B Filtern bestückt wurde. Die Filter und die Mikrotiterplatte werden anschließend 3 x 1 sec mit eiskaltem Krebs-HEPES-Puffer gespült, die Filter abgenommen, getrocknet und nach ca. zwölf Stunden vermessen. Nach der Proteinbestimmung ergab sich eine Proteinkonzentration von 368,76 µg/ml Protein in der Gewebesuspension, somit liegen im Versuchsansatz 73,75 µg/ml Protein vor.

Michaelis-Menten-Kinetik-Untersuchungen

Prinzipiell erfolgt die Durchführung der Kinetikuntersuchungen analog den Serotonin-Aufnahmemessungen an Synaptosomen. Die Versuchsbedingungen sind nur in bezug auf die Konzentration des eingesetzten Radioliganden ³H-Serotonin unterschiedlich, da dieser ähnlich wie in Sättigungsexperimenten in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wird.

Das Michaelis-Menten-Modell erklärt die kinetischen Eigenschaften einiger Enzyme bei der Verbindung mit deren Substrat zu einem Enzym-Substrat-Komplex. Letztendlich entsteht ein Produkt P oder es erfolgt die Dissoziation in Enzym und Substrat. Die Geschwindigkeit V der Produktbildung ergibt sich aus der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$Y = V_{\max} \times X / (K_M + X)$$

V_{max} ist hierbei die Geschwindigkeit bei völliger Substratsättigung des Enzyms und K_M die Michaelis-Menten-Konstante, bei der Substratkonzentration S bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist.

Dieses Modell läßt sich auch auf Radiorezeptorstudien anwenden, wenn man den Transmitter Serotonin als Substrat und den Serotonintransporter als Enzym ansieht. Zur Linearisierung und Auswertung der kinetischen Messungen verwendet man unter anderem die Darstellung nach Lineweaver-Burk (siehe Gleichung).

$$1/V = 1/V_{\max} + K_D/V_{\max} \times 1/S$$

Der Schnittpunkt mit der Y-Achse stellt den reziproken Wert 1/V_{max} von V_{max} dar, während die Steigung K_D / V_{max} ausdrückt.

Die Werte wurden in Prism GraphPad, (Version 2.0) mit dem Template "Enzymkinetics" mittels nicht-linearer Regression berechnet und mit Hilfe eines gepaarten student t-test statistisch bewertet.

2.5.2 Aufnahme von ^3H -Serotonin in Thrombozyten

Pufferlösungen

Krebs-Henseleit-Puffer:

Natriumchlorid	118,0 mM
Kaliumchlorid	4,6 mM
Magnesiumsulfat	1,2 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1,2 mM
Glucose	10,0 mM
Ascorbinsäure	0,1%

Präparation der Thrombozytensuspension

Das Gesamtblut wird aus der Armvene von gesunden Probanden unter Verwendung eines Butterflys (G 20) direkt in 10 ml-Monovetten, die mit 1 ml Citrat-Lösung gefüllt waren, aufgenommen. Dieses Gesamtblut wurde bei $359 \times g$ für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Beckman GS-15 Centrifuge), danach die oberen $\frac{2}{3}$ des überstehenden plättchenreichen Plasmas (PRP) mit einer Pasteurpipette abgenommen und in 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Das mit PRP gefüllte Falcon-Röhrchen wurde nun 20 Minuten lang bei $1000 \times g$ zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das plättchenarme Plasma verworfen, das Thrombozytenpellet in Krebs-Henseleit-Inkubationspuffer resuspendiert und mit dem Inkubationspuffer auf eine Plättchenanzahl von $1-2 \times 10^7$ Thrombozyten/ml eingestellt. Aliquote (400 μl) dieser Suspension wurden dann für die Aufnahmemessung von ^3H -Serotonin verwendet. Messungen der Proteinkonzentration ergaben eine zur Synaptosomenpräparation identische Proteinkonzentration von ca. 370 $\mu\text{g/ml}$ Protein in der Thrombozytensuspension. Da hiervon jedoch 400 μl im Assayansatz verwendet wurden, betrug die Endkonzentration bei der Radioaktivmessungen ca. 300 $\mu\text{g/ml}$ Protein.

Mehrere Publikationen verwenden das PRP für die Bestimmung der Serotonin-Aufnahme. Versuche hierzu zeigten, daß unter diesen Bedingungen die spezifische sowie die unspezifische Bindung um ein Vielfaches höher liegen, als bei der Verwendung der Puffer-Plättchen-Suspension. Um ein unnötiges Binden von zugesetztem Serotonin an die noch im PRP vorhandenen Serumproteine zu verhindern, wird das PRP von den Plättchen getrennt, so daß man eine "saubere" Thrombozytensuspension erhält.

Versuchsdurchführung

In einem Gesamtansatz von 500 µl wurde die Thrombozytensuspension mit 50 µl verschiedener Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen bzw. Blank (1 mM Serotonin) in einer Mikrotiterplatte versetzt und, wenn nichts anderes angegeben, im Schüttelwasserbad bei 37°C für 15 Minuten vorinkubiert. Danach wurde für fünf Minuten bei 4°C im Eiswasser gekühlt. Die Zugabe von 50 µl des Radioliganden ³H-Serotonin in einer Konzentration von 2,94 nM erfolgte direkt danach und es wurde nochmals für zwei Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Die ³H-Serotoninaufnahme wurde durch erneutes Kühlen des Versuchsansatzes bei 4°C im Eiswasserbad gestoppt. Abschließend wurde die Suspension mit Hilfe des 24-Zellharvesters (Brandel, Gaithersburg/MD, USA) abgesaugt, die Thrombozyten auf Whatman GF/C-Filtern aufgefangen und 4 x 1 Sekunde mit eiskaltem Inkubationspuffer gespült. Die Filter werden vorsichtig mit zwei Pinzetten abgenommen, in Szintillationsvials überführt und für 30 min bei 60°C in Umlufttrockenschrank getrocknet. Die trockenen Filter werden mit vier Milliliter Szintillator versetzt und ca. zwölf Stunden stengelassen, um die Radioaktivität nahezu vollständig zu extrahieren. Die in die Thrombozyten aufgenommene Menge an ³H-Serotonin wird mittels Messung der Radioaktivität in den Filtern durch einen Beckman Counter ermittelt.

Versuchsbedingungen	Synaptosomen	Thrombozyten
Temperatur	37°C	37°C
Blank	1mM Serotonin	1 mM Serotonin
Radioligand	2,94 nM ³ H-Serotonin	2,94 nM ³ H-Serotonin
Vorinkubationszeit	15 min	15 min
Inkubation mit Radioligand	4 min	2 min
Versuchsansatz	500 µl	500 µl
Filtration durch	GF/B-Filter	GF/C-Filter
Spülmenge	3 x 1 sec	4 x 1 sec
Inkubations-/Spülpuffer	Krebs-HEPES-Puffer	Krebs-Henseleit-Puffer

Tabelle 2.3: Gegenüberstellung der Versuchsbedingungen bei Messung der Serotoninaufnahme in Synaptosomen und Thrombozyten.

2.5.3 ³H-Paroxetin-Bindung

Der Assay wurde nach einer Arbeitsmethode von Hashimoto & Goromaru (1990a+b) und Habert et al. (1985) modifiziert und durchgeführt.

Pufferlösungen

TRIS-Puffer:

Natriumchlorid	120 mM
Kaliumchlorid	5 mM
TRIS	50 mM

Eingestellter pH-Wert, unter Verwendung von Natronlauge und Salzsäure: 7,5 bei 37°C.

Herstellung der Hirnmembranen

Zur Bestimmung der Bindung von ³H-Paroxetin an den Serotonin-Transporter wurde das Frontalhirn von NMRI Mäusen verwendet. Da dieser Versuchsaufbau bisher nur an Ratten durchgeführt wurde, mußten verschiedene Voruntersuchungen und Validierungen vorgenommen werden. Das Gehirn wurde sofort nach Tötung durch zervikale Dislokation entnommen, in 15 ml eiskalten TRIS-Puffer überführt und bei 1200 U/min bei 4°C mit einem Potter Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Nach Verdünnung des Homogenats mit weiteren 25 ml eiskaltem TRIS-Puffer und Überführen in ein Zentrifugenröhrchen wurde zehn Minuten bei 17000 U/min und 4°C zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge). Anschließend wurde das Pellet nach Verwerfen des Überstandes nochmals in 40 ml TRIS-Puffer aufgenommen, mittels Ultra-Turrax homogenisiert und das Homogenat wiederum bei 4°C und 17000 U/min zehn Minuten lang zentrifugiert. Das hieraus resultierende Pellet wurde mit TRIS-Puffer auf eine Gewebekonzentration von 15 mg Feuchtgewicht/ml, bezogen auf die Einwaage, eingestellt. Diese Gewebesuspension wurde solange auf Eis aufbewahrt, bis Aliquote von 150 µl im Assay eingesetzt wurden.

Versuchsdurchführung

Jeweils 150 µl der Gewebesuspension wurden zusammen mit 650 µl TRIS-Puffer, 100 µl Radioligand (³H-Paroxetin; 0,2 nM) und entweder 100 µl der Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen oder 100 µl Blank (10 µM Fluoxetin Endkonzentration) in einer Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit

wurde der Versuchsansatzes mit dem 24-Zellharvester durch Whatman GF/C-Filter filtriert, die zuvor eine Stunde lang in 0,025%igen Brij 35 eingelegt waren. Die Filter wurden 6 x 1 Sekunde mit eiskaltem TRIS-Puffer gewaschen, in Szintillationsvials überführt und 30 Minuten bei 60°C im Umlufttrockenschrank getrocknet. Danach wurden 4 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und die in den Filtern vorhandene Radioaktivität ermittelt.

Anmerkung: Das Verhältnis zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung ist bei Maushirnmembranen bedingt durch die andere Tierspezies wesentlich schlechter als bei der Verwendung von Rattenmembranen. Es ist daher unerlässlich, die Filter mit Brij 35 zu behandeln, da die unspezifische Bindung hierdurch deutlich reduziert werden kann.

Optimierung der Versuchsbedingungen

Da so gut wie keine Literaturstellen zur Bestimmung der Paroxetin-Bindung an Mäusen vorlagen, war es notwendig, die Versuchsbedingungen neu zu validieren. Es stellte sich heraus, daß so gut wie alle an Ratten gefundenen Parameter auf die Versuchsdurchführung an Mäusehirnen übertragbar waren.

Sättigung

Durch die Durchführung von Sättigungsuntersuchungen können verschiedene Parameter ermittelt werden, die unter anderem einen Vergleich zwischen unterschiedlichen Spezies zulassen und den RRA in einem bestimmten System näher charakterisieren. Es lassen sich die maximal im Gewebe vorhandenen Rezeptorbindungsstellen (B_{max}) und die Affinität des verwendeten Radioliganden zum Rezeptor K_d (Dissoziationskonstante) bestimmen. K_d ist definitionsgemäß die Konzentration an Radioligand, bei der die Hälfte der Rezeptorbindungsstellen besetzt sind.

Bei diesen Experimenten werden Aliquote eines Gewebehomogenats mit steigenden Konzentrationen an Radioligand versetzt. Gerade bei diesen Versuchen ist die Verwendung des Blanks sehr wichtig.

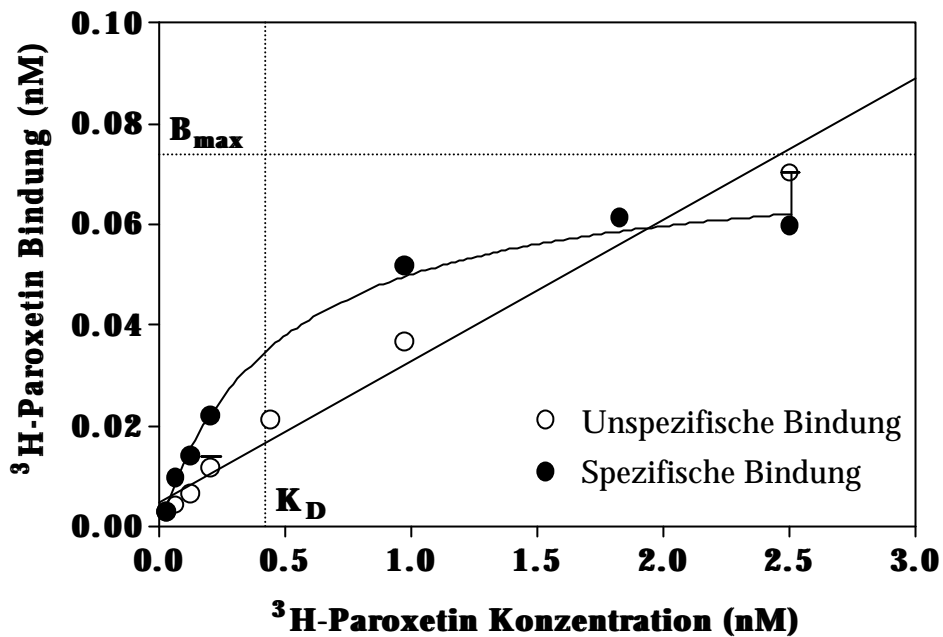


Abbildung 2.12: Ermittlung von B_{\max} und K_D im Sättigungsexperiment. Abgebildet ist die Abhängigkeit von spezifischer und unspezifischer Bindung von der Konzentration des eingesetzten Radioliganden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus sechs unabhängigen Experimenten.

Die Sättigungsuntersuchungen an der Paroxetin-Bindungsstelle von Maushirnmembranen ergaben einen K_D -Wert von $0,42 \pm 0,03$ nM und einen B_{\max} von $0,103 \pm 0,051$ nmol/l. Die hier ermittelten B_{\max} -Werte müssen anschließend noch auf die eingesetzte Menge Protein bezogen werden. Durch die Proteinbestimmung nach Lowry ergibt sich letztendlich die tatsächlich im Gewebe vorhandene Anzahl an Rezeptoren, die in der Einheit fmol/mg Protein angegeben wird. Daher ergab sich ein B_{\max} -Wert von $17,74 \pm 6,96$ fmol/mg Protein.

Die Ermittlung der Sättigungsparameter erfolgten rechnerisch durch die GraphPad® Prism Software durch Verwendung der nicht-linearen Regression unter Annahme einer einzigen Bindungsstelle.

Proteinabhängigkeit

Um die spezifische Bindung möglichst hoch und die unspezifische Bindung so klein wie möglich zu halten, ist es nötig, die optimale Proteinkonzentration zu ermitteln. Bei zu hohen Proteinkonzentrationen wird auch bei gleichbleibender Radioligandkonzentration eine Plateauphase erreicht; die Gewebekonzentration im RRA sollte jedoch im linearen Abhängigkeitsbereich liegen. Zur Durchführung dieses Versuches wird die zuvor optimierte Konzentration an Radioligand unter ansonsten gleichbleibenden Versuchsbedingungen mit steigenden Konzentrationen an Protein versetzt.

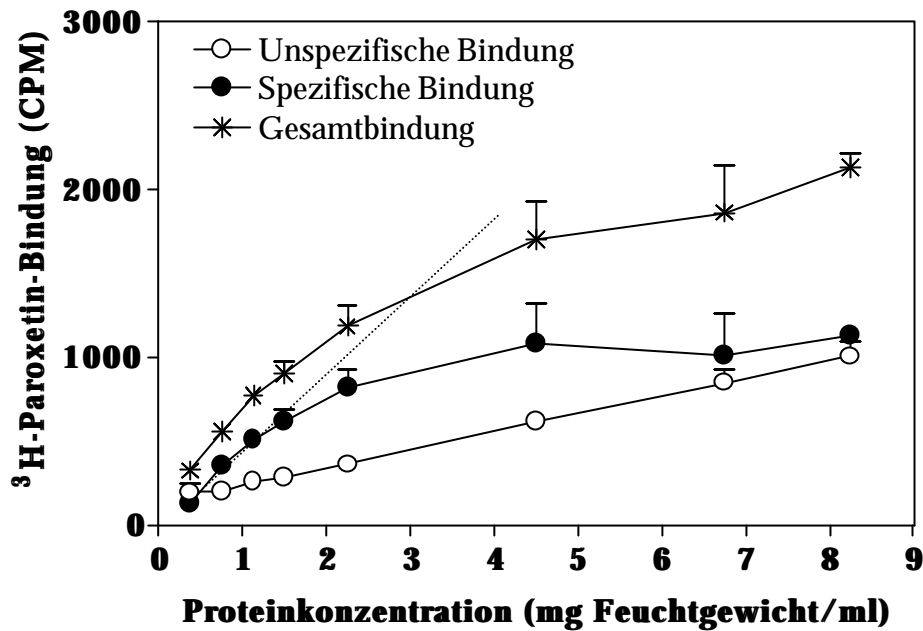


Abbildung 2.13: Proteinabhängigkeit der spezifischen und unspezifischen Bindung sowie der Gesamtbindung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von sechs unabhängigen Experimenten.

Durch die Bestimmung der Proteinabhängigkeit ergab sich eine optimale Proteinkonzentration von 1,5 mg/ml Feuchtgewicht für die weiteren Experimente. Bezogen auf die Einwaage entspricht dies einer Gewebekonzentration von ca. 15 mg/ml. Die nach Lowry ermittelte Proteinkonzentration in der Membransuspension betrug 0,805 mg/ml Protein. Dies entspricht einer Proteinkonzentration von 0,120 mg/ml Protein im Assayvolumen von 1000 μ l.

Inkubationstemperatur und -zeit

Mehrmaliger Durchführung des Paroxetin-Bindungsassays bei verschiedenen in der Literatur angegebenen Temperaturen führte zu keiner wesentlichen Änderung der Bindungsparameter oder der spezifischen Bindung, so daß schließlich eine Inkubation bei Raumtemperatur in das Versuchsprotokoll aufgenommen wurde.

Da sämtliche Literaturstellen nach einer Inkubationsdauer von 60 Minuten ein Einstellen des Gleichgewichtszustandes, charakterisiert durch das Erreichen der Plateauphase der spezifischen Bindung, festgestellt hatten, wurde auf eine detaillierte Bestimmung der Zeitabhängigkeit verzichtet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Johanniskrautextrakt und Hyperforin hemmen die synaptosomale Aufnahme von ^3H -Serotonin

Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war die initiale Beobachtung, daß der Hypericum-Extrakt LI 160 die Aufnahme von ^3H -Serotonin in Synaptosomen hemmt. Diese Hemmung ist konzentrationsabhängig und die Hemmkurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf, der auch bei der Inhibition der Serotoninaufnahme durch klassische Antidepressiva wie dem SSRI Citalopram gefunden wird (Humphreys, 1994 + 1998; Graham et al., 1989) (Abbildung 3.1).

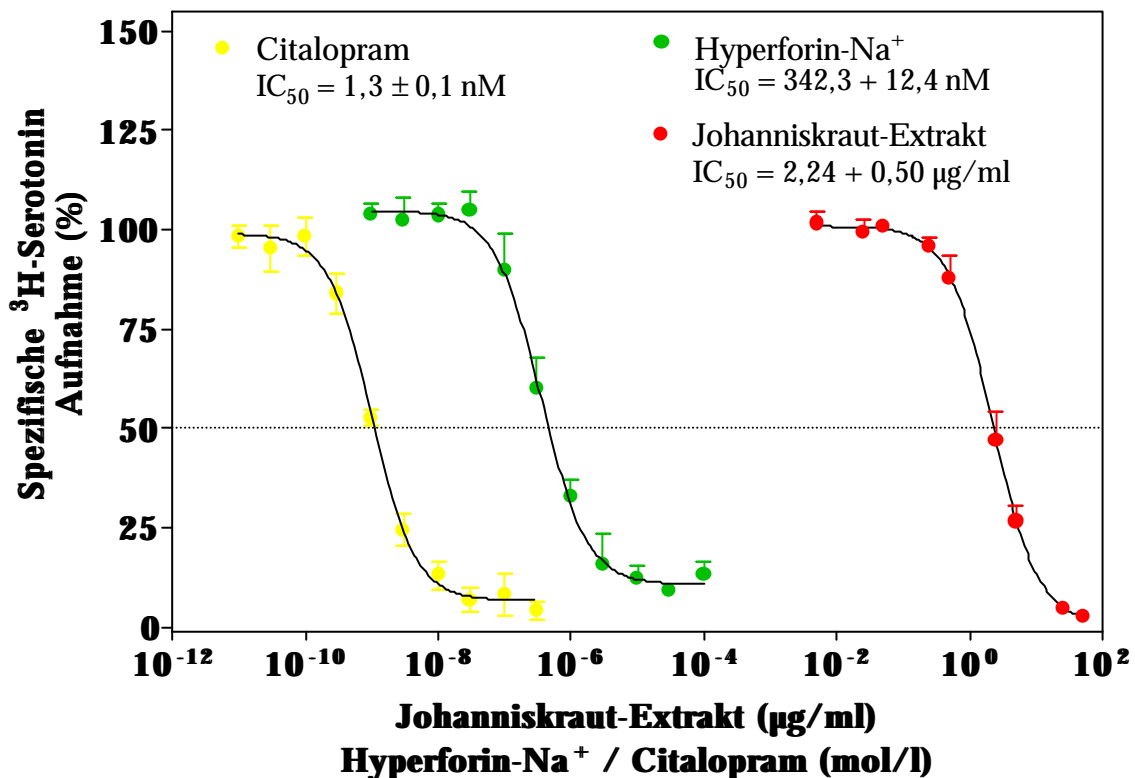


Abbildung 3.1: Konzentrationsabhängige Hemmung der ^3H -Serotoninaufnahme in Synaptosomen durch den Johanniskrautextrakt LI 160, die Reinsubstanz Hyperforin und den SSRI Citalopram. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus sechs unabhängigen Experimenten.

Desweiteren war festzustellen, daß das Phloroglucinol-Derivat Hyperforin hauptsächlich für die Serotoninaufnahme-Hemmung des LI 160-Extraktes verantwortlich ist (Abbildung 3.1). Allerdings konnte die serotoninaufnahmehemmende Wirkung des LI 160-Extraktes nicht ausschließlich durch den Hyperforingehalt des Extraktes erklärt werden. Daher muß davon ausgegangen werden, daß noch zumindest ein weiterer Inhaltsstoff zur Hemmung der

Serotoninaufnahme des Extraktes beiträgt. Potentielle Kandidaten hierfür wären ein weiteres Phloroglucinol-Derivat, das Adhyperforin, welches mit einem IC_{50} -Wert von $317,02 \pm 95,93$ nM einen ähnlich potenten inhibitorischen Effekt auf die synaptosomale Serotoninaufnahme wie Hyperforin ($IC_{50} = 342,30 \pm 12,4$ nM) zeigt und die oligomeren Procyanidine, die mit einem IC_{50} -Wert von $34,94 \pm 5,5$ $\mu\text{g/ml}$ die Serotoninaufnahme hemmen (Tabelle 3.1).

Eine zusätzliche Untersuchung aller weiteren relevanten Hypericum-Inhaltsstoffe aus verschiedenen Stoffgruppen zeigte, daß keine weitere Einzelsubstanz außer einem weiteren HyperforinSalz, der OPC-Fraktion und einem ethanolischen Gesamtextrakt, der mit 5% Hyperforin angereichert war, in der Lage ist, die synaptosomale Aufnahme von ^3H -Serotonin derart potent zu hemmen. Tabelle zeigt die erhaltenen Daten im Überblick. Analoge Befunde wurden auch an den neuronalen Aufnahmesystemen für L-Glutamat und Dopamin festgestellt (Wonnemann et al., 2001).

Substanzklasse	Reinsubstanz	IC_{50} an der ^3H -Serotoninaufnahme
Naphthodianthrone	Hypericin/Pseudohypericin	> 10 μM
	Hypericin	> 100 μM
Flavonoide	Hyperosid	> 100 μM
	Quercetin	> 100 μM
	Quercitrin	> 100 μM
	Isoquercitrin	> 100 μM
	Rutin	> 100 μM
	Myricetin	> 10 μM
Biflavonoide	Amentoflavon	> 100 μM
	Biapigenin	> 100 μM
Phloroglucinole	HyperforinDCHA	0,456 μM
	Adhyperforin	0,317 μM
Gesamtextrakt	Hypericum-Ethanol-Extrakt (+ 5% Hyperforin)	2,59 $\mu\text{g/ml}$
Oligomere Procyanidine	OPC's	34,94 \pm 5,5 $\mu\text{g/ml}$

Tabelle 3.1: Hemmende Effekte verschiedener Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* auf die ^3H -Serotoninaufnahme in Synaptosomen. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD aus 4-6 unabhängigen Einzelerperimenten.

Eine weitere Substanz, die an der Serotoninaufnahme untersucht wurde, ist das Na^+/H^+ -Ionophor Monensin. Diese Experimente wurden durchgeführt, da in der Literatur beschrieben

wurde, daß Substanzen, welche die intrazelluläre Konzentration verschiedener Ionen beeinflussen, ebenfalls zu einer Inhibition der Serotoninaufnahme führen können (Izenwasser et al. 1992, Reith & O'Reilly, 1990). Monensin erhöht durch unspezifischen Transport von Natriumionen und Protonen durch die Zellmembran die intrazelluläre Natriumkonzentration in verschiedenen Zelltypen (siehe Kapitel 2. Material und Methoden). In nachfolgenden Untersuchungen konnten Parallelen zwischen dem Mechanismus von Monensin und Hyperforin beobachtet werden, so daß es von Interesse war, den Effekt von Monensin auf die Serotoninaufnahme zu ermitteln. Monensin inhibiert mit hoher Affinität die Aufnahme von ^3H -Serotonin in Synaptosomen in ähnlicher Art und Weise wie Hyperforin oder Citalopram (Abbildung 3.2).

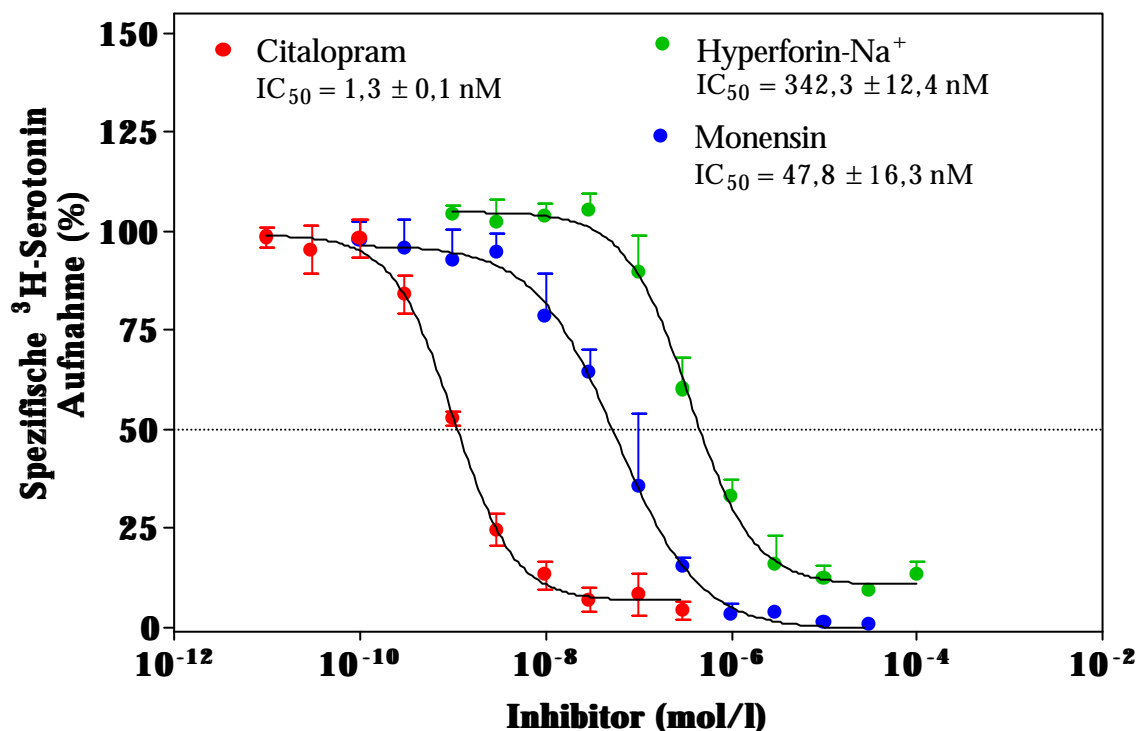


Abbildung 3.2: Hemmung der Serotoninaufnahme durch das Ionophor Monensin im Vergleich zu Hyperforin und Citalopram. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus sechs unabhängigen Experimenten.

3.2 Johanniskrautextrakt und Hyperforin beeinflussen die ³H-Paroxetinbindung nicht

Aus früheren Experimenten war bekannt, daß sowohl Hyperforin als auch Johanniskrautextrakte neben der Hemmung der Serotoninaufnahme auch die Noradrenalin-, Dopamin-, GABA- und L-Glutamat-Aufnahme in Synaptosomen mit ähnlich potenten IC₅₀-Werten inhibieren. Da diese unspezifische Hemmung aller fünf Transporter von keinem bisher bekannten Antidepressivum gezeigt wurde, wurden weitere vergleichende Untersuchungen durchgeführt, um den Mechanismus, durch den sowohl der LI 160-Extrakt als auch Hyperforin eine Hemmung der Serotoninaufnahme bewirken, näher zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurde durch die Ermittlung der Paroxetinbindung überprüft, ob beide Substanzen direkt mit dem Serotonintransporter-Molekül interagieren. Die ³H-Paroxetinbindung kann als ein selektiver Marker für die Serotoninbindungsstelle am Transporter verwendet werden, da Paroxetin nicht wie z.B. Imipramin an zwei verschiedene Bindungsstellen binden kann (Habert et al., 1985; Gleiter & Nutt, 1988; Hrdina et al., 1990). Wenn eine Substanz demnach eine potente Hemmung der Paroxetinbindung zeigt, ist das ein Hinweis auf eine direkte Interaktion dieser Substanz mit der Bindungsstelle für Serotonin an SERT1, was eine Hemmung der Serotoninaufnahme durch den Transporter zur Folge hat. Die meisten bekannten Antidepressiva sind sehr potente Hemmstoffe der Paroxetinbindung, so daß diese über eine Bindung an der Serotonin-Bindungsstelle den Transport des Neurotransmitters hemmen können (Mellerup et al., 1983; Habert et al., 1985).

Auch in der hier durchgeführten Untersuchung konnte die Hemmung der Paroxetinbindung in Mäusehirnmembranen durch verschiedene Antidepressiva gezeigt werden. Untersuchungen einiger bekannter trizyklischer Antidepressiva (TCA) und selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRI) ergab eine sehr gute Korrelation von $r^2 = 0,9992$ zwischen den IC₅₀-Werten der synaptosomalen ³H-Serotoninaufnahme und den IC₅₀-Werten der ³H-Paroxetinbindung. In der Literatur finden sich ähnlich gute Korrelationen für die K_i-Werte einiger Antidepressiva von z.B. 0,985 (Habert et al., 1985) oder für deren EC₅₀-Werte von 0,997 (Scheffel & Hartig, 1989).

Im Gegensatz dazu konnten weder Hyperforin noch ein Johanniskrautextrakt (LI 160) eine nennenswerte Hemmung der ³H-Paroxetinbindung verursachen. Bezieht man die Werte des Hyperforins in die Berechnung der linearen Regression mit ein, erhält man eine deutlich schlechtere Korrelation (Abbildung 3.3).

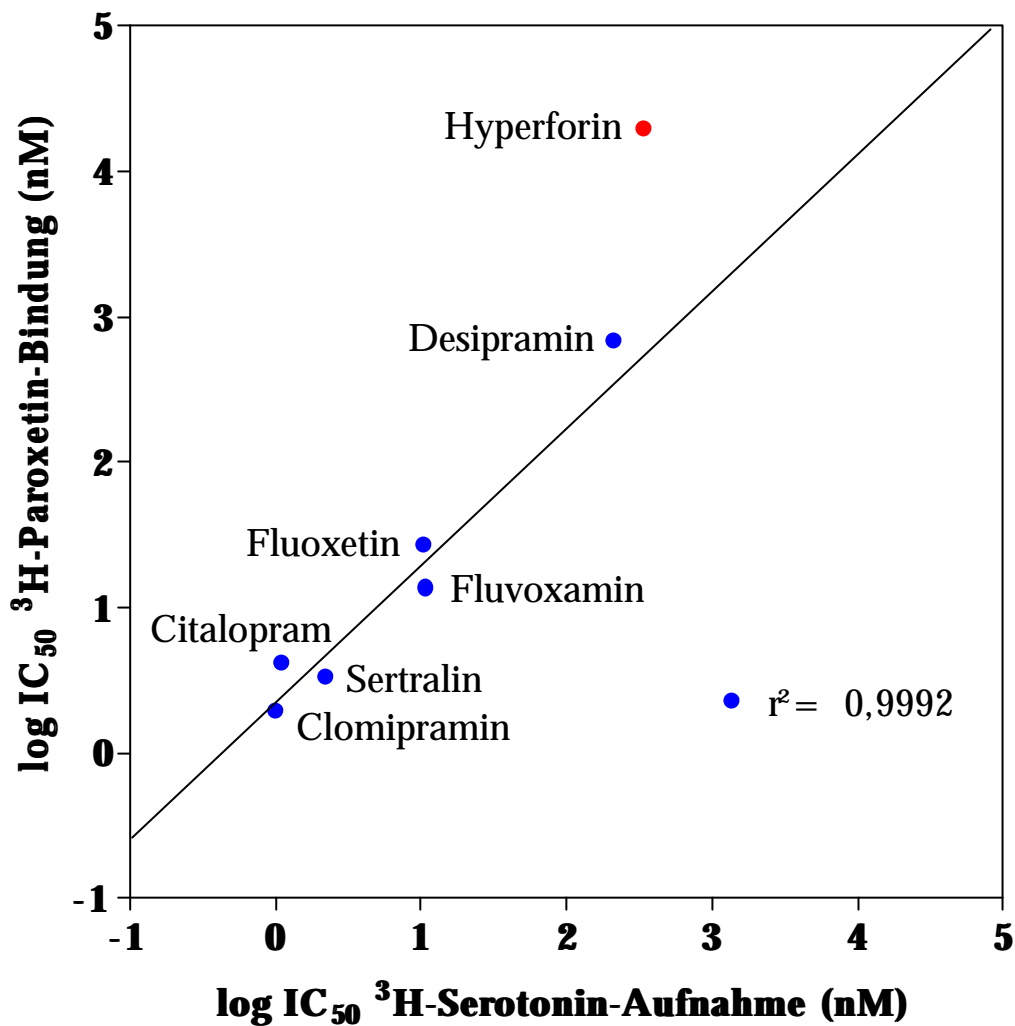


Abbildung 3.3: Korrelation der Halbmaximalen Hemmkonstanten (IC₅₀) für verschiedene SSRI und TCA mit und ohne Hyperforin. Dargestellt sind Mittelwerte aus sechs bis acht Experimenten sowie die Korrelationsgerade für die klassischen Antidepressiva.

Zur besseren Verdeutlichung sind die IC₅₀-Werte für beide Systeme in Tabelle 3.2 nochmals zusammengefaßt. Die Potenz des Hyperforins für die Hemmung der Serotoninaufnahme ist mit $342,3 \pm 75,9$ nM wesentlich größer als die Hemmung der Paroxetinbindung, für die der IC₅₀ bei etwa 20 µM liegt. Ein ähnliches Verhältnis zeigt sich für den LI 160-Extrakt, der einen IC₅₀-Wert von $2,24 \pm 0,5$ µg/ml an der Serotoninaufnahme und einen IC₅₀-Wert von $141,8 \pm 41,5$ µg/ml an der Paroxetinbindung zeigt.

Zudem stellt sich heraus, daß die Vergleichssubstanz Monensin, die wie oben ausgeführt, ebenfalls in der Lage ist die Serotoninaufnahme zu hemmen, ähnlich dem Hyperforin an der Paroxetin-Bindung keinen nennenswerten Effekt hat. Die gute Korrelation für die bekannten Antidepressiva ist ausgiebig untersucht worden und zeigt, daß so gut wie jede der hier

untersuchten Substanzen durch direkte Bindung an den Serotonintransporter eine Inhibition des Transportprozesses bewirkt bzw. bewirken kann.

Substanz	³ H-Paroxetin Bindung (nM)	³ H-Serotoninaufnahme (nM)	Ratio*
Clomipramin	1.9 ± 0.4	1.0 ± 0.1	1.9
Sertralin	3.3 ± 0.3	2.1 ± 1.0	1.6
Citalopram	4.1 ± 0.6	1.1 ± 0.2	3.7
Fluvoxamin	13.5 ± 3.7	10.9 ± 5.6	1.2
Fluoxetin	26.9 ± 0.6	10.4 ± 5.1	2.6
Monensin	> 1000	47.8 ± 16.3	----
Desipramin	672.3 ± 171.6	214.3 ± 89.5	3.1
Hyperforin	19,528 ± 6,983	342.3 ± 75.9	57.1
Johanniskraut-Extrakt	141.8 ± 41.5 µg/ml	2.24 ± 0.5 µg/ml	63.3

*ermittelt aus IC₅₀ ³H-Paroxetin Bindung/IC₅₀ ³H-Serotoninaufnahme

Tabelle 3.2: Gegenüberstellung der IC₅₀-Werte an der Paroxetinbindung in Hirnmembranen der Maus und der IC₅₀-Werte an der Serotoninaufnahme in Synaptosomen für verschiedene klassische Antidepressiva und Hyperforin sowie Johanniskraut-Extrakt (LI 160). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus 6-8 unabhängigen Experimenten.

Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, daß Hyperforin und der Johanniskrautextrakt (LI 160) nicht direkt an der Serotoninbindungsstelle des Serotonintransportermoleküls binden. Dadurch kann die Hemmung der Serotoninaufnahme also nicht erklärt werden und zudem ist dies ein Hinweis darauf, daß Hyperforin und der Extrakt (LI 160) einen anderen Wirkmechanismus als die gängigen Antidepressiva besitzen.

3.3 Hyperforin zeigt nicht-kompetitive Eigenschaften am Serotonintransporter

Ein weiterer Schritt zur Ermittlung der Mechanismen, durch welche Hyperforin die Aufnahme von Serotonin in die Präsynapse hemmt, war die Untersuchung der Kinetik des Serotonin-Transporters nach Hyperforin oder Citalopramzusatz. Klassische Antidepressiva zeigen bei diesen Untersuchungen zumeist einen kompetitiven Angriff am Serotonintransporter (D'Amato et al., 1987; Hyttel, 1978; Lingjaerde, 1979).

Kinetische Untersuchungen an Synaptosomen zeigen, daß die Hemmung der Serotoninaufnahme durch Hyperforin einen nicht-kompetitiven Charakter hat. K_M wird durch die Zugabe von 2 μM Hyperforin nicht verändert, während V_{max} gesenkt wird. Ein Vergleich mit dem SSRI Citalopram konnte in diesem System dessen bereits in der Literatur (Hyttel, 1978 + 1977) beschriebene kompetitive Hemmung des Serotonintransportes durch eine Erhöhung des K_M -Wertes und eine Senkung der maximalen Transportkapazität (V_{max}) bestätigen (Abbildung 3.4).

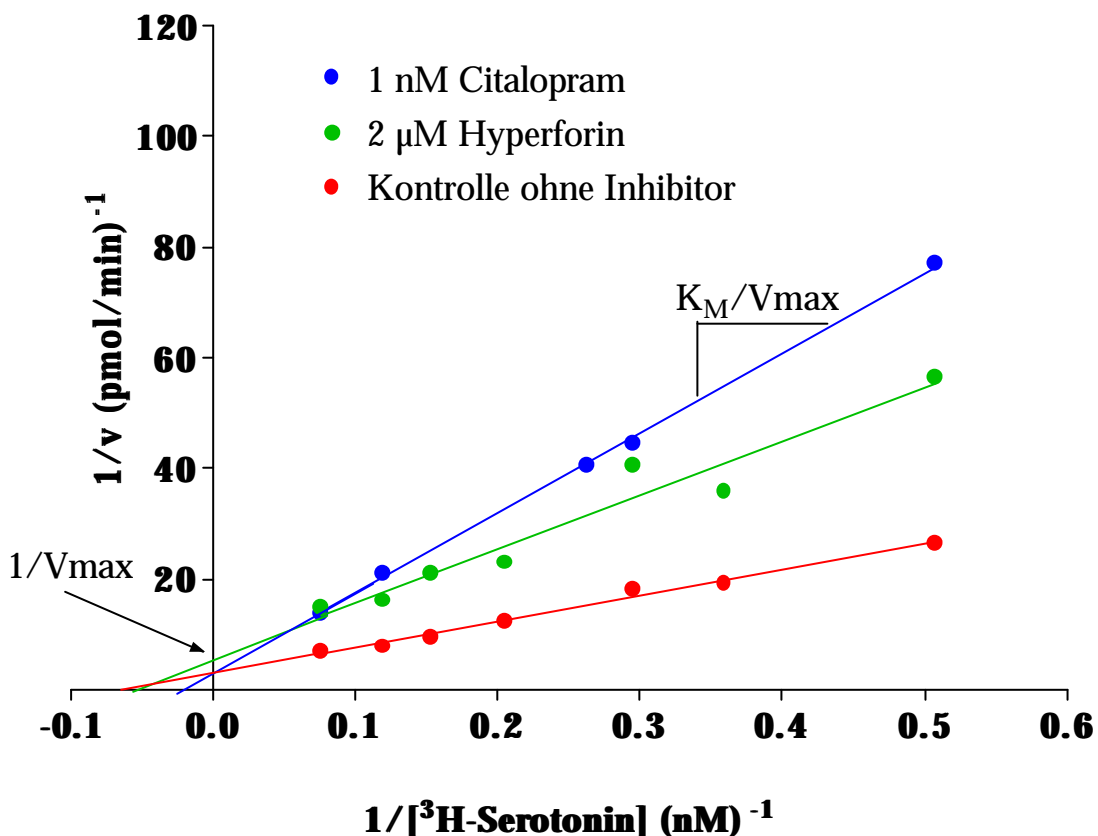


Abbildung 3.4: Lineweaver-Burk Plot zur Darstellung der hemmenden Effekte von Citalopram und Hyperforin am Serotonin-Transporter. Dargestellt sind Einzelexperimente mit Regressionskoeffizienten $>0,99$. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 6-8 gleichartig durchgeführte Experimente.

Im Falle einer kompetitiven Hemmung durch Citalopram findet man eine deutliche Erhöhung der Michaelis-Menten-Konstante K_M , während die maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} sich nicht ändert. K_M ist die Substratkonzentration (Serotonin), bei der die halbmaximale Transportgeschwindigkeit erreicht ist. Im Gegensatz dazu führt die Zugabe von Hyperforin in einer Konzentration von 2 μM zu einer hoch signifikanten Reduktion von V_{max} . K_M ändert sich hingegen nur geringfügig. Diese Art der Hemmung wird als nicht-kompetitiv bezeichnet. Während der SSRI Citalopram somit mit Serotonin in Wettstreit um die aktiven Substratbindungsstellen am Transportmolekül tritt, zeigt Hyperforin hier andersartige Eigenschaften, die darauf hindeuten, daß Hyperforin den Transport des Substrates Serotonin beeinflusst, ohne an die Substratbindungsstelle zu binden.

Auch für das Ionophor Monensin wurden kinetische Untersuchungen vorgenommen, die aufgrund ähnlicher Ergebnisse wie für Hyperforin nicht-kompetitive Effekte am Serotonin-Transporter vermuten lassen. Tabelle 3.3 faßt die ermittelten Parameter nochmals zusammen.

	K_M (nM)	V_{max} (pM/min/mg Protein)
Kontrolle	12,72 \pm 5,01	0,758 \pm 0,044
Citalopram (1 nM)	29,24 \pm 5,25 ^{***}	0,761 \pm 0,074
Kontrolle	11,90 \pm 2,07	0,695 \pm 0,034
Hyperforin (2 μM)	9,93 \pm 0,59 [*]	0,267 \pm 0,032 ^{***}
Kontrolle	13,78 \pm 2,50	0,454 \pm 0,030
Monensin (100 nM)	14,72 \pm 3,94	0,254 \pm 0,009 ^{***}

Tabelle 3.3: Kinetische Parameter nach Michaelis-Menten am Serotonintransport in Synaptosomen für Citalopram, Hyperforin und Monensin. Aufgeführt sind Mittelwerte \pm SD aus 6-8 gleichartig durchgeführten unabhängigen Experimenten. * bedeutet $p < 0,05$; *** bedeutet $p < 0,001$.

Hyttel (1978) gibt als kinetische Parameter für den Serotonintransport in Synaptosomen der Ratte für K_M einen Wert von 49 nM an und eine V_{max} von 7,4 pmol/10 min/5 mg Feuchtgewicht.

Aufgrund der bis dahin erhaltenen Ergebnisse war anzunehmen, daß Hypericum-Extrakt bzw. Hyperforin ein andersartiges Wirkprinzip am Serotonintransporter besitzt, der die antidepressiven Eigenschaften plausibel macht.

3.4 Hyperforin hemmt die Aufnahme von ^3H -Serotonin in Thrombozyten

Da man den Effekt von Hyperforin an Synaptosomen nur an tierischem Gewebe untersuchen konnte, war es von Bedeutung, die Serotoninaufnahme auch in einem humanen System zu beobachten. Die Ermittlung der Serotoninaufnahme in menschliche Thrombozyten ist ein für diesen Zweck optimales System, da in mehreren Studien gezeigt werden konnte, daß der Serotonintransporter im ZNS und in den Blutplättchen des Menschen bezüglich Aufbau und Funktion völlig identisch ist (siehe Einleitung). Seitdem wird das System an Thrombozyten erfolgreich zur Bestimmung der Serotoninaufnahme am Menschen verwendet (Marcusson & Ross, 1990).

Hyperforin hemmt die Aufnahme von Serotonin in Thrombozyten und Synaptosomen mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich, die in beiden Systemen ähnlich waren. Die Hemmung war wie in Synaptosomen konzentrationsabhängig und zeigte einen sigmoidalen Verlauf. Auch die Vergleichssubstanzen Monensin und Citalopram verhalten sich wie an der Serotoninaufnahme an Synaptosomen und hemmen die Aufnahme von Serotonin in humane Thrombozyten mit ähnlicher Potenz (Abbildung 3.7).

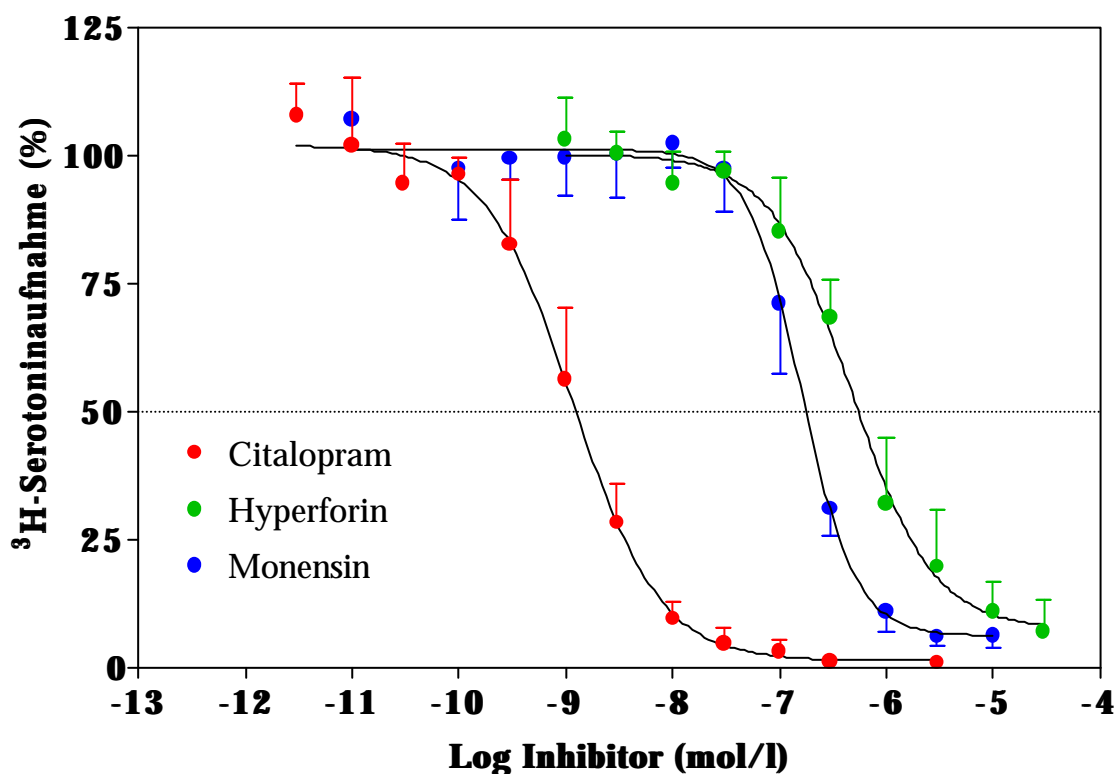


Abbildung 3.7: Durch Hyperforin, Citalopram und Monensin induzierte Hemmung der Serotoninaufnahme in humanen Thrombozyten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus sechs unabhängigen Experimenten.

Da hiermit erstmals Effekte von Hyperforin auch an menschlichen Zellen nachgewiesen werden konnten, sind diese Befunde von besonderer Bedeutung. Zudem zeigt Hyperforin in tierischen und in humanen Zellen die gleiche Effektivität, was darauf hindeutet, daß die Strukturen, an denen Hyperforin wirksam ist, an beiden Modellen identisch ist. Parallele Kontrolluntersuchungen mit klassischen Antidepressiva zeigen an beiden Systemen nahezu identische halbmaximale Hemmkonstanten, was als eine Bestätigung dafür zu sehen ist, daß das Serotonintransportmolekül an beiden Systemen die gleichen Bindungsstellen für die verschiedenen Antidepressiva besitzt (Tabelle 3.4). Sämtliche ermittelten IC₅₀-Werte stimmen mit bereits in der Literatur veröffentlichten Werten überein.

Substanz	³H-Serotoninaufnahme IC₅₀ an Synaptosomen (nM)	³H-Serotoninaufnahme IC₅₀ an Plättchen (nM)
Citalopram	1,1 ± 0,6	1,2 ± 0,5
Clomipramin	1,0 ± 0,4	0,2 ± 0,1
Desipramin	214,3 ± 89,5	249,7 ± 50,3
Hyperforin	342,3 ± 75,9	405,3 ± 105,4
Monensin	47,8 ± 16,3	159,5 ± 40,6
Sertralin	2,1 ± 1,0	0,34 ± 0,01

Tabelle 3.4: Vergleich der halbmaximalen Hemmkonstanten verschiedener klassischer Antidepressiva sowie Monensin und Hyperforin in Thrombozyten und Synaptosomen. Aufgeführt sind Mittelwerte ± SD aus 6-8 unabhängigen Experimenten.

3.5 Hyperforin erhöht die intrazelluläre Natriumkonzentration in Thrombozyten

Aufgrund der bis dahin durchgeführten Untersuchungen war es unwahrscheinlich, daß Hyperforin einen den klassischen Antidepressiva ähnlichen Mechanismus auf die Serotoninaufnahme im speziellen und die Neurotransmitteraufnahme im allgemeinen aufweist. Gerade aufgrund der unspezifischen Hemmung aller fünf Neurotransmitter-Transporter war es von Interesse, Mechanismen zu untersuchen, die für alle Neurotransmitter gleichermaßen wichtig sind und damit die unspezifische Hemmung aller Systeme erklären konnte. Auf der Suche nach weiteren Parametern, welche die Aufnahme von Serotonin in Synaptosomen regulieren, wurde der Natriumgradienten als die treibende Kraft für die Neurotransmitteraufnahme weiter untersucht. Die Natriumabhängigkeit ist allen Transportsystemen eigen, an denen eine Hemmung durch Hyperforin oder Johanniskrautextrakt (LI 160) gezeigt werden konnte, so auch der Dopamin-, Noradrenalin-, GABA- und L-Glutamataufnahme.

Eine Möglichkeit, den Natriumgradienten zu beeinflussen, ist die Verwendung des Natrium-/Protonen-Ionophores Monensin, das die intrazelluläre Natriumkonzentration erhöht, ohne daß spezifische Natriumtransporter oder -Kanäle beeinflusst werden und damit den Natriumgradienten erniedrigt. Dies wird ermöglicht durch einen monensinvermittelten Transport von Natrium und Protonen durch die Zellmembran (siehe auch Material und Methoden).

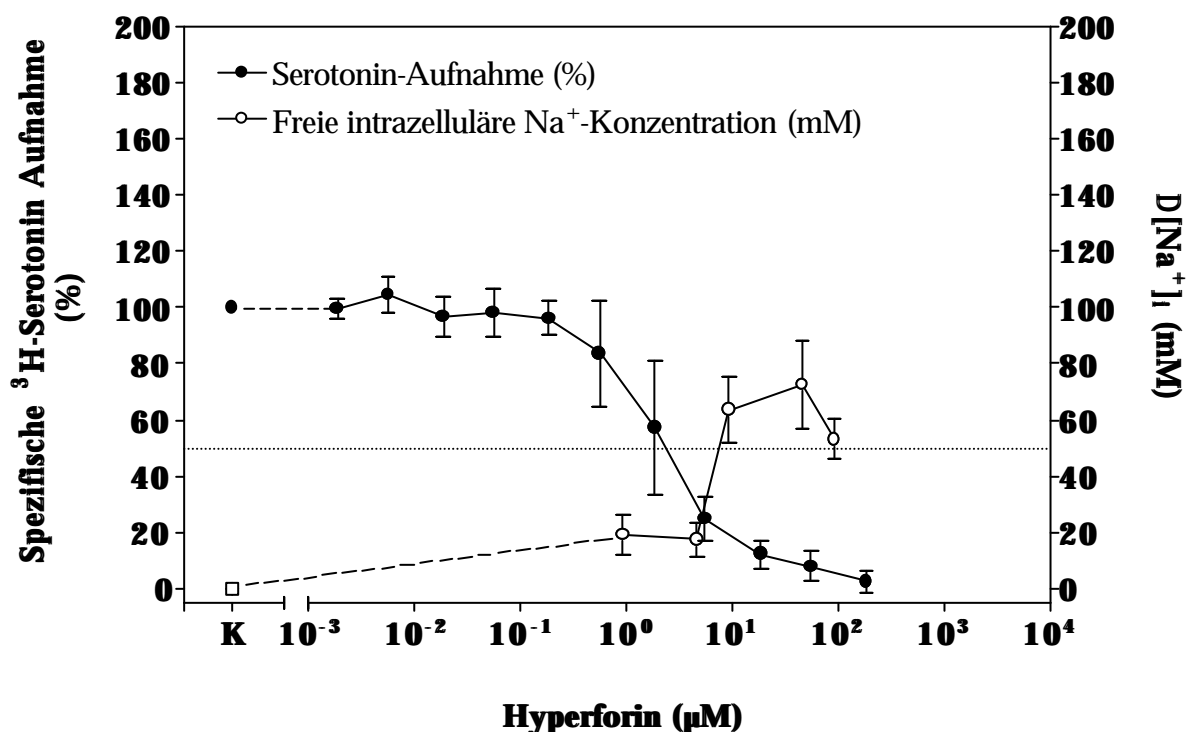


Abbildung 3.8: "Reverse U-Shape"-Kurve der hyperforininduzierten Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration bei Raumtemperatur sowie Darstellung der konzentrationsabhängigen Hemmung der ³H-Serotoninaufnahme. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus sechs unabhängigen Messungen. K = Kontrolle ohne Inhibitor

Hyperforin führt unmittelbar nach der Zugabe zu einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration in Thrombozyten. Die Erhöhung der $[Na^+]_i$ ist auch nach 15 Minuten noch stabil. Der Effekt ist im niedrigeren Dosisbereich konzentrationsabhängig; in höheren Konzentrationen erhält man eine umgekehrt U-förmige Dosis-Wirkungskurve. Diese initialen Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei die höchste verwendete Konzentration von 100 μM einen geringeren Effekt als die nächstniedrigste Dosis von 50 μM hatte (Abbildung 3.8). Das Natrium-/Protonen-Ionophor Monensin führte dagegen, in Abhängigkeit von den Konzentrationsgradienten, zu einem nahezu vollständigen Austausch der Natriumkonzentration zwischen dem Intra- und Extrazellularraum (Abbildung 3.9).

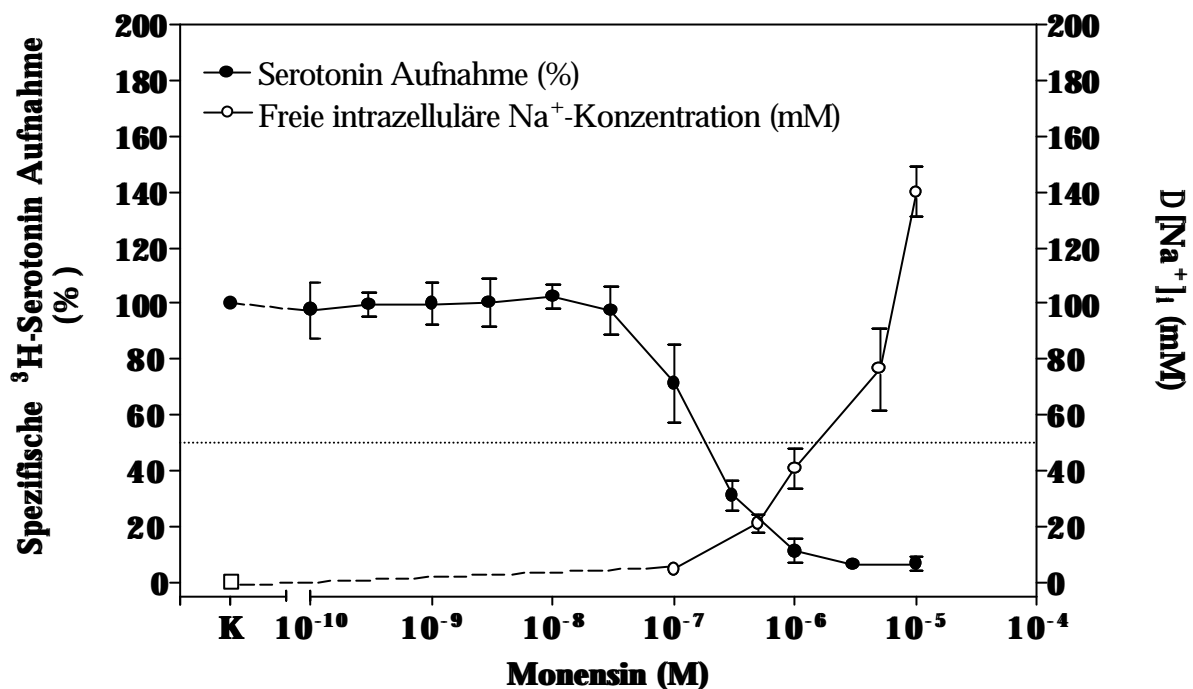


Abbildung 3.9: Konzentrationsabhängige Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration bei Raumtemperatur sowie Hemmung der 3H -Serotoninaufnahme durch Monensin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 6-8 unabhängigen Messungen.

Zusätzlich wurde der SSRI Citalopram am System der intrazellulären Natriumionen-Bestimmung untersucht. Das Antidepressivum zeigte bis zu einer Konzentration von 10 μM keinerlei Effekte auf die intrazelluläre Natriumkonzentration (Ergebnisse nicht dargestellt). Da Citalopram wie viele andere klassische Antidepressiva die Paroxetin-Bindung hemmt und damit durch direkten Angriff am Serotonintransporter die Aufnahme von Serotonin inhibiert, war dieser Befund zu erwarten.

Die nachfolgenden Messungen mit niedrigeren Hyperforinkonzentrationen bei 37°C zeigten, daß sich diese Veränderung der Natriumkonzentration in Thrombozyten dabei schneller einstellte, als bei Raumtemperatur. 10 μM Hyperforin führt zu einem Anstieg von $[Na^+]_i$ um

$81,22 \pm 38,03 \mu\text{M}$. Im Gegensatz zu Monensin führt Hyperforin zu keinem vollständigen Ausgleich der intra- und extrazellulären Natriumkonzentration. Die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration konnte bis zu einer Konzentration von $0,3\text{-}1 \mu\text{M}$ Hyperforin deutlich detektiert werden (Abbildung 3.10.)

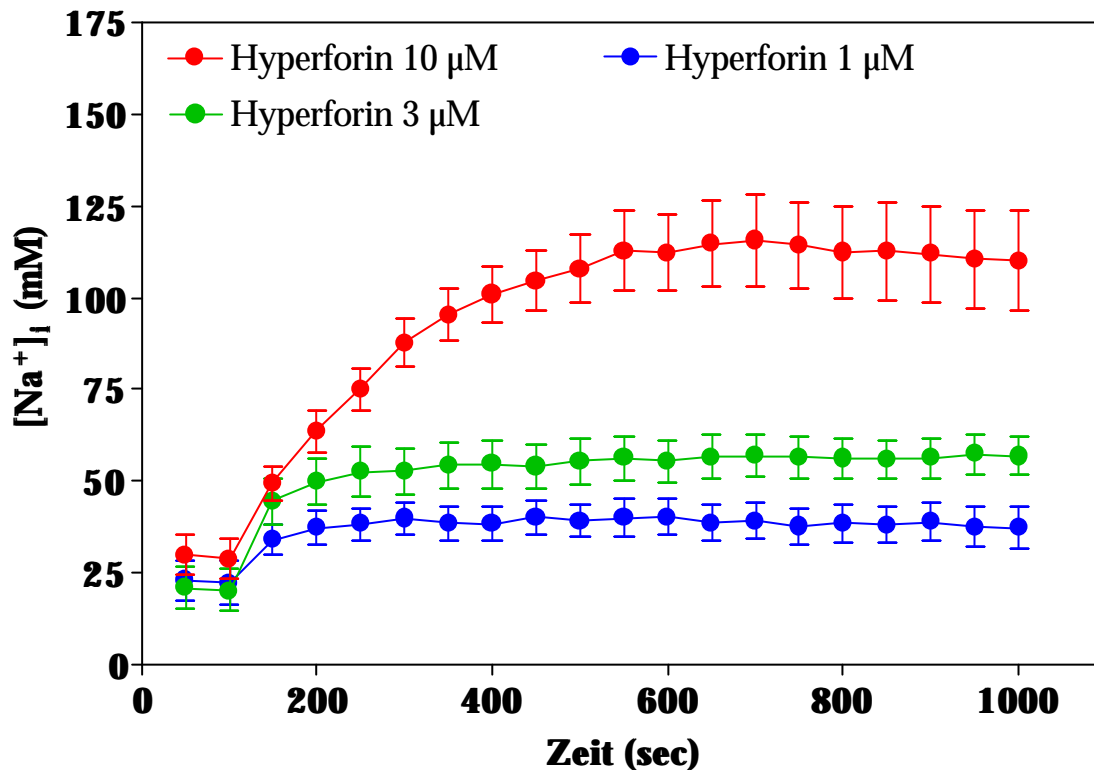


Abbildung 3.10: Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration durch Hyperforin in humanen Thrombozyten. Die Hyperforinzugabe erfolgte bei $t=100 \text{ sec}$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 12-15 Einzelexperimenten.

Der U-förmige Verlauf bei höheren Hyperforinkonzentrationen könnte darauf hindeuten, daß Hyperforin ein Ionentransportsystem aktiviert, das bei Erreichen einer gewissen Natriumkonzentration in der Zelle beginnt, Natriumionen in die andere Richtung zu transportieren bzw. nur eine bestimmte Transportkapazität hat.

Zum Vergleich wurden diese Messungen auch mit Monensin durchgeführt, welches aufgrund seiner Fähigkeit, Natrium in und Protonen aus der Zelle zu transportieren, Effekte auf die intrazelluläre Natriumkonzentration haben sollte. Erwartungsgemäß führte eine Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Monensin zu einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration um $97,94 \pm 15,29 \text{ mM}$. Monensin hatte einen schnelleren und deutlicheren Effekt, der zudem bei Verwendung der höchsten Konzentration von $10 \mu\text{M}$ zu einem vollständigen Ausgleich von intra- und extrazellulärer Natriumkonzentration führte (Abbildung 3.9).

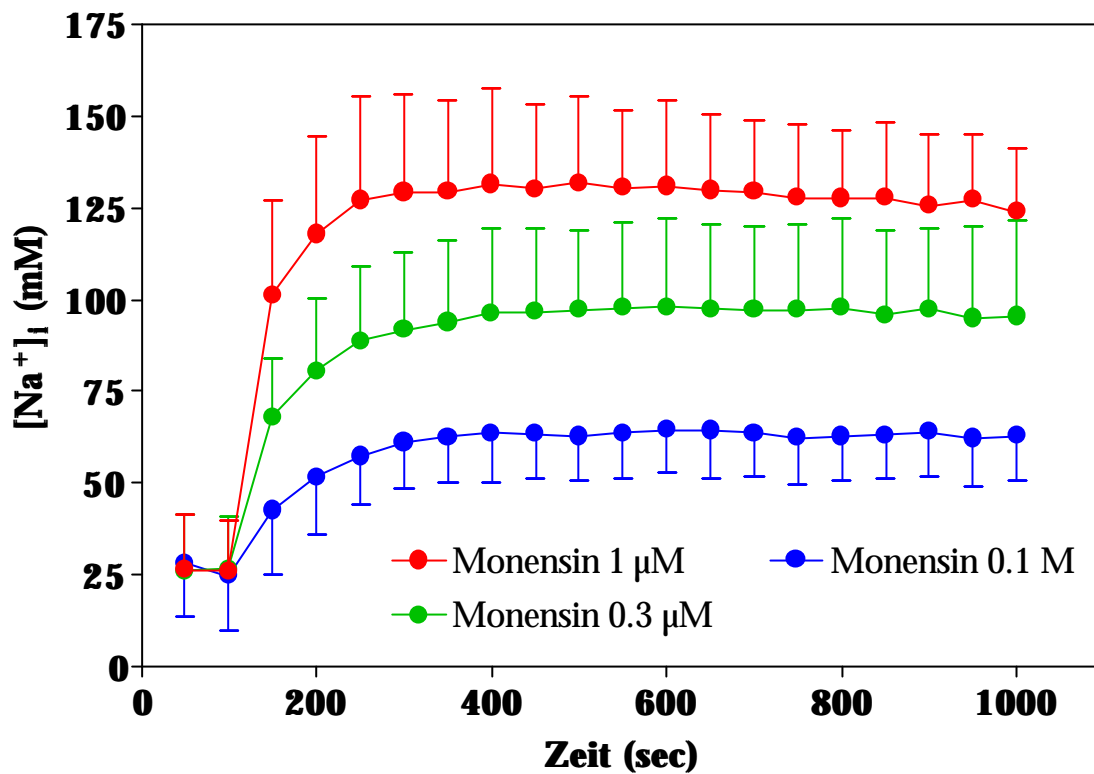


Abbildung 3.11: Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration durch das Na^+/H^+ -Ionophor Monensin. Die Monensinzugabe erfolgte bei $t=100$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 12-15 Einzelmessungen.

Monensin zeigt somit einen ähnlichen Effekt auf die intrazelluläre Natriumkonzentration wie Hyperforin, obwohl es bereits in niedrigeren Konzentrationen zu einem vollständigen Zusammenbruch des Natriumgradienten führt und keine umgekehrte U-förmige Dosis-Wirkungsbeziehung bei höheren Konzentrationen zeigt.

Um zu klären, ob Hyperforin einen monensin-ähnlichen oder -unähnlichen Wirkungsmechanismus besitzt, wurde untersucht, inwieweit Hyperforin auch eine Änderung des intrazellulären pH-Wertes auslöst. Da Monensin durch den Austausch von Natrium gegen Protonen neben einer Erhöhung von $[Na^+]_i$ eine gleichzeitige Alkalisierung des Zytosols bewirkt, wurde der Effekt von Hyperforin auf den intrazellulären pH-Wert untersucht.

3.6 Biphasischer Effekt von Hyperforin auf den intrazellulären pH-Wert

Wenn Hyperforin monensinähnliche Eigenschaften besitzt, müßten auch gleichzeitige Änderungen des intrazellulären pH-Wertes durch Hyperforin beobachtet werden können. Tatsächlich zeigt Hyperforin eine Beeinflussung des intrazellulären pH-Wertes in Thrombozyten.

Der Einfluß, den Hyperforin auf den pH-Wert in Thrombozyten ausübt, ist schneller detektierbar als bei den Natriumuntersuchungen. Desweiteren konnten hier bereits Effekte von niedrigeren Hyperforinkonzentrationen beobachtet werden. Schon die niedrigste untersuchte Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$ Hyperforin führte zu einer intrazellulären Azidifizierung von $-0,04 \pm 0,04$ pH-Einheiten, die sehr schnell den Maximalwert erreichte und über den beobachteten Zeitraum von 15 min stabil blieb. $1 \mu\text{M}$ Hyperforin hatte den gleichen Effekt. Bei der Verwendung höherer Konzentrationen wurde ein biphasischer Verlauf der pH-Wert Veränderung sichtbar (Abbildung 3.12).

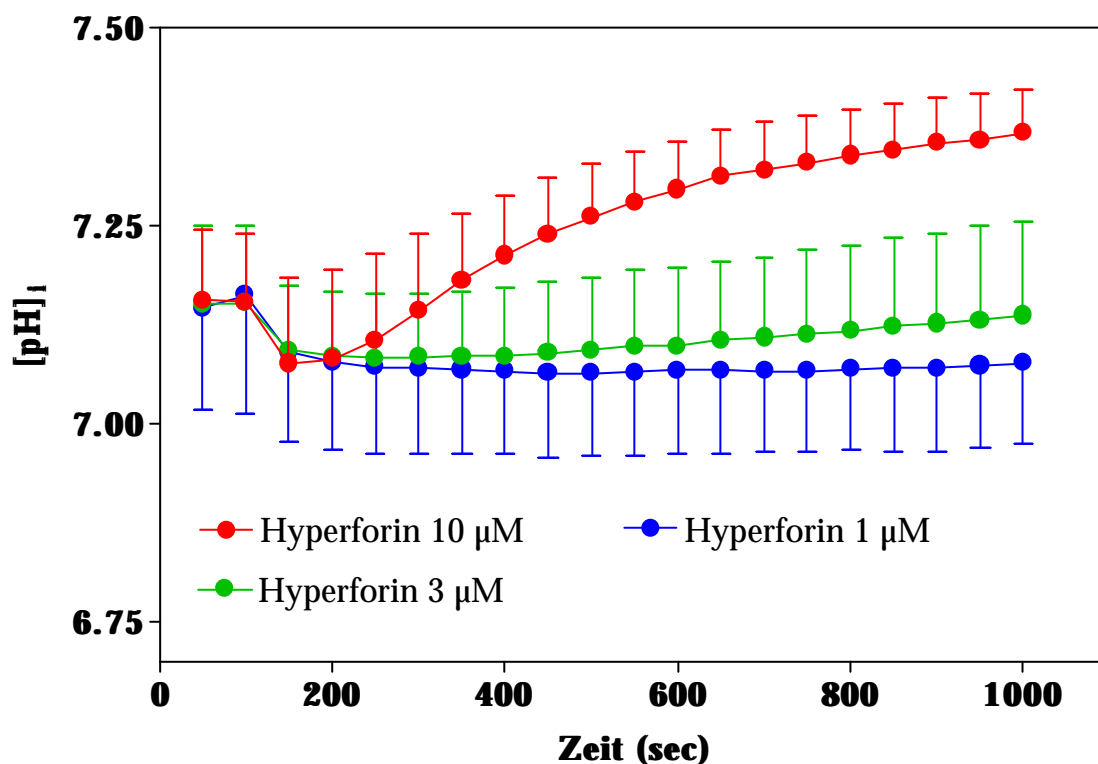


Abbildung 3.12: Veränderung des intrazellulären pH-Wertes durch Hyperforin in Thrombozyten. Hyperforin wurde bei $t=100$ sec zugegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von 12-15 Einzelerperimenten.

Die höchste Konzentration ($10 \mu\text{M}$ Hyperforin) führte direkt nach Einbringen in die Messküvette zu einer schnellen intrazellulären Ansäuerung von $-0,08 \pm 0,04$ pH-Einheiten, die sich jedoch bald regulierte indem der pH-Wert in den Thrombozyten wieder anstieg und

gegen Ende der Messphase sogar $0,24 \pm 0,05$ Einheiten über dem basalen pH-Wert in der Zelle lag. Eine Konzentration von $3 \mu\text{M}$ Hyperforin führte zur gleichen Ansäuerung wie auch bei der höheren Konzentration von $10 \mu\text{M}$, allerdings konnte nur eine tendenzielle Alkalisierung beobachtet werden.

Demzufolge hat Hyperforin einen Einfluß auf die intrazelluläre Konzentration von Natriumionen und Protonen. Ein bekanntes ubiquitär vorkommendes Transportsystem für Natriumionen ist der Natrium/Protonen-Exchanger (NHE). Ein Vergleich mit Monensin zeigt, daß dieses Profil keinem Na^+/H^+ -Ionophor entspricht, aber tendenziell eine Aktivierung des NHE bedeuten könnte. Wie erwartet wird direkt nach der Zugabe von Monensin eine schnelle Alkalisierung des Plättcheninneren beobachtet, deren Ausmaß von der gewählten Konzentration abhängig ist. Eine dem Hyperforin ähnliche Alkalisierung von $0,23 \pm 0,05$ pH-Einheiten wird mit einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Monensin erreicht (Abbildung 3.13).

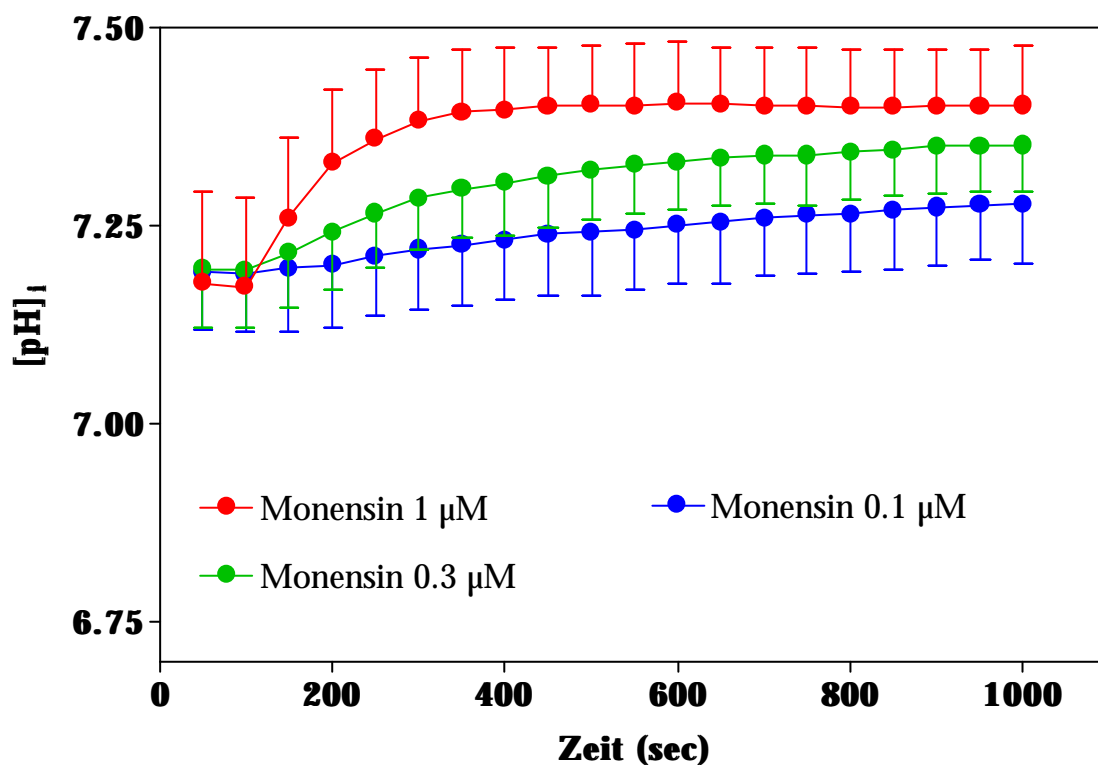


Abbildung 3.13: Alkalisierung des Thrombozyten-Zellinneren durch Monensin. Die Monensinzugabe erfolgte bei $t=100$ sec. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von 12-15 Einzelmessungen.

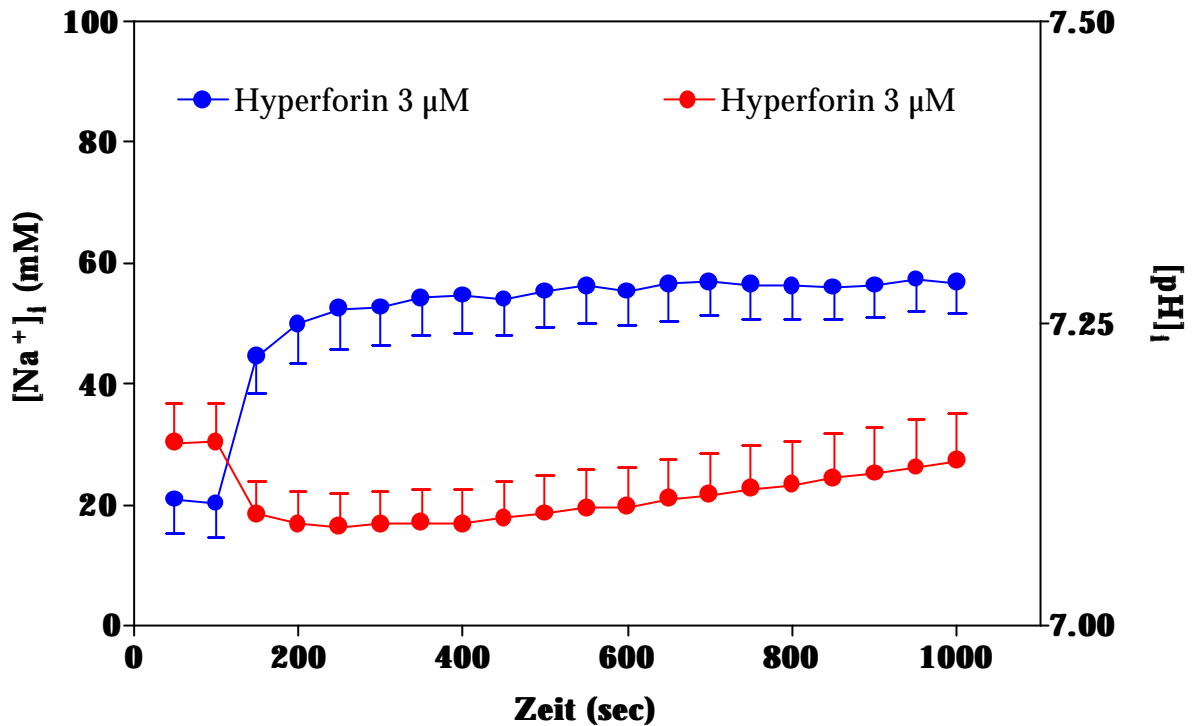


Abbildung 3.14: Beeinflussung der intrazellulären Natriumkonzentration und Erniedrigung des zytosolischen pH-Wertes durch 3 µM Hyperforin. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 12-15 gleichartigen Einzelmessungen.

Die gleichzeitige Darstellung der intrazellulären Ansäuerung sowie der Erhöhung von $[Na^+]_i$ durch Zugabe von 3 µM Hyperforin, weist darauf hin, daß die hyperforininduzierten Veränderungen der Ionenkonzentration voneinander unabhängige Effekte sind (Abbildung 3.14). Die Acidifizierung des Zytosols erfolgt sehr schnell und hat bereits ihr Maximum erreicht, wenn die maximale Erhöhung der Natriumkonzentration noch nicht stabil ist. Zudem bleibt die Natriumkonzentration über den gesamten Versuchszeitraum stabil, während der intrazelluläre pH-Wert sich gegen Ende der Beobachtungszeit allmählich wieder dem Basalwert nähert. Desweiteren ist hier eine Beteiligung des Natrium-Protonen-Exchangers ausgeschlossen, da beide Kurvenverläufe eine Zunahme der Konzentration der betreffenden Ionen implizieren und nicht mit der Vorstellung eines Austausches von Natriumionen gegen Protonen in Einklang zu bringen sind.

3.7 Veränderte Ionenhomöostase und Hemmung der ^3H -Serotoninaufnahme in Thrombozyten

Sowohl die Änderung der intrazellulären Konzentration von Natrium und Protonen, als auch die Hemmung der ^3H -Serotoninaufnahme konnten im gleichen Konzentrationsbereich gesehen werden (Abbildung 3.15). Somit ist ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Konzentration von Natrium und/oder Protonen und der Hemmung der ^3H -Serotoninaufnahme durch Hyperforin möglich.

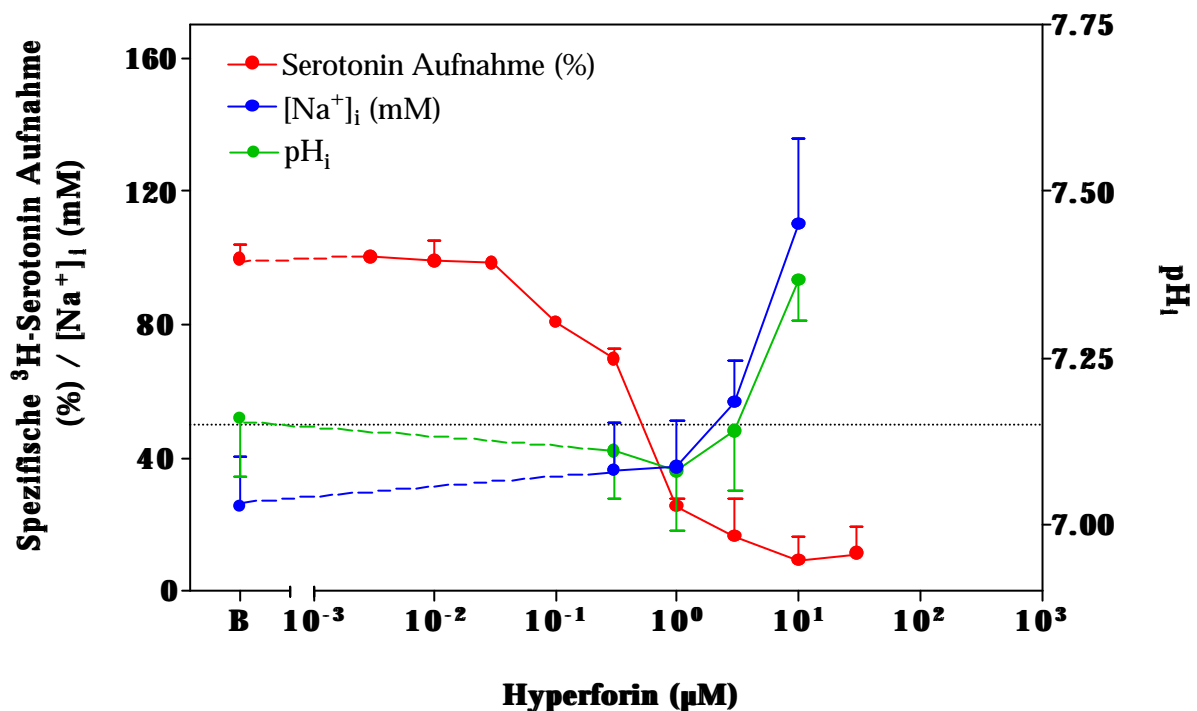


Abbildung 3.15: Konzentrationsabhängige Beeinflussung der ^3H -Serotoninaufnahme sowie gleichzeitige Änderung der intrazellulären Natriumkonzentration und des pH-Wertes durch Hyperforin in Thrombozyten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus sechs unabhängigen Einzelexperimenten.

Auch das Natrium-/Protonenionophor Monensin zeigt einen ähnlichen Zusammenhang zwischen den Ionenkonzentrationsänderungen und der ^3H -Serotoninaufnahme-Hemmung. Da Monensin jedoch nur zu einer Alkalisierung des intrazellulären pH-Wertes führt könnte nur die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration mit der ^3H -Serotoninaufnahme-Hemmung assoziiert sein. Dennoch ist nicht auszuschließen, daß eine generelle Beeinflussung des intrazellulären pH-Wertes zu einer Hemmung der Aufnahme von ^3H -Serotonin in Thrombozyten beitragen kann (Abbildung 3.16).

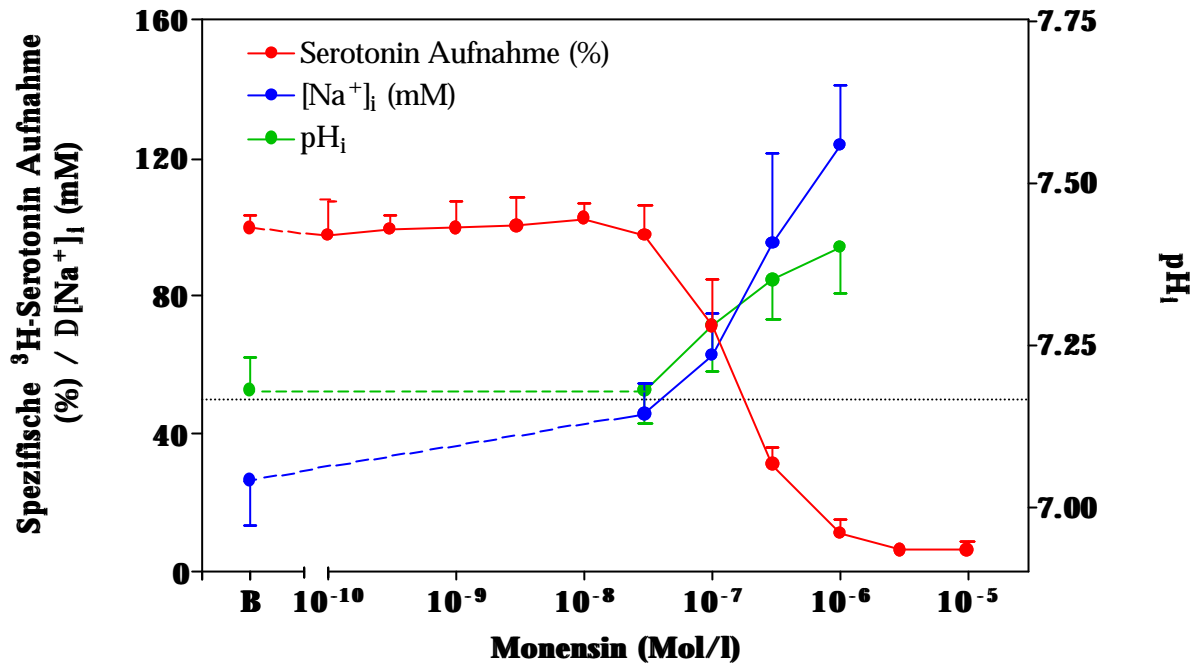


Abbildung 3.16: Monensininduzierte Erhöhung von $[Na^+]_i$ und pH_i sowie 3H -Serotoninaufnahme-Hemmung in Abhängigkeit von der Monensinkonzentration in Thrombozyten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus sechs unabhängigen Einzelexperimenten.

3.8 Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Hyperforin

Eine Veränderung der intrazellulären Natrium- bzw. Protonenkonzentration kann darüberhinaus auch eine Beeinflussung anderer Ionenkonzentrationen in der Zelle nach sich ziehen. Eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration gilt als Stimulus des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchangers in Säugetierzellen. Zudem ist ein Zusammenhang zwischen der hyperforininduzierten Freisetzung verschiedener Neurotransmitter und einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration denkbar. Daher wurde untersucht, inwieweit Hyperforin einen Einfluß auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hat.

Hyperforin ist tatsächlich in der Lage, auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu erhöhen. In kalziumhaltigem Medium steigt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Hyperforin zunächst sehr schnell an, geht dann in eine Plateauphase über und steigt in einer dritten Phase kontinuierlich gravierend an. Diese dritte Phase ist nach einer Inkubationszeit von 1000 sec noch nicht abgeschlossen und in einigen Messungen konnte beobachtet werden, daß die Zelle aufgrund dieser dramatischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - Erhöhung zugrunde geht. Die Plateauphase der $[\text{Na}^+]_i$ - Erhöhung scheint mit der dritten Phase des Kalziumanstiegs assoziiert zu sein, was darauf hindeuten könnte, daß der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchanger dadurch aktiviert wird und $[\text{Na}^+]_i$ deshalb nicht weiter ansteigen kann, weil Natriumionen im Austausch gegen Kalziumionen aus der Zelle transportiert werden (Abbildung 3.17).

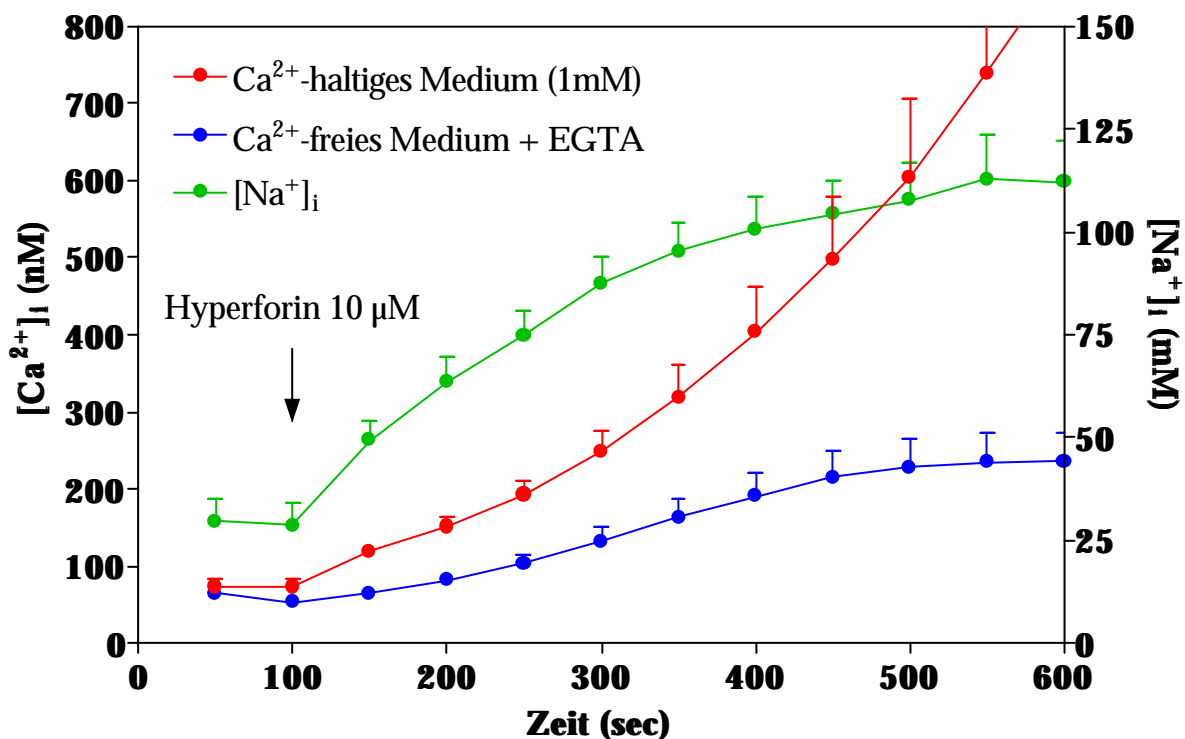


Abbildung 3.17: Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und $[\text{Na}^+]_i$ durch $10 \mu\text{M}$ Hyperforin in kalziumhaltigem Medium und Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in kalziumfreiem Medium. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus sechs unabhängigen Einzelexperimenten.

Gegen diese Hypothese spricht allerdings, daß Monensin in einer Konzentration von 1 μM , die zu einem stärkeren Natriuminflux als 10 μM Hyperforin führt, so gut wie keinen Effekt auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration hat (Ergebnisse nicht dargestellt).

Hyperforin führt in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumkonzentration zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dieser Effekt war am deutlichsten bei der hohen Hyperforin-Konzentration von 10 μM ausgeprägt. Die niedrigeren Konzentrationen zeigen nur noch eine geringfügige Erhöhung der Kalziumkonzentration. Durch Messung in nominell kalziumfreien bzw. völlig kalziumfreien (mit EGTA gepuffertem kalziumfreien) Medium wurde dieser Kalziumeinstrom reduziert. Allerdings konnte auch in völlig kalziumfreiem Medium immer noch ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch 10 μM Hyperforin beobachtet werden. Wenn 1 mM Kalzium im Außenmedium vorhanden war, stieg $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach der Zugabe von 10 μM Hyperforin von $75,43 \pm 20,79$ nM auf 1683 ± 462 nM, in nominell kalziumfreiem Medium auf $506,40 \pm 109,46$ nM und in völlig kalziumfreiem Medium auf $208,98 \pm 89,34$ nM (Abbildung 3.18).

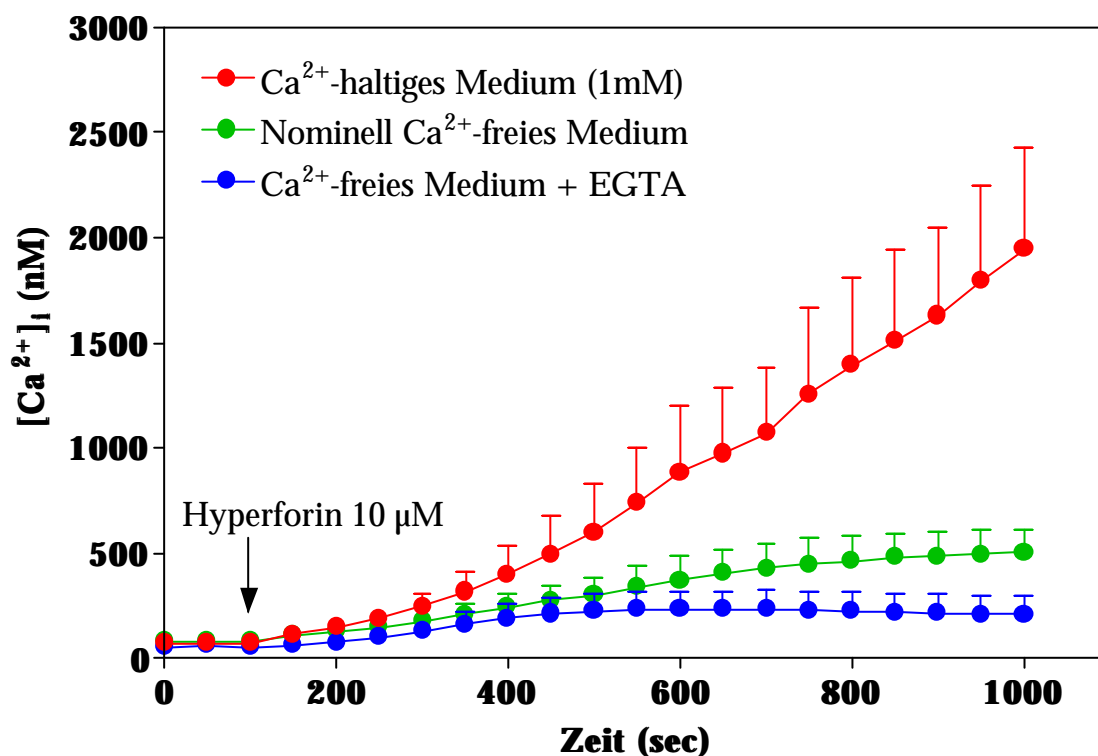


Abbildung 3.18: Effekt von 10 μM Hyperforin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumkonzentration in Thrombozyten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus sechs unabhängigen Einzelerperimenten.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß Hyperforin, zusätzlich zu einem deutlichen Kalziumeinstrom in die Zelle, auch eine Freisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern

verursacht. Die zeitliche Korrelation der Effekte auf $[Ca^{2+}]_i$ und pH_i zeigt eher einen Zusammenhang zwischen der Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ und der sekundären Alkalisierung des Zytosols, wenngleich die Erhöhung von pH_i einen Plateauwert erreicht hat und damit stabil ist, während die Kalziumkonzentration noch weiter ansteigt. Die erste Phase des Kalziumanstiegs steht dagegen eher in Zusammenhang mit der initialen Ansäuerung des Thrombozyten-Zytosols (Abbildung 3.19).

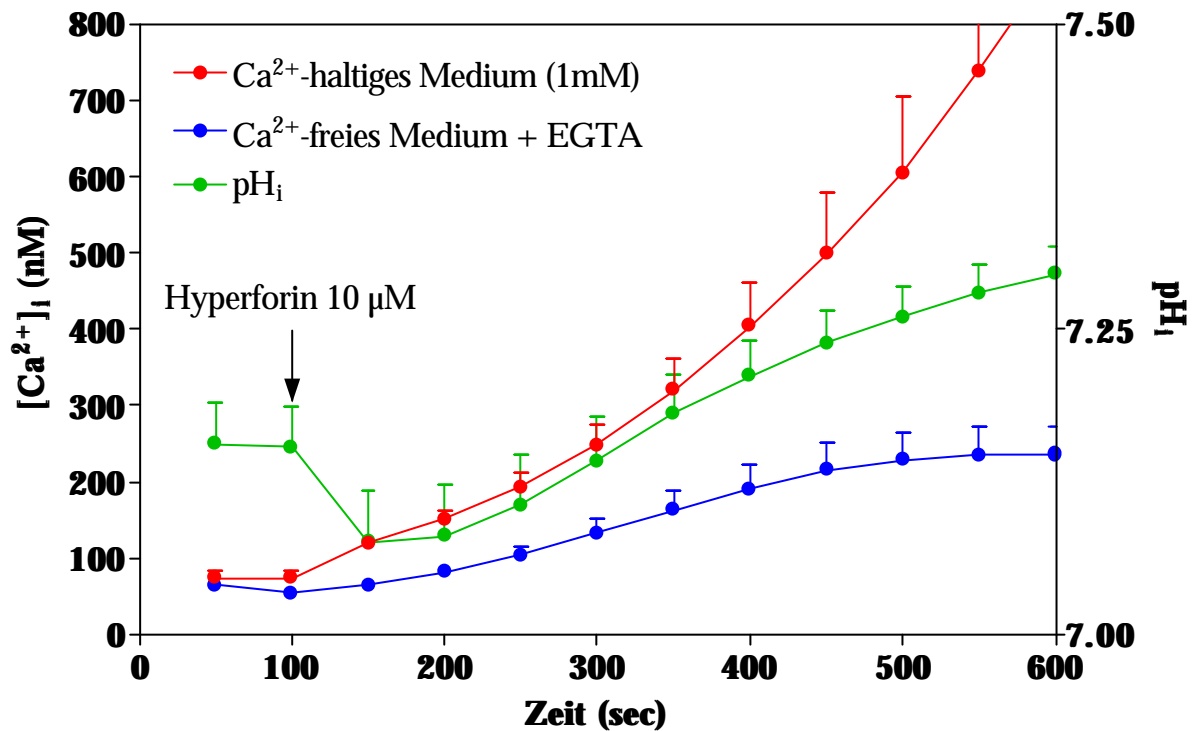


Abbildung 3.19: Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ und pH_i durch 10 μM Hyperforin in kalziumhaltigem Medium und Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ in kalziumfreiem Medium. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus sechs unabhängigen Einzelexperimenten.

Einen Zusammenhang zwischen $[Ca^{2+}]_i$ und pH_i könnte über die Aktivierung einer Ca^{2+} -ATPase hergestellt werden, die Kalziumionen gegen Protonen über eine Zellmembran austauschen kann. Normalerweise ist dieser Transport für die Aufrechterhaltung einer niedrigen intrazellulären Kalziumkonzentration in der Zelle verantwortlich, unter bestimmten Bedingungen kann sich die Transportrichtung jedoch umkehren bzw. scheinen die Ca^{2+} -ATPase an Zellorganellen generell Kalzium in und Protonen aus der Organelle zu transportieren (Goncalves et al., 1999a+b). Möglicherweise könnte damit die parallele Veränderung der hyperforininduzierten pH_i -Änderung und der $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung erklärt werden. Dem Verlauf der Änderungen zufolge wäre diese Ca^{2+} -ATPase eher an einem intrazellulären Kompartiment, wie z.B. den „dense granula“ lokalisiert, da sowohl die intrazelluläre Alkalisierung als auch die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ in kalziumfreiem Medium zu ähnlichen Zeitpunkten ein Plateau erreicht haben. Zudem ist die pH_i -Änderung nicht von der

extrazellulären Kalziumkonzentration abhängig, während in BAPTA-beladenen Plättchen die initiale Ansäuerung vermindert ist, was auf eine Abhängigkeit der initialen Acidifizierung von der intrazellulären Kalziumkonzentration hindeutet. Dagegen ist die sekundäre Alkalisierung in BAPTA-beladenen Plättchen unverändert. Somit dürfte die initiale (10 μM Hyperforin) als auch die generelle Ansäuerung (0,3-0 μM Hyperforin) ein von der beobachteten sekundären Alkalisierung unabhängiger Prozeß sein.

3.9 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Tabelle 3.5 gibt einen Überblick über die Veränderungen der intrazellulären Ionenhomöostase durch Hyperforin. Hyperforin erhöht in allen drei Systemen die Konzentration intrazellulärer Ionen in einer dosisabhängigen Art und Weise. Um zwischen initialen und später auftretenden Effekten zu unterscheiden, werden die Veränderungen am Zeitpunkt $t=150$ sec und am Ende der Messphase ($t=1000$ sec) miteinander verglichen.

Intrazelluläres Ion HyperforinKonzentration	$t=150$ sec	$t=1000$ sec
D [Na⁺]_i		
10 μ M	20,67 \pm 18,53 mM	81,22 \pm 38,03 mM
3 μ M	24,35 \pm 13,68 mM	36,58 \pm 13,72 mM
1 μ M	13,77 \pm 10,25 mM	17,55 \pm 10,63 mM
[Na⁺]_i Basalwert	25,31 \pm 15,03 mM	
pH-Wert		
10 μ M	-0,08 \pm 0,04 pH-Einheiten	+0,24 \pm 0,05 pH-Einheiten
3 μ M	-0,06 \pm 0,03 pH-Einheiten	-0,02 \pm 0,08 pH-Einheiten
1 μ M	-0,04 \pm 0,04 pH-Einheiten	-0,04 \pm 0,06 pH-Einheiten
Basaler pH-Wert	7,16 \pm 0,11	
[Ca²⁺]_i		
10 μ M	135,89 \pm 39,48 nM	1683 \pm 462 nM
3 μ M	89,22 \pm 16,12 nM	152,91 \pm 30,88 nM
1 μ M	90,32 \pm 9,34 nM	137,8 \pm 14,39 nM
Basalwert	75,43 \pm 20,79 nM	122,14 \pm 13,11 nM

Tabelle 3.5: Effekte von verschiedenen HyperforinKonzentrationen auf die Konzentration intrazellulärer Ionen in menschlichen Thrombozyten. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD aus 12-15 Einzelmessungen. Die jeweils ermittelten Basalwerte vor der Hyperforinzugabe entsprechen den in der Literatur gefundenen Angaben für Blutplättchen.

Hyperforin:

- hemmt die Aufnahme von ^3H -Serotonin in Maushirn-Synaptosomen und menschlichen Thrombozyten mit ähnlichen IC_{50} -Werten im oberen nanomolaren Konzentrationsbereich
- hemmt die synaptosomale Aufnahme von ^3H -Serotonin durch einen nicht-kompetitiven Mechanismus
- bindet nicht direkt an der Serotoninbindungsstelle von SERT1
- führt zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration in Thrombozyten
- hat in höheren Dosen von $10\ \mu\text{M}$ einen biphasischen Effekt auf den intrazellulären pH-Wert von humanen Blutplättchen und führt in Konzentrationen von $0,3\text{-}3\ \mu\text{M}$ zu einer Acidifizierung des Zellinneren
- erhöht in höheren Konzentrationen die intrazelluläre Kalziumkonzentration in Thrombozyten durch einen Ca^{2+} -Influx und eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern

4. NÄHERE CHARAKTERISIERUNG DER EINZELEFFEKTE

4.1 Untersuchungen zur ^3H -Serotoninaufnahmehemmung in Synaptosomen und Thrombozyten

4.1.1 Variation der Vorinkubation in Synaptosomen

Zunächst war es von Interesse, die Geschwindigkeit der Hyperforinwirkung auf die Serotoninaufnahme zu untersuchen. Variiert wurde hierbei die Dauer der Vorinkubation. Es sollte festgestellt werden, ob eine Vorinkubation, die in den normalen Experimenten 15 min betrug, nötig war, um die volle Hemmung durch Hyperforin zu erhalten. Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, war die gewählte Konzentration an Hyperforin, die eine Hemmung der ^3H -Serotoninaufnahme um bis zu 50% verursachte, bereits nach einer Vorinkubationszeit von nur zwei Minuten voll wirksam. Hyperforin erzielte hier in einer Konzentration von $0,3 \mu\text{g/ml}$ bzw. $558,86 \text{ nM}$, die dem ungefähren IC_{50} -Wert entsprach, eine Inhibition der Neurotransmitteraufnahme um ca. 50%. Das Ausmaß dieser Hemmung bei der gewählten Hyperforinkonzentration war über die gesamte Dauer der verschiedenen Vorinkubationszeiten konstant.

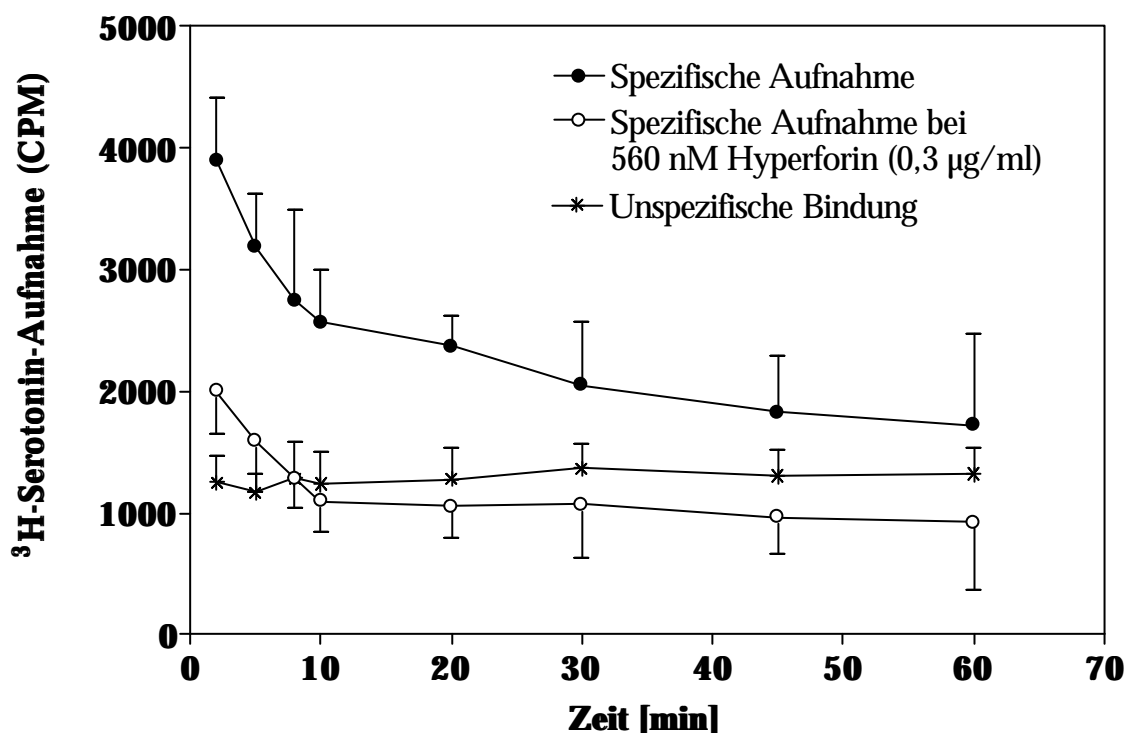


Abbildung 4.1: Bestimmung des ^3H -Serotoninaufnahmes mit und ohne Hyperforin ($0,3 \mu\text{g/ml}$) bei verschiedenen Vorinkubationszeiten. Dargestellt ist die gemessene Radioaktivität in counts per minute (CPM), die innerhalb der Inkubationszeiten in die Synaptosomen aufgenommen werden konnte. Es wurden die Mittelwerte \pm SD von sechs unabhängigen Versuchen angegeben.

Hyperforin war in diesem System somit schon nach sehr kurzer Zeit wirksam und verlor den serotoninaufnahmehemmenden Effekt auch nach einer längeren Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C nicht. Hyperforin mußte seinen Wirkort innerhalb kürzester Zeit und in wahrscheinlich untransformierter Form erreichen, so daß längere Diffusionswege zum Angriffspunkt oder eine direkte Beeinflussung verschiedener Enzyme oder Phosphorylierungskaskaden eher unwahrscheinlich sein dürften.

Eine eingehendere Untersuchung der Zeitabhängigkeit der durch Hyperforin hervorgerufenen Serotoninaufnahmehemmung durch Verdrängungsexperimente zeigte, daß sich die halbmaximale Hemmkonstante durch die fehlende Vorinkubation bei 37°C nicht wesentlich von dem unter normalen Versuchsbedingungen erhaltenen IC₅₀-Wert unterschied. Nach einer 15minütigen Vorinkubation betrug der IC₅₀-Wert 108 nM, ohne vorherige Vorinkubation hemmte Hyperforin die ³H-Serotoninaufnahme mit einem IC₅₀-Wert von 126 nM (Abbildung 4.2).

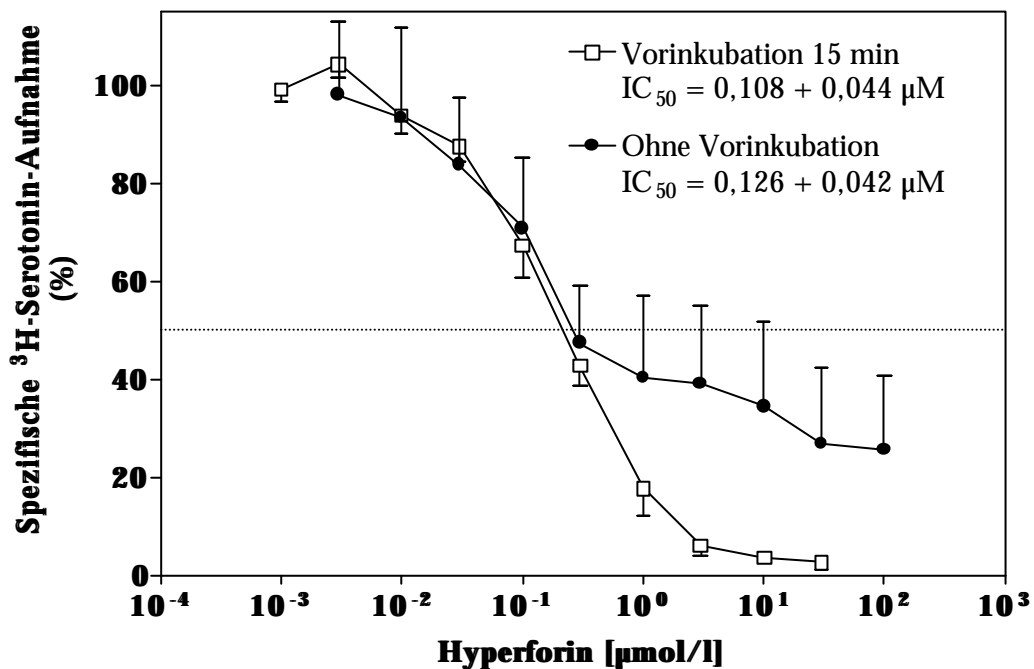


Abbildung 4.2: Hemmung des ³H-Serotoninaufnahmes durch Hyperforin in Synaptosomen unter normalen Versuchsbedingungen mit einer Vorinkubationszeit von 15 min und bei sofortiger Inkubation mit Radioligand ohne vorherige Inkubation bei 37°C. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus sechs unabhängigen Experimenten.

Auffällig war jedoch die Verdrängungskurve, die man durch Messungen ohne Vorinkubation erhielt. Im niedrigeren Dosisbereich verlaufen beide Hemmkurven identisch und zwar bis ungefähr 300 nM, bei höheren zugesetzten Hyperforinkonzentrationen scheint durch die fehlende Vorinkubation bei 37°C die Hyperforinwirkung abgeschwächt, was dazu führt, daß

die Serotoninaufnahme durch Hyperforin nicht mehr zu 100% gehemmt werden kann. Der unter diesen Versuchsbedingungen maximal erreichbare Effekt beinhaltet eine ca. 70%ige Hemmung der Neurotransmitteraufnahme durch Hyperforin (siehe Abbildung 4.2).

Es scheint, daß hier Effekte für die Hemmung der Serotoninaufnahme verantwortlich sind, die erst nach längerer Inkubationszeit erreicht werden. Dem Zeitverlauf zufolge könnte es sich hierbei sowohl um die Erhöhung der Natrium- und/oder der Kalziumkonzentration, als auch um die intrazelluläre Alkalisierung handeln, da diese Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen erst nach einigen Inkubationsminuten ihr Maximum erreicht haben.

4.1.2 Zeitabhängigkeit der ³H-Serotoninaufnahmehemmung in Blutplättchen

Wie bereits oben schon angedeutet, war es in dem System der synaptosomalen Aufnahme nicht möglich, die Synaptosomen für die Untersuchung der intrazellulären Ionenkonzentrationen mit Fluoreszenzfarbstoffen bei längeren Inkubationszeiten zu beladen. Ein Grund dürfte die schnell abnehmende Stabilität dieses Modellsystems, ein weiterer die Entstehung toxischer Endprodukte bei der Abspaltung der Acetoxygruppen von den Farbstoffen in den Zellsystemen sein (siehe Kapitel 2. Material und Methoden). Daher wurde auch das periphere Modellsystem für die neuronale Serotoninaufnahme, das Blutplättchen, bezüglich der Zeitabhängigkeit untersucht. Die Thrombozyten wurden hierzu im gleichen Puffer resuspendiert und inkubiert, der auch für die Fluoreszenzmessungen verwendet wurde. Da bei diesen Messungen die höchste Hyperforinkonzentration 10 µM betrug, wurde diese auch allen Versuchsansätzen zugegeben, um einen eventuellen zeitlichen und dosisabhängigen Zusammenhang in beiden Systemen aufzuzeigen.

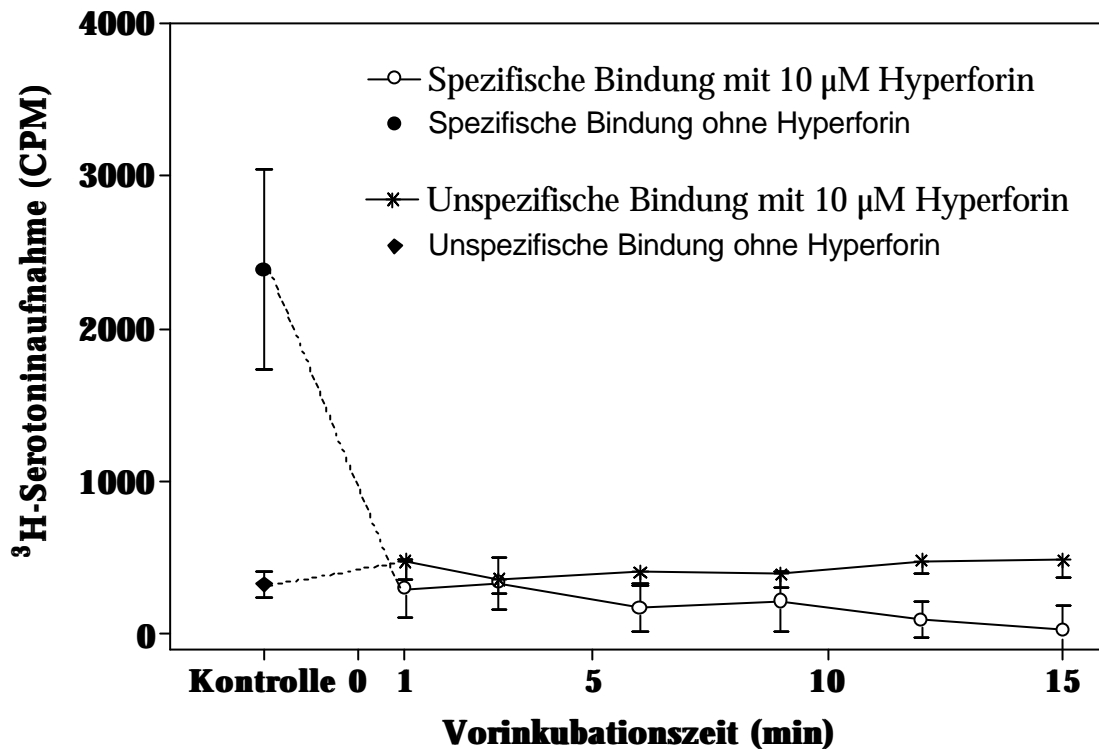


Abbildung 4.3: Hemmung der Serotoninaufnahme in Thrombozyten durch Hyperforin (10 μ M) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 37°C. Kontrollen beziehen sich auf die Neurotransmitteraufnahme ohne Hyperforin bei $t=15$ min. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus sechs unabhängigen Experimenten.

Wie Abbildung 4.3 zu entnehmen ist, zeigt Hyperforin auch in diesem System eine sofortige Wirkung auf die ^3H -Serotoninaufnahme in Thrombozyten, die sich auch nach längerer Inkubationszeit nicht mehr nennenswert verstärkt. Da die Hyperforinkonzentration relativ hoch gewählt war, wurde die Serotonin-Aufnahme nahezu vollständig gehemmt. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Zugabe von Monensin in einer Konzentration von 1 μ M (nicht dargestellt), die in den Messungen zur intrazellulären Natriumkonzentration und des intrazellulären pH-Wertes innerhalb von 15 min zu ähnlichen Effekten wie bei Hyperforinzugabe geführt hatte. Auch Monensin hemmt in der eingesetzten Konzentration die ^3H -Serotoninaufnahme innerhalb von einer Minute nahezu vollständig. Durch diese Untersuchungen stand fest, daß beide Substanzen ihren vollen inhibitorischen Effekt auf die Transmitteraufnahme bereits in den ersten Sekunden nach der Zugabe zum Testsystem entfalteten.

4.1.3 Zeitverlauf der Fluoreszenzmessungen

Um festzustellen, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Serotoninaufnahmemhemmung und der Beeinflussung der Konzentration intrazellulärer Ionen besteht, wurde auch an diesen Systemen der Zeitfaktor detaillierter untersucht. Eine nähere Betrachtung der ersten 150 Sekunden nach der Zugabe von 10 μM Hyperforin, offenbarte, daß bei Erreichen der vollen Serotoninaufnahmemhemmung nach ca. 60 Sekunden die initiale Ansäuerung des Zellinneren bereits ihr Maximum erreicht hatte, nicht jedoch der Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration. Hierzu wurden die Veränderungen von $[\text{Na}^+]_i$ und $[\text{pH}]_i$ im Abstand von jeweils zwei Sekunden 150 Sekunden lang aufgetragen (siehe Abbildung 4.4).

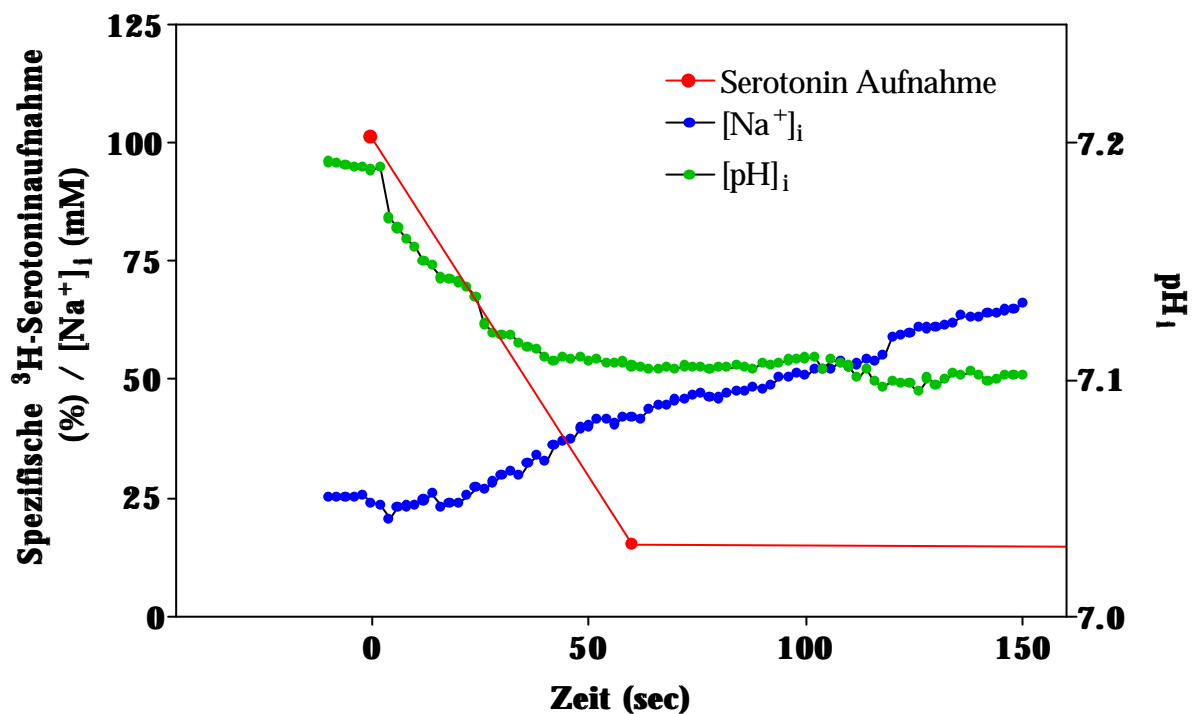


Abbildung 4.4: Darstellung des Zeitverlaufes der Serotoninaufnahme in Plättchen und der Beeinflussung der intrazellulären Natrium- und Protonenkonzentration nach der Zugabe von 10 μM Hyperforin. Die Hyperforinzugabe erfolgte bei $t=0$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 6-10 unabhängigen Versuchen.

Dies könnte zum einen bedeuten, daß der initiale durch Hyperforin hervorgerufene Abfall des intrazellulären pH-Wertes eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Serotoninaufnahme spielt. Zum anderen ist es auch möglich, daß bereits die anfängliche, jedoch nicht maximale Änderung der intrazellulären Natriumkonzentration zu einer deutlichen Hemmung der Serotoninaufnahme führen kann und eine weitere Erhöhung von $[\text{Na}^+]_i$ zu keiner weiteren Verstärkung der Aufnahmemhemmung führt. Möglicherweise ist bereits die Erhöhung der Natriumionenkonzentration auf ca. das Doppelte des Basalwertes ausreichend, um die

Aufnahmehemmung zu erklären. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, daß sich die Hemmung des Serotonin-Uptakes durch Hyperforin auch im weiteren Inkubationsverlauf nicht mehr wesentlich ändert, obwohl die intrazelluläre Natriumkonzentration noch um einiges ansteigt und der pH-Wert in der Zelle über den Basalwert hinaus allmählich alkalischer wird (Abbildung 4.5).

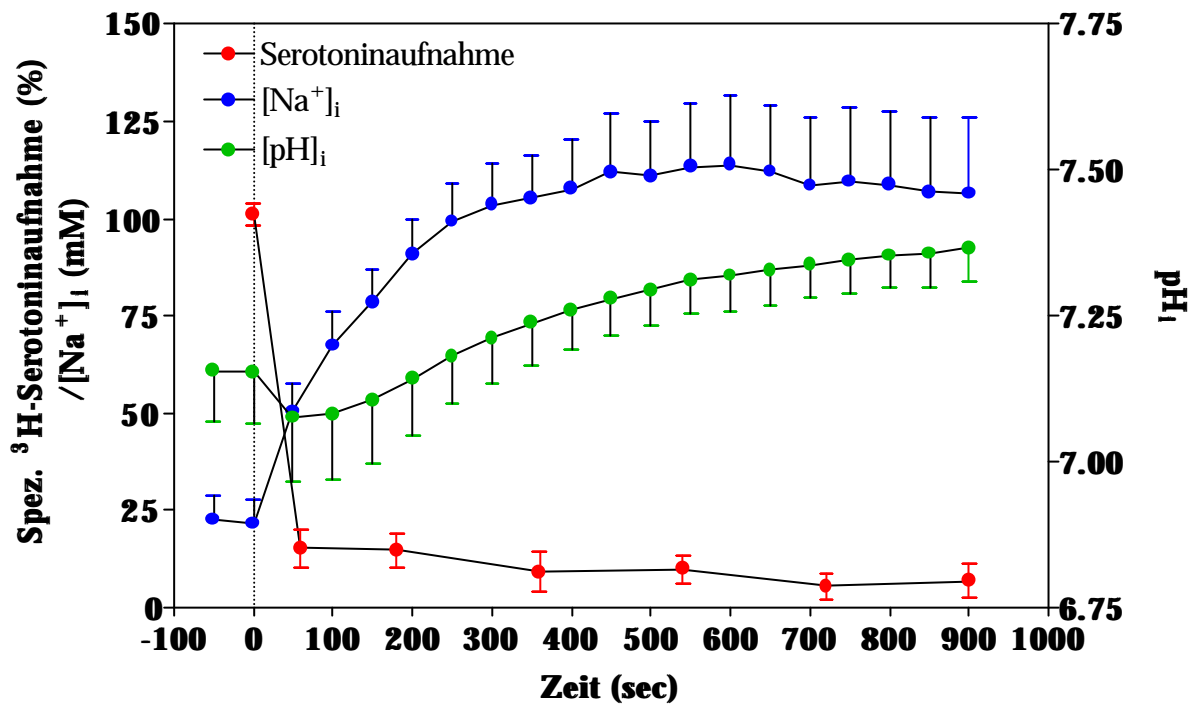


Abbildung 4.5: Paralleler Verlauf der Effekte von 10 µM Hyperforin auf die intrazelluläre Natriumkonzentration, den intrazellulären pH-Wert und die Aufnahme von ³H-Serotonin in menschliche Blutplättchen während einer Inkubationszeit von 15 min bei 37°C. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus 6-10 unabhängigen Versuchen.

4.1.4 Beeinflussung der ³H-Serotoninaufnahme in Thrombozyten durch [Ca²⁺]_i

Die Natriumabhängigkeit der Serotoninaufnahme durch den Serotonintransporter ist schon viele Jahre bekannt und auch der Einfluß des pH-Wertes bzw. der Protonenkonzentration wurde bereits untersucht. Da das Rezeptormolekül auch Bindungsstellen für das Calmodulinsystem besitzt, ist auch eine Abhängigkeit der Transportaktivität von der intrazellulären Kalziumkonzentration wahrscheinlich. Manche der hier durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, daß einige der durch Hyperforin induzierten Effekte von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängen (siehe Kapitel 3. Ergebnisse und Kapitel 4. Nähere Charakterisierung der Einzeleffekte, Punkt 4.2 und 4.3).

Daher wurde untersucht, inwieweit auch die Aufnahme von ^3H -Serotonin in Thrombozyten von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängig ist. Zu diesem Zweck wurden Thrombozyten vor der Durchführung der eigentlichen Radioaktivitätsmessungen mit dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA/AM beladen und dann wie gewohnt die Aufnahme von ^3H -Serotonin in Anwesenheit von Hyperforin bestimmt. Erste Anhaltspunkte, daß die Vitalität der Plättchen oder das Ausmaß der ^3H -Serotoninaufnahme von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängig sein könnten, fanden sich beim Vergleich der maximalen ^3H -Serotoninaufnahme ohne Hyperforinhemmung in normalen und BAPTA-beladenen Plättchen. BAPTA-beladene Plättchen hatten bei sonst identischen Versuchsbedingungen nur 23,09% ^3H -Serotonin in der gleichen Zeit aufgenommen. Daraus resultierte auch ein wesentlich schlechteres Verhältnis zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung. Die unspezifische Bindung betrug bei Messungen in normalen Plättchen 10,7% der Gesamtbindung, in BAPTA-beladenen Plättchen jedoch 38,96%.

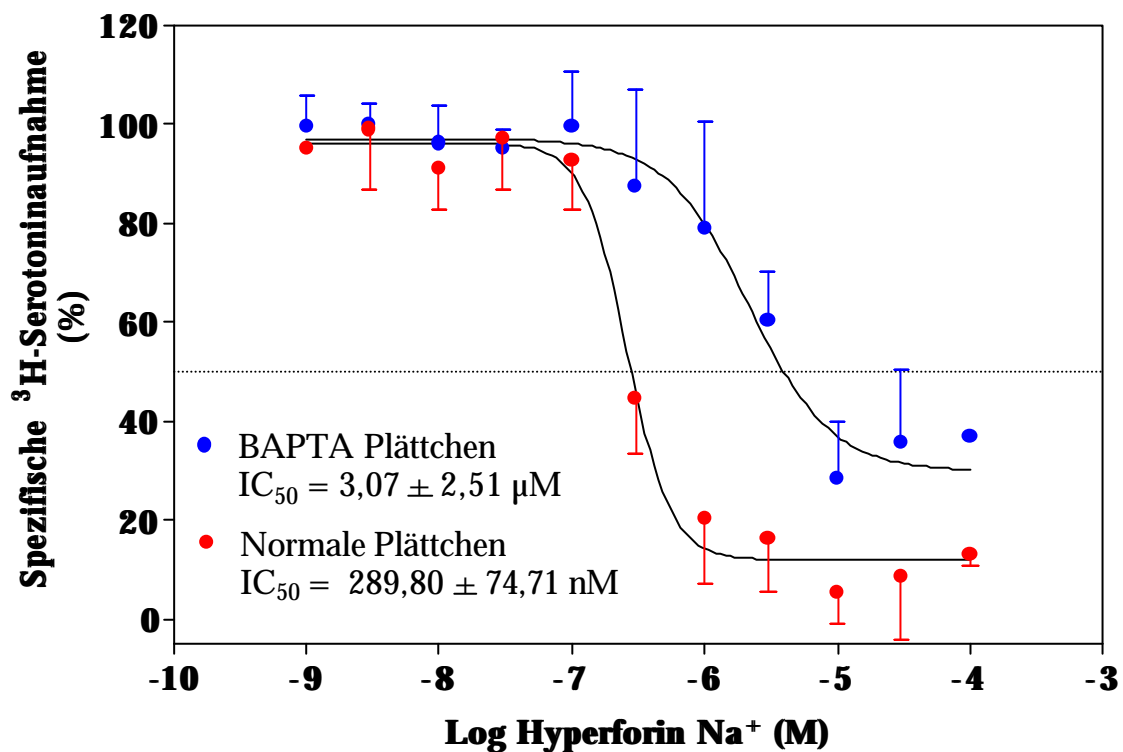


Abbildung 4.6: ^3H -Serotoninaufnahme in BAPTA-beladenen und normalen Thrombozyten unter Zusatz von Hyperforin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus sechs unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich, daß Hyperforin bei Fehlen intrazellulärer Kalziumionen schwächer inhibitorisch auf die Serotoninaufnahme wirken konnte, als unter Standardbedingungen (siehe Abbildung 4.6). Die halbmaximale Hemmkonstante war um eine Zehnerpotenz von $289,80 \pm 74,71$ nM bei Vorhandensein intrazellulärer Kalziumionen auf einen Wert von $3,07 \pm 2,51$

μM nach Chelatierung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch BAPTA verschlechtert. Möglicherweise ist die potente hyperforininduzierte Serotoninaufnahmehemmung von der Anwesenheit intrazellulärer Kalziumionen abhängig, während im höheren Konzentrationsbereich trotz allem eine beträchtliche kalziumunabhängige Hemmung vorhanden ist. Spekulativ könnte auch die in BAPTA-beladenen Plättchen verminderte intrazelluläre Acidifizierung eine Rolle bei der Hemmung der Serotoninaufnahme spielen. Die Serotoninaufnahmehemmung wäre dann von der initialen zytosolischen Ansäuerung und zusätzlich von der Erhöhung der $[\text{Na}^+]_i$ abhängig. In BAPTA-beladenen Plättchen könnte somit nur noch die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentrationen einen Beitrag zur Hemmung der Serotoninaufnahme beitragen, so daß nicht der maximale Effekt erreicht werden kann. Ein Einfluß der extrazellulären Kalziumkonzentration kann ausgeschlossen werden, da im Puffer zur Ermittlung der ^3H -Serotoninaufnahme generell nur nominelle Mengen an Kalzium vorhanden sind.

4.1.5 Amiloridsensitivität der ^3H -Serotoninaufnahme-Hemmung in Thrombozyten

Aufgrund der gefundenen HyperforinEffekte auf die intrazelluläre Natriumkonzentration sollte überprüft werden, ob durch Hyperforin möglicherweise eine Aktivierung des Natrium-Protonen-Exchangers (NHE) erfolgt, welche in einer Erhöhung von $[\text{Na}^+]_i$ resultiert. Ein relativ selektiv NHE-hemmendes Amiloridderivat ist Ethyl-Isopropyl-Amilorid (EIPA), das in einer Konzentration von etwa $1 \mu\text{M}$ bereits eine 100%ige Hemmung von NHE in unterschiedlichen Geweben bewirkt, während andere amiloridsensitive Strukturen wie z.B. epitheliale Natriumkanäle oder Brain Natrium Channels (BNaCs) erst ab Konzentrationen über $10 \mu\text{M}$ deutlich inhibiert werden (Frelin et al., 1988; Sauvaigo et al., 1984). Es war natürlich erforderlich, zuvor zu überprüfen, ob EIPA selbst Effekte auf die ^3H -Serotoninaufnahme in Blutplättchen hat. Das Ergebnis dieser Experimente ist in Abbildung 4.7 dargestellt.

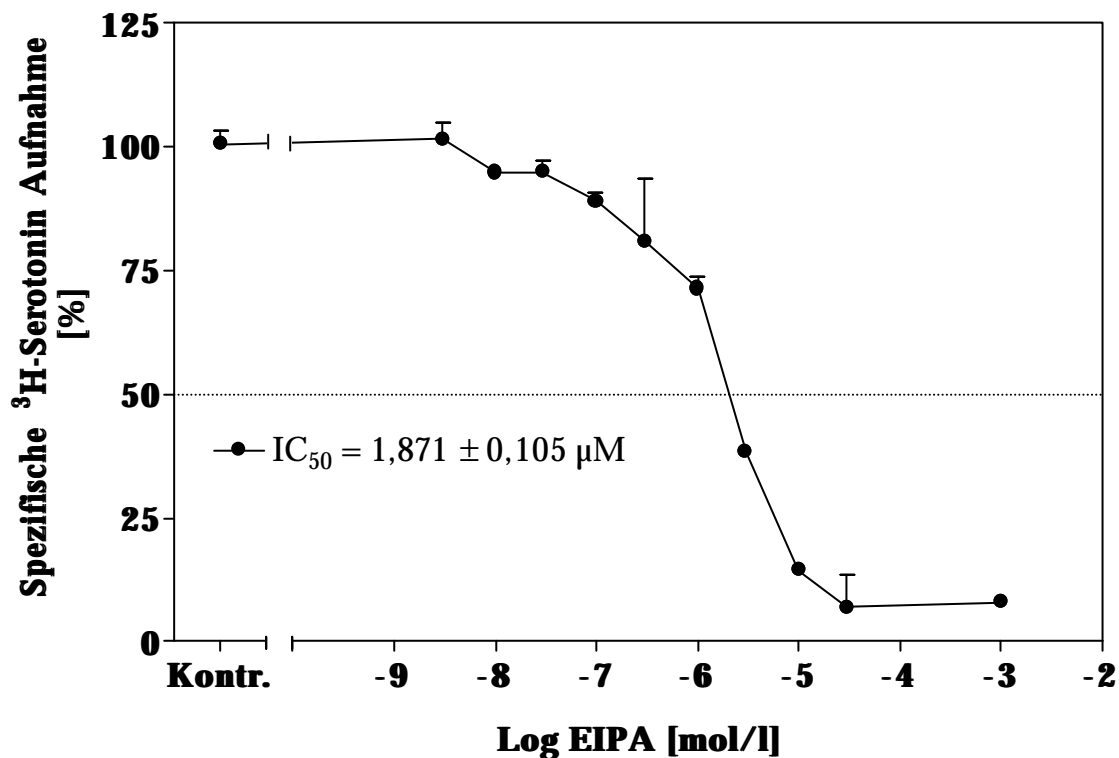


Abbildung 4.7: Konzentrationsabhängige Hemmung der ^3H -Serotonin-Aufnahme in Thrombozyten durch das Amiloridderivat EIPA. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Versuchen.

EIPA hemmt mit einer halbmaximalen Hemmkonstante von $1,871 \pm 0,105 \mu\text{M}$ die Aufnahme von ^3H -Serotonin in menschliche Thrombozyten. Diese Hemmung ist wahrscheinlich unspezifischer Natur. Für das weitere Vorgehen bedeutete dies, daß die

einsetzbare EIPA-Konzentration deutlich unterhalb 1 μM liegen mußte, um nicht die Hyperforineffekte zu maskieren. Wie Abbildung 4.7 außerdem zu entnehmen ist, führt die EIPA-Zugabe nicht, wie vielleicht erwartet zu einer Erhöhung der ^3H -Serotoninaufnahme. Dies wäre der Fall, wenn die EIPA-induzierte NHE-Hemmung zu einer Erniedrigung der intrazellulären Natriumkonzentration und damit zu einer Erhöhung des Natriumgradienten, der treibenden Kraft für die ^3H -Serotoninaufnahme, führen würde. Möglicherweise ist der Natriumgradient auch schon unter physiologischen Bedingungen groß genug, um einen maximalen Uptake von ^3H -Serotonin zu gewährleisten und kann daher durch Substanzen, welche die intrazelluläre Natriumkonzentration senken nicht noch weiter verstärkt werden. Dafür würde auch die Tatsache sprechen, daß der NHE unter physiologischen Bedingungen nicht voll aktiviert ist, da seine vorrangige Aufgabe die Wiederherstellung des basalen pH-Wertes ist und er daher hauptsächlich nach einer Ansäuerung des Zellinneren aktiviert wird.

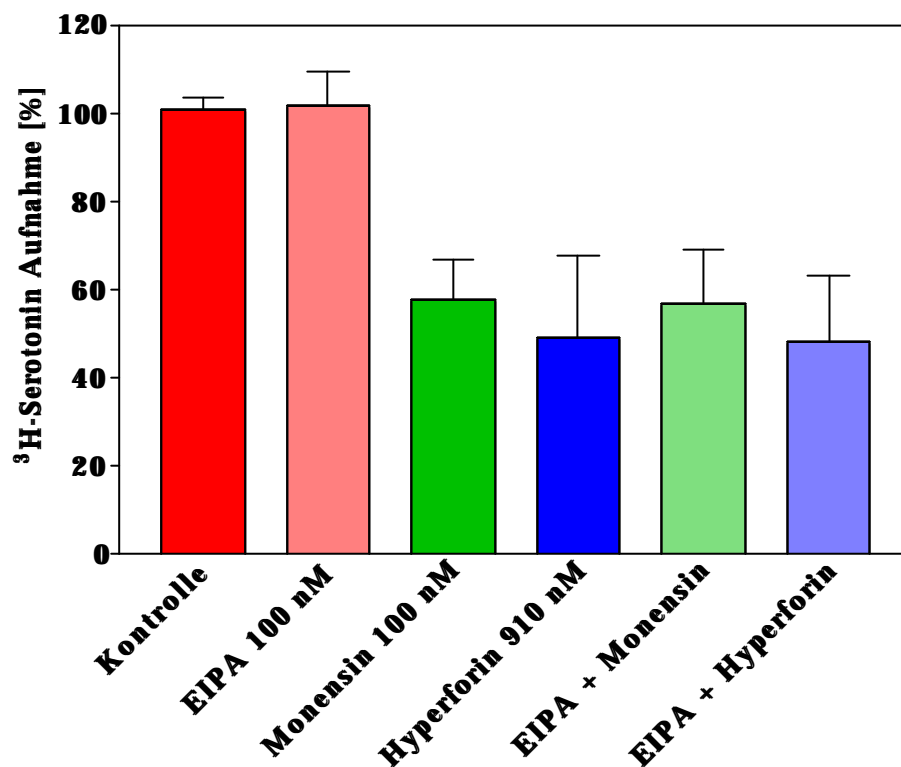


Abbildung 4.8: Vorinkubation von Thrombozyten mit EIPA (100 nM), Hyperforin (910 nM) und Monensin (100 nM) und Kombination von EIPA mit Monensin oder Hyperforin und Bestimmung der ^3H -Serotoninaufnahme. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus zwölf unabhängigen Experimenten.

Da eine EIPA-Konzentration von 100 nM noch keine wesentlichen Hemmung der Serotoninaufnahme verursachte (siehe Abbildung 4.7 und 4.8) wurde diese Konzentration für die Durchführung der Kombinationsexperimente gewählt. Bei einer Messung wurden jeweils

ein Triplikat nur mit Hyperforin, Monensin oder EIPA alleine und EIPA in Kombination mit derselben Konzentration an Monensin oder Hyperforin inkubiert. Die zugesetzten Mengen an Monensin und Hyperforin hemmten die ^3H -Serotoninaufnahme zu 55,16% bzw. 49,16%. Durch die Kombination mit EIPA erhielt man ähnliche Hemmungen für die Kombination Monensin + EIPA 52,32% und für Hyperforin + EIPA 48,20% (siehe Abbildung 4.8).

EIPA war damit nicht in der Lage die ^3H -Serotoninaufnahmehemmung durch Hyperforin in irgendeiner Weise zu beeinflussen, obwohl eine Konzentration von 100 nM EIPA im Prinzip eine ausreichende Hemmung des NHE bewirken sollte. Höhere EIPA-Konzentrationen konnten aufgrund der unspezifischen Eigenhemmung der Neurotransmitteraufnahme durch die Substanz nicht verwendet werden, da hierbei eine additive Hemmung der Serotoninaufnahme beobachtet wurde. Der hyperforininduzierte Effekt auf die ^3H -Serotoninaufnahme könnte damit entweder nicht durch eine NHE-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration induziert werden oder die verwendete EIPA-Konzentration ist in diesem System zu gering, um eine Beeinflussung des NHE zu bewirken.

4.2 Untersuchungen zum Mechanismus der erhöhten intrazellulären Natriumkonzentration durch Hyperforin

4.2.1 Abhängigkeit des Effektes von der extrazellulären Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentration

Da menschliche Blutplättchen keinen intrazellulären Speicherort für Natrium besitzen, war es zu erwarten, daß die Erhöhung der Natriumkonzentration in der Zelle in direkter Beziehung zur Natriumkonzentration im Inkubationsmedium steht. Diese Experimente wurden parallel zur Untersuchung der Natriumabhängigkeit des pH-Effektes gemacht und werden hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt. Zur Herstellung des natriumfreien Außenmediums wurde NaCl in äquimolaren Konzentrationen entweder durch Cholinchlorid oder Tetramethylammoniumchlorid (TMA), bei sonst gleichbleibender Pufferzusammensetzung, ersetzt. Wie erwartet, konnte man in natriumfreiem Puffer nur einen schwachen Effekt auf die intrazelluläre Natriumionenkonzentration nach der Zugabe von 10 μM Hyperforin beobachten. Eine sehr schwache Erhöhung von $[\text{Na}^+]_i$ um ca. 10 mM über den Basalwert kommt möglicherweise durch das Natriumgegenion des Hyperforin-Natriumsalzes zustande (Ergebnisse nicht dargestellt).

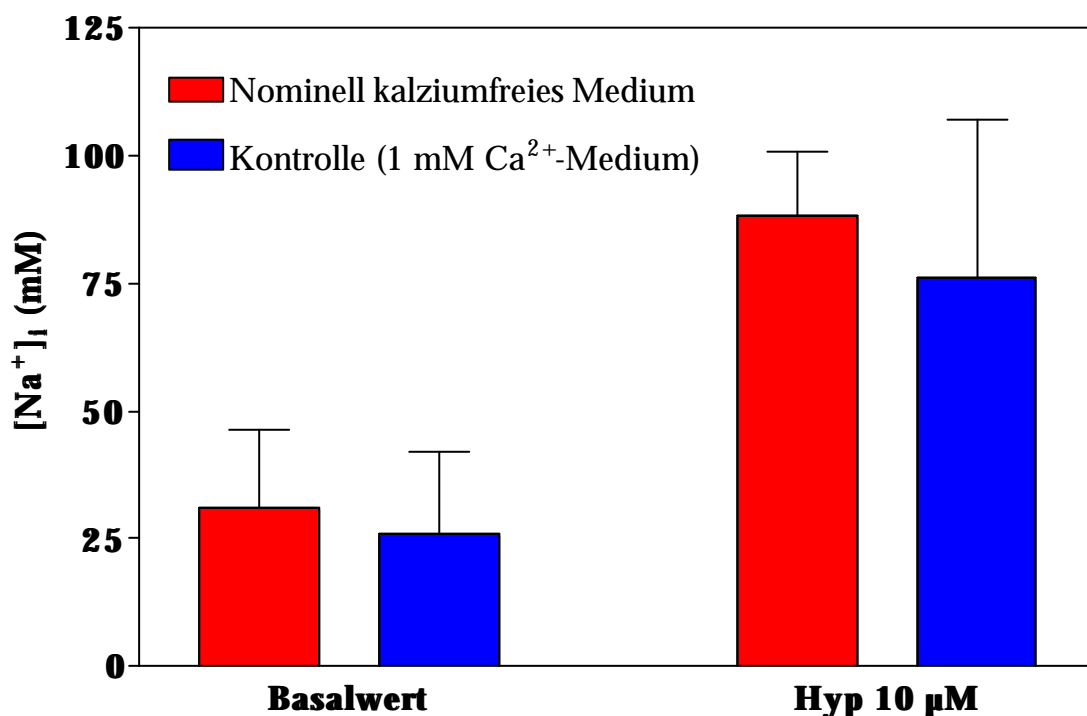


Abbildung 4.9: Erhöhung von $[\text{Na}^+]_i$ durch 10 μM Hyperforin in kalziumhaltigem und nominell kalziumfreiem Inkubationspuffer nach 15 Minuten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus fünf unabhängigen Experimenten.

Analoge Messungen in nominell kalziumfreiem Außenmedium zeigten, daß der durch Hyperforin ausgelöste Effekt auf die intrazelluläre Natriumkonzentration auch nicht von der Anwesenheit des Kalziums im Inkubationspuffer abhängig war. In kalziumhaltigem (1 mM) sowie nominell kalziumfreiem Medium wurden für alle Hyperforinkonzentrationen identische Erhöhungen von $[Na^+]_i$ gefunden. Exemplarisch sind diese Befunde für eine Hyperforinkonzentration von 10 μM in Abbildung 4.9 dargestellt. Somit scheint kein Zusammenhang zwischen der Erhöhung von $[Na^+]_i$ und $[Ca^{2+}]_i$ bzw. der extrazellulären Kalziumkonzentration zu bestehen. Ein Einwärtstransport von Natrium über den Na^+/Ca^{2+} -Exchanger ist daher unwahrscheinlich.

4.2.2 Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration

Wie in Kapitel 3. Ergebnisse beschrieben, zeigt Hyperforin Effekte auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration, die sowohl von einem Einstrom aus dem Extrazellularraum als auch von einer Freisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern getragen werden. Daher war es von Interesse, neben der Abhängigkeit des Natriumsignals von der extrazellulären Kalziumkonzentration auch den Zusammenhang zwischen intrazellulärer Kalziumkonzentration und der Erhöhung von $[Na^+]_i$ zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Plättchen nach der Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff noch für 20 Minuten mit einem Chelator des intrazellulären Kalziums, mit BAPTA/AM (siehe Kapitel 2. Material und Methoden), beladen. Da der Natriumfarbstoff SBFI allgemein etwas empfindlicher auf die Zugabe verschiedener Substanzen reagierte, war es zu erwarten, daß das Fluoreszenzsignal mit BAPTA-beladenen Plättchen nicht mehr aussagekräftig war. Aus diesem Grunde war es nicht möglich, Messungen unter diesen Bedingungen vorzunehmen, so daß hier auf die pH-Wert-Messungen mit BAPTA-beladenen Plättchen verwiesen werden muß.

4.2.3 pH-Abhängigkeit der $[Na^+]_i$ -Erhöhung

Da die Aktivität verschiedener Transportsysteme, wie die des Natrium-/Protonenaustauschers, vom extrazellulären pH-Wert abhängt, wurde weiter untersucht, inwieweit die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration durch Hyperforin vom pH-Wert im Außenmedium abhängig ist. Hierzu wurde der normale Inkubationspuffer mit NaOH/HCl auf vier verschiedene pH-Werte eingestellt und die Messung unter Zugabe von jeweils 10 μM Hyperforin bzw. 1 μM Monensin durchgeführt (Abbildung 4.10).

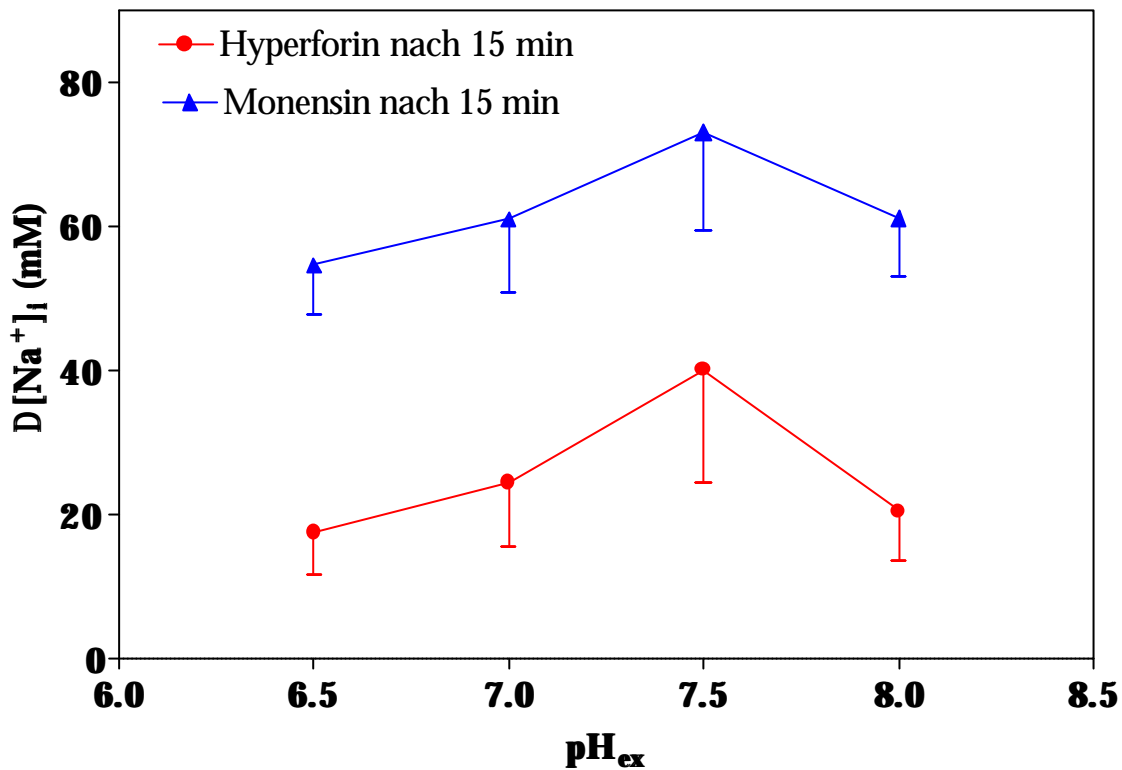


Abbildung 4.10: Änderung der intrazellulären Natriumkonzentration durch 10 μM Hyperforin und 1 μM Monensin in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus fünf unabhängigen Experimenten.

Erwartungsgemäß führte die Zugabe des Natrium-/Protonen-Ionophors Monensin zu einem insgesamt höheren Anstieg von $[\text{Na}^+]_i$, der am ausgeprägtesten bei einem physiologischen pH-Wert von 7,5 bei 37°C, also deutlich pH-abhängig war. Hyperforin führte zwar zu einem geringeren Natriumanstieg in der Zelle, zeigte aber ansonsten ein völlig identisches Profil. Auch die hyperforininduzierte intrazelluläre Natriumerhöhung zeigte bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,5 ein Maximum.

Ausgehend von der Tatsache, daß Monensin die Ionenbewegungen des NHE „nachahmen“ kann ohne diesen direkt zu beeinflussen, könnte die Änderung der intrazellulären Natriumkonzentration durch Hyperforin entweder auf einen ähnlichen Mechanismus oder auf eine Aktivierung des NHE zurückzuführen sein. Ersterem steht entgegen, daß Hyperforin in sehr hohen Konzentrationen eine reverse U-förmige Kurve zeigt, also ab einer bestimmten Konzentration zu keiner weiteren $[\text{Na}^+]_i$ -Erhöhung mehr führt, während Monensin bei einer Dosissteigerung zu einem vollständigen Ausgleich von intra- und extrazellulären Natriumkonzentration führt (siehe Kapitel 3. Ergebnisse).

4.2.4 Amiloridsensitivität der Hyperforineffekte auf $[Na^+]_i$

Ein Kennzeichen der meisten Isoformen des NHE ist die Hemmbarkeit durch Amiloridanaloga, obwohl einige Isoformen nur in sehr hohen Konzentrationen durch Amiloride inhibierbar sind. Von dem hauptsächlich in menschlichen Thrombozyten vorkommenden NHE1 ist bekannt, daß er amiloridsensitiv ist. Daher wurde untersucht, inwieweit sich die hyperforininduzierte Erhöhung von $[Na^+]_i$ durch das Amiloridderivat N-Hexamethylenamilorid (NHA), welches relativ selektiv den NHE hemmt, aufheben läßt (Brierley et al., 1989). NHA war zudem das einzige Amilorid, das bei den Fluoreszenzmessungen verwendet werden konnte, da andere bekannte Derivate, wie häufig in der Literatur beschrieben, mit den Fluoreszenzfarbstoffen interferierten und so keine brauchbare Messung zuließen. Dieses Problem war leider auch bei der Bestimmung der Natriumkonzentration mit dem Farbstoff SBFI gegeben, so daß hier auf die pH-Wert-Messungen mit dem pH-Farbstoff BCECF verwiesen werden muß. Versuche, den NHE1-spezifischen Inhibitor Cariporid zu verwenden, scheiterten daran, daß diese Substanz in dem hier verwendeten System keinerlei Aktivität aufwies (Abbildung 4.11). Erklärt werden könnte diese Beobachtung mit dem basalen pH-Wert der verwendeten Thrombozyten. Da der NHE bei diesen physiologischen pH-Werten praktisch inaktiv ist, kann ein Hemmstoff wie Cariporid hier keine Effektivität zeigen.

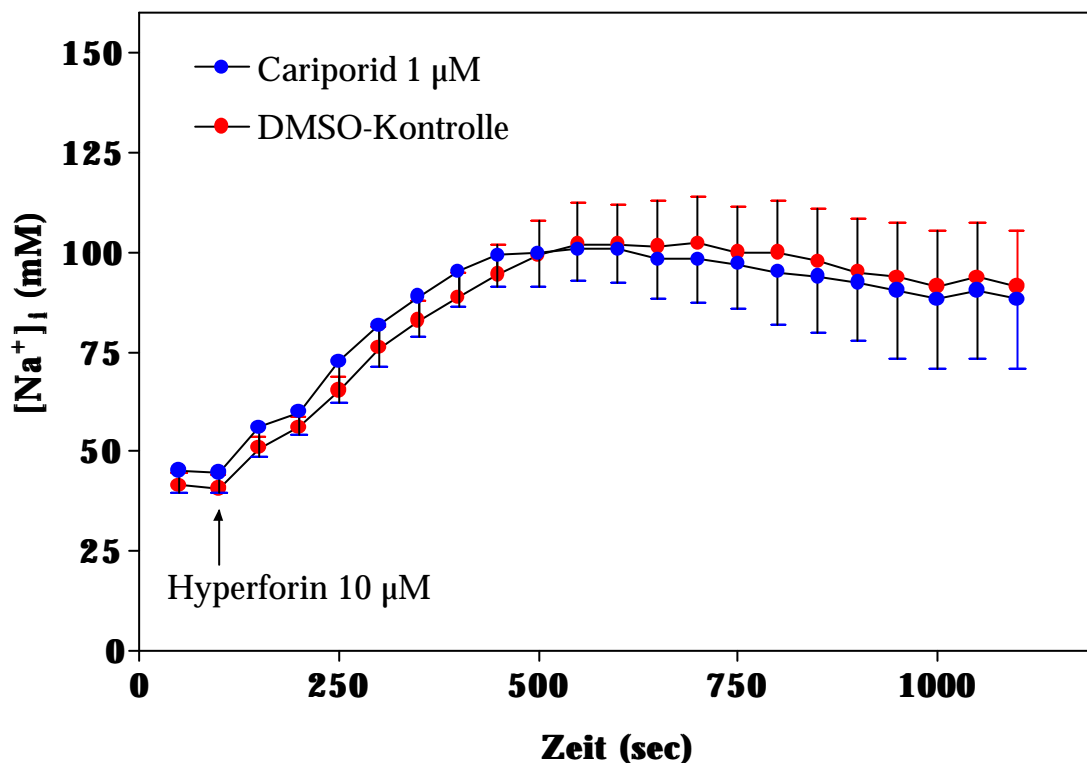


Abbildung 4.11: Beeinflussung der hyperforininduzierten Natriumerhöhung durch den NHE1-spezifischen Inhibitor Cariporid. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus fünf unabhängigen Versuchen.

4.2.5 Beteiligung nicht-selektiver Kationenkanäle

Aufgrund verschiedener Befunde wie der Natriumunabhängigkeit des hyperforininduzierten pH-Effektes (siehe Punkt 4.3.5 Natriumabhängigkeit des pH-Effektes) und der fehlenden Beeinflussung der $[Ca^{2+}]_i$ durch die extrazelluläre Natriumkonzentration (siehe Punkt 4.4.2 Natriumabhängigkeit der hyperforininduzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung), können der Na^+/H^+ - und der Na^+/Ca^{2+} -Exchanger als beteiligte Strukturen nahezu ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Weg, über den ein Influx von Natrium- aber auch Kalziumionen in die Zelle möglich ist, ist die Aktivierung eines nicht-selektiven Kationenkanals (engl. Non-selective cation channel, NSC). Die Aktivierung des NSC ist durch die Substanz SK&F 96365 inhibierbar (siehe Kapitel 2. Material und Ergebnisse). Daher wurde untersucht, inwieweit die hyperforininduzierte Erhöhung der $[Na^+]_i$ durch SK&F 96365 gehemmt werden kann. Zur Durchführung dieser Experimente wurde SK&F 96365 in einer Konzentration von 20 μM 100 Sekunden vor der Hyperforinzugabe dem Versuchsansatz hinzugegeben und die Änderung der intrazellulären Natriumkonzentration 15 Minuten lang beobachtet.

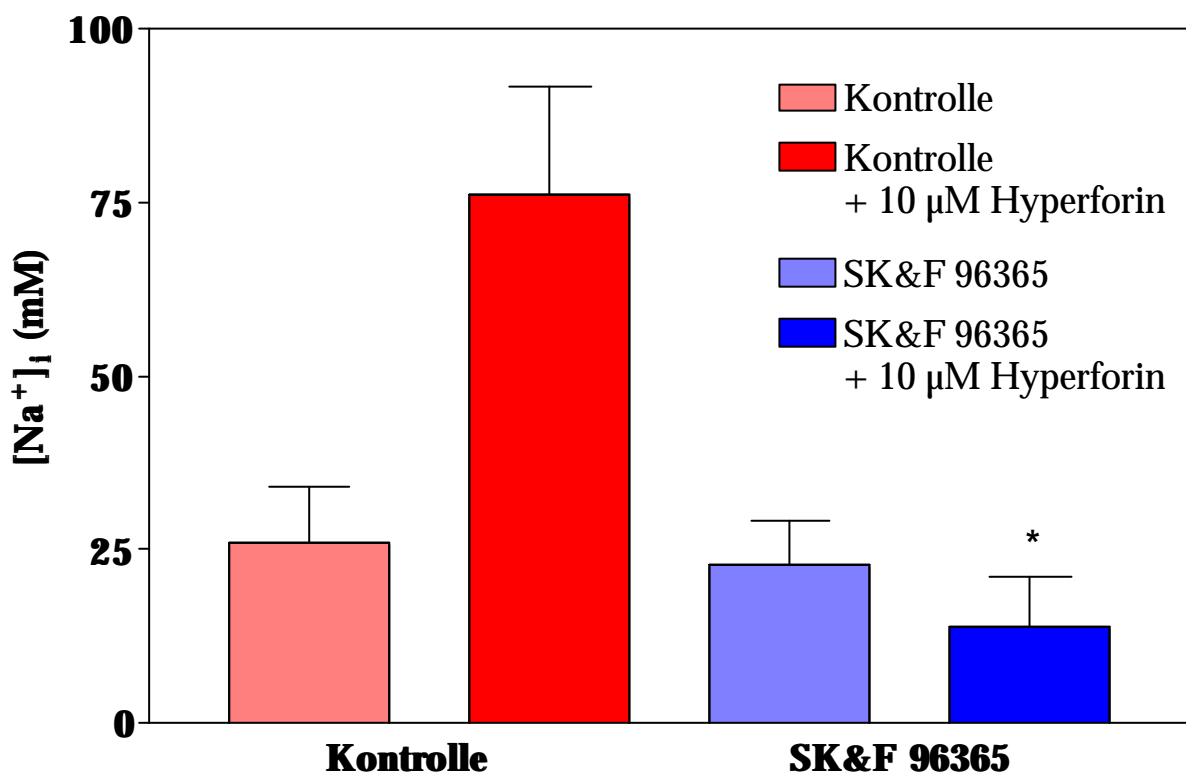


Abbildung 4.12: Beeinflussung der hyperforininduzierten Erhöhung der $[Na^+]_i$ durch SK&F 96365 am Endpunkt der Messung nach 15 Minuten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus fünf unabhängigen Experimenten. * bedeutet eine Signifikanz bei $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

Wie in Abbildung 4.12 dargestellt führt die Zugabe von 10 μM Hyperforin zu einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration auf einen Wert von $76,09 \pm 30,97$ mM. Diese Erhöhung von $[\text{Na}^+]_i$ wird durch 20 μM SK&F 96365 vollständig inhibiert, und nach 15minütiger Inkubationszeit lag die intrazelluläre Natriumkonzentration mit $13,81 \pm 14,67$ teilweise sogar unter dem anfänglichen Basalwert von $22,96 \pm 12,27$. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei geringeren Hyperforinkonzentrationen beobachtet werden. Diese Befunde bestätigen, daß das gesamte Ausmaß der erhöhten Natriumkonzentration nach Hyperforinzugabe durch den Influx von Natriumionen durch nicht-selektive Kationenkanäle getragen wird, und daß weder der NHE noch der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchanger eine Rolle bei der hyperforininduzierten $[\text{Na}^+]_i$ -Erhöhung spielt.

4.3 Charakterisierung des Effektes von Hyperforin auf pH_i

4.3.1 Abhängigkeit des hyperforininduzierten pH-Effektes von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Die hier durchgeführten Versuche wurden in Analogie zu den oben beschriebenen Natriummessungen in kalziumfreien, EGTA-gepuffertem Medium durchgeführt, dessen Zusammensetzung ansonsten identisch mit dem kalziumhaltigen Inkubationspuffer war. Auch bei den pH-Wert-Messungen zeigte sich, daß der hyperforininduzierte pH-Effekt kalziumunabhängig war. Sowohl der biphasische Verlauf bei hohen Hyperforindosen von 10 μM , als auch die konstante Acidifizierung des Zellinneren bei Verwendung niedrigerer Konzentrationen von 0,3-3 μM war in kalziumfreien Puffer konsistent (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.3.2 Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration

Anders als bei den Messungen zu $[\text{Na}^+]_i$ war es bei den BCECF-beladenen Plättchen möglich auch nach nachfolgender Beladung mit 500 μM BAPTA/AM noch ein vernünftiges Fluoreszenzsignal zu erhalten. Auffällig war jedoch, daß der basale intrazelluläre pH-Wert der Plättchen mit einem Wert von $7,13 \pm 0,05$ im Vergleich zu den nur mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Plättchen ($7,36 \pm 0,06$) deutlich saurer war. Diese Beobachtung ist bereits in der Literatur beschrieben worden (Poch et al., 1993) und scheint darauf hinzudeuten, daß die intrazelluläre Kalziumkonzentration bei der Regulation des intrazellulären pH-Wertes eine Rolle spielt. Eine Abweichung des Basalwertes sowie der Auswirkungen der verschiedenen Hyperforindosen bei Messungen in normal beladenen Plättchen im Vergleich mit vorherigen Messungen könnte im Zusammenhang mit der verlängerten Beladungszeit auf insgesamt 50 Minuten stehen.

Wie in Abbildung 4.13 dargestellt, verhindert bzw. vermindert die Komplexierung des intrazellulären Kalziums die durch Hyperforin hervorgerufene Ansäuerung sowohl bei Verwendung von 10 als auch bei 1 μM Hyperforin. Die hyperforininduzierte (10 μM) initiale Erniedrigung des pH-Wertes um $-0,12 \pm 0,04$ pH-Einheiten unter Normbedingungen wird in BAPTA-beladenen Plättchen auf einen Wert von $-0,02 \pm 0,01$ pH-Einheiten reduziert. Auch bei Zugabe von 1 μM Hyperforin wird die Ansäuerung in BAPTA-beladenen Plättchen sowohl nach 15 Minuten ($-0,17 \pm 0,07$ pH-Einheiten bei Normbedingungen; $0,01 \pm 0,02$ pH-Einheiten in BAPTA-beladenen Plättchen) als auch 50 Sekunden nach Hyperforinzugabe gegenüber normalen Plättchen vermindert ($\Delta \text{pH} = -0,09 \pm 0,03$ in normalen Plättchen gegenüber $0,005 \pm 0,004$ in BAPTA-beladenen Plättchen).

Die Alkalisierung bei Hyperforindosen von 10 μM wird dagegen in keinster Weise beeinflusst ($\Delta \text{pH}_i = 0,18 \pm 0,02$ in normalen Plättchen und $0,19 \pm 0,06$ in BAPTA-beladenen Plättchen).

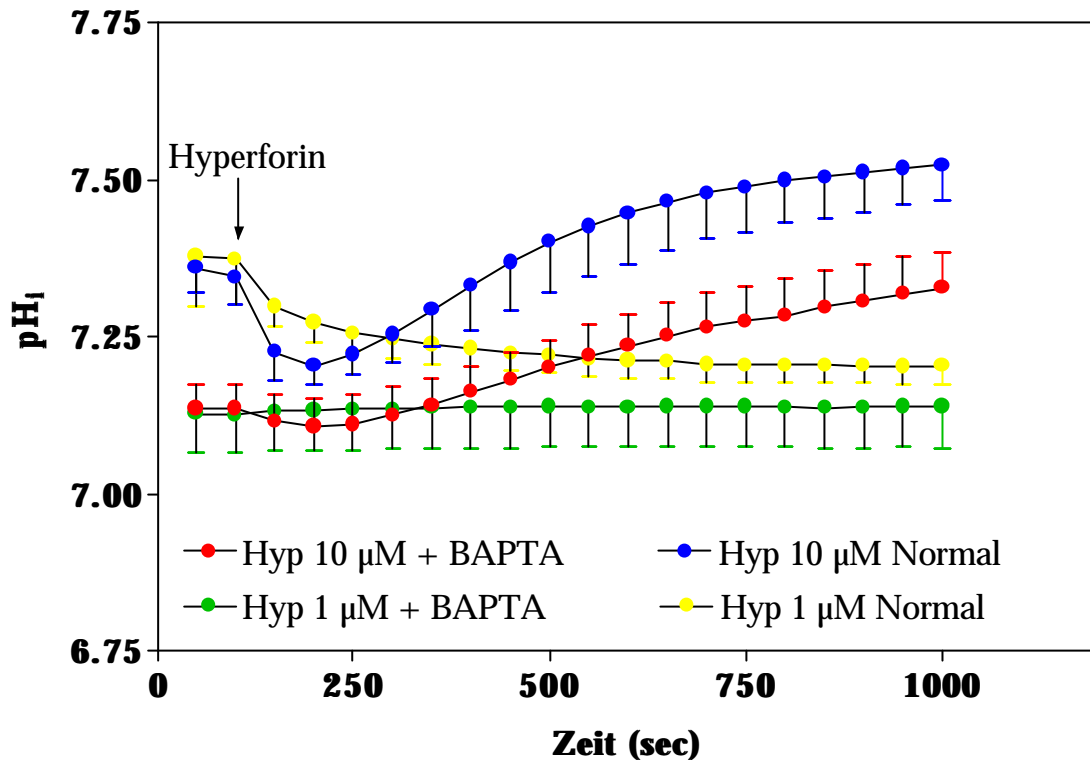


Abbildung 4.13: Vergleichende Messung des intrazellulären pH-Wertes in normalen und in BAPTA-beladenen Plättchen nach der Zugabe von entweder 10 oder 1 μM Hyperforin in kalziumfreiem, EGTA-gepuffertem Medium. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 5-6 unabhängigen Messungen.

Da schon der Basalwert nach der Chelatierung des intrazellulären Kalziums durch BAPTA beeinträchtigt bzw. beeinflusst wurde, erscheint es nicht allzu verwunderlich, daß der hyperforininduzierte pH-Effekt ebenfalls von der intrazellulären Kalziumkonzentration abzuhängen scheint. Zumindest die durch Hyperforin verursachte Ansäuerung steht in Zusammenhang mit der intrazellulären Kalziumkonzentration und ist demzufolge verschwunden, wenn kein freies Kalzium in der Zelle verfügbar ist. Da in diesem System sowohl intra- als auch extrazellulär praktisch völlig kalziumfrei gearbeitet wurde, konnte hiermit nochmals gezeigt werden, daß die durch 10 μM Hyperforin verursachte Alkalisierung nicht von dem Vorhandensein von Kalziumionen abhängig ist (siehe vorheriges Kapitel).

Um den Effekt der intrazellulären Kalziumchelatierung auf die Serotoninaufnahme zu überprüfen, wurde die ^3H -Serotoninaufnahme in BAPTA-beladenen Plättchen untersucht (siehe Kapitel 4.1).

4.3.3 pH-Abhängigkeit der Hyperforineffekte

Möglicherweise ist jedoch auch der saurere basale pH-Wert in BAPTA-beladenen Plättchen für die fehlende intrazelluläre Ansäuerung nach Hyperforinzugabe verantwortlich, da es denkbar wäre, daß Hyperforin in bereits saurem Medium nicht zu einer Acidifizierung gleichen Ausmaßes führt wie in alkalischerem Milieu. Um dies und darüber hinaus die pH-Abhängigkeit der hyperforininduzierten Änderungen der Protonenkonzentration zu untersuchen, wurden die Plättchen in Inkubationspuffern mit unterschiedlichen pH-Werten suspendiert. Es zeigte sich, daß der intrazelluläre pH-Wert stark von der extrazellulären Protonenkonzentration abhängt (Abbildung 4.14). Es ergab sich eine lineare Beziehung zwischen intra- und extrazellulärem pH-Wert in Thrombozyten mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,9995$.

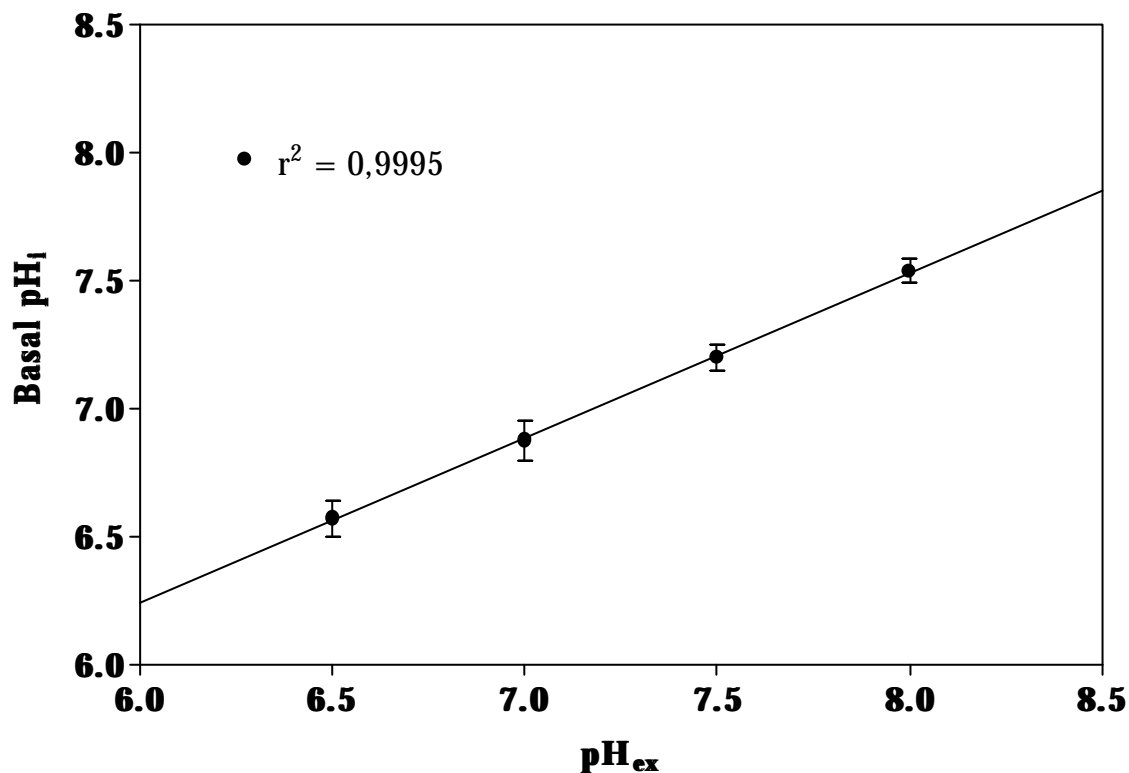


Abbildung 4.14: Lineare Beziehung zwischen unterschiedlichen extrazellulären pH-Werten bei 37°C und den resultierenden intrazellulären Basalwerten in menschlichen Thrombozyten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus zehn unabhängigen Messungen.

Thrombozyten scheinen somit in der Lage zu sein, innerhalb von wenigen Minuten eine Anpassung des intrazellulären pH-Wertes an die äußeren Gegebenheiten durchzuführen. Sie besitzen somit eine gewisse Pufferkapazität und sind nicht auf die strikte Einhaltung eines physiologischen pH-Wertes von etwa 7,4 angewiesen. Im Bereich von pH_{ex} 6,5-7,0 erfolgt eine nahezu vollständige Anpassung des intrazellulären pH-Wertes an den vorherrschenden

extrazellulären pH-Wert. Erst ab einem extrazellulären pH-Wert von 7,5 wird mit Hilfe verschiedener Transporter und Kanäle der basale intrazelluläre pH-Wert in einem Bereich von 7,2-7,5 konstant gehalten und so eine weitere intrazelluläre Alkalisierung in basischeren Puffern verhindert.

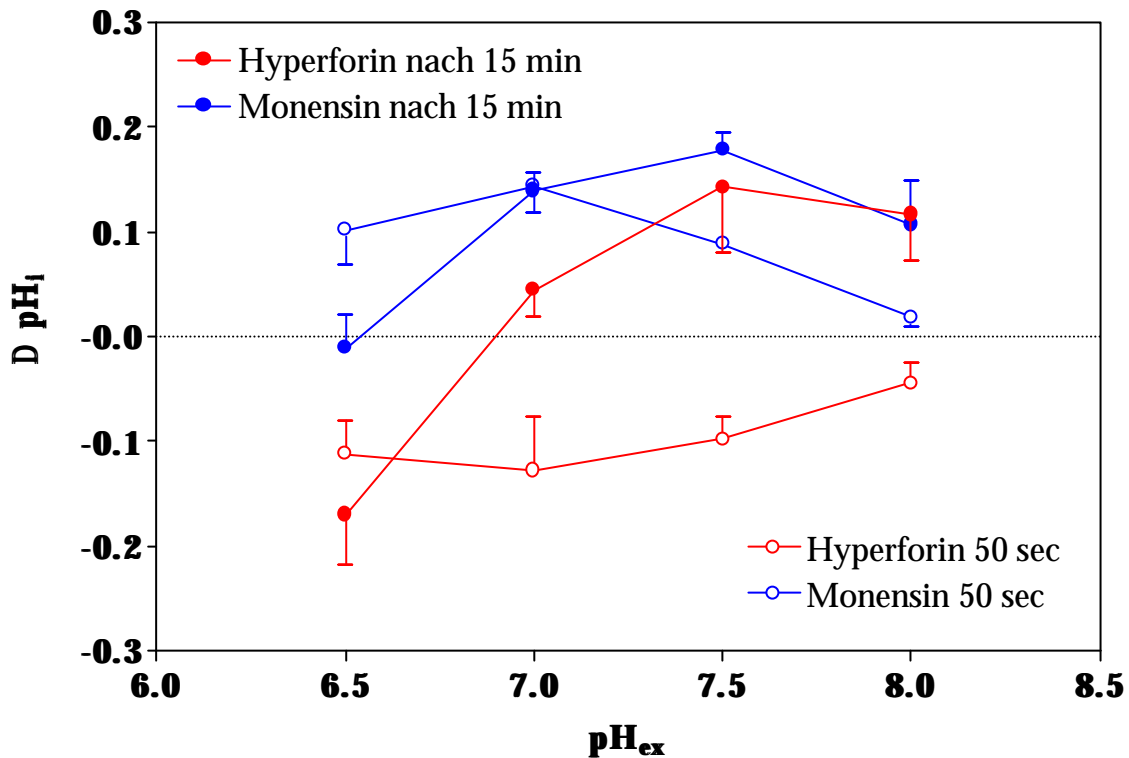


Abbildung 4.15: pH-Effekte von 10 μM Hyperforin und 1 μM Monensin in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus fünf unabhängigen Messungen.

Anhand den in Abbildung 4.15 dargestellten Experimente konnte gezeigt werden, daß Hyperforin auch bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,5 noch in der Lage war, eine Ansäuerung des Zellinneren zu induzieren. Nach 50 Sekunden bewegte sich die hyperforininduzierte initiale Ansäuerung bei allen extrazellulären pH-Werten im Bereich von -0,04 bis -0,13. Die schwächste Acidifizierung wurde bei extrazellulären pH-Werten von 8,0 gemessen, während sie im sauren Milieu (pH_{ex} 6,5-7,0) am stärksten ausgeprägt und bei $\text{pH}_{\text{ex}} = 6,5$ auch stabil war. Die durch BAPTA erniedrigten intrazellulären Basalwerte konnten somit nicht für das Verschwinden der initialen Hyperforineffekte bzw. der generellen Ansäuerung durch niedrigere Hyperforinkonzentrationen verantwortlich gemacht werden.

Sowohl Hyperforin als auch Monensin zeigten die stärkste Alkalisierung, in Analogie zur pH-Abhängigkeit der Natriumeffekte, bei einem physiologischen pH-Wert von 7,5 nach 15 Minuten. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen den $[\text{Na}^+]_i$ -Erhöhungen und der intrazellulären Alkalisierung verursacht durch jeweils beide Substanzen nach jeweils 15 min

Inkubationszeit hindeuten. Da dieses Profil auch bei dem exchangerunabhängigen Ionophor Monensin zutrifft, könnte damit eine Abhängigkeit des Natriumeffektes vom bestehenden Protonengradienten ausgedrückt werden (siehe Abbildung 4.15).

4.3.4 Amiloridsensitivität der hyperforininduzierten pH-Wert Beeinflussung

Wie oben bereits ausgeführt, könnte ein Angriffsort des Hyperforins der NHE und damit dessen Aktivierung sein. Da eine intrazelluläre Ansäuerung zu einer Aktivierung des NHE führt, könnte die initiale Acidifizierung durch 10 μM Hyperforin möglicherweise zu einer sekundären Aktivierung des NHE und damit zu einem Anstieg von $[\text{Na}^+]_i$ und pH_i führen. Eine Möglichkeit, diese Vermutung zu überprüfen, ist die Inhibierung des NHE durch Amiloride oder Cariporid vor der Zugabe von Hyperforin. Wenn Hyperforin wirklich über eine NHE-Aktivierung intrazelluläres Natrium und den pH-Wert beeinflusst, müßten sowohl die hyperforininduzierte Alkalisierung als auch die Natriumerhöhung nach vorheriger Inhibierung durch oben genannte Substanzen vermindert oder gehemmt sein. Da eine Verwendung des Amiloridderivates NHA, aufgrund von Inkompatibilitäten bei der Natriummessung nicht möglich war, wurde dies bei dem weniger empfindlichen pH-Farbstoff BCECF versucht. NHA wurde dem Versuchsansatz in Konzentrationen von 1-30 μM 100 Sekunden vor der Hyperforinzugabe zugegeben. NHA selbst hatte nur geringfügige Effekte auf die Ratio bzw. auf den basalen pH-Wert in der Zelle (Abbildung 4.16).

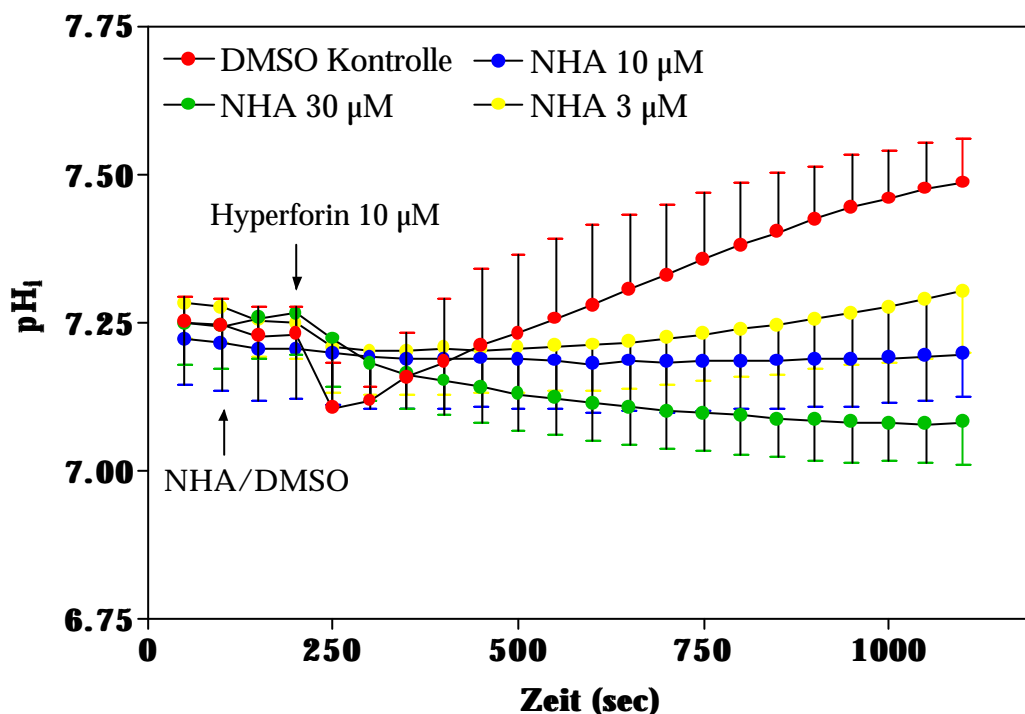


Abbildung 4.16: Beeinflussung der hyperforininduzierten biphasischen Änderung des intrazellulären pH-Wertes in menschlichen Thrombozyten durch das Amiloridderivat NHA. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von 5-6 unabhängigen Messungen in kalziumhaltigem Medium.

Da NHA in reinem DMSO gelöst war, wurde als Kontrolle bei der Messung des Effektes von 10 μM Hyperforin anstatt NHA DMSO verwendet, um einen eventuellen Effekt des Lösungsmittels auf die Ratio auszuschließen. Wie in Abbildung 4.16 dargestellt, konnte NHA in einer Konzentration 30 μM NHA die hyperforininduzierte Alkalisierung vollständig inhibieren. Dieser Effekt war dosisabhängig und erst ab einer NHA-Konzentration von 1 μM konnte keinerlei Beeinflussung des Hyperforineffektes mehr beobachtet werden (Abbildung 4.17).

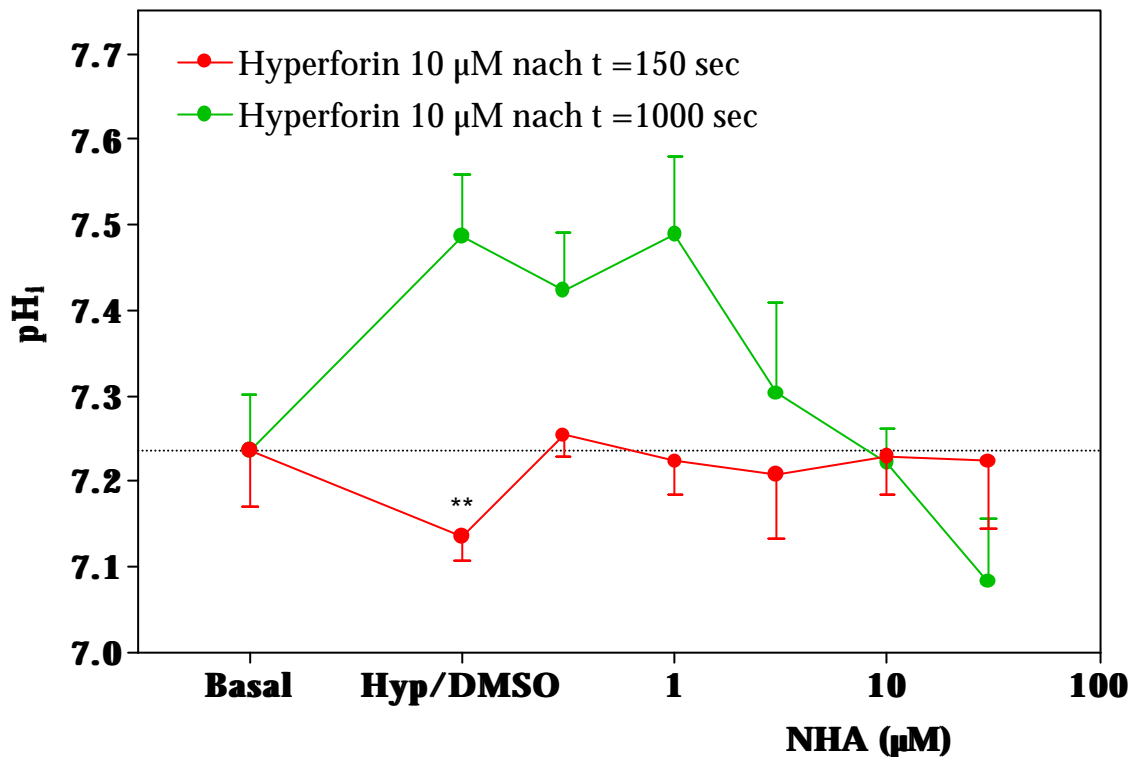


Abbildung 4.17: Konzentrationsabhängige Hemmung der hyperforininduzierten intrazellulären Alkalisierung sowie Beeinflussung der initialen Acidifizierung des Zellinneren in menschlichen Thrombozyten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 5-6 unabhängigen Messungen. Statistische Berechnungen wurden unter Verwendung des ungepaarten, two-tailed t-test durchgeführt (** P < 0,01).

Zunächst scheint NHA auch die initiale intrazelluläre Ansäuerung durch Hyperforin zu beeinflussen. Während das Lösungsmittel DMSO den biphasischen pH-Wert-Effekt nicht beeinflusst, verhindern bereits 0,3 μM NHA die initiale Ansäuerung bei t = 150 sec im selben Maße wie auch die höheren Konzentrationen. Dagegen ist die Hemmung der hyperforininduzierten sekundären Alkalisierung deutlich konzentrationsabhängig. Bei einer NHA-Konzentration von 10 μM werden die Effekte von Hyperforin völlig aufgehoben, während eine höhere Konzentration von 30 μM NHA, wie in der Literatur beschrieben, zu einer langandauernden Hemmung des NHE und damit zu einer langsam konsistent werdenden intrazellulären Acidifizierung führt, da der NHE aufgrund der NHA-induzierten Hemmung

nicht in der Lage ist, dieser Ansäuerung entgegen zu wirken und Protonen aus der Zelle zu transportieren.

Aufgrund dieser Ergebnisse schien es möglich, daß Hyperforin über eine Aktivierung des NHE eine intrazelluläre Alkalisierung und eine gleichzeitige Erhöhung von $[Na^+]_i$ bewirkt.

Kombinationsexperimente mit NHA und BAPTA-beladenen Plättchen zeigten, daß damit alle durch $10 \mu\text{M}$ Hyperforin beeinflussten pH-Effekte verschwunden waren. Die erste Phase schien abhängig von der Anwesenheit intrazellulärer Kalziumionen zu sein, während die zweite Phase Amiloridsensitivität zeigte und daher durch NHE vermittelt werden könnte (Abbildung 4.18). Dies würde bedeuten, daß Hyperforin zwei verschiedene Angriffspunkte hat, welche die gegensätzlichen Wirkungen auf pH_i verursachen. Damit, daß Hyperforin vermutlich eine geringere Affinität zu einem dieser Targets hat, könnte erklärt werden, warum die Alkalisierung nur bei hohen Hyperforinkonzentrationen gesehen wird.

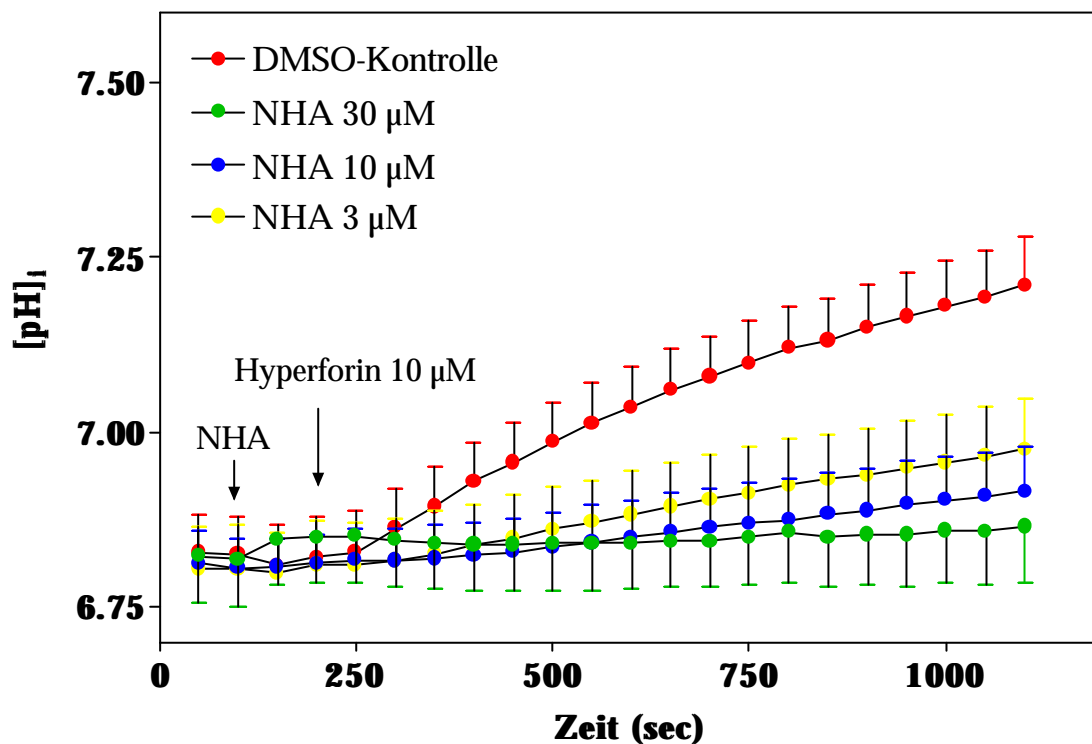


Abbildung 4.18: Effekt von NHA auf die durch Hyperforin verursachten Effekte in BAPTA-beladenen Plättchen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus sechs unabhängigen Experimenten.

Die Befunde gleichartiger Experimente mit Monensin schlossen abermals aus, daß Hyperforin monensinähnliche Ionophor-Eigenschaften besitzt. Da Monensin nur zu einer intrazellulären Alkalisierung führt, konnten natürlich keine Effekte auf eine eventuelle Acidifizierung des Zellinneren untersucht werden. Trotzdem fanden sich einige interessante Beobachtungen.

Selbstverständlich war auch der basale pH-Wert in den Thrombozyten in den BAPTA-beladenen Plättchen saurer als in den normalen Plättchen (Abbildung 4.19).

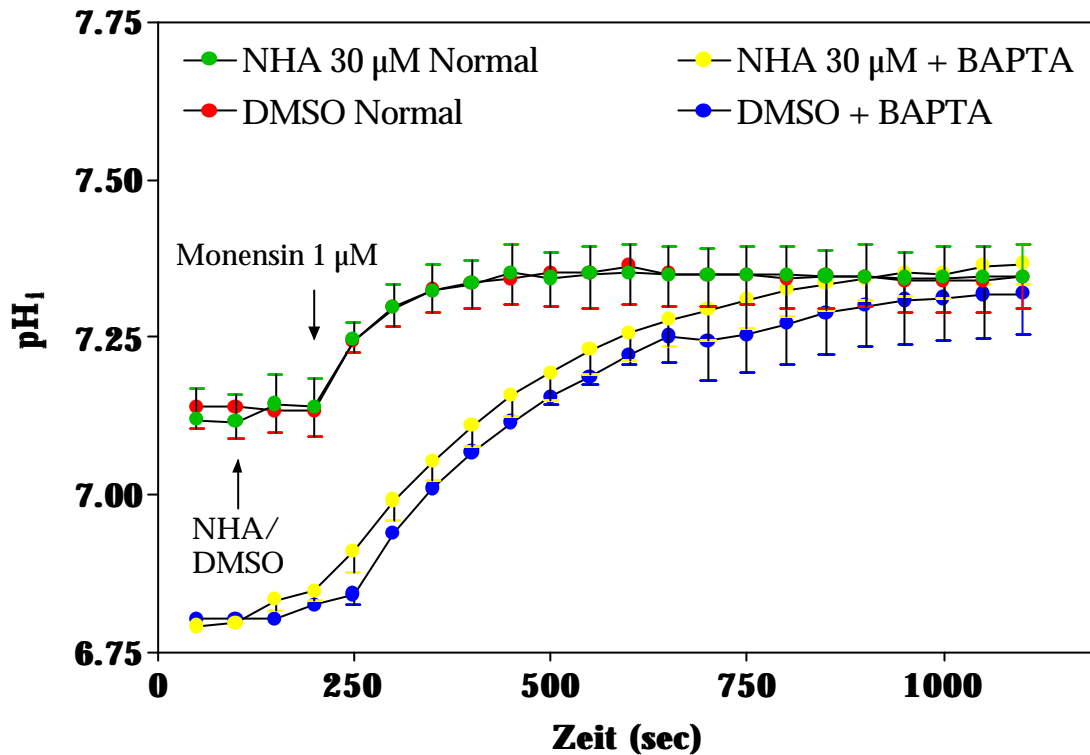


Abbildung 4.19: pH-Wert-Effekte von 1 µM Monensin in BAPTA-beladenen und normalen Plättchen unter Zugabe von NHA. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Einzelerperimenten.

Interessanterweise war Monensin in der Lage, ausgehend von dem wesentlich saureren Basalwert in BAPTA-beladenen Plättchen eine identische intrazelluläre Alkalisierung wie unter Normbedingungen zu erreichen, so daß Δ pH in normalen Plättchen wie erwartet in An- und Abwesenheit von NHA $0,23 \pm 0,05$ pH-Einheiten erreichte, während Δ pH in BAPTA-beladenen Plättchen mehr als doppelt so hoch und ebenfalls unabhängig von der NHA-Zugabe war ($0,57 \pm 0,03$ pH-Einheiten). Da durch den niedrigeren intrazellulären pH-Wert der Protonengradient an der Zellmembran wesentlich größer geworden war, ist es für eine Substanz wie Monensin, deren treibende Kraft für den Ionenaustausch ein Konzentrationsgradient ist, nur logisch, daß ein erhöhter Austausch über die Membran erfolgen kann, solange die zweite treibende Kraft, nämlich der Natriumgradient, groß genug ist. Aus diesem Grunde kann Monensin soviel Protonen im Austausch gegen Natrium aus der Zelle transportieren, bis die kompensatorisch erhöhte Natriumionenkonzentration zu groß geworden ist. Dies ist im hier vorliegenden System offensichtlich bei einem intrazellulären pH-Wert von $7,34 \pm 0,04$ der Fall. Zudem ist die monensininduzierte intrazelluläre Alkalisierung wie erwartet nicht durch NHA hemmbar, da Monensin nicht am NHE angreift,

sondern unabhängig von Transportmolekülen oder Transportern Ionenverschiebungen hervorrufen kann.

Der Effekt von Hyperforin scheint dagegen nicht durch Ionengradienten hervorgerufen zu werden, sondern von der Transportkapazität eines Ionenkanals oder eines Transporters abhängig zu sein, da durch die gleiche Hyperforinkonzentration nur eine bestimmte immer gleichbleibende Menge an Protonen aus der Zelle transportiert werden kann.

Damit wäre allerdings nicht geklärt, wodurch die initiale Ansäuerung in den Thrombozyten zustande kommt bzw. warum diese durch NHA verhindert wird. Eine mögliche Erklärung wäre, daß NHA, obwohl laut Literatur ein relativ selektiver Inhibitor des Natrium-/Protonen-Exchangers, auch andere bekannte oder unbekannte Systeme beeinflusst, wie es von anderen Amiloridderivaten bekannt ist. Um dies auszuschließen wurden die pH-Wert-Messungen auch mit dem NHE1-spezifischen Hemmstoff Cariporid durchgeführt. Wie nach den Natriummessungen erwartet, zeigte sich hier auch bei hohen Dosen von 1-10 μM kein Effekt auf die hyperforininduzierte pH-Wert-Veränderung in Thrombozyten (siehe Abbildung 4.20). Dies war nach der erfolgreichen Hemmung durch NHA um so erstaunlicher, als die hauptsächlich in menschlichen Thrombozyten vorkommende Isoform NHE1 ist (Shrode et al., 1998, Roskopf, 1999). Entweder beeinflusst Hyperforin ein anderes Target, welches auch von NHA gehemmt werden kann oder die Substanz Cariporid ist in dem hier verwendeten System nicht wirksam.

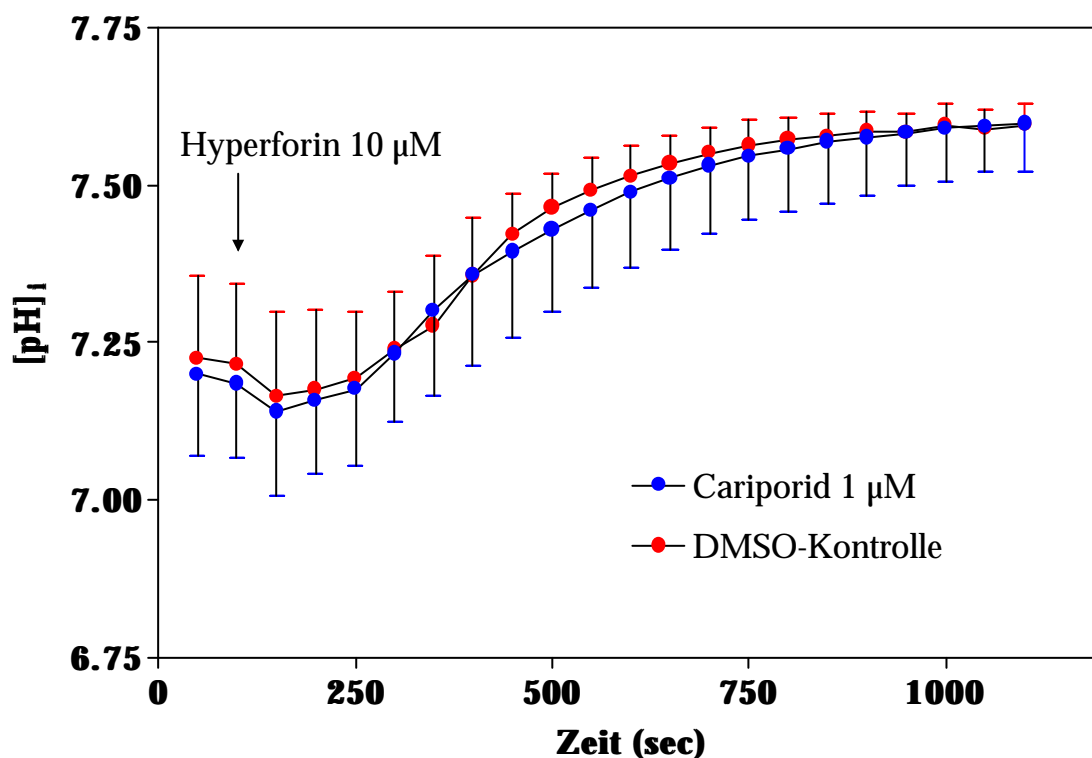


Abbildung 4.20: Effekt von Hyperforin auf den intrazellulären pH-Wert in zuvor mit Cariporid behandelten Thrombozyten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus fünf unabhängigen Experimenten.

Um dies abzuklären wurde untersucht, inwieweit Cariporid eine durch das K^+/H^+ -Ionophor Nigericin, welches Kaliumionen aus und Protonen in die Zelle transportiert, verursachte starke intrazelluläre Ansäuerung beeinflussen kann. Die Zugabe von Nigericin führt zu einer starken und schnellen Acidifizierung des Zellinneren, die jedoch sofort durch die Aktivität des NHE wieder ausgeglichen wird, da dieser durch das Erreichen seines „Setpoints“, der unterhalb eines intrazellulären pH-Wertes von 7,0 liegt (Ogawa et al., 1989), aktiviert wird (Abbildung 4.21).

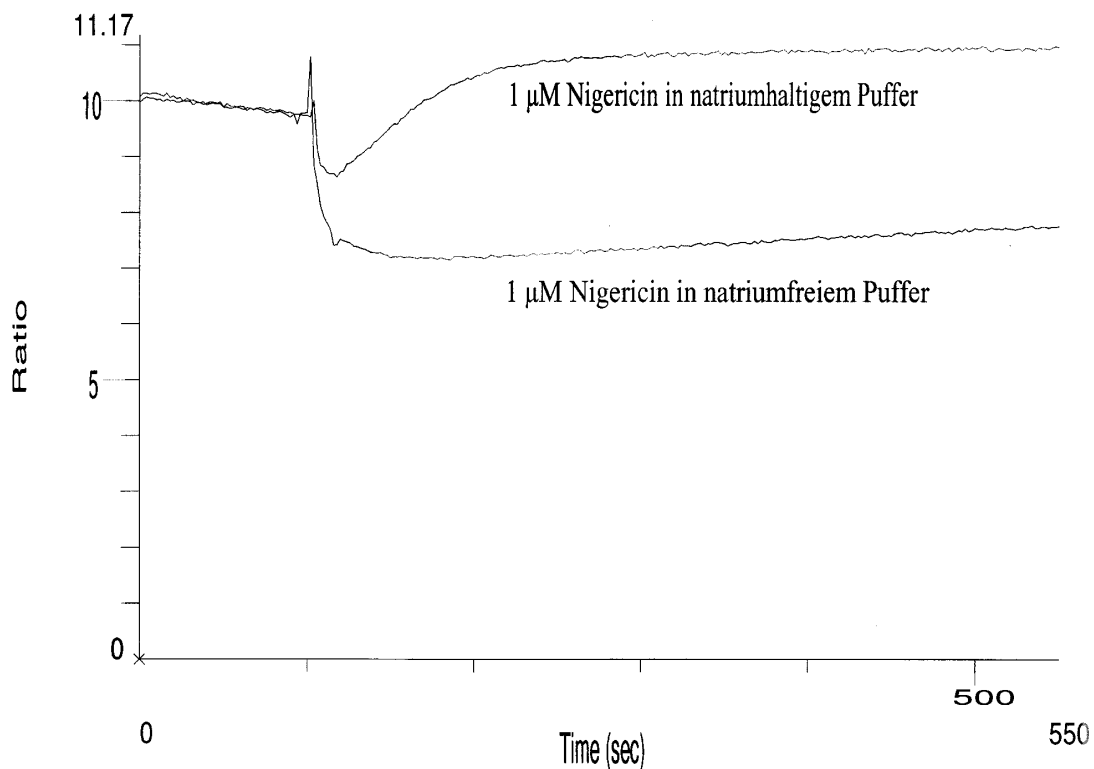


Abbildung 4.21: pH-Wert-Messung in natriumhaltigem und natriumfreiem Puffer nach der Zugabe von 1 μ M Nigericin. Die Zugabe von Cariporid erfolgte 100 Sekunden vor der Nigericineinspritzung. Dargestellt ist ein Einzelexperiment, repräsentativ für drei gleichartige unabhängige Experimente.

Eine Kontrolle, ob die Wiederherstellung des basalen pH_i wirklich durch NHE hervorgerufen wird, ist unter Durchführung weiterer Messungen in natriumfreiem Puffer möglich. Wie in Abbildung 4.21 zu sehen, bleibt die nigericininduzierte intrazelluläre Acidifizierung in natriumfreiem Puffer bestehen, da der NHE aufgrund des fehlenden Natriumgradienten nicht aktiviert werden kann. Weder unter vorheriger, gleichzeitiger noch nachfolgender Zugabe von Cariporid kann in natriumhaltigem Inkubationsmedium die Aktivierung des NHE und damit die Wiederherstellung des basalen pH-Wertes verhindert werden. Allerdings stellte sich heraus, daß auch die Verwendung des Amilorid-Analogons NHA in Konzentrationen, die in vorangegangenen Experimenten in der Lage waren, die hyperforininduzierte intrazelluläre Alkalisierung konzentrationsabhängig zu inhibieren, in diesem Versuchsansatz zu ähnlichen

Ergebnissen führte. Daraus ist zu schließen, daß in dem hier verwendeten System Amilorid-Derivate zumindest nicht am NHE inhibitorisch wirksam sind. Voraussetzung ist hierbei natürlich, daß man der Literatur Glauben schenkt, die von einer Aktivierung des NHE durch Nigericin ausgeht.

4.3.5 Natriumabhängigkeit des pH-Effektes

Im Falle der Aktivierung des NHE durch Hyperforin müßte die pH-Wert-Beeinflussung in natriumfreiem Medium verschwunden sein, da dem Transporter kein parallel zu Protonen transportierendes Gegenion zur Verfügung stehen würde (siehe Versuche mit Nigericin). Daher wurden die Messungen in Analogie zur Überprüfung der Natriumabhängigkeit der $[Na^+]_i$ -Messungen in natriumfreiem Puffer durchgeführt (Abbildung 4.22). Erstaunlicherweise wurde die biphasische Beeinflussung des pH-Wertes in natriumfreiem Medium nicht beeinflußt, was darauf hindeuten scheint, daß der NHE durch Hyperforin nicht aktiviert wird, da in diesem Falle zumindest die sekundäre Alkalisierung verhindert sein müßte.

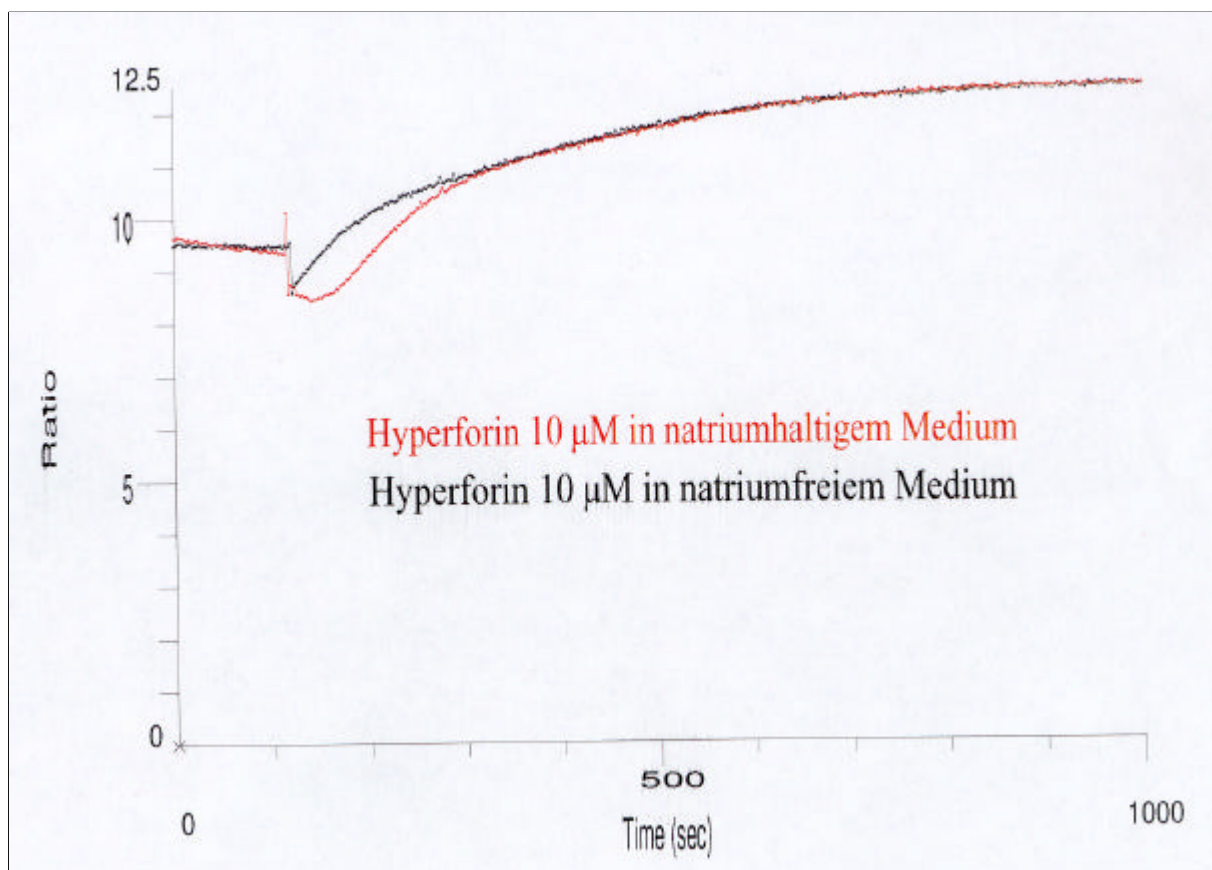


Abbildung 4.22: Hyperforininduzierte Beeinflussung des intrazellulären pH-Wertes in natriumhaltigem Puffer und Puffer, bei dem Natrium durch äquimolare Mengen an TMA (siehe Material und Methoden) ersetzt wurde. Dargestellt ist ein Einzelexperiment, das repräsentativ für fünf gleichartige Befunde ist.

4.3.6 Beruht die Ansäuerung auf einem reserpinähnlichen Effekt?

Offensichtlich ist NHE nicht direkt in die hyperforininduzierte pH-Wert-Veränderung involviert. Zudem wäre damit die initiale Ansäuerung nach Zugabe von 10 μM sowie die generelle intrazelluläre Acidifizierung -hervorgerufen durch niedrigere Hyperforinkonzentrationen- nicht erklärt. Gobbi et al. (1999) vermuteten einen reserpinähnlichen Effekt auf Speichervesikel, in denen Neurotransmitter wie Serotonin, Dopamin und Serotonin in der Zelle gespeichert werden. Auch in Plättchen gibt es vergleichbare Kompartimente –die sogenannten „dense granula“-, die besonders in Blutplättchen sehr wichtig für die Aufrechterhaltung verschiedener neurotransmitterabhängiger Vorgänge sind, da Blutplättchen im Gegensatz zu neuronalen Zellen nicht in der Lage sind, diese Substanzen selbst zu synthetisieren.

Zur Überprüfung der von Gobbi et al. aufgestellten Hypothese, die hinter der kalziumunabhängigen Freisetzung von Serotonin eine Entleerung der Speichervesikel durch eine reserpinähnliche Hemmung von vesikulären Monoamintransportern (VMAT, Typ 2) vermutet, wurde vor der Hyperforinzugabe Reserpin in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Reserpin hemmt beide VMAT-Isoformen, von denen jedoch nur VMAT2 im Gehirn lokalisiert ist, mit IC_{50} -Werten von 0,01-1,0 μM (Hayashi et al., 1999). VMAT transportiert Monoamine wie 5-HT, NA und DA im Austausch gegen Protonen über die vesikuläre Membran in die „dichten Granula“ bzw. Speichervesikel. Die Hemmung erfolgt kompetitiv und irreversibel. Die Folge ist eine passive Entspeicherung der Monoamine, da auch der Protonengradient an der Vesikelmembran (intravesikulärer/- granulärer pH-Wert 5,5), der die Speicherung erst ermöglicht, zusammenbricht. Folglich könnte eine Hemmung von VMAT2 auch zu einer Kumulation von Protonen in Zytosol führen und damit eine intrazelluläre Ansäuerung induzieren.

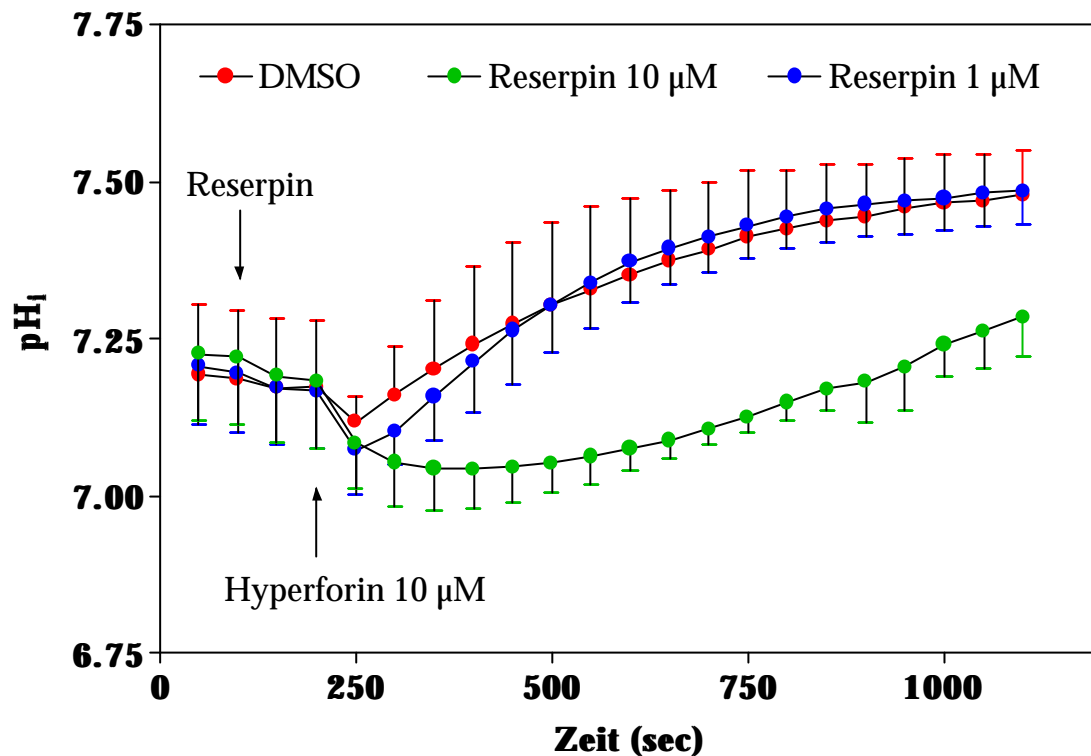


Abbildung 4.23: Effekte des VMAT-Inhibitors Reserpin auf die hyperforininduzierten pH-Effekte bei einer Hyperforinkonzentration von 10 µM. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 8-10 unabhängigen Messungen.

Wie in Abbildung 4.23 dargestellt, hat 1 µM Reserpin außer einer dosisunabhängigen, geringfügigen Erniedrigung des Basalwertes innerhalb von 100 Sekunden keinen erwähnenswerten Effekt auf den intrazellulären pH-Wert. Insbesondere war die hyperforininduzierte Ansäuerung auch durch hohe Reserpinkonzentrationen von 10 µM nicht beeinflusst. Damit wird deutlich, daß eventuelle Effekte von Reserpin an VMAT2 und damit auf den intrazellulären pH-Wert nicht in BCECF-beladenen Plättchen detektierbar sind und daß daher auch die initiale Ansäuerung bei Zugabe von 10 µM Hyperforin nicht auf einen direkten Effekt an VMAT2 zurückzuführen sein dürfte.

Interessanterweise war jedoch die sekundäre intrazelluläre Alkalisierung durch Hyperforin bei vorheriger Zugabe von 10 µM Reserpin vermindert. Da der IC_{50} -Wert von Reserpin an VMAT2 bei ca. 1 nM liegt, könnte es sich hierbei jedoch auch um einen unspezifischen Effekt von Reserpin handeln, der nicht mit einer Wirkung an VMAT2 assoziiert ist. Dies wird durch den Befund unterstützt, daß durch Zugabe von 1 µM Reserpin, einer Konzentration, die bereits ein vielfaches über dem IC_{50} -Wert liegt, keinerlei Effekte auf die hyperforininduzierte Alkalisierung zu beobachten sind.

4.3.7 Induziert Hyperforin eine gesteigerte Glykolyse?

Eine weitere Quelle intrazellulärer Protonen könnte die Generierung durch eine gesteigerte Aktivität verschiedener Stoffwechselprozesse sein. Insbesondere bei der Glykolyse fallen laufend überschüssige Protonen an. Um dies zu überprüfen, wurden die pH-Effekte von Hyperforin in glucosefreiem Puffer untersucht. Hierzu wurde Glucose in äquimolaren Mengen durch Pyruvat ersetzt, welches zwar in die Zelle aufgenommen und von ihr verstoffwechselt werden kann, jedoch keine Verwendung in der Glykolyse findet.

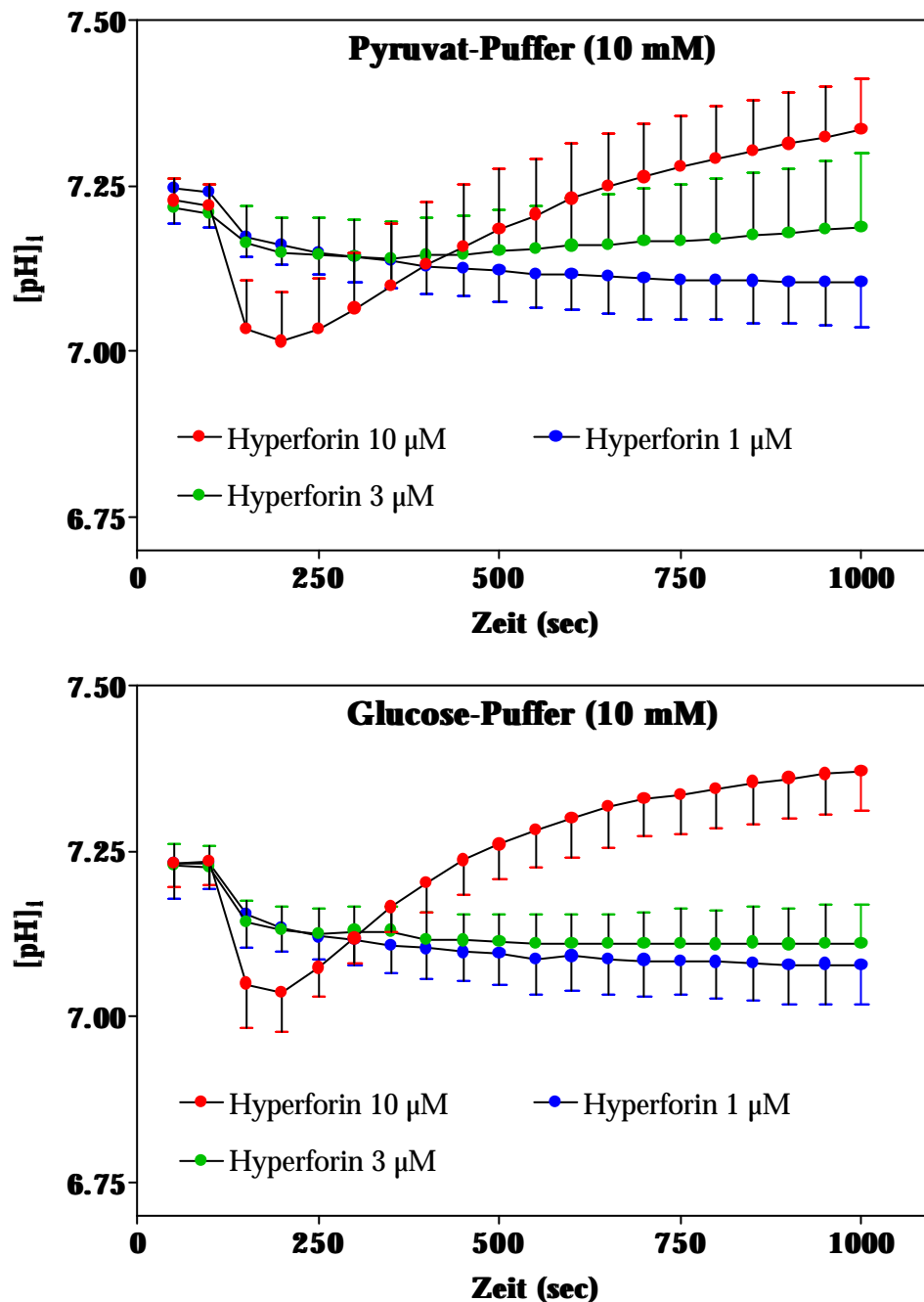


Abbildung 4.24: Effekte von 10 µM Hyperforin auf den intrazellulären pH-Wert in Glucose- und Pyruvat-Puffer (10 mM). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 4-6 unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 4.24 dargestellt, war die intrazelluläre Ansäuerung in glucosefreiem und glucosehaltigem Medium in gleichem Ausmaß vorhanden, so daß man davon ausgehen kann, daß Hyperforin nicht zu einer gesteigerten Glykolyse und damit zur verstärkten Bildung von Protonen in der Zelle führt. Die Ursache der hyperforininduzierten Acidifizierung des Zellinneren bzw. durch welchen Mechanismus Hyperforin diese verursacht, konnte anhand dieser Versuche nicht geklärt werden.

4.4 Experimente zur hyperforininduzierten Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$

4.4.1 Hyperforineffekte auf die Thrombinstimulation

Für Thrombin ist neben der hauptsächlichen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration auch eine Erhöhung von $[Na^+]_i$ und ein biphasischer Effekt auf pH_i bekannt. Es wird vermutet, daß Thrombin durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration oder andere Mechanismen zu einer Aktivierung des NHE führt. Primär aktiviert Thrombin über den Thrombinrezeptor die G-Proteingekoppelte Phospholipase C (PLC) und stößt damit den PIP_2 -Weg an, der über die Bildung der second messenger Diacylglycerin (DAG) und Inosit-1,4,5-triphosphat (IP_3) schließlich zu einer Freisetzung von intrazellulärem Kalzium und einem Kalziuminflux aus dem extrazellulären Milieu führt (Holmsen, 1991; Brass & Joseph, 1985). Eine Überprüfung der Hyperforinwirkung auf die thrombininduzierten Kalziumeffekte sollte klären, ob Hyperforin in ähnlicher Weise wie Thrombin zu einer Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ und damit möglicherweise zu einer Aktivierung von NHE beiträgt.

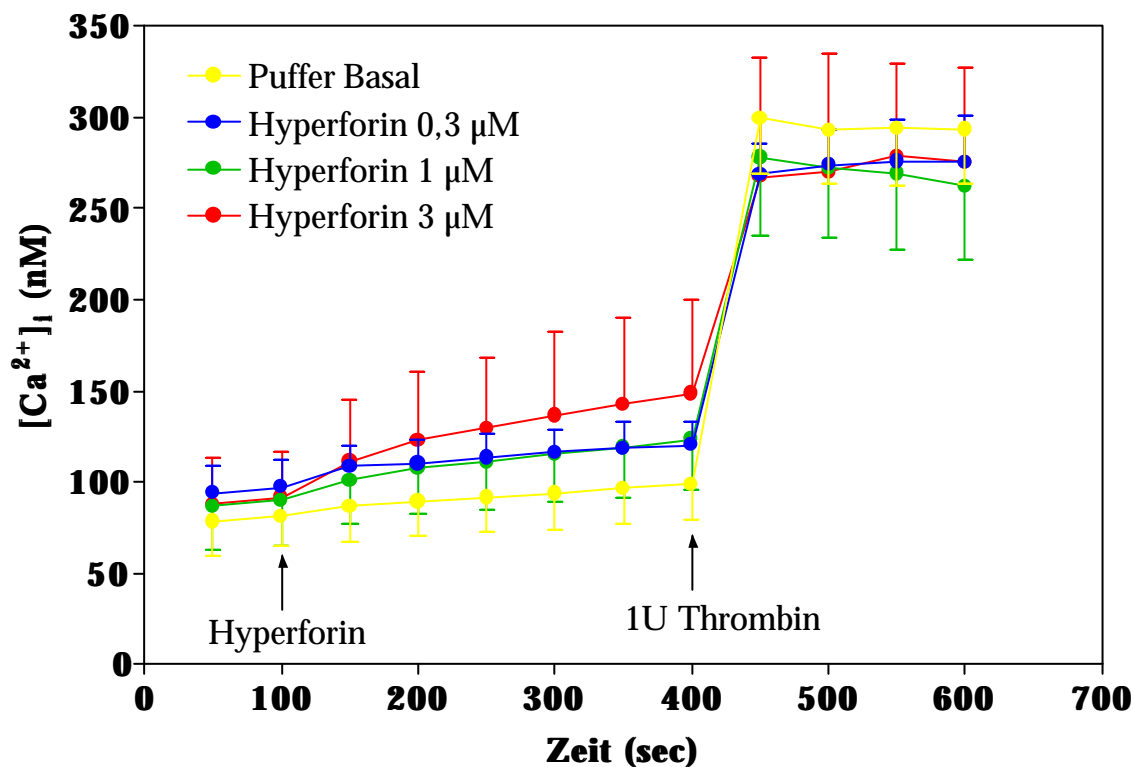


Abbildung 4.25: Thrombininduzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in menschlichen Thrombozyten nach Zugabe von Hyperforin in einer Konzentration von 0,3-3 μM . Die Messung wurde in kalziumhaltigem Medium durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus sieben unabhängigen Experimenten.

Hyperforin wurde hierzu in einer Konzentration von 0,3-3 μM bei $t=100$ sec in die Meßküvette eingespritzt. Thrombin (1 Einheit/ml = 1 U/ml) wurde nach weiteren 300 sec zugegeben (siehe Abbildung 4.25).

Hyperforin führte innerhalb von 300 Sekunden zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um $47,79 \pm 11,19$ nM bei Zugabe von 3 μM , um $31,11 \pm 4,44$ nM bei 1 μM und um $23,90 \pm 3,48$ nM bei Zugabe von 0,3 nM Hyperforin. Nach Pufferzugabe, erhöhte sich $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im selben Zeitfenster um $17,38 \pm 4,62$ nM (siehe Abbildung 4.25 + 4.26). Wie in beiden Abbildungen zu sehen, erhöht eine nachfolgende Thrombinzugabe die intrazelluläre Kalziumkonzentration nur um einen bestimmten Wert, so daß die zuvor durch Hyperforin erhöhten "Basallevel" keine Rolle zu spielen scheinen.

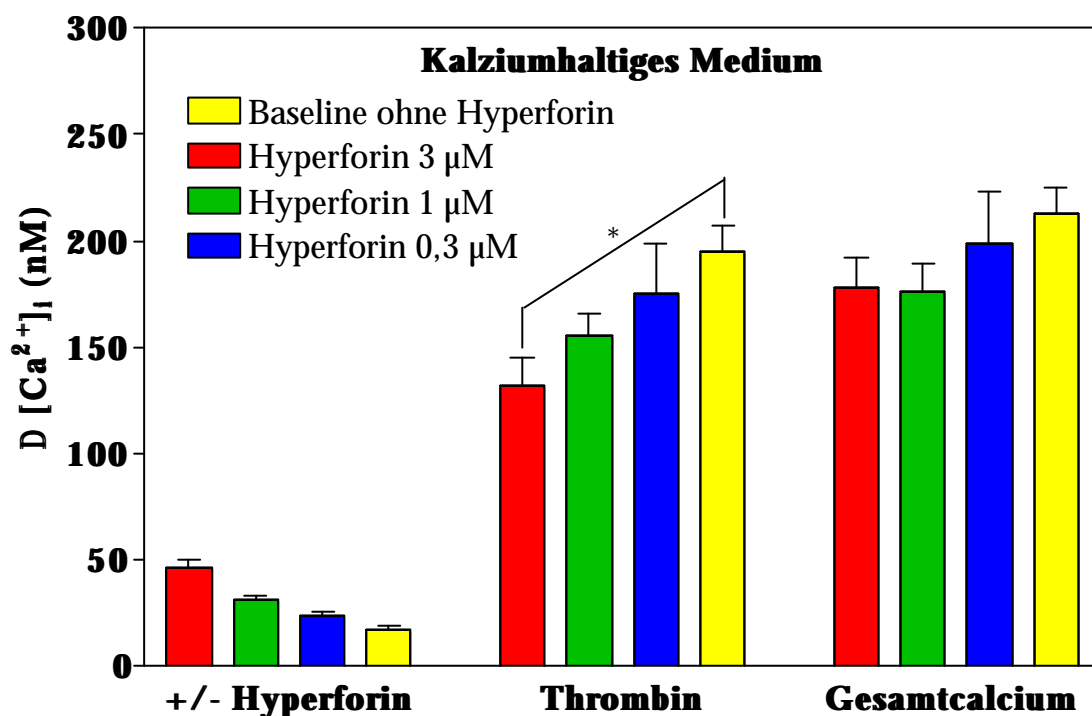


Abbildung 4.26: Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration über den Basalwert nach Zugabe von Hyperforin bei $t = 400$ sec, nachfolgender Thrombinzugabe (1 U) bei $t=600$ sec und Addition beider Einzeleffekte. Die Messungen wurden in kalziumhaltigem Medium durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 6-8 Einzelexperimenten. * bedeutet Signifikanz bei $p < 0,05$.

Obwohl die thrombininduzierte Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ohne vorherige Hyperforinzugabe gegenüber der Erhöhung durch Thrombin nach Hyperforin in einer Konzentration von 3 μM einfach signifikant war (siehe Abbildung), konnte bei einem Vergleich der additiven intrazellulären Kalziumerhöhung keine Signifikanz mehr festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Durchführung identischer Versuche in kalziumfreiem Medium (Abbildung 4.27).

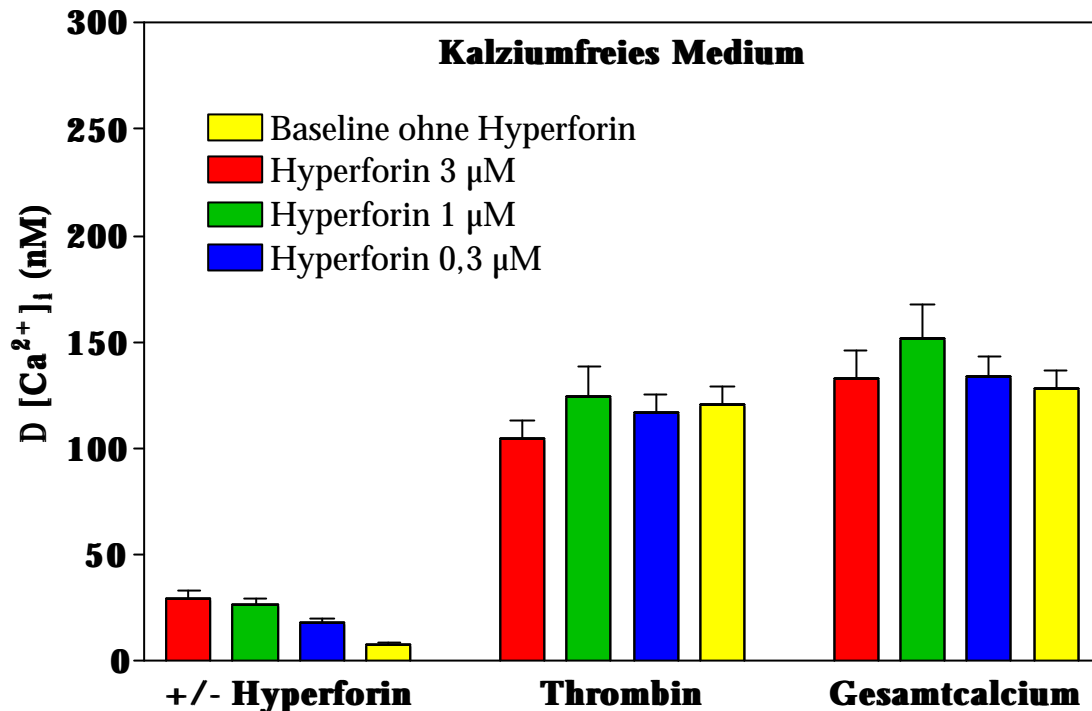


Abbildung 4.27: Ermittlung der Effekte von Hyperforin nach $t=400$ sec und Thrombin bei $t=600$ sec sowie der additiven Effekte auf $[Ca^{2+}]_i$ in Thrombozyten. Die Messungen wurden in kalziumfreiem Medium durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 6-8 unabhängigen Einzelexperimenten.

In beiden Messungen hatte Hyperforin keinerlei Effekte auf die durch 1 U Thrombin erhöhte Gesamtkalziumkonzentration in der Zelle. Es ist daher unwahrscheinlich, daß Hyperforin über einen thrombinähnlichen Mechanismus zu einer Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ führt. Thrombin führte auch wie in der Literatur beschrieben zu einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration in diesem System, während der beschriebene biphasische Effekt auf pH_i in den hier durchgeführten pH-Wert-Messungen nicht gesehen werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt).

In denen in dieser Arbeit verwendeten BCECF-beladenen Plättchen konnte nur eine thrombininduzierte intrazelluläre Ansäuerung durch unterschiedliche Thrombinkonzentrationen (0,25-3 U), ähnlich derer, die auch bei niedrigeren Hyperforinkonzentrationen gefunden wurden, beobachtet werden. Dies hängt möglicherweise von der Reinheit des verwendeten Thrombins oder den jeweiligen Versuchsbedingungen ab (Jones et al., 1993; Ogawa et al., 1989). Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die hier beschriebenen Messungen ausgehend von einem intrazellulären basalen pH-Wert von $> 7,0$ durchgeführt wurden. Laut Ogawa et al. (1989) kann der thrombininduzierte biphasische Effekt auf pH_i nur bei basalen pH_i -Werten von $> 7,0$ gesehen werden, während darüber nur eine Acidifizierung des Zellinneren beobachtet werden kann. Die meisten Literaturstellen, die

diesen biphasischen Thrombineffekt beschrieben haben führen die pH-Wert-Messungen tatsächlich in zuvor künstlich acidifizierten Thrombozyten durch (Borin & Siffert, 1991).

4.4.2 Natriumabhängigkeit der hyperforininduzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung

Da eine Involvierung des Na^+/Ca^{2+} -Exchangers bei der Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Hyperforin nicht ausgeschlossen werden kann, wurde untersucht inwieweit der Kalziumeinstrom von der extrazellulären Natriumkonzentration abhängig ist. Die Messungen wurden daher parallel in natriumfreiem und in normalem Inkubationsmedium durchgeführt.

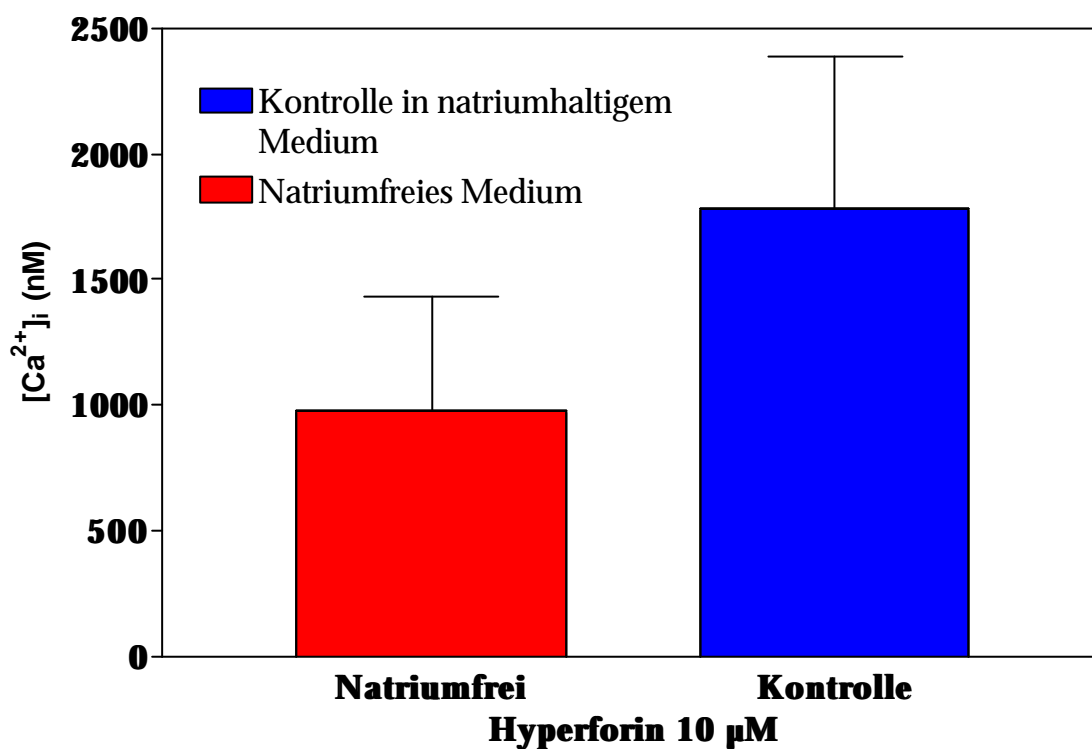


Abbildung 4.28: Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Zugabe von 10 µM Hyperforin in natriumhaltigem und natriumfreiem Inkubationsmedium. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus fünf unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 4.28 dargestellt, ist die hyperforininduzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in natriumfreiem Inkubationsmedium tendenziell erniedrigt. Der Unterschied erreicht jedoch aufgrund erheblicher Schwankungen keine Signifikanz im ungepaarten t-Test. Bei einer Beteiligung des Na^+/Ca^{2+} -Exchangers wäre eine stärkere Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in natriumfreiem Medium im Vergleich zu Kontrollbedingungen zu erwarten, wie z.B. in Synaptosomen des Rattenhirns beschrieben

(Fontana et al., 1995). Es ist daher nicht anzunehmen, daß der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchanger an dem beobachteten Kalziumeinstrom nach Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Hyperforin beteiligt ist.

4.4.3 Kalziumeinstrom durch nicht-selektive Kationenkanäle

Da der Kalziumeinstrom weder durch die Involvierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchangers noch durch thrombinähnliche Mechanismen erklärt werden kann, wurden weitere Möglichkeiten überprüft, die eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Hyperforin plausibel machen. Da bereits bezüglich der erhöhten $[\text{Na}^+]_i$ eine Beteiligung nicht-selektiver Kationenkanäle gezeigt werden konnte und Kalziumionen ebenfalls über diese Kanäle in die Zelle gelangen können, war eine Überprüfung dieses Ionenkanals naheliegend. Auch hier wurde untersucht, ob der Kalziumeinstrom nach Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Hyperforin durch $20 \mu\text{M}$ SK&F 96365 vermindert oder sogar inhibiert werden kann.

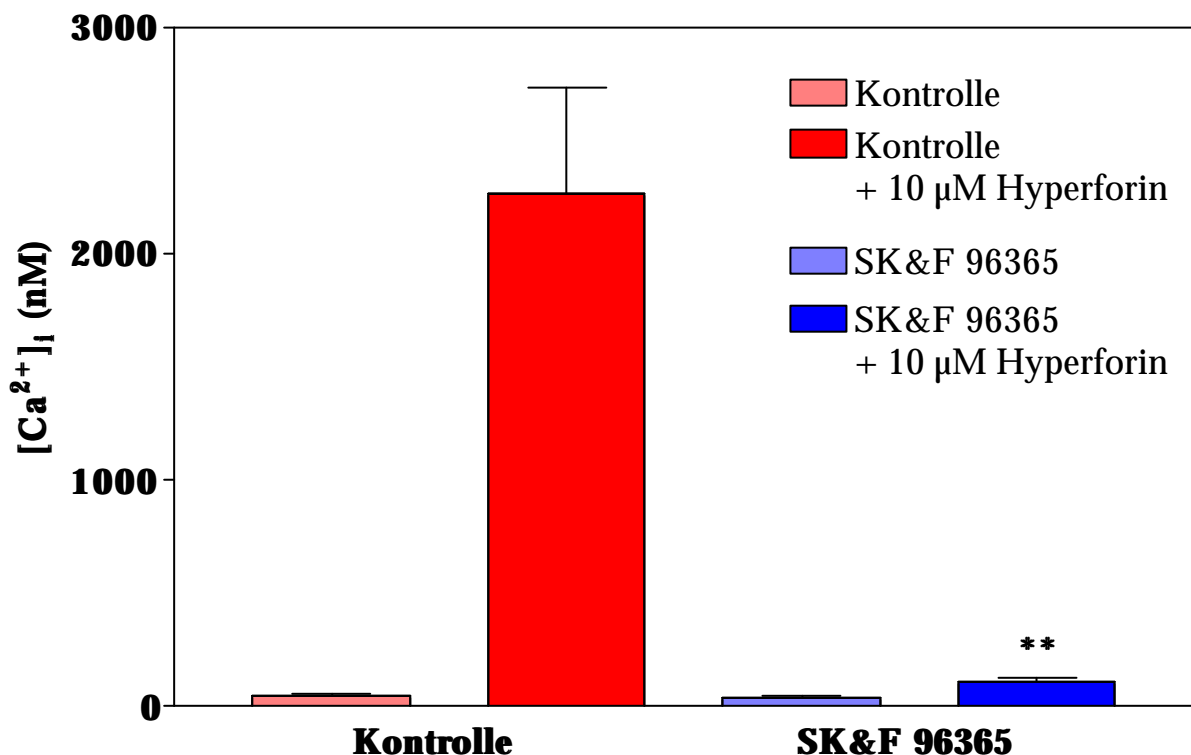


Abbildung 4.29: Beeinflussung der hyperforininduzierten Erhöhung der $[\text{Na}^+]_i$ durch SK&F 96365 am Endpunkt der Messung nach 15 Minuten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus fünf unabhängigen Experimenten. ** bedeutet eine Signifikanz bei $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

SK&F 96365 führt direkt nach der Zugabe zum Versuchsansatz zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, so daß der „Basalwert“ vor Hyperforinzugabe auf einen Wert von 104 ± 48 nM ansteigt. Die nachfolgende Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Hyperforin führt in einigen Experimenten zu einem transienten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, der jedoch nach einigen Sekunden auf den durch SK&F 96365 erhöhten „Basalwert“ absinkt (nicht dargestellt). In keinem der Versuchsansätze war Hyperforin in der Lage nach vorheriger Inkubation mit SK&F 96365 eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ zu induzieren.

4.5 Zusammenfassung

Effekt	Abhängigkeit von:			
	pH_{ex}	$[\text{Na}^+]_{\text{ex}}$	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$
^3H -Serotoninaufnahme ⁻	(+)	(++)	--	+
$[\text{Na}^+]_{\text{i}}$ -	+	++	--	--
pH_{i}				
initial ⁻	--	--	--	++
sekundär -	+	--	--	--
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ -	NN	+	++	+

Tabelle 4.1: Abhängigkeit der hyperforininduzierten Effekte von der extra- sowie intrazellulären Konzentration verschiedener Ionen. (++/+) = Literaturbefunde, ++ = Effekt ist stark abhängig von, + = Effekt ist schwach abhängig von, -- = Effekt ist unabhängig von, NN = Abhängigkeit konnte nicht bestimmt werden bzw. wurde nicht bestimmt.

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

5.1 Serotoninaufnahme in Synaptosomen und Blutplättchen

5.1.1 Hemmung der Neurotransmitteraufnahme

Wie beschrieben führt ein Johanniskrautextrakt (LI 160) bzw. Hyperforin zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Serotoninaufnahme in Synaptosomen und Thrombozyten. Diese Hemmung wird auch von den klassischen Antidepressiva in ähnlichen Konzentrationsbereichen und in ähnlicher Weise verursacht und kann daher als ein Hinweis auf antidepressive Effekte von *Hypericum perforatum*-Inhaltsstoffen angesehen werden (Fuller & Wong, 1990). Bezüglich der Serotoninaufnahmemhemmung zeigen sich einige Parallelen zum Wirkungsmechanismus der klassischen Antidepressiva. Hyperforin hemmt nicht nur die synaptosomale Aufnahme des Neurotransmitters in Präparationen aus dem Nagerhirn, sondern ist zudem in der Lage, in menschlichen Thrombozyten die Serotoninaufnahme mit vergleichbarer Potenz zu inhibieren. Ähnliche Ergebnisse werden durch die Untersuchung verschiedener klassischer Antidepressiva an Thrombozyten gezeigt. Dies zeigt zudem, daß Hyperforin auch in humanen Zellen den bekannten Antidepressiva vergleichbare Effekte aufweist.

Dennoch gibt es einige gravierende Unterschiede zur Neurotransmitter-Aufnahmemhemmung durch Hyperforin. Die gängigen Antidepressiva hemmen mit hoher Affinität den Serotonin- und/oder Noradrenalinuptake, zeigen aber weder an dopaminergen oder GABAergen noch an glutamatergen Aufnahmemechanismen eine Inhibition der Neurotransmitteraufnahme (Richelson et al., 1994). Damit nimmt Hyperforin eine Sonderstellung ein, vor allem weil in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, daß Hyperforin die Aufnahme aller fünf Neurotransmitter mit ähnlichen IC_{50} -Werten hemmt (Chatterjee et al., 1998; Müller et al., 1998). Ein ähnlich unselektives Profil ist bisher von keiner anderen antidepressiv wirksamen Substanz bekannt. Dies ist umso erstaunlicher als daß die durch Hyperforin inhibierbaren Neurotransmitter-Transporter keine allzu große Homologie aufweisen und im Falles des Glutamat-Transporters EAAC1 sogar aus einer anderen Genfamilie stammen (siehe Kapitel 1. Einleitung).

5.1.2 Interaktion mit SERT1

Bezüglich des Mechanismus der Neurotransmitter-Aufnahmemhemmung zeigt Hyperforin deutliche Unterschiede zu bisher bekannten Antidepressiva. Im Gegensatz zu vielen klassischen Antidepressiva, die eine kompetitive Substrathemmung an SERT1 aufweisen, zeigt Hyperforin eine nicht-kompetitive Interaktion mit SERT1. Die Hemmung ist bereits

nach sehr kurzer Zeit konsistent, so daß auch ohne Vorinkubation der Synaptosomen und Thrombozyten mit Hyperforin eine maximale erreichbare Inhibition der Serotoninaufnahme resultiert. Dies könnte darauf hindeuten, daß Hyperforin direkt an membranständigen Strukturen angreift.

Hyperforin bindet zudem nicht an der Substratbindungsstelle des Serotonintransporters, was durch Untersuchungen der Paroxetin-Bindung festgestellt werden konnte. Nahezu alle bekannten Antidepressiva zeigen eine deutliche Hemmung der Paroxetin-Bindung, da sie direkt an die Substratbindungsstelle an SERT1 binden und dadurch die Serotoninaufnahme kompetitiv inhibieren. Dies konnte durch vergleichbare Hemmkonstanten an beiden Systemen gezeigt werden, die sehr gut miteinander korrelieren. Da Hyperforin eine sehr viel schwächere Hemmung der Paroxetin-Bindung aufweist, scheint eine direkte Interaktion mit SERT1 unwahrscheinlich zu sein. Unterstützt wird dies durch vergleichbare Befunde in Untersuchungen zur hyperforininduzierten Hemmung der Imipramin- (Müller & Schäfer, 1996) und Citalopram-Bindung (Gobbi et al., 1999). In beiden Versuchsansätzen konnte keine Hemmung der erwähnten Bindungsstellen an SERT1 durch Hyperforin oder Johanniskrautextrakt beobachtet werden.

5.1.3 Schlußfolgerung

Die Hemmung der Neurotransmitteraufnahme kann in Anlehnung an therapeutisch eingesetzte Antidepressiva für die in klinischen und verhaltenspharmakologischen Studien beobachtete antidepressive Wirksamkeit verantwortlich gemacht werden. Der Inhaltsstoff Hyperforin scheint für diese Effekte von großer Bedeutung zu sein, da die Aufnahmehemmung durch einen Johanniskrautextrakt (LI 160) nahezu ausschließlich durch dessen Hyperforingehalt erklärt werden kann. Trotzdem muß davon ausgegangen werden, daß im Gesamtextrakt noch zumindest ein weiteres antidepressiv wirkendes Prinzip vorhanden sein muß.

Diese Befunde an der Serotoninaufnahme führen außerdem zu der Schlußfolgerung, daß Hyperforin über einen anderen Wirkmechanismus, der für alle Transportsysteme gleichermaßen von Bedeutung sein muß, die Neurotransmitteraufnahme hemmt.

Naheliegender ist hier die treibende Kraft der Neurotransmitteraufnahme aller untersuchten Transporter, der Natriumgradient. Alle Transportproteine gehören in die große Familie der NaCl-abhängigen Neurotransmittertransporter, die unbedingt auf die Anwesenheit eines Natriumkonzentrationsgefälles, wie es unter physiologischen Bedingungen der Fall ist, angewiesen sind. Wenn der Natriumgradient nicht mehr groß genug ist, kann im Falle des SERT1 kein Binden von Serotonin mehr stattfinden und die Bindung und der Transport von Serotonin wird vermindert bzw. inhibiert (siehe Kapitel 1. Einleitung). Eine Verringerung dieses Natriumgradienten durch verschiedene Ionophore (Izenwasser et al., 1992; Reith & O'Reilly, 1990; Singer et al., 1999), Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase (Levi & Raiteri, 1976;

Kamal et al., 1983) oder Beeinflussung der extrazellulären Natriumkonzentration (Sneddon, 1969) führte in allen Fällen zu einer Verminderung oder Hemmung der Neurotransmitteraufnahme. Es ist daher durchaus denkbar, daß Hyperforin über die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration die Neurotransmitteraufnahme hemmt. Wie im Zeitverlauf gezeigt, treten die Serotoninaufnahme-Hemmung und die Erhöhung von $[Na^+]_i$ bei ähnlichen Konzentrationen und nahezu zeitgleich auf. Mögliche Mechanismen, die für die Erhöhung von $[Na^+]_i$ verantwortlich sein könnten, sollen im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

5.2 Regulierung der intrazellulären Natriumkonzentration

Sowohl in Thrombozyten als auch in Synaptosomen gibt es, zum Teil identische, Transportmechanismen, die Natriumionen durch die Plasmamembran transportieren können. Dies geschieht entweder einem Konzentrationsgradienten folgend durch Diffusion durch unspezifische Kationenkanäle, durch aktiven Transport oder über einen Kotransport von Natrium mit anderen Ionen. Unter physiologischen Bedingungen ist die Zellmembran für Natriumionen allerdings so gut wie impermeabel, so daß ein auswärts gerichteter Natriumgradient besteht. Die intrazelluläre Natriumkonzentration beträgt in nahezu allen Zellen ca. 10-25 mM, während im Extrazellularraum eine Konzentration von 145-150 mM Natrium gemessen wird. Im Gegensatz dazu verhält es sich mit der Kaliumkonzentration genau entgegengesetzt; hier finden sich in der intrazellulären Flüssigkeit 155 mM Kalium während in der Zelle nur eine Kaliumionenkonzentration von 4 mM gefunden wird (Forth et al., 1996). Diese Konzentrationsgradienten werden durch die ubiquitär vorkommende Na^+/K^+ -ATPase aufrecht erhalten. Bei diesem Transportsystem handelt es sich um ein ATP-spaltendes Enzym, bei dem die ATP-Spaltung energetisch mit dem Einwärtsstrom von zwei Kaliumionen und dem Auswärtstransport von drei Natriumionen gekoppelt ist. Durch ein Zusammenbrechen dieser Gradienten kommt es zur Zellschwellung und damit zur Dehnung der Zellmembran, so daß ein Öffnen von Chlorid- und Kalium-Ionenkanälen (engl. stretch-activating) resultieren kann, was zu einem Ausstrom von Cl^- und K^+ führt. Diese Regulierungsmechanismen des Zellvolumens sind von einem intakten Zellstoffwechsel abhängig; bei Hemmung des Metabolismus, z.B. im Rahmen einer Hypoxie, kommt es rasch zu einer Zellschwellung (Forth et al., 1996).

Verschiedene Studien konnten zeigen, daß es bei einer Hypoxie in Neuronen des Rattenhippocampus unter anderem zu einer Erhöhung der intrazellulären Natrium- und Kalziumkonzentration und zu einer biphasischen Beeinflussung des pH_i kommen kann (Diarra et al., 1999; Church, 1999). Durch die Sauerstoffunterversorgung kommt es zu einer Störung des Energiestoffwechsels, zu einem Kaliumverlust in der Zelle und zu einem Kalzium- und Natriuminflux. Diese Veränderungen führen zur Membrandepolarisation und nachfolgend zu einer Neurotransmitterfreisetzung aus Synaptosomen aus dem Rattenhirn (Pastuszko et al., 1982). Eine durch Sauerstoff-Fänger (z.B. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) induzierte Hypoxie führt zu einer Ansäuerung des Zytosols, die nach Beendigung des Sauerstoffentzuges zu einer Alkalisierung des Zellinneren führt. Für die Restaurierung des pH_i werden zwei Mechanismen verantwortlich gemacht. Zum einen ein natriumabhängiger, bicarbonatunabhängiger Auswärtstransport von Protonen, der die Charakteristika des Na^+/H^+ -Exchangers (NHE) hat, und zum anderen ein natriumunabhängiger, zinksensitiver Mechanismus, der ein spannungsabhängiger Protonen-Auswärtsstrom sein könnte, welcher als Konsequenz auf die hypoxieinduzierte Membrandepolarisation aktiviert wird. Interessanterweise ist der NHE in hippocampalen CA1 Neuronen des Rattenhirns amilorid- und cariporidinsensitiv und kann

trotz Natriumionenzug aus dem Außenmedium nicht vollständig inhibiert werden (Diarra et al., 1999).

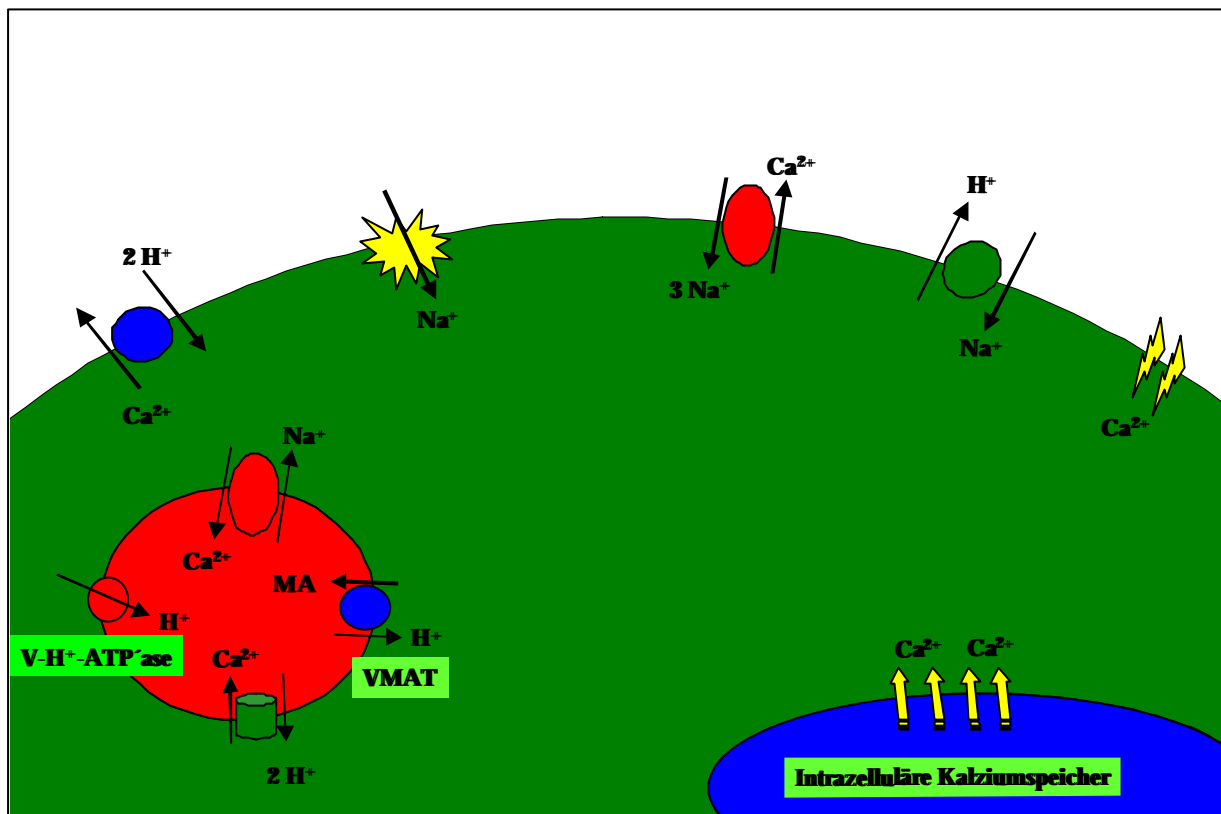


Abbildung 5.1: Regulation der intrazellulären Natriumkonzentration in Synaptosomen und Thrombozyten (mit Ausnahme der spannungsabhängigen Kalziumkanäle) sowie Transportprozesse an Speichervesikeln in Synaptosomen und chromaffinen Zellen (Mundorf et al., 2000) und "Dense Granula" in Thrombozyten.

5.2.1 Na⁺/H⁺-Exchanger (NHE)

Der NHE ist auch im Gehirn vorhanden. Dieser Austauscher, der in Rattensynaptosomen identifiziert wurde, hat eine 1:1 Stöchiometrie für den Austausch von Na⁺ gegen H⁺ und ist durch Amiloridderivate inhibierbar. Zudem scheint es außerhalb der Plasmamembran eine Bindungsstelle für Protonen zu geben, welche die Eigenschaften der intrazellulären Bindungsstelle für Protonen modifizieren kann, so daß die Antiportaktivität sowohl durch Änderungen am extra- wie auch intrazellulären pH-Wert zu einer Aktivierung des Transporters führen kann (Jean et al., 1985).

Da der NHE vor allem bei der pH-Wert-Regulierung eine große Rolle spielt, soll hier auf die Ausführungen unter Punkt 5.3.2 verwiesen werden.

5.2.2 Na⁺/Ca²⁺-Austausch

Zusätzlich zum Na⁺/H⁺-Exchanger besitzen viele Zellen noch zusätzliche Mechanismen, um die intrazelluläre Natriumkonzentration zu beeinflussen. Dies erfolgt meist im Austausch gegen andere Ionen. Ein Beispiel hierfür ist der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher. Der Carrier in kardialen Gewebe (NCX) bezieht seine Energie durch den elektrochemischen Gradienten für Natrium, wobei aufgrund der hohen extrazellulären Natriumkonzentration drei Natriumionen in die Zelle und ein Kalziumion aus der Zelle transportiert wird/werden. Bisher sind drei verschiedene Gene für den kardialen Na⁺/Ca²⁺-Austauscher bekannt, die mit NCX₁₋₃ bezeichnet werden und in geringerer Menge auch im Gehirn, der Niere, den glatten Muskelzellen und im Skelettmuskel vorkommen. Dagegen ist der Exchange in Plättchen zusätzlich von der Kaliumionen-konzentration abhängig, so daß 4 Na⁺ gegen 1 Ca²⁺ und 1 K⁺ ausgetauscht werden (Kimura et al., 1999).

Der in Synaptosomen des Rattenhirns vorhandene Na⁺/Ca²⁺-Austauscher wird durch interne Natriumionen mit einer halbmaximalen Konzentration von 20 mM aktiviert, so daß Kalzium in die Zelle aufgenommen werden kann. Die Aufnahme von Kalzium in die Zelle nimmt zu, wenn entweder [Na⁺]_i erhöht oder die extrazelluläre Natriumionenkonzentration erniedrigt wird (Fontana et al., 1995).

Dieser Mechanismus ist z.B. für die positiv inotrope Wirkung der herzwirksamen Glykoside verantwortlich. Da diese die Na⁺/K⁺-ATPase hemmen, resultiert eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration, welche dazu führt, daß der Na⁺/Ca²⁺-Exchange verringert wird. Demzufolge reichert sich Kalzium in der Zelle an und die Kontraktilität der Myokardzelle wird erhöht (Forth et al., 1996).

Möglicherweise führt die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration durch Hyperforin über eine ähnliche Hemmung zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Dadurch könnte zum einen der Release von verschiedenen Neurotransmittern durch Hyperforin erklärt werden, zum anderen ist damit ein Zusammenhang zwischen der gleichzeitigen Erhöhung von [Ca²⁺]_i und [Na⁺]_i über den Na⁺/Ca²⁺-Exchanger hergestellt. Hyperforin scheint hier zwei Effekte zu zeigen: Zum einen wird eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern beobachtet, zum anderen aber auch ein Influx aus dem extrazellulären Medium. Dieser Influx könnte durchaus auf eine Hemmung des Kalziumauswärtstransports durch den Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration hinweisen.

Es konnte gezeigt werden, daß die Freisetzung von Neurotransmittern aus kultivierten hippocampalen Zellen auch von der intrazellulären Natriumkonzentration abhängig ist. Natriumionen sind die hauptsächlichen Ladungsträger bei der Nervenerregung, so daß hierbei [Na⁺]_i ansteigt. Der Natrium-/Kalzium-Austauscher kann in beide Richtungen Kalziumionen

transportieren, was schon durch eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration um 5 mM verursacht werden kann (Bouron & Reuter, 1996). In Synaptosomen wurde gezeigt, daß die Erhöhung von $[Na^+]_i$ über die Aktivierung des Na^+/Ca^{2+} -Exchangers zu einer gleichzeitigen Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ in der Zelle führt. Bouron & Reuter (1996) beobachteten, daß eine Erhöhung von $[Na^+]_i$ durch Veratridin zu einem Anstieg der Neurotransmitterfreisetzung in Nervenendigungen und einem erhöhten Turnover des vesikulären Pools führt. Beide Vorgänge sind kalziumabhängig. Vermutlich führt der Anstieg von $[Na^+]_i$ entweder durch Erniedrigung der treibenden Kraft für den Kalziumauswärtstransport oder durch Umkehr der Transportrichtung des Exchangers zu einem Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$. Zudem scheint dieser Na^+/Ca^{2+} -Exchanger in der Präsynapse auch für den Release von GABA verantwortlich zu sein, der nach Erhöhung von $[Na^+]_i$ durch Veratridin beobachtet werden kann (Fraser et al., 1993).

5.2.3 Brain Sodium Channels (BNaCs) & Epitheliale Natriumkanäle (ENaCs)

Untersuchungen von Wonnemann et al. (2000) machen eine Aktivierung gehirnspezifischer Natriumkanäle für die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration verantwortlich. In diesen Experimenten konnte die Hemmung der 3H -Glutamat- und 3H -GABA-Aufnahme durch Hyperforin durch die Zugabe des Amiloridderivates Benzamil, das in einer Konzentration von 1-10 μM eine spezifische Hemmung der BNaCs zur Folge hat, vermindert werden.

Die gehirnspezifischen BNaCs (BNaC1 und BNaC2) gehören zur Superfamilie der Natriumkanäle (NaC/ DEG) und sind trotz einiger Unterschiede auch amiloridsensitiv und natriumselektiv (Garcia-Anoveros et al., 1997; Price, 1996). Sie gehören zu den acid-sensitiv ionchannels (ASICs) und können durch Protonen aktiviert werden. Protonen sind hier als eine Art Neurotransmitter bzw. Neuromodulator zu sehen, welche die Aktivität von Ionenkanälen ändern können (siehe Tabelle 5.1).

Da ihr Vorkommen, den neuesten Untersuchungen zufolge, auf das ZNS (Sensorische Neuronen, ZNS-Neuronen, Oligodendrozyten) beschränkt ist, ist die Erhöhung von $[Na^+]_i$ durch Hyperforin in Blutplättchen nicht über die Aktivierung dieser Strukturen zu erklären.

	ASIC1 (BNaC2)	ASIC2 (MDEG/BNaC1)	ASIC3 (DRASIC)
Aktivierung	pH _{ex} 7.4 → < 6.9	pH < 5.5	pH < 4
Permeabilität	Na ⁺ > Ca ²⁺ > K ⁺	Selektiv für Na ⁺	Selektiv für Na ⁺
Desensibilisierung	Einige Sekunden	Einige Sekunden	NN
Funktion	Schmerzepfinden/ Synapt. Transmission	Schmerzepfinden/ Synapt. Transmission	Schmerzepfinden
Vorkommen	Gehirn/Sensorische Neuronen	Neuronen des ZNS	Sensorische Neuronen

Tabelle 5.1: Wichtigste Charakteristika und Aufgaben protonen-aktivierbarer Kanäle im ZNS. NN = nicht angegeben bzw. nicht bekannt

Die epithelialen, amiloridsensitiven Natriumkanäle (ENaCs) waren die ersten Vertreter dieser Ionenkanalfamilie, die identifiziert wurden. Bisher wurden ENaCs in Epithelien der Luftwege, des distalen Kolons, der Niere und exokriner Drüsen gefunden (Garty, 1994). In dem derzeit vorherrschenden Topologiemodell wird ein großer extrazellulärer Loop von zwei hydrophoben Transmembrandomänen flankiert. Sowohl der Amino- als auch der COOH-Terminus sind im Zytosol lokalisiert (Waldmann & Lazdunski, 1998). Allerdings ist bisher nicht bekannt ist, ob ENaCs auch in der Membran von Thrombozyten vorhanden sind.

5.2.4 Unspezifische Kationenkanäle (NSC)

Unspezifische Kationenkanäle sind sowohl für monovalente als auch für divalente Kationen permeabel und können durch die Substanz SK&F 96365 gehemmt werden. Da SK&F 96365 den Natriumionen- und den Kalziumioneninflux gleichermaßen verhindern kann, soll auf die Charakterisierung dieser Kanäle näher unter Punkt 5.4.3 Unspezifische Kationenkanäle (NSC) eingegangen werden.

5.3 Regulation des intrazellulären pH-Wertes

Üblicherweise wird die Konzentration von H^+ -Ionen in pH-Einheiten angegeben. Dies entspricht dem negativen Logarithmus der Protonenkonzentration. Der pH-Wert ist umgekehrt proportional zur H^+ -Konzentration und eine Änderung des pH-Wertes um eine Einheit entspricht einer 10fachen Änderung der Protonenkonzentration. Der normale pH-Wert der extrazellulären Flüssigkeit beträgt 7,4 (40 nmol/l); dagegen ist der Intrazellularraum mit einem pH-Wert von 7,2 (63 nmol/l) etwas saurer. Der maximale Bereich, der noch als physiologisch vertretbar anzusehen ist, liegt zwischen 6,8 und 7,8 (16-160 nmol/l). Im Extrazellularraum ist das Kohlensäure/Bicarbonat-System der wichtigste Puffer, während die primären intrazellulären Puffer Proteine und Phosphate sind. Zudem sind die Zellen selbst mit Mechanismen zur Erhaltung des intrazellulären pH-Wertes ausgestattet (Forth et al., 1996).

Stimulation von Plättchen durch verschiedene Agonisten wie zum Beispiel Thrombin, PMA, PGD_2 (Zavoico et al., 1986) oder PAF (Borin et al., 1989) führt fast immer zu einer signifikanten Veränderung des intrazellulären pH-Wertes, die in nahezu allen Fällen in einer zytoplasmatischen Alkalisierung resultiert. Die Richtung dieser pH-Veränderung hängt vom Gleichgewicht zwischen dem Ausmaß der Protonenentstehung in der Zelle, der intrazellulären Pufferkapazität und dem Transport der entstandenen Protonen aus der Zelle ab. In vielen Zellen führt die Stimulation zu einer explosionsartigen Erhöhung der metabolischen Aktivität und damit letztendlich zu ATP-Verbrauch oder anderen Reaktionen, die zur Bildung von Protonen führen (Busa et al., 1984).

Einer der Mechanismen, der für die Entfernung von Protonen aus dem Zellinneren verantwortlich ist, ist der Na^+/H^+ -Austauscher. Aufgaben dieses NHE sind der transepitheliale Transport von Salzen und Wasser, die Regulation der zytoplasmatischen Natrium- und Protonenkonzentration, die Kontrolle des Zellvolumens sowie die Induktion von Wachstum und Proliferation (Mahnensmith & Aronson, 1985). In letzter Zeit mehren sich Hinweise, daß eine gesteigerte Aktivität des NHE in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen wie Hypertonie oder Myokardinfarkt eine Rolle spielt (Yellon & Baxter, 2000; Fischer et al., 1999; Roskopf, 1999).

5.3.1 Ursachen einer intrazellulären Ansäuerung

Zum einen stellt der Zellmetabolismus eine Quelle stetiger Säurebelastung für die Zelle dar, andererseits resultiert aus der elektrischen Potentialdifferenz an der Zellmembran eine beträchtliche treibende Kraft für den H^+ -Einstrom in die Zelle (Forth et al., 1996).

Protonen werden auch in unstimulierten Plättchen laufend aus dem Zellinneren nach außen befördert. Diese Protonen reflektieren z.B. die Bildung von Milchsäure in ruhenden Plättchen

(Siffert et al., 1984). Die Stimulation von Plättchen wird von der Produktion von Protonen begleitet, die zum Teil aus einer gesteigerten Glykolyse und Hydrolyse von ATP und GTP stammen. Die Stimulation führt meist zur Aggregation der Thrombozyten, zur Änderung der Plättchenform und zur Freisetzung von verschiedenen Substanzen aus Speichergranula. Diese funktionellen Antworten werden von einer Änderung des Zellmetabolismus begleitet, die zu einer gesteigerten Prostaglandinsynthese und erhöhten ATP-Produktion aus Glykolyse, Glykogenolyse und oxidativer Phosphorylierung führt. Desweiteren können Protonen auch aus der Proteolyse von Membranbestandteilen freigesetzt werden (Akkerman & Holmsen, 1981). Es ist verständlich, daß der Umbau des Zytoskeletts, die Sekretion sowie die Aktivierung verschiedener Ionenpumpen Prozesse sind, die einen sehr großen Energieverbrauch haben (Roskopf, 1999). Die Bildung von Protonen in Thrombin-stimulierten Plättchen scheint zum einen mit der Bildung von Laktat einherzugehen, zum anderen wurde aber auch eine laktatunabhängige Protonengenerierung nach Zugabe von höheren Thrombinkonzentrationen beobachtet. Man nimmt an, daß diese Protonen aus einer schlagartigen Erhöhung des mitochondrialen Energieverbrauchs stammen, die zudem mit der Sekretion saurer Hydrolase einhergeht (Akkerman & Holmsen, 1981).

Plättchenstimulation durch verschiedene Agonisten wie ADP, Thrombin oder PAF (Plättchen aktivierender Faktor) induziert eine Vielzahl biochemischer Vorgänge, die in einer Erhöhung der intrazellulären Protonenkonzentration resultieren können. Sowohl die Hydrolyse von ATP und GTP als auch eine gesteigerte Glykolyse und die Aktivierung von Ca^{2+} -ATPasen (durch $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Austausch) kann zu einer Ansäuerung des Zytosols führen (Valant & Haynes, 1993). Einer der Mechanismen zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH_i ist die metabolische Pufferung, die bei intrazellulärer Acidifizierung und ausreichender Oxygenierung zu einer Hemmung protonengenerierender Enzymsysteme führt, während protonenverbrauchende Systeme aktiviert werden. Zusätzlich nimmt die anaerobe Glykolyse ab und die Gluconeogenese und die Oxidation von Pyruvat hingegen zu (Forth et al., 1996).

Wesentlich ist jedoch auch der Säure-Basen-Transport durch die Zellmembran. Einer der wichtigsten Transporter ist hierbei der Na^+/H^+ -Exchanger (NHE). Getrieben wird dieser Austausch durch den Natriumgradienten in der Zelle (siehe oben). Stimuliert wird der Austausch durch intrazelluläre Ansäuerung, wohingegen eine extrazelluläre Acidose inhibitorisch wirkt. Zusätzlich existieren auch zwei verschiedene Cl/HCO_3^- -Austauscher, von denen einer natriumabhängig, der andere jedoch natriumunabhängig ist. Dieser zweite Typ wird durch das transmembranäre Konzentrationsgefälle dieser Anionen getrieben. Dieser Austauscher kann wahrscheinlich jedes Ion in beide Richtungen transportieren (Forth et al., 1996).

Zusätzlich sind manche Zellen des distalen Nephrons und des Gehirns mit einer H^+ -ATPase ausgestattet, die Protonen direkt unter Verbrauch von ATP sezerniert (Forth et al., 1996) (siehe Abbildung 5.2).

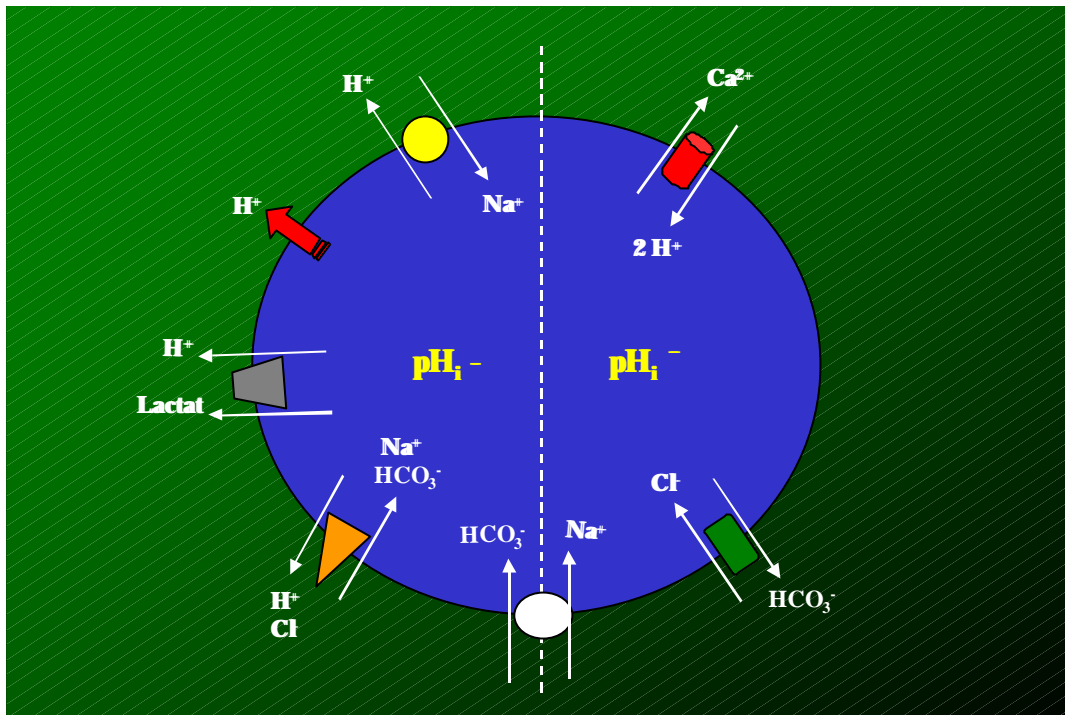


Abbildung 5.2: Regulation des intrazellulären pH-Wertes in neuronalen (nach Kaila & Ransom, 1998) und peripheren Zellen (Faber, 1997).

5.3.2 Der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE)

Verteilung und Topologie

Bisher wurden sechs Isoformen des Na⁺/H⁺-Exchangers in Säugetieren identifiziert. Die Isoform NHE1, die ubiquitär exprimiert wird, ist an der Regulation des intrazellulären pH-Wertes beteiligt und kontrolliert zudem das Zellvolumen. Der erst kürzlich klonierte NHE6 wurde als eine ubiquitäre mitochondriale Isoform identifiziert, die wichtig für die Mitochondrienfunktion zu sein scheint. Eine sehr starke Expression von NHE5 wird vor allem im Hirngewebe gefunden, was auf eine spezielle Rolle dieser Isoform in Neuronen hindeutet (Szabo et al., 2000). Das Vorkommen der anderen Isoformen NHE2, NHE3 und NHE4 ist hauptsächlich auf epitheliale Gewebe beschränkt, wo sie am Transport von Salzen beteiligt sein sollen. Verschiedene Befunde sprechen dafür, daß NHE1 die hauptsächlich, wenn nicht gar ausschließlich, in Plättchen vorkommende Isoform des plasmalemalen Na⁺/H⁺-Exchangers darstellt. Western-Plots konnten hohe Proteinkonzentrationen von NHE1, jedoch keine Proteine der Isoformen NHE3 oder NHE4, in Plättchen nachweisen (Roskopf, 1999).

Analysen der Primärstruktur des NHEs weisen auf das Vorhandensein zweier Domänen hin; einer membrandurchziehenden hydrophoben NH₂-terminalen Domäne mit ca. 500 Aminosäuren (AS) und einem hydrophilen C-Terminus mit ~300 AS. Die aminoterminal Domäne durchzieht die Membran 10-12 Mal, ist für den Ionentransport und die Amiloridsensitivität verantwortlich und beinhaltet den allosterischen H⁺-Sensor, während der COOH-Terminus regulatorische Funktion beinhalten soll (Shrode et al., 1998). Sowohl die NH₂- als auch die COOH-terminale Domäne liegt im Zytosol. Mögliche Bindungsstellen für Natriumionen und Amiloride wurden am N-Terminus entdeckt. Desweiteren sind mehrere Konsensusstellen für Ser/Thr-Kinasen vorhanden (Sardet et al., 1989) und das zytosolische Ende enthält zwei Bindungsstellen für Calmodulin.

Der NHE ist abhängig von extrazellulären Natriumionen, pH-sensitiv und kann durch Amilorid-Derivate inhibiert werden (Mahnensmith & Aronson, 1985). Der Exchange kann unter anderem durch verschiedene Phosphorylierungen aktiviert werden. Für folgende Systeme wurde eine Phosphorylierung im Zusammenhang mit einer NHE-Aktivierung gezeigt:

- Proteinkinase C (PKC) (Borin et al., 1989; Ogawa et al., 1993; Rosskopf, 1999)
- Ca²⁺/Calmodulin (Mix et al., 1984)
- Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK)
- Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) (Rosskopf, 1999)

Die Aktivierung des Exchanges durch Protonen resultiert aus einer allosterischen Bindung an eine nicht in den Transport involvierten Stelle (Aronson et al., 1982; Grinstein & Furuya, 1984). Ein Anstoßen der MAP-Kinasen-Kaskade beeinflusst Proteine wie ras, raf, MEK und MAPK. Dieser Mechanismus scheint der hauptsächliche Weg zu sein, auf dem die Stimulation der RTK (z.B. durch PDGF) oder die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (z.B. durch den Thrombinrezeptor) NHE1 aktivieren (Bianchini et al., 1997). Desweiteren kann eine Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase den C-Terminus von NHE1 in vitro phosphorylieren (Fliegel et al., 1992).

Aufgaben und Eigenschaften

Der Na⁺/H⁺-Exchanger in Plättchen vermittelt den elektroneutralen Austausch von intrazellulären Protonen gegen extrazelluläre Natriumionen. Die treibende Kraft für diesen Transport ist der Natriumgradient, der durch die Na⁺/K⁺-ATPase aufrecht erhalten wird.

Der basale pH-Wert in Plättchen variiert zwischen 7,0 und 7,2 (Astarie et al., 1990; Siffert et al., 1990; Livne et al., 1987). Der Exchanger ist hier praktisch inaktiv, obwohl aus dem

Metabolismus stammende Protonen trotzdem unaufhörlich aus der Zelle diffundieren (Aronson, 1985; Grinstein & Rothstein, 1986). Dies scheint auch der Grund dafür zu sein, daß bei physiologischen intrazellulären pH-Werten $\geq 7,2$ keine amiloridsensitiven oder natriumabhängigen $[pH]_i$ -Änderungen beobachtet werden können. NHE kann allosterisch durch intrazelluläre Protonen aktiviert werden und die maximale Transportkapazität wird bei einem intrazellulären pH-Wert von ca. 6,0 erreicht (Roskopf, 1999).

Hinzu kommt, daß es aufgrund der Präparation in den meisten Fällen schon zu einer Voraktivierung der Plättchen kommen kann und die bisher durchgeführten Studien deshalb nicht immer zu vergleichen sind. Daher ist es schwierig, Effekte verschiedener Agonisten an NHE zu deuten. Eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Ionophore soll ebenfalls zu einer Aktivierung von NHE führen, wobei es zu keiner Erhöhung von pH_i kommen soll (Kimura et al., 1990).

5.3.3 Cl^-/HCO_3^- -Exchanger und andere Mechanismen

Neben den Na^+/H^+ -Austauschern existieren noch weitere Mechanismen, die den intrazellulären pH-Wert regulieren können. Wie bereits erwähnt gehören hierzu verschiedene H^+ -ATPasen (Nelson, 1991) sowie natriumabhängige (NCBE) und –unabhängige Cl^-/HCO_3^- -Exchanger und H^+ -leitende Wege (Hackam et al., 1996; Tonnessen et al., 1990). Kürzlich wurde ein Cl^-/HCO_3^- -Symport in humanen Plättchen charakterisiert, der nach intrazellulärer Acidifizierung an der Wiederherstellung des intrazellulären pH-Wertes beteiligt sein soll (Gende & Cingolani, 1996). Vom NCBE wird berichtet, daß der Exchanger trotz Natriumabhängigkeit weder amilorid- noch EIPA-sensitiv ist (Hoffmann & Simonsen, 1989). Faber (1997) konnte beobachten, daß eine starke Ansäuerung des Zytosols von Rinderaorten-Endothelzellen (pH_i -Wert ca. 6,45) hauptsächlich zu einer Aktivierung des NHEs führt, der damit zu zwei Dritteln an der Wiederherstellung des pH_i s beteiligt ist, während ein Drittel durch den NCBE vermittelt wird. Eine weniger starke Ansäuerung (pH_i -Wert ca. 6,90) führt dagegen zum umgekehrten Fall. Der NHE scheint hauptsächlich für einen Anstieg des pH-Wertes nach akuter ausgeprägter Säurebelastung verantwortlich zu sein, wohingegen der NCBE eher im physiologischen pH-Bereich eine höhere Aktivität zu haben scheint (Faber, 1997). Da in den hier verwendeten Inkubationsmedien jedoch keine Bicarbonat-Ionen vorhanden waren, dürfte der Austausch in diesem System keine allzu große Rolle gespielt haben. Dennoch ist nicht geklärt, welche Bicarbonatkonzentration in den verwendeten Puffern tatsächlich vorhanden war, so daß nicht völlig auszuschließen ist, daß nicht auch geringe Bicarbonationenkonzentrationen für die Aktivierung dieses Exchangers ausreichend sind.

Bisher sind drei Klassen von Protonen-ATPasen bekannt, die mit den Bezeichnungen P-, V-, und F-ATPasen benannt wurden. Jede Zelle besitzt zumindest eine Klasse der H^+ -ATPasen. In synaptischen Vesikeln sind diese Strukturen z.B. für die Aufnahme und Speicherung von

Neurotransmittern verantwortlich. Die Aufgabe der V-ATPase (vesikuläre ATPase) ist dabei die Ansäuerung des Vesikelzytosols, damit ein Protonengradient bestehen bleibt, der die treibende Kraft für die Neurotransmitteraufnahme in die Vesikel darstellt (Rudnick, 1986 + 1987). V-ATPasen sind in eukaryotischen Zellen weit verbreitet. Sie wurden unter anderem in synaptischen Vesikeln, chromaffinen Granula, in dense Granula von Thrombozyten und dem Golgi-Apparat identifiziert. Zu den P-ATPasen (plasmamembranständige ATPasen) gehört unter anderem die Na^+/K^+ -ATPase. Die meisten Vertreter dieser Klasse stellen Ionenpumpen dar, durch die eine Vielzahl von Kationen transportiert werden. Dazu gehören unter anderem Natrium, Kalium, Protonen und Kalzium sowie eine Anzahl weiterer Ionen. P-ATPasen finden sich vor allem in der Plasmamembran, wo sie hauptsächlich für die Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase der Zelle verantwortlich sind, während F-ATPasen vorwiegend in Chloroplasten und Mitochondrien identifiziert wurden. Das Ausmaß der Acidifizierung wird von einem Chloridkanal kontrolliert (Nelson, 1991). Experimente mit dem ATPase-Hemmstoff Bafilomycin A1 führte zu keiner Änderung des intrazellulären pH-Wertes (Ergebnisse nicht dargestellt), so daß Hyperforin keine ähnlichen Eigenschaften vorzuweisen hat, die aufgrund der H^+ -ATPase-Hemmung zu einer Beeinflussung des pH_i führen könnten. Zudem konnte der Hyperforineffekt auf pH_i nicht durch Bafilomycin A1 beeinflußt werden.

5.3.4 Schlußfolgerung

Vermutlich führt Hyperforin aufgrund ähnlicher Mechanismen wie andere Plättchenstimulatoren zu einer Beeinflussung des Thrombozyten-Metabolismus, so daß es zu einer Generierung von Protonen in der Zelle kommt. Daß diese nicht aus einer gesteigerten Glykolyse entstehen, scheint durch die Versuche in glucosefreiem Medium erwiesen zu sein. Möglicherweise ist die intrazelluläre Ansäuerung ein Hinweis auf eine gesteigerte ATP-Hydrolyse, bei der ebenfalls Protonen entstehen. Ein Einstrom aus dem Extrazellulärraum ist unwahrscheinlich, da der pH-Wert in der Zelle um ca. 0,3 pH-Einheiten geringer war als im Außenmedium und daher kein Konzentrationsgefälle für einen Protoneninflux besteht.

Die initiale intrazelluläre Acidifizierung konnte in den hier durchgeführten Untersuchungen durch die Chelatierung des intrazellulären Kalziums mit BAPTA reduziert werden, was dafür spricht, daß die Generierung intrazellulärer Protonen durch Hyperforin ein kalziumabhängiger Effekt sein könnte. Der durch BAPTA deutlich erniedrigte basale pH-Wert in der Zelle deutet ebenfalls darauf hin, daß Kalziumionen bei der Regulation des intrazellulären pH-Wertes eine große Rolle spielen (Astarie et al., 1992). Untersuchungen der zeitlichen Zusammenhänge der Thrombinantwort in Plättchen zeigen, daß die Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeitlich gut mit der initialen Ansäuerung korreliert, was darauf hindeutet, daß die Entstehung von Protonen kalziumabhängig sein dürfte (Zavoico et al., 1986). Eventuell könnte hier die Aktivierung der

kalziumabhängigen Myosin-ATPase verantwortlich sein, da viele ATP'asen von der Anwesenheit von Kalzium- oder Magnesiumionen abhängig sind.

Für die sekundäre Alkalisierung, die nach 10 μM Hyperforin beobachtet wird könnte eine Aktivierung des natriumunabhängigen Cl/HCO_3^- -Exchangers (CBE) verantwortlich sein. Zum einen wäre damit die natriumunabhängige Alkalisierung des Zytosols erklärbar. Zum anderen scheint der NHE eher durch stärkere Säurebelastungen des Zytosols aktiviert zu werden, während die geringfügige Acidifizierung durch Hyperforinzugabe eher ein Signal für einen Exchanger ist, der bereits bei niedriger Ansäuerung des Intrazellularraumes aktiviert wird. Dem gegenüber steht jedoch der Befund, daß die beobachtete intrazelluläre Acidifizierung nach Hyperforinzugabe bei den verwendeten Konzentrationen annähernd gleich ist. Da diese Alkalisierung jedoch nur nach höheren Hyperforinkonzentrationen beobachtet wird, ist die direkte Beeinflussung eines spezifischen Mechanismus durch Hyperforin plausibler.

5.4 Kalziumtransportmechanismen

Kalzium ist einer der wichtigsten Regulatoren biologischer Funktionen. So spielt Kalzium in der Zelle eine wichtige Rolle als "second messenger", der unter anderem über G-Proteingekoppelte Rezeptoren extrazelluläre Signale von Hormonen oder Neurotransmittern auf intrazelluläre Effektoren überträgt. Im Plasma beträgt die Kalziumkonzentration etwa 2,5 mmol/l, von denen 40% an Proteine gebunden sind. Die Konzentration im Intrazellularraum ist wesentlich geringer, sie liegt bei 0,1 $\mu\text{mol/l}$. Diese geringe Kalziumkonzentration wird durch intrazelluläre Sequestrierung von Kalzium in Mitochondrien und im endoplasmatischen Reticulum (ER) sowie durch Transport aus der Zelle über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und eine Ca^{2+} -ATPase aufrecht erhalten. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann sehr schnell durch Freisetzung von Kalzium aus den intrazellulären Speichern bzw. durch einen Kalziuminflux von außen über kalziumsensitive Kanäle in der Zellmembran erhöht werden. Die intrazellulären Effekte von Kalzium werden vor allem durch kalziumbindende Proteine wie z.B. Troponin und Calmodulin vermittelt (Forth et al., 1996).

5.4.1 Ca^{2+} -ATPasen

Es gibt zwei verschiedene Kalziumpumpen in Thrombozyten. Es handelt sich dabei zum einen um eine Ca^{2+} -ATPase, die Ähnlichkeiten mit derjenigen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum aufweist, zum anderen um einen anderen Typ, der eher der in Erythrozyten gefundenen ähnlich ist. Beide Pumpen sind für die Aufrechterhaltung der niedrigen intrazellulären Kalziumkonzentration verantwortlich. Dabei wird Kalzium im Austausch gegen Protonen aus der Zelle transportiert (Enyedi et al., 1986).

Untersuchungen zur Lokalisation verschiedener Kalziumtransporter in der Präsynapse des Hühnerhirns konnten zeigen, daß Ca^{2+} -ATPasen vor allem in der Nähe der Neurotransmitter-Freisetzungsstellen lokalisiert sind. Es wird angenommen, daß sie durch die Erhaltung der niedrigen intrazellulären Kalziumkonzentration an dieser Stelle die Präsynapse auf die Freisetzung von Neurotransmitter vorbereiten sollen. Zudem soll die Ca^{2+} -ATPase nach synaptischen Aktivitäten extrazelluläres Kalzium wieder auffüllen (Juhaszova et al., 2000).

Die Ca^{2+} -ATPase in synaptischen Vesikeln des Kortex des Schafhirns ist für die Aufnahme von Kalzium und gleichzeitige Freisetzung von Protonen verantwortlich (Goncalves et al., 1999a+b).

5.4.2 Na⁺/Ca²⁺-Exchanger

Da es Hinweise gibt, daß es in Blutplättchen keinen spannungsabhängigen Transport für Kalzium gibt, der signifikante Relevanz für den Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ haben könnte (Doyle & Ruegg, 1985), dürfte dem Na⁺/Ca²⁺-Exchanger eine wichtige Rolle zukommen. Schäffer & Blaustein (1989) zeigten einen regulativen Einfluß des transmembranären Natriumgradienten auf $[Ca^{2+}]_i$, sowie einen gravierenden Einfluß auf die Kalziumhomöostase von humanen Blutplättchen (Brass, 1984). Vermutlich spielt der Na⁺/Ca²⁺-Exchanger in Synaptosomen aus dem Gehirn des Huhns eine wichtige Rolle bei der schnellen Entleerung intrazellulärer Speicherorganellen für Kalziumionen (Juhaszova et al., 2000).

Es wird vermutet, daß der Efflux von Kalziumionen aus Synaptosomen durch den Na⁺/Ca²⁺-Exchanger verursacht wird, der mit einer Stöchiometrie von drei oder sogar vier Na⁺ pro Ca²⁺ arbeitet. Einer Arbeit von Akerman & Nicholls (1981) zufolge, kann in Synaptosomen des Meerschweinchenhirns nur dann ein natriumabhängiger Kalziumefflux beobachtet werden, wenn die Synaptosomen zuvor in natriumfreiem Medium depolarisiert wurden. Unter diesen extremen Bedingungen konnte ein Kalziumefflux aus diesen Synaptosomen festgestellt werden, wenn Natrium dem Inkubationsmedium hinzugefügt wurde. Es scheint, daß der durch Depolarisation verursachte Kalziumeinstrom nicht durch Mechanismen erfolgt, die für die Aufrechterhaltung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ verantwortlich sind. Die Autoren gehen davon aus, daß in der synaptosomalen Plasmamembran ein Weg für den Kalziuminflux und ein separater Kalziumefflux-Mechanismus bzw. Mechanismen vorhanden ist/sind, die bei Ruhebedingungen simultan arbeiten. Der durch niedrige $[Ca^{2+}]_i$ aktivierbare Mechanismus für den Auswärtstransport von Kalzium könnte hierbei eine Ca²⁺-ATPase darstellen, während der Na⁺/Ca²⁺-Exchanger erst durch hohe $[Ca^{2+}]_i$ aktiviert wird (Akerman & Nicholls, 1981).

5.4.3 Unspezifische Kationenkanäle (NSC)

Einige Subtypen der unspezifischen Kationenkanäle (engl. non-selective cation channels, NSC) zeigen eine enge Verwandtschaft zu epithelialen Natriumkanälen (Kawahara, 1996). Bisher wurden drei verschiedene Typen von unspezifischen Kationenkanälen beschrieben, die sowohl in erregbaren als auch nicht-erregbaren Geweben gefunden werden (Suzuki et al., 1998). Durch unspezifische Kationenkanäle können sowohl Natrium- als auch Kalziumionen in die Zelle gelangen. Der erste Typ wird durch intrazelluläre Kalziumionen aktiviert, der zweite durch hydrostatischen Druck oder Dehnung und der dritte wird weder durch Kalziumionen noch durch hydrostatischen Druck aktiviert. Bekannt ist auch das Vorkommen von NSCs am Herzen, der Niere, und den Zellen der Retina, die durch cGMP-reguliert werden können (cGCC) (Kawahara, 1996). Es gibt Evidenzen, welche die Aktivierung von NSC durch ADP in Thrombozyten wahrscheinlich macht (Hourani & Hall, 1996). Bei der schnellen synaptischen Transmission spielen P2X-Rezeptoren eine Rolle, die durch Binden

von extrazellulärem ATP Kanäle öffnen, die den Influx von Kationen in die Zelle ermöglichen (Kawahara, 1996). In der Thrombozyten- (Borin & Siffert, 1990) und der Synaptosomenmembran (Sauvaigo et al., 1984; Reichardt & Kelly, 1983) sind diese ubiquitär vorkommenden Kanäle ebenfalls identifiziert worden. Suzuki et al. (1998) isolierten aus einer β -Zelllinie der Maus eine neue komplementäre DNA, die einen NSC kodiert (mNSC1), der Charakteristika eines NSC aufweist, der vorwiegend im Gehirn, dem Herzen und der Lunge verteilt ist. Dieser NSC war amiloridinsensitiv und sowohl für monovalente als auch bivalente Kationen, jedoch nicht für Anionen, permeabel. Die Autoren nehmen an, daß die aus 423 Aminosäuren bestehende Primärstruktur vier TMD bildet, wie sie sowohl bei rezeptoraktivierten nicht-selektiven Kationkanälen, als auch bei Glutamat-, Acetylcholin-, Serotonin- und ATP-Rezeptoren oder cGMP-gesteuerten Kationenkanälen gefunden wird. Es wurden zwar keine Sequenzhomologien zwischen diesen kationenpermeablen Kanälen identifiziert, dafür konnten jedoch Ähnlichkeiten zu einem kalziumaktivierten Ca^{2+} -Kanal (NS_{Ca}) beschrieben werden. NS_{Ca} wurden in epithelalem und nicht-epithelalem Gewebe gefunden, in denen der Kanal vermutlich drei Aufgaben zu erfüllen hat: 1. Aufrechterhaltung der Depolarisation erregbarer Zellen; 2. Verstärkung der Sekretion und 3. Transport von Natriumionen (Suzuki et al., 1998).

Auch in vaskulären glatten Muskelzellen (engl. vascular smooth muscle cells, SMC) wurden unselektive Kationenkanäle identifiziert, die sowohl für Kalzium- als auch für Natriumionen permeabel sind. Sowohl BAPTA als auch Thapsigargin, ein Hemmstoff der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, führen zur Aktivierung dieser Kanäle. Eine Aktivierung dieser Kanäle scheint durch eine Depletion von intrazellulären Kalziumspeichern in arteriellen Myozyten verursacht zu werden, was in einem Kalzium- und Natriumioneninflux resultiert. Der Influx von Natriumionen in SMC könnte, den Autoren zufolge, eine Membrandepolarisation induzieren, was potentiell zu einer Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle führen könnte. Dies würde einen additiven Kalziuminflux und damit eine Kontraktion der SMC verursachen (Trepakova et al., 2000).

Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß nicht-selektive Kationenkanäle sowohl für Kalzium- als auch für Natriumionen permeabel sind und nahezu ubiquitär in verschiedenen Geweben vertreten sind. Obwohl es verschiedene Möglichkeiten der Aktivierung diese NSC zu geben scheint (unter anderem durch die Aktivierung über G-Proteine), kann jeweils eine Erhöhung der intrazellulären Natrium- und Kalziumionenkonzentration beobachtet werden.

5.4.4 Schlußfolgerung

Eine mögliche Erklärung für den Anstieg von Kalzium in der Zelle könnte die hyperforininduzierte Erhöhung von $[\text{Na}^+]_i$ sein. Eine Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchangers durch die erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration würde bedeuten, daß Natrium aus- und Kalzium in die Zelle transportiert wird. Die halbmaximalen Natriumkonzentrationen, die

nötig sind, um den Exchange zu aktivieren, sind nicht sehr hoch, daher kann ein geringer Anstieg von $[\text{Na}^+]_i$ bereits zu einem Einwärtstransport von Kalzium führen. Dem gegenüber steht, daß die deutlich schnellere und stärkere Erhöhung von $[\text{Na}^+]_i$ durch Monensin zu keiner signifikanten Änderung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt. Da die Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ außerdem natriumunabhängig ist bzw. in natriumfreiem Medium nicht verstärkt werden kann, scheint der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchanger nicht involviert zu sein.

Eine Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt zu einer Aktivierung der ATPase, da diese für die Aufrechterhaltung der niedrigen Kalziumkonzentration in der Zelle verantwortlich ist. Daher könnten Protonen im Austausch gegen Kalzium in die Zelle gelangen, was eine weitere Erklärung für die intrazelluläre Ansäuerung sein könnte. Der Zeitverlauf der Ionenveränderungen nach Hyperforinzugabe zeigt jedoch, daß die zytosolische Ansäuerung bereits nach wenigen Sekunden ihr Maximum erreicht hat, während die intrazelluläre Kalziumkonzentration weiterhin ansteigt. Zudem sind die Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration durch niedrige Hyperforinkonzentrationen zu gering, um eine Aktivierung der Ca^{2+} -ATPase wahrscheinlich zu machen.

Den Untersuchungen zufolge, die unter Verwendung von SK&F 96365 durchgeführt wurden, wird der Kalziuminflux in das Thrombozytenzytosol hauptsächlich durch den Einstrom von Kalziumionen über unselektive Kationenkanäle getragen. Für diese Vermutung spricht auch, daß SK&F 96365 den hyperforininduzierten Influx von Natriumionen ebenfalls vollständig zu inhibieren vermag. Da die unselektiven Kationenkanäle für Natrium- und für Kalziumionen permeabel sind, scheinen die hier gewonnenen Befunde darauf hinzudeuten, daß sowohl die Erhöhung von $[\text{Na}^+]_i$ als auch von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch die Aktivierung unselektiver Kationenkanäle hervorgerufen wird. Eine parallele Überprüfung der Effekte von SK&F 96365 auf die ^3H -Serotoninaufnahme in Thrombozyten war bedauerlicherweise nicht möglich, da die Substanz selbst eine unspezifische Hemmung der 5-HT-Aufnahme zur Folge hat (Ergebnisse nicht dargestellt).

5.5 Zusammenhang zwischen pH-Wert, intrazellulären Kalzium- und Natriumkonzentrationen

Ob eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ für die Aktivierung des NHE Voraussetzung ist, wird kontrovers diskutiert. Während verschiedene Arbeitsgruppen davon ausgehen, daß die Aktivierung von NHE eine Voraussetzung für die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ in Plättchen ist (Siffert & Akkerman, 1989 + 1987), konnten andere zeigen, daß die Aktivierung von NHE unabhängig von der Mobilisation von Kalzium ist (Hunyady et al., 1987). Poch et al. (1993) beobachteten jedoch eine kalziumabhängige NHE-Aktivierung. Auch die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Ionomycin führt zu einer natriumabhängigen und amiloridsensitiven Alkalisierung des Zellinneren, verursacht durch die Aktivierung des NHE. Es scheint einen Zusammenhang zwischen der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Agonisten wie Thrombin und des intrazellulären pH-Wertes zu geben. Kalzium-Ionophore wie Ionomycin und A23187 führen ebenfalls zu einer Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ zeigen aber auch einen Effekt auf den intrazellulären pH-Wert. Zavoico et al. (1986) berichten von einem Abfall des $[pH]_i$ von ca. 0,02-0,15 pH-Einheiten nach der Zugabe von 1 μ M Ionomycin. Dagegen finden andere Arbeitsgruppen eine deutlich Erhöhung des $[pH]_i$ durch A23187, die durch eine Aktivierung von NHE verursacht sein soll (Siffert et al., 1984, Ogawa et al., 1989; Siffert et al., 1990). In diesen Fällen scheint Calmodulin direkt die Aktivität des NHE zu modulieren. Scheinbar genügt also eine Änderung von $[Ca^{2+}]_i$, um $[pH]_i$ zu ändern. Dagegen berichtete Siffert et al. (1989) von einer fast gleichzeitigen Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ und $[pH]_i$. Jedoch sollte man anmerken, daß bei diesen Untersuchungen die Änderung der Fura-2 Fluoreszenz etwas schneller zu beobachten war als die Erhöhung der BCECF Fluoreszenz.

Zudem führt die Chelatierung des intrazellulären Kalziums durch MAPT/AM zu einem saureren basalen pH, was darauf hinweisen dürfte, daß $[Ca^{2+}]_i$ für die Regulierung des intrazellulären pH-Wertes wichtig ist (Poch et al., 1993). Dieser Effekt konnte auch bei der Beladung der Plättchen mit BAPTA/AM beobachtet werden. Es ist daher möglich, daß Hyperforin über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration eine Änderung des intrazellulären pH-Wertes induziert.

Die Stimulation mit Thrombin führt zu einer biphasischen Veränderung des intrazellulären pH-Wertes ähnlich wie bei der Zugabe von Hyperforin (Borin et al., 1989; Zavoico et al., 1986). Initial führt Thrombin zu einer kurzen intrazellulären Ansäuerung von ca. 0,01-0,04 pH-Einheiten, gefolgt von einem schnellen alkalischen Shift, der sich nach wenigen Minuten auf einem Plateauwert von 0,1-0,15 pH-Einheiten über dem basalen pH-Wert stabilisiert (Zavoico et al., 1986; Siffert et al., 1984). Anders als bei der pH-Messung mit Hyperforin ist die intrazelluläre Alkalisierung in natriumfreien Medium verschwunden (Borin et al., 1989).

Anmerkung:

Einigen Untersuchungen zufolge führt die Verwendung geringer Thrombinkonzentrationen (<2 nmol/l) nur zu einer stabilen Ansäuerung des Thrombozytenzytosols und erst unter Verwendung höherer Konzentrationen (>5 nmol/l) kann ein biphasischer Effekt mit sekundärer intrazellulärer Alkalisierung beobachtet werden. Es wird vermutet, daß in den meisten vorliegenden Studien, bei denen die spezifische Aktivität des verwendeten Thrombins nicht angegeben wurde, Verunreinigungen mit β - und γ -Thrombin vorhanden waren, die rechnerisch in einer wesentlich höheren α -Thrombinkonzentration resultieren und damit einer höheren Konzentration als der tatsächlich angegebenen entsprechen. Aufgrund dessen konnte in den meisten Studien ein biphasischer Effekt durch Thrombin beobachtet werden (Jones et al., 1993).

Hinzu kommt, daß die Thrombozyten häufig gewaschen werden, bevor der intrazelluläre pH-Wert mittels BCECF-Beladung bestimmt wird. Diese Vorgehensweise führt zu einer Erniedrigung des Basalwertes auf einen pH-Wert von ca. 6,95, wohingegen er in ungewaschenen Plättchen bei einem Wert von ca. 7,15 liegt. Durch Aktivierung der Plättchen mit geringen Thrombindosen von 33 mU/ml wird ein neuer "Setpoint" bei $\text{pH}_i=6,99$ eingestellt. Nur wenn der basale pH-Wert über 6,99 liegt, führt die Aktivierung mit α -Thrombin zu einer stabilen Ansäuerung des Zytosols, während die Alkalisierung durch Thrombin erst beobachtet wird, wenn der zytosolische Basalwert unter 6,99 liegt (Ogawa et al., 1989).

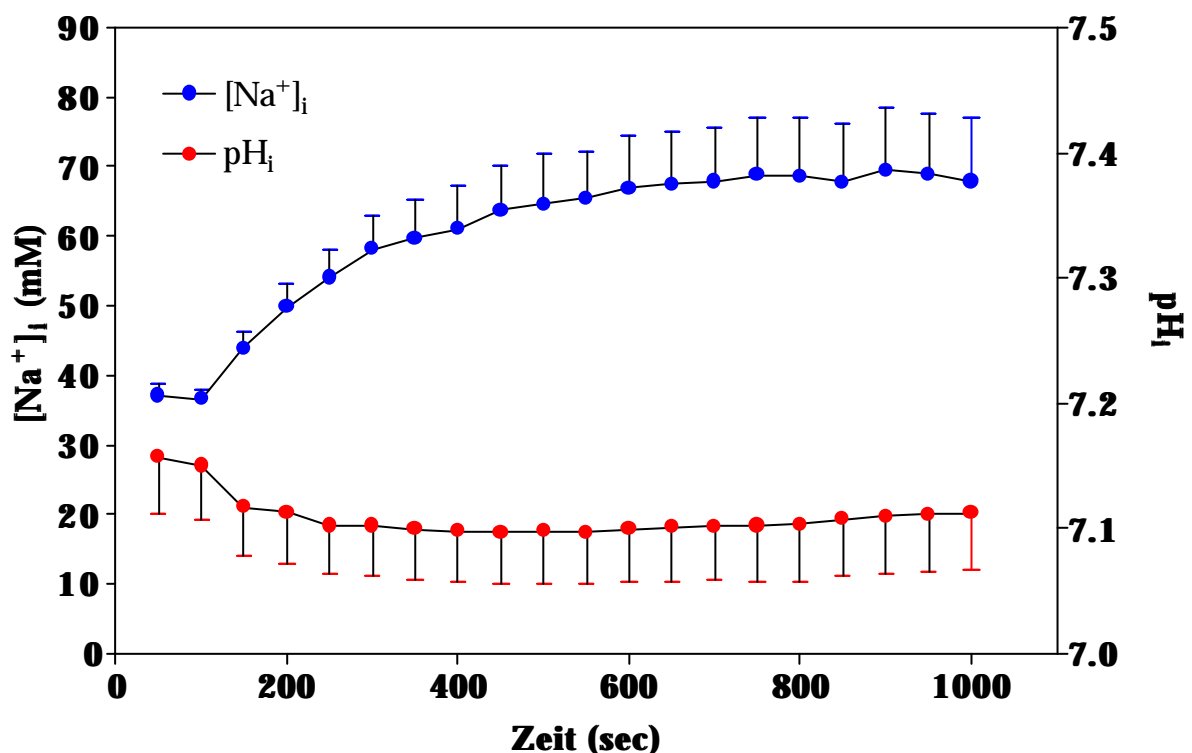


Abbildung 5.3: Änderung des zytosolischen pH-Wertes und der intrazellulären Natriumkonzentration durch 1U/ml Thrombin in Thrombozyten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 5-6 gleichzeitig durchgeführten Experimenten.

Da in den hier durchgeführten Untersuchungen der basale pH-Wert immer über 7,15 lag, konnte der biphasische Effekt nach Thrombinzugabe nicht beobachtet werden (Abbildung 5.3).

Eine weiterer Grund für den fehlenden biphasischen Thrombineffekt könnte zudem in der nur geringen Beteiligung des NHE an der beobachteten Erhöhung von $[\text{Na}^+]_i$ nach Thrombinzugabe zu finden sein (siehe Kapitel 5.8 Fazit).

Tendenziell wurde bei Verwendung hoher Konzentrationen von 3 U/ml Thrombin gegen Ende der intrazellulären Ansäuerung eine leichte Alkalisierung des pH-Wertes beobachtet. Dieses Verhalten zeigt deutliche Parallelen zu den durch Hyperforin induzierten Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes in Thrombozyten. Dies würde bedeuten, daß Hyperforin durch einen thrombinähnlichen Mechanismus zu einer Stimulation von Thrombozyten führt, die sich in irgendeiner Weise auf die intrazelluläre Konzentration von Protonen, Kalzium und Natrium auswirkt. Die thrombininduzierte Alkalisierung wird durch eine Phosphorylierung der PKC und einer Aktivierung des NHE erklärt, während man für die beobachtete Ansäuerung des Zytosols bisher keine befriedigende Erklärung hat (Jones et al., 1993).

Dennoch scheint die hyperforininduzierte intrazelluläre Alkalisierung komplexerer Natur zu sein, da, im Gegensatz zum Thrombineffekt, eine Inhibition des NHEs weder durch Amiloridderivate bzw. Cariporid noch durch Durchführung der Versuche in natriumfreiem Medium beobachtet werden konnte. Interessanterweise konnte gezeigt werden, daß Thrombin die Aufnahme von Serotonin in Blutplättchen der Ratte, vermutlich über eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration, inhibieren kann (Sneddon & Williams, 1974).

5.6 Beeinflussung der Membranviskosität

Änderungen der Membranviskosität können die Aktivität verschiedener Proteine modulieren, die unter anderem in den Transport von Ionen, in die Signaltransduktion, die Kalziumhomöostase der Zelle oder in die Regulation des intrazellulären pH-Wertes involviert sind. Die Membranviskosität ist der reziproke Wert der Membranfluidität und ein biochemisches Charakteristikum der Zellmembran. Änderungen der Membranviskosität reflektieren für gewöhnlich Veränderungen der Lipidzusammensetzung oder der Phospholipidverteilung der Membran. Desweiteren kann die Viskosität der Zellmembran auch durch den Redoxstatus und den lokalen pH-Wert sowie durch die Kalziumkonzentration, durch Zytoskelettproteine oder den Phosphorylierungsstatus der Membranbestandteile beeinflusst werden (Zicha et al., 1999).

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, daß sowohl Hyperforin als auch Cholesterol zu einer Erhöhung der Membranviskosität führen. Hierzu wurde mittels Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie die Fluoreszenz der Farbstoffe DPH (Diphenylhexatrien) und TMA-DPH (Trimethylammonium-Diphenylhexatrien) gemessen, die sich in spezifische Regionen einer biologischen Membran einlagern. Je nach Beweglichkeit des Fluoreszenzfarbstoffes in der Membran variiert die Polarisation des emittierten Lichtes. Diese Beweglichkeit in verschiedene Richtungen wird als Anisotropie bezeichnet, die aus der gemessenen Polarisation berechnet werden kann.

Zusätzlich wurden Messungen mit dem Farbstoff Pyren durchgeführt. Aufgrund seiner Lipophilie inkorporiert Pyren in den hydrophoben Bereich von Membranen und kann im Bereich der Fettsäurereste der Membranphospholipide diffundieren. Im Gegensatz zu DPH, das aufgrund seiner Molekülstruktur hauptsächlich axial zu den Fettsäureresten der Membranphospholipide lokalisiert ist, kann sich Pyren in allen Ebenen des hydrophoben Membrankerns bewegen. Man spricht daher von der lateralen Gesamt-Mobilität bzw. von der Bulk-Fluidität.

Die Bulk-Fluidität wurde fluoreszenzspektroskopisch bestimmt: Wenn zwei angeregte Pyrenmoleküle aufeinander treffen, kommt es zu einer Excimer-Bildung und durch die assoziierte Energieänderung zu einer diskreten Emission von Fluoreszenzlicht. Je öfter die im hydrophoben Membranbereich inkorporierten Pyrenmoleküle zusammentreffen, desto größer ist deren Beweglichkeit in der Membran. Das Verhältnis von excimerem zu monomerem Pyren repräsentiert somit die laterale Gesamt-Mobilität in diesem Membranbereich.

Bei einer Anregungswellenlänge von 286 nm lassen sich auch Excimere des Pyrens mit den Tryptophanresten von Membranproteinen erfassen. Das Verhältnis der Lichtemission dieser Excimere zur Lichtemission der Pyrenmonomere repräsentiert in diesem Fall die Lipidbeweglichkeit in der Nähe der Membranproteine. Diese wird als Annular-Fluidität bezeichnet (Eckert & Müller, 2001).

	Hirnmembranen		Thrombozyten	
	Kontrolle	Hyperforin 10 μ M	Kontrolle	Hyperforin 10 μ M
DPH	0,233 \pm 0,0036	0,242 \pm 0,0016*	0,212 \pm 0,0040	0,228 \pm 0,0050***
TMA-DPH	0,238 \pm 0,0003	0,223 \pm 0,0069*	0,220 \pm 0,0027	0,221 \pm 0,0046
Bulk	0,436 \pm 0,0504	0,393 \pm 0,0485	0,191 \pm 0,0462	0,148 \pm 0,0329**
Annular	0,979 \pm 0,0513	0,752 \pm 0,0925*	0,503 \pm 0,1088	0,292 \pm 0,0535**

Tabelle 5.2: Effekte von Hyperforin auf Anisotropie-Parameter neuronaler Membranen und Thrombozytenmembranen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus sechs gleichartigen Experimenten. Die Befunde wurden als signifikant bewertet, wenn * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ bezogen auf die Kontrolle (ungepaarter t-test).

Wie in Tabelle 5.2 zu sehen ist, erniedrigt Hyperforin in Konzentrationen, die auch in der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurden, die Fluidität an Hirnmembranen und Thrombozyten in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise. Zur Ermittlung der Effekte von Hyperforin auf die annuläre Fluidität und die Bulk-Fluidität wurde das Verhältnis von Pyren-Excimer zur Ratio der monomeren Fluoreszenzintensität (F_e/m), wenn Pyren bei der Anregungswellenlänge von Tryptophan angeregt wurde (286 nm) und bei der pyreneigenen Anregungswellenlänge (334 nm) bestimmt. Die Anisotropie der Fluoreszenzfarbstoffe DPH und TMA-DPH zeigt eine inverse Korrelation mit der Flexibilität der Membran-Acyllketten im Hydrokarbonkern und in hydrophilen Bereichen der Phospholipid-Gruppen der Membran (Eckert & Müller, 2001).

5.6.1 Einfluß der Membranviskosität auf pHi

In in vitro Versuchen wurde beobachtet, daß eine Cholesteroldepletion der Lymphoblastenmembran den NHE stimuliert, während eine Cholesterolanreicherung die Aktivität von NHE senkt. Ebenso wird die Aktivität des NHE in menschlichen Thrombozyten durch den Cholesterolgehalt der Membran beeinflusst und eine Vorinkubation mit HDL (High Density Lipoprotein) stimuliert den NHE, wohingegen LDL (Low Density Lipoprotein) den gegenteiligen Effekt hat (Nofer et al., 1997). Zudem zeigen Gesamtcholesterol und LDL Cholesterol eine positive Korrelation mit der NHE-Aktivität in humanen Leukozyten (Zicha et al., 1999). Einen möglichen Mechanismus postulieren Kochhar & Kaul, wonach die Erhöhung des Cholesterolgehaltes in humanen Plättchenmembranen zu einer Erhöhung der PLA₂-Aktivität führt, die eine Akkumulation von Protonen in der Zelle zur Folge hat. Durch den erniedrigten intrazellulären pH-Wert wird daraufhin NHE aktiviert (Kochhar & Kaul,

1992). Nach Zicha et al. (1999b) könnten Änderungen in der Mikroviskosität der äußeren Membranschicht durch Beeinflussung der NHE-Aktivität in die Regulation des zytosolischen pH-Wertes involviert sein.

Die Konzentration an intrazellulären Natriumionen wurde in den oben erwähnten Untersuchungen nicht ermittelt, es dürfte aber wahrscheinlich sein, daß eine Inhibierung bzw. Aktivierung von NHE zu einer gleichzeitigen Änderung von $[\text{Na}^+]_i$ führt und sich daher auch eine Erhöhung oder Erniedrigung der intrazellulären Natriumkonzentration ergibt.

5.6.2 Beeinflussung von Natriumtransportern

Der Einfluß einer erhöhten Cholesterolkonzentration wurde auch an natriumtransportierenden Systemen in Erythrozyten untersucht. Eine erhöhte Aktivität des Na^+/Li^+ -Countertransports wird in cholesterolangereicherten Erythrozyten gesehen. Auch für andere Transportprozesse bzw. Kanäle konnte eine Beziehung zwischen deren Aktivität und dem Cholesterolgehalt in der Erythrozytenmembran beobachtet werden. Zu nennen wären hier die Na^+/K^+ -ATPase, der Na^+ - "Leak" und der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransport. Cholesterol zeigt an nahezu allen Transportern eine negative Korrelation mit deren Aktivität (Zicha et al., 1999).

5.6.3 Beeinflussung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Membranviskositäts-Änderungen

Eine Cholesterolanreicherung in VSMC (vascular smooth muscle cells) führt darüber hinaus nicht nur zu einem Kalzium-Influx, sondern erhöht auch die Membranviskosität. LDL zeigt ebenfalls eine konzentrationsabhängige Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in VSMC, die zum Teil durch einen Kalziuminflux, aber auch durch eine Freisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern erklärt wird. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in humanen Plättchen korreliert positiv mit den Plasma-Cholesterol- und LDL-Konzentrationen, während HDL den gegenteiligen Effekt hat (Übersichtsarbeit Zicha et al., 1999).

5.6.4 Schlußfolgerung

Durch welchen Mechanismus ein erhöhter Cholesterolgehalt der Membran zu einer Erhöhung der intrazellulären Natrium- und Kalziumkonzentration sowie einer Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes führt, ist bisher nicht genau charakterisiert. Dennoch sind die Parallelen zu den hyperforininduzierten Veränderungen deutlich. Sowohl Hyperforin als auch Cholesterol führen zu einer Zunahme der Membranviskosität, erniedrigen also die Fluidität

der Membran. Die Effekte von Hyperforin auf die Membranfluidität werden im gleichen Dosisbereich beobachtet, bei dem auch schon die verschiedenen Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen beobachtet werden konnten. Es ist daher denkbar, daß Hyperforin über einen cholesterinähnlichen Mechanismus die Plasmamembran rigider macht und daher ähnliche Beeinflussungen verschiedener Transportsysteme oder Kanäle bewirkt, wie dies unter Cholesterin der Fall ist. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen bzw. Inkompatibilitäten zwischen verschiedenen Lösungsmitteln und den Fluoreszenzfarbstoffen war es nicht möglich, die Effekte von Cholesterin auf die Ionenhomöostase in den hier verwendeten Systemen zu untersuchen.

Hyperforin ist ein sehr lipophiles Molekül und wird sich daher schnell an der Plasmamembran anlagern, so daß es unter Umständen ähnlich wie Cholesterin in die Zellmembran "eingebaut" wird und dadurch die Zusammensetzung der Membranstruktur und deren Funktion ändert. Da es nicht möglich war, in den hier verwendeten Systemen den Effekt von Cholesterin auf die gemessenen intrazellulären Ionenkonzentrationen zu ermitteln, kann man nur vermuten, daß die erniedrigte Membranfluidität nach Hyperforinzugabe für die hier vorgestellten Beobachtungen verantwortlich ist.

Darüber hinaus ist es durchaus denkbar, daß derartige Änderungen in der Membranstruktur einer Zelle auch andere Transportsysteme wie z.B. SERT1 beeinflussen, und der Serotonintransporter schon aus diesem Grund inhibiert werden kann. Eine Beeinflussung der Sekundär-, Tertiär- und/oder Quartärstruktur verschiedener Ionenkanäle und -transporter sowie des Serotonintransporters durch die Zusammensetzung der Membranstruktur führt sicherlich auch zu veränderten Eigenschaften dieser Moleküle. Block & Edwards (1987) fanden in Lungenendothelzellen nach Behandlung mit Cholesterin-Hemisuccinat eine erniedrigte Membranfluidität und eine gleichzeitige Abnahme der ^{14}C -Serotoninaufnahme. Eine Zunahme der Fluidität führte dagegen zu einer Erhöhung der Serotoninaufnahme in diesen Zellen (Block & Edwards, 1987)

5.7 Bedeutung der hyperforininduzierten Effekte für das serotonerge System

Viele der bisher beobachteten bzw. beschriebenen Effekte von Hyperforin an verschiedenen Systemen sind durch Veränderungen der intrazellulären Konzentration von Natrium, Kalzium und Protonen erklärbar:

5.7.1 Neurotransmitter-Freisetzung

Der von Hyperforin beschriebene Release von verschiedenen Neurotransmittern ist durch die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ (Zucker, 1993a+b; Dunlap et al., 1995; Chen & Regehr, 1999) und $[H^+]_i$ erklärbar. Spannungsabhängige Kalziumkanäle werden z.B. in Nervenendigungen während des Aktionspotentials geöffnet, so daß $[Ca^{2+}]_i$ ansteigt. Umgekehrt führt die Freisetzung verschiedener Substanzen aus den „dense Granula“ auch zu einer Freisetzung von Ca^{2+} , da diese Organellen eine sehr hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und zudem einen pH_i von ca. 5,7 haben (Akkerman & Holmsen, 1981).

Affolter & Pletscher (1982) beobachteten bereits, daß Ionophore (Monensin, Nigericin, FCCP), die den Protonengradienten an der Plasmamembran von Thrombozyten zusammenbrechen lassen, zu einem Serotonin- und Noradrenalin-Release führen. Exozytose konnte hierbei ausgeschlossen werden, da beide Neurotransmitter in denselben Organellen gespeichert werden, der Release aber unterschiedliche Ausmaße annimmt. Auch eine Hemmung der Neurotransmitteraufnahme und nachfolgende kompensatorische Sekretion von Noradrenalin und Serotonin konnte ausgeschlossen werden. Da Substanzen, welche nur den Natrium- bzw. Kaliumgradienten eliminieren, keine Neurotransmitterfreisetzung hervorrufen, scheint der Protonengradient an der Plasmamembran für die Speicherung von Serotonin und Noradrenalin in Plättchen essentiell zu sein (Affolter & Pletscher, 1982).

Somit könnte Hyperforin über eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ und einer Änderung von pH_i zu dem in verschiedenen Studien beobachteten Neurotransmitterrelease führen (Gobbi et al., 1999; Kaehler et al., 1999).

Im übrigen wird dem Natriumion eine Rolle bei der Stimulierung der Kalziummobilisierung aus intrazellulären Speichern zugeschrieben (Nordmann & Stuenkel, 1991). Zusätzlich ist eine direkte Beeinflussung exozytotischer Prozesse, wie z.B. der Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran durch Natriumionen denkbar (Rahamimoff et al., 1978, Nordmann & Stuenkel, 1991), so daß auch die Erhöhung von $[Na^+]_i$ in die beobachtete Neurotransmitterfreisetzung involviert sein könnte.

Untersuchungen von Chatterjee et al. (2001) konnten zeigen, daß durch Hyperforin auch in Synaptosomen des Rattenkortex eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ und eine biphasische Veränderung von pH_i induziert werden kann. Zudem wurde die Freisetzung von Glutamat und GABA aus

diesen Zellen beobachtet, die auch in kalziumfreiem Medium noch beobachtet werden konnte. Sowohl die Neurotransmitterfreisetzung als auch die Beeinflussung der intrazellulären Ionenkonzentrationen wurde in Konzentrationsbereichen gefunden, die auch bei der Neurotransmitter-Aufnahmehemmung aktiv waren. Die Autoren gehen davon aus, daß die Stimulierung der Neurotransmitterfreisetzung und die bekannte Hemmung der Neurotransmitteraufnahme in Synaptosomen Konsequenzen der hyperforininduzierten Effekte auf die Ionenhomöostase sind. Aufgrund der Befunde von Chatterjee et al. (2001) kann davon ausgegangen werden, daß Hyperforin keinen reserpinähnlichen Mechanismus aufweist. Hyperforin führt zur Freisetzung von Glutamat und GABA aus Synaptosomen, während die Zugabe von Reserpin in diesen Experimenten keine Sekretion der beiden Neurotransmitter induziert (Chatterjee et al., 2001).

Durch eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wird die Fusion der Speichervesikel mit der Plasmamembran z.B. in chromaffinen Zellen der Kuh ermöglicht und somit die Exozytose induziert. Ungefähr 60% der intrazellulären Kalziumkonzentration befindet sich in den Vesikeln der chromaffinen Zellen, die daher eine hohe intravesikuläre Kalziumkonzentration haben. Der intravesikuläre pH von ca. 5,5 ist ebenfalls eine Voraussetzung für die Speicherung von Monoaminen im Vesikel. Eine Alkalisierung des Vesikelzytosols kann daher zu einem Release von Monoaminen führen (Mundorf et al., 2000). VMAT-Inhibitoren wie Reserpin oder Tetrabenazin führen in niedrigen nanomolaren Konzentrationen zu einer Abnahme der Kalziumkonzentration in den Vesikeln und zu einer Zunahme der Monoamin- und Kalziumkonzentration im Zytosol. Durch die Induktion der Freisetzung von Neurotransmittern ins Zytosol kann der Neurotransmittertransport an der Plasmamembran zusätzlich gehemmt werden, so daß durch den hyperforininduzierten Release von Neurotransmittern eine Inhibition des Uptakes möglich wäre.

5.7.2 Neurotransmitter-Aufnahmehemmung

Protonenabhängigkeit

Obwohl einige Studien in Plättchen (Keyes & Rudnick, 1982) und Plazentazellen (Cool et al., 1990) zeigen konnten, daß Protonen Kaliumionen bei der Regulation der Serotoninaufnahme ersetzen können, scheint dies in Synaptosomen nicht zuzutreffen. Während Protonen in Plazentazellen die V_{max} des Serotonintransports erhöhen, wird die Affinität des Transportes für Serotonin durch einen sauren pH-Wert erniedrigt. Bei einem pH-Wert von 6,5 im Intra- und Extrazellulärraum ist die Serotoninaufnahme deutlich erhöht, dagegen ist sie am geringsten bei pH_{i+ex} von 7,5. Die Effekte von intrazellulären Kaliumionen auf die Kinetik der Serotoninaufnahme sind mit denen der intrazellulären Protonenkonzentration vergleichbar.

Ähnlich wie in Blutplättchen werden die Effekte von $[H^+]_i$ durch die Anwesenheit von $[K^+]_i$ maskiert, so daß beide Ionen miteinander in Wettstreit stehen dürften (Cool et al., 1990).

Demgegenüber stehen Untersuchungen an Synaptosomen aus dem Mäusehirn, die feststellten, daß $[K^+]_i$ in diesem System scheinbar nicht durch interne Protonen ersetzt werden kann. Trotzdem zeigt der Serotonintransport in Synaptosomen auch eine gewisse pH-Abhängigkeit, da die Serotoninaufnahme durch Erniedrigung sowohl des intra- wie auch extrazellulären pH-Wertes vermindert ist. Die Autoren vermuten, daß ein neutraler intrazellulärer pH-Wert aufrecht erhalten werden muß, damit Kalium an den Transporter binden kann. Dadurch kann der Transporter wieder zur Außenseite der Zellmembran geöffnet werden (Reith et al., 1989).

Natriumabhängigkeit

Externes Natrium erhöht V_{max} und die Affinität des Transportes für Serotonin in humanen Plazentazellen (Cool et al., 1990). Die unbedingte Abhängigkeit der Serotoninaufnahme vom Natriumgradienten in Plättchen und Synaptosomen wurde in zahlreichen Studien gezeigt (Reith et al., 1989, Sneddon, 1969). Diese Studien befaßten sich allerdings meist mit der Ermittlung des Serotonintransportes in Abhängigkeit von der extrazellulären Natriumkonzentration.

Da bisher nicht genau bekannt ist, bei welchen intrazellulären Natriumkonzentrationen die Neurotransmitteraufnahme beeinflusst wird, muß davon ausgegangen werden, daß bereits geringe Erhöhungen um 20-30 mM zu einer Hemmung der Serotoninaufnahme führen können.

Experimente von Wölfel et al. (1989) dienten zur Untersuchung der Aufnahme von 3H -Serotonin in Abhängigkeit von der intrazellulären Natriumkonzentration in Blutplättchen von Kaninchen. Die basale $[Na^+]_i$ betrug 9 nM/10⁸ Zellen und wurde mittels Flammenphotometrie bestimmt. Nach einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration um 69%, entsprechend einer Konzentration von 13,04 nM/10⁸ Zellen, war V_{max} an SERT1 um 50% reduziert. Übertragen auf das in der vorliegenden Arbeit verwendete System würde dies eine Reduktion von V_{max} um 50% bei einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration, ausgehend von einem Basalwert von ca. 25 mM auf 36,23 mM, bedeuten. Es ist daher anzunehmen, daß schon aus sehr geringen Veränderungen der intrazellulären Natriumkonzentration deutliche Effekte auf die Neurotransmitter-Aufnahme resultieren, die eventuell durch noch geringere Hyperforinkonzentrationen verursacht werden können. In dieser Arbeit konnte zudem beobachtet werden, daß durch Ouabain K_M an SERT1 unverändert ist, während V_{max} reduziert wird. In Analogie zu den hier durchgeführten Michaelis-Menten-Experimenten mit Hyperforin deutet dies auf eine nicht-kompetitive Hemmung der Serotoninaufnahme durch Ouabain hin. Laut in unserer Arbeitsgruppe

durchgeführten Untersuchungen ist ein Angriff von Hyperforin an der Na^+/K^+ -ATPase jedoch auszuschließen.

Bereits 1971 konnte gezeigt werden, daß verschiedene Substanzen, die auf den unterschiedlichsten Wegen zu einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration in Rattenthrombozyten führen, eine konzentrationsabhängige Inhibition der Serotoninaufnahme verursachen. Die Hemmung der Serotoninaufnahme korrelierte hierbei mit der Zunahme von $[\text{Na}^+]_i$ in den Thrombozyten und nicht mit der Konzentration der eingesetzten metabolischen Inhibitoren. Verwendet wurde der Na^+/K^+ -ATPase-Inhibitor Ouabain und eine Kombination von Natriumfluorid/Dinitrophenol, die zu einer Hemmung der ATP-Produktion führt. Eine Abschätzung der aufgetragenen Werte ergibt eine Reduktion der ^{14}C -Serotoninaufnahme auf 50%, wenn die intrazelluläre Natriumkonzentration auf 70 mM ansteigt (Sneddon, 1971).

Natriumionen haben darüber hinaus vielfältige Effekte auf andere Regulationsmechanismen. So scheint Natrium einen Einfluß auf die Spaltung von Phosphatidylinositol in Meerschweinchen-Synaptoneurosomen zu haben. Gusovsky & Daly (1988) beobachteten eine vermehrte Bildung von IP_3 nach Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration durch verschiedene Substanzen, die $[\text{Na}^+]_i$ beeinflussen. Die Autoren vermuten, daß der Anstieg von $[\text{Na}^+]_i$ den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchanger aktiviert und dadurch $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ansteigt, so daß die Kalziumkonzentration an den Stellen der Phosphoinosithydrolyse erhöht wird. Brass & Joseph (1985) beobachteten nach einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ außerdem eine vermehrte Sekretion von Serotonin aus dem dense Tubular-System von Thrombozyten.

Obwohl Hyperforin einige Parallelen zur Wirkung verschiedener Ionophore zeigt, ist die Beeinflussung des Natriumgradienten komplexer und wird wahrscheinlich über spezifische Strukturen vermittelt. Da eine Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase ausgeschlossen werden kann, muß eine Aktivierung der in der Plasmamembran vorhandenen Exchanger oder unspezifischen Kationenkanäle dafür verantwortlich sein. Tatsächlich scheinen die letzten Experimente darauf hinzudeuten, daß Hyperforin einen Einstrom von Natrium- und Kalziumionen über unspezifische Kationenkanäle in der Plasmamembran induziert. Dafür könnte die Änderung der Membranfluidität verantwortlich sein.

Kalziumabhängigkeit

Obwohl es nur vereinzelte Studien über eine mögliche Kalziumabhängigkeit der Serotoninaufnahme in Blutplättchen gibt, soll hier auf Untersuchungen einiger Arbeitsgruppen hingewiesen werden, die diese Möglichkeit näher untersucht haben.

Helmeste et al. (1995) beobachteten, daß SSRIs die Mobilisierung intrazellulären Kalziums in Thrombozyten beeinflussen können. Die untersuchten Antidepressiva Sertralin, Fluoxetin, Paroxetin und Imipramin führten zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der

intrazellulären Kalziumkonzentration und erniedrigten die thrombininduzierte Kalziumantwort. Allerdings korrelierte die Potenz der SSRI bezüglich der $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung nicht mit deren Potenz für die Serotoninaufnahme-Hemmung und die nötige Konzentration zur Beeinflussung von $[Ca^{2+}]_i$ lag deutlich über der vermutlich erreichbaren therapeutischen Dosis. Die Autoren vermuten dennoch eine Beeinflussung von IP_3 oder Calmodulin durch SSRI, die letztendlich zur antidepressiven Wirksamkeit dieser Substanzen beitragen könnte (Helmeste et al., 1995).

Die EGTA-Chelatierung extrazellulären Kalziums führt zu einer Hemmung der Serotoninaufnahme in Plättchen, die nur durch exzessive Zugabe von 2 mM Kalzium ins Medium wiederhergestellt werden kann (Nishio et al., 1995). Dagegen kann bei Chelatierung von $[Ca^{2+}]_i$ durch BAPTA/AM nur dann eine Inhibierung der Serotoninaufnahme beobachtet werden, wenn auch das Außenmedium kalziumfrei ist. Eine nähere Charakterisierung dieser Ergebnisse scheint darauf hinzudeuten, daß die volle Integrität intrazellulärer Kalziumspeicher für die Regulation der Serotonintransportkapazität nötig ist (Nishio et al., 1995).

Dennoch scheint die extrazelluläre Kalziumkonzentration keine allzu große Rolle bei der Hemmung der Serotoninaufnahme zu spielen. Sämtliche Messungen zur Serotoninaufnahme in Thrombozyten und Synaptosomen wurden in nominell kalziumfreiem Medium durchgeführt, so daß Hyperforin unter diesen Versuchsbedingungen nur moderate Effekte auf die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zeigt und diese Komponente daher nicht für die Hemmung der Serotoninaufnahme verantwortlich sein dürfte.

5.8 Fazit

Anmerkungen:

Die Problematik bei der Bestimmung der Effekte verschiedener Agonisten an NHE liegt in der Verwendung indirekter Methoden, wodurch eine Beurteilung der beobachteten Effekte erschwert wird. Manche Messungen werden in natriumfreiem Medium oder in künstlich angesäuerten Plättchen durchgeführt. Da mehrere, von einer NHE-Aktivierung unabhängige Effekte durch diese Manipulationen ausgelöst werden können, sind derartige Messungen nicht allzu aussagekräftig. Zudem werden sehr viel höhere Konzentrationen verschiedener Amiloridderivate benötigt, um die Alkalisierung durch vermeintliche NHE-Agonisten zu inhibieren (Übersichtsarbeit von Siffert, 1995). Der vorherrschende Weg, auf dem Natriumionen in stimulierte Plättchen gelangen, ist einigen Untersuchungen zufolge der Einstrom über nicht-selektive Kationenkanäle und ist nur zu einem geringen Anteil durch den Einstrom über den NHE zu erklären (Stamouli et al., 1993; Borin & Siffert, 1991; Sage et al., 1991). Danach werden nur 20-30% des thrombininduzierten Natriuminflux durch eine Aktivierung des NHE verursacht. Der hauptsächliche Natriumeinstrom kommt durch unspezifische Kationenkanäle zustande (Stamouli et al., 1993).

Aufgrund dieser methodischen Probleme ist die durch NHA inhibierbare intrazelluläre Alkalisierung nach höheren Hyperforinkonzentrationen nicht unbedingt auf eine Aktivierung des Natrium-/Protonen-Exchangers zurückzuführen. Bekräftigt wird diese Vermutung durch die Tatsache, daß die hyperforininduzierten Effekte auf pH_i nicht von der extrazellulären Natriumkonzentration abhängig sind. Der inhibitorische Effekt des Amiloridderivates NHA auf die hyperforininduzierte Alkalisierung läßt sich daher nicht zwangsläufig als eine Inhibition von NHE1 interpretieren. Wie viele andere Amiloride hat auch NHA in höheren Konzentrationen Effekte auf andere Ionenkanäle, -Transporter und ATP-Asen, die eine eindeutige Interpretation der Befunde erschweren.

Auch das K^+ -Ionophor Nigericin ist in der Lage, $[\text{pH}]_i$ zu beeinflussen. Nigericin führt unter normalen physiologischen Bedingungen (auswärts gerichteter Kaliumgradient) zu einem Auswärtsstrom von intrazellulärem Kalium im Austausch gegen Natrium und Protonen, die in die Zelle transportiert werden und dadurch zu einer Senkung von $[\text{pH}]_i$ führen. Ähnlich wie Hyperforin führt Nigericin in unstimulierten Plättchen zu einer initialen Ansäuerung, die bei der Verwendung niedriger Konzentrationen (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stabil bleibt, bei der Zugabe von höheren Konzentrationen (1-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) jedoch zu einer nachfolgenden Alkalisierung führt (Zavoico et al., 1986).

Der Effekt von Nigericin ist nicht kalziumabhängig. 25 μM Nigericin zeigen bei Borin et al. (1989) ebenfalls einen biphasischen Effekt. Diese Beobachtung wurde auch in dem hier verwendeten System gemacht. Die Zugabe von 1 μM Nigericin führt zu einer schnellen Ansäuerung des Zellinneren und anschließender Alkalisierung teilweise über den Basalwert

hinaus. Im Falle des K^+/H^+ -Ionophores Nigericin konnte in natriumfreiem Medium, wie in der Literatur mehrfach beschrieben, die Ansäuerung durch Aktivierung des NHE nicht mehr kompensiert werden, da keine extrazellulären Natriumionen zum Austausch gegen intrazelluläre Protonen zur Verfügung standen. Im Gegensatz dazu ist die pH_i -Änderung durch Hyperforin nicht von der extrazellulären Natriumkonzentration abhängig, was nur den Schluß zuläßt, daß der NHE hier keine Rolle spielt. Somit kommt für die sekundäre Alkalisierung des Thrombozytenzytosols durch 10 μM Hyperforin nur ein natriumunabhängiger Transport wie z.B. der natriumunabhängige Cl/HCO_3^- in Frage, der ebenfalls für die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH -Wertes verantwortlich ist.

Fazit:

Bislang ist die Veränderung intrazellulärer Ionenkonzentrationen und die daraus resultierende Beeinflussung anderer Parameter auch in anderen Systemen nicht vollständig geklärt. Aufgrund deutlicher Änderung verschiedener Ionenkonzentrationen sowohl im Extra- als auch Intrazellulärraum, wird die Zelle über die verschiedensten Mechanismen gegenregulieren, um die Ionenhomöostase aufrecht zu erhalten. Es ist somit schwierig, in einem Gesamtsystem, in dem viele verschiedene Ionenkanäle und -Transporter vorhanden sind, einen beobachteten Effekt nur auf die Aktivierung oder Hemmung einer einzigen Struktur zu beziehen. Vielmehr sind diese Effekte als eine Summe der sowohl initialen und sekundären als auch direkten und indirekten Mechanismen zu sehen. Trotz allem kann die Summe dieser Effekte bezüglich ihrer Auswirkungen auf weitere Parameter diskutiert werden. Bezüglich der Abhängigkeit der Serotoninaufnahme von diversen Ionenkonzentrationen kann man die Summe der beobachteten Effekte durchaus sowohl mit einer Hemmung der Serotoninaufnahme als auch mit einer Freisetzung von Serotonin in Einklang bringen. Zudem könnte die Beeinflussung eines solch allgegenwärtigen Parameters, wie der Ionenhomöostase, gleichzeitig die unspezifische Hemmung der fünf untersuchten Neurotransmittertransporter erklären.

Problematisch sind die vielfältigen Effekte, die Hyperforin auf ionentransportierende Strukturen hat, so daß die Identifizierung eines spezifischen Angriffsortes diffizil ist. Hyperforin (0,04-0,8 μM) moduliert die kinetischen Eigenschaften von P-Typ-Kalziumkanälen in Purkinje-Neuronen. Hierbei wurden bereits zwei separate Mechanismen postuliert, wobei eine Beeinflussung von G-Proteinen nicht involviert sein soll (Fisunov et al., 2000). Krishtal et al. (2001) beschreibt neben der calmodulinabhängigen Modulation von P-Typ-Kalziumkanälen eine zusätzliche Hemmung verschiedener Ionenkanäle durch nanomolare Hyperforinkonzentrationen. Hyperforin zeigt hemmende Effekte auf ligandengesteuerte AMPA-, NMDA- und GABA-abhängige Ionenströme, sowie auf spannungsabhängige Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle (Chatterjee et al., 1999).

Eine Möglichkeit, verschiedene Ionenkonzentrationen in der Zelle zu beeinflussen, ist die Änderung der Membranfluidität, so daß der Beeinflussung dieses Parameters durch Hyperforin ein wesentlicher Anteil an den beobachteten Effekten zugeschrieben werden könnte. Ein wichtiger Angriffspunkt des Hyperforins sind nach den hier erhaltenen Ergebnissen unspezifische Kationenkanäle, die für den Einstrom von Natrium- und Kalziumionen verantwortlich sein dürften. Möglicherweise ist die Aktivierung dieser Kanäle auf eine Änderung der Membranfluidität nach Hyperforinzugabe zurückzuführen.

Ähnliche Effekte sind auch von Natriumfluorid bekannt, das Thrombozyten über einen direkten Effekt auf GTP-bindende Proteine zu aktivieren vermag. NaF aktiviert G_p , ein G-Protein, das mit der Phospholipase C (PLC) gekoppelt ist. Diese Aktivierung resultiert in dem Anstoßen des IP_3 -Weges und damit in der Mobilisierung von Kalzium aus intrazellulären Speichern und einem Kalziuminflux aus dem Außenmedium (Stamouli et al., 1993; Siffert et al., 1990). Nach Zugabe von NaF wird eine Erhöhung der intrazellulären Natrium- (Stamouli et al., 1993) und Kalziumkonzentration (Siffert et al., 1990), sowie nach höheren Konzentrationen von 10-20 mM eine stabile zytosolische Ansäuerung, beobachtet (Siffert et al., 1990). Auch ADP vermittelt einen Einstrom von Natriumionen über Kalziumkanäle in Thrombozyten (Sage et al., 1991). Auch hier wird eine Beteiligung der NSC vermutet.

Für Natriumionen ist eine Modulation der Funktion von G-Proteinen in HL-60 Zellen beschrieben worden. Sowohl die basale GTP-Hydrolyse als auch die GTP-Hydrolyse nach Stimulation der Zellen mit fMLP, einem chemotaktischen Peptid, wird durch NaCl signifikant erhöht. Der nach fMLP-Zugabe beobachtete Natriuminflux könnte deshalb ein Initiationsignal für die beschriebene Freisetzung von β -Glucuronidase und die gesteigerte O_2^- -Produktion nach fMLP-Zugabe sein. Beide Prozesse werden durch eine gesteigerte Aktivierung von G-Proteinen induziert (Krautwurst et al., 1992). Das Natriumion dürfte daher zusätzlich zum Kalziumion ein intrazelluläres Signalmolekül darstellen.

Darüberhinaus könnte die nach Hyperforin und NaF beobachtete intrazelluläre Ansäuerung unter anderem auf eine gesteigerte GTP-Hydrolyse zurückzuführen sein.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnten die initialen Befunde bezüglich der potenten Serotoninaufnahmehemmung durch Johanniskrautextrakt mittels Radiorezeptorassay-Methoden bestätigt werden. Es wurde gezeigt, daß die Phloroglucinole Hyperforin und Adhyperforin größtenteils für die Inhibierung der Serotoninaufnahme in Maushirn-Synaptosomen verantwortlich sind. Die halbmaximalen Hemmkonstanten sind für beide Inhaltsstoffe identisch und liegen bei ca. 400 nM. Dagegen konnte nur bei einer weiteren relevanten Inhaltsstoffgruppe aus *Hypericum perforatum*, nämlich den OPCs, eine Hemmung der Serotoninaufnahme in Synaptosomen festgestellt werden.

Wichtige Befunde konnten durch Ermittlung der Serotoninaufnahme in humanen Thrombozyten gewonnen werden. Vergleichende Untersuchungen von verschiedenen klassischen Antidepressiva und von Hyperforin an der Serotoninaufnahme in Thrombozyten und Synaptosomen zeigten jeweils identische halbmaximale Hemmkonstanten in beiden Systemen. Zum einen wurde durch diese Experimente erstmals eine Beeinflussung der Serotoninaufnahme durch Hyperforin in humanen Zellen nachgewiesen, und zum anderen konnte dadurch bestätigt werden, daß Thrombozyten als ein peripheres Modell der Serotoninaufnahme verwendet werden können.

Eine nähere Charakterisierung des molekularen Wirkungsmechanismus der Serotoninaufnahmehemmung durch Hyperforin in Synaptosomen lieferte Hinweise darauf, daß Hyperforin einen von den klassischen Antidepressiva unterschiedlichen Mechanismus aufweist. Im Gegensatz zu den bekannten Antidepressiva zeigt Hyperforin nicht-kompetitive Eigenschaften am Transportermolekül. Unterstützt wird diese Vermutung durch weitergehende Untersuchungen, bei denen die direkte Interaktion von Johanniskrautextrakt und Hyperforin mit SERT1 durch Ermittlung der Paroxetinbindung an Maushirnmembranen bestimmt wurde. Auch hier zeigt Hyperforin einen andersartigen Einfluß. Sämtliche klassischen Antidepressiva weisen eine sehr gute Korrelation zwischen der Hemmung der Paroxetinbindung und der Inhibition der Serotoninaufnahme mit nahezu identischen IC_{50} -Werten auf. Dagegen hat weder Johanniskrautextrakt noch Hyperforin einen erwähnenswerten Einfluß auf die Paroxetinbindung, was darauf schließen läßt, daß beide Substanzen nicht durch eine direkte Bindung an die Substratbindungsstelle des Serotonintransporters die Inhibition der Serotoninaufnahme induzieren.

Ausgehend von diesen Befunden wurden weitere Parameter untersucht, welche für die Regulation der Serotoninaufnahme verantwortlich sind. Die wichtigste treibende Kraft für die Aktivierung und Aufrechterhaltung des Serotonintransportes ist der an der Plasmamembran bestehende Natriumgradient, so daß sich die weiteren Untersuchungen vor allem mit der Ermittlung der intrazellulären Natriumkonzentration nach Hyperforinzugabe befaßten. Während der SSRI Citalopram keinen Einfluß auf die intrazelluläre Natriumkonzentration in Thrombozyten ausübt, führt Hyperforin in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise zu

einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration. Aufgrund dieser hyperforininduzierten Beeinflussung von $[Na^+]_i$ und der daraus resultierenden Erniedrigung des Natriumgradienten an der Plasmamembran, läßt sich nicht nur die Hemmung der Serotoninaufnahme, sondern auch die Inhibierung der Aufnahme von Noradrenalin, Dopamin, GABA und L-Glutamat erklären.

Um die Ursache des Natriuminflusses in das Thrombozytenzytosol zu ermitteln, wurden Vergleichssubstanzen herangezogen, die bekanntermaßen ebenfalls zu einer Erhöhung von $[Na^+]_i$ führen. Da durch diese Vergleichssubstanzen auch andere intrazelluläre Ionenkonzentrationen beeinflußt werden, wurden die Effekte von Hyperforin mittels Fluoreszenzspektroskopie auf diese Ionenkonzentrationen zusätzlich untersucht. Hyperforin verursacht in höheren Konzentrationen (10 μM) eine gravierende Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ und eine biphasische Beeinflussung des zytosolischen pH-Wertes mit initialer Ansäuerung und sekundärer Alkalisierung des Zytosols. Es handelt sich hierbei größtenteils um einen Kalziuminflux aus dem Außenmedium und in geringerem Maße um eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern. Niedrigere Hyperforinkonzentrationen von 0,3-3 μM führen zu einer konstanten intrazellulären Acidifizierung und einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Eine Beteiligung des NHE kann weitgehend ausgeschlossen werden, da der pH-Effekt nicht natriumabhängig ist. Die sekundäre Alkalisierung, die nach Zugabe von höheren Hyperforinkonzentrationen (10 μM) beobachtet wird, deutet auf die Aktivierung eines Mechanismus hin, der für die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes verantwortlich ist. Ein potentieller Kandidat könnte der natriumunabhängige Cl/HCO_3^- -Exchanger sein. Die Beeinflussung der $[Na^+]_i$ und des pH_i scheinen voneinander unabhängige Prozesse zu sein.

Der Einstrom von Natrium- und Kalziumionen läßt sich vermutlich über nicht-selektive Kationenkanäle erklären, da beide hyperforininduzierten Effekte durch SK&F 96365 nahezu vollständig inhibierbar sind. Die intrazelluläre Ansäuerung, die auch durch die meisten Thrombozyten-Stimulatoren verursacht wird, dürfte auf eine Aktivierung des Thrombozytenmetabolismus zurückzuführen sein. Da eine Generierung von Protonen aus der Glykolyse ausgeschlossen werden kann, muß hier die Entstehung von Protonen z.B. aus der Hydrolyse von ATP oder GTP in betracht gezogen werden. Eine plausible Erklärung wäre die Aktivierung nicht-spezifischer Kationenkanäle über eine Hydrolyse von GTP, wie sie auch von NaF beschrieben wird. Damit wäre der Influx von Natrium- und Kalziumionen ins Zytosol und die beobachtete intrazelluläre Acidifizierung mit einem Mechanismus erklärbar. Es ist außerdem nicht ganz von der Hand zu weisen, daß eine deutliche Erhöhung intrazellulärer Ionenkonzentrationen sekundär zu einer Beeinflussung weiterer Ionentransporter führen könnte.

Hyperforin führt zusätzlich zu einer Fluiditätsänderung der Plasmamembran neuronaler Zellen und Thrombozyten. Es ist jedoch nicht geklärt, inwieweit die Veränderung der

Membranfluidität für die beobachteten Befunde bezüglich der Änderung intrazellulärer Ionenkonzentrationen verantwortlich ist.

Durch die Beeinflussung von pH_i und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann die hyperforininduzierte Sekretion verschiedener Neurotransmitter erklärt werden. Die Hemmung der Neurotransmitteraufnahme im allgemeinen und der Serotoninaufnahme im besonderen, kann mit der Erniedrigung des transmembranären Natriumgradienten in Zusammenhang gebracht werden. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, in welcher Weise Hyperforin nichtspezifische Kationenkanäle öffnet, und ob die Beeinflussung des intrazellulären pH-Wertes einen Beitrag zur antidepressiven Wirksamkeit von Hyperforin und Johanniskrautextrakten leistet.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Affolter H, Pletscher A. Storage of biogenic amines in intact blood platelets of man. Dependence on a proton gradient. *Mol Pharmacol* (1982);22:94-98

Akerman KE, Nicholls DG. Ca²⁺ transport by intact synaptosomes: the voltage-dependent Ca²⁺ channel and a re-evaluation of the role of sodium/calcium exchange. *Eur J Biochem* (1981);117:491-497

Akkerman JW, Holmsen H. Interrelationships among platelet responses: studies on the burst in proton liberation, lactate production, and oxygen uptake during platelet aggregation and Ca²⁺ secretion. *Blood* (1981);57:956-966

Amara SG, Kuhar MJ. Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu Rev Neurosci* (1993);16:73-93

Aronson PS, Nee J, Suhm MA. Modifier role of internal H⁺ in activating the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature* (1982);299:161-163

Aronson PS. Kinetic properties of the plasma membrane Na⁺-H⁺ exchanger. *Annu Rev Physiol* (1985);47:545-560

Astarie C, David-Duflho M, Devynck MA. Direct characterization of the Na⁺/H⁺ exchanger in human platelets. *FEBS Lett* (1990);277:235-238

Astarie C, David-Duflho M, Devynck MA. Na⁽⁺⁾- and Ca⁽²⁺⁾-dependent pH regulation in unstimulated human platelets. *Thromb Res* (1992);65:131-140

Baker GB, Greenshaw AJ. Effects of long-term administration of antidepressants and neuroleptics on receptors in the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol* (1989);9:1-44

Baureithel KH, Buter KB, Engesser A, Burkard W, Schaffner W. Inhibition of benzodiazepine binding in vitro by amentoflavone, a constituent of various species of *Hypericum*. *Pharm Acta Helv* (1997);72:153-157

Bennet G, Lee H. Xanthenes from the Guttiferae. *Phytochemistry* (1989);28:967-998

Bennett DAJ, Phun L, Polk JF, Voglino SA, Zlotnik V, Raffa RB. Neuropharmacology of St. John's Wort (*Hypericum*). *Ann Pharmacother* (1998);32:1201-1208

Berghöfer R, Hölzl J. Biflavonoids in *Hypericum perforatum*. Part 1: Isolation of I3,II8-Biapigenin. *Planta Med* (1987);53:216

Berghöfer R. Analytik phenolischer Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L. aus Anbau und Wildvorkommen und Vergleich mit anderen heimischen *Hypericum*-Arten. In: *Dissertationes Botanicae*, edited by Cramer, J. Berlin, Stuttgart (1987)

Bhattacharya SK, Chakrabarti A, Chatterjee SS. Activity profiles of two hyperforincontaining hypericum extracts in behavioral models. *Pharmacopsychiatry* (1998);31 Suppl 1:22-29

Bianchini L, L'Allemain G, Pouyssegur J. The p42/p44 mitogen-activated protein kinase cascade is determinant in mediating activation of the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1 isoform) in response to growth factors. *J Biol Chem* (1997);272:271-279

Biber A, Fischer H, Romer A, Chatterjee SS. Oral bioavailability of hyperforin from hypericum extracts in rats and human volunteers. *Pharmacopsychiatry* (1998);31 Suppl 1:36-43

Bladt S, Wagner H. Inhibition of MAO by fractions and constituents of hypericum extract. *J Geriatr Psychiatry Neurol* (1994);7 Suppl 1:S57-S59

Block ER, Edwards D. Effect of plasma membrane fluidity on serotonin transport by endothelial cells. *Am J Physiol* (1987);253:C672-C678

Borin M, Siffert W. Further characterization of the mechanisms mediating the rise in cytosolic free Na⁺ in thrombin-stimulated platelets. Evidence for inhibition of the Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase and for Na⁺ entry via a Ca²⁺ influx pathway. *J Biol Chem* (1991);266:13153-13160

Borin M, Siffert W. Stimulation by thrombin increases the cytosolic free Na⁺ concentration in human platelets. Studies with the novel fluorescent cytosolic Na⁺ indicator sodium-binding benzofuran isophthalate. *J Biol Chem* (1990);265:19543-19550

Borin ML, Pinelis VG, Azizova OA, et al. Na⁺/H⁺ exchange in PAF-stimulated platelets. *J Lipid Mediat* (1989);1:257-272

Bouron A, Reuter H. A role of intracellular Na⁺ in the regulation of synaptic transmission and turnover of the vesicular pool in cultured hippocampal cells. *Neuron* (1996);17:969-978

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976);72:248-254

Brantner A, Kartnig T, Quehenberger F. Vergleichende phytochemische Untersuchungen an *Hypericum perforatum* L. und *Hypericum maculatum* Crantz. *Scient Pharm* (1994);62:261-276

Brass LF, Joseph SK. A role for inositol triphosphate in intracellular Ca²⁺ mobilization and granule secretion in platelets. *J Biol Chem* (1985);260:15172-15179

Brass LF. The effect of Na⁺ on Ca²⁺ homeostasis in unstimulated platelets. *J Biol Chem* (1984);259:12571-12575

Brierley GP, Davis MH, Cragoe EJ, Jung DW. Kinetic properties of the Na⁺/H⁺ antiport of heart mitochondria. *Biochemistry* (1989);28:4347-4354

Brockmann H, Franssen U, Spitzner D, Augustiniak H Zur Isolierung und Konstitution des Pseudohypericins. *Tetrahedron Letters* (1974);23:1991-1994

Brockmüller J, Reum T, Bauer S, Kerb R, Hubner WD, Roots I. Hypericin and pseudohypericin: pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans. *Pharmacopsychiatry* (1997);30 Suppl 2:94-101

Busa WB, Nuccitelli R. Metabolic regulation via intracellular pH. *Am J Physiol* (1984);246:R409-R438

Butterweck V, Jurgenliemk G, Nahrstedt A, Winterhoff H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med* (2000);66:3-6

Butterweck V, Petereit F, Winterhoff H, Nahrstedt A. Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med* (1998);64:291-294

Butterweck V, Wall A, Lieflander-Wulf U, Winterhoff H, Nahrstedt A Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* (1997);30 Suppl 2:117-124

Chatterjee S, Filippov V, Lishko P, Maximyuk O, Nöldner M, Krishtal O Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rat. *Life Sci* (1999);65:2395-2405

Chatterjee SS, Bhattacharya SK, Wonnemann M, Singer A, Muller WE. Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Sci* (1998);63:499-510

Chatterjee SS, Biber A, Weibezahn C. Stimulation of glutamate, aspartate and γ -aminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin. *Pharmacopsychiatry* (2001);in press

Chen C, Regehr WG. Contributions of residual calcium to fast synaptic transmission. *J Neurosci* (1999);19:6257-6266

Church J. Effects of pH changes on calcium-mediated potentials in rat hippocampal neurons in vitro. *Neuroscience* (1999);89:731-742

Cool DR, Leibach FH, Bhalla VK, Mahesh VB, Ganapathy V. Expression and cyclic AMP-dependent regulation of a high affinity serotonin transporter in the human placental choriocarcinoma cell line (JAR). *J Biol Chem* (1991); 266:15750-15757

Cool DR, Leibach FH, Ganapathy V. Modulation of serotonin uptake kinetics by ions and ion gradients in human placental brush-border membrane vesicles. *Biochemistry* (1990);29:1818-1822

Coppen, A. The biochemistry of affective disorders. *Br. J. Psychiatry* 1967; 113, 1237-1264

Cott JM. In vitro receptor binding and enzyme inhibition by *Hypericum perforatum* extract. *Pharmacopsychiatry* (1997);30 Suppl 2:108-112

Czok G, Lang K. Zur erregenden Wirkung von Chlorogensäure. *Arzneimittelforsch* (1961);11:448-450

Czygan F. Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrautes. *Z Phytother* (1993);14:272-278

D'Amato RJ, Largent BL, Snowman AM, Snyder SH. Selective labeling of serotonin uptake sites in rat brain by [³H]citalopram contrasted to labeling of multiple sites by [³H]imipramine. *J Pharmacol Exp Ther* (1987);242:364-371

De Vry J, Maurel S, Schreiber R, de Beun R, Jentsch K. Comparison of the effects of hypericum extracts, imipramine and fluoxetine in rat models of depression and alcoholism. *Neuropsychopharm* (1998);8:162

Demisch L, Hölzl J, Gollnik B, Kaczmarczyk P. Identification of selective MAO-Type-A-Inhibitors in *Hypericum Perforatum* L. *Pharma psychiatri* (1989);22:194

Diarra A, Sheldon C, Brett CL, Baimbridge KG, Church J. Anoxia-evoked intracellular pH and Ca²⁺ concentration changes in cultured postnatal rat hippocampal neurons. *Neuroscience* (1999);93:1003-1016

Dimpfel W, Schober F, Mannel M. Effects of a methanolic extract and a hyperforinenriched CO₂ extract of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on intracerebral field potentials in the freely moving rat (Tele-Stereo-EEG). *Pharmacopsychiatry* (1998);31 Suppl 1:30-35

Dimpfel W, Schombert L. Central action of hyperici herba cum flore extractum siccum in freely moving rats. *Eur J Med Res* (1997);2:491-496

Doyle VM, Ruegg UT. Lack of evidence for voltage dependent calcium channels on platelets. *Biochem Biophys Res Commun* (1985);127:161-167

Duncan GE, Knapp DJ, Little KY, Breese GR. Neuroanatomical specificity and dose dependence in the time course of imipramine-induced beta adrenergic receptor down-regulation in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* (1994);271:1699-1704

Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ. Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. Trends Neurosci (1995);18:89-98

Eckert GP, Müller WE. Effects of hyperforin on the fluidity of brain membranes. Psychopharmacology (2001);in press

Enyedi A, Sarkadi B, Foldes-Papp Z, Monostory S, Gardos G. Demonstration of two distinct calcium pumps in human platelet membrane vesicles. J Biol Chem (1986);261:9558-9563

Faber S. Assays for examination of intracellular pH regulation via Na⁺/H⁺ Exchanger and Na⁺-dependent Cl⁻/HCO₃⁻ Exchanger and their inhibition. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main (1997)

Fischer H, Seelig A, Beier N, Raddatz P, Seelig J. New drugs for the Na⁺/H⁺ exchanger. Influence of Na⁺ concentration and determination of inhibition constants with a microphysiometer. J Membr Biol (1999);168:39-45

Fisunov A, Lozovaya N, Tsintsadze T, Chatterjee S, Noldner M, Krishtal O. Hyperforin modulates gating of P-type Ca²⁺ current in cerebellar Purkinje neurons. Pflugers Arch (2000);440:427-434

Fliegel L, Walsh MP, Singh D, Wong C, Barr A. Phosphorylation of the C-terminal domain of the Na⁺/H⁺ exchanger by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. Biochem J (1992);282 (Pt 1):139-145

Fontana G, Rogowski RS, Blaustein MP. Kinetic properties of the sodium-calcium exchanger in rat brain synaptosomes. J Physiol (Lond) (1995);485 (Pt 2):349-364

Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7th ed. Mannheim; Wissenschaftsverlag, (1996)

Franklin M. Researching the antidepressant actions of hypericum perforatum (St. John's Wort) in animals and man. Pharmacopsychiatry (2001);in press

Fraser DD, Hoehn K, Weiss S, MacVicar BA. Arachidonic acid inhibits sodium currents and synaptic transmission in cultured striatal neurons. Neuron (1993);11:633-644

Frelin C, Barbry P, Vigne P, Chassande O, Cragoe EJ, Lazdunski M. Amiloride and its analogs as tools to inhibit Na⁺ transport via the Na⁺ channel, the Na⁺/H⁺ antiport and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. Biochimie (1988);70:1285-1290

Fuller RW, Wong DT. Serotonin uptake and serotonin uptake inhibition. Ann N Y Acad Sci (1990);600:68-78

Garcia-Anoveros J, Derfler B, Neville-Golden J, Hyman BT, Corey DP. BNaC1 and BNaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997);94:1459-1464

Garty H Molecular properties of epithelial, amiloride-blockable Na⁺ channels. *FASEB J* (1994);8:522-528

Gende OA, Cingolani HE. Identification of a sodium-bicarbonate symport in human platelets. *Biochim Biophys Acta* (1996);1278:119-124

Giese A. Hypericium. *Photochem Photobiol Rev* (1980);5:229-255

Gleiter CH, Nutt DJ. Measuring the serotonin uptake site using [3H]paroxetine--a new serotonin uptake inhibitor. *Adv Alcohol Subst Abuse* (1988);7:107-111

Gobbi M, Valle FD, Ciapparelli C, et al. Hypericum perforatum L. extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (1999);360:262-269

Golsch S, Vocks E, Rakoski J, Brockow K, Ring J. [Reversible increase in photosensitivity to UV-B caused by St. John's wort extract]. *Hautarzt* (1997);48:249-252

Goncalves PP, Meireles SM, Neves P, Vale MG. Ionic selectivity of the Ca²⁺/H⁺ antiport in synaptic vesicles of sheep brain cortex. *Brain Res Mol Brain Res* (1999)b;67:283-291

Goncalves PP, Meireles SM, Neves P, Vale MG. Synaptic vesicle Ca²⁺/H⁺ antiport: dependence on the proton electrochemical gradient. *Brain Res Mol Brain Res* (1999)a;71:178-184

Graham D, Esnaud H, Habert E, Langer SZ A common binding site for tricyclic and nontricyclic 5-hydroxytryptamine uptake inhibitors at the substrate recognition site of the neuronal sodium-dependent 5-hydroxytryptamine transporter. *Biochem Pharmacol* (1989);38:3819-3826

Grinstein S, Furuya W. Amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in human neutrophils: mechanism of activation by chemotactic factors. *Biochem Biophys Res Commun* (1984);122:755-762

Grinstein S, Rothstein A Mechanisms of regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J Membr Biol* (1986);90:1-12

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* (1985);260:3440-3450

Gurevich AI, Dobrynin VN, Kolosov MN, Popravko SA, Riabova ID. [Antibiotic hyperforin from *Hypericum perforatum* L]. *Antibiotiki* (1971);16:510-513

Gusovsky F, Daly JW. Formation of inositol phosphates in synaptoneurosomes of guinea pig brain: stimulatory effects of receptor agonists, sodium channel agents and sodium and calcium ionophores. *Neuropharmacology* (1988);27:95-105

Habert E, Graham D, Tahraoui L, Claustre Y, Langer SZ. Characterization of [3H]paroxetine binding to rat cortical membranes. *Eur J Pharmacol* (1985);118:107-114

Hackam DJ, Grinstein S, Rotstein OD. Intracellular pH regulation in leukocytes: mechanisms and functional significance. *Shock* (1996);5:17-21

Hagenström U. Analytik phenolischer Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L. aus Anbau und Wildvorkommen und Vergleich mit anderen heimischen *Hypericum*-Arten. Berlin, Stuttgart (1953)

Hashimoto K, Goromaru T. Evaluation of 3H-paroxetine as a radioligand for in vivo study of 5- hydroxytryptamine uptake sites in mouse brain. *Radioisotopes* (1990)b;39:335-341

Hashimoto K, Goromaru T. Reduction of in vivo binding of [3H]paroxetine in mouse brain by 3,4- methylenedioxymethamphetamine. *Neuropharmacology* (1990)a;29:633-639

Hayashi M, Haga M, Yatsushiro S, Yamamoto A, Moriyama Y. Vesicular monoamine transporter 1 is responsible for storage of 5- hydroxytryptamine in rat pinealocytes. *J Neurochem* (1999);73:2538-2545

Helmeste DM, Tang SW, Reist C, Vu R. Serotonin uptake inhibitors modulate intracellular Ca²⁺ mobilization in platelets. *Eur J Pharmacol* (1995);288:373-377

Hoffmann EK, Simonsen LO. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev* (1989);69:315-382

Holmsen H. Signal transducing mechanisms in platelets. *Proc Natl Sci Counc Repub China [B]* (1991);15:147-152

Hourani SM, Hall DA. P2T purinoceptors: ADP receptors on platelets. *Ciba Found Symp* (1996);198:53-64

Hrdina PD, Foy B, Hepner A, Summers RJ. Antidepressant binding sites in brain: autoradiographic comparison of [3H]paroxetine and [3H]imipramine localization and relationship to serotonin transporter. *J Pharmacol Exp Ther* (1990);252:410-418

Humphreys CJ, Levin J, Rudnick G. Antidepressant binding to the porcine and human platelet serotonin transporters. *Mol Pharmacol* (1988);33:657-663

Humphreys CJ, Wall SC, Rudnick G. Ligand binding to the serotonin transporter: equilibria, kinetics, and ion dependence. *Biochemistry* (1994);33:9118-9125

Hunyady L, Sarkadi B, Cragoe EJ, Spat A, Gardos G Activation of sodium-proton exchange is not a prerequisite for Ca²⁺ mobilization and aggregation in human platelets. *FEBS Lett* (1987);225:72-76

Hyttel J. Effect of a specific 5-HT uptake inhibitor, citalopram (Lu 10-171), on 3H-5-HT uptake in rat brain synaptosomes in vitro. *Psychopharmacology (Berl)* (1978);60:13-18

Hyttel J. Neurochemical characterization of a new potent and selective serotonin uptake inhibitor: Lu 10-171. *Psychopharmacology (Berl)* (1977);51:225-233

Inoue K, Sato K, Tohyama M, Shimada S, Uhl GR. Widespread brain distribution of mRNA encoding the orphan neurotransmitter transporter v7-3. *Brain Res Mol Brain Res* (1996);37:217-223

Izenwasser S, Rosenberger JG, Cox BM. Inhibition of [3H]dopamine and [3H]serotonin uptake by cocaine: comparison between chopped tissue slices and synaptosomes. *Life Sci* (1992);50:541-547

Jean T, Frelin C, Vigne P, Barbry P, Lazdunski M. Biochemical properties of the Na⁺/H⁺ exchange system in rat brain synaptosomes. Interdependence of internal and external pH control of the exchange activity. *J Biol Chem* (1985);260:9678-9684

Jess U. Untersuchungen zur Interaktion zytoplasmatischer Proteine mit dem Serotonintransporter. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (2000)

Jones GD, Tenner TE, Greco NJ, Kitagawa S, Tandon NN, Jamieson GA. Changes in cytoplasmic pH in platelets activated through the high- and moderate-affinity receptor pathways by highly purified human alpha- thrombin. *J Lab Clin Med* (1993);121:662-667

Juhaszova M, Church P, Blaustein MP, Stanley EF. Location of calcium transporters at presynaptic terminals. *Eur J Neurosci* (2000);12:839-846

Jursky F, Tamura S, Tamura A, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N. Structure, function and brain localization of neurotransmitter transporters. *J Exp Biol* (1994);196:283-295

Kaehler ST, Sinner C, Chatterjee SS, Philippu A Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleus. *Neurosci Lett* (1999);262:199-202

Kaila K, Ransom BR (editors). pH and brain function. Wiley-Liss Verlag New York (1998)

Kakiuchi N, Kusomoto I, Hattori M, Namba T Effect of condensed tannins and related compounds on reverse transcriptase. *Phytother Res* (1991);5:270-272

Kamal LA, Cloix JF, Devynck MA, Meyer P. [3H]serotonin uptake in human blood platelets is reduced by ouabain and endogenous digitalis-like inhibitors of Na⁺, K⁺-ATPase. *Eur J Pharmacol* (1983);92:167-168

Kanner BI. Sodium-coupled neurotransmitter transport: structure, function and regulation. *J Exp Biol* (1994);196:237-249

Kasper S. Depressionen-Diagnostik und Therapie. Behandlungsmöglichkeiten mit Johanniskraut. München: Urban & Vogel Medien und Medizinverlagsgesellschaft mbH, (2000)

Kawahara K. [Non-selective cation channel]. *Nippon Rinsho* 1996;54:679-684

Keyes SR, Rudnick G Coupling of transmembrane proton gradients to platelet serotonin transport. *J Biol Chem* (1982);257:1172-1176

Kimura M, Gardner JP, Aviv A. Agonist-evoked alkaline shift in the cytosolic pH set point for activation of Na⁺/H⁺ antiport in human platelets. The role of cytosolic Ca²⁺ and protein kinase C. *J Biol Chem* (1990);265:21068-21074

Kimura M, Jeanclos EM, Donnelly RJ, Lytton J, Reeves JP, Aviv A Physiological and molecular characterization of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in human platelets. *Am J Physiol* (1999);277:H911-H917

Klusa V, Germane S, Nöldner M, Chatterjee S. Hypericum extract and hyperforin: Memory enhancing properties in rodents. *Pharmacopsychiatry* (2001);in press

Kochhar N, Kaul D. Molecular link between membrane cholesterol and Na⁺/H⁺ exchange within human platelets. *FEBS Lett* (1992);299:19-22

Krautwurst D, Seifert R, Hescheler J, Schultz G. Formyl peptides and ATP stimulate Ca²⁺ and Na⁺ inward currents through non-selective cation channels via G-proteins in dibutyryl cyclic AMP- differentiated HL-60 cells. Involvement of Ca²⁺ and Na⁺ in the activation of beta-glucuronidase release and superoxide production. *Biochem J* (1992);288 (Pt 3):1025-1035

Krishtal O, Lozovaya N, Fisunov A, et al. Modulation of ion channels in rat neurons by the constituents of hypericum perforatum. *Pharmacopsychiatry* (2001);in press:

Laakmann G, Schule C, Baghai T, Kieser M. St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry* (1998);31 Suppl 1:54-59

Lapke C, Schilcher H, Riedel E . Abstracts of Lectures and Poster Presentations. 44th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research. Prague (1996) (Abstract)

Leonard BE. The comparative pharmacology of new antidepressants. *J Clin Psychiatry* (1993);54 Suppl:3-15

Leonard HL, Meyer MC, Swedo SE, et al. Electrocardiographic changes during desipramine and clomipramine treatment in children and adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* (1995);34:1460-1468

Lesch KP, Wolozin BL, Murphy DL, Reiderer P. Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J Neurochem* (1993);60:2319-2322

Lester HA, Mager S, Quick MW, Corey JL. Permeation properties of neurotransmitter transporters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1994);34:219-249

Levi G, Raiteri M. Synaptosomal transport processes. *Int Rev Neurobiol* (1976);19:51-74

Linde K, Ramirez G, Mulrow CD, Pauls A, Weidenhammer W, Melchart D. St John's wort for depression-an overview and meta-analysis of randomised clinical trials [see comments]. *BMJ* (1996);313:253-258

Lingjaerde O. Inhibitory effect of clomipramine and related drugs on serotonin uptake in platelets: more complicated than previously thought. *Psychopharmacology (Berl)* (1979);61:245-249

Livne A, Grinstein S, Rothstein A. Characterization of Na⁺/H⁺ exchange in platelets. *Thromb Haemost* (1987);58:971-977

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Radnall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* (1951);193:265-275

Mahnensmith RL, Aronson PS. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res* (1985);56:773-788

Marcusson JO, Ross SB. Binding of some antidepressants to the 5-hydroxytryptamine transporter in brain and platelets. *Psychopharmacology (Berl)* (1990);102:145-155

Masson J, Langlois X, Lanfumey L, et al. Immunolabeling of the Na⁺/Cl⁻-dependent "orphan" transporter Rxt1 in the rat central nervous system. *J Neurosci Res* (1995);42:423-432

Mathis C, Ourisson G. Etude chimico-taxonimique du genre *Hypericum* III. *Phytochemistry* (1964);3:133-141

Mellerup ET, Plenge P, Engelstoft M. High affinity binding of [3H]paroxetine and [3H]imipramine to human platelet membranes. *Eur J Pharmacol* (1983);96:303-309

Melzer M, Fuhrken D, Kolkmann R. Hyperforin im Johanniskraut. *Dtsch Apoth Ztg* (1998);49:56-62

Melzer R, Fricke U, Holzl J. Vasoactive properties of procyanidins from *Hypericum perforatum* L. in isolated porcine coronary arteries. *Arzneimittelforschung* (1991);41:481-483

Melzer R. Untersuchungen zur Analytik und kardiovaskulären Wirkung der oligomeren Procyanidine von *Hypericum perforatum* L. Dissertation, Philipps-Universität Marburg (1990)

Merritt JE, Armstrong WP, Benham CD, et al. SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem J* (1990);271:515-522

Meruelo D, Lavie G, Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci USA* (1988);85:5230-5234

Misane I, Ögren S. Effects of *Hypericum perforatum* on passive avoidance in the rat: Evaluation of potential neurochemical mechanism underlying its antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* (2001);in press

Mix LL, Dinerstein RJ, Villereal ML. Mitogens and melittin stimulate an increase in intracellular free calcium concentration in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* (1984);119:69-75

Müller W, Schäfer C. Johanniskraut, In-vitro-Studie über *Hypericum*-Extrakt, Hypericin und Kämpferol als Antidepressiva. *Dtsch Apoth Ztg* (1996);136:1015-1022

Müller WE, Rolli M, Schäfer C, Hafner U. Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* (1997);30 Suppl 2:102-107

Müller WE, Rossol R. Effects of hypericum extract on the expression of serotonin receptors. *J Geriatr Psychiatry Neurol* (1994);7 Suppl 1:S63-S64

Müller WE, Singer A, Wonnemann M, Hafner U, Rolli M, Schäfer C. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of hypericum extract. *Pharmacopsychiatry* (1998);31 Suppl 1:16-21

Müller WE, Singer A, Wonnemann M. Johanniskraut - Vom Nerventee zum modernen Antidepressivum. *Dtsch Apoth Ztg* (1999);139:49-58

Mundorf ML, Troyer KP, Hochstetler SE, Near JA, Wightman RM. Vesicular Ca(2+) participates in the catalysis of exocytosis. *J Biol Chem* (2000);275:9136-9142

Nakazato K, Hatano Y. Monensin-mediated antiport of Na⁺ and H⁺ across liposome membrane. *Biochim Biophys Acta* (1991);1064:103-110

Nathan P. The experimental and clinical pharmacology of St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). *Mol Psychiatry* (1999);4:333-338

Neary JT, Bu Y. *Hypericum* LI 160 inhibits uptake of serotonin and norepinephrine in astrocytes. *Brain Res* (1999);816:358-363

Negulescu PA, Machen TE. Intracellular ion activities and membrane transport in parietal cells measured with fluorescent dyes. *Methods Enzymol* (1990);192:38-81

Nelson N. Structure and pharmacology of the proton-ATPases. *Trends Pharmacol Sci* (1991);12:71-75

Nielsen H, Arends P. Structure of the xanthone lignoid kielcorin. *Phytochemistry* (1978);17:2040-2041

Nishio H, Nezasa K, Nakata Y. Role of calcium ion in platelet serotonin uptake regulation. *Eur J Pharmacol* (1995);288:149-155

Nofer JR, Tepel M, Kehrel B, et al. Low-density lipoproteins inhibit the Na⁺/H⁺ antiport in human platelets. A novel mechanism enhancing platelet activity in hypercholesterolemia [see comments]. *Circulation* (1997);95:1370-1377

Nordmann JJ, Stuenkel EL. Ca(2+)-independent regulation of neurosecretion by intracellular Na⁺. *FEBS Lett* (1991);292:37-41

Ogawa A, Ishikawa Y, Sasakawa S. Cytoplasmic pH dependency of Na⁺/H⁺ exchange in human platelets activated with thrombin, arachidonic acid, A23187 and TPA. *Thromb Res* (1989);55:683-693

Ogawa A, Ishikawa Y, Sasakawa S. Na⁺/H⁺ exchange activity induced by thrombin is not inhibited by protein kinase inhibitors, staurosporine, K-252a, H-7 and sphingosine, in human platelets. *Thromb Res* (1993);70:139-149

Ostrowski E. Untersuchungen zur Analytik, ¹⁴C-Markierung und Pharmakokinetik phenolischer Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L. Dissertation, Philipps-Universität Marburg (1988)

Pastuszko A, Wilson DF, Erecinska M. Neurotransmitter metabolism in rat brain synaptosomes: Effect of anoxia and pH. *J Neurochem* (1982);38:1657-1667

Pauluhn K. In-vitro Untersuchungen zum Mechanismus der serotonininduzierten Thrombozytenaggregation beim Menschen. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (1996)

Perovic S, Müller WE. Pharmacological profile of hypericum extract. Effect on serotonin uptake by postsynaptic receptors. *Arzneimittelforschung* (1995);45:1145-1148

Philippu A In vivo neurotransmitter release in the locus coeruleus: Effects of hyperforin, inescapable shock and fear. *Pharmacopsychiatry* (2001);in press

Poch E, Botey A, Gaya J, Cases A, Rivera F, Revert L. Intracellular calcium mobilization and activation of the Na⁺/H⁺ exchanger in platelets. *Biochem J* (1993);290 (Pt 2):617-622

Price MP, Snyder PM, Welsh MJ. Cloning and expression of a novel human brain Na⁺ channel. *J Biol Chem* (1996);271:7879-7882

Rahamimoff R, Meiri H, Erulkar SD, Barenholz Y. Changes in transmitter release induced by ion-containing liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1978);75:5214-5216

Reichardt LF, Kelly RB. A molecular description of nerve terminal function. *Annu Rev Biochem* (1983);52:871-926

Reith ME, O'Reilly CA. Inhibition of serotonin uptake into mouse brain synaptosomes by ionophores and ion-channel agents. *Brain Res* (1990);521:347-351

Reith ME, Zimanyi I, O'Reilly CA. Role of ions and membrane potential in uptake of serotonin into plasma membrane vesicles from mouse brain. *Biochem Pharmacol* (1989);38:2091-2097

Richelson E. The pharmacology of antidepressants at the synapse: focus on newer compounds. *J Clin Psychiatry* (1994);55 Suppl A:34-39

Roskopf D. Sodium-hydrogen exchange and platelet function. *J Thromb Thrombolysis* (1999);8:15-24

Rücker G, Manns D, Hartmann R, Bonsels U A C-50-hydroperoxide from *Hypericum perforatum*. *Arch Pharm* (1995);328:725-730

Rudnick G, Humphreys CJ, Dean GE. Serotonin transport by platelet plasma and granule membranes. *Ann N Y Acad Sci* (1985);456:277-278

Rudnick G. ATP-driven H⁺ pumping into intracellular organelles. *Annu Rev Physiol* (1986);48:403-413

- Rudnick G.** The vacuolar ATPase is responsible for acidifying secretory organelles. *Ann N Y Acad Sci* (1987);493:259-263
- Sage SO, Rink TJ, Mahaut-Smith MP.** Resting and ADP-evoked changes in cytosolic free sodium concentration in human platelets loaded with the indicator SBFI. *J Physiol (Lond)* (1991);441:559-573
- Sandeaux R, Sandeaux J, Gavach C, Brun B.** Transport of Na⁺ by monensin across bimolecular lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* (1982);684:127-132
- Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J.** Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. *Cell* (1989);56:271-280
- Sauvaigo S, Vigne P, Frelin C, Lazdunski M** Identification of an amiloride sensitive Na⁺/H⁺ exchange system in brain synaptosomes. *Brain Res* (1984);301:371-374
- Scalbert A.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* (1991);30:3875-3883
- Schäffer J, Blaustein MP.** Platelet free calcium concentrations measured with fura-2 are influenced by the transmembrane sodium gradient. *Cell Calcium* (1989);10:101-113
- Scheffel U, Hartig PR.** In vivo labeling of serotonin uptake sites with [3H]paroxetine. *J Neurochem* (1989);52:1605-1612
- Schellenberg R, Sauer S, Dimpfel W.** Pharmacodynamic effects of two different hypericum extracts in healthy volunteers measured by quantitative EEG. *Pharmacopsychiatry* (1998);31 Suppl 1:44-53
- Schimmer O.** *Dtsch Apoth Ztg* (1986);126:1811
- Schinazi RF, Chu CK, Babu JR, et al.** Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. *Antiviral Res* (1990);13:265-272
- Schloss P, Puschel AW, Betz H** Neurotransmitter transporters: new members of known families. *Curr Opin Cell Biol* (1994);6:595-599
- Schloss P.** Klonierung und Charakterisierung plasmaständiger Transporterproteine. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (1996)
- Schmidt U, Harrer G, Kuhn U, Bladt S.** Äquivalenzvergleich Johanniskrautextrakt LoHyp-57 versus Fluoxetin-HCl. ESCOP-Konferenz, London, Oktober 1998 und Symposium der Gesellschaft für Phytotherapie un der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Bonn, November (1998)

Schrader E Equivalence of St John's wort extract (Ze 117) and fluoxetine: a randomized, controlled study in mild-moderate depression. *Int Clin Psychopharmacol* (2000);15:61-68

Schwarz G, Droogmans G, Nilius B. Multiple effects of SK&F 96365 on ionic currents and intracellular calcium in human endothelial cells. *Cell Calcium* (1994);15:45-54

Shrode LD, Gan BS, D'Souza SJ, Orlowski J, Grinstein S. Topological analysis of NHE1, the ubiquitous Na⁺/H⁺ exchanger using chymotryptic cleavage. *Am J Physiol* (1998);275:C431-C439

Siffert W, Akkerman JW. Activation of sodium-proton exchange is a prerequisite for Ca²⁺ mobilization in human platelets. *Nature* (1987);325:456-458

Siffert W, Akkerman JW. Na⁺/H⁺ exchange and Ca²⁺ influx. *FEBS Lett* (1989);259:1-4

Siffert W, Fox G, Muckenhoff K, Scheid P. Thrombin stimulates Na⁺-H⁺ exchange across the human platelet plasma membrane. *FEBS Lett* (1984);172:272-274

Siffert W, Jakobs KH, Akkerman JW. Sodium fluoride prevents receptor- and protein kinase C-mediated activation of the human platelet Na⁺/H⁺ exchanger without inhibiting its basic pHi-regulating activity. *J Biol Chem* (1990);265:15441-15448

Siffert W. Regulation of platelet function by sodium-hydrogen exchange. *Cardiovasc Res* (1995);29:160-166

Singer A, Wonnemann M, Muller WE. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺. *J Pharmacol Exp Ther* (1999);290:1363-1368

Sneddon JM. Blood platelets as a model for monoamine-containing neurones. *Prog Neurobiol* (1973);1:151-198

Sneddon JM. Relationship between internal Na⁺ + -K⁺ and the accumulation of 14 C- 5-hydroxytryptamine by rat platelets. *Br J Pharmacol* (1971);43:834-844

Sneddon JM. Sodium-dependent accumulation of 5-hydroxytryptamine by rat blood platelets. *Br J Pharmacol* (1969);37:680-688

Sparenberg B, Demisch L, Hölzl J. Untersuchung über antidepressive Wirkstoffe von Johanniskraut. *Pharm Ztg Wiss* (1993);6/138:50-54

Sparenberg B. MAO-inhibierende Eigenschaften von Hypericum-Inhaltsstoffen und Untersuchungen zur Analytik und Isolierung von Xanthonen aus *Hypericum perforatum* L. Dissertation, Philipps-Universität Marburg (1993)

Stamouli V, Vakirtzi-Lemonias C, Siffert W. Thrombin and NaF, but not epinephrine, raise cytosolic free Na⁺ in human platelets. *Biochim Biophys Acta* (1993);1176:215-221

Stock S, Hölzl J. Pharmacokinetic test of (¹⁴C)-labelled hypericin and pseudohypericin from *hypericum perforatum* and serum kinetics of hypericin in man. 39th Annual Congress on Medicinal Plant Research, Thieme, Stuttgart (1991);61-62(Abstract)

Stoll L, Müller WE. Der Radiorezeptorassay. *Pharm Ztg Wiss* (1991);2:53-66

Sur C, Betz H, Schloss P. A single serine residue controls the cation dependence of substrate transport by the rat serotonin transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997);94:7639-7644

Suzuki M, Murata M, Ikeda M, Miyoshi T, Imai M. Primary structure and functional expression of a novel non-selective cation channel. *Biochem Biophys Res Commun* (1998);242:191-196

Suzuki O, Katsumata Y, Oya M, Bladt S, Wagner H. Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med* (1984);50:272-274

Szabo EZ, Numata M, Shull GE, Orlowski J. Kinetic and pharmacological properties of human brain Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform 5 stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* (2000);275:6302-6307

Takahashi I, Nakanishi S, Kobayashi E, Nakano H, Suzuki K, Tamaoki T. Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity. *Biochem Biophys Res Commun* (1989);165:1207-1212

Teufel-Mayer R, Gleitz J. Effects of long-term administration of hypericum extracts on the affinity and density of the central serotonergic 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. *Pharmacopsychiatry* (1997);30 Suppl 2:113-116

Thiede HM, Walper A. Inhibition of MAO and COMT by hypericum extracts and hypericin. *J Geriatr Psychiatry Neurol* (1994);7 Suppl 1:S54-S56

Tonnessen TI, Sandvig K, Olsnes S. Role of Na⁽⁺⁾-H⁺ and Cl⁽⁻⁾-HCO₃⁻ antiports in the regulation of cytosolic pH near neutrality. *Am J Physiol* (1990);258:C1117-C1126

Trepakova ES, Gericke M, Hirakawa Y, Weisbrod RM, Cohen RA, Bolotina VM. The properties of a native cation channel activated by Ca²⁺ store depletion in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* (2000); in press

Valant PA, Haynes DH. The Ca⁽²⁺⁾-extruding ATPase of the human platelet creates and responds to cytoplasmic pH changes, consistent with a 2 Ca²⁺/nH⁺ exchange mechanism. *J Membr Biol* (1993);136:215-230

- Vohora SB, Kumar I, Shah SA, Khan MS.** Effect of biflavonoids of *Taxus baccata* on the central nervous system. *Indian J Med Res* (1980);71:815-820
- Volz HP.** Controlled clinical trials of hypericum extracts in depressed patients-- an overview. *Pharmacopsychiatry* (1997);30 Suppl 2:72-76
- Vorbach EU, Arnoldt KH, Hubner WD.** Efficacy and tolerability of St. John's wort extract LI 160 versus imipramine in patients with severe depressive episodes according to ICD- 10. *Pharmacopsychiatry* (1997);30 Suppl 2:81-85
- Waldmann R, Lazdunski M** H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* (1998);8:418-424
- Weiser D.** Pharmakokinetik von Hypericin nach oraler Gabe des Johanniskraut-Extraktes LI 160. *Nervenheilkunde* (1991);10:318-319
- Wheatley D.** LI 160, an extract of St. John's wort, versus amitriptyline in mildly to moderately depressed outpatients--a controlled 6-week clinical trial. *Pharmacopsychiatry* (1997);30 Suppl 2:77-80
- Woelk H, Burkard G, Grunwald J.** Benefits and risks of the hypericum extract LI 160: drug monitoring study with 3250 patients. *J Geriatr Psychiatry Neurol* (1994);7 Suppl 1:S34-S38
- Woelk H.** Comparison of St. John's Wort and imipramine for treating depression: randomised controlled trial. *BMJ* (2000);321:536-539
- Wölfel R, Halbrugge T, Graefe KH.** Effects of N-ethylmaleimide on 5-hydroxytryptamine transport and sodium content in rabbit platelets. *Br J Pharmacol* (1989);97:1308-1314
- Wonnemann M, Singer A, Müller WE.** Inhibition of Synaptosomal Uptake of 3H-L-glutamate and 3H-GABA by Hyperforin, a Major Constituent of St. John's Wort. The Role of Amiloride Sensitive Sodium Conductive Pathways. *Neuropsychopharmacology* (2000);23:188-197
- Wonnemann M, Singer A, Siebert B, Müller WE.** Evaluation of synaptosomal uptake inhibition by all relevant constituents of St. John's Wort. *Pharmacopsychiatry* (2001);in press
- Wonnemann M.** Biochemische Effekte und pharmakologische Prinzipien der antidepressiven Aktivität von Johanniskrautextrakt-Präparaten -Untersuchung GABAerger und glutamaterger Systeme-. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/M. (2000)
- Worrall DM, Williams DC.** Sodium ion-dependent transporters for neurotransmitters: a review of recent developments. *Biochem J* (1994);297 (Pt 3):425-436

Yellon DM, Baxter GF. Sodium-hydrogen exchange in myocardial reperfusion injury. *Lancet* (2000);356:522-523

Zavoico GB, Cragoe EJ, Feinstein MB. Regulation of intracellular pH in human platelets. Effects of thrombin, A23187, and ionomycin and evidence for activation of Na⁺/H⁺ exchange and its inhibition by amiloride analogs. *J Biol Chem* (1986);261:13160-13167

Zicha J, Kunes J, Devynck MA. Abnormalities of membrane function and lipid metabolism in hypertension: a review. *Am J Hypertens* (1999);12:315-331

Zicha J, Sang KH, Kunes J, Devynck MA. Membrane microviscosity, blood pressure and cytosolic pH in Dahl rats: the influence of plasma lipids. *J Hypertens* (1999)b;17:785-792

Zucker RS. Calcium and transmitter release at nerve terminals. *Biochem Soc Trans* (1993)a;21:395-401

Zucker RS. Calcium and transmitter release. *J Physiol Paris* (1993)b;87:25-36

8. VERÖFFENTLICHUNGEN

Einige der hier vorgestellten Ergebnisse wurden vorab in verschiedenen Zeitschriften veröffentlicht, bzw. als Poster präsentiert:

Originalarbeiten

CHATTERJEE S.S., BHATTACHARYA S.K., WONNEMANN M., SINGER A., MÜLLER W.E. Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts *Life Sci* 1998;63:499-510

MÜLLER W.E., SINGER A., WONNEMANN M., HAFNER U., ROLLI M., SCHÄFER C. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of hypericum extract *Pharmacopsychiatry* 1998;31 Suppl 1:16-21

SINGER A., WONNEMANN M., MÜLLER W.E. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺ *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999;290:1363-8

WONNEMANN M., SINGER A., MÜLLER W.E. Inhibition of synaptosomal uptake of ³H-L-glutamate and ³H-GABA by hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort: The role of amiloride sensitive sodium conductive pathways *Neuropsychopharmacology* 2000;23:188-197

WONNEMANN M., SINGER A., SIEBERT B., MÜLLER W.E. Evaluation of synaptosomal uptake inhibition by all relevant constituents of St. John's Wort *Pharmacopsychiatry* 2001;in press

Übersichtsarbeiten

MÜLLER W.E., SINGER A., WONNEMANN M., ROLLI M., SCHÄFER C., HAFNER U. Wirkungen von standardisiertem Johanniskrautextrakt (LI 160) in biochemischen Modellen antidepressiver Wirksamkeit. *Psychopharmakotherapie* 1998;5 Suppl.8:40-45

MÜLLER W.E., SINGER A., WONNEMANN M. Johanniskraut - Vom Nerventee zum modernen Antidepressivum *Dtsch. Apoth. Ztg.* 1998;139 (17):49-58

MÜLLER W.E., SINGER A., WONNEMANN M.. Johanniskraut - Von der Pflanze zum Molekül *Forschung Frankfurt* **1998; 3:22-32**

MÜLLER W.E., SINGER A., WONNEMANN M.. Johanniskraut - Vom Nerventee zum modernen Antidepressivum. *Dtsch Apoth Ztg* **1999; 139:49-58**

MÜLLER W.E., SINGER A., WONNEMANN M.. Zum Wirkungsmechanismus von Johanniskraut-Extrakt. *Praxis* **2000; 89:2111-2122**

MÜLLER W.E., SINGER A., WONNEMANN M.. Hyperforin, antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry* **2001; in press**

SINGER A., WONNEMANN M., W.E. MÜLLER: Zum Status quo der Johanniskraut-Forschung: Hyperforin: Wichtigster Hemmstoff der Neurotransmitteraufnahme aus *Hypericum perforatum* *Zeitschr. f. Phytother.* **1999; 20:83-86**

WONNEMANN M., SINGER A., MÜLLER W.E.. Zum Status quo der Johanniskraut-Forschung: Johanniskrautextrakt: Effekte auf GABA- und glutamaterge Rezeptorsysteme *Zeitschr. f. Phytother.* **1999;20: 77-82**

Posterpräsentationen mit publiziertem Abstract

CHATTERJEE S.S., BHATTACHARYA S.K., SINGER A., WONNEMANN M., MÜLLER W.E.. Hyperforin inhibits synaptosomal uptake of neurotransmitters in vitro and shows antidepressant activity in vivo. First European Graduate Student meeting, Frankfurt/Main, **February 1998, Die Pharmazie 53 Suppl 1**

SINGER A., WONNEMANN M., MÜLLER, W.E.. Hyperforin represents the major reuptake inhibiting constituent of St. John`s Wort. *28th Annual meeting, Society for neuroscience (SFN), Los Angeles, CA, USA, November 1998; Vol. 24, 583.20, p. 1492*

SINGER A., WONNEMANN M. AND W.E. MÜLLER. Hyperforin represents the major reuptake inhibiting constituent of St. John`s Wort. *Dtsch.Ges.Biol.Psych. (DGBP) Congress, Jena, September, 1998, Eur.Arch.Psych.Clin.Neurosci* **1998; 248: Suppl. 2, P 90**

SINGER A., WONNEMANN M. AND W.E. MÜLLER. Hyperforin represents the major reuptake inhibiting constituent of St. John`s Wort. *Symposium Ges. f. Phytotherapie/ Ges. f. Arzneipflanzenforschung, Bonn, November 1998, Phytopharmakaforschung 2000, 1998; P21, 97*

SINGER A., WONNEMANN M. AND W.E. MÜLLER: Hyperforin inhibits uptake of serotonin in synaptosomes and platelets by elevating free intracellular sodium. *29th Annual meeting, Society for neuroscience (SFN), Miami beach, FL, USA, October 1999; Vol. 25, 829.2, p. 2072*

SINGER A., WONNEMANN M. AND W.E. MÜLLER: Hyperforin inhibits uptake of serotonin in synaptosomes and platelets by elevating free intracellular sodium. Annual meeting Dtsch.Pharm.Ges. (DPHG), Frankfurt/Main, October. 1999, *Arch. Pharm. - Pharm. Med. Chem., 1999; 332 Suppl. 2, P165, p. 44*

SINGER A., WONNEMANN M. AND W.E. MÜLLER. Hyperforin inhibits uptake of serotonin in synaptosomes and platelets by elevating free intracellular sodium 13. Graduate student meeting. Dtsch.Pharm.Ges. (DPHG), Freiburg i.Br., **March 1999, Arch. Pharm. - Pharm. Med. Chem.; 332 Suppl. 1, P132, p. 64**

SINGER A., WONNEMANN M. AND W.E. MÜLLER. Hyperforin inhibits uptake of serotonin in synaptosomes and platelets by elevating free intracellular sodium. 40th Spring meeting Dtsch.Ges.Pharmak.Tox (DGPT), Mainz, March 1999, *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 1999; 359:3, 361, R94*

SINGER A., MÜLLER, W.E.. Hyperforin alters intracellular pH and free intracellular sodium- and calcium-concentration in human platelets. *30th Annual meeting, Society for neuroscience (SFN), New Orleans, LA, USA, November 1999; Vol. 26, 871.12, p. 2327*

WONNEMANN M., SINGER A., MÜLLER W.E.. Hyperforin of St.John`s Wort - The possible role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. *29th Annual meeting, Society for neuroscience, Miami beach, FL, USA, Oktober 1999; 829.3, 2073*

WONNEMANN M., SINGER A., MÜLLER, W.E.. Hyperforin of St.John`s Wort - The possible role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. Annual meeting Dtsch.Pharm.Ges. (DPHG), Frankfurt/Main, **Oktober 1999; Arch. Pharm.Pharm.Med.Chem.; 332 Suppl.2, P207, 54**

WONNEMANN M., SINGER A., MÜLLER W.E.. The inhibition of the synaptosomal uptake of GABA and L-glutamate by hyperforin is attenuated by drugs inhibiting Na⁺ channels and Na⁺-H⁺ exchange. 40th Spring meeting Dtsch.Ges.Pharmak.Tox. (DGPT), Mainz, March 1999, *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol., 1999; 359: R93, 360*

WONNEMANN M., SINGER A., MÜLLER W.E.. The inhibition of the synaptosomal uptake of GABA and L-glutamate by hyperforin is attenuated by drugs inhibiting Na⁺ channels and Na⁺-H⁺ exchange. 13. Graduate student meeting Dtsch.Pharm.Ges. (DPHG), Freiburg i.Br., March 1999, *Arch. Pharm.Pharm.Med.Chem.*, **1999; 332: Suppl.1, P134, 65**

WONNEMANN M., SINGER A., MÜLLER W.E.. Hyperforin of St.John`s Wort - The possible role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. Second European Graduate Student meeting, Frankfurt/Main, March, 2000, *Arch. Pharm.Pharm.Med.Chem.* **2000; 333 Suppl.1, 105, 34**

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Kalziumionenkonzentration
[Na ⁺] _i	Intrazelluläre Natriumionenkonzentration
ASIC	Acid sensitiv ionchannel
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA/AM	Chelator für intrazelluläre Kalziumionen
BCECF	Fluoreszenzfarbstoff für Protonen
BNaC	Brain Natrium Channel
c-AMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBE	Natriumunabhängiger Chlorid-Bicarbonat-Exchanger
CGI	Clinical Global Impression Scale
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CPM	Counts per minute
DAC	Deutscher Arzneimittel Codex
DAG	Diacylglycerin
DAT	Dopamin-Transporter
DPM	Decays per minute
EAAC	Glutamat-Transporter
EEG	Elektroenzephalogramm
EIPA	Ethyl-Isopropyl-Amilorid
ENaC	Epitheliale Natriumkanäle
Fura-2	Fluoreszenzfarbstoff für Kalziumionen
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAT	GABA-Transporter
GLAST	Glutamat-Transporter
GTP	Guanosintriphosphat
HAMD	Hamilton Rating Scale for Depression
IC ₅₀	Halbmaximale Hemmkonstante
ICD 10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IP ₃	Inosit-1,4,5-triphosphat
K _d	Dissoziationskonstante
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
MAO	Monoaminoxidase

NCBE	Natriumabhängiger Chlorid-Bicarbonat-Exchanger
NCX	Natrium-Kalzium- Austauscher
NET	Noradrenalin- Transporter
NHA	Hexamethylen- Amilorid
NHE	Natrium-Protonen- Exchanger
NMDA	N-methyl-D- aspartat
NSC	Non-selective cation channels
OPC	Oligomere Procyanidine
pH _i	Intrazellulärer pH- Wert
PIP ₂	Phosphoinositoldiphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PRP	Plättchenreiches Plasma
RRA	Radiorezeptorassay
RT	Raumtemperatur
SBFI	Fluoreszenzfarbstoff für Natriumionen
SERT	Serotonin- Transporter
SSRI	Selektive Serotonin Reuptake Inhibitoren
TCA	Trizyklische Antidepressiva
TMA	Tetramethylammoniumchlorid
TMD	Transmembrandomänen
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem

10. DANKSAGUNG

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W.E. Müller für die Vergabe und Betreuung des Dissertationsthemas bedanken. Auf seine Hilfe, Unterstützung und Anregung sowie Ratschläge und Tips konnte ich jederzeit zählen. Die angenehme Arbeitsatmosphäre trug wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit bei.

Bei Herrn Prof. Dr. W.E. Müller und Herrn Prof. Dr. T. Dingermann möchte ich mich ganz herzlich für die schnelle und unkonventionelle Begutachtung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Außerdem gebührt mein Dank Herrn Dr. S.S. Chatterjee und der Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH (Karlsruhe) für die Finanzierung meiner Arbeit und der Bereitstellung verschiedener Hypericum-Einzelsubstanzen, vor allem des Hyperforin-Natriumsalzes. Bei der Firma Lichtwer Arzneimittel AG (Berlin) bedanke ich mich für die Bereitstellung des Johanniskrautextraktes LI 160, der für die initialen Untersuchungen der Serotoninaufnahme verwendet wurde.

Auch Frau Claudia Schäfer aus dem Zentralinstitut für seelische Gesundheit in Mannheim bin ich zu großen Dank verpflichtet: Sie führte mich in die Methodik des Radiorezeptorassays ein und war mit ihrer unendlichen Geduld und vielen unentbehrlichen Tips und Ratschlägen für das Gelingen dieser Versuche mitverantwortlich. Auch nach unserem Umzug nach Frankfurt konnte ich immer auf ihre Hilfe und Unterstützung zählen.

Besonders möchte ich auch meinem Kollegen Herrn Dr. Meinolf Wonnemann für die enge Zusammenarbeit danken. Von ihm lernte ich viele nützliche Handgriffe und konnte in zahlreichen Diskussionen Anregungen für einige weiterführende Versuche finden. Außerdem brachte er mir die Sehenswürdigkeiten Frankfurts nahe, wir hatten viel Spaß im Labor und machten gemeinsam das Frankfurter Nachtleben unsicher. Desweiteren gilt mein Dank meinen ArbeitskollegInnen, besonders Frau Gisela Holoubek und Frau Sabine Kressmann, die sich bemüht haben, neben ihrer eigenen Arbeit, meine Dissertation nochmals kritisch zu überlesen. Die Atmosphäre in unserem Labor war immer sehr entspannt und angenehm und man konnte jederzeit mit Hilfestellung und Ratschlägen von allen Seiten rechnen. Frau Katharina Schindowski möchte ich, neben ihrer Diskussionsbereitschaft und Unterstützung in Fragen der Biochemie für die gemeinsamen Besuche der Kongresse der Society for Neuroscience (USA) und manch gute (und lustige) Party danken. Nicht vergessen möchte ich Frau Silke Leutner und Herrn Dr. Jörg Büge, die mich in das Prinzip der Kalziumionenmessung mit Fura-2 einwiesen.

Ganz herzlich möchte ich auch allen mutigen „Freiwilligen“ danken, die mich und meine Experimente immer mit frischem Humanblut versorgt haben und ohne die große Teile dieser Arbeit gar nicht möglich gewesen wären.

Nicht vergessen möchte ich meinen Freund Alex, der zwar wenig mit der Entstehung dieser Arbeit zu tun hatte, mich aber auf vielen Kongreßreisen begleitete und meist davon abhielt bzw. bewahrte, am Wochenende auch noch zu arbeiten.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die mich immer tatkräftig und finanziell unterstützt haben und vor allem meiner Mutter, die sich mit dem abschließenden Korrekturlesen meiner Arbeit die Nächte um die Ohren geschlagen hat.

Ich möchte diese Arbeit vor allem meinem Kater Panty widmen, den ich zu meinem großen Bedauern während meines Studiums und während meiner Promotion nicht bei mir haben konnte, und der am 15. September 2000 im Alter von 10 Jahren an chronischem Nierenversagen gestorben ist.



11. LEBENSLAUF

Name : Andrea Singer
Geburtsdatum/-ort : 24.03.1970/Stuttgart, Deutschland
Familienstand : ledig

Ausbildung:

1976 - 1980 : Pestalozzischule in 70839 Gerlingen, Deutschland
1980 - 1989 : Gymnasium in 70839 Gerlingen, Deutschland
April 1989 : Abitur

Studium:

Ab Sommersemester 1990 : Pharmaziestudium an der Ruprecht Karls-Universität,
Heidelberg
September 1993 : Erstes Staatsexamen
Oktober 1995 : Zweites Staatsexamen
01.11.1995 - 30.04. 1996 : Praktikum in der Carl Theodor Apotheke, Brühl, Deutschland
01.05.1996 - 31.10.1996 : Praktikum bei der BASF, Ludwigshafen, Deutschland
Dezember 1996 : Drittes Staatsexamen
09. Januar 1997 : Erteilung der Approbation als Apothekerin

Promotion:

Seit 07.01.1997 : Doktorandin am Zentralinstitut für seelische Gesundheit,
Mannheim und im Pharmakologischen Institut für
Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe-
Universität, Frankfurt/M. unter der Leitung von Herrn Prof.
Dr. W.E. Müller.

Titel der Dissertation : Untersuchungen zur Hemmung des Serotonintransportes durch
Hyperforin –Die Beeinflussung intrazellulärer
Ionenkonzentrationen-

November 2000 : Verleihung des Alfred-Vogel-Preises in Baden, Schweiz für
die Forschungsarbeit:
Charakterisierung von Hyperforin als wichtige antidepressive
Komponente von Johanniskrautextrakt mit neuartigem
molekularem Wirkungsmechanismus