

Mechanistische Untersuchungen zur Modulation der zytosolischen Phospholipase A₂ durch Hyperforin

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Marika Hoffmann
aus Neuruppin

Frankfurt am Main (2009)
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. D. Steinhilber
Prof. Dr. O. Werz

Datum der Disputation: 07.12.2009

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Zytosolische Phospholipase A ₂ (cPLA ₂)	1
1.1.1 Die Familie der Phospholipasen A ₂	1
1.1.2 Struktur der cPLA ₂	2
1.1.3 Regulation der cPLA ₂	3
1.1.4 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der cPLA ₂	17
1.1.5 Inhibitoren der cPLA ₂	23
1.2 Hyperforin als Bestandteil des Johanniskrauts	25
1.2.1 Johanniskraut	25
1.2.2 Hyperforin	26
1.2.3 Wirkung bei Depressionen und anderen neurologischen Erkrankungen	27
1.2.4 Einsatz bei Entzündungen und Infektionen	29
1.2.5 Antitumorales Potential von Hyperforin	30
1.2.6 Nebenwirkungen und pharmakokinetische Interaktionen	31
1.3 Ziel der Arbeit	33
2 Material und Methoden	34
2.1 Material	34
2.2 Aufreinigung primärer Zellen	35
2.2.1 PMNL	35
2.2.2 Thrombozyten	35
2.3 Zellkultur	35
2.3.1 MM6-Zellen (differenzierte, monozytäre Zellen)	35
2.3.2 Sf9-Zellen	36
2.4 12-Lipoxygenase-Aktivitäts-Assays	36
2.4.1 In intakten Zellen	36
2.4.2 In Zellhomogenaten	37
2.5 cPLA ₂ -Aktivitätsassay in intakten Zellen und Zelllysaten	37
2.5.1 Freisetzung von [³ H]-AA aus intakten Zellen	37
2.5.2 Bestimmung der AA-Freisetzung aus intakten Zellen mittels HPLC	38

2.5.3 Bestimmung der AA-Freisetzung in Zellhomogenaten.....	39
2.6 Intrazelluläre Ca ²⁺ -Messung	39
2.7 Translokation der cPLA ₂	40
2.7.1 In intakten Thrombozyten	40
2.7.2 In Thrombozytenhomogenaten.....	40
2.8 Untersuchung der Phosphorylierung der cPLA ₂ , p38MAPK, ERK-1/2, Mnk1 und CaMKII in intakten Zellen	40
2.9 SDS-PAGE, Western Blot, Coomassie-Färbung.....	41
2.10 Überexpression und Aufreinigung der cPLA ₂	41
2.10.1 Herstellung des Baculovirus.....	41
2.10.2 Überexpression und Aufreinigung der cPLA ₂	43
2.11 Liposomen- und Mizellenherstellung.....	44
2.11.1 Herstellung von Liposomen und Mizellen	44
2.11.2 Vesikelgrößenmessung.....	45
2.12 cPLA ₂ -Aktivitätsassay	45
2.13 cPLA ₂ -Bindungsassay	46
2.14 Dichtemessung.....	46
2.15 NMR-Messung	46
3 Ergebnisse.....	48
3.1 Aktivierung der cPLA ₂ in Thrombozyten	48
3.1.1 Erhöhung der 12-H(P)ETE-Freisetzung durch Hyperforin	48
3.1.2 Aktivierung der cPLA ₂ durch Hyperforin	50
3.1.3 Ca ²⁺ -Freisetzung durch Hyperforin	52
3.1.4 Induktion der Translokation der cPLA ₂	53
3.1.5 Aktivierung der p38MAPK durch Hyperforin	54
3.1.6 Die Rolle der MAPK-Phosphorylierung bei Hyperforin-Effekten	55
3.1.7 Co-Stimulation mit Thrombin und Ionophor	57
3.2 Stimulus-abhängige Modulation der cPLA ₂ in PMNL.....	59
3.2.1 Hyperforin-Effekte auf die AA-Freisetzung in PMNL	59
3.2.2 Beeinträchtigung der Phosphorylierung der Kinasen.....	61

3.3 Hyperforin-Effekte in Thrombozyten und PMNL im alternativen AA-Freisetzungss-Assay	62
3.4 Untersuchung des Einflusses von Hyperforin auf die cPLA ₂ in Zellhomogenaten ..	64
3.5 Beeinflussung der cPLA ₂ im zellfreien System	66
3.5.1 PAPC-Vesikel	70
3.5.2 Vesikel mit direkten Aktivatoren	71
3.5.3 PAPC/POG-Vesikel	72
3.5.4 Cholesterolhaltige PAPC-Vesikel	73
3.5.5 Lipid-Raft-Strukturen	76
3.5.6 PAPC/DPPC-Vesikel	78
3.5.7 PAPE-Vesikel	79
3.5.8 Zusammenfassung der Hyperforin-Effekte in Liposomen	80
3.5.9 Effekte von O-Methylhyperforin auf die cPLA ₂ im zellfreien System	81
3.6 Beeinflussung der Fluidität von Lipidaggregaten durch Hyperforin	82
3.7 NMR-Analyse der Einlagerung von Hyperforin in (D31)POPC-Vesikel	84
4 Diskussion	87
4.1 Der Einfluss von Hyperforin auf die cPLA ₂ in PMNL und Thrombozyten	87
4.2 Mechanistische Untersuchungen	89
4.2.1 Translokation	89
4.2.2 Modulation des intrazellulären Ca ²⁺ -Spiegels	90
4.2.3 Phosphorylierung der cPLA ₂	91
4.2.4 Direkte Effekte in Zellhomogenaten	91
4.2.5 Direkte Effekte und Membraninteraktionen	92
5 Zusammenfassung	103
6 Literaturverzeichnis	106
Lebenslauf	126
Publikationen	128
Danksagung	130

Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ASS	Acetylsalicylsäure
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
BEL	Bromoenollacton
BSA	Bovines Serumalbumin
C-1-P	Ceramid-1-Phosphat
CaMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase
CBL	Ca ²⁺ -bindende Schleifen
CHO	Ovarialzellen chinesischer Hamster
Chol	Cholesterol
COX	Cyclooxygenase
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A ₂
CYP	Cytochrom P450
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
FLAP	5-LO-aktivierendes Protein
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
GP	Generalisierte Polarisierung
H(P)ETE	Hydro(pero)xyeikosatetraensäure
ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
iPLA ₂	Ca ²⁺ -unabhängige Phospholipase A ₂

Abkürzungen

LO	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MM6	MonoMac 6
Mnk	MAPK-interagierende Kinase
NDGA	Nordihydroguairetische Säure
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAPC	1-Palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin
PAPE	1-Palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin
PG	Prostaglandin
PI	Phosphatidylinositol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PKC	Phosphokinase C
PL	Phospholipid
PLC/PLD	Phospholipase C/D
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMNL	polymorphkernige Leukozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POG	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin
ROS	reaktive Sauerstoffderivate
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sf9	Zelllinie aus <i>Spodoptera frugiperda</i>
SM	Sphingomyelin
sPLA ₂	sekretorische Phospholipase A ₂
STI	Soja-Trypsin-Inhibitor
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α

1 Einleitung

1.1 Zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂)

1.1.1 Die Familie der Phospholipasen A₂

Enzyme der Familie der Phospholipasen A₂ (PLA₂) katalysieren die Hydrolyse von Phospholipiden an der sn-2-Position und bewirken damit die Freisetzung von Fettsäuren und Lysophospholipiden. Insbesondere freigesetzte Arachidonsäure (AA) sowie Lysophosphatidat bzw. Lysophosphatidylcholine sind dabei auf Grund ihrer biologischen Aktivität und ihrer potentiellen Umwandlung in aktive Metabolite von Bedeutung. Darüber hinaus ist die Spaltung von Phospholipiden im Zusammenhang mit der Membranorganisation und dem Umbau von Membranstrukturen erforderlich [1-3].

Zur Zeit sind 15 Gruppen (I – XV) der PLA₂ bekannt, die wiederum 5 Familien zugeordnet werden (Tab. 1.1). Während die Nummerierung der Gruppen historisch bedingt ist und die Reihenfolge der Entdeckung der Enzyme widerspiegelt, beruht die Einteilung der Phospholipasen in die Familien auf deren Sequenz, Molekulargewicht, Disulfid-Brücken-Muster und Ca²⁺-Abhängigkeit. Somit wird zwischen sekretorischen (sPLA₂), zytosolischen (cPLA₂) und Ca²⁺-unabhängigen PLA₂ (iPLA₂) sowie PAF(Plättchen-

	sPLA ₂	cPLA ₂	iPLA ₂	PAF-AH	Lysosomale PLA ₂
Gruppen	I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII, XIV	IV	VI	VII, VIII	XV
Größe	13 – 55 kD	61 – 114 kD	28 – 146 kD	26 – 45 kD	45 kD
Ca²⁺- Abhängigkeit	mM	< μM (außer cPLA ₂ γ)	keine	keine	keine
primäre Funktion	Verdauung Eikosanoid- Produktion	Eikosanoid- Produktion	Membran- Homöostase	PAF-Abbau	Ceramid- Acylierung

Tab. 1.1 Überblick über die PLA₂-Familien (nach [3-5])

aktivierender Faktor)-Acetylhydrolasen (PAF-AH) und lysosomalen PLA₂ unterschieden [3-5].

Sowohl durch unterschiedliche Expressionsmuster und Regulationen als auch durch verschiedene Spezifitäten der Phospholipasen wird die Erfüllung einer Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben im Lipidmetabolismus und der zellulären Signaltransduktion ermöglicht. Für die Bereitstellung von AA und Konvertierung in die entsprechenden Metabolite nimmt die cPLA₂α (im weiteren kurz cPLA₂ genannt) eine Schlüsselrolle ein. Sie zeichnet sich gegenüber den PLA₂ der anderen Gruppen sowie gegenüber den weiteren 5 Unterfamilien (β bis ζ) der cPLA₂ durch eine hohe Spezifität für AA an der sn-2 Position der Phospholipide aus [1-4].

1.1.2 Struktur der cPLA₂

Die cPLA₂ ist ein 85 kD großes Enzym (Abb. 1.1), welches aus 2 Domänen aufgebaut ist: der N-terminalen Ca²⁺-bindenden (C2, Aminosäuren 1 – 138) und der C-terminalen katalytischen Domäne (Aminosäuren 144 – 749), die über eine kurze Schleife (Aminosäuren 139 – 143) verlinkt sind [6, 7]. Beide Domänen sind eng koordiniert, weisen aber in der Kristallstruktur keine Protein-Interaktionen auf, wodurch eine gewisse Rotation ermöglicht wird [7, 8].

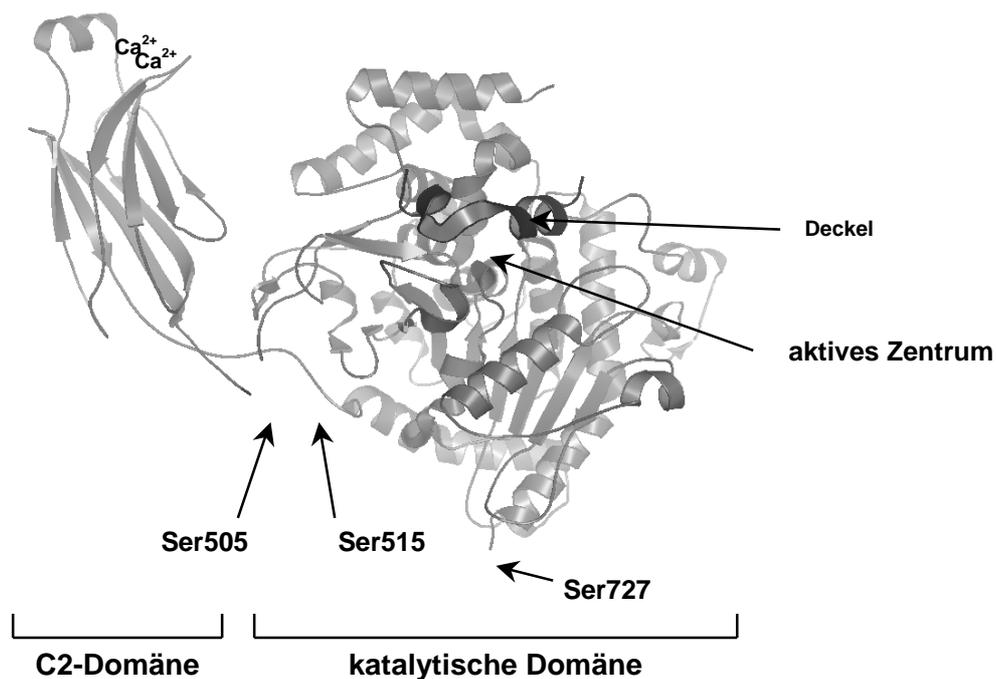


Abb. 1.1 Kristallstruktur der cPLA₂ (nach [7])

Die N-terminale C2-Domäne zeigt eine große Analogie zu den C2-Domänen der Proteinkinase C (PKC) und Phospholipase C (PLC) und ist durch eine 8-fache β -Sandwich-Struktur und drei Ca^{2+} -bindende Schleifen gekennzeichnet, durch die zwei Ca^{2+} -Ionen koordiniert werden [6, 9]. In der C-terminalen Domäne hingegen findet sich das aktive Zentrum. Ein ca. 7 Å langer, sich verjüngender Tunnel führt zu den katalytisch aktiven Aminosäuren Ser228 und Asp549. Die Bindung der Phospholipide wird durch hydrophobe Aminosäuren entlang des Tunnels unterstützt und Wechselwirkungen zwischen Resten am Tunnelausgang und der ersten Doppelbindung der AA könnten die Spezifität der cPLA₂ für AA begründen [7]. Die Hydrolyse von Glycerolestern erfolgt nach nukleophilem Angriff des Ser228 auf den Kohlenstoff der Carbonylgruppe der AA, wobei Arg549 die Aktivierung des Ser228 stabilisiert [7, 10-12]. Arg200, welches am Tunnelausgang lokalisiert ist, wurde ebenfalls als essentielle Aminosäure identifiziert, allerdings ist deren Funktion noch unklar. Auf Grund ihrer Position ist eine Interaktion mit der Phosphatgruppe der Phospholipide möglich, experimentelle Belege fehlen aber bisher [7, 12]. Der Eingang des aktiven Zentrums wird durch eine deckelähnliche Struktur (Aminosäuren 413 – 457) verschlossen, die durch die Bindung an Membranoberflächen zum einen sterisch, zum anderen durch die Abstoßungen zwischen negativen Resten auf dem Deckel und anionischen Phospholipiden verschoben wird [7, 13, 14].

Die cPLA₂ unterscheidet sich in ihrer Struktur somit stark von den sekretorischen PLA₂, gleicht aber bezüglich der funktionellen Teilung des Enzyms in eine Ca^{2+} -sensitive und eine katalytisch aktive Domäne anderen Ca^{2+} -gesteuerten Enzymen wie z.B. der 5-Lipoxygenase (5-LO), der PKC oder der PLC [7, 15].

1.1.3 Regulation der cPLA₂

1.1.3.1 Gen- und Proteinexpression

Mit Ausnahme von reifen T- und B-Lymphozyten ist die cPLA₂ in allen Zellen und Geweben konstitutiv exprimiert [2, 3]. Somit kommt der posttranslationalen Regulation dieses Enzyms eine besondere Rolle zu. Nichtsdestotrotz ist in bestimmten Zellarten und pathologischen Zuständen auch die transkriptionelle und posttranskriptionelle Modulation der cPLA₂ von Bedeutung. In verschiedenen Tumoren liegt die cPLA₂ überexprimiert vor [16, 17] und durch Stimulation mit Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder

Lipopolysacchariden (LPS) kann insbesondere die verzögerte AA-Freisetzung durch eine verstärkte cPLA₂-Expression intensiviert werden [2, 18]. Dabei konnte die Beteiligung von Ras sowie der Jun-N terminalen Kinase (JNK), der extrazellulär Signal-regulierten Kinase 1/2 (ERK-1/2), der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) p38 und des Transkriptionsfaktors NFκB (Nuklearer Faktor κ B) nachgewiesen werden [19-21].

Das cPLA₂-Gen umfasst 137 kb und wurde auf Chromosom 1q25 lokalisiert [20, 22]. Sein Promotor enthält, wie bei anderen Haushaltsgenen, keine TATA-Boxen und es fehlen klassische Sp1-Bindestellen [23, 24]. Dennoch konnte die Assemblierung des TFIID-Komplexes bei -30/-35 sowie die Bindung von Sp1 an die GC-reichen Bereiche -37 bis -30 und -21 bis -18 und die Assoziation von c-Jun an Sp1 nachgewiesen werden [25, 26]. Bei -21 bis -18 bindet weiterhin der Lungen-Krüppel-ähnliche Faktor (LKLf) [27]. Eine mögliche Aktivierung von c-Jun und LKLf durch JNK und ERK-1/2 könnte den Zusammenhang zwischen der Induktion von MAPK und der Hochregulation der cPLA₂ herstellen [27]. Die Funktion des terminalen Deoxynukleotid-Transferasen (TdT)-Initiator-Elements, der IFN-γ Bindestellen, des NFκB-Motivs und der Glucocorticoid-Response-Elemente (GRE) hingegen bleibt noch zu klären.

Neben Transkriptionsfaktoren ist auch die Histonacetylase p300 in die Genexpression der cPLA₂ involviert. Nach Interleukin(IL)-1β-Induktion assoziiert p300 durch MAPK (p38MAPK, ERK-1/2 und JNK) sowie NFκB vermittelt mit dem cPLA₂-Promoter und führt über eine Öffnung der Chromatinstruktur zur Transkription [28].

1.1.3.2 Subzelluläre Lokalisation

In der posttranslationalen Regulation der cPLA₂ spielt vor allem die Ca²⁺-abhängige Aktivierung des Enzyms eine essentielle Rolle (Abb. 1.2). Im Gegensatz zur sPLA₂, welche Ca²⁺ im aktiven Zentrum bindet [29], wird zwar die katalytische Aktivität der cPLA₂ nicht durch Ca²⁺-Ionen beeinflusst [30], allerdings forciert Ca²⁺ ab 235 – 450 nM die Bindung der cPLA₂ an Phospholipidaggregate und ermöglicht somit den Zugang des Enzyms zum Substrat [31]. In intakten Zellen erfolgt die Assoziation der cPLA₂ an das Endoplasmatische Retikulum (ER) und an Kernmembranen sogar schon bei 210 – 280 nM Ca²⁺ und zur Bindung an den Golgi-Apparat genügen Ca²⁺-Konzentrationen von 100 – 125 nM [32].

In unstimulierten Zellen liegt das Enzym somit in der Regel zytosolisch vor, es wurde in verschiedenen Epithelzelllinien allerdings auch im Kern lokalisiert [2, 33, 34]. Die Zielstrukturen nach Aktivierung der Zellen werden durch den Zelltyp und die Art der Zellstimulation bestimmt. So präferiert die cPLA₂ in der Regel Golgi, ER oder Kernmembranen [2, 32-38], kann in Einzelfällen aber auch an alternative Membrankompartimente translozieren. In der zervikalen Epithelzelllinie HeLa bevorzugt die cPLA₂ Subdomänen der Kernmembran [35], in Zymosan-stimulierten Makrophagen werden Phagosomen und in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293), MDA-MB231 Brustkrebs- und PC3 Prostatakrebszellen neben ER und Golgi auch Lipid Bodies angesteuert [39, 40]. Für glomeruläre Epithelzellen und neutrophile Granulozyten konnte neben einer Translokation zum Zellkern auch eine Bindung an Plasmamembranen nachgewiesen werden [38, 41]. In neutrophilen Granulozyten erfolgt die Assoziation an Plasmamembranen vor allem nach der Stimulation mit Zymosan, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) und steht im Zusammenhang mit der Aktivierung der NADPH-Oxidase. Interessanterweise konnte die Lokalisation an der Plasmamembran aber nur über einen Zeitraum von 5 min beobachtet werden, während nach 15 min die cPLA₂ hauptsächlich an nukleären Membranen detektiert wurde [41].

Die Translokation der cPLA₂ und ihre Spezifität für die verschiedenen Membrankompartimente geht auf die C2-Domäne und deren Ca²⁺-bindende Schleifen (CBL) zurück, die unabhängig von der Beschaffenheit der katalytischen Domäne die Assoziation mit den entsprechenden Membranen bestimmt [30, 36, 42]. In der Selektion der Ziel-Membranen spielt möglicherweise die Präferenz der C2-Domäne für das in intrazellulären Membranen vorherrschende Phosphatidylcholine (PC) gegenüber dem in Plasmamembranen angereichertem Phosphatidylserine (PS) eine Rolle. Durch Mutationen der hydrophoben Aminosäuren Phe35, Leu39, Tyr96 und Val97 der CBL1 und CBL3 geht die Selektivität der cPLA₂ für PC und intrazelluläre Membranen verloren [36, 42]. Weiterhin ermöglichen CBL1 und CBL3 durch Penetration in die Lipid-Doppelschicht die Verankerung des Enzyms an der Membran. Die hydrophoben Spitzen der Schleifen interagieren dabei mit den Fettsäureresten im Innenbereich der Membran, während hydrophilere Aminosäurereste in unmittelbarer Nähe zu den Phospholipid-Kopfgruppen lokalisiert sind. Die Ca²⁺-Ionen zwischen den CBL führen nicht zu verstärkten Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen, sondern werden durch Wasser koordiniert und dienen der Neutralisation von negativen Ladungen in den CBL [43, 44].

Allerdings scheint die C2-Domäne nicht allein für die Interaktion des Enzyms mit Membranen verantwortlich zu sein. Nach Zellstimulation translozierte cPLA₂ bleibt auch nach Erniedrigung des Ca²⁺-Spiegels mit den Zielstrukturen assoziiert und kann auch mit Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) nicht von Membranfragmenten dissoziiert werden. Die isolierte C2-Domäne hingegen wird allein durch Ca²⁺ reguliert und ist von dieser verzögerten Dissoziation nicht betroffen [45, 46]. Welche Aminosäuren die zusätzlichen Membraninteraktionen bewirken, konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Mutationen von Trp464, aber auch von Ile399, Leu400 und Leu552 konnten die Affinität der cPLA₂ gegenüber Lipidaggregaten hemmen [13, 46, 47]. Darüber hinaus wurde auch ein Kontakt der Bereiche 268 bis 279 und 466 bis 470 zur Membranoberfläche nachgewiesen [14]. Eine Beteiligung des Zytoskeletts an der verzögerten Dissoziation in den Epithelzelllinien GEC und EA.hy.926 wurde ausgeschlossen [45, 48], allerdings wurde in Thrombozyten die EGTA-resistente Assoziation der cPLA₂ mit Plasmamembranen mit einer Bindung an Aktin in Zusammenhang gebracht [49].

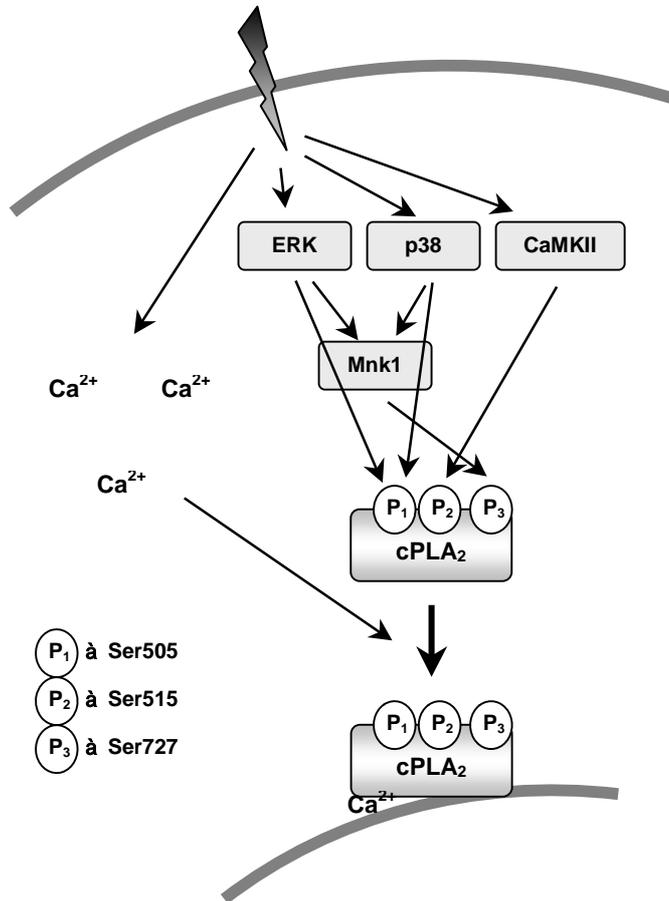
Die Ca²⁺-abhängige Membranassoziation wird also durch Wechselwirkungen der C2-Domäne mit Phospholipiden ermöglicht, während unterstützende Interaktionen der katalytischen Domäne den Ca²⁺-Bedarf des intakten Enzyms gegenüber der C2-Domäne reduzieren und einen Ausgleich von vorherrschenden Ca²⁺-Oszillationen bewirken [14, 46].

1.1.3.3 Phosphorylierung der cPLA₂

Neben der Ca²⁺-induzierten Translokation trägt die Phosphorylierung der cPLA₂ durch verschiedene Kinasen zur Aktivierung des Enzyms bei (Abb. 1.2). Abhängig vom Zelltyp und der Art der Zellstimulation phosphorylieren p38MAPK und p42/44MAPK (ERK-1/2) sowie MAPK-interagierende Kinasen (Mnk1) und Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMK) II die cPLA₂ an Ser505, Ser727 und Ser515 [50-56].

Aus der G-Protein vermittelten Zellstimulation durch PAF, fMLP oder Thrombin resultiert die Aktivierung von ERK-1/2 und p38MAPK [56-58], während Zellstress und Phorbol ester selektiv p38MAPK bzw. ERK-1/2 aktivieren [55, 56, 59, 60]. Die resultierende Phosphorylierung der cPLA₂ an Ser505 führt nicht zur initialen Induktion der AA-Freisetzung, kann aber Ca²⁺-vermittelte Effekte verstärken und erhöht die im Lysat gemessene Enzymaktivität 2- bis 3-fach [52, 61-63]. In intakten Zellen, bei niedrigeren physiologischen Ca²⁺-Konzentrationen, dürfte der Beitrag der Kinasen erheblich gesteigert

sein [47]. Die Phosphorylierung an Ser505 bewirkt wahrscheinlich eine Konformationsänderung und damit verbunden eine verbesserte Membraninteraktion der katalytischen Domäne [47]. Allerdings gibt es widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der



Frage, ob durch eine Phosphorylierung an Ser505 die Ca²⁺-unabhängige Assoziation dieser Domäne unterstützt wird [46, 47].

Die Mnk1 vermittelte Phosphorylierung der cPLA₂ hingegen verstärkt nicht nur Ca²⁺-Effekte sondern vermittelt auch die direkte Aktivierung der cPLA₂ in intakten Zellen nach Stimulation mit Okadainsäure in Abwesenheit eines Ca²⁺-Einstroms [53, 63]. Mnk1 kann durch ERK-1/2 und p38MAPK in intakten Zellen und im zellfreien

Abb. 1.2 Ca²⁺- und Kinasen-vermittelte Regulation der cPLA₂

Kontext aktiviert werden und phosphoryliert die cPLA₂ an Ser727 [53, 64]. Dadurch wird die Bindung der OH-Gruppe des Ser727 an p11 aufgehoben, welches im Komplex mit Annexin A2 die Aktivität des Enzyms unterbindet [65].

Ein Einfluss der CaMKII wurde bisher in glatten Muskelzellen der Aorta (VSMC), in der leukämischen Zelllinie U937, in embryonalen Nierenzellen HEK293 und in C12-Mausfibroblasten detektiert, die durch Noradrenalin, fötales Rinderserum (FBS) oder durch einen Ca²⁺-Einstrom stimuliert wurden [66-69]. Die Aktivierung in intakten Zellen resultiert aus einer direkten Phosphorylierung der cPLA₂ an Ser515 [54]. Darüber hinaus bewirkt CaMKII die Aktivierung von MAPK [66, 70] und in C12 Zellen wurden auch phosphorylierungs-unabhängige Effekte der CaMKII auf Ser505/Ser727/Ser515-Mutanten gefunden [69].

Weiterhin wurde eine Phosphorylierung der isolierten cPLA₂ durch PKC gezeigt, die die Aktivität der cPLA₂ allerdings kaum modulierte [51, 52, 71]. Über eine Rolle der PKC in intakten Zellen, die über eine Aktivierung von ERK-1/2 hinausgeht, wurde bisher nur in Komplement-stimulierten glomerulären Epithelzellen berichtet [48].

1.1.3.4 Proteininteraktionen

Phospholipase-aktivierendes Protein (PLAP), Phospholipase-interagierendes Protein (PLIP), Annexine I, II, V und VI, p11, Caveolin-1 sowie Vimentin, Aktin, und das Integrin $\alpha 2\beta 3$ wurden als Interaktionspartner der cPLA₂ beschrieben, die stimulusabhängig in die Signalkaskade der cPLA₂-Aktivierung involviert sein können. So wird PLAP nach der Behandlung glatter Muskelzellen mit Leukotrien(LT)₄ sowie von Makrophagen mit LPS, TNF α oder IL-1 β hochreguliert und die Expression, Membranbindung und Aktivität der cPLA₂ werden gesteigert [72-74]. Auch im zellfreien System kann PLAP die cPLA₂-vermittelte AA-Freisetzung positiv beeinflussen [75, 76].

Die physiologische Bedeutung von PLIP hingegen ist noch unklar. Überexprimiert in Mesangialzellen der Nieren potenziert es die apoptotische Wirkung der cPLA₂ sowie die Prostaglandin(PG)E₂-Produktion, allerdings ist zumindest der apoptotische Effekt unabhängig von einer direkten Interaktion mit der cPLA₂ [77, 78].

Besser untersucht ist die Rolle der inhibitorischen Proteine p11 und der Annexine I, II, V und VI. Antientzündliche Annexine unterdrücken die Aktivität der cPLA₂, sPLA₂, cPKC, induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) [79, 80]. Bezüglich der cPLA₂ wurde eine schwache, unspezifische Hemmung durch Annexin II und V nachgewiesen, während Annexin I direkt an die C2-Domäne der cPLA₂ bindet und bei niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen die Phospholipidhydrolyse um 50% senkt [81, 82]. Obwohl Annexin II selbst keine direkte Interaktion mit der cPLA₂ zeigt, kann die Komplexbildung mit p11, einem niedermolekularen Protein der S100-Familie, die Enzymaktivität der cPLA₂ stark vermindern. Das Heterotetramer bindet über p11 an den C-terminalen Bereich der cPLA₂ und behindert vermutlich sterisch die Membranassoziation der katalytischen Domäne [65, 81, 83]. Durch Phosphorylierung an Ser727 kann die Komplexbildung - wie oben erwähnt - unterbunden werden [65]. Die Erhöhung der Expression von Annexin I als auch von p11 durch Dexamethason trägt möglicherweise zur antientzündlichen Wirkung des Glucocorticoids bei [84, 85]. Darüber hinaus moduliert auch der physiologische Stimulus transformierender Wachstumsfaktor α

(TGF α) die inflammatorische Zellantwort durch die Transkriptionsregulation von p11 [86].

Annexin VI weist keine direkten Interaktionen zur cPLA₂ auf, inhibiert aber die AA-Freisetzung aus Ovarialzellen chinesischer Hamster (CHO) durch Änderungen der Membranstruktur. Es bewirkt eine Akkumulation von Cholesterol im späten Endosom, wodurch der Cholesterolspiegel im Golgi und in der Plasmamembran sinkt und die Aktivität der cPLA₂ beeinträchtigt wird (siehe auch Lipidinteraktionen / Lipid Rafts) [87].

Zu den inhibitorischen Interaktionspartnern zählt außerdem Caveolin-1, welches im zellfreien System und in primären Hippocampus-Neuronen der Aktivierung der cPLA₂ entgegenwirkt [88].

Die Bindung der cPLA₂ an die Zytoskelettproteine Aktin oder Vimentin ist zelltypspezifisch. Während in der Endothelzelllinie EA.hy.926 keine Assoziation des Enzyms mit dem Zytoskelett detektiert wurde [45], interagiert cPLA₂ in embryonalen Nierenzellen (HEK 293) über die C2-Domäne mit Vimentin [89]. In Thrombozyten hingegen kolokalisiert cPLA₂ nicht mit Vimentin, sondern mit Aktin, welches auch die aktivitätsverstärkende Interaktion des Enzyms mit dem Integrin α 2b β 3 vermitteln könnte [49, 90].

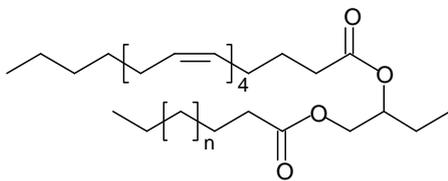
Neben den beschriebenen Proteinen können weiterhin die proinflammatorischen Enzyme iNOS, COX-2 und sPLA₂ die Aktivität der cPLA₂ beeinflussen. In humanen Endothelzelllinien wurde ein Komplex aus cPLA₂, iNOS und COX-2 nachgewiesen, der die AA-Freisetzung und die effiziente Umsetzung der AA zu PGE₂ impliziert. iNOS bindet dabei direkt an die cPLA₂ und vermittelt die Bindung von COX-2, welches ohne iNOS nur minimale Assoziationen zur cPLA₂ aufweist [91].

sPLA₂ bewirkt eine Verstärkung der cPLA₂-Aktivität ohne direkt mit dem Enzym zu interagieren, möglicherweise über spezifische Rezeptoren oder durch Eikosanoid- bzw. Lysophospholipidfreisetzung. Umgekehrt scheint die AA-Freisetzung durch sPLA₂, insbesondere sPLA₂ V, essentiell mit einer initialen Aktivierung der cPLA₂ verknüpft zu sein [3, 92, 93].

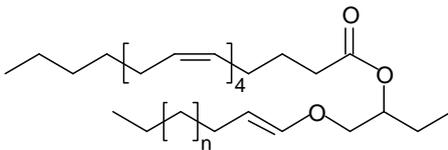
1.1.3.5 Lipidinteraktionen

Die cPLA₂ ist durch eine hohe Substratspezifität für Phospholipide mit sn-2 veresteter AA charakterisiert [71, 94, 95]. Diese ist in Zellmembranen in Phosphatidylethanolamin (PE) sowie in Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylserin (PS) angereichert, während nur ein geringerer Prozentsatz der Phosphatidylcholine (PC) AA enthält [96, 97]. Dennoch dient PC auf Grund seines hohen Anteils in Membranen [98, 99] neben PE als Hauptlieferant für AA [96, 97, 100].

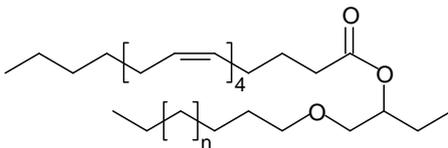
1-Acyl-2-Arachidonoyl-sn-glycero-



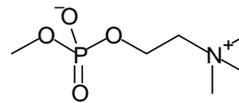
1-Alkyl-2-Arachidonoyl-sn-glycero-



1-Alk-1'-enyl-2-Arachidonoyl-sn-glycero-



-3-phosphatidylcholin



-3-phosphatidylethanolamin

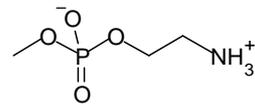


Abb. 1.3 PC und PE-Derivate

Zelltypabhängig werden selektiv 1,2-Diacyl-, 1-O-Alkyl- oder 1-O-Alk-1'-enyl-PC bzw. – PE hydrolysiert (Abb. 1.3) [97, 98, 100, 101], während in zellfreien Systemen keine Selektivität der cPLA₂ bezüglich PC und PE sowie der sn-1-Radyl-Gruppe festgestellt werden konnte [71, 95, 102].

Allerdings wird die cPLA₂-Aktivität durch die Oberflächenladung und Membranstruktur sowie durch Interaktionen mit einzelnen Lipiden moduliert.

1.1.3.5.1 Anionische Lipide

Untersuchungen der isolierten C2-Domäne der cPLA₂ ergaben eine hohe Selektivität dieses Enzymteils für PC-Vesikel gegenüber Liposomen aus anionischen Lipiden wie PS, PI, Phosphatidylglycerol (PG) oder Phosphatidsäure (PA) [42, 103, 104]. Dem gegenüber konnte allerdings eine erhöhte Membranassoziation und Aktivität des kompletten Enzyms an Liposomen mit eingebauten anionischen Lipiden festgestellt werden, die bei niedrigen Ca²⁺-Spiegeln und Lipidkonzentrationen von 7 – 17 mol% optimal sind und bei steigendem Anteil an negativen Ladungen auf Grund der Abstoßungsreaktionen mit der C2-Domäne wieder abnehmen [13, 71, 104-107]. Als ursächlich werden mögliche Interaktionen mit einem kationischen Cluster (Lys271/273/274 plus Arg467) sowie Abstoßungsreaktionen mit anionischen Aminosäureresten auf dem Deckel (Glu418/419/420) bzw. im Verbindungsstück zum Deckel (Asp436/438/439/Glu440) diskutiert [13]. Die Aktivierung durch anionische Lipide konnte allerdings nur in intakten Lipidaggregaten gezeigt werden. In Triton-X-100-haltigen Mizellen, in denen die Lipide vereinzelt vorliegen, können 5 mol% PS, PI, PG und PA die cPLA₂-Aktivität nicht erhöhen [108].

1.1.3.5.2 Phosphatidylinositol 4,5-diphosphat (PIP₂)

PIP₂ gilt als sehr potenter Aktivator der cPLA₂ in intakten Zellen sowie in zellfreien Assays mit Liposomen und Triton-X-100-Mizellen [105, 106, 108-110]. Schon ab 0,1 mol% PIP₂ kann eine gesteigerte AA-Freisetzung gemessen werden, die je nach Reaktionsbedingungen bei 1 bis 3 mol% PIP₂ in Liposomen 8- bis 55-fach und in Mizellen sogar bis zu 120-fach über dem Basalwert liegt [105, 106, 108]. Konzentrationen von 1 bis 3% entsprechen dem physiologischen Vorkommen von PIP₂, welches ca. 1% aller Phospholipide stellt [111]. Es ist vorrangig in der Plasmamembran, aber auch in kleineren Mengen in ER, Golgi, Kernmembranen und Mitochondrien zu finden [112, 113]. Innerhalb der Membran scheint es trotz seines hohen Anteils an ungesättigten Fettsäuren vorwiegend in rigiden, cholesterolreichen Raft-ähnlichen Domänen aufkonzentriert zu sein [111, 113, 114], möglicherweise durch die Bindung an Raft-lokalisierte Proteine wie NAP-22 oder GAP-43 [111, 115]. Eine Plecktrin-Homologie(PH)-Domäne, wie sie für PIP₂-regulierte Enzyme typisch ist, ist in der cPLA₂-Struktur nicht zu finden, allerdings wurde ein kationischer Cluster in der katalytischen Domäne (Arg488/Lys541/543/544) als PIP₂-Bindestelle identifiziert (Abb. 1.4) [13]. Die Translokation der cPLA₂ an Membranen, die

Penetration von hydrophoben Bereichen der katalytischen Domäne in die Lipiddoppelschicht und die Substrathydrolyse werden durch die Interaktion mit PIP_2 verstärkt und sind sogar in Abwesenheit von Ca^{2+} zu beobachten, wenn auch zu einem geringeren Ausmaß [106, 108, 116, 117]. Dass dieses Phänomen die in Abwesenheit eines Ca^{2+} -Einstroms beobachtete AA-Freisetzung nach Stimulation mit bestimmten Stimuli erklären könnte, wurde in LPS-vorbehandelten und UV-stimulierten Makrophagen gezeigt, wobei PIP_2 für die Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung der cPLA_2 verantwortlich gemacht werden konnte [109].

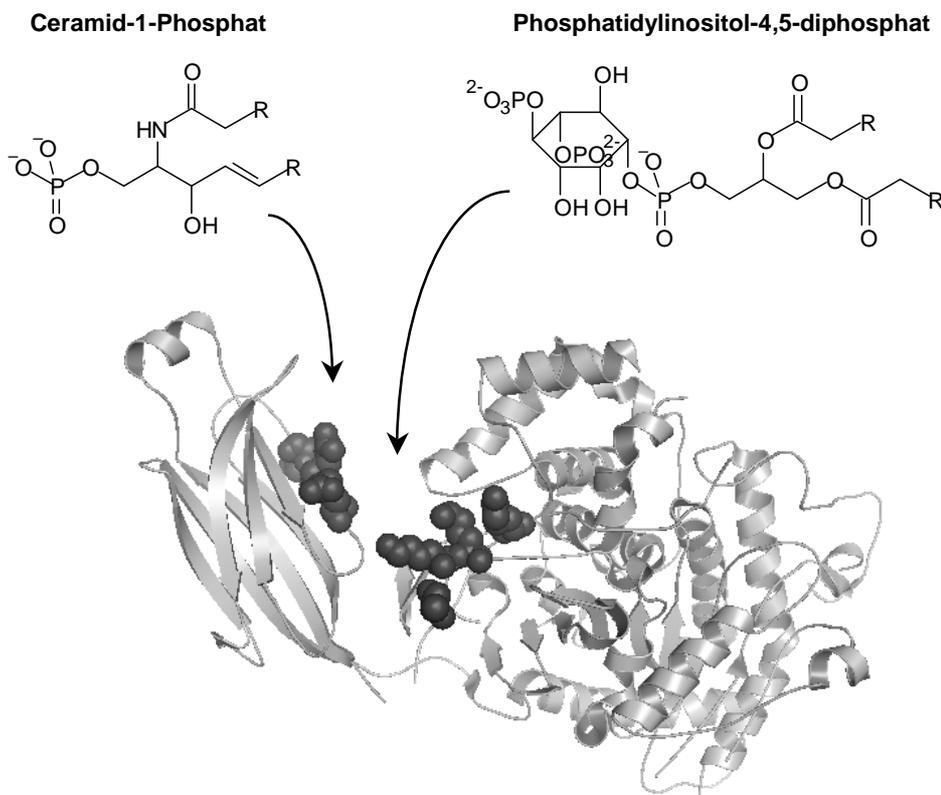


Abb. 1.4 C-1-P- und PIP_2 -Bindestellen

1.1.3.5.3 Ceramide-1-Phosphate (C-1-P)

Einen weiteren direkten Aktivator der cPLA_2 stellt C-1-P dar. Das aus Ceramiden gebildete C-1-P tritt im Zusammenhang mit Entzündungen, Phagozytose sowie Zellüberleben und -proliferation auf [118, 119] und ist essentiell für die $\text{IL-1}\beta$ - und A23187-induzierte cPLA_2 -Aktivität in Lungen-Alveolarepithel-Karzinom-Zellen A549 [120]. Auch in J774.1-Makrophagen und L929-Mausfibroblasten führt exogenes C-1-P zur Freisetzung von AA und Translokation der cPLA_2 an Golgi und perinukleare Membranen

[121, 122]. Durch direkte Interaktion von C-1-P mit einer kationische Bindestelle an der C2-Domäne der cPLA₂ (Abb. 1.4) wird die Dissoziationskonstante des Enzyms gesenkt und damit die Bindezeit an Membranen verlängert [116, 123]. Weiterhin erfährt die cPLA₂ eine ca. 2-fache bzw. 8-fache allosterische Steigerung der Aktivität an Liposomen und Mizellen [116, 121, 124]. In Abwesenheit von Ca²⁺ konnten keine Effekte beobachtet werden, allerdings senkt C-1-P die notwendige Ca²⁺-Konzentration [121] und könnte daher die Translokation der cPLA₂ an Golgi bei geringeren Ca²⁺-Spiegeln bewirken. Zusätzlich zur direkten Bindung werden aber auch Einflüsse von C-1-P auf zelluläre Signaltransduktionswege in der Aktivierung der cPLA₂ diskutiert. So induziert C-1-P einen Ca²⁺-Einstrom und in L929-Zellen konnte die C-1-P induzierte AA-Freisetzung zumindest zum Teil auf eine Aktivierung der PKC zurückgeführt werden [122].

1.1.3.5.3 Ceramide und Diacylglycerol

Im Gegensatz zu C-1-P werden Ceramide vor allem im Apoptose- oder Differenzierungsgeschehen generiert. Darüber hinaus induzieren auch Zellstress (Hitze, Strahlung, oxidativer Stress) oder entzündliche Zytokine die Ceramidbildung. Vorläuferlipid der Ceramide ist das vor allem auf der Außenseite der Plasmamembran lokalisierte Sphingomyelin (SM), welches durch Sphingomyelinase gespalten wird [125, 126]. Diacylglycerole (DAG) hingegen werden in aktivierten Zellen durch die PLC oder PLD aus PI bzw. PC gewonnen [99]. Ceramid und DAG gleichen sich in ihrer Struktur, die sich aus einer kleinen Kopfgruppe und einem voluminöseren Fettsäureteil zusammensetzt (Abb. 1.5), und zeigen ähnliche physikalische Eigenschaften. Sie streben die Bildung von negativen Membrankurvaturen und hexagonalen Phasen an und führen dadurch zu einer erhöhten Membranpermeabilität, zur Freilegung hydrophober Bereiche innerhalb der

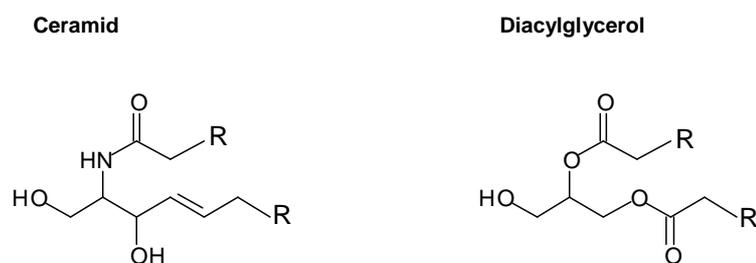


Abb. 1.5 Ceramid und Diacylglycerol

hydrophilen Kopfgruppenschicht und zu Flip-Flop-Prozessen zwischen den Membranschichten. Sie gelten daher als Störsubstanzen in Lipidaggregaten [99, 127-129]. Sie weisen aber auch einen ordnend Charakter auf und formieren sich in separaten, gelartigen (s_o) Phasen [99, 130, 131].

Für beide Lipide wurde eine Aktivierung der cPLA₂ in intakten Zellen und in Liposomen festgestellt. Kurzkettige (C2- und C6-Ceramide) wie langkettige Ceramide (C16-Ceramide) sowie die Bildung endogener Ceramide durch Behandlung mit Sphingomyelinase erhöhen die AA-Freisetzung in Thrombozyten, CHO-Zellen, mesangialen Zellen und Phäochromozytom (PC12)-Zellen [107, 132-135]. Die Behandlung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten mit dem DAG 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-3-glycerol (OAG) resultiert in einer verstärkten Translokation der cPLA₂ und gesteigerten AA-Freisetzung [136, 137]. Darüber hinaus konnte die cPLA₂-Aktivität nach dem Einbau von C16-Ceramid und DAG in PC-Liposomen schon ab 0,1 bzw. 2 mol% gesteigert und ab 10 bzw. 9 – 17 mol% maximal aktiviert werden [105, 107]. Als Ursachen werden das Auseinanderschieben der voluminösen PC-Kopfgruppen und damit eine bessere Substratzugänglichkeit wie auch die Bildung von hydrophoben Ankern durch hexagonale Phasen diskutiert [99, 127]. Für Ceramid werden auch direkte Effekte auf die cPLA₂ postuliert. So wurde die Bindung von markiertem Ceramid an die C2-Domäne des Enzyms gezeigt [107]. Allerdings konnte dieser Befund in einem Lipid-Protein-Overlay-Assay nicht bestätigt werden [121] und Ceramid sowie DAG bewirken im Gegensatz zu PIP₂ und C-1-P ausschließlich in Liposomen mit intakter Phospholipid-Doppelschicht eine Verstärkung der AA-Freisetzung, nicht aber in Triton-X-100-Mizellen [124]. PKC α hingegen, welche durch DAG wahrscheinlich direkt stimuliert wird, zeigt auch nach der Zugabe von Triton-X-100 eine erhöhte Aktivität [138].

Andererseits sind die Ceramid-Effekt nicht allein auf physikalische Eigenschaften zurückzuführen, da unterschiedliche Längen der Ceramide diese zwar verändern (C2-Ceramid bildet keine hexagonalen Phasen), aber keinen Einfluss auf die Aktivierung der cPLA₂ haben [129].

1.1.3.5.4 Lipid rafts

Das Konzept der Bildung von Lipid Rafts in Membranen wurde und wird auf Grund von experimentellen Unsicherheiten bei der Aufarbeitung und Analyse solcher Domänen kontrovers diskutiert [139-141]. Bei der Fraktionierung von Zellen konnten sphingomyelin- und cholesterolreiche Detergenzien-unlösliche Membranbereiche (DRM)

isoliert werden, allerdings ist nicht klar, inwieweit diese DRMs Artefakte sind, die aus der Behandlung mit Detergenzien entstehen [139, 141]. In Modellmembranen aus PC, SM und 33% Chol konnte eine Phasentrennung in flüssig-geordnete (l_o) und flüssig-ungeordnete (l_d) Bereiche nachgewiesen werden. Jedoch ist die Übertragbarkeit dieser Modelle auf reale Membranen fraglich, zumal die in Modellmembranen sogar mikroskopisch erfassbaren Areale in ihrer Größe nicht mit natürlichen Mikrodomänen vergleichbar sind [141-143]. Dass 33% Cholesterol rein physikalisch in der Lage sind, eine Phasentrennung in PC/SM-Lipidaggregaten zu induzieren, weist darauf hin, dass 20 – 40% Cholesterol in Zellmembranen durchaus Domänenbildungen forcieren können [143]. Eindeutig nachgewiesen wurde bisher aber nur die Existenz von ca. 100 nm großen cholesterol- und sphingomyelinreichen Caveolae in der Plasmamembran sowie ein sehr heterogener Aufbau von Membranen auf Lipid- und Proteinebene [141, 144]. Anreicherungen von SM und Cholesterol finden sich vor allem in der Plasmamembran sowie im Golgi-Apparat [145, 146]. Da Rafts mikroskopisch nicht sichtbar sind, müssen sie eine Größe von < 300 nm aufweisen, Größen von 10 – 100 nm werden postuliert. Neben der geringen Größe sind Lipid Rafts wahrscheinlich auch durch eine hohe Dynamik (Halbwertszeit: μ s bis ms) und Heterogenität gekennzeichnet. Außer Lipiden spielen Proteine, z.T. in Verbindung mit dem Zytoskelett, eine Rolle in der Formierung und Größenbegrenzung der Domänen [115, 141, 147]. In Rafts (bzw. DRM) angereicherte Proteine weisen dabei in der Regel Verknüpfungen mit ungesättigten Fettsäureresten (Myristinsäure, Palmitinsäure) oder glykosylierten PI-Gruppen auf. Darüber hinaus können sie durch Interaktionen mit anderen Proteinen (z.B. Caveolin-1, Flotillin), Lipiden (z.B. in Rafts angereichertes PIP_2) oder Cholesterol (über Cholesterol-bindende Domänen (CRAC)) in Rafts konzentriert werden [115]. Die Membran als ordnende Plattform könnte durch derartige Trennungen und Aufkonzentrierungen die Signaltransduktion entscheidend mit beeinflussen [147].

Hinweise auf eine Lokalisation der $cPLA_2$ in Lipid Rafts finden sich in mit Prionen infizierten Nervenzellen und Hippocampus-Neuronen [88, 148]. Darüber hinaus wurde ein positiver Zusammenhang zwischen dem Cholesterolgehalt und der $cPLA_2$ -Aktivität in Thrombozyten, HeLa, CHO und Ratten-Endothelzellen der Aorta festgestellt. Aus letzteren konnte $cPLA_2$ mit Caveolin-1 co-immunoprecipitiert werden [87, 133, 149-152]. In einer Leukämiezelllinie von Ratten-Basophilen (RBL-2H3) hingegen wurde eine reduzierte Leukotrienbiosynthese nach Cholesterolentzug sowie die Lokalisation von 5-LO aktivierendem Protein (FLAP) in Lipid Rafts, aber kein Einfluss von Cholesterol auf die AA-Freisetzung beobachtet [153]. Am isolierten Enzym wiederum wurde eine

gegensätzliche Beeinflussung der cPLA₂ durch SM und Cholesterol nachgewiesen. Cholesterol konnte die SM-bedingte Hemmung der cPLA₂ aufheben [133]. In diesem Zusammenhang ist auch eine Studie interessant, die durch die Verankerung der cPLA₂ an der Plasmamembran durch N-terminal gebundenes Lck und C-terminal verankertes K-Ras4B auf unterschiedliche Aktivitäten der cPLA₂ stieß. Nach Stimulation mit Epinephrin und A23187 wurde die Aktivität der Lck-cPLA₂ gesteigert, die der Ras-cPLA₂ hingegen gehemmt. Neben der in der Studie postulierten Interkalation des C-terminalen Peptids mit evt. Proteinbindungen der cPLA₂ könnte auch die unterschiedliche Membranlokalisation von Lck und K-Ras4B in Lipid Rafts und in Rafts-freien Gebieten eine Rolle spielen [140, 154, 155].

1.1.4 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der cPLA₂

Aufgrund der zentralen Rolle der cPLA₂ in der AA-Säure-Kaskade und der daraus resultierenden Vielfalt an Mediatoren, ist die cPLA₂ für eine Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wichtig.

1.1.4.1 Produkte der Phospholipid-Hydrolyse und deren Metabolite

Die Spaltung von Phospholipiden (PL) resultiert in der Freisetzung von AA, welche in der Folge durch Cyclooxygenasen (COX), Lipoxygenasen (LO) oder Cytochrom P450 (Cyp)-Enzyme oxidiert wird (Abb. 1.6) [156, 157]. Weiterhin werden Lysophospholipide sowie deren Metabolite erzeugt, deren bekanntestes Beispiel PAF ist. PAF bewirkt neben der zuerst identifizierten Thrombozytenaktivierung eine Erhöhung des Lungenwiderstands und eine Bronchokonstriktion, sowie eine Verschlechterung von Hauterkrankungen und gilt

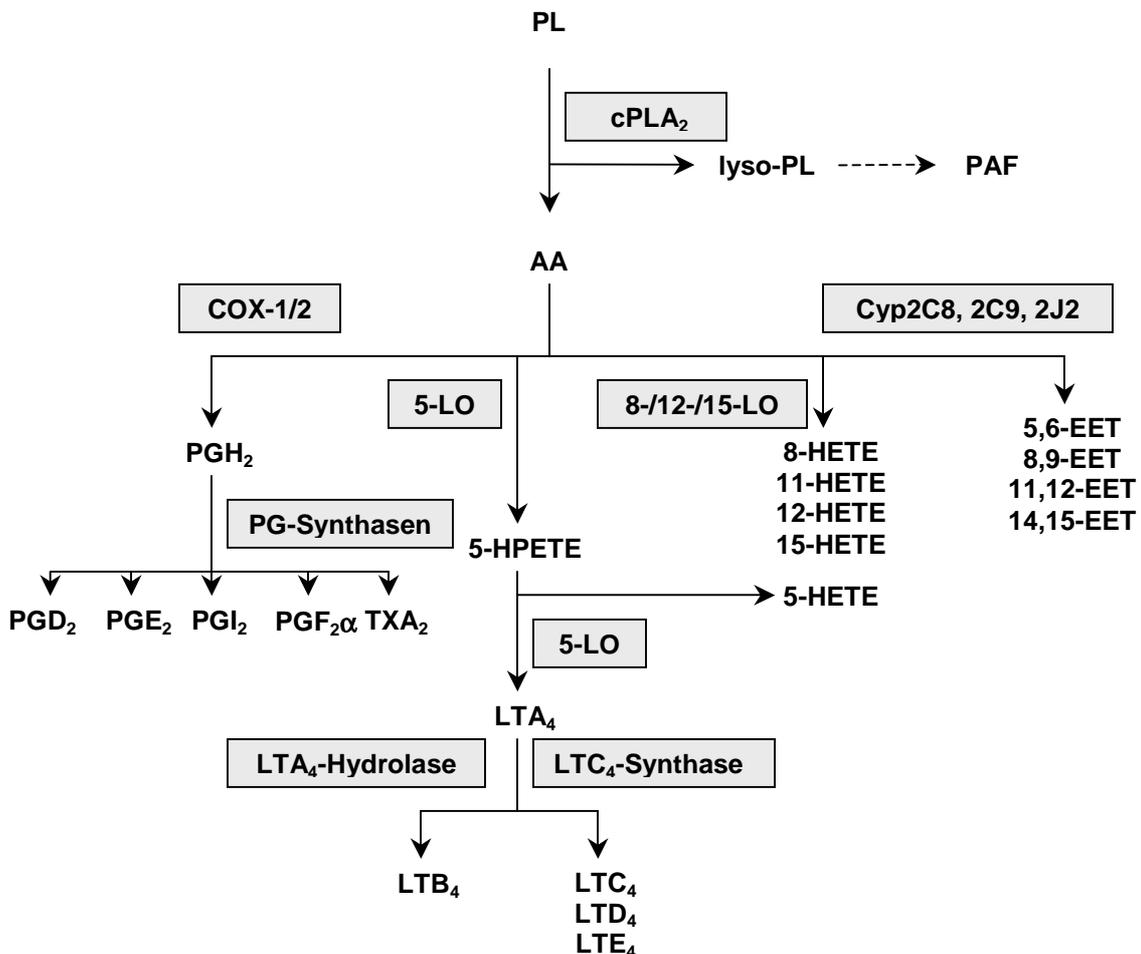


Abb. 1.6 Eikosanoid- und PAF-Produktion nach Phospholipidhydrolyse

allgemein als entzündungsfördernder Faktor [158].

Durch COX wird die Metabolisierung der AA zu den vasodilatierenden Prostaglandinen PGE₂, PGD₂ und PGI₂ und den vasokonstriktorisches Thromboxan (TX)A₂ und PGF_{2α} katalysiert. Das nozizeptiv aktive PGE₂ trägt dabei am stärksten zum Entzündungsgeschehen bei. TXA₂ bewirkt die Verengung der Gefäße, verstärkt die Thrombozytenaggregation und antagonisiert damit die PGI₂-Wirkung [159, 160].

Zu den 5-LO-Produkten zählen LTB₄ und die Cys-LTs LTC₄, LTD₄ und LTE₄, die vorrangig in myeloiden Zellen generiert werden und deren Freisetzung mit Asthma, entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts (Morbus Crohn), der Haut (Psoriasis) und der Niere (Glomerulonephritis) assoziiert ist [160]. Die durch 12-LO vorrangig in Thrombozyten gebildete 12-Hydro(pero)xyeikosatetraensäure (12-H(P)ETE) wiederum ist in der Pathogenese der Atherosklerose, des Bluthochdrucks und des Diabetes von Bedeutung [161].

Neben COX und LO verwenden auch die Cyp-Enzyme Cyp2C8, Cyp2C9 und Cyp2J2 die AA als Substrat. Vor allem im Endothelium und in Kardiomyozyten katalysieren diese die Bildung von Epoxyeikosatriensäuren (EETs), welche vasodilatorisches, aggregationshemmendes und antientzündliches Potential aufweisen [157].

Die spezifische Hydrolyse von AA-haltigen Phospholipiden bildet somit den Ausgangspunkt für die Generation von strukturell und funktionell vielfältigen Metaboliten.

1.1.4.2 Physiologische Rolle der cPLA₂

Da neben der cPLA₂ auch andere PLA₂, insbesondere sPLA₂, zur AA-Freisetzung beitragen, wird durch eine Hemmung der cPLA₂ die Bildung der beschriebenen Mediatoren nicht vollständig blockiert. Allerdings wird der cPLA₂ die zentrale Rolle in der AA-Freisetzung für die Eikosanoid-Bildung zugeschrieben. Dies ist auf die kurzfristige Bereitstellung größerer Mengen AA durch die cPLA₂ selbst, aber auch z.T. auf die Aktivierung der sPLA₂, wie dies in Makrophagen gezeigt wurde, zurückzuführen [92, 93].

In cPLA₂-knockout-Mäusen ist somit die PG- und LT-Synthese in Makrophagen stark eingeschränkt, wenn auch die PAF-Produktion in diesen Zellen kaum unterdrückt wird. In Knochenmark-Mast-Zellen und Neutrophilen von cPLA₂-knockout-Mäusen hingegen konnte neben der Eikosanoid- auch die PAF-Bildung blockiert werden. In einem Patienten mit cPLA_{2α}-Defizienz waren die TXB₂- (Abbauprodukt des TXA₂) und 12-HETE-Werte um 95,9 und 97,8 % und die Urinspiegel an PGI₂-, PGD₂- und PGE₂-Metaboliten um 30

bis 40% und an LTB₄ und LTE₄ um über 90% gesenkt. Während also hier AA-Quellen für die Prostaglandin-Synthese zumindest in einigen Geweben zur Verfügung stehen, geht die Eikosanoid-Bildung aus Thrombozyten und Leukozyten fast ausschließlich auf die cPLA₂ zurück [162]. Wahrscheinlich auf Grund dieser zellspezifischen alternativen AA-Freisetzung durch andere PLA₂ zeigen auch cPLA₂-knockout-Mäuse eine relativ normale Physiologie. Altersabhängig tritt ein Urin-Konzentrationsdefekt auf, der mit einer gesteigerten Aquaporin-1-Expression einhergeht und in einer übermäßigen Urinausscheidung bei verminderter Wasseraufnahme resultiert. Andererseits wurde eine Rolle der cPLA₂ in der Angiotensin II-vermittelten Bildung von 5,6-EETs nachgewiesen, welche den NaHCO₃-Cotransporters hemmen. Die bei cPLA₂-knockout-Mäusen gesteigerte Aktivität dieses Transporters scheint allerdings gegenüber der Aquaporin-1-Expression nicht ins Gewicht zu fallen [16, 163, 164].

Darüber hinaus ist bei cPLA₂-knockout-Mäusen die Fertilität eingeschränkt, wenn auch nicht blockiert, wie z.B. nach COX-2-Knockout, und es treten Geburtsschwierigkeiten, kleinere Würfe und eine größere Sterblichkeit der Jungtiere auf. Die eingeschränkte Fertilität könnte auf den Mangel an antiapoptotisch wirkender AA in Granulosa-Zellen des Eierstocks zurückzuführen sein [165]. Weiterhin entwickeln sich spontane Geschwüre im Dünndarmbereich. Gastrointestinale Beschwerden nach cPLA₂-Hemmung könnten auch ein vorherrschendes Symptom beim Menschen sein. Der cPLA₂-defiziente Patient leidet seit seiner Kindheit an abdominalen Schmerzen, gastrointestinalen Blutungen und damit verbunden an Anämie und Eisenmangel. In der 4. Lebensdekade traten mehrfach Dünndarm-Perforationen und kleinere Geschwüre im Bereich Ileum und Jejunum auf. Ähnlich wie bei den Knockout-Mäusen kam es bei ihm jedoch nicht zu Ulzerationen der Magenschleimhaut, wie sie nach Gabe von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) auftreten. Eine unterschiedliche Lokalisation bzw. Bedeutung der cPLA₂ in der AA-Freisetzung, aber auch die zusätzliche Hemmung der ulzerativen Leukotriene im Magenbereich könnten dieses Phänomen verursachen. Ob ein Nierenkarzinom des Patienten mit der cPLA₂-Defizienz im Zusammenhang steht, ist nicht geklärt [16, 162, 163].

1.1.4.3 Pathophysiologische Rolle der cPLA₂

Mit Hilfe von Knockout-Mäusen, Inhibitoren und antisense-Oligonukleotiden wurde die Rolle der cPLA₂ in Entzündungen, Infektionen, Karzinogenese, neurodegenerativen Erkrankungen, Diabetes und Osteoporose eruiert.

1.1.4.3.1 Entzündungen

In entzündlichen Erkrankungen, die auf das Zusammenspiel von PG, LT und PAF zurückzuführen sind, wie z.B. Arthritis, atopische Dermatitis, Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS) oder im Peritonitis-Modell, konnte die jeweilige Symptomatik durch eine Herunterregulierung oder Inhibition der cPLA₂ stark vermindert werden [163, 166-169]. Auch die Symptome des allergischen Asthmas und atherosklerotische Veränderungen nach fettreicher Diät wurden durch eine Hemmung der cPLA₂ und durch die daraus resultierende verminderte LT- bzw. PG-Produktion reduziert [119, 170, 171]. Das inflammatorische Potential der cPLA₂ ist dabei nicht allein auf die Eikosanoid- und PAF-Freisetzung, sondern zelltypspezifisch auch auf die Bildung von TNF α , IL-1, IL-6 oder ICAM-1 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1) zurückzuführen [18, 166, 169, 172]. Und in der Pathogenese des Asthma führt die Inhibition der cPLA₂, im Gegensatz zur 5-LO-Hemmung, darüber hinaus zu einer Normalisierung des Genexpressionsmusters in Monozyten asthmatischer Patienten [173].

1.1.4.3.2 Infektionen

Auch bei der Bekämpfung von Infektionen kommt der cPLA₂ eine zentrale Rolle zu. Die cPLA₂-Expression ist während einer Sepsis in neutrophilen Granulozyten hochreguliert und kann auch in Monozyten-ähnlichen PLB und in HeLa durch LPS induziert werden [18, 174, 175]. Posttranslational bewirken Zymosan (ein Zellwandbestandteil von *Saccharomyces cerevisiae*), *Staphylokokkos aureus*, *Candida albicans* oder *Toxoplasma gondii* die Stimulation der cPLA₂ über eine Erhöhung des Ca²⁺-Spiegels und die Aktivierung von MAPK. Vermittelt werden diese Signaltransduktionen über den beta-Glucan-Rezeptor dectin-1, den Toll-like-Rezeptor TLR4 und MyD88 [176-178]. Prioneninfektionen steigern ebenfalls die Aktivität der cPLA₂ und die PGE₂-Freisetzung, allerdings über eine Erhöhung des Cholesterolgehaltes in den befallenen Neuronen [148].

Die Phagozytose von Mikroorganismen selbst und die Expression der entsprechenden Oberflächenmarker erfolgt unabhängig von der Phospholipid-Hydrolyse, aber das Abtöten der Keime setzt die Freisetzung von AA und zu einem geringeren Teil auch von PAF voraus [175, 179]. Außerdem ist die cPLA₂ für die Assemblierung der NADPH-Oxidase und die konsequente Bildung von reaktiven Sauerstoffderivaten (ROS) von Bedeutung. Über eine Bindung der CBL1 an eine Untereinheit der NADPH-oxidase, p47phox, und über bereitgestellte AA ermöglicht die cPLA₂ die Funktionalität dieser Oxidase [175, 180]. Eine Hemmung der cPLA₂ könnte somit zu klinischen Problemen bei Infektion führen. So war die Clearance von Escheria coli bei Lungenentzündung nach Inhibition der cPLA₂ stark eingeschränkt [179] und im Sepsis-Modell konnte trotz verminderter Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren im Gegensatz zur 5-LO-Inhibition kein Überlebensvorteil durch cPLA₂-Hemmung festgestellt werden [181].

1.1.4.3.3 Krebs

Das karzinogene Potential der cPLA₂-Aktivität ist gewebe- und zellspezifisch differenziert zu betrachten. In Tumoren der Lunge, des Ösophagus, der Gallengänge, des Pankreas und des Dünndarms sowie in akuter myeloider Leukämie und in der leukämischen monozytären Zelllinie U937 ist die cPLA₂ überexprimiert, im Magentumor und Kolonkarzinom hingegen sind normale Spiegel und im Barret-Ösophagus (Metaplasie des Speiseröhrenepithels) gar reduzierte cPLA₂-Werte zu finden [16, 17, 94, 182]. cPLA₂-knockout-Mäuse weisen, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, seltener Dünndarmpolypen und Lungentumore auf, entwickeln aber größere Karzinome im Kolon [16].

Dementsprechend wird auch den freigesetzten Mediatoren antiapoptotische oder antiproliferative Potenz zugeschrieben. In Sarkomzellen, humanen embryonalen Nieren (HEK)-Zellen und im hepatozellulären Karzinom (HCC) verhindert AA oder in der Folge gebildetes PGE₂ die Apoptose und in U937 die Nekrose der Zellen. Die Proliferation von U937 hängt allerdings primär nicht von der AA oder deren Metaboliten ab, sondern geht wahrscheinlich auf die Freisetzung von LysoPC zurück [67, 183]. Der genaue Mechanismus der Metabolite ist in diesem Zusammenhang noch unklar. Lediglich für HCC-Zellen wurde eine Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-Aktivierten-Rezeptor(PPAR) δ durch AA und eine konsequente COX-2-Überexpression gezeigt, die mit der Proliferation der Zellen im Zusammenhang steht [184-187]. Die Bildung der überlebensfördernden Metabolite wird während der Apoptose wiederum durch Caspasen-vermittelte Spaltung und Inaktivierung der cPLA₂ limitiert [182, 188].

In Kolonkarzinomzellen, neutrophilen Granulozyten und chronisch myeloiden Leukämie (CML)-Zellen hingegen induziert AA die Apoptose [189-191]. Mechanistisch könnten diesem Prozess die Erhöhung der Mitochondrienpermeabilität durch AA selbst, antiproliferative Wirkungen der AA-Metabolite oder die durch AA verursachte Ceramid-Bildung zu Grunde liegen [16, 192].

1.1.4.3.4 Neurodegenerative Erkrankungen

Im gesunden Hirngewebe ist die cPLA₂ vor allem in Purkinje-Zellen, Astrozyten der Grauen Substanz und Hippocampus-Neuronen lokalisiert und sie ist in die Neurotransmitter-Freisetzung, Membranorganisation, Prozesse des Lernens und Gedächtnisses und die Zellproliferation sowie Differenzierung involviert [193-195]. Eine Überaktivierung der cPLA₂ verstärkt neurodegenerative Erkrankungen wie die zerebrale Ischämie, Alzheimer und vaskuläre Demenzen, Multiple Sklerose, Parkinson und Epilepsie [193, 196]. AA schädigt hier die Membran-Permeabilität und Mitochondrienfunktion und führt zur Freisetzung von ROS [197]. Zusätzlich ist die cPLA₂ im Zusammenspiel mit der iPLA₂ und 5-LO an der iNOS-Transkription und damit NO-Freisetzung in Glia-Zellen beteiligt [198]. Aufgrund der hohen Dichte an ungesättigten Fettsäuren und der niedrigen Antioxidanzkonzentration ist das Hirngewebe besonders anfällig für oxidativen Stress [197, 199].

Die Hemmung der cPLA₂ vermindert somit entzündliche Reaktionen und die Freisetzung von Radikalen während einer zerebralen Ischämie oder vaskulären Demenz. Die Infarktgröße und das neurologische Defizit waren nach einer Ischämie in cPLA₂-knockout-Mäusen deutlich reduziert [193, 200]. In der Alzheimererkrankung wurden veränderte cPLA₂-Aktivitäten in Nucleus Basalis, Cortex und Hippocampus gefunden, allerdings ist noch nicht klar, ob die cPLA₂-Überexpression Ursache oder Konsequenz der neurodegenerativen Prozesse ist. Amyloid β (A β) selbst führt zur ROS-Bildung und könnte über einen Ca²⁺-Einstrom und die Aktivierung von MAPK die cPLA₂ stimulieren. Darüber hinaus werden TNF α , IL-1 β und IL-6 aus Astrozyten freigesetzt, welche die cPLA₂-Transkription verstärken [193, 200]. In Hirngeweben von Patienten mit Multipler Sklerose ist die cPLA₂ ebenfalls überexprimiert und die Unterdrückung der PG-, LT- und PAF-Produktion in cPLA₂-knockout-Mäusen konnte die Symptomatik der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, einem Modell der Multiplen Sklerose, verbessern [193, 201]. Auch gegenüber einem Parkinsonsyndrom zeigten sich cPLA₂-knockout-Mäuse resistent, während in normalen Mäusen mit Parkinsonsyndrom die basale AA-Freisetzung

erhöht ist [196, 202]. Schizophrenie-Patienten weisen gesteigerte cPLA₂-Aktivitäten in Hirn- und Blutzellen auf, die mit einem Polymorphismus im cPLA₂-Gen assoziiert sind [203]. Interessanterweise wurde für die in der Schizophrenie eingesetzten Stimmungsstabilisatoren Lithium und Carbamazepin eine Hemmung der cPLA₂-Expression nachgewiesen [204].

1.1.4.3.5 Diabetis und Osteoporose

In pankreatischen β -Zellen besetzt die cPLA₂ eine protektive Funktion dahingehend, dass durch PGE₂ die TNF α -Bildung unterdrückt sowie die Apoptose unterbunden wird. In cPLA₂-knockout-Mäusen traten somit auch in nicht fettleibigen Mäusen vermehrt Insulinitis und Typ-I-Diabetis auf und auch die Typ-II-Diabetis kann durch Hemmung der cPLA₂ und damit verbundenen β -Zell-Untergang induziert werden [16, 205, 206]. Ebenfalls über PGE₂ werden die Effekte der cPLA₂ auf die Knochenresorption vermittelt. Der Knochenabbau geht auf eine PGE₂-induzierte Hemmung der Osteoblasten-Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten zurück [207, 208].

1.1.5 Inhibitoren der cPLA₂

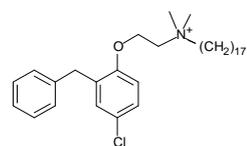
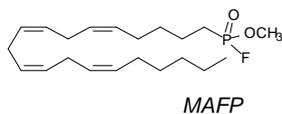
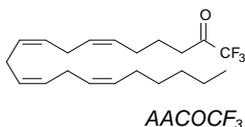
Da durch die Inhibition der cPLA₂ die Bildung von PG, LT und PAF gehemmt, aber je nach Zelltyp auch nicht vollständig blockiert wird, verspricht die Entwicklung von cPLA₂-Antagonisten potentielle Arzneistoffe mit einem von COX- oder 5-LO-Inhibitoren abweichenden Aktionsprofil. Insbesondere bei Entzündungen der Gelenke oder Haut sowie bei Asthma, aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen könnte der Einsatz von cPLA₂-Inhibitoren die bisherige Arzneistoffpalette bereichern. Zu den ersten Inhibitoren zählen die in den 90ern entwickelten relativ unspezifischen AA-Analoga AACOCF₃ und Methyl-arachidonyl-fluoro-phosphonat (MAFP), die kovalent an Ser228 im aktiven Zentrum binden [193, 209]. Cholin-Derivate als PC-Analoga wirken an der Lipid-Wasser-Oberfläche [210].

2000 – 2001 wurden auf der Suche nach spezifischeren Inhibitoren Pyrrolidon-Derivate entwickelt, die ebenfalls mit Ser228 interagieren, allerdings sPLA₂, iPLA₂, 5-LO und COX nicht inhibieren [211-214]. Als potentester Inhibitor dieser Substanzklasse reduziert Pyrrophenon die cPLA₂-Aktivität mit IC₅₀-Werten von 4,2 nM im zellfreien System und 0,18 μ M im Vollblut-Assay [212].

cPLA₂-Inhibitoren 1. Generation

AA-Derivate

Cholin-Derivate



cPLA₂-Inhibitoren 2. Generation

Pyrrolidininhhibitoren

Indolinhibitoren

**Indoylpropanon-
inhibitoren**

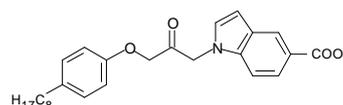
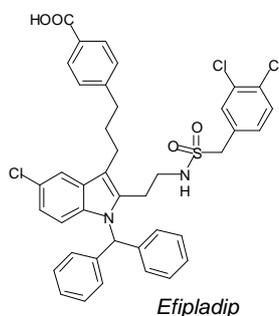
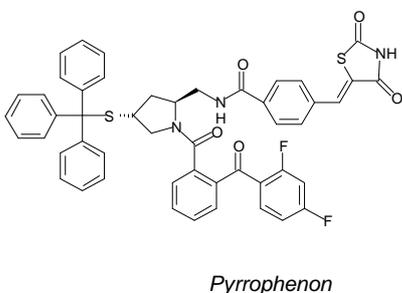


Abb. 1.7 cPLA₂-Inhibitoren

In den letzten 2 Jahren wurden die Indol-Derivate Ecopladib, Efipladib und WAY-196025 sowie ein Efipladib-Derivat mit verbesserter Bioverfügbarkeit beschrieben. Die eingeführten Benzoylsäure-, Sulfonamid- und Benzhydryl-Gruppen führten zu IC₅₀-Werten von 0,15, 0,04, 0,01 und 0,065 µM. Trotz ihrer Größe von > 700 kD, schlechter Wasserlöslichkeit und damit relativ schlechter Bioverfügbarkeit von maximal 12 bis 13% waren sie in Arthritis- und Asthma-Tiermodellen nach peroraler Applikation effektiv. Für Ecopladib und Efipladib wurden Phase-I-Studien initiiert [215-218].

Von Lehr et. al hingegen wurde der Indol-Grundbaustein mit Propanon kombiniert und somit Substanzen mit IC₅₀-Werten unter 1 µM und einer relativ guten Wasserlöslichkeit geschaffen [219, 220].

1.2 Hyperforin als Bestandteil des Johanniskrauts

1.2.1 Johanniskraut

Als "Arnika der Nerven" bezeichnete bereits Paracelsus Anfang des 16. Jahrhunderts das Tüpfel-Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) und beschrieb damit erstmalig den Einsatz dieser Pflanze bei psychiatrischen Beschwerden. Heute gehören Johanniskraut-Präparate zu den populärsten pflanzlichen Arzneimitteln und stellen in der Therapie depressiver Störungen eine bedeutende Alternative zu den synthetischen Antidepressiva dar [221, 222]. Die Anwendung von Johanniskrautzubereitungen geht allerdings über den Gebrauch in der Psychiatrie hinaus und erstreckt sich in der traditionellen Medizin auch auf die Behandlung von respiratorischen Erkrankungen, Beschwerden des Magen-Darm-Trakts, Haut- und Schleimhautläsionen, oberflächlichen Verletzungen und auf die Wundpflege. In Osteuropa sind Johanniskrautpräparate als topisches Antibiotikum auf dem Markt und in der präklinischen Krebsforschung wurde auch ein anti-tumorales Potential der Droge festgestellt [222, 223]. Als Zubereitungsformen stehen in Europa der mit Hilfe von Pflanzenölen hergestellte Auszug aus frischen Blüten (Johanniskrautöl), meist wässrig-ethanolische Extrakte der Pflanze oder Tees zur Verfügung. Die genaue Zusammensetzung der jeweiligen Präparate schwankt dabei je nach Erntezeit, verwendeten Pflanzenteilen und Extraktionsverfahren sehr stark [221, 224, 225]. Zu den Hauptinhaltsstoffen des getrockneten Krauts zählen Naphthodianthron- und Phloroglucinderivate und Flavonoide sowie Procyanide, Catechingerbstoffe und Xanthone. Die Naphthodianthrone Hypericin und Pseudohypericin sind in Konzentrationen von 0,05 bis 0,15% vorhanden. Das rot fluoreszierende Hypericin verleiht dem nach dem Anschneiden der Pflanze austretenden roten Saft und dem Johanniskrautöl die charakteristische Farbe und ist an der antidepressiven und antitumoralen Wirkung beteiligt. Allerdings muss auch die photosensibilisierende Wirkung dem Hypericin zugeschrieben werden. Zu den Phloroglucinolen gehören Hyperforin und Adhyperforin, die je nach Erntezeitpunkt zu 2 bis 4% in der getrockneten Pflanze enthalten sind. In Blüten und Früchten werden die höchsten Konzentrationen gefunden, wobei der Hyperforin-Gehalt während der Reifung der Blüten von 2,5% in den Knospen bis auf 8,5% in den unreifen Früchten ansteigt. Adhyperforin akkumuliert ebenfalls mit der Entwicklung der Blüten und ist je nach Erntezeitpunkt in Konzentrationen von 0,2 bis 1,9% zu finden. Flavonoide liegen zu 2 bis

5% vor und bestehen hauptsächlich aus Quercetinglykosiden (Hyperosid, Rutosid, Quercitrin, Isoquercitrin) sowie aus verschiedenen Flavonoidaglyka und Biflavonoiden (z.B. Biapigenin). Flavonoide tragen zur antidepressiven Wirkung bei und fungieren als Antioxidantien, aber Quercetin zeigte in Ratten auch kanzerogenes Potential [221, 224, 225].

1.2.2 Hyperforin

Hyperforin wurde erstmalig 1975 isoliert und ist der am besten charakterisierte Inhaltsstoff von Johanniskraut [226]. Es stellt ein mehrfach isoprenyliertes Phloroglucinol mit tautomerisierender vinyloger Carbonsäure dar (Abbildung 1.8). Zu finden ist es in verschiedenen Hypericum-Species, aber nur in *Hypericum perforatum* in maßgeblichen Mengen [222, 226]. Auf Grund seiner Lipophilie und Empfindlichkeit gegenüber Licht und Oxidation hängt der endgültige Gehalt in Präparaten neben der Erntezeit stark von der Aufarbeitungs- und Extraktionsmethode ab. Es gibt prominente

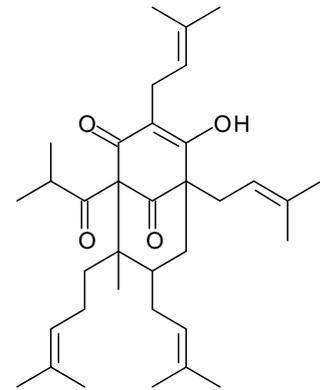


Abb. 1.8 Hyperforin

Schwankungen zwischen verschiedenen Extrakten, die von hyperforinfreien Zubereitungen bis zu Präparaten mit fast 6% Hyperforin reichen. Auch zwischen den Chargen ist eine erhebliche Varianz zu finden [225, 227, 228]. Aus traditionellen Gründen sind Johanniskrautpräparate allerdings meist auf 0,3% Hypericin standardisiert, dessen Monoaminoxidase (MAO)-Hemmung ursprünglich als das wirksame Prinzip beschrieben wurde, ein Wirkmechanismus, der in Folgestudien nicht bestätigt werden konnte. Obwohl Flavonoide und Xanthone tatsächlich MAO inhibieren, liegt deren Konzentration weit unterhalb des relevanten Bereichs [224, 227, 229]. Wahrscheinlicher ist, dass eine Vielfalt von Mechanismen der pharmakologischen Wirkung von Johanniskraut zu Grunde liegt, die zum Teil auf einzelne Bestandteile, zum Teil aber auch auf die Kombination der verschiedenen Substanzen zurückzuführen ist [224].

Als eine der potentesten Komponenten wird Hyperforin angesehen, welches antidepressive, anti-entzündliche, anti-bakterielle und anti-tumorale Eigenschaften aufweist, sich aber auch für die pharmakokinetischen Interaktionen verantwortlich zeichnet [222, 226].

1.2.3 Wirkung bei Depressionen und anderen neurologischen Erkrankungen

Die Wirksamkeit von Johanniskraut bei leichten bis moderaten Depressionen wurde in klinischen Studien gegenüber Placebo und im Vergleich zu verschiedenen Antidepressiva mehrfach belegt. Allerdings weisen die Studiendesigns sehr unterschiedliche Qualitäten auf. Die Klassifikation der Depression ist zum Teil sehr vage, Patienten wurden in einigen Untersuchungen auch von Allgemeinärzten, Internisten oder Gynäkologen in die Studien aufgenommen und die Studiendauer war meist zu kurz. Darüber hinaus wurde in Vergleichsstudien das synthetische Antidepressivum vorwiegend in der niedrigsten empfohlenen Dosis appliziert und auf eine Hochtitation, wie in der Klinik üblich, verzichtet. Dennoch ist insbesondere im Hinblick auf die Placebo-kontrollierten Studien von einer Wirksamkeit auszugehen. Inwieweit diese aber tatsächlich, wie dargestellt, Äquivalenz zu synthetischen Antidepressiva aufweist, ist fraglich [221, 230, 231]. Zur Anwendung von Johanniskrautpräparaten bei moderaten bis schweren Depressionen mit Dosierungen von bis zu 1800 mg/Tag gibt es hinsichtlich der Wirksamkeit widersprüchliche Daten, die eine Indikation bei schwereren Erkrankungen nicht rechtfertigen [221, 231, 232].

Bei der Untersuchung der antidepressiven Wirkung von Johanniskrautpräparaten in Tiermodellen (Forced-Swim-Test und Learned-Helplessness-Test) konnte eine gute Korrelation der Effektstärke mit der Hyperforin-Konzentration festgestellt werden [233, 234]. Allerdings verfügen auch hyperforinfreie Extrakte über antidepressives Potential, das mit dem hyperforinhaltigen Zubereitungen vergleichbar ist [235]. Das wirksame Prinzip dieser Extrakte ist noch nicht vollständig geklärt. Für Hyperforin wurden vielfältige Wirkungsansätze auf zellulärer Ebene beschrieben. Wie bereits angedeutet, konnte die ursprünglich angenommene MAO-Hemmung durch Johanniskraut nicht bestätigt werden und wurde auch für Hyperforin nicht gefunden [229, 234, 236]. Dahingegen wurden Johanniskraut-Extrakt und Hyperforin als potente und unselektive Wiederaufnahmememmer von Dopamin, Noradrenalin, Serotonin (5-HT), γ -Aminobuttersäure (GABA) und L-Glutamat charakterisiert. Diese Effekte wurden in synaptosomalen Präparationen, Neuronen und Astrozyten, aber auch in Peritonealzellen und Thrombozyten beobachtet [229, 233, 234, 236-239]. Hyperforin hat dabei einen maßgeblichen Anteil an der Gesamtwirkung, ohne jedoch die volle Effektstärke der Extrakte reproduzieren zu können [233, 234]. Die Erhöhung der

Neurotransmitterkonzentrationen im synaptischen Spalt wird noch durch die Hyperforin-induzierte aktive Freisetzung von Aspartat, Glutamat und GABA verstärkt [240, 241].

Die breite und unselektive Wirkung von Hyperforin weist auf übergeordnete Mechanismen hin. Tatsächlich wurde eine Induktion des Na^+ -Einstroms durch Hyperforin beobachtet, wodurch das für die Neurotransmittertransporter essentielle Na^+ -Gefälle aufgehoben wird [237, 238]. Als verantwortliche Kanäle wurden in PC12-Zellen sowie auch in Thrombozyten nicht-Selektive Kation-Kanäle (NSCCs) identifiziert, die Hyperforin in Konzentrationen um $1 \mu\text{M}$ öffnen kann, während andere Transportwege wie der Na^+ - Ca^{2+} -Antiport, der Na^+ - H^+ -Austauscher oder SOCCs (Speicher-abhängiger Ca^{2+} -Kanäle) nicht involviert sind und spannungsabhängige Na^+ -Kanäle in Hippocampus-Neuronen sogar leicht gehemmt werden [242, 243]. Zusätzlich zu einem Na^+ -Einstrom resultiert die Öffnung der Kanäle auch in einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels [240, 242, 244]. Spannungs- und ligandenabhängige Ca^{2+} -Kanäle in Hippocampus-Neuronen und Purkinje-Fasern wiederum werden durch Hyperforin stark gehemmt [243, 245, 246]. Auch bezüglich der Neurotransmitter zeigt Hyperforin ambivalente Eigenschaften. Der Erhöhung der synaptosomalen Neurotransmitterkonzentration steht eine Hemmung von NMDA-, AMPA- und GABA- sowie 5-HT-Rezeptoren in Hippocampusneuronen und Muskelzellen des Ileums gegenüber [233, 246]. Zudem interferiert Hyperforin mit β -Adrenozeptoren, was allerdings nicht auf einer Internalisierung der Rezeptoren, sondern einer Behinderung in ihrer lateralen Mobilität beruht [229, 236, 247, 248]. Des Weiteren konnte eine Erhöhung der 5-HT₂-Rezeptordichte durch Johanniskrautextrakt festgestellt werden, die allerdings nicht mit dem Hyperforin-Gehalt korreliert werden konnte [229, 236].

Die Beeinflussung der Rezeptormobilität könnte auf Veränderungen der Membranfluidität durch Hyperforin zurückgeführt werden, wie sie in *in-vitro* und *in-vivo* gezeigt wurde [249, 250]. Störungen der Membranintegrität durch Hyperforin wurden auch im Zusammenhang mit der Minderung des pH-Gradienten an synaptosomalen Vesikeln und der Absenkung des zytoplasmatischen pH-Werts beobachtet [240, 251, 252]. Daraus resultiert eine erhöhte Freisetzung von 5-HT aus Synaptosomen und damit eine höhere zytoplasmatische Konzentration, die der Wiederaufnahme von 5-HT zusätzlich entgegenwirken dürfte [252]. Ein weiterer Ansatz in der Erklärung der zellulären Wirkung von Hyperforin bezieht sich auf das Zytokin IL-6. Durch IL-6-knockout-Mäuse konnte gezeigt werden, dass IL-6 für die Hyperforin-induzierten Effekte im Forced-Swimming Test und in der Neurotransmitterfreisetzung essentiell ist [253]. Mit der ebenfalls beschriebenen

Hemmung der IL-6-Freisetzung durch Johanniskrautextrakte und Hyperforin lässt sich diese Beobachtung allerdings noch nicht in Zusammenhang bringen [254, 255].

Neben einem Einsatz bei depressiven Verstimmungen wird die Applikation von Hyperforin auch bei weiteren neurologischen Erkrankungen oder Zuständen diskutiert. Zum einen könnte es die Behandlung von Alkoholismus erleichtern, da hier Ähnlichkeiten mit der Pathophysiologie von Depressionen bestehen. Tatsächlich war der Alkoholkonsum von Mäusen nach Behandlung mit Hyperforin reduziert [256]. Zum anderen zeigte Hyperforin Anxiolyse und eine Erhöhung der kognitiven Leistungsfähigkeit im Tiermodell [233, 257]. Inwieweit letzteres allerdings in der Behandlung von Demenzen genutzt werden könnte, bleibt fraglich, da Hyperforin auch die Spaltung des A β -Vorläufer-Proteins (APP) und somit die Akkumulation von A β induziert [251].

1.2.4 Einsatz bei Entzündungen und Infektionen

Die Anwendung von Johanniskraut bei Entzündungen geht aus der traditionellen Medizin hervor und wurde in verschiedenen Tiermodellen belegt. So bewirkten Johanniskrautextrakte bei Carageen-induzierten Ödemen, Pleuritis- und Pankreatitis-Modellen sowie im Multiplen Organversagen eine Linderung der Symptome [258-265]. Darüber hinaus zeigten sich die Extrakte auch in verschiedenen Schmerzmodellen effektiv [259, 261]. Hyperforin scheint auch in diesem Wirkspektrum eine der hauptverantwortlichen Komponenten zu sein. So hemmt es den G Protein-gekoppelten Einstrom von Ca²⁺ und die Freisetzung von ROS aus polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) [266, 267]. Für den Extrakt konnte weiterhin eine reduzierte NO-Freisetzung auf Grund einer verminderten iNOS-Expression gefunden werden, allerdings ist nicht klar, inwieweit Hyperforin an diesem Wirkprinzip beteiligt ist [260, 265, 268]. Neben den Radikalen wird die Sezernierung der Leukozytenelastase (LE) durch Hyperforin beeinträchtigt [266, 269]. Da LE die Aktivität der Matrix-Metalloprotease-9 triggert, könnte die verminderte LE-Ausschüttung mit der Hemmung der Migration von PMNL und T-Zellen und damit reduzierten Infiltration in entzündetes Gewebe im Zusammenhang stehen [269, 270]. Die Viabilität von PMNL und T-Zellen wird dabei durch Hyperforin nicht beeinträchtigt, allerdings wird die Proliferation von T-Zellen unterdrückt [269, 271]. Die Enzyme der AA-Kaskade werden ebenfalls durch Hyperforin moduliert. Hyperforin agiert im unteren mikromolaren Konzentrationsbereich als dualer Inhibitor der 5-LO und

COX-1, schränkt aber nicht die Aktivität der COX-2 und 12-LO ein und hemmt nur leicht die 15-LO [272].

Interessanterweise besitzt Hyperforin zusätzlich zu den immunsuppressiven Eigenschaften auch entzündungsförderndes Potential. In intestinalen Epithelzellen erhöht es die Expression des Neutrophilen-Aktivators IL-8 und von ICAM-1, welches für die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen verantwortlich ist. Beide Effekte sind abhängig von einer Aktivierung der ERK-1/2 und stehen möglicherweise mit den gastrointestinalen Nebenwirkungen von Hyperforin in Beziehung [273].

Neben den antientzündlichen kommt auch den antiinfektiven Eigenschaften von Johanniskraut bzw. Hyperforin Bedeutung zu, wobei Hyperforin für die antimikrobiellen Effekte von Johanniskraut hauptverantwortlich ist und vor allem gegen grampositive ($IC_{50} < 1 \mu M$), etwas schwächer aber auch gegen gramnegative Bakterien sowie gegen Plasmodium falciparum antibakteriell bzw. antiparasitär wirkt [274, 275].

1.2.5 Antitumorales Potential von Hyperforin

Der beobachtete proliferationshemmende Effekt von Hyperforin auf T-Lymphozyten legte die Vermutung nahe, dass Hyperforin auch in anderen Zelllinien antiproliferative oder apoptotische Eigenschaften aufweisen könnte. Dieser Verdacht wurde in Mammakarzinom-, Melanom-, Leukämie-, Plattenepithelkarzinom-, Fibrosarkom-, Adenokarzinom-, Neuroblastom- und Glioblastom-Zelllinien sowie in leukämischen B-Zellen von Patienten mit chronisch-lymphatischer B-Zellleukämie (B-CLL) bestätigt [276-279]. In der Mehrzahl der Zelllinien sprechen die Ergebnisse für die Stimulation des intrinsischen Wegs der Apoptose, da die Freisetzung von Cytochrom C und die vorrangige Aktivierung der Caspasen-9 und -3 detektiert wurden, wobei ein alternativer Ablauf der Apoptose, wie in leukämischen K562 Zellen, nicht ausgeschlossen ist [276, 277].

Das primäre Target von Hyperforin konnte noch nicht identifiziert werden. Als zeitiges Ereignis in der induzierten Apoptose wurden die Senkung des Membranpotentials von Mitochondrien beobachtet, was die Cytochrom C-Freisetzung ermöglicht [276]. Darüber hinaus wird die Herunterregulierung von iNOS als ursächlich diskutiert, da eine NO-vermittelte Hemmung der Caspase-3 dadurch aufgehoben werden könnte [279]. Weiterhin konnte eine Hemmung der Histon-Deacetylasen SIRT1 und SIRT2 nachgewiesen werden, die beide in proliferative Vorgänge involviert sind. Allerdings lagen die zur Blockade der

Histon-Deacetylasen notwendigen Hyperforin-IC₅₀-Werte 10- bis 20-fach über den proliferationshemmenden Konzentrationen [280].

Interessanterweise zeigte Hyperforin in normal differenzierten Pankreas-β-Zellen antiapoptotisches Potential und verhinderte durch eine Verminderung der iNOS-Expression das Absterben dieser Zellen nach Stimulation mit IL-1β [281].

1.2.6 Nebenwirkungen und pharmakokinetische Interaktionen

Der breite Einsatz von Johanniskrautpräparaten in der antidepressiven Therapie und die intensive Erforschung weiterer Applikationsmöglichkeiten sind nicht zuletzt auf die gute Verträglichkeit der Extrakte zurückzuführen. In Studien wurden meist leichte Nebenwirkungen wie gastrointestinale Syndrome, Übelkeit, Schwindel und Müdigkeit verzeichnet. Auch die bekannte photosensibilisierende Wirkung tritt nur bei hohen Hypericin-Konzentrationen und somit in der normalen antidepressiven Therapie nur selten auf [221, 225, 231].

Ein Problem stellen allerdings die Cytochrom P450 und Efflux-Protein-vermittelten pharmakokinetischen Interaktionen dar. Erste Fallberichte zu Wechselwirkungen mit Theophyllin, Cyclosporin, Warfarin und Kontrazeptiva erschienen 1998 – 2000 [282, 283]. In folgenden Studien wurde insbesondere ein Einfluss von Hyperforin auf Cyp3A4-verstoffwechselte Arzneistoffe beschrieben [284, 285].

Cyp3A4, welches 70% aller Xenobiotika metabolisiert, stellt das wichtigste Phase-I-Enzym in der Arzneistoff-Biotransformation dar. 30% aller hepatischen und 70% aller intestinalen Cytochrom-P450-Enzyme gehören zu dieser Familie [286]. Hyperforinhaltige Johanniskrautextrakte und Hyperforin erhöhen in der Langzeitgabe die Expression dieses Metabolisierungsenzyms in der Leber und in intestinalem Gewebe, was vor allem zur Beeinträchtigung der Bioverfügbarkeit führt [287-290]. Diese Induktion scheint allein auf Hyperforin zurückzuführen zu sein [291-294], welches durch direkte Bindung an den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) dessen Translokation an die entsprechenden Response-Elemente triggert [295]. Darüber hinaus wird die Expression von Cyp2C9 und Cyp2E1 erhöht, während Cyp1A2 und Cyp2D6 nicht induziert werden [288-290]. Die Induktion von Cyp2C9 bestätigt somit die beobachteten Wechselwirkungen mit Warfarin [296], während Cyp2E1 mit der Bildung von ROS im Zusammenhang stehen könnte [289].

Die vermutete Interaktion mit Theophyllin geht auf einen einzelnen Fallbericht einer Raucherin zurück, die neben Johanniskraut mit 11 weiteren Medikamenten therapiert

wurde [297]. Obwohl in ihrem Fall eine deutliche Korrelation der Wechselwirkung mit der Johanniskraut-Einnahme hergestellt wurde, konnte in weiteren Studien eine Induktion des theophyllinmetabolisierenden Enzyms Cyp1A2 nicht gezeigt werden, was eine direkte Interaktion mit Cyp1A2-verstoffwechselten Arzneistoffen unwahrscheinlich erscheinen lässt [288-290].

Neben der Induktion der Cyp-Enzyme führt die Langzeit-Gabe von Johanniskraut-Präparaten auch zu einer verstärkten Expression von p-Glykoprotein (p-GP) [287, 298-301], welches ebenfalls PXR-vermittelt transkribiert wird [286]. Daraus resultierte eine um 18 – 25% verminderte Digoxin-AUC bei gleichzeitiger Applikation [287, 298]. Die Induktion des Efflux-Proteins ist erneut hauptsächlich auf Hyperforin zurückzuführen [301, 302], wobei hier auch ein Einfluss von Hypericin nicht ausgeschlossen ist [299].

Sowohl verschiedene Cyp-Enzyme, als auch p-GP werden nach kurzzeitiger initialer Gabe von Johanniskrautextrakten, Hyperforin und weiteren Komponenten (Hypericin, Flavonoide) gehemmt, diese Effekte verlieren jedoch in der Langzeitgabe ihre Relevanz [290, 303-308].

Die spezifische Korrelation der Wechselwirkungen von Johanniskraut mit der Hyperforin-Konzentration legt zumindest in der antidepressiven Therapie eine Anwendung von hyperforinfreien Präparaten nahe, denen eine antidepressive Wirkung und ein vermindertes Interaktionspotential nachgewiesen wurde [293, 309].

1.3 Ziel der Arbeit

Basierend auf den Ergebnissen der Doktorarbeiten von Dr. Dana Albert und Dr. Christian Feisst zur Modulation von Entzündungskaskaden durch Hyperforin sollte in dieser Arbeit eine mögliche Interaktion des Acylphloroglucinols mit der cPLA₂ eruiert werden. Die in diesen Arbeiten untersuchte Inhibition der G Protein-gekoppelten Freisetzung von Ca²⁺, reaktiven Sauerstoffradikalen und Leukozytenelastase und Hemmung der 5-LO- und COX-1-Aktivitäten sowie die aus der Literatur bekannte Unterdrückung der T-Lymphozytenproliferation wiesen auf ein breites antiinflammatorisches Wirkspektrum Hyperforins hin [266, 271, 272, 310]. Insbesondere auf Grund der Inhibition der 5-LO in polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) mit IC₅₀-Werten von 1 bis 2 µM [272] wurde eine Modulation der strukturell ähnlichen cPLA₂ vermutet. Der Hemmung der 5-LO-Aktivität liegt die Assoziation Hyperforins an die PC-Bindestelle der C2-ähnliche Domäne des Enzyms zugrunde [310], daher lag die Vermutung der Beeinträchtigung anderer C2-Domänen-Enzyme nahe. Darüber hinaus weist die 5-LO Ähnlichkeiten in der Regulation auf, in dem sie analog zur cPLA₂ durch Ca²⁺ und MAPK aktiviert werden kann [311]. Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Beeinflussung der cPLA₂ ergab sich aus der anfänglichen Untersuchung der Hyperforineffekte auf die 12-LO in Thrombozyten (Dr. Christian Feisst), die eine verstärkte 12-H(P)ETE-Produktion in Abwesenheit von AA ergab.

In dieser Arbeit sollte somit die Wirkung des Hyperforins auf die cPLA₂ in PMNL und Thrombozyten und der zu Grunde liegende Mechanismus evaluiert werden. Mögliche Interaktionen mit der Signalkaskade sowie direkte Wechselwirkungen mit dem Enzym aber auch Einflüsse Hyperforins auf Lipid-Enzyminteraktionen waren dabei von Interesse.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Hyperforin, O-Methylhyperforin und pVL1393 cPLA₂-Plasmid wurden von der Schwabe AG (Karlsruhe, Deutschland), Luisella Verotta and Dr. Wonhwa Cho zur Verfügung gestellt. Bromoenollacton (BEL), Calcium Ionophor A23187, Ceramide-1-phosphat (aus Rinderhirn), Cholesterol, 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (DPPC), 1,2-Dipalmitoylphosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP₂), Fötale Kälberserum (FCS), formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), γ -Linolensäure, N-Hexanoyl-D-sphingosin (C6-Ceramid), KN-62, N-Palmitoyl-D-sphingomyelin (SM), Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), Pyridin, Soja-Trypsin-Inhibitor (STI), Thapsigargin, Thrombin, und U0126 wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland), 6-Dodecanoyl-N,N-dimethyl-2-naphthylamin (Laurdan), Nordihydroguairetische Säure (NDGA), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Triton-X-100 von Fluka und Acetylsalicylsäure (ASS), p-Anisidiniumchlorid, 1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid (EDC), Leupeptin, Methanol, Trifluoressigsäure und Trypanblau von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. 1,2-bis(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure-Acetomethylester (BAPTA/AM), Fura-2/AM und SB203580 waren von Alexis (Lörrach, Deutschland), Dithiothreitol (DTT) und Glycerol von Applichem (Darmstadt, Deutschland) und cPLA₂ α -Inhibitor von Calbiochem (Gibbstone, USA). 1-Palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (PAPC), 1-Palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin (PAPE), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol (POG) und 1-Palmitoyl(D31)-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin ((D31)POPC) stammten von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Antikörper wurden von Cell Signaling Technology (Denvers, USA – cPLA₂, P-cPLA₂, P-p38, P-Mnk1, P-CaMKII, ERK, Histag) und Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland – cPLA₂, Mnk1, p38, CaMKII) erhalten. Bac-to-Bac Baculovirus Expressionssystem sowie Sf-900 II SFM Medium stammten von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Lymphoprep und Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) von PAA (Pasching, Österreich), Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) von Serva (Heidelberg, Deutschland), Blocking Puffer und IRDye® sekundärer Antikörper von LI-COR (Lincoln, USA), Precision Plus Protein All Blue Marker von Biorad, [³H]-Arachidonsäure von Biotrend (Köln, Deutschland) und Ni⁺-NTA-Agarose von Qiagen (Hilden, Deutschland).

2.2 Aufreinigung primärer Zellen

2.2.1 PMNL

PMNL wurden aus Leukozytenkonzentraten (Buffy coats) aus dem Blut gesunder Spender (Markus Krankenhaus Frankfurt/Main und Städtische Kliniken Frankfurt/Main-Höchst) gewonnen. Die Blutkonzentrate wurden vereinigt und mit 20%-iger Dextran-Lösung (5% Dextran in PBS) versetzt. Nach Sedimentation der Erythrozytenaggregate wurde der Überstand auf Lymphozytenseparationsmedium geschichtet und durch 10-minütige Zentrifugation bei 800xg (Raumtemperatur, ohne Bremse) in verschiedene Zellfraktionen aufgetrennt. Die im Pellet befindlichen PMNL wurden weiterhin zur Lyse noch vorhandener Erythrozyten mit eiskaltem Wasser behandelt und anschließend mit PBS pH 7,4 gewaschen.

2.2.2 Thrombozyten

Thrombozyten wurden ebenfalls aus Leukozytenkonzentraten isoliert. Bei der Aufarbeitung von Buffy coats wurden Thrombozyten aus dem Überstand nach der Dichtefraktionierung durch Zentrifugation bei 800xg gewonnen und mit PBS pH 5,9 gewaschen. Zur Gewinnung von thrombozytenreichem Plasma (PRP) wurden frische Vollblutspenden gesunder Spender zur Abtrennung sonstiger Blutzellen bei 800xg zentrifugiert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 MM6-Zellen (differenzierte, monozytäre Zellen)

Mono Mac 6 (MM6) Zellen wurden von Dr. H. W. Ziegler-Heitbrock, München, zur Verfügung gestellt und in RPMI 1640 Medium kultiviert, welches mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS), 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, nicht essentiellen Aminosäuren, 10 µg/ml Insulin und 1 mM Oxalacetat supplementiert wurde. Zur Differenzierung der Zellen wurden diese

4 Tage vor der Durchführung der Aktivitätsassays mit 2 ng/ml TGF β und 50 nM Calcitriol behandelt.

2.3.2 Sf9-Zellen

Sf(*Spodoptera frugiperda*)⁹ Insektenzellen wurden von Prof. J. Z. Häggström, Stockholm, zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte bei 27°C in Spinnerflaschen (Bellco) unter ständigem Rühren in Sf-900 II SFM Medium, ergänzt mit 10% FCS (Sigma), 100 Units/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin.

2.4 12-Lipoxygenase-Aktivitäts-Assays

2.4.1 In intakten Zellen

Frisch isolierte Thrombozyten (10^8 in 1 ml) wurden in PBS pH 7,4 suspendiert und mit 1 mM Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) plus 30 μ M BAPTA/AM bzw. mit 1 mM CaCl₂ supplementiert. Inhibitoren wurden 15 min vor Reaktionsstart hinzugefügt und die Zellsuspensionen wurden für 10 min bei 37°C mit den entsprechenden Stimuli inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml Methanol wurden die Reaktionen abgestoppt. Zur Aufreinigung der freigesetzte 12-H(P)ETE über C18-Säulen (UCT clean-up® CEC 1811Z) wurden die Proben mit 30 μ l 1 N HCl, 500 μ l PBS pH 7,4 und 200 ng PGB1 (interner Standard) versetzt. Nach Equilibrierung der Säulen mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser wurden die Proben aufgegeben und die gebundenen Säuren mit 1 ml Wasser und 1 ml 25%-igem Methanol gewaschen. Die Elution erfolgte mit 300 μ l Methanol. Die Proben wurden weiterhin mit 120 μ l Wasser versetzt und mittels HPLC vermessen. Verwendet wurden hierfür eine Novapak C-18 Radial-Pak Säule (Waters) und 76%-iges Methanol-Wasser-Gemisch mit 0,007% (V/V) Trifluoressigsäure als Fließmittel. Flussrate und Injektionsvolumen waren 1,2 ml/min und 100 μ l, detektiert wurde bei 280 (PGB1) und 235 nm (12-H(P)ETE) nach ca. 3 bzw. 11 min.

2.4.2 In Zellhomogenaten

10^8 frisch isolierte Thrombozyten wurden in 1 ml PBS pH 7,4 suspendiert und mit 1 mM EDTA sowie den Proteaseinhibitoren Leupeptin (10 μ g/ml), STI (60 μ g/ml) und PMSF (1 mM) versetzt und mittels Ultraschall (Bandelin Sonoplus HD200) lysiert. 1 ml des Lysates oder des Überstands nach Zentrifugation bei 100.000xg (für 70 min bei 4°C) wurden für die Inkubationen verwendet. Diese starteten nach Zugabe von 2 mM CaCl_2 und 10 μ M AA und wurden nach 10 min mit 1 ml Methanol abgestoppt. Die Aufarbeitung erfolgte analog der Detektion von 12-H(P)ETE aus intakten Zellen.

2.5 *cPLA₂-Aktivitätsassay in intakten Zellen und Zelllysaten*

2.5.1 Freisetzung von [³H]-AA aus intakten Zellen

Zur Bestimmung freigesetzter [³H]-AA aus Thrombozyten wurde thrombozytenreiches Plasma verwendet. Zur Vermessung von PMNL und MM6 wurden jeweils 10^7 bzw. 3×10^6 Zellen pro Inkubation in RPMI-Medium suspendiert. Thrombozytenreiches Plasma (mit 200 μ M Acetylsalicylsäure behandelt) wurde mit 1 μ Ci/ml und die Zellsuspensionen jeweils mit 0,2 μ Ci/ml [³H]-AA versetzt und für 2 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Beladene Thrombozyten wurden anschließend mit Tyrodes-Puffer (PBS pH 5,9, 1 mM MgCl_2 , 11,5 mM NaHCO_3 , 1 g/l Glucose, 1 mg/ml fettsäurefreiem Rinderserumalbumin (FAF-BSA)) und PMNL bzw. MM6 mit PBS pH 7,4 plus 1 mg/ml FAF-BSA gewaschen. Thrombozyten wurden vor dem Start der Inkubation auf 37°C erwärmt, um eine vorzeitige Aktivierung durch Kälte zu verhindern. [312] Zu den Proben wurden je nach Inkubationsbedingungen 30 min vor Reaktionsstart 1 mM EDTA und 30 μ M BAPTA gegeben. Inhibitoren wurden 15 min und 1 mM CaCl_2 5 min vor der Inkubation hinzugefügt. Durch Zugabe der Stimuli wurde die Reaktion gestartet und nach 5 min bei 37°C auf Eis abgestoppt. Zellüberstände mit freigesetzten radioaktiven Metaboliten wurden durch Zentrifugation bei 4000xg (Thrombozyten) bzw. 200xg (MM6 und PMNL) von den Zellen getrennt und zu Szintillationszähler-Lösung (LSC-Lösung, Optisafe, HiSafe 3', PerkinElmer) gegeben. Die Zahl der Zerfälle pro Minute und damit die Menge an freigesetzter [³H]-AA bzw. deren Metabolite wurde in einem Wallac 1409

Szintillationszähler (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Monza, Italien) quantifiziert.

2.5.2 Bestimmung der AA-Freisetzung aus intakten Zellen mittels HPLC

Pro Inkubation wurden 3×10^7 PMNL bzw. 3×10^8 Thrombozyten in 1 ml PBS pH 7,4 plus 1 g/l Glucose suspendiert und mit 5 μ M BEL und 1 mM DTT versetzt. COX-1 und 12-LO in Thrombozyten wurden mit 200 μ M ASS und 50 μ M NDGA und 5-LO in PMNL mit 300 nM BW4AC gehemmt.

30 min bzw. 15 min vor dem Inkubationsstart wurden die Proben mit 1 mM EDTA und 30 μ M BAPTA bzw. den entsprechenden Inhibitoren versetzt. Die Zugabe von 1 mM CaCl_2 erfolgte 5 min vor der Zellstimulation mit den jeweiligen Reagenzien und der anschließenden 10-minütigen Inkubation bei 37°C. Mit 4 ml Methanol wurden die Proben abgestoppt und für die weitere Aufarbeitung mit 1 nmol γ -Linolensäure, 100 μ l 1 N HCl und 4 ml PBS versetzt. Nach Zentrifugation bei 944xg wurden die Überstände über C18-Säulen (UCT clean-up® CEC 1811Z) aufgereinigt. Die Equilibrierung der Säulen vor der Probenaufgabe erfolgte mit 1 ml Methanol und 1 ml PBS pH 3 und nach der Bindung der Probensubstanzen an die Säule wurden diese mit 1 ml Wasser und 1 ml 70%-igen Methanol gewaschen und mit 1 ml Methanol eluiert. Das Eluat wurde, mit 750 μ M p-Anisidiumchlorid, 4,7 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 0,056% Pyridin versehen, 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 900 μ l Wasser versetzt und erneut über C18-Säulen (UCT clean-up® CEC 1811Z) gegeben. Diese wurden zuvor mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser equilibriert und nach Probenaufgabe mit 1 ml 50%-igem Methanol pH 2,75 und 1 ml 50%-igem Methanol gewaschen. Die in 300 μ l eluierten Fettsäuren wurden nach Zugabe von 60 μ l Wasser mittels HPLC über eine Novapak C-18 Radial-Pak Säule (Waters) aufgetrennt und bei 249 nm detektiert. Als Fließmittel diente 85%-iger Methanol mit 0,007% Trifluoressigsäure, das in einem geradlinigen Gradienten gegen 100%iges Methanol mit 0,007% Trifluoressigsäure ausgetauscht wurde.

2.5.3 Bestimmung der AA-Freisetzung in Zellhomogenaten

3×10^7 PMNL bzw. 3×10^8 Thrombozyten wurden in 500 μ l Lyse-Puffer (20 mM Tris pH 8,8, 134 mM NaCl, 1 mM EDTA bzw. EGTA, Leupeptin (10 μ g/ml) und STI (60 μ g/ml)) mittels Ultraschall (Bandelin Sonoplus HD200) homogenisiert und nach Zugabe von 5 μ M BEL, 1 mM DTT, 200 μ M ASS (Thrombozyten), 50 μ M NDGA (Thrombozyten) und 300 nM BW4AC (PMNL) sowie entsprechenden Inhibitoren 15 min vor der Inkubation wurden die Lysate für 60 min in Anwesenheit der jeweils angegebenen Konzentration an Ca^{2+} bei 37°C stimuliert. Nach Abstoppen mit 4 ml Methanol wurden die Proben entsprechend der Behandlung intakter Zellen aufgearbeitet und AA vermessen.

2.6 Intrazelluläre Ca^{2+} -Messung

10^8 frisch isolierte Thrombozyten wurden mit 2 μ M Fura-2/AM für 30 min bei 37°C inkubiert. Überschüssiges Fura-2/AM wurde anschließend durch Waschen entfernt und die Zellen wurden in 1 ml PBS pH 7,4 resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mM Ca^{2+} oder 1 mM EDTA und 30 μ M BAPTA erfolgte die Messung bei 37°C im Spectrofluorometer (Aminco-Bowman series 2). 15 min vor dem Start der Messung wurde Hyperforin zugesetzt und nach Erhalt der Basislinie für 20 Sekunden der entsprechende Stimulus zugegeben. Zur Ermittlung der maximalen Fluoreszenz wurden die Zellen in Gegenwart von 1 mM Ca^{2+} mit 1% Triton-X-100 lysiert und die minimalen Werte ergaben sich aus den Kurven nach der Zugabe von 10 mM EDTA. Gemessen wurde die Emission bei 510 nm während der abwechselnden Anregung der Proben bei 340 (Ca^{2+} -gebundenes Fura-2) und 380 nm (ungebundenes Fura-2). Aus den resultierenden Kurven, den Maxima und Minima konnte der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel entsprechend der Methode von Grynkiewicz et al [313] bestimmt werden.

2.7 Translokation der *cPLA₂*

2.7.1 In intakten Thrombozyten

3×10^8 Thrombozyten wurden nach 15-minütiger Vorbehandlung mit entsprechenden Inhibitoren mit den angegebenen Stimuli in 300 μ l Translokationspuffer (134 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 g/l Glucose, 1 mM EDTA plus 30 μ M BAPTA (30 min vor der Stimulation) oder 2 mM CaCl_2) für 5 min bei 37°C inkubiert und auf Eis abgestoppt. Die Zellen wurden bei 1000xg abzentrifugiert, in Translokationspuffer mit 10 μ g/ml Leupeptin, 60 μ g/ml STI und 1 mM PMSF resuspendiert und durch Einfrier/Auftau-Prozesse in flüssigem N_2 und im Wasserbad (37°C) lysiert. Nach der Zentrifugation bei 100.000xg für 35 min wurden Überstand und in Translokationspuffer resuspendiertes Membranpellet mit Ladepuffer (225 mM Tris pH 6,8, 4,5 mM EDTA, 45% Glycerol, 9% SDS, 0,045% Bromphenolblau und 10% β -Mercaptoethanol) versetzt, 6 min bei 95°C gekocht und mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot näher untersucht.

2.7.2 In Thrombozytenhomogenaten

3×10^8 Thrombozyten wurden in 300 μ l Translokationspuffer (134 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 g/l Glucose, 1 mM EDTA, 10 μ g/ml Leupeptin und 60 μ g/ml STI) mittels Ultraschall (Bandelin Sonoplus HD200) lysiert und nach Zugabe der Inhibitoren (15 min vorher) sowie von 2 mM CaCl_2 für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 100.000xg für 35 min bei 4°C wurde der Überstand vom Pellet getrennt, das Pellet in Translokationspuffer resuspendiert und Teile beider Fraktionen mit Ladepuffer (225 mM Tris pH 6,8, 4,5 mM EDTA, 45% Glycerol, 9% SDS, 0,045% Bromphenolblau und 10% β -Mercaptoethanol) versetzt und bei 95°C für 6 min gekocht.

2.8 Untersuchung der Phosphorylierung der *cPLA₂*, *p38MAPK*, *ERK-1/2*, *Mnk1* und *CaMKII* in intakten Zellen

10^7 PMNL bzw. 10^8 Thrombozyten wurden in 100 μ l PBS pH 7,4 plus 1 g/l Glucose mit 1 mM EDTA plus 30 μ M BAPTA für 30 min vorbehandelt oder mit 1 mM CaCl_2 versetzt und mit den entsprechend Inhibitoren für 15 min inkubiert. Nach Zugabe der Stimuli

wurden die Zellen für 5 min bei 37°C aktiviert, mit 25 µl Ladepuffer (225 mM Tris pH 6,8, 4,5 mM EDTA, 45% Glycerol, 9% SDS, 0,045% Bromphenolblau und 10%β-Mercaptoethanol) abgestoppt und bei 95°C für 6 min gekocht.

2.9 SDS-PAGE, Western Blot, Coomassie-Färbung

Jeweils mit Ladepuffer versehene Proben wurden mittels Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese(PAGE) untersucht. Für die spezifische Analyse einzelner Proteine wurden diese durch Elektroblotting aus dem Gel auf Nitrozellulosemembranen übertragen und nach dem Blocken mit Odyssey Blocking Buffer für 1 h über Nacht mit primären Antikörpern inkubiert. Die Membranen wurden zur Entfernung von überschüssigem Primär-Antikörper mit PBS gewaschen und mit IRDye® sekundärem Antikörper in Odyssey Blocking Buffer für 45 min inkubiert und nach erneutem Waschen im Infrarot-Scanner (Odyssey Infrared Imaging System, LI-COR Corporate Offices, Lincoln USA) analysiert.

Für Coomassie-Färbungen wurden die Proteine durch Behandlung mit 20%-iger Trichloressigsäure für 30 min im Gel fixiert und durch anschließendes Schwenken in 10% Essigsäure, 50% Methanol und 0,1% Coomassie G-25 angefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrunds wurde eine Lösung aus 10% Essigsäure und 20% Methanol verwendet.

2.10 Überexpression und Aufreinigung der cPLA₂

2.10.1 Herstellung des Baculovirus

Die Überexpression der cPLA₂ erfolgte analog dem Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System Handbuch (Version D, 6. April 2004) von Invitrogen.

Humane cPLA₂ DNA-Sequenz wurde aus pVL1393 Plasmid über Not I und Bgl II Schnittstellen ausgeschnitten und mit Hilfe eines Primerpaars mit Bgl II- und Pst I-Überhang über die Schnittstellen für Not I und Pst I in den pFastBac[™] HT A Vektor inkloniert (Abb. 2.1). 5'-wärts der eingefügten cPLA₂-Sequenz befanden sich im pFastBac[™] HT A Vektor somit die Sequenzen für eine Tabakätzvirus (Tobacco Etch Virus (TEV))-Protease-Schnittstelle, für einen 6-fach His-Tag sowie des für Expressionen in Insektenzellen gut geeigneten Polyhedrin-Promoters (P_{Ph}). Der rekombinante

pFastBac™ HT A Vektor wurde in MAX Efficiency® DH10Bac™ E. coli transformiert, in denen das von den entsprechenden Tn7-Schnittstellen flankierte cPLA₂-Plasmid unter Zerstörung der LacZ α -Gens in die mini-attTn7 Sequenz transponierte (Abb. 2.1). Aus durch Blau-Weiß-Selektion identifizierten E. coli wurde die rekombinante Bacmid-DNA isoliert und der Einbau des vollständigen Klonierungsproduktes über Polymerase-Ketten-

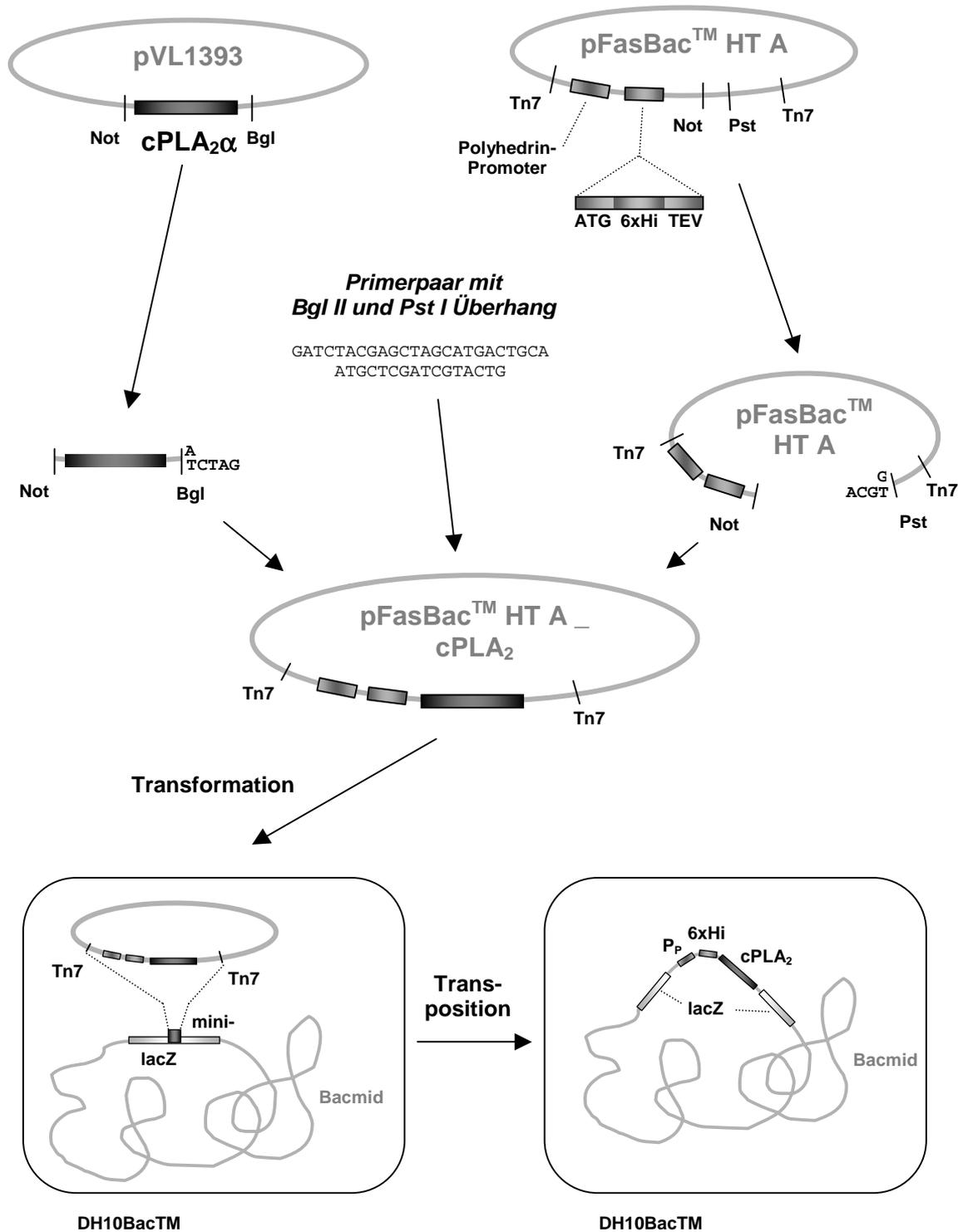


Abb. 2.1 Herstellung des Baculovirusbacmids

Reaktion (PCR)-Analyse der eingebauten Sequenz bestätigt. Mit Hilfe von Cellfectin[®] Reagenz wurde die rekombinante Bacmid-DNA in frisch ausgesäte Sf9-Zellen (5×10^5 /2 ml Sf-900 II SFM plus Penicillin und Streptomycin) transfiziert (Inkubation für 5 h bei 27°C). Nach anschließendem Mediumwechsel wurden die Zellen für 72 h bei 27°C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und durch Zentrifugation bei 1300xg abgetrennt. 1 ml des Überstands mit gebildetem Baculovirus wurde zur Amplifikation zu 100 ml Sf9-Zellkultur (5×10^5 /ml) gegeben und für 5 Tage bei 27°C inkubiert. Der nach Ernte und Zentrifugation gewonnene Überstand wurde für Infektionen von Sf9 Zellen zur Proteinexpression genutzt.

2.10.2 Überexpression und Aufreinigung der cPLA₂

Zur Überexpression der His-Tag-cPLA₂ wurden Sf9-Zellen (5×10^5 /ml, Viabilität > 95%) 72 h vor der Ernte mit rekombinantem Baculovirus infiziert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Zellen bei 340xg abzentrifugiert und in 5 ml Na₃PO₄-Puffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8, 300 mM NaCl, 10% Glycerol, 1 mM EDTA, 10 µg/ml Leupeptin und 60 µg/ml STI) durch Ultraschall (Bandelin Sonoplus HD200) lysiert. Die Lysate

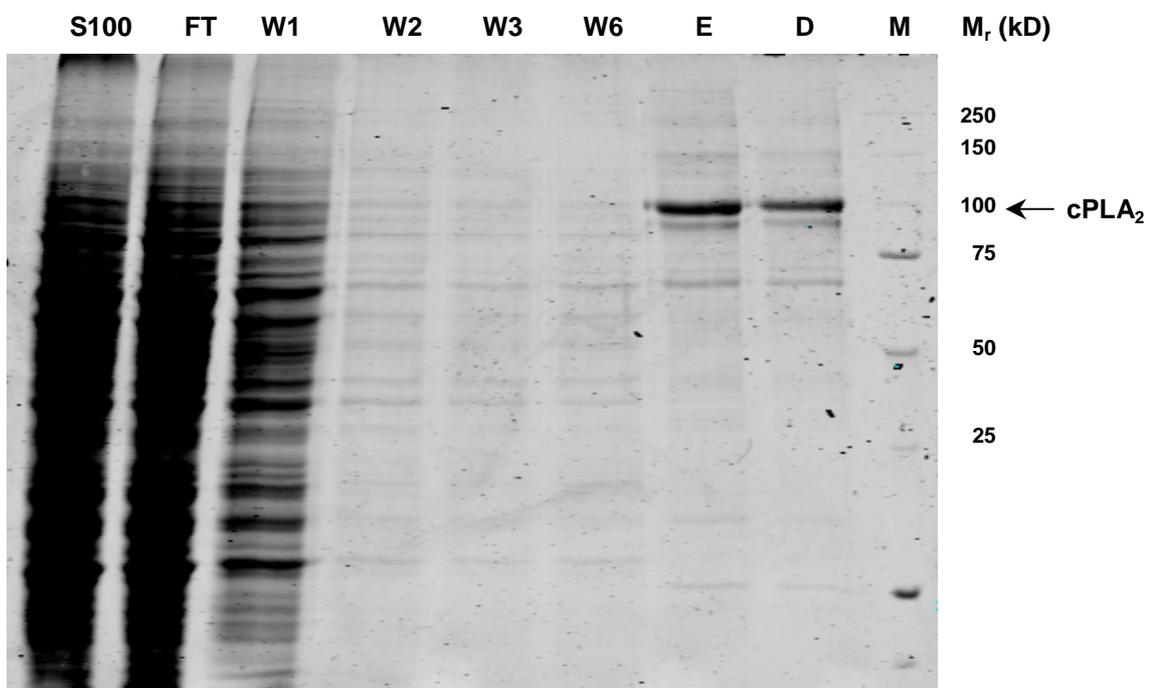


Abb. 2.2 Aufreinigung der cPLA₂

Coomassie-Gel einer typischen Aufreinigung mit jeweils 0,1% (S100 und FT) bzw. 0,4% (W1/2/3/6, E, D) der Fraktionen

S100 = Zelllysat nach Zentrifugation bei 100.000 g; FT = Durchfluss nach Bindung an Ni⁺-NTA; W1/2/3/6 = Waschfraktionen 1 bis 3 und 6 (letzte), E = Eluat; D = Dialysat nach Über-Nacht-Dialyse; M = Marker (Precision Plus Protein All Blue)

wurden durch Zentrifugation (100.000xg, 70 min, 4 °C) von unlöslichen Bestandteilen gereinigt und für 1 – 2 h bei 4°C in Gegenwart von 2 mM MgSO₄ (zum Binden des EDTA) und 10 mM Imidazol mit 100 µl 50%-iger Ni²⁺-NTA-Agarose (in PBS) geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension in eine leere Säule gegeben und nach dem Abfließen des Zelllysats mit Na₃PO₄-Puffer plus 20 mM Imidazol gewaschen. Die Elution der His-Tag-cPLA₂ erfolgte mit 6-fachem Säulenvolumen an Na₃PO₄-Puffer plus 150 mM Imidazol. Zur Umpufferung des aufgereinigten Proteins in TGN-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 20% Glycerol) wurde das Eluat über Nacht dialysiert.

Die Proteinmenge wurde mit der BCA-Methode gegen bovines Serumalbumin (BSA) bestimmt. 10 µl Probe wurden mit 200 µl BCA-Reagenz versetzt und nach 30 min Inkubation bei 37°C UV-metrisch ausgewertet. Bei einer Aufreinigung aus 400 ml Kultur konnten durchschnittlich 700 bis 1000 µg/ml cPLA₂ gewonnen werden. Bei –70 °C waren die Enzymlösungen für mindestens 3 Monate ohne Aktivitätsverlust lagerbar.

Ein Coomassie-Gel einer typischen Aufreinigung ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

2.11 Liposomen- und Mizellenherstellung

2.11.1 Herstellung von Liposomen und Mizellen

Zur Herstellung multilamellarer Vesikel (MLV) wurden die Lipide in Chloroform gelöst und je nach gewünschter Zusammensetzung in Reagenzgläsern miteinander vermischt. Bei der Einlagerung von Hyperforin während der Liposomenherstellung wurde auch Hyperforin frisch in Chloroform gelöst (1 mg/ml) und zu den anderen Lipiden gegeben. Die eingesetzte Hyperforinmenge entsprach dabei der erforderlichen Stoffmenge für eine Konzentration von 1, 3, 10 oder 30 µM in 200 µl Reaktionsvolumen.

Unter N₂-Dampf wurde bei ständiger Rotation der Gläser das Chloroform abgedampft und der Lipidkuchen anschließend in wässrigem Puffer wieder resuspendiert. Dieser Prozess konnte durch 3- bis 5-maliges Einfrieren (flüssiger N₂) und Auftauen (Wasserbad, 37°C) unterstützt werden.

Für die Gewinnung von großen unilamellaren Vesikeln (LUVs) wurden MLVs in Liposomen-Puffer (134 mM NaCl und 20 mM Tris-HCl pH 7,4) gebildet und anschließend durch 11-malige Extrusion durch Polycarbonatmembranen mit 100 nM Porendurchmesser

(Mini-Extruder und Membranen von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)) aufgebrochen und zu unilamellaren Liposomen umgeformt [314, 315].

Triton-X-100-Mizellen hingegen wurden aus MLVs hergestellt, die in Mizellen-Puffer (150 mM NaCl, 80 mM HEPES pH 7,4 und 1 mM DTT) erzeugt wurden. Die fertigen Mizellenlösungen wurden mit Triton-X-100 in 4-fachem Überschuß, bezogen auf die Lipidkonzentration, versehen und einige Minuten bei 37°C inkubiert. Eine deutliche Reduktion der Trübung der Suspensionen war zu beobachten [316].

Für die Messung der Bindung der cPLA₂ an Liposomen wurden MLVs verwendet, die in Liposomen-Puffer plus 1 g/l Glucose gebildet wurden.

Die verwendete absolute Lipidmenge lag bei 50 nmol für Aktivitätsassays und die Dichtemessung und 100 nmol für die Messung der cPLA₂-Bindung an Liposomen. Daraus resultierten Konzentrationen von 250 bzw. 500 µM im Inkubationsvolumen von 200 µl.

2.11.2 Vesikelgrößenmessung

Für die Vermessung der Vesikelgröße wurden LUVs wie beschrieben hergestellt und durch Photonen-Korrelations-Spektroskopie bei Raumtemperatur vermessen (Zetasizer 3000 Hsa, Malvern Instruments Ltd 1992, PCS for Windows v1.51 Rev.1). Der Einfluss von Hyperforin konnte durch den Einbau der Substanz während der Herstellung oder durch die 15-minütige Vorinkubation der Liposomensuspensionen mit Hyperforin überprüft werden.

2.12 cPLA₂-Aktivitätsassay

LUVs bzw. Triton-X-100 Mizellen in 190 µl wurden mit Ca²⁺ oder EDTA versetzt und für 15 min mit den entsprechenden Konzentrationen Hyperforin (1 bis 30 µM bezogen auf 200 µl Endvolumen) bei 37°C vorbehandelt. Durch Zugabe von 500 ng cPLA₂ (in 10 µl TGN-Puffer) wurde die Reaktion gestartet und nach 60 min mit 1,6 ml Methanol abgestoppt. Nach Zugabe von 1 nmol γ-Linolensäure, 40 µl 1 N HCl und 1,6 ml PBS erfolgte die weitere Aufarbeitung der Proben und deren Vermessung in der HPLC wie beschrieben (siehe AA-Freisetzung aus intakten Zellen).

2.13 cPLA₂-Bindungsassay

MLVs in 190 µl TGN-Puffer wurden nach der Vorinkubation mit 1 bis 30 µM Hyperforin bei 37°C in Gegenwart von 1 mM Ca²⁺ bzw. 1 mM EDTA (jeweils bezogen auf ein Endvolumen von 200 µl) mit 500 ng cPLA₂ versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Liposomen durch Zentrifugation (150.000xg, 30 min, 37°C) abgetrennt und in TGN-Puffer resuspendiert. Fraktionen der Pellet-Suspension und des Überstands nach Zentrifugation wurden mit Ladepuffer versetzt, bei 95°C für 6 min gekocht und über SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.14 Dichtemessung

Die Membrandichte wurde mittels der Generalisierten Polarisation (GP) von Laurdan bestimmt. Dazu wurden LUVs in den entsprechenden Zusammensetzungen mit 1 mol% Laurdan erzeugt. Emissionsspektren von eingebautem Laurdan wurden über einen Bereich von 390 bis 560 nm im Fluoreszenzspektrometer (Aminco-Bowman series 2) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und bei 37°C aufgenommen. Aus den Fluoreszenzintensitäten bei 435 (F₄₃₅) und 500 nm (F₅₀₀) konnte der GP-Wert ($GP = (F_{435} - F_{500}) / (F_{435} + F_{500})$) berechnet werden. Aufgrund von Verschiebungen des Laurdan-Spektrums bei Änderungen der Membranfluidität spiegelt die Größe des GP-Wertes die Rigidität von Lipidaggregaten wieder [317, 318].

2.15 NMR-Messung

MLVs wurden aus 7 g (D31)POPC und 1,4 g Hyperforin hergestellt. Nach Mischen der in Chloroform gelösten Substanzen und Abtrocknen des Chloroform unter N₂ wurden die Lipide in 2 ml Cyclohexan wieder gelöst, in flüssigem N₂ eingefroren und über Nacht unter Vakuum lyophilisiert. Die Proben wurden anschließend mit ca. 20 µl D₂O rehydriert und durch Einfrier-Auftau-Prozesse (flüssiger N₂, Wasserbad) homogenisiert. Die Suspension wurde in einen 4 mm MAS-Rotor transferriert und im NMR-Spektrometer (Bruker Avance III 850) vermessen. Alle Messungen wurden bei einer Resonanzfrequenz von 850 MHz und einer MAS (magic angle spinning) Rotationsgeschwindigkeit von 10 kHz durchgeführt. Zweidimensionale ¹H-MAS-NOESY Spektren wurden phasensensitiv

mit ^1H 90° Pulsen von durchschnittlich $3\ \mu\text{s}$ aufgenommen. Insgesamt 256 komplexe Datenpunkte wurden in indirekter Dimension mit 8 Transienten pro Inkrement und einer Unterbrechung von 2 s zwischen den Zyklen akkumuliert. Alle ^1H -Spektren wurden zu der terminalen Methylgruppe des (D31)POPC-Lipids bei 0.89 ppm in Relation gesetzt und für NOESY-Aufbau-Kurven wurden Mischzeiten von 5, 10, 25, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 350, 500, 800 und 1200 ms angesetzt.

Die Prozessierung der Daten erfolgte in Topspin (Bruker Instruments, Karlsruhe, Deutschland) und die analytische Auswertung mit Hilfe der Software Python 2.5 (<http://www.python.org>) sowie pylab (<http://matplotlib.sourceforge.net/>). Die Berechnung der relativen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der Kerne beruhte auf der „Full Matrix Rate Analysis“ nach Huster et. al. [319].

3 Ergebnisse

3.1 Aktivierung der cPLA₂ in Thrombozyten

3.1.1 Erhöhung der 12-H(P)ETE-Freisetzung durch Hyperforin

Auf Grund der beschriebenen prominenten Hemmung der 5-LO durch Hyperforin [272] wurde im Vorfeld dieser Arbeit auch der Einfluss von Hyperforin auf die 12-LO untersucht. Frisch isolierte Thrombozyten wurden für 10 min mit Hyperforin stimuliert und die gebildete 12-H(P)ETE wurde über C18-Säulen aufgereinigt und mittels HPLC quantifiziert. Dabei wurde eine konzentrationsabhängige Steigerung der 12-H(P)ETE-Produktion festgestellt, die bei 10 µM Hyperforin ihr Maximum (8,1-fache Induktion) erreichte, bei höheren Konzentrationen aber wieder abfiel (Abb. 3.1 A). Bemerkenswert war, dass diese Aktivierung auch in Abwesenheit von Ca²⁺ erfolgte. Durch die Behandlung der Zellen mit 1 mM EDTA und 30 µM BAPTA/AM 30 min vor der Inkubation mit Hyperforin wurde extra- und intrazelluläres Ca²⁺ chelatiert. Dennoch stimulierte Hyperforin die 12-H(P)ETE Freisetzung konzentrationsabhängig bis zu 25,2-fach bei 10 µM (Abb. 3.1 A). Im Vergleich zu den Befunden in Anwesenheit von Ca²⁺ war somit ein ca. 3-fach stärkerer Effekt zu beobachten, was zum Teil allerdings auf einen sehr niedrigen Bezugswert zurückzuführen war.

Interessanterweise wurde die Induktion der 12-H(P)ETE Produktion sowohl unter 1 mM Ca²⁺ als auch nach dessen Entfernung nur in Abwesenheit von AA beobachtet. Bei vorheriger Zugabe von 10 µM AA konnte in beiden Fällen keine Aktivitätssteigerung detektiert werden (Abb. 3.1 B).

Zur näheren Analyse dieser bereits vorliegenden Befunde wurde der Einfluss von Hyperforin auf die 12-LO im zellfreien System überprüft. Dabei wurden Thrombozyten mit Ultraschall lysiert und das Homogenat bzw. der Überstand (S100) nach Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile für 10 min mit Hyperforin inkubiert. Eine Steigerung der 12-LO-Aktivität konnte in beiden Systemen nicht beobachtet werden. Im S100 wurde die Bildung von 12-H(P)ETE bei 10 und 30 µM Hyperforin sogar leicht gehemmt (78 und 54% Restaktivität) (Abb. 3.1 C).

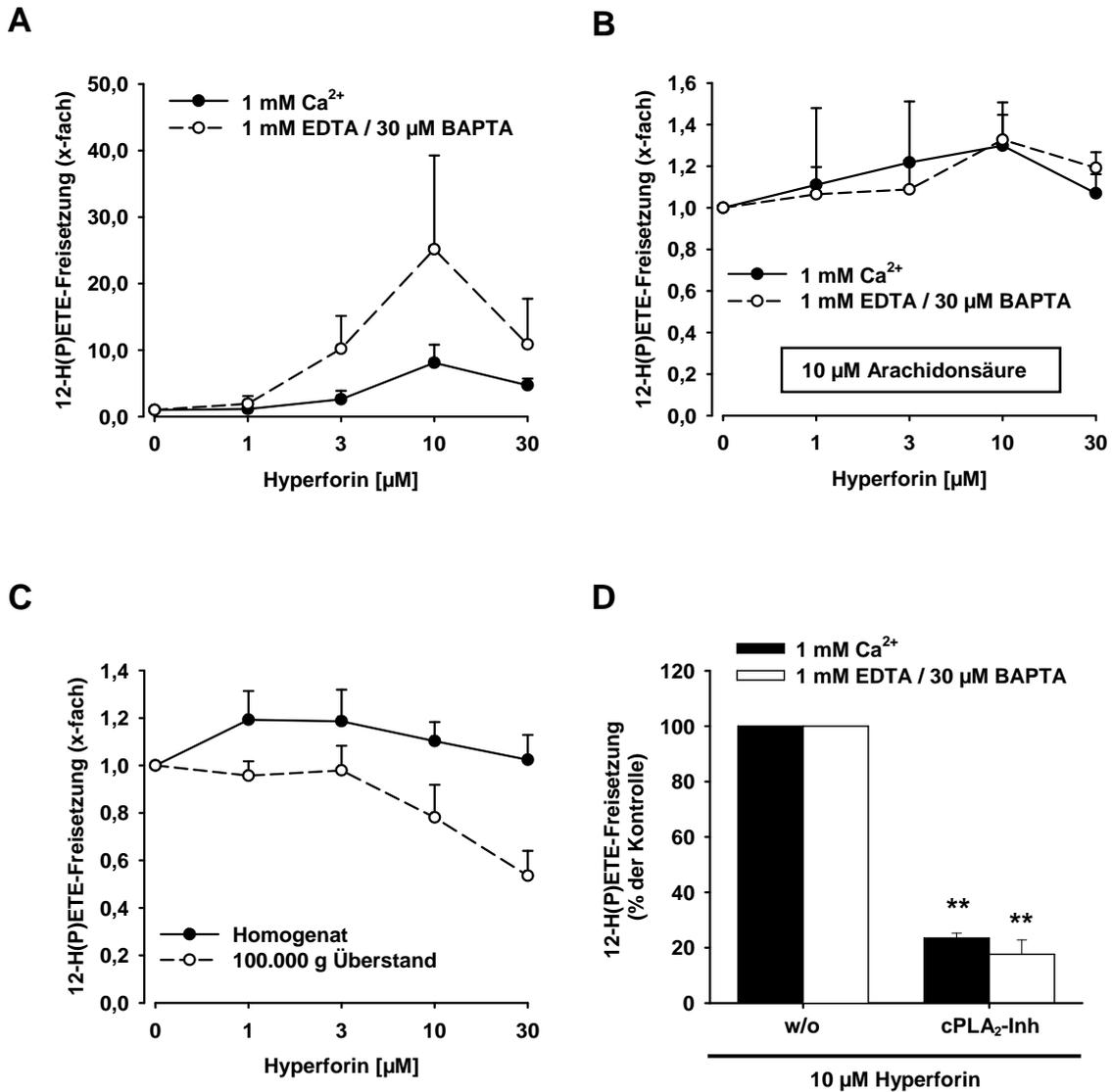


Abb. 3.1 Induktion der 12-H(P)ETE Produktion in Thrombozyten

(A/B) Thrombozyten wurden in Anwesenheit von 1 mM CaCl₂ (volle Kreise) oder nach Behandlung mit 1 mM EDTA und 30 μM BAPTA (leere Kreise) mit den angegebenen Konzentrationen an Hyperforin für 10 min in Abwesenheit (A) und in Gegenwart (B) von 10 μM AA inkubiert. (C) Ultraschalllysate aufgereinigter Thrombozyten (volle Kreise) bzw. der Überstand nach Zentrifugation dieser Lysate bei 100.000xg (leere Kreise) wurden für 10 min mit den angegebenen Konzentrationen Hyperforin inkubiert. (D) Thrombozyten wurden für 15 min bei 37°C in An- (schwarze Balken) oder Abwesenheit (weiße Balken) von Ca²⁺ mit 5 μM cPLA₂α-Inhibitor oder DMSO behandelt und anschließend für 10 min mit 10 μM Hyperforin inkubiert. In intakten Zellen oder Zelllysaten gebildete 12-H(P)ETE wurde über C18-Säulen aufgereinigt und mittels HPLC detektiert.

Die sich daraus ergebende Hypothese, dass nicht die Umwandlung von AA zu 12-H(P)ETE, sondern die Bereitstellung der AA durch Hyperforin moduliert wird, wurde durch die Hemmung der cPLA₂α mit einem cPLA₂α-Inhibitor überprüft. Die 15-minütige Vorinkubation von Thrombozyten mit dem Inhibitor führte zu einer ca. 80%-igen

Reduktion der Hyperforin-induzierten 12-H(P)ETE-Freisetzung sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Ca^{2+} (Abb. 3.1 D).

3.1.2 Aktivierung der cPLA₂ durch Hyperforin

Da basierend auf den dargestellten Ergebnissen eine Erhöhung der AA-Freisetzung durch Hyperforin vermutet werden konnte, wurde die Phospholipase-Aktivität in Thrombozyten untersucht. Thrombozyten wurden mit Tritium-markierter AA ($[^3\text{H}]$ -AA) für 2 h inkubiert, überschüssige AA wurde durch Waschen mit BSA-haltigem Puffer entfernt und die Zellen wurden für 5 min mit Hyperforin stimuliert. Freigesetzte markierte AA und markierte Folgeprodukte wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, im Szintillationszähler quantifiziert.

In Analogie zur 12-H(P)ETE-Produktion konnte auch bei der AA-Freisetzung eine konzentrationsabhängige Stimulation durch Hyperforin beobachtet werden, die bei 10 μM maximal war und sich bei höheren Konzentrationen nicht weiter verstärkte (Abb. 3.3 A).

10 μM Hyperforin bewirkten dabei eine 2,6-fache Erhöhung der AA-Freisetzung, die etwa halb so hoch war wie die rezeptorvermittelte Aktivierung durch den physiologischen Liganden Thrombin (5,1-fach bei 2 U/ml Thrombin) und die Ca^{2+} -abhängige Stimulation durch Ca^{2+} -Ionophor A23187 (4,8-fach bei 2,5 μM). Durch Maskierung der vinylogenen Säurefunktion des Hyperforins wurde dieser Effekt aufgehoben. Der Methylester O-Methyl-Hyperforin (Abb. 3.2) konnte die Freisetzung von AA aus Thrombozyten nicht stimulieren (Abb. 3.3 B).

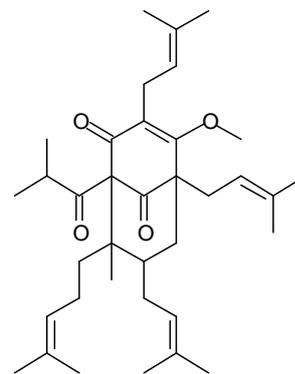


Abb. 3.2 O-Methylhyperforin

Wie erwartet, wurde die Thrombin- und Ionophor-induzierte AA-Freisetzung nach Chelatierung von extra- und intrazellulärem Ca^{2+} durch EDTA und BAPTA/AM stark eingeschränkt, wenn auch nicht völlig aufgehoben (nichtsignifikante 1,7- und 1,2-fache Induktion durch Thrombin und A23187). Die Stimulation von Thrombozyten durch Hyperforin hingegen wurde durch die Chelatierung des zellulären Ca^{2+} nicht beeinträchtigt, sondern sogar leicht erhöht. Eine 3,7-fache Stimulation der Phospholipase-Aktivität durch 10 μM Hyperforin wurde in Abwesenheit von Ca^{2+} beobachtet (Abb. 3.3 A/B).

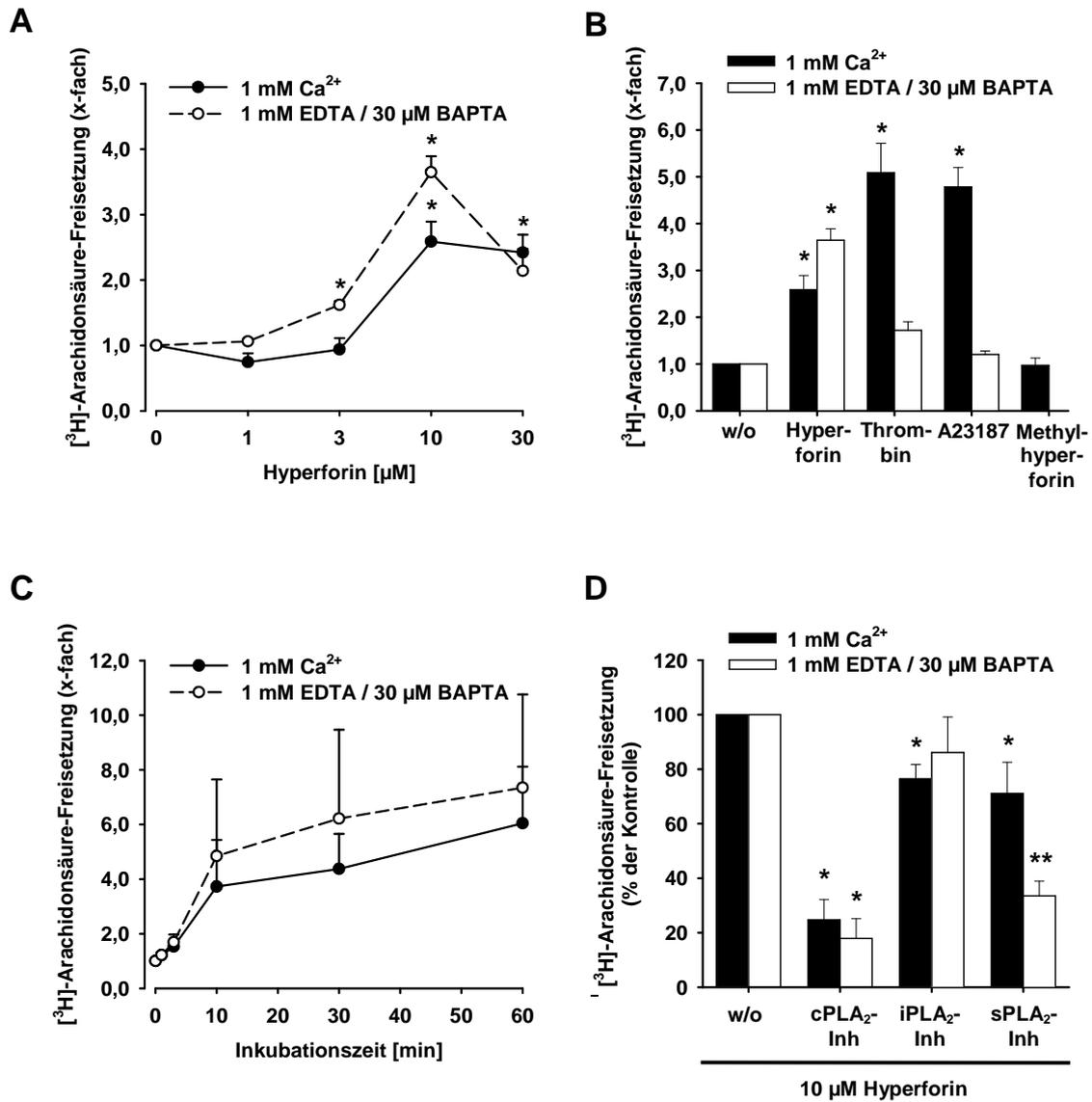


Abb. 3.3 Erhöhung der AA-Freisetzung in Thrombozyten

Thrombozytenreiches Plasma wurde für 2 h bei 37°C mit [³H]-AA behandelt, markierte Zellen wurden anschließend gewaschen, in PBS-Glucose resuspendiert und für 5 min in Anwesenheit von 1 mM CaCl₂ (volle Kreise/schwarze Balken) oder nach Zugabe von 1 mM EDTA und 30 μM BAPTA (leere Kreise/weiße Balken) bei 37°C inkubiert. In den Überstand abgegebene [³H]-AA bzw. deren [³H]-Metabolite wurden nach Abzentrifugation der Zellen im Szintillationszähler quantifiziert. (A) Thrombozyten wurden für 5 min mit den angegebenen Konzentrationen an Hyperforin behandelt. (B) Thrombozyten wurden für 5 min mit DMSO (w/o), 10 μM Hyperforin, 2 U/ml Thrombin, 2,5 μM A23187 oder 10 μM O-Methylhyperforin inkubiert. (C) Inkubationen von Thrombozyten mit 10 μM Hyperforin wurden nach den angegebenen Zeitpunkten abgestoppt. (D) Thrombozyten wurden für 15 min bei 37°C mit DMSO, 5 μM cPLA₂α-Inhibitor, 5 μM BEL (iPLA₂-Inh.) oder 1 mM DTT (sPLA₂-Inh.) behandelt und anschließend für 10 min mit 10 μM Hyperforin inkubiert.

Die Kinetik der Phospholipase-Aktivität unterschied sich nicht in An- und Abwesenheit von Ca²⁺. Die AA-Freisetzung setzte mit einer leichten Verzögerung von ca. 1 min ein und erreichte nach 10 bis 30 min ein Maximum (Abb. 3.3 C).

Bei der kurzfristigen Freisetzung von AA in Thrombozyten nimmt die cPLA₂ eine Schlüsselrolle ein [320], wobei eine Verstärkung der Aktivität durch die sPLA₂ nicht ausgeschlossen werden kann [3]. Beide Enzyme sind Ca²⁺-abhängig, die Ca²⁺-unabhängige iPLA₂ hat eine eher untergeordnete Bedeutung bei der Bereitstellung von AA für die Eikosanoid-Synthese [1, 3].

Durch Vorinkubation von Thrombozyten mit dem cPLA₂α-Inhibitor (5 μM), Bromoenollacton (BEL, 5 μM) und Dithiothreitol (DTT; 1 mM) für 15 min wurde die Rolle der cPLA₂, iPLA₂ und sPLA₂ in der Hyperforin-vermittelten AA-Freisetzung ermittelt. In Korrelation zu den Ergebnissen der 12-H(P)ETE Messung führte die Behandlung der Zellen mit dem cPLA₂-Inhibitor zu einer ca. 80%-igen Reduktion der AA-Freisetzung in An- und Abwesenheit von Ca²⁺. Der Einfluss von BEL mit einer 15- bis 25%-igen Reduktion war eher schwach. Auch DTT konnte in Anwesenheit von Ca²⁺ die Hyperforin-vermittelte AA-Freisetzung nur um 30% hemmen, allerdings wurde nach Chelatierung von Ca²⁺ eine Reduktion der Phospholipidhydrolyse durch DTT um 70% beobachtet (Abb. 3.3 D).

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse konnte auf eine entscheidende Rolle der cPLA₂ geschlossen werden, die weitergehend untersucht wurde. Die Bedeutung der sPLA₂ wurde hier nicht weiter evaluiert.

3.1.3 Ca²⁺-Freisetzung durch Hyperforin

Um zu nachzuprüfen, ob Ca²⁺ durch 1 mM EDTA und 30 μM BAPTA/AM vollständig entfernt wurde, und zur Evaluation des Einflusses von Hyperforin auf den Ca²⁺-Spiegel, wurde die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration gemessen. Thrombozyten wurden mit dem

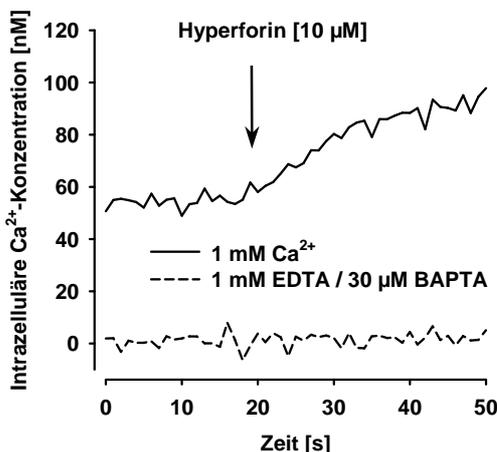


Abb. 3.4 Intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in Thrombozyten

Thrombozyten wurden für 30 min bei 37°C mit Fura-2/AM beladen, gewaschen und in PBS resuspendiert. 1 mM CaCl₂ (durchgezogene Linie) oder 1 mM EDTA und 30 μM BAPTA (gestrichelte Linie) wurden hinzugefügt, die Fluoreszenz wurde gemessen und die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, wie in Material und Methoden beschrieben, ermittelt. 15 s nach dem Start der Messung wurden 10 μM Hyperforin zugegeben.

Dargestellt ist eine von 3 Beispielmessungen.

Fluoreszenzindikator Fura-2/AM beladen und freies bzw. Ca^{2+} -gebundenes Fura-2 anhand der unterschiedlichen Anregungswellenlängen im Fluoreszenzspektrometer bestimmt.

Wie aus der dargestellten exemplarischen Messung (Abb. 3.4) ersichtlich ist, führten 10 μM Hyperforin zu einem langsamen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, der nach 80 s um bis zu 123 nM erhöht wurde. Die Behandlung der Zellen mit 1 mM EDTA und 30 μM BAPTA führte zu einer kompletten Entfernung von intrazellulärem Ca^{2+} und verhinderte ebenso den Hyperforin-induzierten Ca^{2+} -Einstrom.

3.1.4 Induktion der Translokation der cPLA₂

Die cPLA₂-abhängige Freisetzung von AA in Thrombozyten setzt die Translokation des Enzyms aus cytosolischen Kompartimenten an die Plasmamembran voraus. Durch Zellfraktionierung und Analyse der membranären und zytosolischen Fraktionen konnte dieser Prozess beobachtet werden. Dabei wurden Thrombozyten nach 5-minütiger Inkubation mit steigenden Konzentrationen Hyperforin durch Einfrier-Auftau-Vorgänge lysiert und durch Zentrifugation bei 100.000xg wurden die unlöslichen Membranfraktionen vom zytosolischen Kompartiment abgetrennt. Aliquots beider Fraktionen wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blot auf die cPLA₂ untersucht. Als Kontrollen

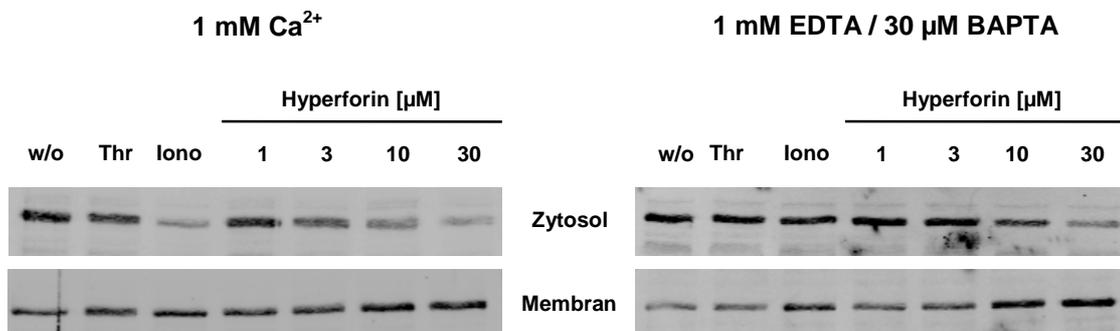


Abb. 3.5 Induktion der Translokation der cPLA₂ durch Hyperforin

Intakte Thrombozyten wurden mit DMSO (w/o), 2 U/ml Thrombin (Thr), 2,5 μM A23187 (Iono) oder Hyperforin in den angegebenen Konzentrationen für 5 min bei 37°C in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 oder 1 mM EDTA und 30 μM BAPTA inkubiert, anschließend durch Einfrier-Auftau-Prozesse lysiert und durch Zentrifugation bei 100.000xg in eine lösliche (Zytosol) und unlösliche (Membran) Fraktion aufgetrennt. Die subzelluläre Verteilung der cPLA₂ in beiden Fraktionen wurde durch Western Blot untersucht.

dienten 2 U/ml Thrombin und 2,5 μM Ca^{2+} -Ionophor A23187. Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte nach Inkubation mit Thrombin nur eine schwache Umverteilung der cPLA₂ aus dem Zytosol an die Membran detektiert werden, wohingegen A23187 zu

einer deutlichen Translokation der cPLA₂ führte. Die Stimulation von Thrombozyten mit Hyperforin bewirkte ebenfalls eine Translokation der cPLA₂, die vor allem bei Hyperforinkonzentrationen von 10 und 30 µM auftrat. Im Gegensatz zur Konzentrationskurve bei der AA-Freisetzung kann allerdings kein Maximum bei 10 µM Hyperforin festgestellt werden.

Nach Chelatierung von extra- und intrazellulärem Ca²⁺ mit EDTA/BAPTA ist die Bindung an Membranen in der Negativkontrolle sowie nach Stimulation mit Thrombin und A23187 stark beeinträchtigt. Die Inkubation mit Hyperforin allerdings führt auch unter diesen Bedingungen zu einer Umverteilung der cPLA₂ an die Plasmamembranen (Abb. 3.5).

3.1.5 Aktivierung der p38MAPK durch Hyperforin

Die Signaltransduktion der rezeptorvermittelten Aktivierung der cPLA₂ erfolgt zum Teil über die Aktivierung von Kinasen und die Phosphorylierung der cPLA₂ [156]. Da diese besonders bei niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen von Bedeutung ist, wurde die Phosphorylierung der cPLA₂ sowie der Kinasen p38MAPK, Mnk1 und ERK-1/2 durch Hyperforin untersucht.

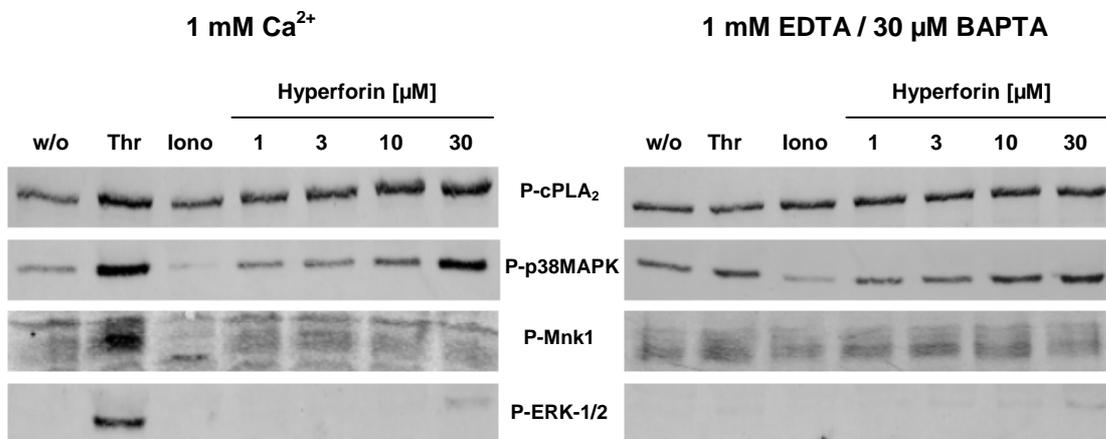


Abb. 3.6 Einfluss von Hyperforin auf die Phosphorylierung der cPLA₂ und der Kinasen p38MAPK, Mnk1 und ERK-1/2

Intakte Thrombozyten wurden mit DMSO (w/o), 2 U/ml Thrombin (Thr), 2,5 µM A23187 (Iono) oder Hyperforin in den angegebenen Konzentrationen für 5 min bei 37°C in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ oder 1 mM EDTA und 30 µM BAPTA inkubiert. Aliquots entsprechend 16 x 10⁶ Zellen wurden im Western Blot auf phosphorylierte cPLA₂, p38MAPK, Mnk1 und ERK-1/2 untersucht.

Hierzu wurden Thrombozyten für 5 min mit Hyperforin, Thrombin, A23187 oder Dimethylsulfoxid (DMSO) inkubiert und die gesamten Zelllysate nach SDS-

Gelelektrophorese und Western Blot mit Hilfe der jeweiligen Antikörper analysiert. Als Ladekontrollen dienten jeweils die unphosphorylierten Enzyme.

Nach Inkubation von Thrombozyten mit steigenden Mengen Hyperforin konnte eine deutliche Phosphorylierung der cPLA₂ konstatiert werden. Die Stärke der Phosphorylierung war vergleichbar mit der Thrombin-induzierten Aktivierung. Im Gegensatz zu Thrombin steigerte Hyperforin allerdings auch in Abwesenheit von Ca²⁺ den Phosphorylierungsstatus der cPLA₂.

A23187 als rezeptor-unabhängiger Stimulus wirkt nur als schwacher Aktivator der Kinasen in Thrombozyten [60] und konnte die Phosphorylierung der cPLA₂ auch in den vorliegenden Befunden nicht erhöhen.

In weiteren Western-Blot-Analysen wurde die Rolle der Kinasen p38MAPK, Mnk1 und ERK-1/2 untersucht, die alle durch Thrombin aktiviert werden konnten. Dabei wurde konzentrationsabhängig eine Phosphorylierung der p38MAPK durch Hyperforin gefunden, die auch in Abwesenheit von Ca²⁺ auftrat. Mnk1 und ERK-1/2 hingegen wurden durch Hyperforin nicht beeinflusst (Abb. 3.6).

Auf Grund von Berichten über einen Einfluss der CaMKII in glatten Muskelzellen, wurden Thrombozyten auch auf diese Kinase hin untersucht, sie konnte allerdings nicht detektiert werden (ohne Abbildung).

3.1.6 Die Rolle der MAPK-Phosphorylierung bei Hyperforin-Effekten

Um einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung der p38MAPK und der verstärkten Phosphorylierung der cPLA₂ zu untersuchen, wurden Thrombozyten vor der Inkubation mit Hyperforin für 15 min mit dem Inhibitor SB203580 behandelt. SB203580 unterdrückt die Aktivierung der p38MAPK und der Mnk1 durch Hemmung der übergeordneten MAPK aktivierten Proteinkinase (MAPKAP) 2 [59]. ERK-1/2 vermittelte Prozesse wurden mit Hilfe von U0126 inhibiert, welches die ERK-aktivierenden Kinasen MEK1 und MEK2 (MAPK/ERK Kinasen) inhibiert [59]. Wie erwartet, konnte U0126 die Phosphorylierung der cPLA₂ nicht vermindern, durch SB203580 hingegen wurde sie komplett geblockt (Abb. 3.6 A). Dennoch wurde keine Beeinträchtigung der AA-Freisetzung und Translokation der cPLA₂ in Gegenwart der MAPK-Inhibitoren festgestellt. Auch die Hyperforin induzierte 12-H(P)ETE-Produktion wurde durch die Hemmung der drei Kinasen nicht reduziert (Abb. 3.7 B-D).

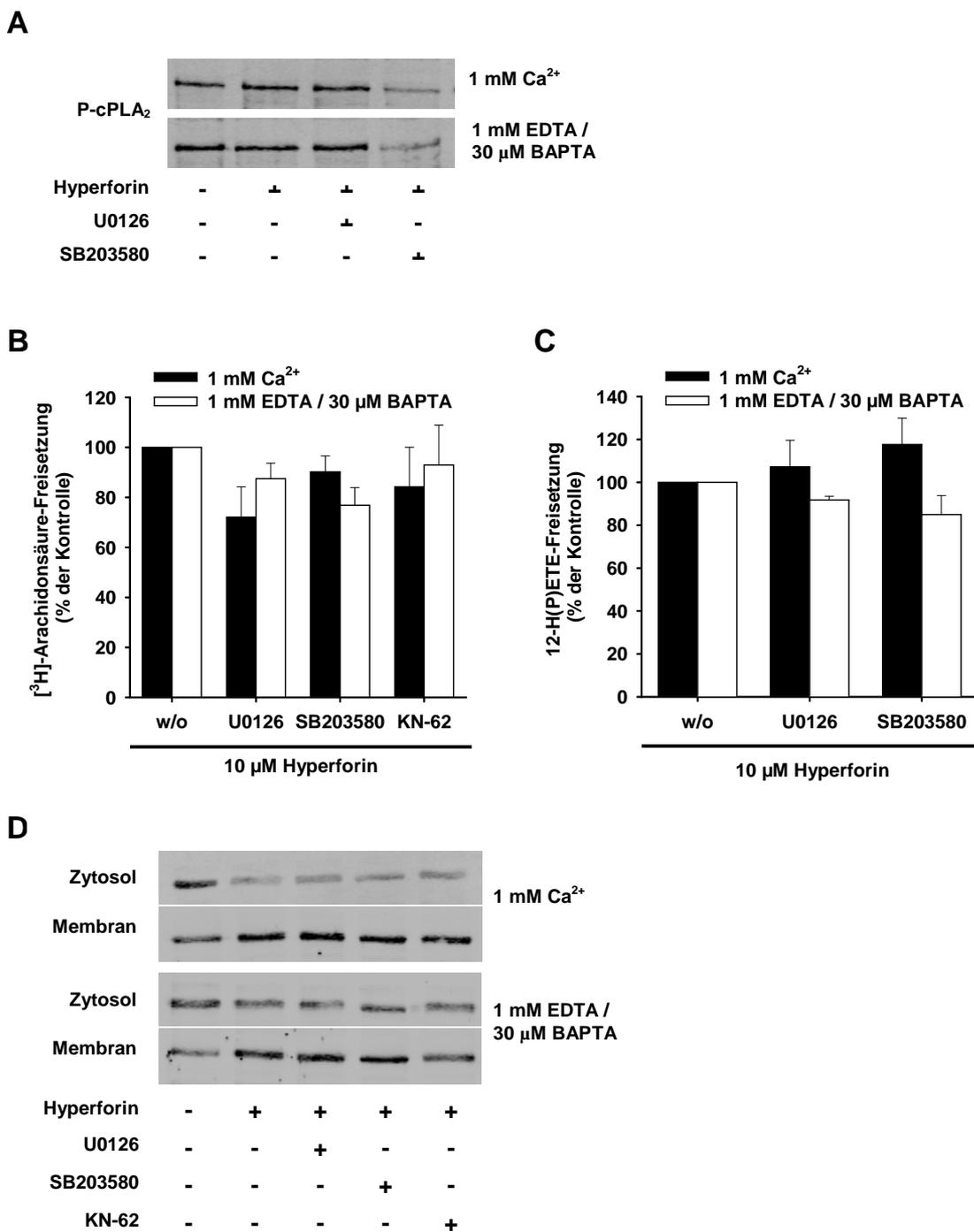


Abb. 3.7 Effekte der MAPK- und CaMKII-Inhibitoren auf die AA-Freisetzung, 12-H(P)ETE-Produktion und Translokation der cPLA₂

Intakte Thrombozyten wurden mit DMSO (w/o), 3 μM U0126, 10 μM SB203580 oder 5 μM KN-62 für 15 min bei 37°C behandelt und für 5 min (A/B/D) bzw. 10 min (C) inkubiert. (A) Aliquots (entspr. 16 x 10⁸ Zellen) wurden im Western Blot auf phosphorylierte cPLA₂ analysiert. (B) Aus [³H]-AA beladenen Thrombozyten wurde die Freisetzung der markierten AA gemessen. (C) 12-H(P)ETE wurde mittels HPLC quantifiziert. (D) Zellen wurden durch Einfrier-Auftau-Prozesse lysiert, durch Zentrifugation bei 100.000xg in eine lösliche (Zytosol) und unlösliche (Membran) Fraktion aufgetrennt und die Verteilung der cPLA₂ in beiden Fraktionen wurde mittels Western Blot analysiert.

Weiterhin wurde mit Hilfe des spezifischen CaMKII-Inhibitors KN-62 auf einen möglichen Einfluss der CaMKII getestet. KN-62 konnte weder die AA-Freisetzung noch die subzelluläre Umverteilung der cPLA₂ verhindern (Abb. 3.7 B/D).

3.1.7 Co-Stimulation mit Thrombin und Ionophor

Zur Analyse von additiven Effekten von Hyperforin mit den rezeptorvermittelten bzw. rezeptorunabhängigen Stimuli Thrombin und A23187 wurden Thrombozyten 1 min nach Zugabe von Hyperforin mit Thrombin bzw. A23187 versetzt. Eine weitere Steigerung der Thrombin- bzw. A23187-induzierten AA-Freisetzung konnte dabei nicht beobachtet werden. Allerdings hemmten 1 und 3 μM Hyperforin die Thrombin-abhängige Phospholipid-Hydrolyse um 49 bzw. 44%. Bei höheren Hyperforin-Konzentrationen stieg die AA-Freisetzung hingegen wieder an (Abb. 3.8 A). Ein möglicher Zusammenhang dieses Effekts mit einer Hemmung des GPCR-abhängigen Ca^{2+} -Einstroms, wie bereits in PMNL beschrieben [266], konnte durch Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hergestellt werden. 0,5 U/ml Thrombin induzierten einen Ca^{2+} -Einstrom von durchschnittlich 174 ± 30 nM, der durch Hyperforin mit einem IC_{50} von 1,2 μM gehemmt wurde (Abb. 3.8 C/E).

Die A23187-vermittelte Freisetzung von AA wurde durch Hyperforin nicht beeinträchtigt (Abb. 3.8 B). In Analogie dazu konnte Hyperforin auch die Ionophore induzierte Ca^{2+} -Freisetzung nicht beeinflussen (Abb. 3.8 D/F). Auf Grund von Quenching-Effekten durch A23187 in der Fluoreszenzdetektion wurde hier Ionoymcin verwendet.

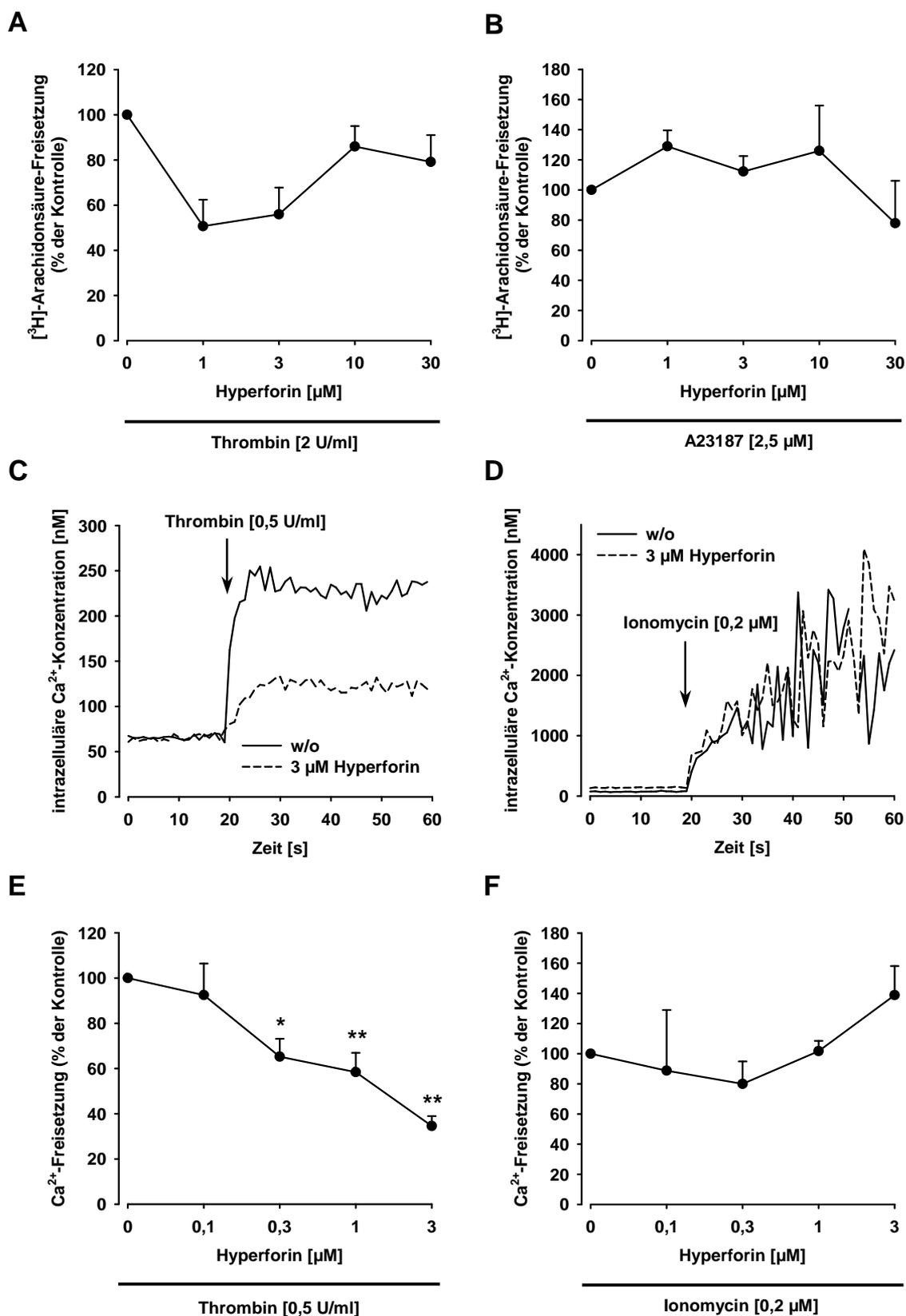


Abb. 3.8 Einfluss von Hyperforin auf die Thrombin- und Ionophor-induzierte Thrombozytenaktivierung

Thrombozyten wurden mit Hyperforin für 15 min bei 37°C vorbehandelt und mit 2 bzw. 0,5 U/ml Thrombin oder 2,5 μM A23187 bzw. 0,2 μM Ionomycin versetzt. (A/B) Die Zellen wurden für 5 min bei 37°C inkubiert und freigesetzte [^3H]-AA im Szintillationszähler quantifiziert. (C-F) Die Proben wurden bei 37°C im Fluoreszenzspektrometer wie in Material und Methoden beschrieben vermessen und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ermittelt. Dargestellt ist jeweils 1 von 3 Beispielmessungen (C/D) bzw. die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulus-Zugabe in Relation zur Kontrolle (ohne Hyperforin) (E/F).

3.2 Stimulus-abhängige Modulation der cPLA₂ in PMNL

3.2.1 Hyperforin-Effekte auf die AA-Freisetzung in PMNL

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Thrombozyten auf andere Zellen sollte evaluiert werden. Daher wurde der Einfluss von Hyperforin auf die cPLA₂ in frisch isolierten PMNL untersucht. PMNL wurden mit Tritium-markierter AA beladen und nach Inkubation für 5 min bei 37°C wurde die freigesetzte markierte AA im Szintillationszähler quantifiziert. Die Behandlung der Zellen mit steigenden Mengen Hyperforin für 5 min ergab dabei im Gegensatz zu den Befunden in Thrombozyten keine Steigerung der AA-Freisetzung (Abb. 3.9 A). A23187 und der ATPase-Inhibitor Thapsigargin [321] stimulierten die AA-Freisetzung 3,3-fach, die Inkubation von PMNL mit dem GPCR-abhängigen Stimulus fMLP (verstärkt durch den PKC-Aktivator PMA) war allerdings kaum detektierbar (1,2-fachen Erhöhung) (Abb. 3.9 B).

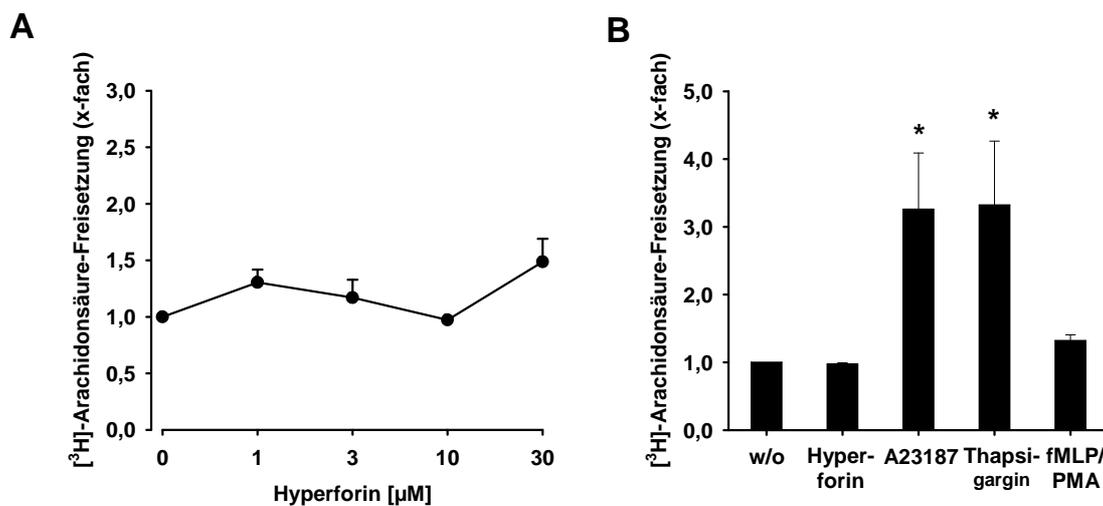


Abb. 3.9 Einfluss von Hyperforin auf die AA-Freisetzung in PMNL

Frisch isolierte PMNL wurden für 2 h mit [³H]-AA beladen, anschließend gewaschen und in PBS-Glucose plus 1 mM CaCl₂ für 5 min mit 0 bis 30 µM Hyperforin (A) bzw mit DMSO (w/o), 10 µM Hyperforin, 2,5 µM A23187, 1 µM Thapsigargin oder 1 µM fMLP und 0,1 µM PMA (B) inkubiert. Freigesetzte [³H]-AA wurde im Szintillationszähler quantifiziert.

Wurden die Zellen hingegen mit Hyperforin für 15 min vorbehandelt, mit 2,5 µM Ionophore A23187 oder Thapsigargin versetzt und für 5 min bei 37°C inkubiert, so hemmte Hyperforin die induzierte AA-Freisetzung mit einem IC₅₀ von 1,9 µM bzw. 1,5 µM (Abb. 3.10 B). Dieser Befund konnte auch in differenzierten MonoMac 6 Zellen (MM6) reproduziert werden, allerdings war der Effekt nicht so ausgeprägt wie in PMNL.

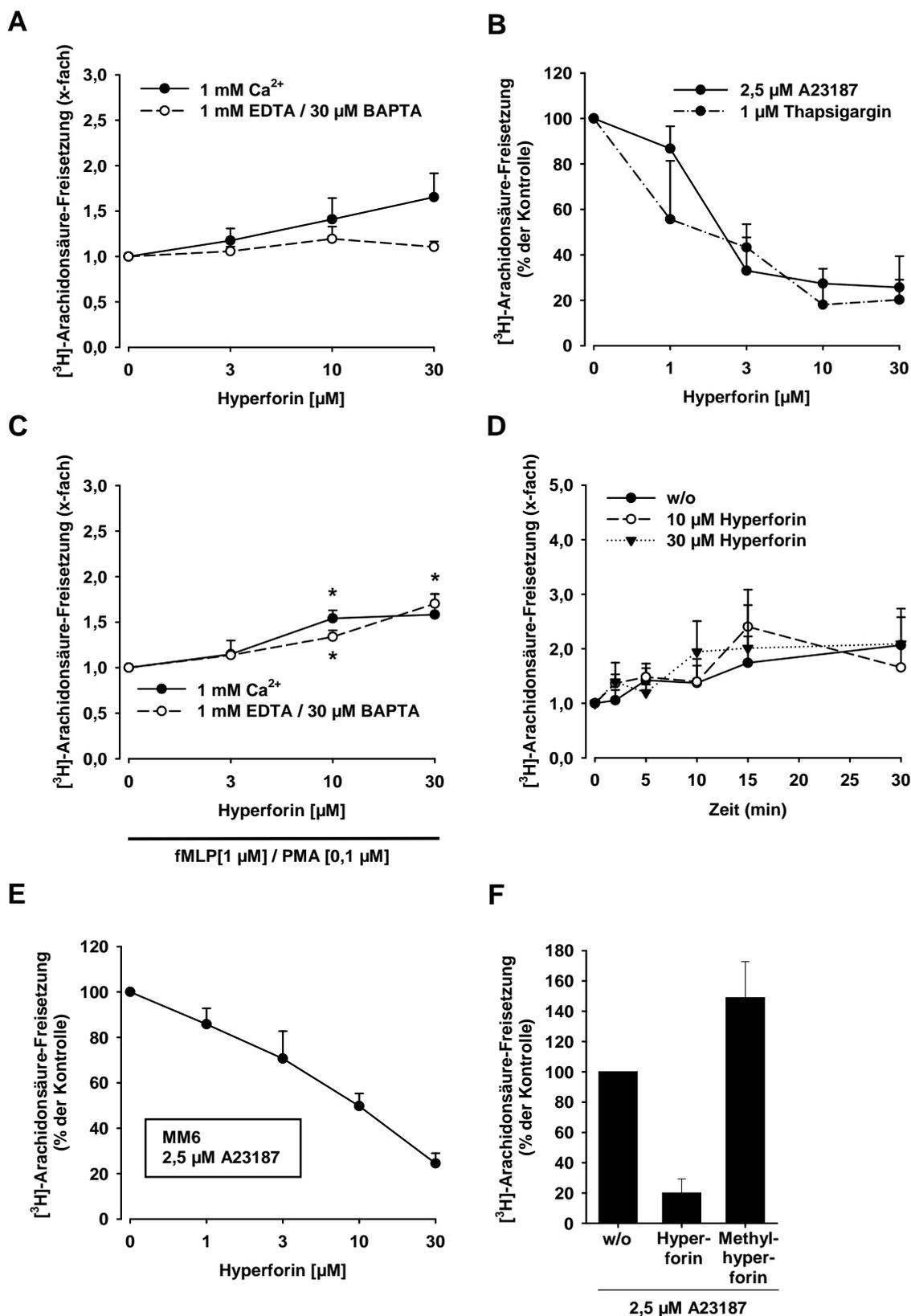


Abb. 3.10 Effekte von *Hyperforin* auf die *A23187*-, *Thapsigargin*- und *fMLP/PMA*-induzierte *AA*-Freisetzung

[^3H]-beladene PMNL (A-C) oder differenzierte MM6 (E) wurden 15 min vor Reaktionsstart bei Raumtemperatur mit *Hyperforin* versetzt und in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 (volle Kreise) oder 1 mM EDTA und 30 μM BAPTA (weiße Kreise) für 5 min bei 37°C mit DMSO (A), 2,5 μM A23187 bzw. 1 μM Thapsigargin (B/E) oder 1 μM fMLP und 0,1 μM PMA (C) inkubiert. (D) Die Inkubation von [^3H]-beladenen PMNL mit DMSO (w/o) bzw. 10 oder 30 μM *Hyperforin* wurde nach den angegebenen Zeitpunkten abgestoppt. (E) [^3H]-beladene PMNL wurden für 15 min mit DMSO (w/o), 10 μM *Hyperforin* oder 10 μM *O*-Methyl*hyperforin* behandelt und in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 für 5 min bei 37°C mit 2,5 μM A23187 inkubiert. Aus den jeweiligen Überständen wurde die freigesetzte [^3H]-AA quantifiziert.

Die Vorbehandlung von MM6 mit Hyperforin verminderte die A23187-induzierte AA-Freisetzung mit einem IC₅₀ Wert von 10 µM (Abb. 3.10 E). Die Veresterung der Säurefunktion des Hyperforins führte erneut zu einer Aufhebung der Effekte. O-Methylhyperforin konnte die A23187-stimulierte AA-Freisetzung nicht hemmen, sondern verstärkte sie sogar leicht (1,5-fach) (Abb. 3.10 F).

Der schwache fMLP/PMA-Effekte wiederum wurde durch Vorbehandlung der Zellen mit steigenden Konzentrationen Hyperforin schwach (1,6-fach bei 30 µM Hyperforin) aber signifikant (ab 10 µM) erhöht (Abb. 3.10 C). Die Durchführung der Versuche mit DMSO führte allerdings zu vergleichbaren Ergebnissen (Abb. 3.10 A). Die 15-minütige Vorbehandlung der Zellen mit Hyperforin bewirkte einen bis zu 1,7-fachen Anstieg der AA-Freisetzung. In der daraufhin durchgeführten Langzeitmessung der AA-Freisetzung konnten aber keine Effekte von Hyperforin allein bestätigt werden (Abb. 3.10 D).

3.2.2 Beeinträchtigung der Phosphorylierung der Kinasen

Um die Frage zu klären, ob durch die 15-minütige Vorinkubation mit Hyperforin die Phosphorylierung der cPLA₂ beeinflusst wird, wurden PMNL analog zu den Aktivitätsversuchen für 15 min mit Hyperforin bei Raumtemperatur behandelt und 5 min bei 37°C mit dem jeweiligen Stimulus oder DMSO inkubiert. Aliquots wurden anschließend über SDS-Gelelektrophorese und Western Blots analysiert. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Detektion der cPLA₂ in PMNL konnte die Phosphorylierung der

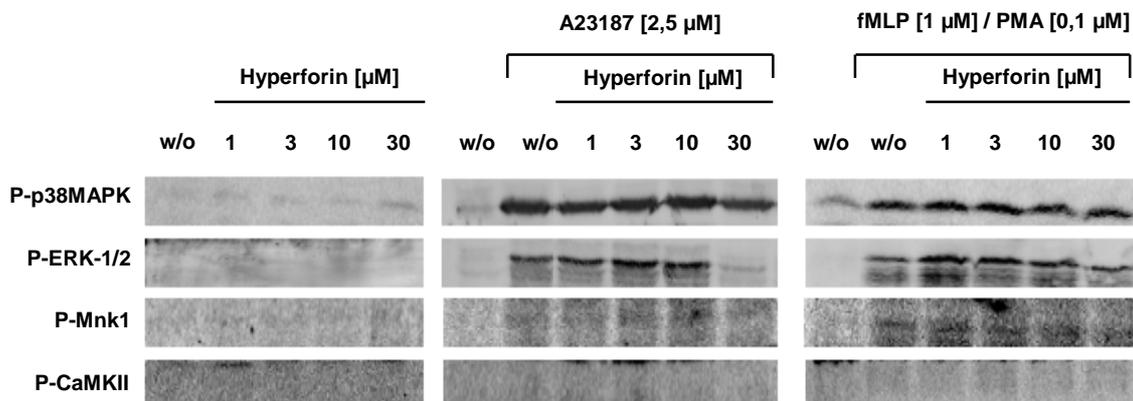


Abb. 3.11 Der Einfluss von Hyperforin auf die Phosphorylierung der Kinasen p38MAPK, Mnk1, ERK-1/2 und CaMKII in PMNL

Intakte PMNL wurden für 15 min mit DMSO (w/o) oder Hyperforin in den angegebenen Konzentrationen behandelt und für 5 min bei 37°C in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ mit DMSO (w/o), 2,5 µM A23187 oder 1 µM fMLP und 0,1 µM PMA inkubiert. Aliquots entsprechend 1,6 x 10⁶ Zellen wurden im Western Blot auf die phosphorylierten Kinasen untersucht.

cPLA₂ nicht direkt ermittelt werden. Stattdessen wurde die Phosphorylierung der Kinasen p38MAPK, ERK-1/2, Mnk1 und CaMKII untersucht. Als Ladekontrolle dienten jeweils die unphosphorylierten Enzyme. Nach Behandlung der Zellen mit DMSO konnte keine Aktivierung der Kinasen gefunden werden. Die Stimulation mit Ionophor und fMLP/PMA hingegen führte zu einer deutlichen Phosphorylierung von p38, ERK und Mnk1. CaMKII konnte, im Gegensatz zu Thrombozyten, in PMNL detektiert werden (ohne Abbildung), allerdings wurde keine Aktivierung dieses Enzyms beobachtet. Hyperforin zeigte keine Effekte bezüglich der Ionophore- und fMLP/PMA-induzierten Kinasen-Aktivierung in Konzentrationen von bis zu 10 µM. Erst 30 µM Hyperforin konnten die Phosphorylierung der p38MAPK und der Mnk1 reduzieren. Weiterhin konnte auch bei direkter Stimulation mit Hyperforin kein Einfluss von Hyperforin auf die Kinasen beobachtet werden. Weder p38MAPK, Mnk1 oder ERK-1/2 noch CaMKII wurden durch Hyperforin phosphoryliert (Abb. 3.11).

3.3 Hyperforin-Effekte in Thrombozyten und PMNL im alternativen AA-Freisetzungs-Assay

Die Analyse der cPLA₂-Aktivität in Thrombozyten und PMNL erfolgte wie oben beschrieben. Dieses Verfahren ist eine sensitive Methode zur Messung der Phospholipase-Aktivität, spiegelt aber nicht vollständig den physiologischen Kontext wieder, da neben den metabolisch aktiven, [³H]-AA inkorporierenden PL, auch weitere PL der Hydrolyse durch die cPLA₂ unterliegen.

So konnte in PMNL 1-O-Alk-en-yl-PE (Plasmalogen) als Hauptpool der AA identifiziert werden, während nach Radiomarkierung [³H]-AA vor allem aus Diacyl-PC und 1-Alkyl-PC freigesetzt wird [97, 322]. In Thrombozyten nach Thrombin-Stimulation ergibt sich sowohl nach der radioaktiven Messmethode, als auch durch Bestimmung von Massenverlusten eine AA-Freisetzung aus 1,2-Diacyl-PC und -PE, wobei aber auch eine Freisetzung von AA aus Plasmalogen und eine anschließende Übertragung von AA aus Diacyl-Spezies in 1-O-Alk-en-yl-LysoPE diskutiert wird [96, 100, 323].

Um auszuschließen, dass es sich bei der Hyperforin-vermittelten Hemmung der cPLA₂ in PMNL und insbesondere bei der Phospholipid-Hydrolyse aus Thrombozyten um methodenspezifische Effekte handelt, wurden die Schlüsselversuche in einer alternativen Methode wiederholt. Die freigesetzte AA wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, nach Derivatisierung mit p-Anisidiniumchlorid mittels HPLC quantifiziert. Die

Ergebnisse korrelierten mit den Befunden aus dem radioaktiven Assay. In Thrombozyten stimulierte Hyperforin die Freisetzung von AA 3,5- und in Abwesenheit von Ca^{2+} sogar bis zu 6,8-fach (Abb. 3.12 A). Die starke Aktivierung in Abwesenheit von Ca^{2+} war auf sehr niedrige AA-Spiegel in der Bezugsprobe zurückzuführen. Ausgedrückt in Absolutwerten wurden in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} bis zu 0,69 bzw. 0,52 nmol AA pro 3×10^7 Zellen in 60 min freigesetzt.

In PMNL hingegen konnte die Hemmung der A23187-induzierten AA-Freisetzung bestätigt werden. Hyperforin inhibierte die cPLA₂ mit einem IC₅₀ von 1,1 μM (Abb. 3.12 B).

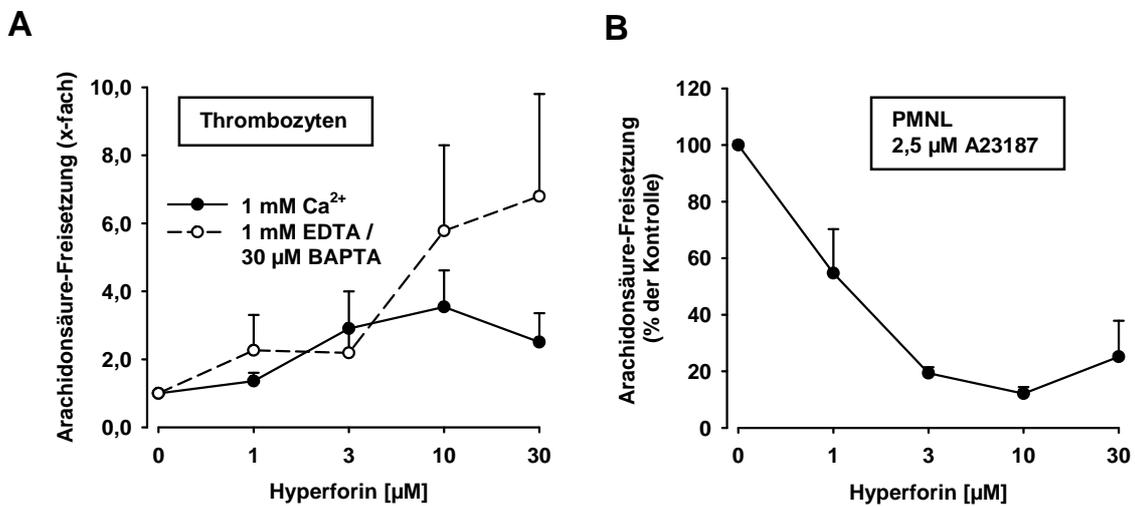


Abb. 3.12 Detektion der AA-Freisetzung aus Thrombozyten und PMNL im HPLC-Assay

(A) Frisch isolierte Thrombozyten wurden in PBS-Glucose in Anwesenheit von 1 mM CaCl_2 (volle Kreise) oder 1 mM EDTA und 30 μM BAPTA (leere Kreise) für 10 min bei 37°C mit Hyperforin inkubiert. (B) Aufgereinigte PMNL wurden in PBS-Glucose mit 1 mM CaCl_2 für 15 min mit Hyperforin bei Raumtemperatur vorinkubiert, mit 2,5 μM A23187 versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Freigesetzte AA wurde jeweils über C18-Säulen aufgereinigt, mit p-Anisidiniumchlorid derivatisiert und mittels HPLC vermessen. Die Metabolisierung der freigesetzten AA durch 12-LO und COX-1 bzw. 5-LO wurde durch Zugabe von 50 μM NDGA, 200 μM ASS (A) und 300 nM BWA4C (B) unterbunden.

3.4 Untersuchung des Einflusses von Hyperforin auf die cPLA₂ in Zellhomogenaten

Aus den oben dargestellten Befunden heraus wurde auf einen zelltypabhängigen Einfluss Hyperforins auf die cPLA₂ geschlossen, der unabhängig von der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und von der Aktivierung durch MAPK erfolgt. Daher ergab sich die Frage, inwieweit Hyperforin in der Lage ist, die cPLA₂ direkt zu beeinflussen.

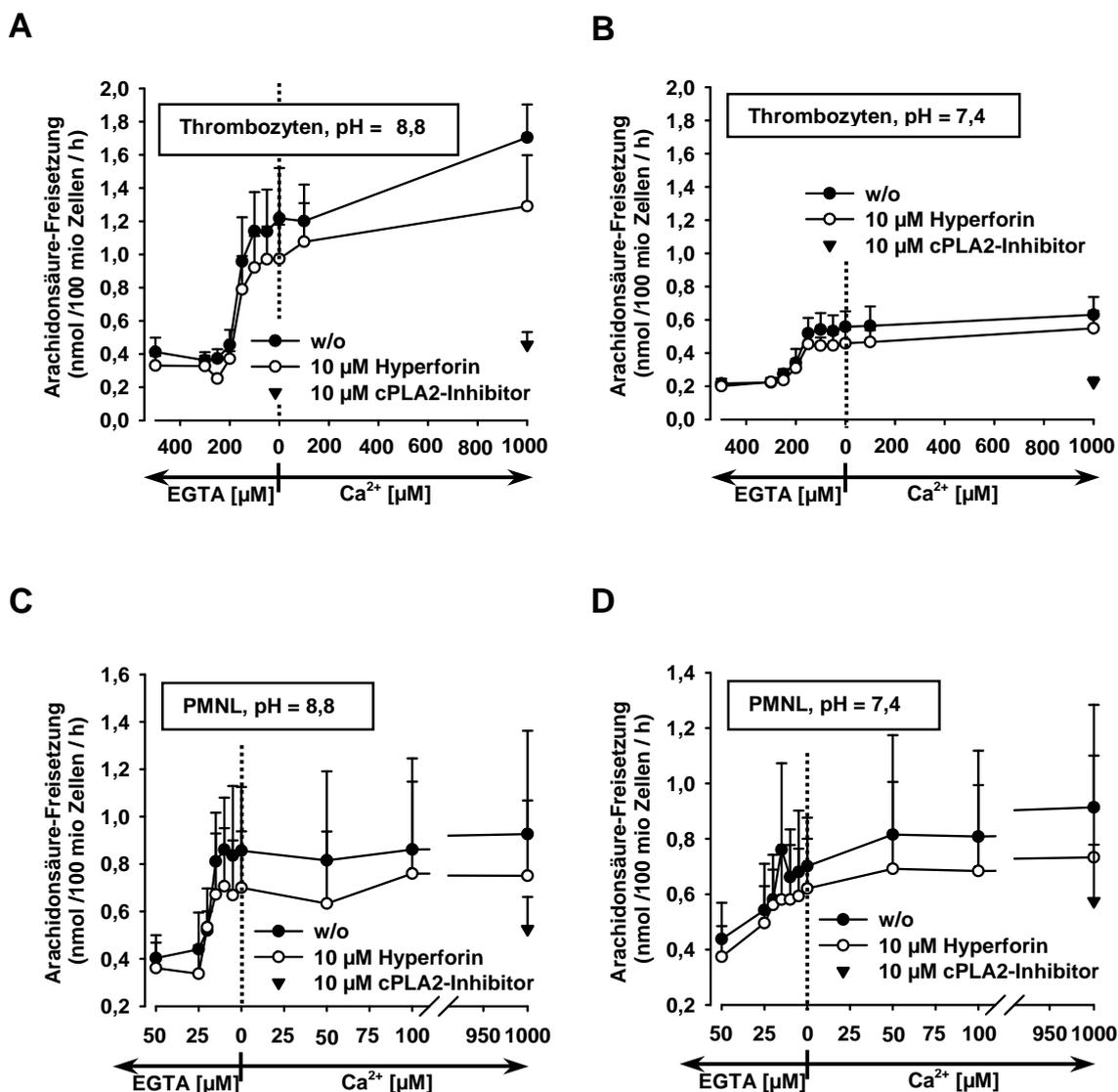


Abb. 3.13 Messungen der AA-Freisetzung in Zellhomogenaten

Thrombozyten (A/B) bzw. PMNL (C/D) wurden in Lyse-Puffer bei pH 8,8 (A/C) oder pH 7,4 (B/D) in Gegenwart von 500 (A/B) bzw. 50 μM EGTA (C/D) durch Ultraschall lysiert und nach Zugabe von DMSO (volle Kreise), 10 μM Hyperforin (leere Kreise) oder 10 μM cPLA₂α-Inhibitor (volle Dreiecke) sowie der entsprechenden Mengen CaCl₂ bei 37°C für 60 min inkubiert. Freigesetzte AA wurde nach Derivatisierung mit p-Anisidiniumchlorid mittels HPLC quantifiziert.

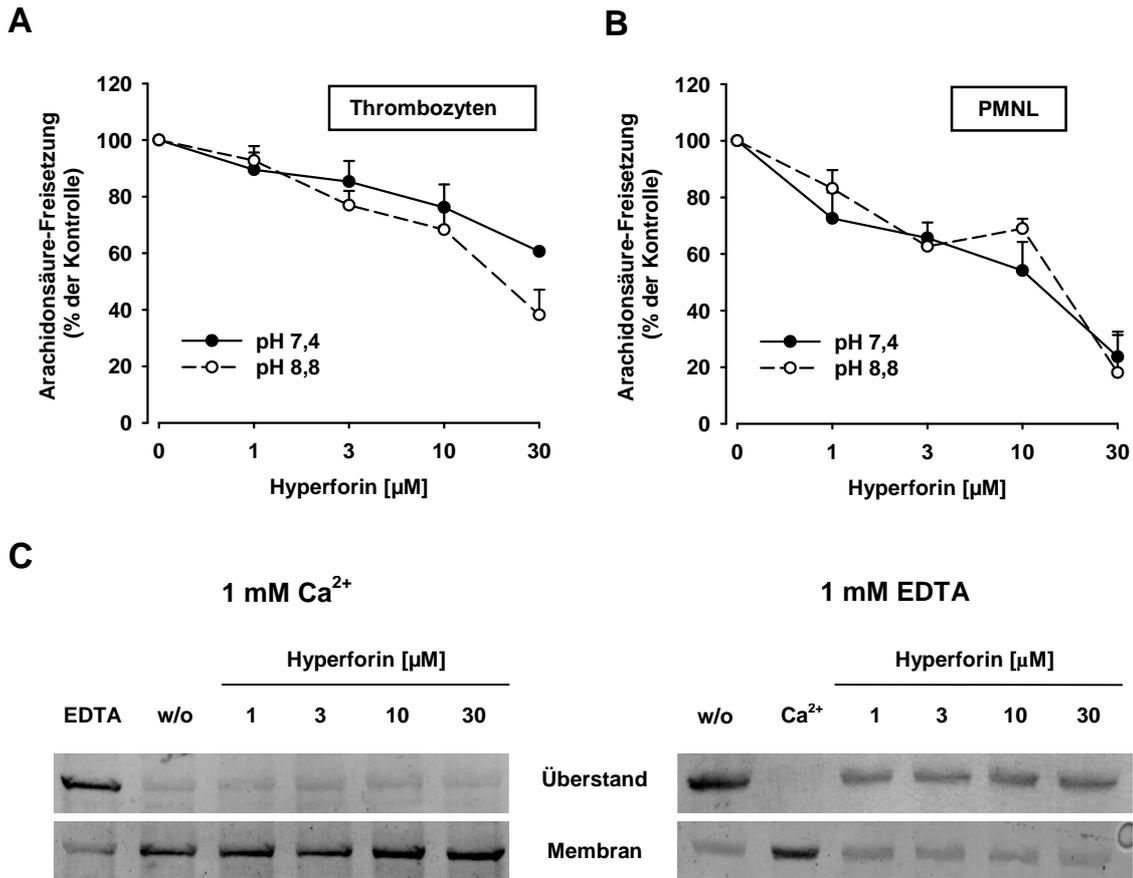


Abb. 3.14 Hyperforin hemmt die cPLA₂-Aktivität moderat nicht aber die Membranassoziation. Thrombozyten (A/C) bzw. PMNL (B) wurden in Lyse-Puffer bei pH 8,8 (volle Kreise) oder pH 7,4 (leere Kreise, C) in Gegenwart von 1 mM EDTA durch Ultraschall lysiert und nach Zugabe von DMSO oder Hyperforin sowie von 2 mM CaCl₂ für 60 min bei 37°C inkubiert. (A/B) Freigesetzte AA wurde nach Derivatisierung mit p-Anisidiniumchlorid mittels HPLC quantifiziert. (C) Zellysate wurden durch Zentrifugation bei 100.000xg in eine lösliche (Überstand) und unlösliche (Membran) Fraktion getrennt. Die Verteilung der cPLA₂ in beiden Fraktionen wurde via Western Blot der entsprechenden Aliquots ermittelt.

Daher wurde zunächst der Effekt des Hyperforins in Zellysaten untersucht. Thrombozyten und PMNL wurden durch Ultraschall lysiert, für 1 h bei 37°C inkubiert und die freigesetzte AA wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, mit Hilfe der HPLC detektiert. cPLA₂ zeigt maximale Aktivität bei einem pH von 8 bis 10 [94, 324]. Daher wurden die Versuche sowohl bei einem physiologischen pH von 7,4 als auch bei pH 8,8 durchgeführt. Durch Zugabe von Ca²⁺ und EGTA wurden verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen eingestellt. EGTA wurde hier anstelle von EDTA auf Grund seiner höheren Spezifität für Ca²⁺ als Ca²⁺-Chelator eingesetzt [325]. Dabei fiel auf, dass auch in Anwesenheit von bis zu 150 μM bzw. 15 μM EGTA im Thrombozyten- bzw. PMNL-Lysat cPLA₂-Aktivität detektiert werden konnte (Abb. 3.13). Tatsächlich ergab die Messung der Ca²⁺-Konzentrationen in

den Homogenaten, dass erst nach Zugabe von 200 bzw. 15 μM EGTA das intrazelluläre Ca^{2+} aus Thrombozyten und PMNL vollständig chelatiert werden konnte (ohne Abbildung).

In Gegenwart von Ca^{2+} hemmte Hyperforin die Aktivität der cPLA_2 leicht und unabhängig von der vorliegenden Ca^{2+} -Konzentration. Unter EGTA war kein Effekt (Thrombozyten) bzw. eine sehr schwache Hemmung (PMNL) zu beobachten. Eine Aktivierung der cPLA_2 konnte aber nicht verzeichnet werden.

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung wurden Thrombozyten und PMNL-Homogenate mit steigenden Konzentrationen an Hyperforin versetzt und nach Zugabe von 1 mM Ca^{2+} 1 h bei 37°C inkubiert. Die ermittelten IC_{50} -Werte lagen im Thrombozyten-Homogenat bei $>30 \mu\text{M}$ (pH 7,4) bzw. $19 \mu\text{M}$ (pH 8,8) und im PMNL-Homogenat bei $7,8 \mu\text{M}$ (pH 7,4) und $10,4 \mu\text{M}$ (pH 8,8) (Abb. 3.14 A/B).

Ferner wurde im Thrombozyten-Homogenat der Einfluss von Hyperforin auf die Bindung an Membranen analysiert. Nach der 10-minütigen Inkubation des Homogenats mit 1 mM Ca^{2+} oder 1 mM EDTA in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen Hyperforin wurde das Lysat durch Zentrifugation bei $100.000\times g$ in eine Membran- und eine Zytosolfraction aufgetrennt und die cPLA_2 wurde in den jeweiligen Fraktionen über Western Blot detektiert. Durch Ca^{2+} wurde die Bindung der cPLA_2 an die Membranen forciert, die durch Hyperforin trotz der schwachen Hemmung der cPLA_2 -Aktivität nicht unterbunden wurde (Abb. 3.14 C).

3.5 Beeinflussung der cPLA_2 im zellfreien System

Im Folgenden sollte der Einfluss von Hyperforin auf die cPLA_2 im zellfreien System untersucht werden. Zwei verschiedene Assays standen hierbei zur Verfügung. Zum einen konnte die cPLA_2 -Aktivität an artifiziellen Liposomen (große Laminare Vesikel), zum anderen an Mizellen (Multilamellare Vesikel versetzt mit 4-facher Menge an Triton-X-100) gemessen werden. Im Gegensatz zur Messung an Liposomen spielen im Mizellbasierten Assay Membraneffekte keine Rolle mehr. Vielmehr kommt hier der direkte Einfluss der Membrankomponenten per se auf die cPLA_2 zum tragen.

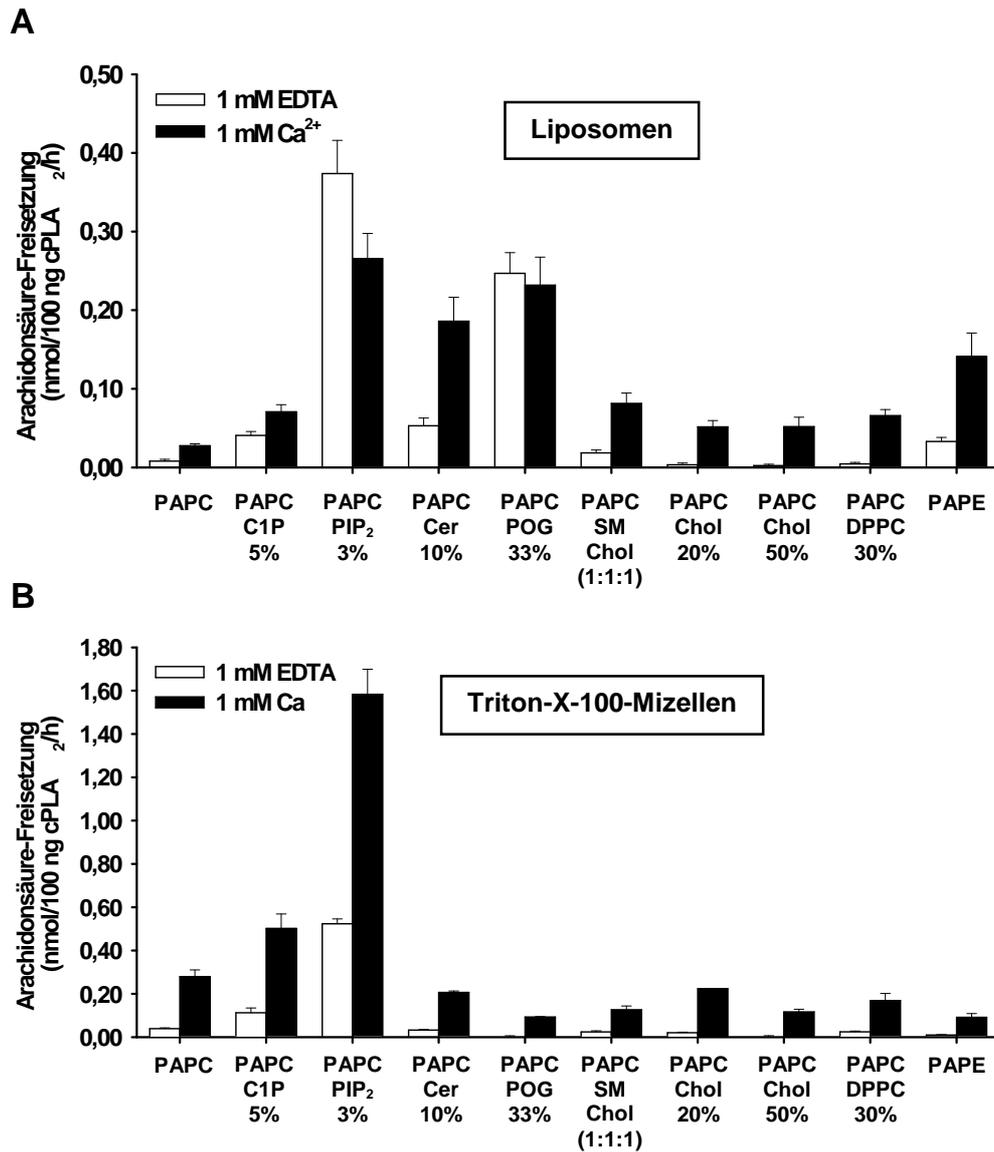


Abb. 3.15 Freisetzung von AA im Liposomen- und Mizellenaktivitätsassay

Liposomen und Triton-X-100-Mizellen in den angegebenen Zusammensetzungen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, generiert und in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ (schwarze Balken) oder 1 mM EDTA (weiße Balken) mit 500 ng cPLA₂ für 60 min inkubiert. Freigesetzte AA wurde über C18-Säulen aufgereinigt, mit p-Anisidiniumchlorid derivatisiert und mittels HPLC vermessen.

Zur Gewinnung der Liposomen wurden multilamellare Vesikel verschiedener Lipidzusammensetzungen, wie in Material und Methoden beschrieben, hergestellt und durch Extrusion durch Membranen mit einer Porengröße von 100 nm zu großen unilamellaren Vesikel umgeformt. Diese Liposomen wurden mit 500 ng cPLA₂ für 60 min bei 37°C inkubiert und die freigesetzte AA wurde mittels HPLC vermessen. Als Basislipid diente 1-Palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-PC (PAPC) oder 1-Palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-PE (PAPE), denen entsprechend der gewünschten Effekte Gastlipide zugegeben wurden. In Abbildung 3.15 A ist die freigesetzter AA-Menge pro

100 ng Enzym dargestellt. Während reine PAPC-Vesikel suboptimale Substrate darstellen, konnte die cPLA₂-Aktivität durch Zugabe verschiedener Membrankomponenten variiert werden. Besonders auffällig ist die starke Erhöhung der AA-Freisetzung nach Zugabe von PIP₂, Ceramid und POG (9,6-, 6,7- und 8,4-fach). C-1-P führte zu einer schwächeren Aktivierung (2,6-fach) und in Anwesenheit von strukturverändernden Elementen (Cholesterin, Sphingomyelin, gesättigte Fettsäuren (Di-Palmitoyl-PC (DPPC))) war eine 1,9- bis 2,9-fache Erhöhung der Aktivität zu finden. Das zweite Substrat PAPE war als Liposom 5,1-fach besser geeignet als PAPC.

Die Aktivitäten der cPLA₂ an Mizellen (ausgedrückt als freigesetzte AA pro 100 ng Enzym) sind in Abbildung 3.15 B dargestellt. Nach Auflösung der membranären Strukturen hängt in diesem Fall die Höhe der AA-Freisetzung allein vom verfügbaren Substrat ab. Durch die bessere Zugänglichkeit für das Enzym konnte im Fall von PAPC eine stark erhöhte Phospholipid-Hydrolyse beobachtet werden. Einzig die direkten Aktivatoren C-1-P und PIP₂ konnten diese Freisetzung 1,7- bzw. 5,6-fach erhöhen. PAPE wurde im Vergleich zu PAPC in einem geringeren Maße umgesetzt.

Der cPLA₂α-Inhibitor (5 μM) konnte sowohl im Liposomen- als auch im Mizellen-basierten Assay die Freisetzung der AA um 91,5 und 86,3% senken (Abb 3.16).

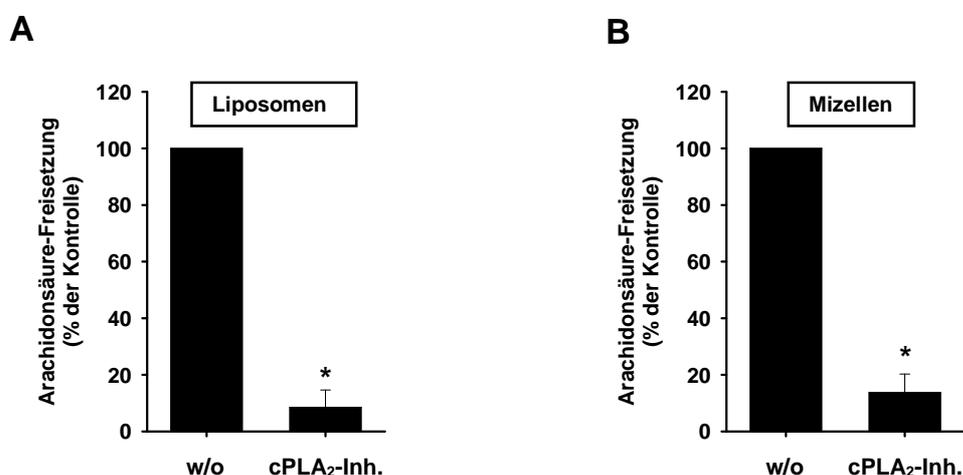


Abb. 3.16 Inhibition der AA-Freisetzung in Liposomen und Triton-X-100-Mizellen durch cPLA₂α-Inhibitor

Liposomen und Triton-X-100-Mizellen aus PAPC wurden 15 min vor dem Inkubationsstart mit 5 μM cPLA₂α-Inhibitor versetzt und nach Zugabe von 1 mM CaCl₂ und 500 ng aufgereinigter cPLA₂ für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Quantifizierung der freigesetzten AA erfolgte mittels HPLC.

Zur Untersuchung des Einflusses von Hyperforin auf die cPLA₂-Aktivität an Liposomen oder Mizellen wurden diese mit steigenden Konzentration an Hyperforin für 15 min bei 37°C vorbehandelt und nach Zugabe von 500 ng cPLA₂ weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Alternativ wurden auch Liposomen in Anwesenheit von Hyperforin hergestellt. Die angegebenen Hyperforinkonzentrationen entsprechen in diesen Fällen der Endkonzentration im Inkubationsvolumen.

Die Integrität der Liposomen nach Hyperforinzugabe konnte durch Vermessung der Vesikel mit Hilfe der Photonen-Korrelations-Spektroskopie überprüft werden.

	Liposomengröße (nm)	Differenz (%)	
		mit Hyperforin inkubiert	mit eingebautem Hyperforin
PAPC	156,3 ± 6,5	2,2 ± 0,6	-10,2 ± 1,5 *
PAPC/C1P 5%	152,5 ± 8,7	2,3 ± 0,2 **	
PAPC/PIP ₂ 3%	147,8 ± 7,9	1,2 ± 0,5	
PAPC/Cer 10%	165,9 ± 2,1	2,1 ± 0,4 *	
PAPC/POG 33%	173,8 ± 6,5	5,8 ± 0,7 *	-9,4 ± 3,8
PAPC/SM/Chol (1:1:1)	197,2 ± 6,4	0,4 ± 0,2	-9,8 ± 3,3
PAPC/Chol 20%	164,3 ± 6,1	1,7 ± 0,7	-14,4 ± 2,1 *
PAPC/Chol 50%	174,3 ± 17,2	3,3 ± 1,1	-2,9 ± 9,0
PAPC/DPPC 30%	173,2 ± 11,5	-1,4 ± 0,9	-16,4 ± 1,2 **
PAPE	1443,0 ± 124,4	7,2 ± 2,7	-31,5 ± 10,2

Tab. 3.1 Liposomengröße

Liposomen der angegebenen Zusammensetzung, ohne Hyperforinbehandlung, nach 15-minütiger Inkubation mit Hyperforin oder mit eingebautem Hyperforin, wurden mittels Photonen-Korrelations-Spektroskopie vermessen.

Auf Grund der unbekanntenen Dichte der Liposomen sind die Messwerte nicht als Absolutwerte zu verstehen, können aber in Relation zueinander gesetzt werden.

Mit Ausnahme von PAPE-Vesikel wurde so ein durchschnittlicher Durchmesser der Liposomen von ca. 167 nm gefunden, der durch Hyperforin nur leicht verändert wurde. Eine Zerstörung oder grundsätzliche Veränderung der Liposomen durch Hyperforin konnte daher ausgeschlossen werden. Allerdings wiesen die Vesikel nach Inkubation mit 30 µM Hyperforin einen etwa 2% größeren Durchmesser auf, während die Größe der mit Hyperforin beladenen Liposomen im Vergleich zur Kontrolle um durchschnittlich 10% reduziert war. Suspensionen von PAPE-Vesikel wiesen trotz Extrusion durch Poren von 100 nm sehr inhomogene Größen mit einem Durchschnitt von 1443 nm auf. Hyperforin veränderte die Größe dieser Vesikel stärker als die der PAPC-basierten Liposomen, zerstörte sie aber nicht (Tab. 3.1). Ungeachtet dieser Tatsache wurden die Aktivitätsassays auch mit diesen Vesikeln in der oben beschriebenen Weise durchgeführt, da trotz der

größeren und inhomogeneren Vesikeldurchmesser von der Ausbildung membranärer Oberflächen ausgegangen werden konnte.

3.5.1 PAPC-Vesikel

In intakten Thrombozyten und PMNL wurde eine Aktivierung der cPLA₂ in Abwesenheit von Ca²⁺ und in PMNL eine Hemmung der Ionophore-induzierten AA-Freisetzung beobachtet. Daher wurde der Einfluss von Hyperforin auf die isolierte cPLA₂ sowohl in

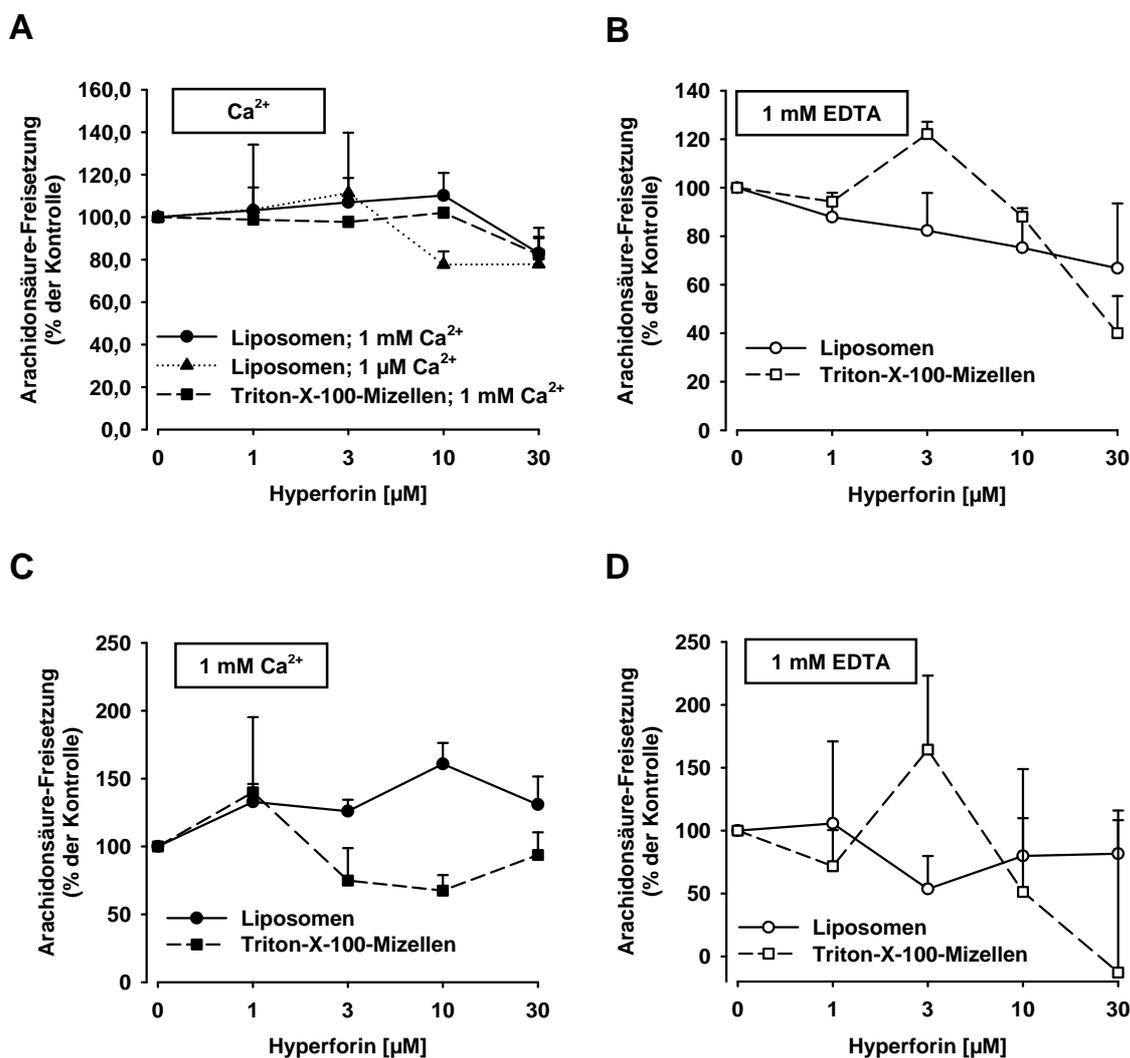


Abb. 3.17 Einfluss von Hyperforin auf die AA-Freisetzung aus PAPC-Liposomen

PAPC-Liposomen (durchgezogene Linien) bzw. -Mizellen (gestrichelte Linien) wurden mit den angegebenen Konzentrationen Hyperforin vorbehandelt (A/B) oder in Gegenwart von Hyperforin hergestellt (C/D) und in Gegenwart von 1 μM bzw. 1 mM CaCl₂ (A/C) oder 1 mM EDTA (B/D) mit 500 ng cPLA₂ für 60 min bei 37°C inkubiert. Dargestellt ist die freigesetzte AA in Relation zur Kontrollprobe ohne Hyperforin.

Gegenwart von 1 mM Ca^{2+} als auch von 1 mM EDTA gemessen. In Vesikeln und Mizellen aus reinem PAPC war dabei weder eine Aktivierung noch eine Hemmung der Phospholipid-Hydrolyse durch Hyperforin zugabe zu beobachten. Die Reduktion der Ca^{2+} -Konzentration auf 1 μM änderte diesen Befund nicht (Abb 3.17 A/B). Auch bei Vesikeln, in die Hyperforin schon im Herstellungsverfahren integriert wurde, hatte die Beladung mit Hyperforin keinen nennenswerten Einfluss auf die AA-Freisetzung. Vielmehr führte die Herstellung in verschiedenen Ansätzen hier zu stärkeren Schwankungen (Abb. 3.17 C/D).

3.5.2 Vesikel mit direkten Aktivator

Die als direkte Aktivator beschriebenen Lipide PIP_2 , C-1-P und Ceramid wurden in geeigneten Konzentrationen von 3%, 10% und 5% gemäß Lit. eingesetzt [107, 108, 124]. Bei diesen Konzentrationen erreichen die Aktivator maximale Effekte und erhöhten, wie oben beschrieben, die Aktivität der cPLA_2 9,6-, 2,6- und 6,7-fach (Abb. 3.15 A). Zur

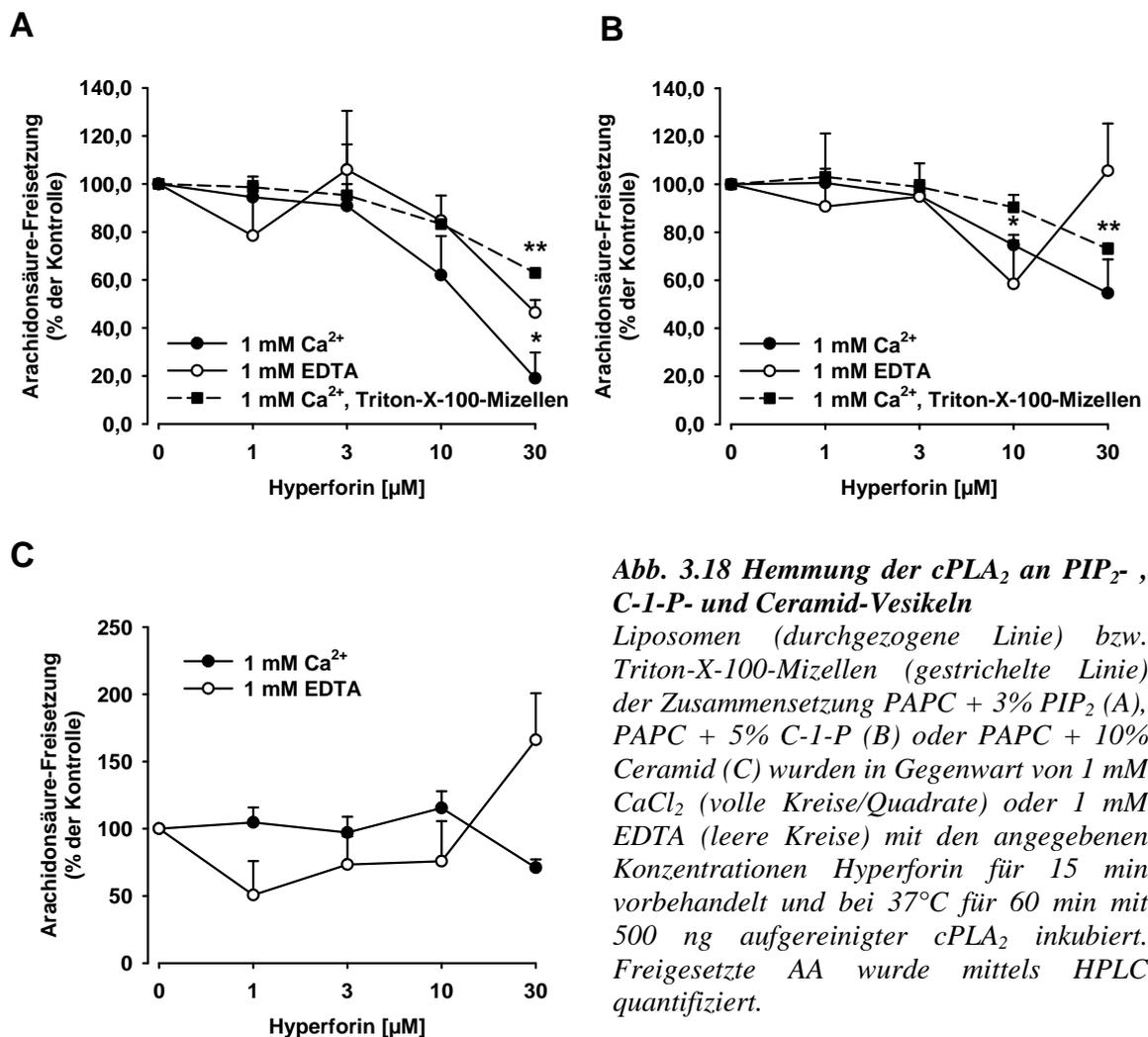


Abb. 3.18 Hemmung der cPLA_2 an PIP_2 , C-1-P- und Ceramid-Vesikeln
Liposomen (durchgezogene Linie) bzw. Triton-X-100-Mizellen (gestrichelte Linie) der Zusammensetzung PAPC + 3% PIP_2 (A), PAPC + 5% C-1-P (B) oder PAPC + 10% Ceramid (C) wurden in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 (volle Kreise/Quadrate) oder 1 mM EDTA (leere Kreise) mit den angegebenen Konzentrationen Hyperforin für 15 min vorbehandelt und bei 37°C für 60 min mit 500 ng aufgereinigter cPLA_2 inkubiert. Freigesetzte AA wurde mittels HPLC quantifiziert.

Untersuchung, ob Hyperforin die stimulierenden Einflüsse dieser Substanzen kompetitiv unterdrückt, wurden Liposomen mit diesen Komponenten mit Hyperforin inkubiert. Die Aktivität der cPLA₂ an Ceramid-haltigen Liposomen wurde nicht beeinträchtigt (Abb. 3.18 C), die Stimulation durch PIP₂ und C-1-P konnte aber durch Hyperforin leicht reduziert werden (Abb. 3.18 A/B). In Anwesenheit von Ca²⁺ lagen die IC₅₀-Werte bei 13,2 µM (PIP₂) bzw. > 30 µM (C-1-P). In PIP₂-basierten Liposomen wurde auch in Abwesenheit von Ca²⁺ eine prominente AA-Freisetzung beobachtet (Abb. 3.15 A), die durch Hyperforin mit einem IC₅₀ von ca. 25 µM vermindert wurde. Sowohl die Hemmung der PIP₂- als auch der C-1-P-Aktivierung wurden allerdings durch Zugabe von Triton-X-100 vermindert.

3.5.3 PAPC/POG-Vesikel

Ebenso wie PIP₂ und Ceramid hatte auch der Einbau von POG (33%) in PAPC einen starken aktivierenden Einfluss. Dieser konnte durch Hyperforin-Zugabe deutlich gehemmt werden, wobei der IC₅₀ in Anwesenheit von Ca²⁺ bei 7,6 µM lag (Restaktivität 17,9% bei 30 µM Hyperforin). Die Bindung der cPLA₂ an die Liposomen wurde durch Hyperforin allerdings nicht beeinflusst. Nach Inkubation von multilamellaren Vesikeln mit 500 ng cPLA₂ und Abtrennung der Liposomen bei 150.000×g wurden Zentrifugat und Überstand per SDS-PAGE und Western Blot auf liposomengebundene bzw. ungebundene cPLA₂ analysiert. Dabei konnte eine deutliche Bindung der cPLA₂ an die Vesikel in Gegenwart von Ca²⁺ festgestellt werden, die trotz steigender Hyperforinkonzentrationen nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 3.19 A/C).

Wie PIP₂ führte auch POG in Abwesenheit von Ca²⁺ zu einer deutlichen Aktivierung der cPLA₂, die den Ca²⁺-induzierten Effekten äquivalent war, sich erstaunlicherweise aber nicht in den Befunden des Bindungsassays widerspiegelte. In Gegenwart von 1 mM EDTA konnte keine nennenswerte Assoziation der cPLA₂ an abzentrifugierten Liposomen nachgewiesen werden. Die Ca²⁺-unabhängige Freisetzung von AA wurde aber ebenfalls durch Hyperforin um bis zu 92% reduziert. Der IC₅₀ lag bei 2,9 µM Hyperforin. Durch Zerstörung der Eigenschaften einer Membranoberfläche nach Triton-X-Zugabe wurde die Hyperforin-induzierte Hemmung sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Ca²⁺ aufgehoben (Abb. 3.19 B/C).

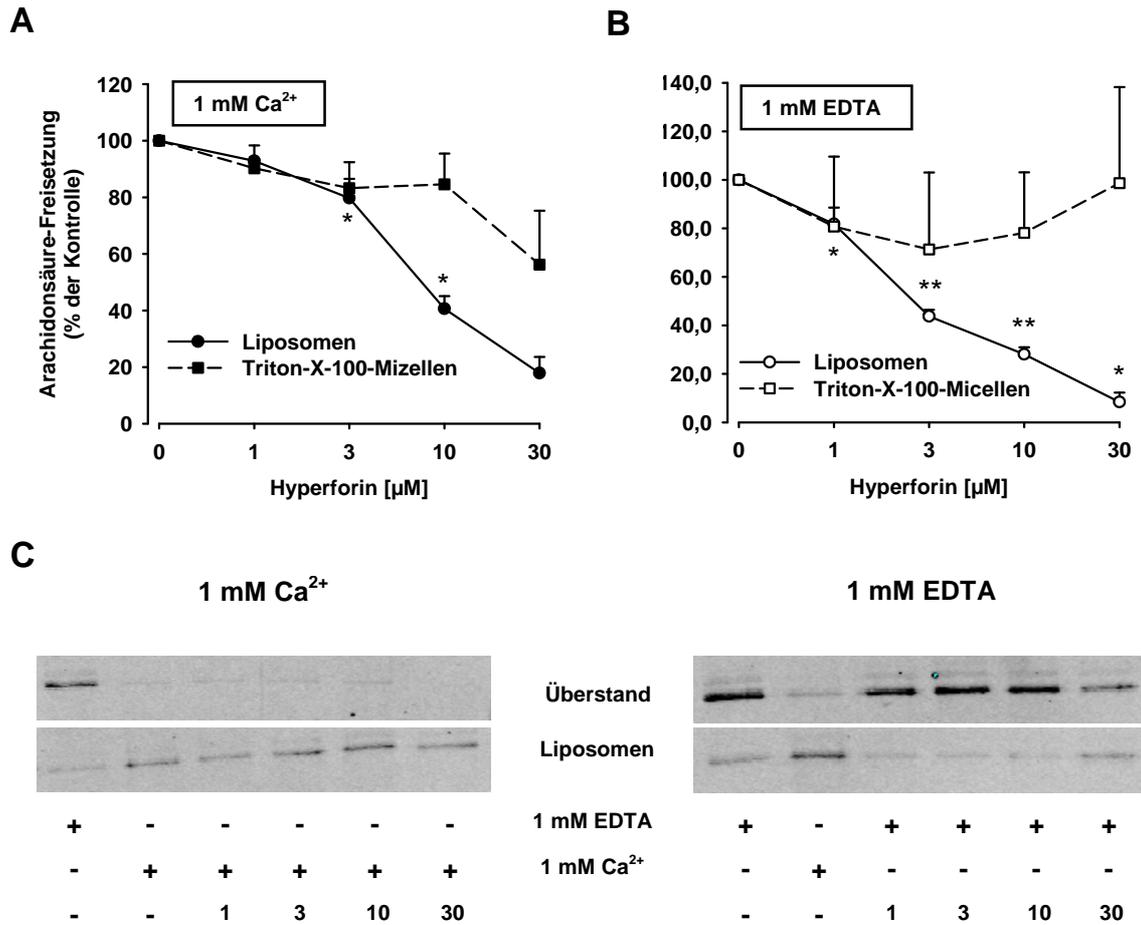


Abb. 3.19 Effekte von Hyperforin auf die cPLA₂-Aktivität und Bindung an PAPC/POG-Vesikeln

Liposomen (durchgezogene Linie), Triton-X-100-Mizellen (gestrichelte Linie) bzw. Multilamellare Vesikel (C) wurden aus PAPC und POG im Verhältnis 2:1 generiert und nach 15-minütiger Behandlung mit 0 bis 30 μ M Hyperforin für 60 (A/B) bzw. 10 (C) min bei 37°C in Anwesenheit von 1 mM CaCl₂ oder 1 mM EDTA mit 500 ng cPLA₂ inkubiert. (A/B) Freigesetzte AA wurde über C18-Säulen aufgereinigt und mittels HPLC quantifiziert. (C) Proben wurden bei 150.000xg und 37°C zentrifugiert und Aliquots des Überstands sowie des resuspendierten Liposomenpellets wurden im Western Blot auf cPLA₂ untersucht.

3.5.4 Cholesterolhaltige PAPC-Vesikel

Insbesondere für Thrombozyten wurde ein positiver Einfluss von Cholesterol auf die cPLA₂ beschrieben [149, 150]. Daher wurden PAPC-Liposomen mit Cholesterol-Anteilen von 20 und 50% versetzt. Eine leichte Steigerung der AA-Freisetzung gegenüber reinen PAPC-Liposomen konnte beobachtet werden (1,9-facher Anstieg; Abb. 3.15 A).

Wurden diese Vesikel mit Hyperforin inkubiert, so konnte erneut eine Hemmung der AA-Freisetzung festgestellt werden, die mit dem PAPC-Cholesterol-Verhältnis im Zusammenhang stand. In Liposomen mit 20% Cholesterol inhibierte Hyperforin die cPLA₂

mit einem IC_{50} von $25,8 \mu\text{M}$, in Liposomen mit 50% Cholesterol lag der IC_{50} sogar bei $5,5 \mu\text{M}$. Beide Effekte konnten in Anwesenheit von Triton-X-100 erneut aufgehoben werden (Abb. 3.20 A).

Eine Aktivierung in Abwesenheit von Ca^{2+} konnte nicht beobachtet werden (Abb. 3.20 B). Allerdings kam es bei der Durchführung der Versuche insbesondere in Abwesenheit von Ca^{2+} zu erheblichen Differenzen in den Messwerten. Während in einem Teil der Ergebnisse eine klare Hemmung auftrat, kam es bei anderen Versuchsdurchführungen zu einer leichten Aktivierung. Eine je nach Liposomenqualität qualitativ oder quantitativ

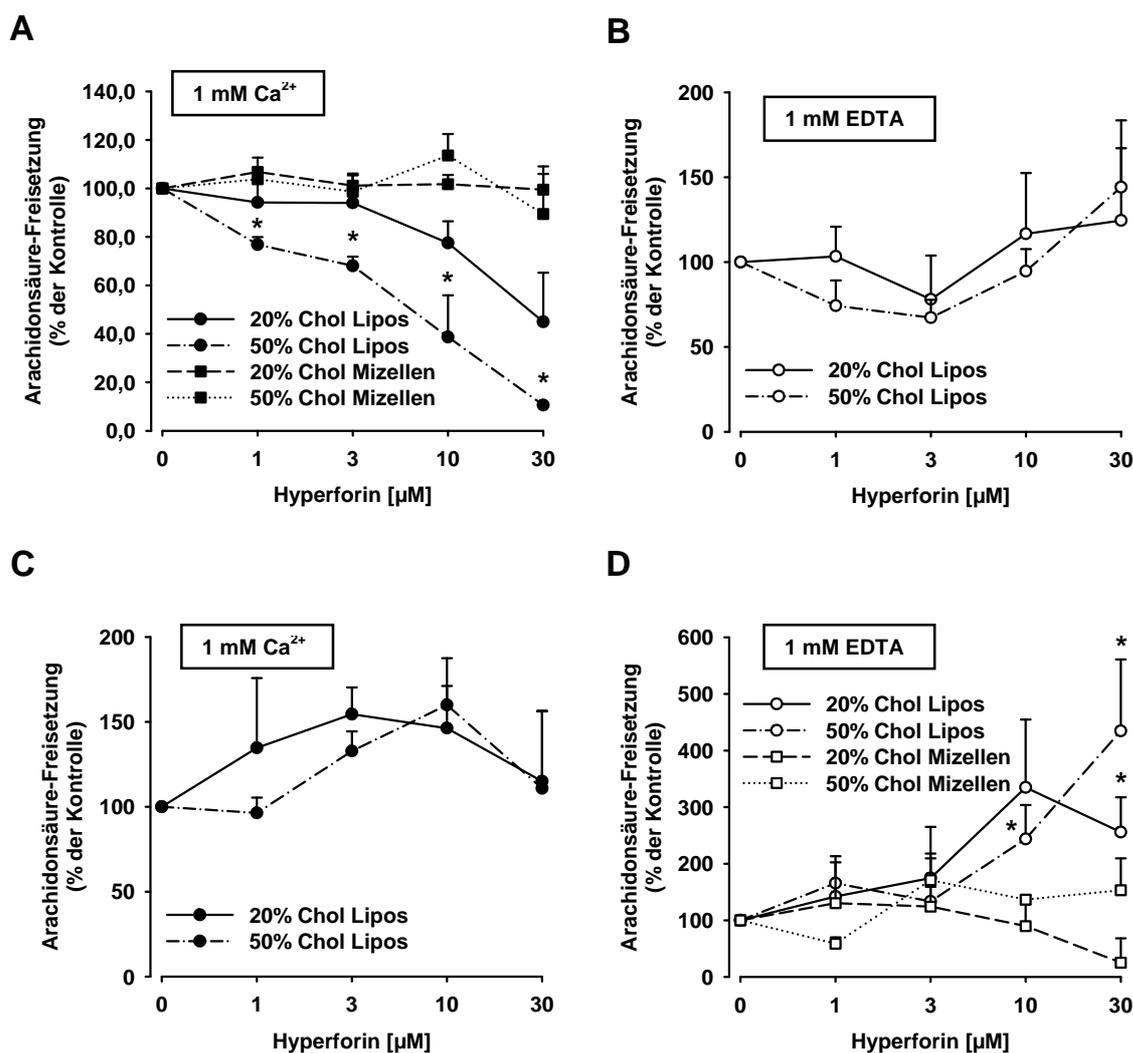


Abb. 3.20 Einfluss von Hyperforin auf die $c\text{PLA}_2$ -Aktivität gegenüber cholesterolhaltigen Vesikeln

Liposomen bzw. Mizellen aus PAPC mit 20 bzw. 50% Cholesterol wurden in Gegenwart von Hyperforin (angegeben sind die finalen Hyperforinkonzentrationen im Reaktionsgemisch) hergestellt (C/D) oder vor dem Versetzen mit $c\text{PLA}_2$ für 15 min mit 0 bis $30 \mu\text{M}$ Hyperforin behandelt (A/B). Die 60-minütige Inkubation erfolgte nach Zugabe von 1 mM CaCl_2 (A/C) bzw. 1 mM EDTA (B/D) und $500 \text{ ng } c\text{PLA}_2$ bei 37°C . Freigesetzte AA wurde nach Derivatisierung mit p-Anisidiniumchlorid in der HPLC vermessen.

unterschiedliche Einlagerung von Hyperforin während der Inkubation wurde vermutet. Daher wurden zusätzlich Vesikel in Anwesenheit von Hyperforin hergestellt und auf diese Weise eine grundsätzliche Integration von Hyperforin in die Liposomen gewährleistet. Weder die Vesikelintegrität noch die Freisetzung der AA in PAPC-Vesikeln wurden durch dieses Verfahren beeinträchtigt (Tab. 3.1 und Abb. 3.17 C/D). Die Effekte von Hyperforin als integraler Membranbestandteil differierten von den oben beschriebenen Befunden. In Anwesenheit von Ca^{2+} konnte keine Hemmung beobachtet werden (Abb. 3.20 C). Allerdings führte die Inkubation der Hyperforin-haltigen Vesikel mit 1 mM EDTA zu einer bis zu 3,3-fachen und 4,3-fachen Steigerung der Phospholipid-Hydrolyse in Liposomen mit 20 und 50% Cholesterol. Durch Zugabe von Triton-X konnte diese Stimulation ebenfalls aufgehoben werden (Abb. 3.20 D).

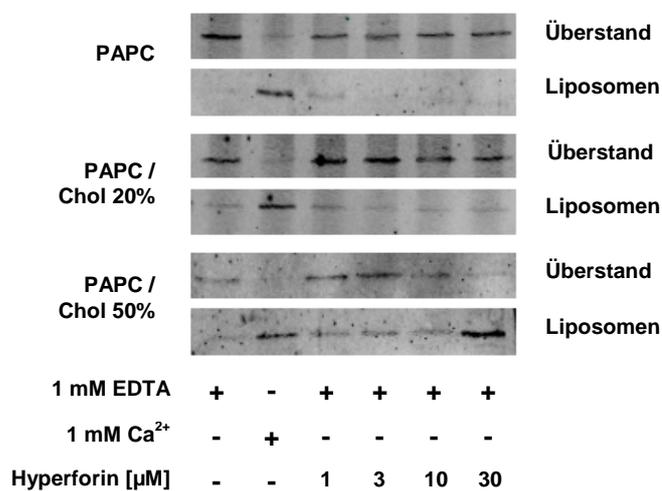


Abb. 3.21 Einfluss von Hyperforin auf die Bindung der cPLA₂ an cholesterolhaltige Vesikeln
 Multilamellare Vesikel der angegebenen Zusammensetzung wurden in Gegenwart von 0 bis 30 μM Hyperforin hergestellt und nach Zugabe von 1 mM CaCl_2 oder 1 mM EDTA mit 500 ng aufgereinigter cPLA₂ für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Liposomen bei 150.000xg und 37°C wurde die Verteilung der cPLA₂ zwischen Überstand und liposomaler Fraktion im Western Blot analysiert.

Um zu klären, ob die verstärkte cPLA₂-Aktivität in Abwesenheit von Ca^{2+} mit einer intensivierten Bindung der cPLA₂ an die Liposomen einhergeht, wurden erneut Liposomen nach Inkubation mit cPLA₂ abzentrifugiert und die im Überstand verbliebene cPLA₂ und der an Membranbestandteile gebundene Enzym-Anteil durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. PAPC-Vesikel mit 20 und 50% Cholesterol wurden untersucht, reine PAPC-Vesikel dienten als Kontrolle. In allen 3 Vesikelarten bedingte die Zugabe von Ca^{2+} eine nahezu vollständige Bindung der cPLA₂ an die Membranen, während in Abwesenheit von Ca^{2+} das Enzym beinahe ausnahmslos im Überstand zu finden war.

Der Einbau von Hyperforin in PAPC-Vesikel mit 50% Cholesterol führte zu einer Abnahme der Enzym-Konzentration im Überstand und zu einer vermehrten Bindung der cPLA₂ an die Liposomen. Die Bindung der cPLA₂ an PAPC-Vesikel konnte durch Hyperforin hingegen nicht beeinflusst werden. Auch gegenüber 20%-igen Cholesterol-

Vesikeln war trotz der Hyperforin-induzierten Aktivitätssteigerung kein Effekt auf die Membranbindung nachweisbar (Abb. 3.21).

3.5.5 Lipid-Raft-Strukturen

Der Einfluss von Lipid Rafts auf der Regulation der cPLA₂ ist noch unklar, anhand von Literaturindizien lässt sich aber eine Rolle dieser Membrandomänen postulieren [133, 152]. Daher sollten diese Strukturen auch im Zusammenhang mit der Hyperforin-Wirkung beurteilt werden. Zur Simulation von Lipid Rafts wurde die Mischung der drei Komponenten PAPC, Sphingomyelin (SM) und Cholesterol im Verhältnis 1:1:1 verwendet, da Cholesterol in Anteilen von 30 – 40% in Mischungen aus SM und ungesättigtem PC Phasentrennungen induziert [142, 143].

Ähnlich wie im Fall der Cholesterol-Vesikel konnte auch hier ein leichter Effekt auf die absolute AA-Freisetzung festgestellt werden (2,9-fache Aktivierung; Abb. 3.15 A). Hyperforin konnte die Freisetzung der AA mit einem IC₅₀ von 4,4 µM auf eine Restaktivität von 38% bei 10 µM Hyperforin senken. Bei 30 µM Hyperforin stieg die AA-Freisetzung wieder leicht an (Abb. 3.22 A). In Abwesenheit von Ca²⁺ induzierten 30 µM Hyperforin ebenfalls eine Erhöhung der Phospholipid-Hydrolyse, die eine im Vergleich zur Negativkontrolle 7,3-fach gesteigerte AA-Freisetzung bewirkte (Abb. 3.22 B). Die durch 30 µM Hyperforin freigesetzte AA-Menge in Anwesenheit von Ca²⁺ (13,3 pmol / 100 ng cPLA₂ / h) entsprach in etwa der freigesetzten AA in Abwesenheit von Ca²⁺ (11,4 pmol / 100 ng cPLA₂ / h). Im Mizellen-basierten Assay konnten beide Effekte nicht beobachtet werden.

Die Hemmung der cPLA₂-Aktivität in Gegenwart von Ca²⁺ stand auch im Lipid-Rafts-System nicht mit der Membranbindung im Zusammenhang. 1 mM Ca²⁺ induzierten die Assoziation der cPLA₂ mit den Liposomen unabhängig von der vorliegenden Hyperforin-Konzentration. Die Aktivierung der cPLA₂ in Abwesenheit von Ca²⁺ spiegelte sich hingegen in den Befunden des Bindungs-Assays wieder. Trotz Anwesenheit von 1 mM EDTA konnte eine Umverteilung der cPLA₂ an die Membranfraktion bei Anwesenheit von 30 µM Hyperforin beobachtet werden (Abb. 3.22 C).

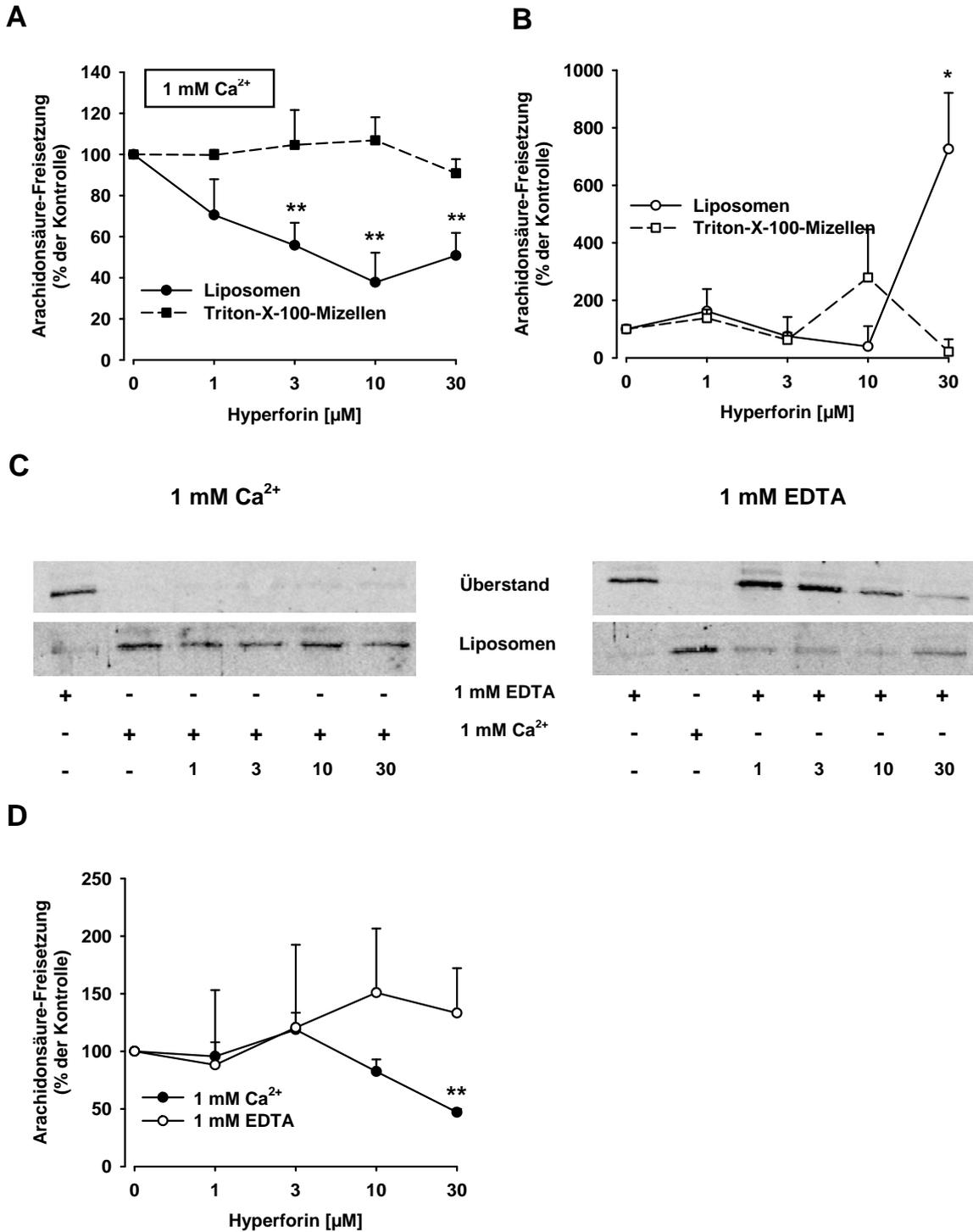


Abb. 3.22 Effekte von Hyperforin gegenüber Vesikeln mit Lipid-Raft-Charakter

(A-C) Liposomen bzw. Triton-X-100-Mizellen (A/B) oder Multilamellare Vesikel (C) wurden aus PAPC, Sphingomyelin und Cholesterol im Verhältnis 1:1:1 hergestellt, mit 1 mM CaCl₂ oder 1 mM EDTA und 15 min vor Reaktionsstart mit 0 bis 30 µM Hyperforin versetzt und für 60 (A/B) bzw. 10 min (C) bei 37°C mit 500 ng cPLA₂ inkubiert. (D) Liposomen der Zusammensetzung PAPC/Sphingomyelin/Cholesterol (1:1:1) wurden in Anwesenheit ansteigender Mengen Hyperforin (finale Konzentrationen im Reaktionsgemisch: 0 bis 30 µM) hergestellt und nach Zugabe von 1 mM CaCl₂ (volle Kreise) oder 1 mM EDTA (leere Kreise) für 60 min bei 37°C mit 500 ng cPLA₂ inkubiert. (A/B/D). Freigesetzte AA wurde mit p-Anisidiniumchlorid umgesetzt und in der HPLC detektiert. (C) Liposomen wurden durch Zentrifugation bei 150.000xg und 37°C abgetrennt und Überstand sowie aufsuspendiertes Liposomenpellet wurden im Western Blot auf cPLA₂ untersucht.

Analog zu Cholesterol-beladenen Vesikeln mit integriertem Hyperforin wurden auch Lipid-Raft-Vesikel in Anwesenheit von Hyperforin hergestellt und der Einbau von Hyperforin in die Membranen somit sichergestellt.

Vergleichbar zu Cholesterol-Liposomen konnte auch hier keine Hemmung in Anwesenheit von Ca^{2+} festgestellt werden. Im Gegensatz zu Vesikeln mit Cholesterol war aber auch keine Aktivierung unter 1 mM EDTA zu beobachten (Abb. 3.22 D).

3.5.6 PAPC/DPPC-Vesikel

Da Cholesterol und Sphingomyelin neben ihren speziellen strukturgebenden Eigenschaften auch membranverdichtende Wirkung aufzeigen, sollte eine Membranverdichtung mit Hilfe von ungesättigten Fettsäuren ohne Veränderungen in der Kopfgruppe erreicht werden. Daher wurden Vesikel mit einem Anteil von 30% DPPC konzipiert.

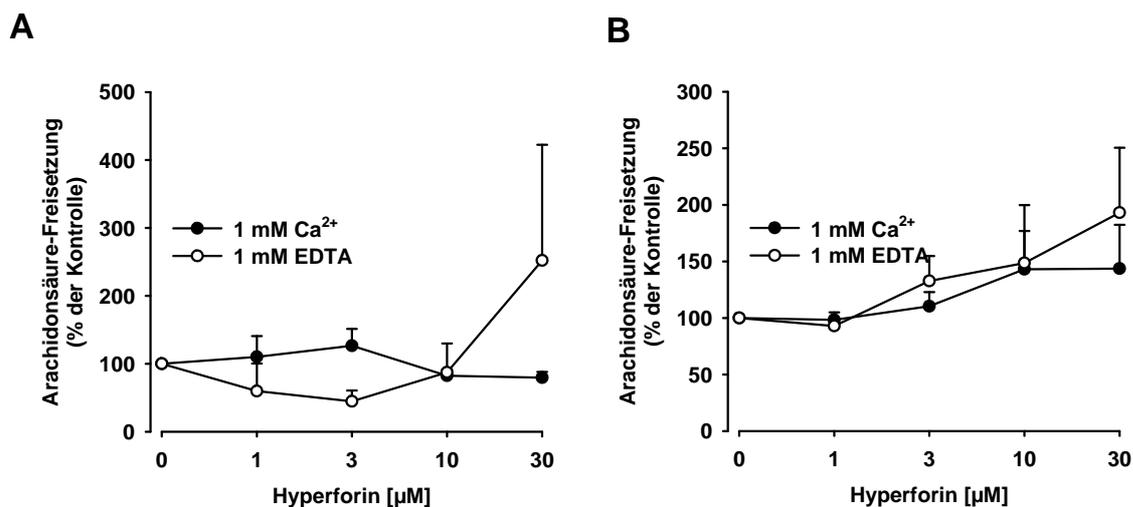


Abb. 3.23 Wirkung von Hyperforin auf die AA-Freisetzung aus PAPC/DPPC-Liposomen
Liposomen aus PAPC mit 30% DPPC wurden 15 min vor dem Reaktionsstart mit 0 bis 30 μM Hyperforin behandelt (A) oder in Gegenwart von Hyperforin hergestellt (B). Die 60-minütige Inkubation erfolgte in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 (volle Kreise) bzw. 1 mM EDTA (leere Kreise) und 500 ng $c\text{PLA}_2$ bei 37°C. Freigesetzte AA wurde nach Derivatisierung mit *p*-Anisidiniumchlorid in der HPLC vermessen.

Hinsichtlich der AA-Freisetzung in Absolutwerten waren diese Liposomen vergleichbar mit Cholesterol- und Lipid-Raft-Vesikeln (2,4-fache Aktivierung; Abb. 3.15 A). Allerdings traten kaum vergleichbare Hyperforin-Effekte auf. Die Inkubation von DPPC-haltigen Liposomen mit Hyperforin führte nicht zu einer Hemmung oder Aktivierung der AA-

Freisetzung (Abb. 3.23 A). In Liposomen integriert konnte Hyperforin die AA-Freisetzung in Abwesenheit von Ca^{2+} schwach (1,9-fach) verstärken (Abb. 3.23 B).

3.5.7 PAPE-Vesikel

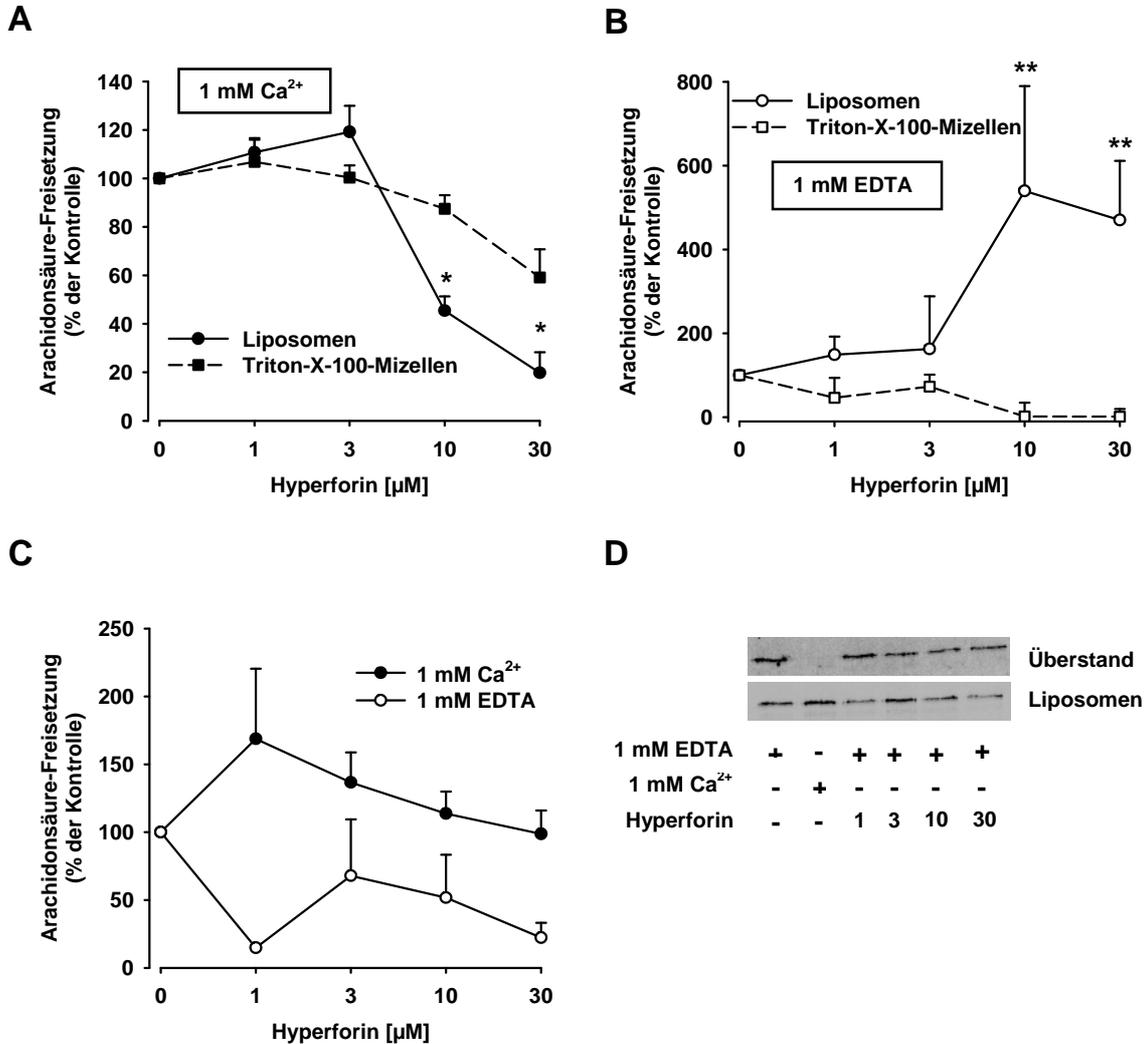


Abb. 3.24 Hyperforin-Effekte auf die Hydrolyse von PAPE

(A/B) Liposomen (durchgezogene Linie) bzw. Triton-X-100-Mizellen (gestrichelte Linie) aus PAPE wurden nach 15-minütiger Inkubation mit Hyperforin in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 (volle Symbole) bzw. 1 mM EDTA (leere Symbole) für 60 min bei 37°C mit cPLA₂ inkubiert. Freigesetzte AA wurde in der HPLC quantifiziert. (C) PAPE-Liposomen wurden in Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen Hyperforin hergestellt (Endkonzentration von Hyperforin im Reaktionsgemisch: 0 bis 30 μM). Nach Inkubation der Liposomen nach Zugabe von 1 mM CaCl_2 (volle Kreise) oder 1 mM EDTA (leere Kreise) und 500 ng cPLA₂ bei 37°C für 60 min wurde die freigesetzte AA in der HPLC analysiert. (D) Multilamellare Vesikel aus PAPE wurden nach 15-minütiger Vorbehandlung mit Hyperforin und 60-minütiger Inkubation mit 500 ng cPLA₂ (1 mM Ca^{2+} oder 1 mM EDTA) bei 150.000xg und 37°C abzentrifugiert und cPLA₂ im Überstand und Liposomenpellet wurde im Western Blot analysiert.

Sowohl in Thrombozyten als auch in PMNL stellt PE neben PC ein Hauptsubstrat der cPLA₂ dar [96, 97], daher wurden Liposomen aus PAPE generiert und in die Enzymaktivitäts- und Membranassoziationsanalysen mit einbezogen. Die Tendenz von PE zur Ausbildung nicht-lamellarer Phasen [105] erschwerte die Bildung unilamellarer Vesikel mit Größen unter 200 µM. So stellten sich PAPE-Liposomen trotz Extrusion als Mischungen größerer, wahrscheinlich multilamellarer und unhomogener Vesikel dar (Tab. 3.1). Da dennoch nachweislich Liposomen erzeugt wurden, konnte von der Ausbildung einer Membranoberfläche mit PE-spezifischer Physiognomie ausgegangen werden. Die aus der veränderten Oberflächenstruktur resultierende verbesserte Substratzugänglichkeit in PAPE-Liposomen [106] spiegelte sich in einer gegenüber PAPC-Vesikeln 5,1-fach gesteigerten AA-Freisetzung wieder, wenn auch PAPC in Mizellenassays bevorzugt hydrolysiert wurde (Abb. 3.15).

Aus der Behandlung von PAPE-Liposomen mit Hyperforin resultierte erneut eine leichte Hemmung der AA-Freisetzung in Gegenwart von Ca²⁺ (IC₅₀ = 9,9 µM; Abb. 3.24 A). In Abwesenheit von Ca²⁺ hingegen kam es zu einer bis zu 5,2-fachen Steigerung der Phospholipid-Hydrolyse, die bei 10 µM Hyperforin maximal war (Abb. 3.24 B). Beide Effekte wurden im Mizellen-basierten Assay stark abgeschwächt. Die Inkubation von PAPE-Vesikeln mit eingebautem Hyperforin führte nicht zu einer Veränderung der cPLA₂-Aktivität (Abb. 3.24 C).

Durch die veränderte Struktur der PAPE-Liposomen wurde, wie schon für POPE-Vesikel beschrieben [103], auch die Abzentrifugation und Resuspension von multilamellaren Vesikeln erschwert, so dass insbesondere in der abgetrennten liposomalen Fraktion deutliche Schwankungen im Proteingehalt auftraten. Dennoch konnten hauptsächlich anhand der Veränderungen in der ungebundenen cPLA₂-Fraktion Rückschlüsse in Bezug auf die Membranbindung getroffen werden. So wurde auch hier eine starke Assoziation der cPLA₂ mit Liposomen in Gegenwart von Ca²⁺ festgestellt. Hyperforin hingegen konnte trotz der Aktivitätssteigerung keine eindeutige Bindung an Membranen hervorrufen (Abb. 3.24 D).

3.5.8 Zusammenfassung der Hyperforin-Effekte in Liposomen

In der Tabelle 3.2 sind die Effekte von Hyperforin an den untersuchten Liposomen zusammengefasst. Während die Stimulation der cPLA₂ mittels direkter Aktivatoren durch Hyperforin kaum beeinflusst wurde, zeigte Hyperforin eine prominente Inhibition (IC₅₀ <

10 μM) der AA-Freisetzung aus Vesikeln mit PAPC plus POG, Chol (50%) und Lipid Rafts sowie mit PAPE. Eine Aktivierung in Abwesenheit von Ca^{2+} konnte bei der Untersuchung von Lipid-Raft-Strukturen und PAPE-Vesikeln gefunden werden. Ausserdem bewirkte die Integration von Hyperforin in PAPC/Chol-Vesikel eine gesteigerte Phospholipid-Hydrolyse trotz Abwesenheit von Ca^{2+} .

	mit Hyperforin inkubiert		mit eingebautem Hyperforin	
	1 mM EDTA	1 mM Ca^{2+}	1 mM EDTA	1 mM Ca^{2+}
PAPC	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
PAPC/C1P 5%	k.E.	Inhibition $\text{IC}_{50} > 30 \mu\text{M}$		
PAPC/PIP ₂ 3%	Inhibition $\text{IC}_{50} = 25 \mu\text{M}$	Inhibition $\text{IC}_{50} = 13,2 \mu\text{M}$		
PAPC/Cer 10%	k.E.	k.E.		
PAPC/POG 33%	Inhibition $\text{IC}_{50} = 2,9 \mu\text{M}$	Inhibition $\text{IC}_{50} = 7,6 \mu\text{M}$		
PAPC/SM/Chol (1:1:1)	Aktivierung 7,3-fach	Inhibition $\text{IC}_{50} = 4,4 \mu\text{M}$	k.E.	k.E.
PAPC/Chol 20%	k.E.	Inhibition $\text{IC}_{50} = 25,8 \mu\text{M}$	Aktivierung 3,3-fach	k.E.
PAPC/Chol 50%	k.E.	Inhibition $\text{IC}_{50} = 5,5 \mu\text{M}$	Aktivierung 4,3-fach	k.E.
PAPC/DPPC 30%	k.E.	k.E.	Aktivierung 1,9-fach	k.E.
PAPE	Aktivierung 5,2-fach	Inhibition $\text{IC}_{50} = 9,9 \mu\text{M}$	k.E.	k.E.

Tab. 3.2 Zusammenfassung der Effekte von Hyperforin auf die cPLA₂-Aktivität im Liposomenassay

Die Effekte von Hyperforin nach Zugabe 15 min vor Reaktionsstart bzw. von in Liposomen eingebautem Hyperforin auf die Aktivität der cPLA₂ gegenüber Vesikeln der angegebenen Zusammensetzung sind aufgeführt. Stärkere Effekte ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$ bzw. > 2 -fache Aktivierung) sind fett gedruckt, k.E. indiziert keinen Effekt.

3.5.9 Effekte von O-Methylhyperforin auf die cPLA₂ im zellfreien System

Da die Veresterung der vinylogenen Säurefunktion des Hyperforins dessen Effekte in intakten Zellen aufhob, wurde der Einfluss von O-Methylhyperforin auf die cPLA₂ auch im zellfreien Assay untersucht. Dabei wurden die Liposomenmischungen evaluiert, in denen Hyperforin die cPLA₂ hemmte oder aktiviert. Tatsächlich bewirkte O-

Methylhyperforin konzentrationsabhängig die Freisetzung der AA. Im Gegensatz zu den differenzierten Wirkungen des Hyperforins ergab sich allerdings nach Inkubation mit O-Methylhyperforin bzw. nach dessen Einbau (PAPC/Chol) sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Ca^{2+} eine verstärkte AA-Freisetzung, die auch in reinen PAPC-Liposomen beobachtet werden konnte. Eine Ausnahme stellten PAPC/POG-Vesikel dar, deren Hydrolyse durch O-Methylhyperforin nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 3.25).

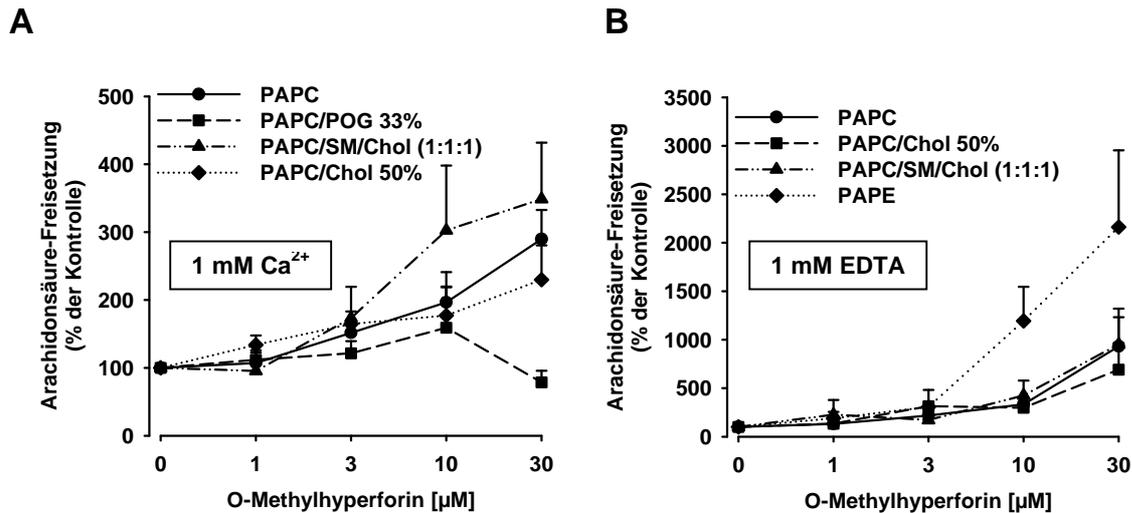


Abb. 3.25 Effekte von O-Methylhyperforin im Liposomenassay

(A) In Gegenwart von 1 mM CaCl_2 wurden Liposomen in den angegebenen Zusammensetzungen für 15 min mit Hyperforin behandelt und nach anschließender Inkubation mit 500 ng cPLA_2 für 60 min wurde die freigesetzte AA quantifiziert. (B) Liposomen aus PAPC, PAPC plus SM und Cholesterol oder PAPE wurden in Gegenwart von 1 mM EDTA für 15 min mit Hyperforin behandelt bzw. Liposomen aus PAPC plus Cholesterol wurden in Gegenwart von steigenden Mengen Hyperforin hergestellt (Hyperforin-Endkonzentration im Reaktionsgemisch: 0 bis 30 μM). Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C mit 500 ng cPLA_2 wurde die freigesetzte AA mittels HPLC detektiert.

3.6 Beeinflussung der Fluidität von Lipidaggregaten durch Hyperforin

In weiteren Untersuchungen sollte verifiziert werden, ob dem dargestellten Effekt auf die cPLA_2 eine Beeinflussung von Membranstrukturen zu Grunde liegen kann.

Aus der Literatur ist bekannt, dass unter anderem die Dichte zellulärer Membranen durch Hyperforin beeinflusst wird [249, 250]. Daher sollte hier der Einfluss von Hyperforin auf die Dichte der untersuchten künstlichen Liposomen herausgearbeitet werden. Die Messungen wurden mit Hilfe von in Vesikel eingebautem Laurdan durchgeführt (Abb. 3.26 A), dessen Fluoreszenzspektrum sich in Abhängigkeit von der Membranfluidität

zwischen den Maxima bei 435 nm und 500 nm bewegt (Abb. 3.26 B). Der GP-Wert wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, als Relation zwischen beiden Maxima ermittelt und gilt als Maß für die Beweglichkeit der Lipide in der Membran, wobei ein zunehmender GP-Wert wachsende Rigidität indiziert.

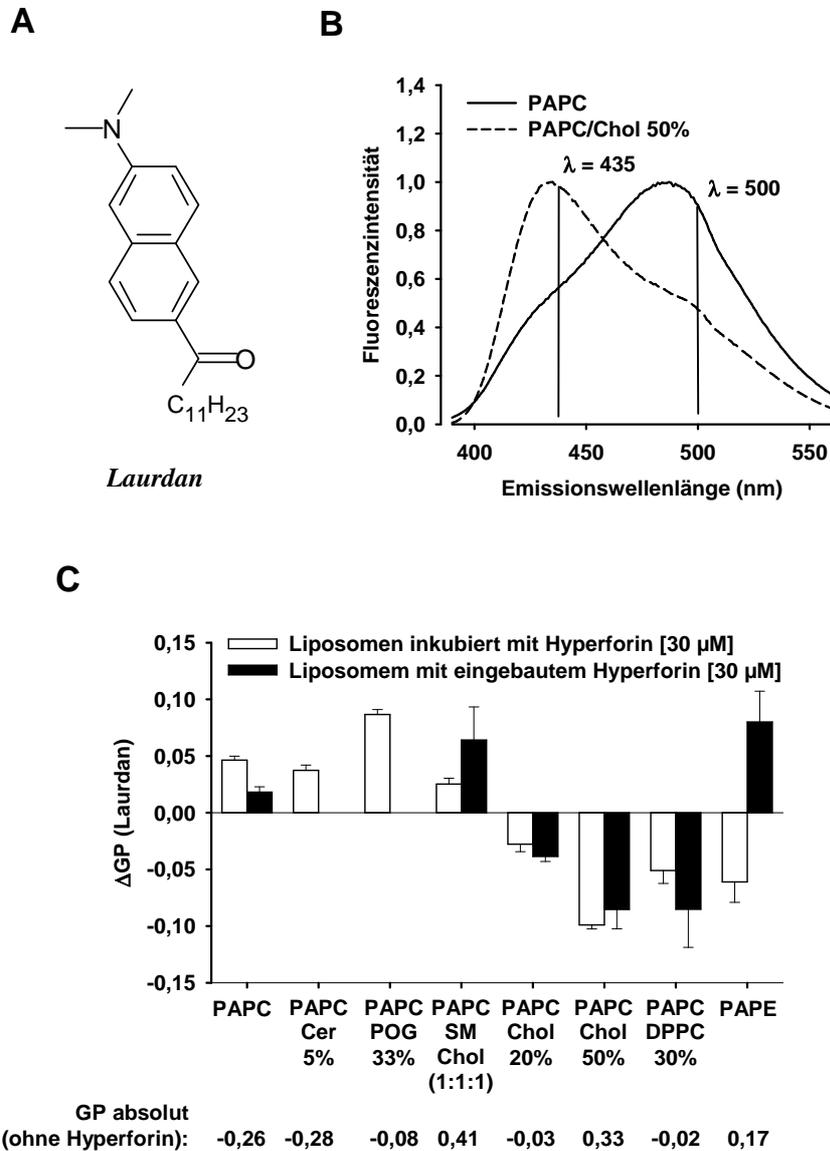


Abb. 3.26 Hyperforin moduliert die Dichte von Liposomen

(A) Laurdan (B/C) Liposomen der angegebenen Zusammensetzung wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit 1 mol% Laurdan hergestellt und bei 37°C bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm über einen Emissionswellenlängenbereich von 390 bis 560 nm im Fluoreszenzspektrometer vermessen. Aus den Fluoreszenzintensitäten bei 435 und 500 nm wurde der GP-Wert ($GP = (F_{435} - F_{500}) / (F_{435} + F_{500})$) ermittelt. (B) Dargestellt sind Beispielspektren für Liposomen aus PAPC und PAPC mit 50% Cholesterol. (C) Liposomen wurden vor der Messung für 15 min mit 30 µM Hyperforin inkubiert oder in Gegenwart von Hyperforin hergestellt (Endkonzentration in der Probe: 30 µM) und die Differenzen zwischen den GP-Werten der Kontrollvesikel und der Liposomen mit Hyperforinbehandlung wurden ermittelt. Die absoluten GP-Werte der Kontrollvesikel sind angegeben.

Bei den Untersuchungen ergaben sich in Abhängigkeit vom Aufbau der Vesikel unterschiedliche Einflüsse durch Hyperforin. Eine verringerte Membranfluidität wurde durch Hyperforin in PAPC-, PAPC/Cer-, PAPC/POG- und Lipid-Raft-Vesikeln bewirkt. In Cholesterol- und DPPC-haltigen Vesikeln hingegen führte Hyperforin zu einer Abnahme der Membrandichte. Dabei gab es in PAPC-basierten Liposomen keinen qualitativen Unterschied dahingehend, ob Vesikel für 15 min vor der Messung mit Hyperforin versetzt wurden oder ob Hyperforin bei der Bildung der Vesikel anwesend war. Die Dichte von PAPE-Vesikeln hingegen wurde durch Inkubation der Liposomen mit Hyperforin gesenkt, während der Einbau von Hyperforin während der Vesikelherstellung zur Bildung von Liposomen mit erhöhter Rigidität führte.

3.7 NMR-Analyse der Einlagerung von Hyperforin in (D31)POPC-Vesikel

Die Einlagerung von Hyperforin in Membranen wurde mit Hilfe der zweidimensionalen ^1H -MAS-NMR-NOESY-Analyse von multilamellaren Vesikeln mit integriertem Hyperforin (22 mol%) sowie hyperforinfreien Liposomen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Glaubitz, Universität Frankfurt evaluiert. Auf Grund von starken Überlagerungen der Spektren von Hyperforin und PAPC-Lipiden wurde dabei auf teilweise deuteriertes 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-PC ((D31)POPC) zurückgegriffen, wodurch die Resonanzdichte des Lipidspektrums reduziert und eine ausreichende Differenzierung zwischen Lipid- und Hyperforinsignalen erreicht wurde (Abb. 3.27). Nach Zuordnung der Resonanzen zu Hyperforin- und Lipidprotonen [326, 327] konnte durch Analyse der Kreuzpeaks über die Zeit der Magnetisierungstransfer zwischen räumlich nahen Kernen ermittelt werden. Diese Kreuzrelaxationsraten wurden als Marker für die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der einzelnen Hyperforinkerne in Bezug auf die Lipiddoppelschicht genutzt (Abb. 3.28). Starke Kreuzrelaxationen zwischen den terminalen Protonen der Isoprenylgruppen des Acylphloroglucinols und den Kernen der Fettsäurereste weisen somit auf eine Penetration dieser Reste in den hydrophoben Membrankern hin. Mit zunehmender Nähe zum sauerstoffreichen Bicyclus nehmen die Interaktionen der Hyperforinkerne zu den Fettsäureresten sowie auch dem Glycerolrückgrat ab, so dass auf einer Lokalisation des Bicyclus außerhalb dieser Regionen geschlossen werden kann.

^1H MAS-NOESY-NMR

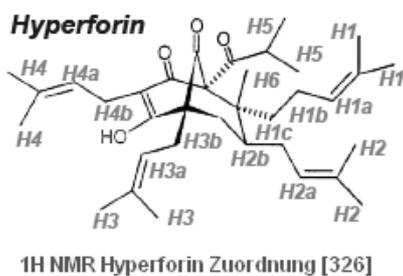
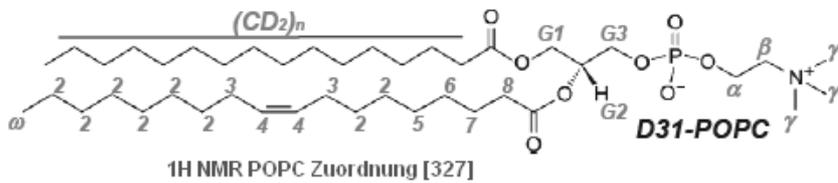
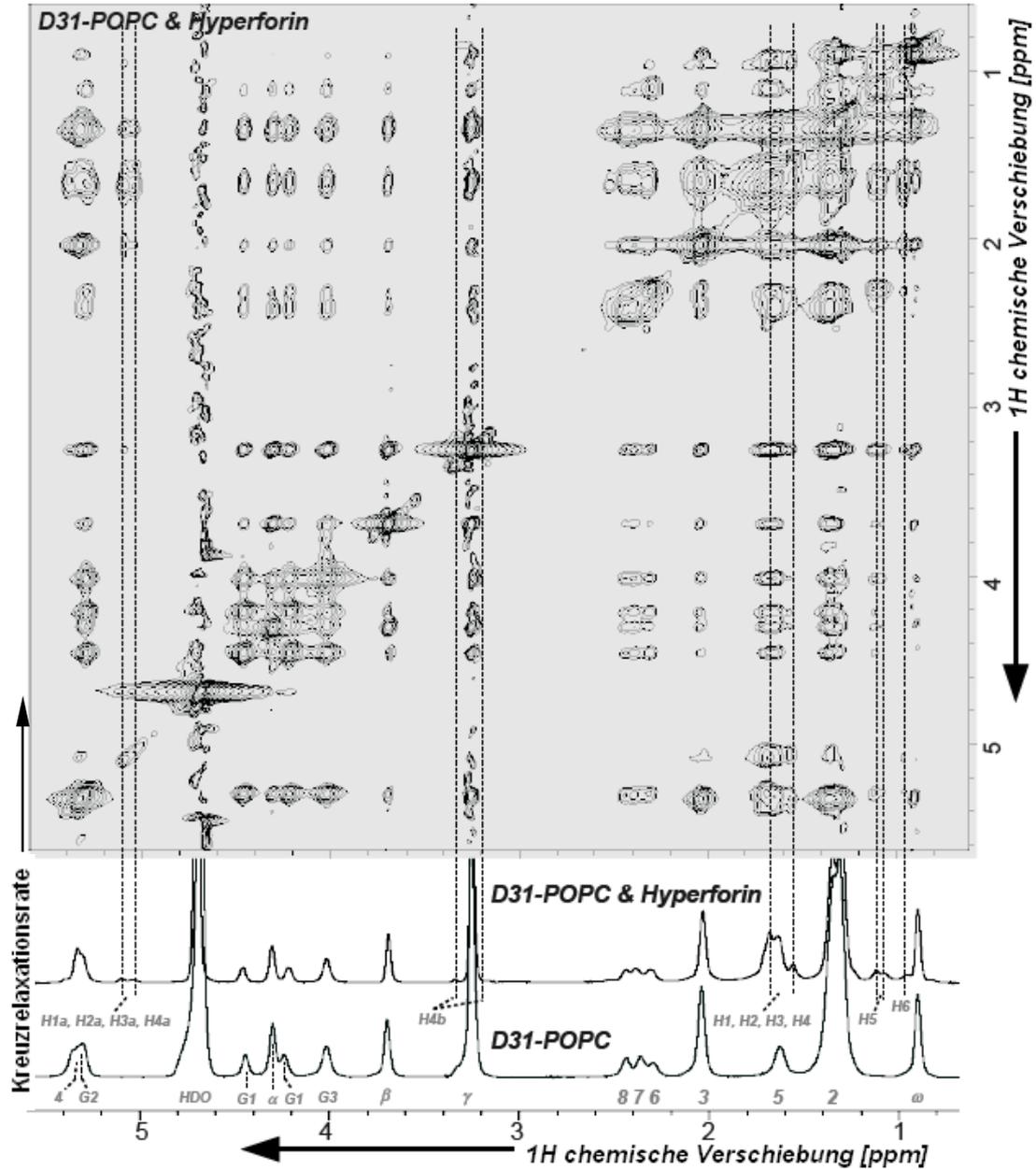


Abb. 3.27 $2\text{-D } ^1\text{H}$ MAS-NMR-NOESY Spektrum
 Beispielspektrum für (31D)POPC Liposomen mit 22 mol% Hyperforin (aufgenommen in der Arbeitsgruppe Prof. Glaubitz, Universität Frankfurt).
 Das den Diagonalpeaks entsprechende 1-D-Spektrum sowie das 1-D-Spektrum hyperforinfreier Liposomen sind aufgetragen, die zusätzlichen Hyperforinpeaks sind hervorgehoben.

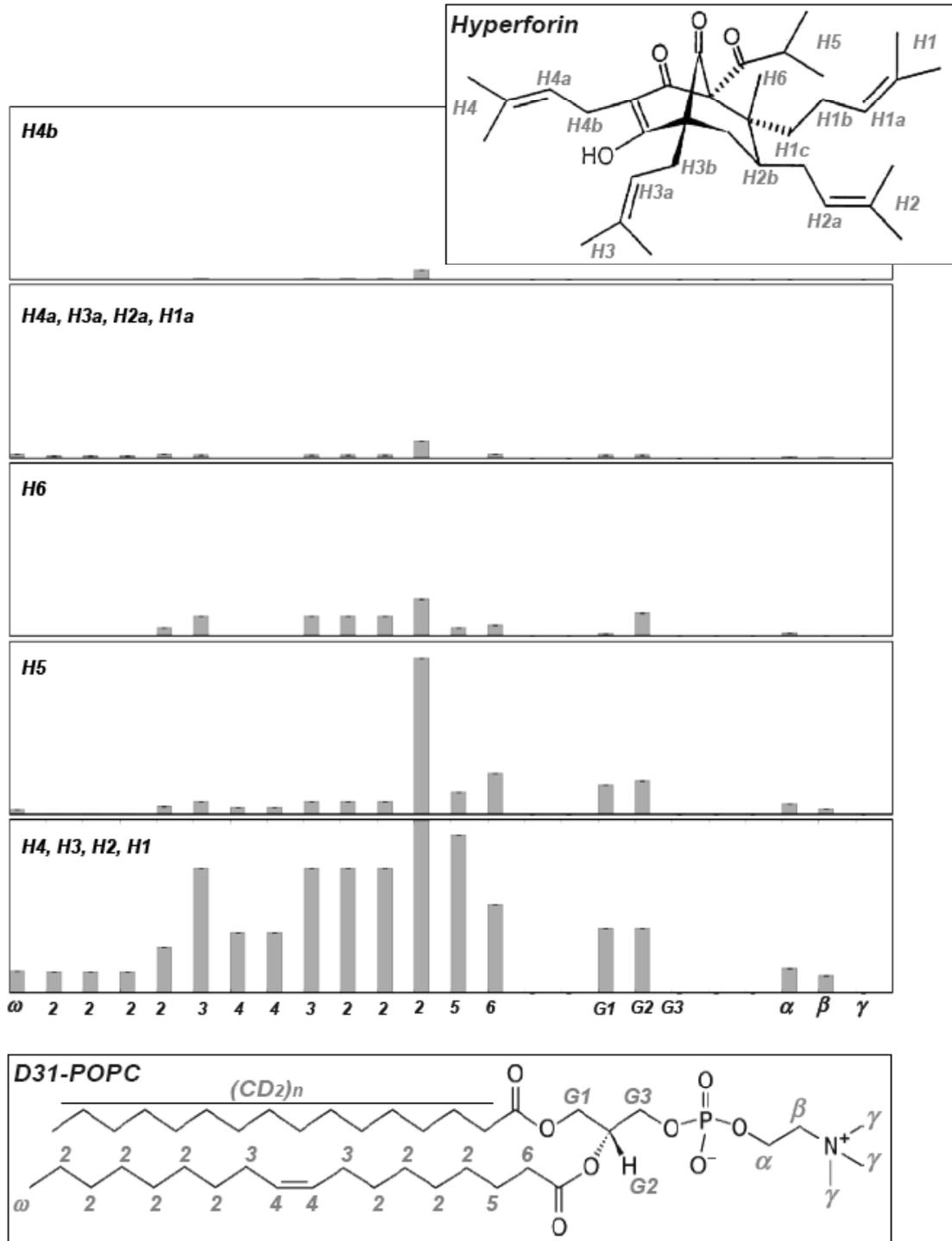


Abb. 3.28 Kreuzrelaxationsraten

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Glaubitz, Universität Frankfurt, wurden 2-D ^1H -MAS-NMR-NOESY-Spektren von (31D)POPC Liposomen mit 22 mol% Hyperforin sowie hyperforinfreien Liposomen wie in Material und Methoden beschrieben aufgenommen. Die Kreuzrelaxationsraten zwischen den angegebenen Hyperforin- und Lipidprotonen sind als Indikatoren für die räumliche Nähe dieser Kerne aufgetragen.

4 Diskussion

4.1 Der Einfluss von Hyperforin auf die cPLA₂ in PMNL und Thrombozyten

Hyperforin ist ein wichtiger Bestandteil des Johanniskrauts, der zum pharmakologischen Spektrum der Hypericum-Extrakte entscheidend beiträgt. Im Tiermodell erwies es sich als wirksam gegen Depressionen und zeigte antientzündliches, antibakterielles und antitumorales Potential [222, 226]. In der Entzündungskaskade spielt die Bildung von proinflammatorischen Mediatoren, wie Prostaglandinen und Leukotrienen, eine zentrale Rolle. Die in diese Kaskade involvierten Enzyme 5-LO und COX-1 werden durch Hyperforin potent gehemmt, während COX-2, 12- und 15-LO in ihrer enzymatischen Aktivität nicht beeinträchtigt werden [272].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Hyperforin auf die cPLA₂ näher untersucht, die für die Freisetzung von AA aus Phospholipiden und somit für den ersten Schritt in der Eikosanoid-Produktion sowie für die Bildung von Lysophospholipiden primär verantwortlich ist [156, 163]. Insbesondere in Leukozyten und Thrombozyten, in denen sie erstmalig nachgewiesen wurde [328, 329], ist sie für die physiologische und pathophysiologische Eikosanoid-Produktion essentiell [162].

In Leukozyten dient freigesetzte AA vor allem als Substrat für Lipoxygenasen [162]. AA ist in diesen Zellen hauptsächlich in Plasmalogen und in 1-O-alkyl-PC (63% aller PC) verestert, so dass die Hydrolyse von PC hier primär zur Freisetzung von 1-O-alkyl-lyso-PC, einem Vorläufer von PAF, führt [98, 163]. In Thrombozyten hingegen ist nur ein geringer Anteil der AA in 1-O-alkyl-PC gebunden, wodurch die PAF-Produktion eingeschränkt wird [96]. Freigesetzte AA wird in Thrombozyten zum größten Teil durch 12-LO zu 12-H(P)ETE und weiterhin durch COX-1 zu TXA₂ verstoffwechselt [162].

Sowohl in humanen Thrombozyten als auch in humanen PMNL wurden die Effekte von Hyperforin auf die cPLA₂ evaluiert und dabei überraschend widersprüchliche Ergebnisse erhalten.

In PMNL hemmte Hyperforin die AA-Freisetzung nach Stimulation der Zellen mit Ionophor A23187 mit einem IC₅₀ von 1,9 µM und somit ähnlich potent wie die 5-LO- und COX-1-Aktivität in intakten PMNL und Thrombozyten (IC₅₀ = 0,3 bis 3 µM) [272]. Auch nach Aktivierung der PMNL mit dem ATPase-Inhibitor Thapsigargin und in differenzierten monozytären MM6 konnte die Hemmung der cPLA₂-Aktivität reproduziert

werden. fMLP plus PMA steigerten die AA-Freisetzung aus PMNL nur sehr eingeschränkt, so dass hier keine Hemmung durch Hyperforin beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde eine leicht erhöhte Aktivität der cPLA₂ nach 15-minütiger Hyperforin-Vorbehandlung beobachtet. Da die Inkubation mit Hyperforin allerdings auch nach der Stimulation mit DMSO (Lösungsmittel für fMLP und PMA) die AA-Freisetzung im gleichen Maße schwach erhöhte, kann nicht auf einen direkten Zusammenhang mit den Stimuli fMLP und PMA geschlossen werden, sondern auf einen eventuellen schwachen Einfluss von Hyperforin selbst. In Inkubationen bei 37°C für 5 min sowie über einen Zeitraum von bis zu 30 min wich die AA-Freisetzung nach Hyperforin-Behandlung allerdings nicht von der Lösungsmittelkontrolle ab.

In Thrombozyten wurde keine Hemmung der A23187-stimulierten cPLA₂-Aktivität festgestellt. Die Thrombin-stimulierte AA-Freisetzung hingegen wurde durch Hyperforin bereits ab 1 µM reduziert. Die Untersuchung der Ca²⁺-Freisetzung zeigte dabei, dass dieser Effekt eher einer Senkung des Thrombin-induzierten Ca²⁺-Einstroms zugerechnet werden kann, welcher mit einem IC₅₀ von 1,2 µM gehemmt wurde. Dieser Befund weist auf eine Hemmung der G-Protein-gekoppelten Ca²⁺-Freisetzung hin, wie sie schon in PMNL beobachtet wurde [266] und könnte auch den unterschiedlich starken COX-1-Antagonismus von Hyperforin in Thrombozyten nach Stimulation mit A23187 (IC₅₀ = 3 µM) und mit Thrombin (IC₅₀ = 0,3 µM) erklären [272].

Interessanterweise führte die direkte Stimulation von Thrombozyten mit Hyperforin zu einer 2,6-fachen Erhöhung der AA-Freisetzung, die bei 10 µM Hyperforin ihr Maximum erreichte. Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde eine verstärkte 12-H(P)ETE-Produktion in Hyperforin-behandelten Thrombozyten beobachtet, die durch Zugabe von AA aufgehoben werden konnte (Vorarbeiten von Dr. Christian Feisst). Aus weiteren Untersuchungen der 12-LO-Aktivität in zytosolischen Fraktionen von Thrombozytenlysaten ergab sich der Schluss, dass primär nicht die 12-LO durch Hyperforin beeinflusst wird, sondern dass dies auf einer vermehrten Bereitstellung der AA basiert. Sowohl die Freisetzung von AA, als auch die Bildung von 12-H(P)ETE wurde durch einen Pyrrolidin-1-ähnlichen cPLA₂α-Inhibitor [211] unterbunden, woraus auf eine Beteiligung der cPLA₂ an der AA-Freisetzung geschlossen werden kann.

Die hier ermittelten inhibitorischen bzw. aktivierenden Hyperforinkonzentrationen sind mit der bisher beschriebenen antiinflammatorischen und antitumoralen Potenz des Acylphloroglucinols vergleichbar [266, 272, 276, 277, 330]. Sie liegen allerdings über der beschriebenen durchschnittlichen Plasmakonzentration von 0,2 µM, die nach der

Applikation von 900 mg Johanniskrautextrakt pro Tag erreicht werden kann [331]. Auf Grund der Akkumulation von Hyperforin in lipophileren Geweben oder Zellkompartimenten könnten regioselektiv dennoch mikromolare Spiegel auftreten. Und bei topischer Applikation in Form von hyperforinhaltigen Cremes [271] liegt ohnehin ein verändertes Pharmakokinetik-Profil vor. Die Inhibition der cPLA₂ durch 2 µM Hyperforin könnte somit durchaus pharmakologisch relevant sein. Inwieweit allerdings die Freisetzung von 12-H(P)ETE aus Thrombozyten bei normaler Johanniskrautextraktanwendung auftritt ist fraglich. Auf Grund der im Vergleich zu PMNL gegensätzlichen Effekte war eine weitere Untersuchung dieses Befundes dennoch von Interesse.

4.2 Mechanistische Untersuchungen

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der mechanistische Hintergrund der beobachteten Effekte untersucht. Insbesondere vor dem Hintergrund der widersprüchlichen Befunde stellte sich die Frage, ob Hyperforin zelltypspezifisch in die zelluläre Regulation der cPLA₂ eingreift oder ob mögliche direkte Effekte zum Tragen kommen. Daher wurden die Translokation des Enzyms, der Einfluss des Ca²⁺-Spiegels, die Phosphorylierungswege sowie direkte Effekte auf das Enzym und die Bedeutung von Membranstrukturen untersucht.

4.2.1 Translokation

Eine Voraussetzung für die Spaltung von Phospholipiden ist die Translokation der cPLA₂ an intrazelluläre Membranen. Dabei kommen insbesondere Membranen des Golgi, des ER, Kernmembranen und zum Teil auch Plasmamembranen in Frage [38, 41, 156]. In PMNL wurde nach A23187-Stimulation eine Kotranslokation der cPLA₂ mit der 5-LO an Kernmembranen beschrieben [332], wohingegen nach Stimulation durch fMLP oder PAF partial auch eine Bindung der cPLA₂ an Plasmamembranen nachgewiesen wurde, wo die cPLA₂ die Rekrutierung der NADPH-oxidase forciert [41]. In kernlosen Thrombozyten hingegen stellt die Plasmamembran die Hauptzielstruktur dar [49].

Eine Beurteilung des Einflusses von Hyperforin auf die Translokation der cPLA₂ in PMNL ist in der vorliegenden Arbeit nicht gelungen. In Thrombozyten hingegen wurde nach Behandlung mit steigenden Hyperforinkonzentrationen eine Lokalisation der cPLA₂ in Membrankompartimenten beobachtet. Im Gegensatz zur AA-Freisetzung nahm dieser

Effekt aber bei 30 μM Hyperforin nicht ab, sondern stieg konzentrationsabhängig weiter an.

4.2.2 Modulation des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels

Der Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} auf 100 – 300 nM stellt den wichtigsten Antrieb in der Aktivierung der cPLA₂ dar [31, 32], scheint aber, abgesehen von der Hemmung der Thrombin-induzierten AA-Freisetzung in Thrombozyten, für die Hyperforin-vermittelten Effekte nicht von Bedeutung zu sein. Der G-Protein-gekoppelte Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration kann durch Hyperforin beeinträchtigt werden, allerdings können keine Effekte auf den Ionophor- oder Thapsigargin-induzierten Ca^{2+} -Einstrom nachgewiesen werden [266]. Dennoch führte die Behandlung von Ionophor- und Thapsigargin-stimulierten PMNL mit Hyperforin zur verminderten AA-Freisetzung. In Thrombozyten induzierte Hyperforin einen sofortigen schwachen Ca^{2+} -Einstrom, durch den der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel nach 80 s um durchschnittlich 123 nM anstieg. Jedoch konnten die Effekte von Hyperforin durch die Behandlung der Zellen mit 1 mM EDTA und 30 μM BAPTA, trotz nachgewiesener völliger Entfernung des intrazellulären Ca^{2+} , nicht aufgehoben werden. Sowohl die Freisetzung von AA, als auch die Bildung von 12-H(P)ETE und die Translokation der cPLA₂ an Membranen wurden unvermindert beobachtet. Ein möglicher Beitrag der Ca^{2+} -unabhängigen iPLA₂ [101, 333] wurde durch Behandlung der Zellen mit dem iPLA₂-Inhibitor BEL ausgeschlossen. Interessanterweise reduzierte der extrazelluläre sPLA₂-Inhibitor DTT in Abwesenheit von Ca^{2+} , jedoch nicht unter physiologischen Bedingungen mit 1 mM extrazellulärem Ca^{2+} , die Freisetzung von AA. Da die sPLA₂ allerdings eine stärkere Ca^{2+} -Abhängigkeit als die cPLA₂ aufweist, ist unklar, inwieweit dieser Effekt auf eine tatsächliche Beteiligung dieser Enzymfamilie oder auf unspezifische DTT-Effekte zurückzuführen ist.

Eine Aktivierung der cPLA₂ ohne Steigerung der basalen Ca^{2+} -Spiegel kann (zumindest in Makrophagen) auch nach Stimulation mit LPS, Okadainsäure oder Phorbolestern beobachtet werden [93, 334]. Die Phosphorylierung des Enzyms (siehe unten), die unterstützende Membran-Assoziation der katalytischen Domäne der cPLA₂ [45, 46] und die direkte Interaktion mit den Membrankomponenten PIP₂ oder C-1-P [106, 108, 121] können diese Ca^{2+} -unabhängigen Effekte vermitteln. Eine Aktivierung der cPLA₂ in völliger Abwesenheit von Ca^{2+} , wie sie hier gezeigt wird, wurde aber bisher nur für Boswelliasäuren, ein weiterer antiinflammatorischer Naturstoff, nachgewiesen [335].

4.2.3 Phosphorylierung der cPLA₂

In Thrombozyten und PMNL phosphorylieren p38MAPK, ERK-1/2 und Mnk1 die cPLA₂ an Ser505 und Ser727 und führen damit zu einer 2- bis 3-fachen Erhöhung der Enzymaktivität [53, 56-58, 62, 336, 337].

In PMNL konnte die Behandlung mit Hyperforin die Ionophor- ebenso wie die fMLP/PMA-stimulierte Phosphorylierung der genannten Kinasen bis zu einer Konzentration von 10 µM nicht beeinflussen. In Thrombozyten hingegen resultierte aus der Stimulation mit 10 - 30 µM Hyperforin eine Aktivierung der p38MAPK und korrelierende Phosphorylierung der cPLA₂ an Ser505, die in ihrer Stärke mit der Thrombin-induzierten Phosphorylierung vergleichbar war, im Gegensatz zu dieser aber auch in Abwesenheit von Ca²⁺ auftrat. ERK-1/2 und Mnk1 hingegen wurden durch Hyperforin nicht aktiviert, obwohl eine Phosphorylierung der Mnk1 durch p38MAPK zu erwarten gewesen wäre [64]. Die Behandlung von Hyperforin-stimulierten Thrombozyten mit dem p38MAPK-Inhibitor SB203580 hemmte die Phosphorylierung der cPLA₂ und bestätigte damit die Abhängigkeit der cPLA₂-Phosphorylierung von der Aktivierung der p38MAPK. Allerdings hatte SB203580 ebenso wie der ERK-1/2-Inhibitor U0126 keinen Einfluss auf die Freisetzung von AA und 12-H(P)ETE sowie auf die Translokation der cPLA₂. Die Phosphorylierung der cPLA₂ durch Hyperforin steht somit nicht im direkten Zusammenhang mit den beobachteten Effekten auf die Enzymaktivität.

Neben p38MAPK, ERK-1/2 und Mnk1 ist auch die CaMKII in glatten Muskelzellen der Aorta (VSMC), leukämischen Zellen (U937) und embryonalen Nierenzellen (HEK293) sowie C12-Mausfibroblasten in die Phosphorylierung der cPLA₂ involviert [66-69]. Allerdings wurde in dieser Arbeit weder in Thrombozyten noch in PMNL eine Aktivierung dieser Kinase festgestellt. Darüber hinaus hemmte der CaMKII-Inhibitor KN-62 in Thrombozyten weder die AA-Freisetzung noch die Membranbindung der cPLA₂ nach Hyperforin-Stimulation.

4.2.4 Direkte Effekte in Zellhomogenaten

Da sowohl die Hemmung der cPLA₂ in PMNL als auch die Aktivierung in Thrombozyten nicht auf einen Eingriff von Hyperforin in die intrazelluläre Signaltransduktion zurückgeführt werden konnte, rückte die Untersuchung einer direkten Enzyminteraktion in den Fokus. Allerdings ergab die Analyse der cPLA₂-Aktivität in ultraschalllysierten PMNL

und Thrombozyten trotz der differenzierten Hyperforin-Effekte in intakten Zellen analoge Muster. In Abwesenheit von Ca^{2+} konnte Hyperforin die cPLA_2 nicht beeinflussen und in Anwesenheit von Ca^{2+} kam es zu einer leichten Hemmung mit IC_{50} -Werten von $\geq 7,4 \mu\text{M}$. Diese Inhibition war unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration und vom pH-Wert und könnte tatsächlich auf eine direkte Hemmung der cPLA_2 bei hohen Hyperforinkonzentrationen zurückzuführen sein. Die Bindung der cPLA_2 an Membranfragmente im Thrombozytenlysat wurde unter diesen Bedingungen jedoch nicht beeinträchtigt. Auf Grund des hohen IC_{50} kann die Hemmung im Lysat die Inhibition in intakten PMNL nur partiell begründen und steht im Gegensatz zu der beobachteten Aktivierung in intakten Thrombozyten. Allerdings könnte sich der Abfall der AA-Freisetzung aus Thrombozyten bei hohen Hyperforinkonzentrationen, der trotz gesteigerter Membranbindung beobachtet wurde, in diesem Befund widerspiegeln.

Auch der Hyperforin-induzierte 5-LO-Antagonismus erfährt im Homogenat eine Abschwächung gegenüber Effekten in intakten Zellen oder in zellfreien Assays [310]. Die Konkurrenz von Membranfragmenten oder Lipiden um eine möglichen Hyperforin-Bindestelle am Enzym oder die Assoziation von Hyperforin an hydrophobe Zellbestandteile könnte hier sowie bei der Modulation der cPLA_2 -Aktivität die Effekte vermindern. Darüber hinaus könnte die Zerstörung eines evt. relevanten aber bisher nicht bekannten Signaltransduktionswegs der cPLA_2 -Regulation durch die Zellyse zur Aufhebung der Hyperforin-Ergebnisse führen. Des Weiteren werden zellspezifische Membranunterschiede durch die Zellyse nivelliert. Die ungleichmäßige Verteilung von Phospholipiden zwischen den Zellmembrankompartimenten und den beiden Seiten der Lipid-Doppelschichten [338] resultiert in Unterschieden im Aufbau zwischen der Außenseite der intrazellulären Membranen in PMNL und der Innenseite der Plasmamembran in Thrombozyten. Die Zerstörung dieser Strukturen könnte somit für die Angleichung der Hyperforineffekte in PMNL- und Thrombozytenhomogenaten verantwortlich sein.

4.2.5 Direkte Effekte und Membraninteraktionen

In zellfreien Assays sollte ebenfalls eine direkte inhibitorische oder aktivierende Potenz von Hyperforin überprüft sowie weiterhin der Einfluss verschiedener Membrankomponenten analysiert werden. Dabei wurde PAPC als Substrat gewählt. Im zellulären Kontext spielt neben PC vor allem auch PE eine entscheidende Rolle als AA-

Quelle und zelltypabhängig werden neben 1,2-Diacyl- auch 1-O-Alkyl- und 1-O-Alk-1'-enyl-Phospholipide hydrolysiert [96, 97]. Allerdings konnte keine Selektivität der isolierten cPLA₂ bezüglich der Kopfgruppen PC und PE und der 1-Radyl-Gruppe festgestellt werden [71, 95, 102], weshalb die Untersuchungen mit dem gut verfügbaren PAPC durchgeführt wurden. Mit Hilfe von großen unilamellaren Liposomen sollte die Lipid-Doppelschicht von Membranen nachgestellt werden. Des Weiteren wurden Versuche mit Triton-X-100-Mizellen durchgeführt, in denen die jeweiligen Lipide durch das Detergenz im Verhältnis 4:1 verdünnt und somit vereinzelt vorliegen [316, 339]. Die Oberflächenstruktur mit ihren physikalischen Eigenschaften wird hier aufgebrochen, wodurch Triton-X-100-Mizellen zur Differenzierung zwischen direkten und Membran-Effekten geeignet sind.

Die Inkubation von PAPC-Liposomen und -Triton-X-100-Mizellen mit Hyperforin führte weder in An- noch in Abwesenheit von Ca²⁺ zu einer veränderten Aktivität der aufgereinigten cPLA₂. Eine direkte Beeinflussung des Enzyms durch Hyperforin konnte daher ausgeschlossen werden. Somit wurde im Weiteren untersucht, inwieweit Hyperforin in das System der Lipid-Enzym-Wechselwirkungen eingreift, wobei zunächst ein möglicher Einfluss von Hyperforin auf die cPLA₂-Aktivierung durch C-1-P und PIP₂ sowie Ceramid und DAG analysiert wurde.

Die Bildung von C-1-P in A549 Epithelzellen und L929 Fibroblasten ist essenziell mit der A23187-induzierten AA-Freisetzung verknüpft [120, 122] und könnte auch in PMNL von Relevanz sein, da diese im Gegensatz zu anderen hämatologischen Zellen zur Umwandlung von Ceramid in C-1-P befähigt sind [340]. Das bei physiologischem pH negativ geladene Hyperforin wiederum könnte mit der kationischen C-1-P-Bindestelle auf der C2-Domäne der cPLA₂ interagieren und somit die C-1-P-Bindung antagonisieren [123]. Allerdings führte die Behandlung von C-1-P-haltigen Liposomen mit Hyperforin nur zu einer sehr schwachen Reduktion der cPLA₂-Aktivität.

Ein weiterer starker Aktivator der cPLA₂, PIP₂, vermittelt seine Effekte durch Bindung an die katalytische Domäne [13]. Eine physiologische Relevanz dieses Lipids wurde bisher nicht in Neutrophilen, aber in LPS-stimulierten Makrophagen nachgewiesen [109]. Um dennoch die Hemmung einer möglichen PIP₂-Interaktion durch Hyperforin zu evaluieren, wurde 3% PIP₂ in PAPC-Liposomen eingebaut. Doch auch die Stimulation des Enzyms durch PIP₂ konnte durch Hyperforin nur in hohen Konzentrationen unterbunden werden. Durch Behandlung von PAPC/C-1-P und PAPC/PIP₂-Vesikeln mit Triton-X-100 wurden diese Hyperforin-Effekte weiter abgeschwächt. Lediglich 30 µM Hyperforin führten hier zu einer leichten Reduktion der AA-Freisetzung. Bei einer direkten Konkurrenz von

Hyperforin um die C-1-P- oder PIP₂-Bindestelle hingegen wäre auch im mizellaren Assay ein vergleichbarer Effekt zu erwarten gewesen.

Gegenüber den Lipiden Ceramid und POG ergaben sich unterschiedliche Befunde. Während die Ceramid-vermittelte Stimulation der cPLA₂ durch Hyperforin nicht beeinträchtigt wurde, konnte die POG-induzierte Aktivierung durch Hyperforin mit einem IC₅₀ von 7,6 µM gehemmt werden. Beide Lipide wirken als potente Aktivatoren der cPLA₂, wobei der genaue Mechanismus dieser Interaktion noch nicht vollständig geklärt ist [105, 107, 136, 137, 341]. Auf Grund der Analogie in ihren Strukturen und physikalischen Eigenschaften wurde eine vergleichbare Modulation der Membranstruktur durch die Lipide angenommen, die sich in einer Separation von Phospholipid-Kopfgruppen, der Induktion einer Phasentrennung in Ceramid/POG-reiche und -arme Bereiche und einer Entstehung von nicht-lamellaren Arealen äußert [99, 127, 129-131]. Dahingehend ist die Differenz zwischen den Hyperforineffekten erstaunlich und weist auf eine gewisse Selektivität der Hyperforininteraktionen hin. Direkte Effekte von Ceramid auf die cPLA₂ wurden in dieser Arbeit nicht festgestellt. In Triton-X-100-Mizellen war der Einfluss von Ceramid ebenso wie der von POG auf die cPLA₂-Aktivität nicht mehr detektierbar. Des Weiteren hob die Zugabe von Triton-X-100 zu PAPC/POG-Liposomen die Hemmung durch Hyperforin auf und lässt somit eine Modifikation der Membranstrukturen durch Hyperforin vermuten, die in einer reduzierten Phospholipid-Hydrolyse resultiert. Interessanterweise erhöhte POG die cPLA₂-Aktivität auch in Abwesenheit von Ca²⁺ sehr stark, ohne jedoch eine feste Bindung der cPLA₂ an Liposomen zu induzieren. Hyperforin inhibierte diese Aktivierung sogar mit einem IC₅₀ von 2,9 µM.

Obwohl ein Einfluss von Ceramid und DAG auf die cPLA₂ in intakten Zellen nachgewiesen wurde, ist die physiologische Relevanz in Ionophor- oder Thapsigargin-stimulierten PMNL unklar. Hingegen mehren sich die Hinweise auf die Bedeutung von Mikrodomänen (Lipid Rafts) in der Regulation der cPLA₂. Die aktivierenden Eigenschaften von Cholesterol in zellulären Membranen wurden bereits vor über 25 Jahren publiziert [149, 150]. Über den lipidverdichtenden Charakter hinaus ist Cholesterol eine wichtige Strukturkomponente von Membranen, die insbesondere über hydrophobe Interaktionen mit Sphingomyelin Domänenbildung in Membranen induziert [139, 342-345]. Die zelluläre Verteilung von Cholesterol und Sphingomyelin lässt ein Auftreten dieser Domänen insbesondere an der Außenseite der Plasmamembran sowie im Golgi-Apparat vermuten [139, 145]. Obwohl eine Anreicherung der cPLA₂ in Lipid Rafts bisher

nur in Prionen-infizierten Nervenzellen und primären Hippocampus-Neuronen nachgewiesen wurde [88, 148], könnte es auch in PMNL zu einer Anlagerung des Enzyms an Mikrodomänen kommen. Ein Hinweis auf eine räumliche Nähe der cPLA₂ zu Lipid-Raft-artigen Strukturen in Leukozyten findet sich in der leukozytären Zelllinie RBL-2H3, in der FLAP in Mikrodomänen lokalisiert ist [153]. Mit Hilfe von 33% Cholesterol in einer Lipidmischung aus PAPC und Sphingomyelin wurde in unseren Modellmembranen entsprechend den Literaturangaben eine Phasentrennung induziert [139, 142, 143]. Im Vergleich zur Messung an reinen PAPC-Membranen wurde durch diese strukturelle Veränderung die Aktivität der cPLA₂ beinahe verdreifacht, wobei diese Steigerung der Phospholipid-Hydrolyse ähnlich zu PAPC/Ceramid- und PAPC/POG-Membranen nach Zerstörung der Lipiddoppelschicht durch Triton-X-100 aufgehoben war. Die Behandlung dieser Liposomen, nicht aber der Triton-X-100-Mizellen, mit Hyperforin verminderte die AA-Freisetzung mit einem IC₅₀ von 4,1 µM auf bis zu 38% Restaktivität.

Somit konnte eine Hemmung der cPLA₂-Aktivität durch Hyperforin in Modellmembranen mit Perturbationen oder induzierten Mikrodomänen festgestellt werden (PAPC/POG und PAPC/Chol/SM). Allerdings wurde in beiden Fällen die Ca²⁺-abhängige Assoziation der cPLA₂ mit diesen Membranen durch Hyperforin nicht beeinträchtigt.

Bezogen auf das Vorkommen von Mikrodomänen auf der Innenseite der Plasmamembran in Thrombozyten sind, abgesehen von den größeren Caveolae, weniger Informationen verfügbar. Sphingolipide sind nur zu einem geringen Prozentsatz auf dieser Membranseite lokalisiert und ungesättigte Phospholipide dominieren. Dennoch wird auch hier ein membranordnender und phasenbildender Effekt von Cholesterol vermutet, welches gleichmäßig über beide Seiten der Plasmamembran verteilt ist [139, 141, 346]. Gesättigte Phospholipide weisen Sphingomyelin-ähnliche Eigenschaften auf und könnten daher dessen Rolle in Mikrodomänen übernehmen. Selbst in Modellmembranen aus POPC und Cholesterol wurde die Ausbildung von flüssig-kristallinen (l_o) neben fluiden (l_d) Phasen detektiert, wenn auch die Phasen weniger prominente Differenzen aufwiesen als in POPC/SM/Chol-Mischungen [143]. Daher wird von der Ausbildung von Domänen auf der Innenseite der Plasmamembran ausgegangen, die in ihrer Zusammensetzung allerdings von den besser erforschten Lipid Rafts abweichen. Speziell in Thrombozyten wird im Vergleich zu anderen Zellarten eine erhöhte Cholesterolkonzentration gefunden und eine positive Korrelation der Cholesterolbeladung mit der Freisetzung von AA konnte festgestellt werden [149, 150, 342]. Auch in zellfreien Systemen gilt Cholesterol als Aktivator der cPLA₂ [133], in der vorliegenden Arbeit erhöhte die Zugabe von 20 bzw.

50% Cholesterol in Liposomen, aber nicht in Mizellen, die Phospholipid-Hydrolyse 1,9-fach. Da Hyperforin in intakten Zellen die Steigerung der AA-Freisetzung nur in unstimulierten Zellen und auch nach Entfernung von extra- und intrazellulärem Ca^{2+} auslöste, wurde die Wirkung von Hyperforin in diesen Membranen in Abwesenheit von Ca^{2+} , in Gegenwart von 1 mM EDTA, untersucht. Unter diesen Bedingungen ergaben sich nach Inkubation mit Hyperforin allerdings sehr schwankende Befunde zwischen den Versuchstagen, die eine Hemmung oder eine Aktivierung zeigten und auf einen alterierenden Einbau von Hyperforin in die Lipiddoppelschichten hinwiesen. Ausgehend von der Überlegung, dass in Thrombozyten der Interaktion von Hyperforin mit der cPLA₂ dessen Durchqueren der Plasmamembran und somit die Einlagerung von Hyperforin in die Zielstruktur des Enzyms vorausgeht, wurden im weiteren Liposomen mit integriertem Hyperforin hergestellt. Tatsächlich führte diese Abwandlung des Assays zu konstanteren Resultaten. Hyperforin induzierte signifikante 3,3- und 4,3-fache Erhöhungen der cPLA₂-Aktivität in Liposomen mit 20 bzw. 50% Cholesterol. In reinen PAPC-Vesikeln hingegen konnte Hyperforin auch unter diesen Bedingungen die AA-Freisetzung nicht beeinflussen. Darüber hinaus induzierte Hyperforin die Bindung der cPLA₂ an PAPC-Liposomen mit 50% Cholesterol trotz Abwesenheit von Ca^{2+} . In Gegenwart von Ca^{2+} war keine weitere Verstärkung der Phospholipid-Hydrolyse zu beobachten, wobei es im Fall der für nur 15 min mit Hyperforin vorbehandelten Liposomen sogar zu einer Verminderung der cPLA₂-Aktivität mit IC₅₀-Werten von 25,8 (20% Cholesterol) und 5,5 μM (50% Cholesterol) kam. 30 μM Hyperforin erhöhten auch in PAPC/SM/Chol-Liposomen nach 15minütiger Vorbehandlung die Phospholipid-Hydrolyse in Abwesenheit von Ca^{2+} 7,3-fach und verstärkten die Assoziation der cPLA₂ mit den Liposomen. Durch die Zugabe von Triton-X-100 konnte die Aktivitätssteigerung erneut annulliert werden. Allerdings traten diese Befunde ebenso wie die oben beschriebene Hemmung der cPLA₂ in Anwesenheit von Ca^{2+} nicht in PAPC/SM/Chol-Liposomen auf, wenn Hyperforin während deren Generierung eingebaut wurde.

Inkonsistente Befunde ergaben sich auch bei der Vermessung von mit Hyperforin vorbehandelten PAPC/DPPC-Vesikeln, mit denen eine reine Erhöhung der Membrandichte simuliert wurde. Der Einbau von Hyperforin in diese Vesikel führte auch hier zu einer Stabilisierung der Ergebnisse, allerdings konnte keine signifikante Veränderung der AA-Freisetzung beobachtet werden. Aufgrund der hohen Fluidität der mehrfachungesättigten AA in PAPC konnte aber auch der Anteil von 33% DPPC keine cholesterolähnliche Rigidität herbeiführen. Die Inhibition der cPLA₂-Aktivität bei höheren Konzentrationen an

nicht AA-verestertem PC limitierte allerdings den Anteil an DPPC in den Modellmembranen.

Da neben PC auch PE ein Hauptsubstrat der cPLA₂ darstellt, sollte auch der Effekte von Hyperforin auf die Freisetzung von AA aus PAPE-Liposomen evaluiert werden. Bereits bei der Herstellung dieser Vesikel zeigten sich veränderte Membraneigenschaften, die möglicherweise auf die veränderte Lipidstruktur zurückzuführen sind. Aufgrund der kleineren Kopfgruppe und der daraus resultierenden negativen Krümmung von PAPE-Aggregaten gelang im Gegensatz zu PAPC-basierten Liposomen die Herstellung von homogenen Vesikeln mit Größen von 150 bis 200 nm nicht und, wie bereits beschrieben [103], ergaben sich Schwierigkeiten bei der Abzentrifugation der PAPE-Lipidaggregaten. Dennoch wurden die größeren, multilamellaren Vesikeln mit Hyperforin inkubiert und in Anwesenheit von Ca²⁺ konnte eine leichte Hemmung der cPLA₂-Aktivität beobachtet werden (IC₅₀ = 10 µM). In Gegenwart von 1 mM EDTA hingegen führte die Zugabe von Hyperforin zu einer 5,2-fachen Erhöhung der Phospholipid-Hydrolyse, die ihr Maximum bei 10 µM Hyperforin fand. Die Aktivitätsabnahme bei höheren Hyperforin-Konzentrationen ist möglicherweise auf die überlagernden hemmenden Effekte zurückzuführen. Eine Korrelation der cPLA₂-Aktivierung mit einer verstärkten Membranbindung war in diesem Fall nicht festzustellen, in Analogie zu den bisherigen Ergebnissen konnten aber auch hier die Beobachtungen in PAPE-Membranen durch die Zugabe von Triton-X-100 aufgehoben werden. Aus der Integration von Hyperforin in PAPE-Liposomen während der Herstellung resultierten lediglich Aktivitätsschwankungen auf Grund der verschiedenen Ansätze, aber keine Hyperforin-spezifischen Effekte.

In der Summe ergibt sich ein komplexes Bild, in dem Hyperforin die Aktivität der cPLA₂ unter bestimmten Versuchsbedingungen und abhängig von der Membranstruktur beeinflusst. Die unterschiedlichen beobachteten Effekte können allein aus den vorliegenden Ergebnissen heraus nicht erklärt werden. Sie weisen aber auf die Komplexität der Hyperforin-Membran-Enzym-Interaktionen und die Bedeutung des strukturellen Aufbaus der Membranen, insbesondere der Anwesenheit von Mikrodomänen, Cholesterol und PAPE, hin.

Da vor allem ordnende Strukturen im Zusammenhang mit den Hyperforin-Effekten relevant waren, verwundert es nicht, dass tatsächlich ein schwacher Einfluss von Hyperforin auf die Dichte der Liposomen beobachtet werden konnte. Diese hing erneut stark von der Lipid-Zusammensetzung ab, so dass Hyperforin membranverdichtende Eigenschaften in PAPC-, PAPC/Cer-, PAPC/POG- und PAPC/SM/Chol-Liposomen

aufwies, während es in der Gegenwart von Cholesterol und DPPC die Rigidität der Membranen verringerte. Diese Beobachtung konnte sowohl in Vesikeln mit integriertem Hyperforin als auch in Liposomen nach 15minütiger Inkubation mit Hyperforin getroffen werden. Die verschiedenartigen Effekte der Assay-Bedingungen auf die cPLA₂-Aktivität spiegeln sich in diesen Befunden also nicht wieder. Eine Ausnahme bildet dabei die Vermessung von PAPE-Vesikeln. Während die Dichte von PAPE-Liposomen durch die 15minütige Behandlung mit Hyperforin verringert wurde, führte die Herstellung von PAPE/Hyperforin-Vesikeln zu einer Verstärkung der Rigidität.

Eine direkte Korrelation der Fluidität von Membranen mit der Enzymaktivität kann für die 5-LO festgestellt werden [318]. Für die cPLA₂ hingegen wird ein solcher Zusammenhang nicht abgeleitet, da die Zugabe von verdichtenden Agenzien die Aktivität des Enzyms sowohl erhöhen (Cholesterol) als auch verringern (Sphingomyelin) kann [105, 154]. So ist es auch unwahrscheinlich, dass Hyperforineffekte allein über eine Modulation der Membrandichte vermittelt werden. Hyperforin führt auch hier zu differenzierten Resultaten, allerdings lassen die Befunde keinen direkten Vergleich mit seinen Einflüssen auf die Enzymaktivität zu. Zwar kann in hyperforinhaltigen PAPC/Chol-Liposomen und in PAPE-Vesikeln nach der Inkubation mit Hyperforin eine erhöhte Membranfluidität sowie auch eine Aktivierung des Enzyms beobachtet werden, allerdings senkt Hyperforin auch schon nach 15minütiger Inkubation mit PAPC/Chol-Liposomen die Rigidität der Lipide ohne jedoch die AA-Freisetzung zu steigern. Die Aktivierung der cPLA₂ durch 30 µM Hyperforin in PAPC/SM/Chol-Vesikeln wiederum spiegelt sich nicht in einer Erhöhung der Membranfluidität wieder. Auch die Inhibition der cPLA₂ lässt sich weder bezüglich der Hyperforinkonzentrationen noch der Effektintensität durch die Verstärkung der Membranordnung reflektieren. Doch die Diversität der Befunde lässt erneut auf vielschichtige Interaktionen von Hyperforin schließen.

Zur genaueren Evaluation der Einlagerung von Hyperforin in Membranen wurde die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Hyperforin-Moleküls in PC-Liposomen über ¹H-NMR-Analysen ermittelt. Auf Grund einer starken Überlagerung der Spektren von Lipiden und Hyperforin erfolgten die Messungen in teilweise deuterierten POPC-Vesikeln bei 850 MHz, wodurch eine bisher nicht erzielte Auflösung der Lipidspektren und eine ausreichende Trennung der Lipid- und Hyperforin-Signale erreicht wurde. Tatsächlich ergaben die Untersuchungen enge Interaktionen der vier lipophilen Isoprenylreste mit dem hydrophoben Bereich der Liposomen, während der kürzere Isopropyl- und Methylrest geringere Wechselbeziehungen zu den Fettsäureresten der umgebenden Phospholipide

aufwiesen. Daher können eine Lokalisation des bicyklischen Teils der Hyperforin-Struktur in räumlicher Nähe zu den Kopfgruppen der Lipide und eine tiefere Membranpenetration der lipophilen Isopropylreste postuliert werden. Dieses Modell spiegelt die amphiphile Struktur des Moleküls wieder, wenn sie auch nicht mit Gewissheit auf alle Membranstrukturen übertragen werden kann. Die Einlagerung weiterer Phospholipide oder Strukturkomponenten wie Cholesterol konnte auf Grund von weiteren Spektrenüberlappungen nicht analysiert werden, aber eine Modulation der Hyperforin-Interkalation ist denkbar, die zu abweichenden Effekten führen könnte.

Die Modifikation der Membranstruktur durch Hyperforin könnte aber auch auf verschieden starke Wechselwirkungen mit einzelnen Lipidstrukturen zurückzuführen sein, wobei insbesondere die im Glycerol-Rückgrat-Bereich positionierte vinyloge Carbonsäurestruktur des Acylphloroglucinols als potentieller Interaktionspartner auftreten kann. Die Derivatisierung dieser Gruppe führt zum Wirkungsverlust des Hyperforins in Bezug auf die Hemmung der 5-HT-Wiederaufnahme, der 5-LO-Aktivität in intakten PMNL und des Parasiten *Plasmodium falciparum* [275, 347-349]. Auch im stabileren Hyperforinderivat Aristoforin, welches durch Addition einer Carboxymethylfunktion an die Carbonsäure-Gruppe entsteht, ist die neu entstandene Carbonsäuregruppe als essentiell für die Wirkungen anzusehen [350]. In dieser Arbeit erwies sich der Hyperforin-O-Methylester auch in der Untersuchung der AA-Freisetzung in PMNL und Thrombozyten als wirkungslos. Im zellfreien Assay hingegen konnte eine Aktivierung der cPLA₂ beobachtet werden, die allerdings nicht die Selektivität der Hyperforineffekte widerspiegelte, sondern unabhängig von der Liposomen-Zusammensetzung, der Anwesenheit von Ca²⁺ oder EDTA und den Assaybedingungen bezüglich der O-Methylhyperforin-Einlagerung auftrat. Durch die Methylierung der Carbonsäurefunktion wurden somit die Effekte des Hyperforins aufgehoben ohne bedeutende strukturelle Veränderungen der Molekülstruktur zu bewirken. Eine Hyperforin-ähnliche Einlagerung des O-Methylesters ist auf Grund des sauerstoffreichen Bicyklus trotz Verlust der negativen Ladung recht wahrscheinlich und die Bedeutung spezifischer Interaktionen der Carbonsäuregruppe mit Lipiden tritt in den Vordergrund.

Einflüsse von Hyperforin auf Membraneigenschaften wurden schon in früheren Studien diskutiert. So könnte die Veränderung der Membranfluidität oder das Absenken des pH-Gradienten im Zusammenhang mit der antidepressiven und antitumoralen Wirkung von Hyperforin stehen [240, 249, 250, 252, 276]. Bezüglich der Membranfluidität von neuronalen Membranen wurden widersprüchliche Hyperforinwirkungen beschrieben.

Während die Flexibilität der Fettsäurereste erhöht wurde, kam es insbesondere in Protein-umgebenden Lipiden zu einer Abnahme der Fluidität [249]. Inwieweit dieser Effekt maßgeblich Rezeptoren oder Kanäle beeinflussen könnte, ist unklar.

Den Wechselwirkungen von Lipiden und Proteinen liegen sehr komplexe Mechanismen zu Grunde. Lipide beeinflussen die Funktion, Verteilung und Organisation von membranständigen und -assoziierten Proteinen über spezifische Effekte bestimmter Lipide sowie durch die Organisation des Lipidmilieus. So spielen neben elektrostatischen Interaktionen von Lipiden mit Proteinen die Rigidität und Dicke von Membranen sowie die Krümmung und die lamellaren Eigenschaften einzelner Lipide eine zentrale Rolle [351-353]. Transmembranäre Proteine sind auf Grund ihrer Positionierung besonders stark von diesen Interaktionen betroffen. Sie werden insbesondere durch die Dicke des hydrophoben Bereichs der Membranen reguliert. Bei einem Missverhältnis der hydrophoben Bereiche der Membran und der Proteine werden Assoziationen zwischen transmembranären α -Helices aber auch zwischen verschiedenen Peptiden verstärkt. Leichte Konformationsänderungen und Neigungen von α -Helices zum Ausgleich energetisch ungünstiger Zustände führen zur Modulation der Aktivität von Enzymen und Kanälen. Darüber hinaus wird eine optimale Anpassung der hydrophoben Bereiche durch eine Lokalisation der Proteine in Membranregionen mit energetisch günstiger Dicke erreicht. Proteine können dadurch zwischen dickeren Raft- und schmalen Nicht-Raft-Gebieten organisiert werden [351, 353]. Neben der Membrandicke beeinflusst auch die Membranrigidität die Verteilung von Proteinen. So treten α -Helices in starren cholesterolreichen Membranregionen seltener auf, während mit Glycosylphosphatidylinositol (GPI), Palmitinsäure oder Myristylsäure verlinkte Proteine in Rafts lokalisiert sind [351, 352]. Kleinere Dichteunterschiede innerhalb der gleichen Phase beeinflussen die Enzym- oder Kanalaktivität in der Regel nicht [351], wenn auch die 5-LO-Aktivität durch die Membranfluidität maßgeblich geprägt wird [318]. Eine Reihe von membranassoziierten Proteinen, darunter die cPLA₂, aber auch die sPLA₂, Sphingomyelase, PLC oder Cytochrom P450 können durch Störungen der Membranstruktur durch nicht-lamellare Lipide wie PE oder an Phasenübergängen aktiviert werden [105, 354-356]. Aus derartigen Störungen der Membranstruktur resultiert eine erhöhte Oberflächenenergie der Membranen, freigelegte hydrophobe Bereiche und ein verstärkter Wasserkontakt mit der inneren Membranschicht [99, 351]. Darüber hinaus finden insbesondere an Phasenübergängen verstärkte Lipidprotusionen statt, die die

sPLA₂-vermittelte Phospholipidhydrolyse verstärken und auch die Aktivität der cPLA₂ begünstigen könnten [357].

Für die gezielte pharmakologische Intervention spielen Interaktionen mit Membranstrukturen bisher keine Rolle. Durch die sehr komplexen und nur partial aufgeklärten Zusammenhänge sowie die fehlende Spezifität von Membraneffekten werden Lipidaggregate auch in naher Zukunft kein Target der Arzneimittelforschung sein. Allerdings kann die Akkumulation hydrophober Substanzen in Membranen deren Strukturen und damit die Aktivität von Enzymen modulieren. Unspezifische Effekte von Nikotin sowie dem TRPV(transient receptor potential vanilloid)1-Ca²⁺-Kanal-Antagonisten Capsaicin oder dem Protein-Tyrosin-Kinase-Inhibitor Genistein auf Ionenkanäle werden auf Veränderungen der Membrandicke zurückgeführt [352]. Midazolam hemmt die PKC und PLC in Thrombozyten durch die Modulation der Membrankonformation [358]. Die Hemmung der cPLA₂ in Thrombozyten durch die Antidepressiva Chlorpromazin, Prochlorperazin und Trifluoperazin wurde auf Interkalationen mit der Plasmamembran zurückgeführt, wenn auch der gemessene Parameter, die Vergrößerung der mittleren Molekülfläche, nicht mit der inhibitorischen Aktivität korreliert werden konnte [359]. In der vorliegenden Arbeit werden Anhaltspunkte für eine membranvermittelte Wirkung von Hyperforin auf die cPLA₂ aufgezeigt. Auf Grund der Hydrophobizität der Substanz [350] ist von einer Anreicherung im Lipid-Milieu auszugehen, Wechselwirkungen der Prenylgruppen mit Fettsäureresten konnten per NMR nachgewiesen werden. Die Art der Einlagerung in komplexen Lipidgemischen sowie die Lokalisation in Zweiphasensystemen hingegen bleiben spekulativ. Die sperrige Struktur der Isoprenylgruppen lässt eine Anreicherung in fluideren Non-Raft Regionen vermuten, die Ergebnisse der Studien mit cholesterolhaltigen, domäneninduzierenden (PAPC/POG und PAPC/SM/Chol) und nicht-lamellaren (PAPC/POG und PAPE) Lipiden verdeutlichen indessen die Relevanz der Phasentrennung sowie der Störungen der Membranstruktur. Das weite Spektrum der Hyperforineffekte lässt vermuten, dass zumindest einige Wirkungen des Acylphloroglucinols auf unspezifische Membraneffekte zurückzuführen sind. Der genaue Mechanismus der Interaktion von Hyperforin mit Neurotransmitterrezeptoren oder Ionenkanälen ist noch nicht geklärt, ein membranvermittelter Weg wäre hier angesichts der fehlenden Selektivität denkbar. Bezüglich der antientzündlichen Wirkungen von Hyperforin konnte eine Interaktion mit der C2-Domäne der 5-LO nachgewiesen werden [272, 310, 360], die cPLA₂ hingegen wird weder direkt noch durch Beeinflussung der Signaltransduktion moduliert. Dahingegen

führt die Interkalation von Hyperforin in Membranen abhängig von deren Zusammensetzung in einem alternativen Wirkmechanismus zu einer Aktivierung oder Hemmung der cPLA₂ in mikromolaren Konzentrationen.

5 Zusammenfassung

Aus der Familie der Phospholipasen A_2 nimmt die zytosolische Phospholipase A_2 (cPLA₂) in der Bereitstellung von Arachidonsäure (AA) für die Produktion von Eikosanoiden sowie von Lysophospholipiden für die PAF(Plättchen-aktivierender Faktor)-Bildung eine Schlüsselrolle ein [2]. Eingriffe in die Enzymaktivität der cPLA₂ haben somit Auswirkungen auf ein breites Spektrum entzündungsfördernder Mediatoren, und erste Studien mit spezifischen Inhibitoren zeigten vielversprechende Ergebnisse in inflammatorischen Tiermodellen [217]. Inwieweit die Modulation dieses Enzyms zum antientzündlichen Wirkspektrum von Hyperforin beiträgt, war Gegenstand dieser Arbeit. Hyperforin als Bestandteil des Johanniskrauts greift auf vielfältige Art und Weise in Entzündungsprozesse ein. Die Proliferation von T-Lymphozyten und die Migration von Leukozyten, die Freisetzung von Ca^{2+} , reaktiven Sauerstoffradikalen und Leukozytenelastase und die Aktivität von 5-Lipoxygenase und Cyclooxygenase-1 werden in mikromolaren Konzentrationen gehemmt [266, 269, 271, 272]. Bei der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis in Ratten und bei Dermatitispatienten konnten positive therapeutische Effekte verzeichnet werden [270, 361]. Zur Erforschung der cPLA₂ als weitere potentielle Zielstruktur wurden die Effekte Hyperforins auf frisch isolierte humane polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) und Thrombozyten untersucht. Dabei ergaben sich erstaunlich widersprüchliche Ergebnisse. Während in PMNL die A23187- und Thapsigargin-induzierte AA-Freisetzung potent unterdrückt wurde ($IC_{50} = 1,5$ bis $1,9 \mu M$), konnte Hyperforin die cPLA₂-Aktivität in Thrombozyten nach A23187-Stimulation nicht und nach Thrombin-Induktion nur leicht beeinträchtigen. Die Inhibition der Thrombineffekte wurde dabei auf eine Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms bei $1,2 \mu M$ Hyperforin zurückgeführt. Hingegen resultierte aus der Behandlung von Thrombozyten mit $10 \mu M$ Hyperforin eine 2,6-fache Steigerung der AA-Freisetzung und nachfolgender 12-Hydro(pero)xyeikosatetraensäure(H(P)ETE)-Produktion, die von einer Translokation der cPLA₂ an die Plasmamembran begleitet war. Eine derartige Aktivierung der cPLA₂ war in PMNL nicht zu beobachten. Diese widersprüchlichen Befunde führten zu näheren mechanistischen Untersuchungen. Insbesondere der Einstrom von Ca^{2+} , wie auch die Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) p38MAPK, ERK-1/2 (Extrazellulär Signal regulierte Kinasen 1/2) und Mnk1 (MAPK interagierende Kinasen) tragen in PMNL und Thrombozyten zur cPLA₂-Aktivierung bei. Allerdings konnte eine Beeinträchtigung dieser Signaltransduktionswege durch Hyperforin ausgeschlossen

werden. In PMNL inhibiert Hyperforin zwar den G-Protein-gekoppelten Ca^{2+} -Einstrom, nicht aber die A23187- oder Thapsigargin-induzierte Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels [266]. Auch die Aktivierung der MAPK konnte durch Hyperforin in Konzentrationen von bis zu $10\ \mu\text{M}$ nicht vermindert werden. In Thrombozyten wurde extra- und intrazelluläres Ca^{2+} durch Zugabe von EDTA und BAPTA entfernt. Dennoch bewirkte Hyperforin die Translokation der cPLA₂ und somit die AA- und 12-H(P)ETE-Produktion. Tatsächlich induzierte Hyperforin aber die Phosphorylierung der cPLA₂ durch Aktivierung von p38MAPK. Die Unterbindung dieses Prozesses durch Inhibition der p38MAPK-Phosphorylierung konnte jedoch die Aktivierung der cPLA₂ nicht verhindern. Hyperforin bewirkte somit in intakten Zellen Effekte unabhängig von der zellulären Signaltransduktion, wobei vor allem die Ca^{2+} -freie Stimulation der cPLA₂ den bisherigen Paradigmen einer Ca^{2+} -abhängigen Membranbindung gegenüberstand [2].

In Zellslysaten wurden die Ergebnisse der intakten Zellen nivelliert. Eine leichte Ca^{2+} -unabhängige Inhibition der cPLA₂ ($\text{IC}_{50} \geq 7,8\ \mu\text{M}$) konnte sowohl in PMNL- als auch in Thrombozytenhomogenaten beobachtet werden. In zellfreien Untersuchungen an aufgereinigtem Enzym zeigte Hyperforin weder hemmende noch aktivierende Effekte, wenn Liposomen aus 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylcholin (PAPC) eingesetzt wurden. Direkte Interaktionen mit dem Enzym konnten daher ausgeschlossen werden. Wurden hingegen die Liposomen in ihrer Zusammensetzung variiert, konnte Hyperforin die AA-Freisetzung signifikant verändern. Verschiedene Lipide führen zu einer direkten (Dipalmitoylphosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP₂) und Ceramid-1-Phosphat (C-1-P)) oder indirekten (Ceramid und Diacylglycerole) Verstärkung der cPLA₂-Aktivität. Des Weiteren existieren Hinweise auf eine Regulation des Enzyms durch membranordnendes Cholesterol und Lipid-Raft-artige Mikrodomänen und neben PC sind Phosphatidylethanolamine (PE) als Substrate der cPLA₂ von Bedeutung. Gegenüber PIP₂- und 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol (POG)-haltigen Liposomen zeigte Hyperforin tatsächlich inhibitorisches Potential ($\text{IC}_{50} = 13,2$ und $7,6\ \mu\text{M}$). Darüber hinaus wurde die AA-Freisetzung aus Liposomen mit 50% Cholesterol bzw. aus Lipid-Raft-Adaptionen (PAPC/Sphingomyelin (SM)/Cholesterol 1:1:1) mit IC_{50} -Werten von $5,5$ und $4,4\ \mu\text{M}$ gehemmt. Die Bindung der cPLA₂ an die entsprechenden Vesikel wurde hingegen nicht beeinträchtigt.

Aktivierende Effekte des Hyperforins konnten in Abwesenheit von Ca^{2+} beobachtet werden, wenn cholesterolhaltige, Lipid-Raft-artige- oder PAPE-Vesikel eingesetzt wurden. 10 bis $30\ \mu\text{M}$ Hyperforin erhöhten die AA-Freisetzung $3,3$ - bis $7,3$ -fach, wobei die

Bindung des Enzyms an Liposomen mit 50% Cholesterol und mit je 33% SM und Cholesterol, aber nicht gegenüber dem PAPE-Substrat verstärkt war.

Alle Effekte konnten durch die Zerstörung der Membranoberfläche und –struktur nach Zugabe von Triton-X-100 aufgehoben werden. Die AA-Freisetzung aus diesen Mizellen wurde durch Hyperforin nicht beeinträchtigt, wodurch die Bedeutung der Struktur der Lipidaggregate für die Hyperforinwirkung in den Vordergrund tritt.

Die Diversität dieser Befunde spiegelte sich auch in der Untersuchung der Liposomendichte wieder, die Hyperforin abhängig von der Membranstruktur modulierte, wobei allerdings keine direkte Korrelation zwischen der Beeinflussung der Enzymaktivität und der Membranrigidität verzeichnet werden konnte.

Weiterhin wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Glaubitz, Universität Frankfurt, die Einlagerung des Acylphloglucinols in Membranen näher evaluiert. Die Analyse von ^1H -MAS-NMR-NOESY-Spektren von Liposomen aus 1-Palmitoyl(D31)-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin ((D31)POPC) mit integriertem Hyperforin ergab intensive energetische Wechselwirkungen der terminalen Kerne der Isoprenylgruppen mit Kernen der Fettsäuren, während die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Hyperforinprotonen im hydrophoben Kern der Liposomen mit zunehmender Nähe zum zentralen sauerstoffreichen Bicyklus abnahm. Das sich daraus ergebende Modell postuliert die Lokalisation des Bicyklus im Kopfgruppenbereich und eine Penetration der Isoprenylgruppen in die hydrophobe Schicht der Lipidaggregate und spiegelt somit die amphiphile Struktur des Hyperforins wieder. Hyperforin könnte also nach Einlagerung in zelluläre Membranen durch Interaktionen mit anderen Membrankomponenten deren Ordnung beeinflussen. Die vinyloge Carbonsäurestruktur ist dabei von essentieller Bedeutung, da ein O-Methylester des Hyperforins weder die Hemmung der cPLA₂ in PMNL noch deren Aktivierung in Thrombozyten reproduzieren konnte und im Liposomenassay nur eine unspezifische Aktivierung der cPLA₂ unabhängig von der Membranstruktur und den Assaybedingungen zeigte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit in intakten Zellen und zellfreien Systemen verweisen somit auf komplexe Zusammenhänge, bei denen Interkalationen von Hyperforin mit speziellen Membranstrukturen und Mikrodomänen im Vordergrund stehen. Die unspezifische Einlagerung der lipophilen Substanz Hyperforin in zelluläre Membrankompartimente könnte somit unter Umgehung der regulären Signaltransduktionswege zelltypabhängig die cPLA₂-Aktivität modulieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Six, D.A. and E.A. Dennis, *The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1488**(1-2): p. 1-19.
2. Ghosh, M., et al., *Properties of the Group IV phospholipase A2 family*. Prog Lipid Res, 2006. **45**(6): p. 487-510.
3. Kudo, I. and M. Murakami, *Phospholipase A2 enzymes*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: p. 3-58.
4. Burke, J.E. and E.A. Dennis, *Phospholipase A2 biochemistry*. Cardiovasc Drugs Ther, 2009. **23**(1): p. 49-59.
5. Hiraoka, M., A. Abe, and J.A. Shayman, *Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A2, 1-O-acylceramide synthase*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10090-9.
6. Clark, J.D., et al., *A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP*. Cell, 1991. **65**(6): p. 1043-51.
7. Dessen, A., et al., *Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism*. Cell, 1999. **97**(3): p. 349-60.
8. Hsu, Y.H., et al., *Calcium binding rigidifies the C2 domain and the intradomain interaction of GIVA phospholipase A2 as revealed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. J Biol Chem, 2008. **283**(15): p. 9820-7.
9. Perisic, O., et al., *Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2*. J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1596-604.
10. Sharp, J.D., et al., *Serine 228 is essential for catalytic activities of 85-kDa cytosolic phospholipase A2*. J Biol Chem, 1994. **269**(37): p. 23250-4.
11. Huang, Z., et al., *Functional identification of the active-site nucleophile of the human 85-kDa cytosolic phospholipase A2*. Biochemistry, 1996. **35**(12): p. 3712-21.
12. Pickard, R.T., et al., *Identification of essential residues for the catalytic function of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. Probing the role of histidine, aspartic acid, cysteine, and arginine*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19225-31.
13. Das, S. and W. Cho, *Roles of catalytic domain residues in interfacial binding and activation of group IV cytosolic phospholipase A2*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23838-46.
14. Burke, J.E., et al., *A Phospholipid Substrate Molecule Residing in the Membrane Surface Mediates Opening of the Lid Region in Group IVA Cytosolic Phospholipase A2*. J Biol Chem, 2008. **283**(45): p. 31227-36.
15. Werz, O., et al., *Caspase-mediated degradation of human 5-lipoxygenase in B lymphocytic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13164-9.
16. Nakanishi, M. and D.W. Rosenberg, *Roles of cPLA2alpha and arachidonic acid in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(11): p. 1335-43.
17. Runarsson, G., et al., *The expression of cytosolic phospholipase A2 and biosynthesis of leukotriene B4 in acute myeloid leukemia cells*. Eur J Haematol, 2007. **79**(6): p. 468-76.
18. Wang, X.H., et al., *The mediating role of cPLA2 in IL-1 beta and IL-6 release in LPS-induced HeLa cells*. Cell Biochem Funct, 2004. **22**(1): p. 41-4.
19. Heasley, L.E., et al., *Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras in human non-small cell lung cancer*. J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 14501-4.

20. Dolan-O'Keefe, M., et al., *Transcriptional regulation and structural organization of the human cytosolic phospholipase A(2) gene*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. **278**(4): p. L649-57.
21. Van Putten, V., et al., *Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras is mediated through the JNK and ERK pathways in rat epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(2): p. 1226-32.
22. Tay, A., et al., *Cytosolic phospholipase A2 gene in human and rat: chromosomal localization and polymorphic markers*. *Genomics*, 1995. **26**(1): p. 138-41.
23. Tay, A., et al., *Isolation of promoter for cytosolic phospholipase A2 (cPLA2)*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1217**(3): p. 345-7.
24. Wu, T., et al., *Characterization of the promoter for the human 85 kDa cytosolic phospholipase A2 gene*. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(23): p. 5093-8.
25. Cowan, M.J., et al., *The role of TFIID, the initiator element and a novel 5' TFIID binding site in the transcriptional control of the TATA-less human cytosolic phospholipase A2-alpha promoter*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1680**(3): p. 145-57.
26. Blaine, S.A., et al., *Induction of cPLA2 in lung epithelial cells and non-small cell lung cancer is mediated by Sp1 and c-Jun*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(46): p. 42737-43.
27. Wick, M.J., et al., *Lung Kruppel-like factor (LKLf) is a transcriptional activator of the cytosolic phospholipase A2 alpha promoter*. *Biochem J*, 2005. **387**(Pt 1): p. 239-46.
28. Luo, S.F., et al., *Involvement of MAPKs, NF-kappaB and p300 co-activator in IL-1beta-induced cytosolic phospholipase A2 expression in canine tracheal smooth muscle cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. **232**(3): p. 396-407.
29. Burke, J.E. and E.A. Dennis, *Phospholipase A2 structure/function, mechanism and signaling*. *J Lipid Res*, 2008.
30. Nalefski, E.A., et al., *Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(27): p. 18239-49.
31. Channon, J.Y. and C.C. Leslie, *A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(10): p. 5409-13.
32. Evans, J.H., et al., *Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(32): p. 30150-60.
33. Grewal, S., S. Ponnambalam, and J.H. Walker, *Association of cPLA2-alpha and COX-1 with the Golgi apparatus of A549 human lung epithelial cells*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 11): p. 2303-10.
34. Sierra-Honigmann, M.R., J.R. Bradley, and J.S. Pober, *"Cytosolic" phospholipase A2 is in the nucleus of subconfluent endothelial cells but confined to the cytoplasm of confluent endothelial cells and redistributes to the nuclear envelope and cell junctions upon histamine stimulation*. *Lab Invest*, 1996. **74**(3): p. 684-95.
35. Grewal, S., et al., *Cytosolic phospholipase A2-alpha and cyclooxygenase-2 localize to intracellular membranes of EA.hy.926 endothelial cells that are distinct from the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus*. *Febs J*, 2005. **272**(5): p. 1278-90.
36. Evans, J.H., et al., *The calcium binding loops of the cytosolic phospholipase A2 C2 domain specify targeting to Golgi and ER in live cells*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(1): p. 371-83.
37. Schievella, A.R., et al., *Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(51): p. 30749-54.

38. Liu, J., et al., *Cytosolic phospholipase A2-alpha associates with plasma membrane, endoplasmic reticulum and nuclear membrane in glomerular epithelial cells.* Biochem J, 2001. **353**(Pt 1): p. 79-90.
39. Girotti, M., et al., *Cytosolic phospholipase A2 translocates to forming phagosomes during phagocytosis of zymosan in macrophages.* J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19113-21.
40. Wooten, R.E., et al., *Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A2alpha fluorescent proteins.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(8): p. 1544-50.
41. Shmelzer, Z., et al., *Unique targeting of cytosolic phospholipase A2 to plasma membranes mediated by the NADPH oxidase in phagocytes.* J Cell Biol, 2003. **162**(4): p. 683-92.
42. Stahelin, R.V., et al., *The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C-alpha and group IVA cytosolic phospholipase A2.* J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 12452-60.
43. Malmberg, N.J., D.R. Van Buskirk, and J.J. Falke, *Membrane-docking loops of the cPLA2 C2 domain: detailed structural analysis of the protein-membrane interface via site-directed spin-labeling.* Biochemistry, 2003. **42**(45): p. 13227-40.
44. Jaud, S., et al., *Self-induced docking site of a deeply embedded peripheral membrane protein.* Biophys J, 2007. **92**(2): p. 517-24.
45. Grewal, S., et al., *Stimulation-dependent recruitment of cytosolic phospholipase A2-alpha to EA.hy.926 endothelial cell membranes leads to calcium-independent association.* Eur J Biochem, 2004. **271**(1): p. 69-77.
46. Evans, J.H. and C.C. Leslie, *The cytosolic phospholipase A2 catalytic domain modulates association and residence time at Golgi membranes.* J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 6005-16.
47. Das, S., et al., *Mechanism of group IVA cytosolic phospholipase A(2) activation by phosphorylation.* J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 41431-42.
48. Cybulsky, A.V., et al., *The actin cytoskeleton facilitates complement-mediated activation of cytosolic phospholipase A2.* Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(3): p. F466-76.
49. Hastings, A.D., et al., *Association with actin mediates the EGTA-resistant binding of cytosolic phospholipase A(2)-alpha to the plasma membrane of activated platelets.* Cell Biol Int, 2008.
50. Borsch-Haubold, A.G., et al., *Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in platelets is mediated by multiple stress-activated protein kinase pathways.* Eur J Biochem, 1999. **265**(1): p. 195-203.
51. Nemenoff, R.A., et al., *Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A2 by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C.* J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1960-4.
52. Lin, L.L., et al., *cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase.* Cell, 1993. **72**(2): p. 269-78.
53. Hefner, Y., et al., *Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases.* J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37542-51.
54. Muthalif, M.M., et al., *Functional interaction of calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A(2).* J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 39653-60.
55. Qiu, Z.H. and C.C. Leslie, *Protein kinase C-dependent and -independent pathways of mitogen-activated protein kinase activation in macrophages by stimuli that activate phospholipase A2.* J Biol Chem, 1994. **269**(30): p. 19480-7.

56. Syrbu, S.I., et al., *Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in human neutrophils*. J Immunol, 1999. **162**(4): p. 2334-40.
57. Papkoff, J., et al., *p42 mitogen-activated protein kinase and p90 ribosomal S6 kinase are selectively phosphorylated and activated during thrombin-induced platelet activation and aggregation*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(1): p. 463-72.
58. Kramer, R.M., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27723-9.
59. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911-2.
60. Borsch-Haubold, A.G., R.M. Kramer, and S.P. Watson, *Cytosolic phospholipase A2 is phosphorylated in collagen- and thrombin-stimulated human platelets independent of protein kinase C and mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25885-92.
61. Lin, L.L., A.Y. Lin, and J.L. Knopf, *Cytosolic phospholipase A2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 6147-51.
62. Kramer, R.M., et al., *Thrombin-induced phosphorylation and activation of Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2 in human platelets*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26796-804.
63. de Carvalho, M.G., et al., *Identification of phosphorylation sites of human 85-kDa cytosolic phospholipase A2 expressed in insect cells and present in human monocytes*. J Biol Chem, 1996. **271**(12): p. 6987-97.
64. Waskiewicz, A.J., et al., *Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2*. Embo J, 1997. **16**(8): p. 1909-20.
65. Tian, W., et al., *Mechanism of regulation of group IVA phospholipase A2 activity by Ser727 phosphorylation*. J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 3960-71.
66. Muthalif, M.M., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha mediates activation of mitogen-activated protein kinase and cytosolic phospholipase A2 in norepinephrine-induced arachidonic acid release in rabbit aortic smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(47): p. 30149-57.
67. Muthalif, M.M., et al., *Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A2 contribute to mitogenic signaling in myeloblastic leukemia U-937 cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(1): p. 272-8.
68. Handlogten, M.E., et al., *The Ca2+-sensing receptor activates cytosolic phospholipase A2 via a Gqalpha -dependent ERK-independent pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13941-8.
69. Shimizu, M., et al., *Ser515 phosphorylation-independent regulation of cytosolic phospholipase A2alpha (cPLA2alpha) by calmodulin-dependent protein kinase: possible interaction with catalytic domain A of cPLA2alpha*. Cell Signal, 2008. **20**(5): p. 815-24.
70. Pavicevic, Z., C.C. Leslie, and K.U. Malik, *cPLA2 phosphorylation at serine-515 and serine-505 is required for arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells*. J Lipid Res, 2008. **49**(4): p. 724-37.
71. Wijkander, J. and R. Sundler, *An 100-kDa arachidonate-mobilizing phospholipase A2 in mouse spleen and the macrophage cell line J774. Purification, substrate interaction and phosphorylation by protein kinase C*. Eur J Biochem, 1991. **202**(3): p. 873-80.

72. Clark, M.A., et al., *Cloning of a phospholipase A2-activating protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(12): p. 5418-22.
73. Ribardo, D.A., et al., *Prostaglandin levels in stimulated macrophages are controlled by phospholipase A2-activating protein and by activation of phospholipase C and D*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5467-75.
74. Zhang, F., et al., *Alteration in the activation state of new inflammation-associated targets by phospholipase A2-activating protein (PLAA)*. Cell Signal, 2008. **20**(5): p. 844-61.
75. Clark, M.A., et al., *Identification and isolation of a mammalian protein which is antigenically and functionally related to the phospholipase A2 stimulatory peptide melittin*. J Biol Chem, 1987. **262**(9): p. 4402-6.
76. Pilane, C.M. and E.F. LaBelle, *cPLA2 activator peptide, PLAP, increases arachidonic acid release and apoptosis of vascular smooth muscle cells*. J Cell Physiol, 2004. **198**(1): p. 48-52.
77. Sheridan, A.M., et al., *PLIP, a novel splice variant of Tip60, interacts with group IV cytosolic phospholipase A(2), induces apoptosis, and potentiates prostaglandin production*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(14): p. 4470-81.
78. Muckova, K., et al., *cPLA2-interacting protein, PLIP, causes apoptosis and decreases G1 phase in mesangial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(1): p. F70-9.
79. Russo-Marie, F., *Annexin V and phospholipid metabolism*. Clin Chem Lab Med, 1999. **37**(3): p. 287-91.
80. Parente, L. and E. Solito, *Annexin I: more than an anti-phospholipase protein*. Inflamm Res, 2004. **53**(4): p. 125-32.
81. Kim, S., et al., *Differential effects of annexins I, II, III, and V on cytosolic phospholipase A2 activity: specific interaction model*. FEBS Lett, 2001. **489**(2-3): p. 243-8.
82. Kim, S.W., et al., *Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 15712-9.
83. Wu, T., et al., *P11, a unique member of the S100 family of calcium-binding proteins, interacts with and inhibits the activity of the 85-kDa cytosolic phospholipase A2*. J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 17145-53.
84. Yao, X.L., et al., *Dexamethasone alters arachidonate release from human epithelial cells by induction of p11 protein synthesis and inhibition of phospholipase A2 activity*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17202-8.
85. Wu, Y.L., et al., *Upregulation of lipocortin 1 inhibits tumour necrosis factor-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible mechanism of resistance to immune surveillance*. Br J Haematol, 2000. **111**(3): p. 807-16.
86. Akiba, S., et al., *Transforming growth factor-alpha stimulates prostaglandin generation through cytosolic phospholipase A(2) under the control of p11 in rat gastric epithelial cells*. Br J Pharmacol, 2000. **131**(5): p. 1004-10.
87. Cubells, L., et al., *Annexin A6-induced inhibition of cytoplasmic phospholipase A2 is linked to caveolin-1 export from the Golgi*. J Biol Chem, 2008. **283**(15): p. 10174-83.
88. Gaudreault, S.B., et al., *The caveolin scaffolding domain modifies 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor binding properties by inhibiting phospholipase A2 activity*. J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 356-62.
89. Nakatani, Y., et al., *Identification of a cellular protein that functionally interacts with the C2 domain of cytosolic phospholipase A(2)alpha*. J Biol Chem, 2000. **275**(2): p. 1161-8.

90. Prevost, N., et al., *Group IVA cytosolic phospholipase A2 (cPLA2{alpha}) and integrin {alpha}IIb{beta}3 reinforce each other's functions during {alpha}IIb{beta}3 signaling in platelets*. Blood, 2008.
91. Xu, L., et al., *Activation of cytosolic phospholipase A2alpha through nitric oxide-induced S-nitrosylation. Involvement of inducible nitric-oxide synthase and cyclooxygenase-2*. J Biol Chem, 2008. **283**(6): p. 3077-87.
92. Balsinde, J., M.A. Balboa, and E.A. Dennis, *Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 7951-6.
93. Shinohara, H., et al., *Regulation of delayed prostaglandin production in activated P388D1 macrophages by group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A2s*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12263-8.
94. Clark, J.D., N. Milona, and J.L. Knopf, *Purification of a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A2 from the human monocytic cell line U937*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(19): p. 7708-12.
95. Diez, E., et al., *Fatty acid and phospholipid selectivity of different phospholipase A2 enzymes studied by using a mammalian membrane as substrate*. Biochem J, 1994. **301** (Pt 3): p. 721-6.
96. Purdon, A.D., D. Patelunas, and J.B. Smith, *Evidence for the release of arachidonic acid through the selective action of phospholipase A2 in thrombin-stimulated human platelets*. Biochim Biophys Acta, 1987. **920**(3): p. 205-14.
97. Chilton, F.H. and T.R. Connell, *1-ether-linked phosphoglycerides. Major endogenous sources of arachidonate in the human neutrophil*. J Biol Chem, 1988. **263**(11): p. 5260-5.
98. Mueller, H.W., et al., *1-O-alkyl-linked glycerophospholipids of human neutrophils: distribution of arachidonate and other acyl residues in the ether-linked and diacyl species*. J Lipid Res, 1984. **25**(4): p. 383-8.
99. Carrasco, S. and I. Merida, *Diacylglycerol, when simplicity becomes complex*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(1): p. 27-36.
100. Purdon, A.D. and J.B. Smith, *Turnover of arachidonic acid in the major diacyl and ether phospholipids of human platelets*. J Biol Chem, 1985. **260**(23): p. 12700-4.
101. Beckett, C.S., et al., *Phospholipase A2-catalyzed hydrolysis of plasmalogen phospholipids in thrombin-stimulated human platelets*. Thromb Res, 2007. **120**(2): p. 259-68.
102. Aussenac, F., M. Tavares, and E.J. Dufourc, *Cholesterol dynamics in membranes of raft composition: a molecular point of view from 2H and 31P solid-state NMR*. Biochemistry, 2003. **42**(6): p. 1383-90.
103. Nalefski, E.A., et al., *Independent folding and ligand specificity of the C2 calcium-dependent lipid binding domain of cytosolic phospholipase A2*. J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1365-72.
104. Hixon, M.S., A. Ball, and M.H. Gelb, *Calcium-dependent and -independent interfacial binding and catalysis of cytosolic group IV phospholipase A2*. Biochemistry, 1998. **37**(23): p. 8516-26.
105. Leslie, C.C. and J.Y. Channon, *Anionic phospholipids stimulate an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 from macrophages and reduce the calcium requirement for activity*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1045**(3): p. 261-70.
106. Mosior, M., D.A. Six, and E.A. Dennis, *Group IV cytosolic phospholipase A2 binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 2184-91.

107. Huwiler, A., et al., *Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release*. *Faseb J*, 2001. **15**(1): p. 7-9.
108. Six, D.A. and E.A. Dennis, *Essential Ca(2+)-independent role of the group IVA cytosolic phospholipase A(2) C2 domain for interfacial activity*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(26): p. 23842-50.
109. Balsinde, J., et al., *Cellular regulation of cytosolic group IV phospholipase A2 by phosphatidylinositol bisphosphate levels*. *J Immunol*, 2000. **164**(10): p. 5398-402.
110. Le Berre, L., et al., *Role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the activation of cytosolic phospholipase A2-alpha*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2006. **81**(3-4): p. 113-25.
111. McLaughlin, S., et al., *PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2002. **31**: p. 151-75.
112. Tran, D., et al., *Cellular distribution of polyphosphoinositides in rat hepatocytes*. *Cell Signal*, 1993. **5**(5): p. 565-81.
113. Watt, S.A., et al., *Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1*. *Biochem J*, 2002. **363**(Pt 3): p. 657-66.
114. Martin, T.F., *PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic*. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. **13**(4): p. 493-9.
115. Epand, R.M., *Proteins and cholesterol-rich domains*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(7-8): p. 1576-82.
116. Subramanian, P., et al., *Anionic lipids activate group IVA cytosolic phospholipase A2 via distinct and separate mechanisms*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(12): p. 2701-8.
117. Casas, J., et al., *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate anchors cytosolic group IVA phospholipase A2 to perinuclear membranes and decreases its calcium requirement for translocation in live cells*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(1): p. 155-62.
118. Gomez-Munoz, A., *Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation*. *FEBS Lett*, 2004. **562**(1-3): p. 5-10.
119. Lamour, N.F. and C.E. Chalfant, *Ceramide kinase and the ceramide-1-phosphate/cPLA2alpha interaction as a therapeutic target*. *Curr Drug Targets*, 2008. **9**(8): p. 674-82.
120. Pettus, B.J., et al., *Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(40): p. 38206-13.
121. Pettus, B.J., et al., *Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(12): p. 11320-6.
122. Nakamura, H., et al., *Ceramide-1-phosphate activates cytosolic phospholipase A2alpha directly and by PKC pathway*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **71**(6): p. 850-7.
123. Stahelin, R.V., et al., *Ceramide-1-phosphate binds group IVA cytosolic phospholipase a2 via a novel site in the C2 domain*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(28): p. 20467-74.
124. Subramanian, P., et al., *Ceramide 1-phosphate acts as a positive allosteric activator of group IVA cytosolic phospholipase A2 alpha and enhances the interaction of the enzyme with phosphatidylcholine*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(18): p. 17601-7.
125. Pfeilschifter, J. and A. Huwiler, *Ceramides as Key Players in Cellular Stress Response*. *News Physiol Sci*, 2000. **15**: p. 11-15.
126. Hannun, Y.A. and L.M. Obeid, *The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(29): p. 25847-50.

127. Huang, H.W., E.M. Goldberg, and R. Zidovetzki, *Ceramide induces structural defects into phosphatidylcholine bilayers and activates phospholipase A2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **220**(3): p. 834-8.
128. Contreras, F.X., et al., *Asymmetric addition of ceramides but not dihydroceramides promotes transbilayer (flip-flop) lipid motion in membranes*. *Biophys J*, 2005. **88**(1): p. 348-59.
129. Goni, F.M. and A. Alonso, *Biophysics of sphingolipids I. Membrane properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1758**(12): p. 1902-21.
130. Fidorra, M., et al., *Absence of fluid-ordered/fluid-disordered phase coexistence in ceramide/POPC mixtures containing cholesterol*. *Biophys J*, 2006. **90**(12): p. 4437-51.
131. Goni, F.M. and A. Alonso, *Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes*. *Prog Lipid Res*, 1999. **38**(1): p. 1-48.
132. Hashizume, T., et al., *Ceramide enhances susceptibility of membrane phospholipids to phospholipase A2 through modification of lipid organization in platelet membranes*. *Biol Pharm Bull*, 1999. **22**(12): p. 1275-8.
133. Klapisz, E., et al., *Sphingolipids and cholesterol modulate membrane susceptibility to cytosolic phospholipase A2*. *J. Lipid Res.*, 2000. **41**(10): p. 1680-1688.
134. Kitatani, K., et al., *Acceleration by ceramide of calcium-dependent translocation of phospholipase A2 from cytosol to membranes in platelets*. *Arch Biochem Biophys*, 2000. **382**(2): p. 296-302.
135. Nakamura, H., et al., *Inhibition of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 alpha activity by D-erythro-sphingosine*. *Eur J Pharmacol*, 2004. **484**(1): p. 9-17.
136. Schonhardt, T. and E. Ferber, *Translocation of phospholipase A2 from cytosol to membranes induced by 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol in serum-free cultured macrophages*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. **149**(2): p. 769-75.
137. Bauldry, S.A., R.L. Wykle, and D.A. Bass, *Phospholipase A2 activation in human neutrophils. Differential actions of diacylglycerols and alkylacylglycerols in priming cells for stimulation by N-formyl-Met-Leu-Phe*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(32): p. 16787-95.
138. Sanchez-Pinera, P., et al., *A comparative study of the activation of protein kinase C alpha by different diacylglycerol isomers*. *Biochem J*, 1999. **337** (Pt 3): p. 387-95.
139. Brown, R.E., *Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal*. *J Cell Sci*, 1998. **111** (Pt 1): p. 1-9.
140. Grzybek, M., et al., *Rafts--the current picture*. *Folia Histochem Cytobiol*, 2005. **43**(1): p. 3-10.
141. Mishra, S. and P.G. Joshi, *Lipid raft heterogeneity: an enigma*. *J Neurochem*, 2007. **103 Suppl 1**: p. 135-42.
142. Dietrich, C., et al., *Lipid rafts reconstituted in model membranes*. *Biophys J*, 2001. **80**(3): p. 1417-28.
143. de Almeida, R.F., A. Fedorov, and M. Prieto, *Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts*. *Biophys J*, 2003. **85**(4): p. 2406-16.
144. Chang, T.Y., et al., *Cholesterol sensing, trafficking, and esterification*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006. **22**: p. 129-57.
145. Gkantiragas, I., et al., *Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex*. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**(6): p. 1819-33.
146. Ishitsuka, R., S.B. Sato, and T. Kobayashi, *Imaging lipid rafts*. *J Biochem*, 2005. **137**(3): p. 249-54.

147. Shaw, A.S., *Lipid rafts: now you see them, now you don't*. Nat Immunol, 2006. **7**(11): p. 1139-42.
148. Bate, C., M. Tayebi, and A. Williams, *Sequestration of free cholesterol in cell membranes by prions correlates with cytoplasmic phospholipase A2 activation*. BMC Biol, 2008. **6**: p. 8.
149. Kramer, R.M., et al., *Effect of membrane cholesterol on phospholipid metabolism in thrombin-stimulated platelets. Enhanced activation of platelet phospholipase(s) for liberation of arachidonic acid*. J Biol Chem, 1982. **257**(12): p. 6844-9.
150. Sorisky, A., G.L. Kucera, and S.E. Rittenhouse, *Stimulated cholesterol-enriched platelets display increased cytosolic Ca²⁺ and phospholipase A activity independent of changes in inositol trisphosphates and agonist/receptor binding*. Biochem J, 1990. **265**(3): p. 747-54.
151. Grimmer, S., et al., *Golgi vesiculation induced by cholesterol occurs by a dynamin- and cPLA2-dependent mechanism*. Traffic, 2005. **6**(2): p. 144-56.
152. Graziani, A., et al., *Cholesterol- and caveolin-rich membrane domains are essential for phospholipase A2-dependent EDHF formation*. Cardiovasc Res, 2004. **64**(2): p. 234-42.
153. You, H.J., et al., *Leukotriene synthesis in response to A23187 is inhibited by methyl- beta-cyclodextrin in RBL-2H3 cells*. Mol Cells, 2007. **23**(1): p. 57-63.
154. Klapisz, E., et al., *N-terminal and C-terminal plasma membrane anchoring modulate differently agonist-induced activation of cytosolic phospholipase A2*. Eur J Biochem, 1999. **265**(3): p. 957-66.
155. Omerovic, J., A.J. Laude, and I.A. Prior, *Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(19-20): p. 2575-89.
156. Hirabayashi, T., T. Murayama, and T. Shimizu, *Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2*. Biol Pharm Bull, 2004. **27**(8): p. 1168-73.
157. Gauthier, K.M., et al., *Roles of epoxyeicosatrienoic acids in vascular regulation and cardiac preconditioning*. J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **50**(6): p. 601-8.
158. Ishii, S., T. Nagase, and T. Shimizu, *Platelet-activating factor receptor. Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. **68-69**: p. 599-609.
159. Dogne, J.M., J. Hanson, and D. Pratico, *Thromboxane, prostacyclin and isoprostanes: therapeutic targets in atherogenesis*. Trends Pharmacol Sci, 2005. **26**(12): p. 639-44.
160. Khanapure, S.P., et al., *Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers*. Curr Top Med Chem, 2007. **7**(3): p. 311-40.
161. Yoshimoto, T. and Y. Takahashi, *Arachidonate 12-lipoxygenases. Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. **68-69**: p. 245-62.
162. Adler, D.H., et al., *Inherited human cPLA(2alpha) deficiency is associated with impaired eicosanoid biosynthesis, small intestinal ulceration, and platelet dysfunction*. J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2121-31.
163. Uozumi, N. and T. Shimizu, *Roles for cytosolic phospholipase A2alpha as revealed by gene-targeted mice. Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. **68-69**: p. 59-69.
164. Li, Y., et al., *Roles of ERK and cPLA2 in the angiotensin II-mediated biphasic regulation of Na⁺-HCO₃⁻ transport*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(2): p. 252-9.
165. Mu, Y.M., et al., *Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells*. Endocrinology, 2001. **142**(8): p. 3590-7.
166. Burke, J.R., et al., *BMS-229724 is a tight-binding inhibitor of cytosolic phospholipase A2 that acts at the lipid/water interface and possesses anti-*

- inflammatory activity in skin inflammation models*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(1): p. 376-85.
167. Hegen, M., et al., *Cytosolic phospholipase A2alpha-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis*. J Exp Med, 2003. **197**(10): p. 1297-302.
168. Raichel, L., et al., *Reduction of cPLA(2alpha) overexpression: An efficient anti-inflammatory therapy for collagen-induced arthritis*. Eur J Immunol, 2008. **38**(10): p. 2905-15.
169. Yamamoto, M., et al., *Inhibitory effect of a potent and selective cytosolic phospholipase A2alpha inhibitor RSC-3388 on skin inflammation in mice*. Pharmacology, 2008. **81**(4): p. 301-11.
170. Malaviya, R., et al., *Targeting cytosolic phospholipase A2 by arachidonyl trifluoromethyl ketone prevents chronic inflammation in mice*. Eur J Pharmacol, 2006. **539**(3): p. 195-204.
171. Ii, H., et al., *Group IVA phospholipase A2-associated production of MMP-9 in macrophages and formation of atherosclerotic lesions*. Biol Pharm Bull, 2008. **31**(3): p. 363-8.
172. Thommesen, L., et al., *Selective inhibitors of cytosolic or secretory phospholipase A2 block TNF-induced activation of transcription factor nuclear factor-kappa B and expression of ICAM-1*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3421-30.
173. Whalen, K.A., et al., *In vitro allergen challenge of peripheral blood induces differential gene expression in mononuclear cells of asthmatic patients: inhibition of cytosolic phospholipase A2alpha overcomes the asthma-associated response*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(10): p. 1590-605.
174. Levy, R., et al., *Elevated cytosolic phospholipase A(2) expression and activity in human neutrophils during sepsis*. Blood, 2000. **95**(2): p. 660-5.
175. Levy, R., *The role of cytosolic phospholipase A2-alfa in regulation of phagocytic functions*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(11): p. 1323-34.
176. Olsson, S. and R. Sundler, *Different roles for non-receptor tyrosine kinases in arachidonate release induced by zymosan and Staphylococcus aureus in macrophages*. J Inflamm (Lond), 2006. **3**: p. 8.
177. Suram, S., et al., *Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the beta-glucan receptor*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5506-14.
178. Fang, H., et al., *Toxoplasma gondii-derived heat shock protein 70 induces lethal anaphylactic reaction through activation of cytosolic phospholipase A2 and platelet-activating factor via Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88*. Microbiol Immunol, 2008. **52**(7): p. 366-74.
179. Rubin, B.B., et al., *Cytosolic phospholipase A2-alpha is necessary for platelet-activating factor biosynthesis, efficient neutrophil-mediated bacterial killing, and the innate immune response to pulmonary infection: cPLA2-alpha does not regulate neutrophil NADPH oxidase activity*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 7519-29.
180. Shmelzer, Z., et al., *Cytosolic phospholipase A2alpha is targeted to P47phox-PX domain of the assembled NADPH oxidase via a novel binding site in its C2 domain*. J Biol Chem, 2008.
181. Uozumi, N., Y. Kita, and T. Shimizu, *Modulation of lipid and protein mediators of inflammation by cytosolic phospholipase A2alpha during experimental sepsis*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3558-66.
182. Cummings, B.S., J. McHowat, and R.G. Schnellmann, *Phospholipase A(2)s in cell injury and death*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **294**(3): p. 793-9.

183. Balboa, M.A., R. Perez, and J. Balsinde, *Calcium-independent phospholipase A2 mediates proliferation of human promonocytic U937 cells*. *Febs J*, 2008. **275**(8): p. 1915-24.
184. Tang, D.G., et al., *Suppression of W256 carcinosarcoma cell apoptosis by arachidonic acid and other polyunsaturated fatty acids*. *Int J Cancer*, 1997. **72**(6): p. 1078-87.
185. Casas, J., et al., *Overexpression of cytosolic group IVA phospholipase A2 protects cells from Ca²⁺-dependent death*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(9): p. 6106-16.
186. Xu, L., et al., *Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and cytosolic phospholipase A(2)alpha/cyclooxygenase-2/prostaglandin E(2) signaling pathways in human hepatocellular carcinoma cells*. *Cancer Res*, 2006. **66**(24): p. 11859-68.
187. Tommasini, I., et al., *Peroxynitrite stimulates the activity of cytosolic phospholipase A2 in U937 cells: the extent of arachidonic acid formation regulates the balance between cell survival or death*. *Cell Death Differ*, 2002. **9**(12): p. 1368-76.
188. Kronke, M. and S. Adam-Klages, *Role of caspases in TNF-mediated regulation of cPLA(2)*. *FEBS Lett*, 2002. **531**(1): p. 18-22.
189. Cao, Y., et al., *Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(21): p. 11280-5.
190. Koller, M., et al., *Arachidonic acid induces DNA-fragmentation in human polymorphonuclear neutrophil granulocytes*. *Inflammation*, 1997. **21**(5): p. 463-74.
191. Rizzo, M.T., et al., *Induction of apoptosis by arachidonic acid in chronic myeloid leukemia cells*. *Cancer Res*, 1999. **59**(19): p. 5047-53.
192. Penzo, D., et al., *Arachidonic acid released by phospholipase A(2) activation triggers Ca(2+)-dependent apoptosis through the mitochondrial pathway*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(24): p. 25219-25.
193. Farooqui, A.A., W.Y. Ong, and L.A. Horrocks, *Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders*. *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(3): p. 591-620.
194. Mashimo, M., et al., *Cytosolic PLA2(alpha) activation in Purkinje neurons and its role in AMPA-receptor trafficking*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 18): p. 3015-24.
195. Hicks, J.B., et al., *Amyloid-beta peptide induces temporal membrane biphasic changes in astrocytes through cytosolic phospholipase A(2)*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(11): p. 2512-9.
196. Sun, G.Y., et al., *Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases*. *J Lipid Res*, 2004. **45**(2): p. 205-13.
197. Farooqui, A.A. and L.A. Horrocks, *Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly*. *Neuroscientist*, 2006. **12**(3): p. 245-60.
198. Won, J.S., et al., *Involvement of phospholipase A2 and lipoxygenase in lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression in glial cells*. *Glia*, 2005. **51**(1): p. 13-21.
199. Sun, G.Y., L.A. Horrocks, and A.A. Farooqui, *The roles of NADPH oxidase and phospholipases A2 in oxidative and inflammatory responses in neurodegenerative diseases*. *J Neurochem*, 2007. **103**(1): p. 1-16.
200. Yagami, T., *Cerebral arachidonate cascade in dementia: Alzheimer's disease and vascular dementia*. *Curr Neuropharmacol*, 2006. **4**(1): p. 87-100.
201. Marusic, S., et al., *Cytosolic phospholipase A2 alpha-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Exp Med*, 2005. **202**(6): p. 841-51.

202. Bhattacharjee, A.K., et al., *In vivo imaging of disturbed pre- and post-synaptic dopaminergic signaling via arachidonic acid in a rat model of Parkinson's disease*. Neuroimage, 2007. **37**(4): p. 1112-21.
203. Barbosa, N.R., et al., *Association between BanI genotype and increased phospholipase A2 activity in schizophrenia*. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2007. **257**(6): p. 340-3.
204. Rao, J.S., et al., *Mode of action of mood stabilizers: is the arachidonic acid cascade a common target?* Mol Psychiatry, 2008. **13**(6): p. 585-96.
205. Oikawa, Y., et al., *Protective role for cytosolic phospholipase A2alpha in autoimmune diabetes of mice*. FEBS Lett, 2005. **579**(18): p. 3975-8.
206. Papadimitriou, A., et al., *Anti-apoptotic effects of arachidonic acid and prostaglandin E2 in pancreatic beta-cells*. Cell Physiol Biochem, 2007. **20**(5): p. 607-16.
207. Miyaura, C., et al., *An essential role of cytosolic phospholipase A2alpha in prostaglandin E2-mediated bone resorption associated with inflammation*. J Exp Med, 2003. **197**(10): p. 1303-10.
208. Yoshida, K., et al., *Arachidonic acid inhibits osteoblast differentiation through cytosolic phospholipase A2-dependent pathway*. Oral Dis, 2007. **13**(1): p. 32-9.
209. Street, I.P., et al., *Slow- and tight-binding inhibitors of the 85-kDa human phospholipase A2*. Biochemistry, 1993. **32**(23): p. 5935-40.
210. Burke, J.R., et al., *Competitive, reversible inhibition of cytosolic phospholipase A2 at the lipid-water interface by choline derivatives that partially partition into the phospholipid bilayer*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18864-71.
211. Seno, K., et al., *Pyrrolidine inhibitors of human cytosolic phospholipase A(2)*. J Med Chem, 2000. **43**(6): p. 1041-4.
212. Seno, K., et al., *Pyrrolidine inhibitors of human cytosolic phospholipase A2. Part 2: synthesis of potent and crystallized 4-triphenylmethylthio derivative 'pyrrophenone'*. Bioorg Med Chem Lett, 2001. **11**(4): p. 587-90.
213. Ghomashchi, F., et al., *A pyrrolidine-based specific inhibitor of cytosolic phospholipase A(2)alpha blocks arachidonic acid release in a variety of mammalian cells*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1513**(2): p. 160-6.
214. Ono, T., et al., *Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A2alpha, pyrrophenone*. Biochem J, 2002. **363**(Pt 3): p. 727-35.
215. Lee, K.L., et al., *Discovery of EcopladiB, an indole inhibitor of cytosolic phospholipase A2alpha*. J Med Chem, 2007. **50**(6): p. 1380-400.
216. McKew, J.C., et al., *Indole cytosolic phospholipase A2 alpha inhibitors: discovery and in vitro and in vivo characterization of 4-{3-[5-chloro-2-(2-[(3,4-dichlorobenzyl)sulfonyl]amino)ethyl]-1-(diphenylmethyl)-1H-indol-3-yl]propyl}benzoic acid, efipladib*. J Med Chem, 2008. **51**(12): p. 3388-413.
217. Lee, K.L., et al., *Benzenesulfonamide indole inhibitors of cytosolic phospholipase A2alpha: optimization of in vitro potency and rat pharmacokinetics for oral efficacy*. Bioorg Med Chem, 2008. **16**(3): p. 1345-58.
218. Ramarao, M.K., et al., *Thermodynamic characterization of cytosolic phospholipase A2 alpha inhibitors*. Anal Biochem, 2008. **383**(2): p. 217-25.
219. Hess, M., A. Schulze Elfringhoff, and M. Lehr, *1-(5-Carboxy- and 5-carbamoylindol-1-yl)propan-2-ones as inhibitors of human cytosolic phospholipase A2alpha: bioisosteric replacement of the carboxylic acid and carboxamide moiety*. Bioorg Med Chem, 2007. **15**(8): p. 2883-91.
220. Fritsche, A., et al., *1-(2-Carboxyindol-5-yloxy)propan-2-ones as inhibitors of human cytosolic phospholipase A2alpha: synthesis, biological activity, metabolic stability, and solubility*. Bioorg Med Chem, 2008. **16**(7): p. 3489-500.

221. Bilia, A.R., S. Gallori, and F.F. Vincieri, *St. John's wort and depression: efficacy, safety and tolerability-an update*. Life Sci, 2002. **70**(26): p. 3077-96.
222. Medina, M.A., et al., *Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound?* Life Sci, 2006. **79**(2): p. 105-11.
223. Saller, R., J. Melzer, and J. Reichling, [*St. John's Wort (Hypericum perforatum): a plurivalent raw material for traditional and modern therapies*]. Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd, 2003. **10 Suppl 1**: p. 33-40.
224. Hänsel, R., O. Sticher, and E. Steinegger, *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. 1999, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 924 - 927.
225. Schempp, C.M., et al., [*St. John's wort (Hypericum perforatum L.). A plant with relevance for dermatology*]. Hautarzt, 2002. **53**(5): p. 316-21.
226. Beerhues, L., *Hyperforin*. Phytochemistry, 2006. **67**(20): p. 2201-7.
227. Butterweck, V. and M. Schmidt, *St. John's wort: role of active compounds for its mechanism of action and efficacy*. Wien Med Wochenschr, 2007. **157**(13-14): p. 356-61.
228. Wurglics, M., et al., *Batch-to-batch reproducibility of St. John's wort preparations*. Pharmacopsychiatry, 2001. **34 Suppl 1**: p. S152-6.
229. Muller, W.E., et al., *Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity*. Pharmacopsychiatry, 1997. **30 Suppl 2**: p. 102-7.
230. Linde, K., et al., *St John's wort for depression--an overview and meta-analysis of randomised clinical trials*. Bmj, 1996. **313**(7052): p. 253-8.
231. Gaster, B. and J. Holroyd, *St John's wort for depression: a systematic review*. Arch Intern Med, 2000. **160**(2): p. 152-6.
232. Szegedi, A., et al., *Acute treatment of moderate to severe depression with hypericum extract WS 5570 (St John's wort): randomised controlled double blind non-inferiority trial versus paroxetine*. Bmj, 2005. **330**(7490): p. 503.
233. Chatterjee, S.S., et al., *Antidepressant activity of hypericum perforatum and hyperforin: the neglected possibility*. Pharmacopsychiatry, 1998. **31 Suppl 1**: p. 7-15.
234. Chatterjee, S.S., et al., *Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts*. Life Sci, 1998. **63**(6): p. 499-510.
235. Butterweck, V., et al., *Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different Hypericum preparations in behavioral models*. Life Sci, 2003. **73**(5): p. 627-39.
236. Muller, W.E., et al., *Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of hypericum extract*. Pharmacopsychiatry, 1998. **31 Suppl 1**: p. 16-21.
237. Singer, A., M. Wonnemann, and W.E. Muller, *Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **290**(3): p. 1363-8.
238. Wonnemann, M., A. Singer, and W.E. Muller, *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**(2): p. 188-97.
239. Neary, J.T., et al., *Biochemical mechanisms of action of Hypericum LI 160 in glial and neuronal cells: inhibition of neurotransmitter uptake and stimulation of extracellular signal regulated protein kinase*. Pharmacopsychiatry, 2001. **34 Suppl 1**: p. S103-7.
240. Chatterjee, S.S., A. Biber, and C. Weibezahn, *Stimulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin*. Pharmacopsychiatry, 2001. **34 Suppl 1**: p. S11-9.

241. Marsh, W.L. and J.A. Davies, *The involvement of sodium and calcium ions in the release of amino acid neurotransmitters from mouse cortical slices elicited by hyperforin*. Life Sci, 2002. **71**(22): p. 2645-55.
242. Treiber, K., et al., *Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs)*. Br J Pharmacol, 2005. **145**(1): p. 75-83.
243. Chatterjee, S., et al., *Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rat*. Life Sci, 1999. **65**(22): p. 2395-405.
244. Koch, E. and S.S. Chatterjee, *Hyperforin stimulates intracellular calcium mobilisation and enhances extracellular acidification in DDT1-MF2 smooth muscle cells*. Pharmacopsychiatry, 2001. **34 Suppl 1**: p. S70-3.
245. Fisunov, A., et al., *Hyperforin modulates gating of P-type Ca²⁺ current in cerebellar Purkinje neurons*. Pflugers Arch, 2000. **440**(3): p. 427-34.
246. Krishtal, O., et al., *Modulation of ion channels in rat neurons by the constituents of Hypericum perforatum*. Pharmacopsychiatry, 2001. **34 Suppl 1**: p. S74-82.
247. Prenner, L., et al., *Reduction of high-affinity beta2-adrenergic receptor binding by hyperforin and hyperoside on rat C6 glioblastoma cells measured by fluorescence correlation spectroscopy*. Biochemistry, 2007. **46**(17): p. 5106-13.
248. Haberlein, H., L. Prenner, and K. Zeller, *Einfluss von Hyperosid und Hyperforin auf die Regulation und laterale Mobilität von beta1-adrenergen Rezeptoren an lebenden C6 Glioblastomzellen: Ein postsynaptischer Ansatz zum Wirkmechanismus von Johanniskraut*. Tagung Phytopharmaka und Phytotherapie 2008, Abstract, 2008.
249. Eckert, G.P. and W.E. Muller, *Effects of hyperforin on the fluidity of brain membranes*. Pharmacopsychiatry, 2001. **34 Suppl 1**: p. S22-5.
250. Eckert, G.P., et al., *Hyperforin modifies neuronal membrane properties in vivo*. Neurosci Lett, 2004. **367**(2): p. 139-43.
251. Froestl, B., B. Steiner, and W.E. Muller, *Enhancement of proteolytic processing of the beta-amyloid precursor protein by hyperforin*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(11): p. 2177-84.
252. Roz, N. and M. Rehavi, *Hyperforin inhibits vesicular uptake of monoamines by dissipating pH gradient across synaptic vesicle membrane*. Life Sci, 2003. **73**(4): p. 461-70.
253. Calapai, G., et al., *Interleukin-6 involvement in antidepressant action of Hypericum perforatum*. Pharmacopsychiatry, 2001. **34 Suppl 1**: p. S8-10.
254. Fiebich, B.L., A. Hollig, and K. Lieb, *Inhibition of substance P-induced cytokine synthesis by St. John's wort extracts*. Pharmacopsychiatry, 2001. **34 Suppl 1**: p. S26-8.
255. Gobbi, M., et al., *In vitro effects of the dicyclohexylammonium salt of hyperforin on interleukin-6 release in different experimental models*. Planta Med, 2004. **70**(7): p. 680-2.
256. Wright, C.W., et al., *Correlation of hyperforin content of Hypericum perforatum (St John's Wort) extracts with their effects on alcohol drinking in C57BL/6J mice: a preliminary study*. J Psychopharmacol, 2003. **17**(4): p. 403-8.
257. Klusa, V., et al., *Hypericum extract and hyperforin: memory-enhancing properties in rodents*. Pharmacopsychiatry, 2001. **34 Suppl 1**: p. S61-9.
258. Shipochliev, T., A. Dimitrov, and E. Aleksandrova, *[Anti-inflammatory action of a group of plant extracts]*. Vet Med Nauki, 1981. **18**(6): p. 87-94.
259. Kumar, V., P.N. Singh, and S.K. Bhattacharya, *Anti-inflammatory and analgesic activity of Indian Hypericum perforatum L*. Indian J Exp Biol, 2001. **39**(4): p. 339-43.

260. Raso, G.M., et al., *In-vivo and in-vitro anti-inflammatory effect of Echinacea purpurea and Hypericum perforatum*. J Pharm Pharmacol, 2002. **54**(10): p. 1379-83.
261. Abdel-Salam, O.M., *Anti-inflammatory, antinociceptive, and gastric effects of Hypericum perforatum in rats*. ScientificWorldJournal, 2005. **5**: p. 586-95.
262. Genovese, T., et al., *Hypericum perforatum attenuates the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice*. Shock, 2006. **25**(2): p. 161-7.
263. Menegazzi, M., et al., *Hypericum perforatum attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(5): p. 740-53.
264. Savikin, K., et al., *Antiinflammatory activity of ethanol extracts of Hypericum perforatum L., H. barbatum Jacq., H. hirsutum L., H. richeri Vill. and H. androsaemum L. in rats*. Phytother Res, 2007. **21**(2): p. 176-80.
265. Di Paola, R., et al., *Protective effect of Hypericum perforatum in zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity*. Nitric Oxide, 2007. **16**(1): p. 118-30.
266. Feisst, C. and O. Werz, *Suppression of receptor-mediated Ca²⁺ mobilization and functional leukocyte responses by hyperforin*. Biochem Pharmacol, 2004. **67**(8): p. 1531-9.
267. Heilmann, J., K. Winkelmann, and O. Sticher, *Studies on the antioxidative activity of phloroglucinol derivatives isolated from hypericum species*. Planta Med, 2003. **69**(3): p. 202-6.
268. Tedeschi, E., et al., *Anti-inflammatory actions of St. John's wort: inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1alpha (STAT-1alpha) activation*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(1): p. 254-61.
269. Dell'Aica, I., et al., *Hyperforin blocks neutrophil activation of matrix metalloproteinase-9, motility and recruitment, and restrains inflammation-triggered angiogenesis and lung fibrosis*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(2): p. 492-500.
270. Cabrelle, A., et al., *Hyperforin down-regulates effector function of activated T lymphocytes and shows efficacy against Th1-triggered CNS inflammatory-demyelinating disease*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(1): p. 212-9.
271. Schempp, C.M., et al., *Topical application of St John's wort (Hypericum perforatum L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells*. Br J Dermatol, 2000. **142**(5): p. 979-84.
272. Albert, D., et al., *Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(12): p. 1767-75.
273. Zhou, C., et al., *Hyperforin, the active component of St. John's wort, induces IL-8 expression in human intestinal epithelial cells via a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway*. J Clin Immunol, 2004. **24**(6): p. 623-36.
274. Reichling, J., A. Weseler, and R. Saller, *A current review of the antimicrobial activity of Hypericum perforatum L.* Pharmacopsychiatry, 2001. **34 Suppl 1**: p. S116-8.
275. Verotta, L., et al., *In vitro antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure-activity study*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. **17**(6): p. 1544-8.
276. Schempp, C.M., et al., *Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis*. Oncogene, 2002. **21**(8): p. 1242-50.

277. Hostanska, K., et al., *Hyperforin a constituent of St John's wort (Hypericum perforatum L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines*. Eur J Pharm Biopharm, 2003. **56**(1): p. 121-32.
278. Dona, M., et al., *Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6225-32.
279. Quiney, C., et al., *Pro-apoptotic properties of hyperforin in leukemic cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2006. **20**(3): p. 491-7.
280. Gey, C., et al., *Phloroglucinol derivatives guttiferone G, aristoforin, and hyperforin: inhibitors of human sirtuins SIRT1 and SIRT2*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(27): p. 5219-22.
281. Menegazzi, M., et al., *Protective effects of St. John's wort extract and its component hyperforin against cytokine-induced cytotoxicity in a pancreatic beta-cell line*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(8): p. 1509-21.
282. Ernst, E., *Second thoughts about safety of St John's wort*. Lancet, 1999. **354**(9195): p. 2014-6.
283. Yue, Q.Y., C. Bergquist, and B. Gerden, *Safety of St John's wort (Hypericum perforatum)*. Lancet, 2000. **355**(9203): p. 576-7.
284. Madabushi, R., et al., *Hyperforin in St. John's wort drug interactions*. Eur J Clin Pharmacol, 2006. **62**(3): p. 225-33.
285. Pal, D. and A.K. Mitra, *MDR- and CYP3A4-mediated drug-herbal interactions*. Life Sci, 2006. **78**(18): p. 2131-45.
286. Pal, D. and A.K. Mitra, *MDR- and CYP3A4-mediated drug-drug interactions*. J Neuroimmune Pharmacol, 2006. **1**(3): p. 323-39.
287. Durr, D., et al., *St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4*. Clin Pharmacol Ther, 2000. **68**(6): p. 598-604.
288. Wang, Z., et al., *The effects of St John's wort (Hypericum perforatum) on human cytochrome P450 activity*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **70**(4): p. 317-26.
289. Bray, B.J., et al., *St. John's wort extract induces CYP3A and CYP2E1 in the Swiss Webster mouse*. Toxicol Sci, 2002. **66**(1): p. 27-33.
290. Komoroski, B.J., et al., *Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(5): p. 512-8.
291. Cantoni, L., et al., *Hyperforin contributes to the hepatic CYP3A-inducing effect of Hypericum perforatum extract in the mouse*. Toxicol Sci, 2003. **75**(1): p. 25-30.
292. Mueller, S.C., et al., *The extent of induction of CYP3A by St. John's wort varies among products and is linked to hyperforin dose*. Eur J Clin Pharmacol, 2006. **62**(1): p. 29-36.
293. Whitten, D.L., et al., *The effect of St John's wort extracts on CYP3A: a systematic review of prospective clinical trials*. Br J Clin Pharmacol, 2006. **62**(5): p. 512-26.
294. Godtel-Armbrust, U., et al., *Variability in PXR-mediated induction of CYP3A4 by commercial preparations and dry extracts of St. John's wort*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2007. **375**(6): p. 377-82.
295. Moore, L.B., et al., *St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7500-2.
296. Kaminsky, L.S. and Z.Y. Zhang, *Human P450 metabolism of warfarin*. Pharmacol Ther, 1997. **73**(1): p. 67-74.
297. Nebel, A., et al., *Potential metabolic interaction between St. John's wort and theophylline*. Ann Pharmacother, 1999. **33**(4): p. 502.

298. Johné, A., et al., *Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (Hypericum perforatum)*. Clin Pharmacol Ther, 1999. **66**(4): p. 338-45.
299. Perloff, M.D., et al., *Saint John's wort: an in vitro analysis of P-glycoprotein induction due to extended exposure*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(8): p. 1601-8.
300. Hennessy, M., et al., *St Johns wort increases expression of P-glycoprotein: implications for drug interactions*. Br J Clin Pharmacol, 2002. **53**(1): p. 75-82.
301. Tian, R., et al., *Functional induction and de-induction of P-glycoprotein by St. John's wort and its ingredients in a human colon adenocarcinoma cell line*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(4): p. 547-54.
302. Gutmann, H., et al., *Hypericum perforatum: which constituents may induce intestinal MDR1 and CYP3A4 mRNA expression?* Planta Med, 2006. **72**(8): p. 685-90.
303. Obach, R.S., *Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **294**(1): p. 88-95.
304. Zou, L., M.R. Harkey, and G.L. Henderson, *Effects of herbal components on cDNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity*. Life Sci, 2002. **71**(13): p. 1579-89.
305. Wang, Z., et al., *Effect of St John's wort on the pharmacokinetics of fexofenadine*. Clin Pharmacol Ther, 2002. **71**(6): p. 414-20.
306. Wang, E.J., M. Barecki-Roach, and W.W. Johnson, *Quantitative characterization of direct P-glycoprotein inhibition by St John's wort constituents hypericin and hyperforin*. J Pharm Pharmacol, 2004. **56**(1): p. 123-8.
307. Weber, C.C., et al., *Modulation of P-glycoprotein function by St John's wort extract and its major constituents*. Pharmacopsychiatry, 2004. **37**(6): p. 292-8.
308. Quiney, C., et al., *Hyperforin inhibits P-gp and BCRP activities in chronic lymphocytic leukaemia cells and myeloid cells*. Leuk Lymphoma, 2007. **48**(8): p. 1587-99.
309. Will-Shahab, L., et al., *St John's wort extract (Ze 117) does not alter the pharmacokinetics of a low-dose oral contraceptive*. Eur J Clin Pharmacol, 2008.
310. Feisst, C., *On the molecular basis of novel anti-inflammatory compounds and functional leukocyte responses*. Dissertation, 2006.
311. Radmark, O., et al., *5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(7): p. 332-41.
312. Maurer-Spurej, E., et al., *Room temperature activates human blood platelets*. Lab Invest, 2001. **81**(4): p. 581-92.
313. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. J Biol Chem, 1985. **260**(6): p. 3440-50.
314. Mayer, L.D., M.J. Hope, and P.R. Cullis, *Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure*. Biochim Biophys Acta, 1986. **858**(1): p. 161-8.
315. MacDonald, R.C., et al., *Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1061**(2): p. 297-303.
316. Dennis, E.A., *Formation and characterization of mixed micelles of the nonionic surfactant Triton X-100 with egg, dipalmitoyl, and dimyristoyl phosphatidylcholines*. Arch Biochem Biophys, 1974. **165**(2): p. 764-73.
317. Parasassi, T., et al., *Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence*. Biophys J, 1990. **57**(6): p. 1179-86.

318. Pande, A.H., S. Qin, and S.A. Tatulian, *Membrane fluidity is a key modulator of membrane binding, insertion, and activity of 5-lipoxygenase*. *Biophys J*, 2005. **88**(6): p. 4084-94.
319. Huster, D., K. Arnold, and K. Gawrisch, *Investigation of Lipid Organization in Biological Membranes by Two-Dimensional Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy* doi:10.1021/jp983428h. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1999. **103**(1): p. 243-251.
320. Bartoli, F., et al., *Tight binding inhibitors of 85-kDa phospholipase A2 but not 14-kDa phospholipase A2 inhibit release of free arachidonate in thrombin-stimulated human platelets*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(22): p. 15625-30.
321. Treiman, M., C. Caspersen, and S.B. Christensen, *A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases*. *Trends Pharmacol Sci*, 1998. **19**(4): p. 131-5.
322. Tessner, T.G., D.G. Greene, and R.L. Wykle, *Selective deacylation of arachidonate-containing ethanolamine-linked phosphoglycerides in stimulated human neutrophils*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(34): p. 21032-8.
323. Kramer, R.M. and D. Deykin, *Arachidonoyl transacylase in human platelets. Coenzyme A-independent transfer of arachidonate from phosphatidylcholine to lysoplasmenylethanolamine*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(22): p. 13806-11.
324. Forsell, P.K., et al., *Purification, characterization, and cDNA sequencing of cytosolic phospholipase A(2) from equine neutrophils*. *J Lipid Res*, 2000. **41**(8): p. 1222-30.
325. Brooks, S.P. and K.B. Storey, *Bound and determined: a computer program for making buffers of defined ion concentrations*. *Anal Biochem*, 1992. **201**(1): p. 119-26.
326. Adam, P., et al., *Biosynthesis of hyperforin in *Hypericum perforatum**. *J Med Chem*, 2002. **45**(21): p. 4786-93.
327. Yau, W.-M. and K. Gawrisch, *Lateral Lipid Diffusion Dominates NOESY Cross-Relaxation in Membranes*. *Journal of the American Chemical Society*, 2000. **122**(16): p. 3971-3972.
328. Kramer, R.M., et al., *Solubilization and properties of Ca²⁺-dependent human platelet phospholipase A2*. *Biochim Biophys Acta*, 1986. **878**(3): p. 394-403.
329. Alonso, F., P.M. Henson, and C.C. Leslie, *A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine*. *Biochim Biophys Acta*, 1986. **878**(2): p. 273-80.
330. Hammer, K.D., et al., *Pseudohypericin is necessary for the light-activated inhibition of prostaglandin E2 pathways by a 4 component system mimicking an *Hypericum perforatum* fraction*. *Phytochemistry*, 2008.
331. Biber, A., et al., *Oral bioavailability of hyperforin from hypericum extracts in rats and human volunteers*. *Pharmacopsychiatry*, 1998. **31 Suppl 1**: p. 36-43.
332. Pouliot, M., et al., *Colocalization of cytosolic phospholipase A2, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils*. *Eur J Biochem*, 1996. **238**(1): p. 250-8.
333. Lehr, M. and K. Griessbach, *Involvement of different protein kinases and phospholipases A2 in phorbol ester (TPA)-induced arachidonic acid liberation in bovine platelets*. *Mediators Inflamm*, 2000. **9**(1): p. 31-4.
334. Gijon, M.A., et al., *Cytosolic phospholipase A2 is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that Do and Do not mobilize calcium. Novel role of mitogen-activated protein kinase pathways in cytosolic phospholipase A2 regulation*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(26): p. 20146-56.

335. Poeckel, D., et al., *Boswellic acids stimulate arachidonic acid release and 12-lipoxygenase activity in human platelets independent of Ca²⁺ and differentially interact with platelet-type 12-lipoxygenase*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(3): p. 1071-8.
336. Kramer, R.M., et al., *Differential activation of cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) by thrombin and thrombin receptor agonist peptide in human platelets. Evidence for activation of cPLA2 independent of the mitogen-activated protein kinases ERK1/2*. J Biol Chem, 1995. **270**(24): p. 14816-23.
337. Coffey, P.J., et al., *Comparison of the roles of mitogen-activated protein kinase kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in neutrophil effector function*. Biochem J, 1998. **329** (Pt 1): p. 121-30.
338. Boon, J.M. and B.D. Smith, *Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes*. Med Res Rev, 2002. **22**(3): p. 251-81.
339. Dennis, E.A., *Phospholipase A2 activity towards phosphatidylcholine in mixed micelles: surface dilution kinetics and the effect of thermotropic phase transitions*. Arch Biochem Biophys, 1973. **158**(2): p. 485-93.
340. Rile, G., et al., *Ceramide 1-phosphate formation in neutrophils*. Acta Haematol, 2003. **109**(2): p. 76-83.
341. Sato, T., et al., *Stimulation by ceramide of phospholipase A2 activation through a mechanism related to the phospholipase C-initiated signaling pathway in rabbit platelets*. J Biochem, 1999. **125**(1): p. 96-102.
342. Shattil, S.J. and R.A. Cooper, *Membrane microviscosity and human platelet function*. Biochemistry, 1976. **15**(22): p. 4832-7.
343. Straume, M. and B.J. Litman, *Influence of cholesterol on equilibrium and dynamic bilayer structure of unsaturated acyl chain phosphatidylcholine vesicles as determined from higher order analysis of fluorescence anisotropy decay*. Biochemistry, 1987. **26**(16): p. 5121-6.
344. Maulik, P.R. and G.G. Shipley, *Interactions of N-stearoyl sphingomyelin with cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine in bilayer membranes*. Biophys J, 1996. **70**(5): p. 2256-65.
345. Holopainen, J.M., et al., *Evidence for the lack of a specific interaction between cholesterol and sphingomyelin*. Biophys J, 2004. **86**(3): p. 1510-20.
346. Chap, H., et al., *Organization and role of platelet membrane phospholipids as studied with purified phospholipases*. Agents Actions, 1979. **9**(4): p. 400-6.
347. Verotta, L., et al., *Hyperforin analogues from St. John's wort (Hypericum perforatum)*. J Nat Prod, 2000. **63**(3): p. 412-5.
348. Verotta, L., et al., *Synthesis and biological evaluation of hyperforin analogues. Part I. Modification of the enolized cyclohexanedione moiety*. J Nat Prod, 2002. **65**(4): p. 433-8.
349. Feisst, C., et al., *Evaluation of hyperforin analogues for inhibition of 5-lipoxygenase*. Med Chem, 2005. **1**(3): p. 287-91.
350. Gartner, M., et al., *Aristoforin, a novel stable derivative of hyperforin, is a potent anticancer agent*. Chembiochem, 2005. **6**(1): p. 171-7.
351. Lee, A.G., *Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1612**(1): p. 1-40.
352. McIntosh, T.J. and S.A. Simon, *Roles of bilayer material properties in function and distribution of membrane proteins*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2006. **35**: p. 177-98.
353. Nyholm, T.K., S. Ozdirekcan, and J.A. Killian, *How protein transmembrane segments sense the lipid environment*. Biochemistry, 2007. **46**(6): p. 1457-65.

354. Kannagi, R. and K. Koizumi, *Effect of different physical states of phospholipid substrates on partially purified platelet phospholipase A2 activity*. *Biochim Biophys Acta*, 1979. **556**(3): p. 423-33.
355. Fanani, M.L. and B. Maggio, *Surface pressure-dependent cross-modulation of sphingomyelinase and phospholipase A2 in monolayers*. *Lipids*, 1998. **33**(11): p. 1079-87.
356. Ahn, T., et al., *Functional regulation of hepatic cytochrome p450 enzymes by physicochemical properties of phospholipids in biological membranes*. *Curr Protein Pept Sci*, 2007. **8**(5): p. 496-505.
357. Halperin, A. and O.G. Mouritsen, *Role of lipid protrusions in the function of interfacial enzymes*. *Eur Biophys J*, 2005. **34**(7): p. 967-71.
358. Sheu, J.R., et al., *Mechanisms involved in the antiplatelet activity of midazolam in human platelets*. *Anesthesiology*, 2002. **96**(3): p. 651-8.
359. Oruch, R., I.F. Pryme, and H. Holmsen, *Effects of psychotropic drugs on the thrombin-induced liberation of arachidonate in human platelets*. *Saudi Med J*, 2008. **29**(10): p. 1397-407.
360. Feisst, C., et al., *Hyperforin is a novel type of 5-lipoxygenase inhibitor with high efficacy in vivo*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(16): p. 2759-71.
361. Schempp, C.M., et al., *Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream--a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison*. *Phytomedicine*, 2003. **10 Suppl 4**: p. 31-7.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Marika Hoffmann, geb. Schubert
geboren 24.05.1979 in Neuruppin
verheiratet, deutsche Staatsangehörigkeit

Ausbildung

seit 10.2004	Promotion im Institut für pharmazeutische Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a.M.
04.2006 – 06.2006	Bearbeitung eines Teilprojekts am Karolinska Institutet Stockholm
06.2004	Approbation als Apothekerin
10.1998 – 10.2002	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität, Marburg
09.1991 – 06.1998	Carl-Anwandter-Gymnasium in Calau
09.1985 – 08.1991	Polytechnische Oberschule in Calau

Berufliche Praxis

seit 01.2009	Beschäftigung in der Apotheke des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a.M.
09.2006 – 12.2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a.M. Betreuung des Praktikums „Pharmazeutische Chemie III: Arzneimittelanalytik, Drug-Monitoring, toxikologische und umweltrelevante Untersuchungen“ im Studiengang Pharmazie

Lebenslauf

01.2005 – 07.2008	Tätigkeit als Apothekerin in der Schlossapotheke, Kronberg
07.2004 – 08.2008	Tätigkeit als Apothekerin in der Apotheke an der Post, Frankfurt
11.2003 – 04.2004	Zweites Halbjahr der Praktischen Ausbildung zur Apothekerin in der Apotheke an der Post, Frankfurt a.M.
05.2003 – 10.2003	Erstes Halbjahr der Praktischen Ausbildung zur Apothekerin in der Apotheke der Städtischen Kliniken Frankfurt a.M.
11.2002 – 04.2003	Visiting Research Fellow im Children's Hospital Pittsburgh (The University of Pittsburgh Medical Center) in Pittsburgh, USA
1998 – 2001	verschiedene Praktika: Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Marburg Apotheke der Städtischen Kliniken Frankfurt a.M. Apotheke des Klinikums der Philipps-Universität Marburg Centeon Pharma GmbH Marburg Apotheke am Markt, Vetschau Forum-Apotheke, Lübbenau

Akademische Lehrer

PD Dr. T. Gillmann

Prof. Dr. M. Haake

Prof. Dr. T. Kissel

Prof. Dr. G. Klebe

Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein

Prof. Dr. R. Matusch

Prof. Dr. M. Petersen

Dr. R. Sindhi

Prof. Dr. P. Jakobsson

Prof. Dr. D. Steinhilber

Prof. Dr. O. Werz

Publikationen

M. Hoffmann, J. J. Lopez, C. Feisst, S. Pawelczik, P. Jakobsson, B. Sorg, C. Glaubitz, D. Steinhilber, O. Werz (2009): Hyperforin induces Ca^{2+} -independent arachidonic acid release in human platelets by facilitating cytosolic phospholipase A_2 activation through select phospholipid interactions. *Manuskript in Revision*

M. Hoffmann, S. Pawelczik, P. Jakobsson, B. Sorg, D. Steinhilber, O. Werz (2009): The acylphloroglucinol hyperforin inhibits arachidonic acid release in human neutrophils by cytosolic phospholipase A_2 involving select phospholipid interactions. *Manuskript*

A. Rossi, C. Pergola, A. Koeberle, **M. Hoffmann**, F. Dehm, P. Bramanti, S. Cuzzocrea, O. Werz, L. Sautebin (2009): The 5-lipoxygenase inhibitor zileuton suppresses prostaglandin biosynthesis by inhibition of arachidonic acid release in macrophages. *Manuskript*

A. Koeberle, J. Bauer, M. Verhoff, **M. Hoffmann**, H. Northoff, O. Werz (2009): Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits microsomal prostaglandin $E(2)$ synthase-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 388: 350-4

C. Feisst, C. Pergola, M. Rakonjac, A. Rossi, A. Koeberle, G. Dodt, **M. Hoffmann**, C. Hoernig, L. Fischer, D. Steinhilber, L. Franke, G. Schneider, O. Radmark, L. Sautebin, O. Werz (2009): Hyperforin is a novel type of 5-lipoxygenase inhibitor with high efficacy in vivo. *Cell Mol Life Sci* 66: 2759-71.

T. J. Maier, S. Schiffmann, I. Wobst, K. Birod, C. Angioni, **M. Hoffmann**, J. J. Lopez, C. Glaubitz, D. Steinhilber, G. Geisslinger, S. Grosch (2009): Cellular membranes function as a storage compartment for celecoxib. *J Mol Med.* 87: 981-93

Posterpräsentationen:

M. Hoffmann, C. Feisst, P. Jakobsson, D. Steinhilber, O. Werz (2008): Divergent Effects of Hyperforin on the Release of Arachidonic Acid in Platelets and Neutrophils. Posterpräsentation, *Phytopharmaka und Phytotherapie 2008*, Berlin

M. Hoffmann, C. Feisst, P. Jakobsson, D. Steinhilber, O. Werz (2007): Activation of Cytosolic Phospholipase A_2 by Hyperforin. Posterpräsentation, *3rd International Conference on Phospholipase A_2 and Lipid Mediators*, Sorrent, Italien

M. Hoffmann, C. Feisst, D. Pöckel, D. Steinhilber, O. Werz (2006): Differential regulation of phospholipase A₂ in human platelets and polymorphonuclear leukocytes by hyperforin. Posterpräsentation, *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft und der Gesellschaft Deutscher Chemiker*, Frankfurt

M. Hoffmann, C. Feisst, D. Pöckel, O. Werz (2005): The influence of hyperforin on the regulation of cytosolic phospholipase A₂ in human neutrophils. Posterpräsentation, *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Mainz

M. Schubert, C. Feisst, D. Pöckel, O. Werz (2005): Hyperforin stimuliert die Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A₂ in menschlichen Thrombozyten. Posterpräsentation, *Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Leipzig

Vorträge auf Seminaren des EU-Graduiertenkollegs GRK 757

Winterschule 2005, Stockholm

Sommerschule 2005, Arnsburg

Sommerschule 2006, Sandham

Winterschule 2007, Obergurgel

Sommerschule 2007, Aigen

Winterschule 2008, Obergurgel

Weitere Veröffentlichungen

M. Schubert, R. Venkataramanan, D. W. Holt, L.M. Shaw, W. McGhee, J. Reyes, S. Webber, R. Sindhi (2004): Pharmacokinetics of sirolimus and tacrolimus in pediatric transplant patients. *Am J Transplant* 4: 767-73.

M. Schubert, R. Venkataramanan, D. Holt, L. Shaw, R. Sindhi (2003): Pharmacokinetics of sirolimus in pediatric transplant recipients receiving tacrolimus. Plenarvortrag, *9th Congress of the International Liver Transplantation Society*, Barcelona, Spanien

M. Schubert, L. Shaw, D. Holt, R. Venkataramanan, R. Sindhi (2003): Pharmacokinetics of sirolimus in pediatric transplant recipients receiving tacrolimus. Vortrag, *American Transplant Congress*, Washington, USA

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt:

... Prof. Dr. Oliver Werz für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit von nah und fern, sein Engagement und Ideenreichtum sowie das in mich gesetzte Vertrauen und sein immerwährendes Interesse am Gelingen meiner Arbeit

... Prof. Dr. Dieter Steinhilber für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis zu promovieren, die Aufnahme in das europäische Graduiertenkolleg, die wertvollen Anregungen und seine stetige Unterstützung

... Prof. Dr. Per-Johann Jakobsson für die freundliche Aufnahme in sein Labor am Karolinska Institutet Stockholm und die Starthilfen bei der Virenzucht

... Sven Pawelczik für die vielen praktischen Tipps zur Pflege der Sf9-Zellen und für die schöne Zeit in Stockholm

... Dr. Bernd Sorg für die Hilfe bei der Klonierungsplanung, ohne die die Viren nie entstanden wären

... Dr. Jakob J. Lopez für die Durchführung und aufwendige Auswertung der NMR-Analysen

... Sven Eriksson für die hilfreichen Tipps zur Liposomenproduktion

... Dr. Christian Feißt für die ersten Untersuchungen der Hyperforin-Effekte auf die Thrombozyten-12-LO, aus denen dieses spannende Projekt entstanden ist

... Dr. Daniel Pöckel für seine unerschöpfliche Geduld bei der Einarbeitung eines Neulings in die Laborwelt

... Sabine Lindner und Tina Hörnig für die wunderbare Laborpartnerschaft, ohne die die Promotionszeit nur halb so schön gewesen wäre...

... Dr. Beate Firla, Dr. Michael Hörnig, Tina Hörnig, Dr. Lars Tausch, Michael Ermisch und Svenja Steinbrink für die unkomplizierte und sehr nette Zusammenarbeit in der Betreuung der Studentenpraktika

... Dr. Michael Hörnig für die technischen Hilfestellungen in HPLC- und PC-Fragen

... Dr. Thorsten J. Maier für viele anregende Diskussionen über Proteine und Membranen und seine Begeisterungsfähigkeit

... Brigitte Welter für die Beschaffung von Literatur und das unermüdliche Abrotieren von Methanol

... Astrid Brüggerhoff für die Bestellung einer Unmenge an Chemikalien
... dem Blutspendedienst im Markus-Krankenhaus und in den Städtischen Kliniken
Frankfurt-Höchst für die zuverlässige Bereitstellung von mehreren Litern Blut
... der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jennifer B. Dressmann für die Benutzung des Photonen-
Korrelations-Spektroskops
... allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen und Kolleginnen des Arbeitskreises für ihre
Kollegialität sowie die höchst unterhaltsamen Kaffeepausen, Stammtische und Grillabende
und allen Mitarbeitern des pharmazeutischen Instituts für ihre Hilfsbereitschaft

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann, die mich stets unterstützt
und nie den Glauben an mich verloren haben.