



Abschließender Sachstandsbericht  
Leibniz-Wettbewerb

Johanniskraut gegen Alzheimer – Begegnung einer gesellschaftlichen  
Herausforderung durch neue Wege in der Identifizierung, Gewinnung  
und Anwendung von Naturstoffen  
Antragsnummer: SAW-2015-IPB-2 (K182/2014)

---

**Berichtszeitraum:** 01. 05. 2015 – 31. 04. 2019

**Federführendes Leibniz-Institut:** Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB)

**Projektleiter/in:**

Prof. Dr. Dr. Ludger A. Wessjohann

**Inhalt**

1.	Zielerreichung und Umsetzung der Meilensteine .....	3
2.	Aktivitäten und Hindernisse.....	3
3.	Ergebnisse und Erfolge.....	4
4.	Chancengleichheit.....	5
5.	Qualitätssicherung.....	5
6.	Zusätzliche eigene Ressourcen.....	6
7.	Strukturen und Kooperation .....	6
8.	Ausblick.....	6

## 1. Zielerreichung und Umsetzung der Meilensteine

Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) ist neben vielfältigen Anwendungen, wie z.B. für Wundheilung, Hautpflege und Verdauungsbeschwerden, insbesondere für seine Wirkung bei leichten bis mittelschweren Depressionen bekannt. Darüber hinaus wurden auch positive Effekte auf Alzheimer-Demenz beobachtet, die vermutlich mit einer Aktivierung von ABC-Transportern in der Blut-Hirn-Schranke verbunden sind. Das große Interesse an dieser Art spiegelt sich in Deutschland in der Wahl zur Arzneipflanze des Jahres 2015 und zur Heilpflanze des Jahres 2019 wider.

Ziel des interdisziplinären Projektes war die Untersuchung der molekularen Hintergründe der Wirkung von Johanniskraut und anderen pflanzlichen Extrakten auf Alzheimer-Demenz und andere neurodegenerative Alterserkrankungen. Dies schließt die Identifizierung der verantwortlichen bioaktiven Substanzen aus *Hypericum perforatum* L. auf der Grundlage von Metabolitenprofilen mittels chemoinformatischer Tools, Biosynthesestudien, genetische Analysen und Bioaktivitätsstudien ein. Während die phytochemischen, biochemischen und genetischen Fragestellungen weitgehend sehr erfolgreich beantwortet wurden, traten unerwartete Schwierigkeiten bei der Bioaktivitätscharakterisierung von Extrakten und isolierten Reinsubstanzen auf, so dass die Verifizierung aktiver Inhaltsstoffe nicht vollständig umgesetzt werden konnte. Die erfolgte umfassende Charakterisierung genetisch verschiedener Johanniskrautlinien ermöglicht jedoch nunmehr die Auswahl von relevanten Genotypen für spezifische pharmakologische Fragestellungen, die einen hohen oder niedrigen Gehalt an bestimmten Inhaltsstoffen erfordern.

## 2. Aktivitäten und Hindernisse

Am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik Kulturpflanzenforschung (IPK) wurden *Hypericum perforatum*-Akzessionen mit unterschiedlicher genetischer Ausstattung kultiviert und genetisch charakterisiert. Insbesondere wurden Genom- und Transkriptomanalysen von Blüten durchgeführt. Dabei wurde in mehreren, genetisch verschiedenen *Hypericum*-Linien ein Phänotyp (GPT) gefunden, der im Plazentagewebe keine dunklen Drüsen ausbildet und auch kein Hypericin enthält. Das Naphthodianthron Hypericin ist einer der mit der antidementiellen Wirkung verbundenen Johanniskraut-Inhaltsstoffe, der jedoch auch unerwünschte phototoxische Reaktionen hervorruft und in der photodynamischen Krebstherapie eingesetzt werden kann. Basierend auf dieser Entdeckung wurden differentielle Transkriptomanalysen durchgeführt, die es erlaubten Gene zu identifizieren, die an der Biosynthese von Hypericin bzw. an der Entwicklung der dunklen Drüsen beteiligt sind.

In der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie (IPB) wurden Metabolitenprofile von definierten Extrakten verschiedener in Gatersleben kultivierter *Hypericum*-Linien mittels Massenspektrometrie (MS) und Kernresonanzspektroskopie (NMR) erstellt und verglichen. Insbesondere auf dem relativ neuen Gebiet der NMR-Metabolomics wurden große methodische Fortschritte erzielt. Die detaillierte Auswertung der Daten führte zur Identifizierung einer Vielzahl von spezifischen Sekundärmetaboliten. Die Annotierung der Verbindungen wurde dabei durch Isolierung und Strukturaufklärung von relevanten Metaboliten aus Johanniskraut-Extrakten unterstützt.

Ziel der Arbeit der Abteilung Stoffwechsel- und Zellbiologie des IPB war es, die intakten Drüsen aus *Hypericum*-Blättern zu isolieren, die RNA zu sequenzieren, um im Anschluss ein *de-novo*-Transkriptom zu generieren und Kandidatengen für Enzyme des Hyperforin-Biosyntheseweges im Vergleich mit drüsenfreiem Blattgewebe zu suchen. Hauptaugenmerk lag hierbei auf putativen Prenyltransferasen und Polyketidsynthasen, welche nach heutigen Kenntnissen die Hauptrolle in den zugrundeliegenden Biosynthesewegen spielen. Hier zeigten die Untersuchungen jedoch, dass es technisch nicht möglich ist, die Drüsen zerstörungsfrei zu gewinnen oder auf anderem Weg geeignetes Gewebe für differentielle Expressions-Analysen zu finden. Teile dieser Aufgaben wurden daraufhin in der

Arbeitsgruppe Beerhues an der TU Braunschweig weiter verfolgt, die mit langjährigen Erfahrungen zur Aufklärung der Biosynthese bedeutender Inhaltsstoffe insbesondere in Wurzelkulturen beitragen konnte. Besonderer Fokus lag dabei auf Biosyntheseuntersuchungen von Hyperpolyphyllirin, einem Hyperforinderivat mit methyliertem Grundgerüst, das von der AG Wessjohann (IPB) aus *Hypericum polyphyllum* isoliert wurde. Die verantwortliche Polyketidsynthese ist bisher nicht bekannt. Ausgehend von diesem veränderten Grundgerüst wurden biosynthetische Studien begonnen, die später durch Transkriptomanalysen ergänzt werden.

Das Pahnke Lab der Universität Oslo konzentrierte sich auf die Untersuchung von grundlegenden molekularen Mechanismen und neuen Behandlungsmöglichkeiten von neurodegenerativen Erkrankungen mit besonderem Fokus auf Alzheimer-Demenz. In den letzten Jahren konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass durch Aktivierung von ABCC1-ATPasen der A $\beta$ -Gehalt im Gehirn sinkt. In verschiedenen Assay-Systemen wurde nun die Wirkung von Johanniskrautextrakten und anderen Pflanzen untersucht. Eine besondere Schwierigkeit bestand in der quantitativen Bestimmung des Einflusses von Pflanzeninhaltsstoffen auf ABC-Transporter. Nachdem ein ursprünglich kommerziell verfügbarer Analyse-Kit zur Bestimmung der Aktivität von ABCC1-Transportern nicht mehr produziert wurde, war die zeitaufwändige Entwicklung von alternativen Testsystemen notwendig. Trotz vielfältiger Ergebnisse konnten keine Daten gewonnen werden, die sich zur statistischen Korrelation mit pflanzlichen Metabolitenprofilen eignen.

Alle im Rahmen des Projektes erhobenen Daten wurden am IPB in der Arbeitsgruppe Bioinformatik und Massenspektrometrie der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie (jetzt Synergieforschungsgruppe Bioinformatik & Forschungsdaten) zur Analyse zusammengeführt und dort mit Methoden der Bioinformatik und Biostatistik ausgewertet, um die Identifizierung von Metaboliten zu erleichtern und um Korrelationen zwischen chemischen Inhaltsstoffen und ihrer biologischen Aktivität oder zwischen Metaboliten und Genen aufzudecken. Dabei wurden neue Tools zur Annotierung von Substanzklassen entwickelt und erstmals Abläufe zur Auswertung von metabolomischen NMR-Daten etabliert.

### 3. Ergebnisse und Erfolge

Die Forschungsergebnisse des Projektes wurden in zahlreichen Publikationen und Konferenzbeiträgen vorgestellt. Diese umfassen Arbeiten zur Biosynthese und zum Profiling wichtiger Johanniskraut-Inhaltsstoffe, zur chemoinformatischen Datenverarbeitung und zur biologischen Wirkung. Mehrere Konferenzpräsentationen wurden mit Posterpreisen ausgezeichnet, darunter auch das "Alzheimer Drug Discovery Foundation Young Investigator Scholarship". Ein Schwerpunkt der Publikationstätigkeit in Fachjournals lag dabei insbesondere in der Untersuchung von krankheitsbedingten Vorgängen im neurodegenerativ beeinträchtigten Gehirn und der Entwicklung und Anwendung von spezifischen Testsystemen und Mausmodellen. Neben Johanniskraut wurde hier auch die Wirksamkeit weiterer Pflanzen wie Kiefernrinde und Sideritiskraut evaluiert. Weitere Publikationen zu bereits auf Tagungen vorgestellten Ergebnissen zum Metabolitenprofiling von 20 verschiedenen *Hypericum*-Akzessionen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund, zum Sekundärstoffspektrum einer spezifischen Art mit besonderen Hyperforinen sowie zur Biosynthese des Hyperpolyphyllirin-Grundgerüsts sind in Vorbereitung und werden demnächst eingereicht.

Im Rahmen des Projektes konnten bisher drei Promotionsarbeiten, die sich mit dem Inhaltsstoffspektrum (IPB) und der Vermehrung von Johanniskraut (IPK) sowie mit der Bedeutung von ABC-Transportern für Altern und Alzheimer-Demenz (OvGU Magdeburg) beschäftigen, abgeschlossen werden. Drei weitere Dissertationen zum vergleichenden Metabolitenprofiling, zur bioinformatischen Datenauswertung (beide IPB) und zu Biosynthesestudien (TU Braunschweig) stehen kurz vor dem Abschluss. Des Weiteren

fokussierte eine Diplomarbeit am IPB auf besonderen NMR-Techniken zur Analyse von Johanniskrautextrakten. In einer Praktikumsarbeit wurde eine Methode entwickelt, um die Drüsen in Johanniskrautblättern, die die wesentlichen aktivitätsrelevanten Inhaltsstoffe enthalten, automatisch quantitativ zu erfassen.

Verbunden mit dem Vorhaben wurden von im Projekt beschäftigten Doktoranden DAAD Research Intership (RISE)-Stipendien eingeworben, die Forschungsaufenthalte von amerikanischen und kanadischen Studenten förderten und die Untersuchung von Johanniskraut-Inhaltsstoffen unterstützten.

Des Weiteren legten die Projektarbeiten die Basis für weiterführende Drittmittel-einwerbungen. So sollen die erworbenen grundlegenden methodischen Erkenntnisse zur Identifizierung, Gewinnung und Anwendung von Johanniskraut-Naturstoffen im Rahmen des Forschungsverbundes „Autonomie im Alter“ in dem von EFRE und dem Land Sachsen-Anhalt geförderten „PhytoAD“-Vorhaben anwendungsbezogen zur Erzeugung, Reinigung und Wirkung von neuroaktiven Substanzen ausgeweitet werden. Entwickelte Methoden und identifizierte Inhaltsstoffe kommen auch in den im gleichen Verbund angesiedelten Vorhaben „ProCognito“ und „Phytohäm“ zum Einsatz, in denen mit neuen Kooperationspartnern die Wirkung von Naturstoffen auf synaptische Kommunikationsprozesse bzw. auf altersbedingte Bluterkrankungen erforscht werden soll. Darüber hinaus gab es erste Kontakte zu einem Industriepartner hinsichtlich der Entwicklung einer pflanzenbasierten Alzheimermedikation. Während der Projektlaufzeit wurde der interdisziplinäre wissenschaftliche Austausch durch regelmäßige Meetings aller Projektpartner gewährleistet, die wesentlich zur Vernetzung der Kooperationspartner beitrugen. Die Organisation einer Konferenzserie mit der Bezeichnung TransportDementia erlaubte den fachübergreifenden Erfahrungsaustausch mit einem breiteren Fachpublikum.

Im Rahmen der jährlich ausgerichteten „Langen Nacht der Wissenschaften“ in Halle wurde das Projekt am IPB der interessierten Öffentlichkeit vorgestellt. Dazu haben die im Projekt beschäftigten Doktoranden ein thematisches Memory-Spiel entworfen, um mit den Besuchern der Veranstaltung in Interaktion zu treten. Die Thematik wurde auch mehrfach von der Presse aufgegriffen.

#### 4. Chancengleichheit

Chancengleichheit gehört an allen beteiligten Forschungseinrichtungen zum Grundprinzip. Am IPB überwacht der Personalrat und Gleichstellungsbeauftragte, dass die Gleichbehandlung aller Dienststellenangehörigen unabhängig von Geschlecht, Herkunft, Nationalität etc. gewährleistet ist. Das Projektteam war aus weiblichen und männlichen Mitarbeitern unterschiedlicher Nationalität zusammengesetzt.

#### 5. Qualitätssicherung

Die Einhaltung der guten wissenschaftlichen Praxis ist selbstverständlich an allen beteiligten Forschungsinstitutionen. Die Einhaltung dieser Regeln ist im IPB ausdrücklich als arbeitsvertragliche Pflicht normiert und Mitarbeiter/innen wurden durch schriftliche Erklärung hierauf verpflichtet. Alle Arbeiten wurden dokumentiert, Primärdaten veränderungssicher gespeichert, erhobene Daten, Ergebnisse und Proben stehen für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung. Forschungsergebnisse wurden in Peer-Review-Fachjournalen, wenn möglich unter Open Access-Bedingungen publiziert. Nach Publikation der Ergebnisse bzw. Sicherung etwaiger Schutzrechte werden die transkriptomischen Daten beim European Nucleotide Archive (ENA) hinterlegt, während die Metabolom-Ergebnisse u.a. in den Datenbanken RADAR und Massbank verfügbar sein werden. Auch Softwarepakete (z.B. R-Scripts) werden öffentlich zur Verfügung gestellt.

## 6. Zusätzliche eigene Ressourcen

Am IPB und bei beteiligten Kooperationspartnern wurde das Projekt insbesondere durch kostenlose Nutzung von Infrastruktur (Gewächshäuser, Phytokammern und Freilandanbaufläche, kostenintensive Messgeräte wie z. B. Massenspektrometer und Kernresonanzspektrometer, Rechencluster, Sequenzierungsgeräte, Maushaltung) unterstützt. Darüber hinaus war Technisches Personal in Pflanzen- und Versuchstierpflege, Probenname etc. involviert sowie wissenschaftliche Mitarbeiter in die Anleitung von Doktoranden, Bedienung spezifischer Geräte und Datenauswertung. Schätzungsweise entsprechen diese „In-kind“ Leistungen an den Leibniz-Instituten etwa 80 % des jeweiligen Projektbudgets.

## 7. Strukturen und Kooperation

Die interdisziplinäre Kooperation war ausschlaggebend für den Erfolg des komplexen Vorhabens und wirkt über den Projektzeitraum hinaus. Durch den Wechsel der beruflichen Position von 2 Partnern (T. Sharbel, GIFS, Saskatoon; J. Pahnke, Universität Oslo) wurden Kooperationsbeziehungen zu den neuen Institutionen aufgenommen, um die Expertise im Vorhaben zu halten. Ein Projektmitarbeiter des IPB wurde nach Oslo entsandt, um Knowhow und dortige Infrastruktur zur Durchführung von biologischen Tests zu nutzen. Insbesondere für die Entwicklung von *in-Vitro*-Analysen und Tiermodellen wurden Kooperationsbeziehungen ausgeweitet oder neu etabliert (Prof. L. Mosca, Prof. S. Behrends, Prof. Dan Frenkel, Prof. Claus Pietrzik, Dr. H. Wangenstein), die bei den fortlaufenden Arbeiten zum Tragen kommen und vor allem die oben beschriebene Problematik im Assaybereich ausgleichen werden.

## 8. Ausblick

Perspektivisch werden die Untersuchungen auf weitere Johanniskrautarten ausgeweitet, die zum Teil spezifische Inhaltsstoffspektren aufweisen. So kann die mit der Biodiversität verknüpfte chemische Vielfalt für ein breites Anwendungsfeld erschlossen werden. Auch sollen neben dem potentiellen Einfluss auf ABC-Transporter weitere mögliche, mit neurodegenerativen Erscheinungen verbundene Targets geprüft werden. Die Funktionsanalyse ausgesuchter Johanniskraut-Gene mit Hilfe molekularbiologischer Methoden bildet die Basis für späteres züchterisches Vorgehen oder für mögliche biotechnologische Herangehensweisen. Die Grundlagen um Johanniskräuter mit weniger oder gar ohne unerwünschte Nebenkomponenten zu erzeugen wurden sehr erfolgreich gelegt.