

Universitätsklinikum Ulm  
Klinik für Neurologie  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. A.C. Ludolph

Die Bedeutung des Dopamintransporters für die selektive dopaminerge  
Neurotoxizität von  $\beta$ -Carbolinen:  
Toxikologische Studien an heterologen Expressionsmodellen des  
Dopamintransporters

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von Yu-I Hwang  
aus Loutong, Taiwan

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Alexander Storch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Wirth

Tag der Promotion: 19.06.2009

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 Morbus Parkinson	- 1 -
1.1.1 Grundlagen	- 1 -
1.1.2 Neuropathologie und Pathobiochemie	- 2 -
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese	- 3 -
1.2 Stand der Forschung	- 5 -
1.2.1 Toxizität von MPTP bzw. MPP <sup>+</sup>	- 5 -
1.2.2 Toxizität der $\beta$ -Carboline	- 6 -
1.2.3 Toxizität der Isoquinoline	- 9 -
1.2.4 Der Dopamintransporter	- 11 -
1.3 Ziel dieser Arbeit	- 11 -
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>- 12 -</b>
2.1 Material	- 12 -
2.1.1 Zelllinien	- 12 -
2.1.2 Chemikalien	- 12 -
2.1.3 Geräte	- 13 -
2.2 Methoden	- 13 -
2.2.1 Zellbiologische Methoden	- 13 -
2.2.1.1 Kultivierung der HEK-293- bzw. HEK-hDAT-Zelllinie	- 13 -
2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien	- 14 -
2.2.1.3 MTT- Färbung	- 15 -
2.2.2 Durchführung und Messung der Versuche	- 16 -
2.2.2.1 Versuche zu konzentrationsabhängigen Effekten aufs Zellüberleben	- 16 -
2.2.2.2 Versuche zur intrazellulären Toxinaufnahme / Uptake-Versuche	- 17 -
2.2.3 Statistische Auswertung der Messergebnisse	- 19 -
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>- 20 -</b>
3.1 Konzentrationsabhängige Effekte der $\beta$ -Carboline auf das Zellüberleben	- 20 -
3.1.1 Norharman und seine Derivate	- 20 -
3.1.2 Harmine und seine Derivate	- 24 -
3.1.3 Harmane und seine Derivate	- 27 -
3.1.4 Harmaline und 2-Methyl-Harmalinium	- 30 -
3.1.5 Weitere Carboline mit signifikantem Unterschied des Zellüberlebens	- 32 -
3.1.6 $\beta$ -Carboline ohne signifikanten Unterschied im Zellüberleben	- 34 -
3.2 Konzentrationsabhängige Effekte der Isoquinoline auf das Zellüberleben	- 35 -
3.3 Zusammenfassung der toxikologischen Daten	- 36 -
3.4 Intrazelluläre Toxinaufnahme in HEK-293- und HEK-hDAT-293-Zellen / Uptake-Versuche	- 38 -
3.4.1 Intrazelluläre Aufnahme der $\beta$ -Carboline	- 38 -
3.4.2 Korrelationen zwischen Aufnahmekinetik und Toxizität	- 41 -

<b>4. DISKUSSION</b>	<b>- 42 -</b>
4.1 Der Dopamintransporter in der Ätiopathogenese des IPS	- 43 -
4.2 Dopaminerge Toxizität von $\beta$ -Carbolinen	- 44 -
4.3 Dopaminerge Toxizität von Isoquinolinen	- 48 -
4.4 Ausblick	- 49 -
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>- 50 -</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>- 52 -</b>

## Abkürzungsverzeichnis

1-Benzyl-TIQ	1-Benzyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin
CH2-FH4	5,10-Methylenetetrahydrofolat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
FCS	Fetales Kälberserum („foetal calf serum“)
G418	Geneticin Sulphat 418
GBR 12909	1-[2-[bis(4-fluorophenyl)methoxy]ethyl]-4-[3-phenyl-propyl]- Piperacin Dihydrochlorid
HBSS	Hanks balanced salt solution
(h)DAT	(humaner) Dopamintransporter
HEK-293	Humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“)
HEK-(h)DAT	HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters
IPS	Idiopathisches Parkinson Syndrom
TC <sub>50 wt</sub> bzw. TC <sub>50 DAT</sub>	Halbmaximale Toxizitätskonzentration der HEK-293-wt- bzw. HEK- hDAT-293-Zelllinie
I <sub>DAT</sub>	Quotient TC <sub>50 wt</sub> / TC <sub>50 DAT</sub>
MAO	Monoaminoxidase
MEM	Modified Eagles´s Medium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
MPP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-phenyl-Pyridinium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid
PBS	Phosphat gepufferte Lösung («buffered solution«)
PC 12	Phäochromozytom Zellen („cells“)
P / S	Penicillin / Streptomycin
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SEM	Standardabweichung
SnPr	Substantia nigra pars reticulata
TC <sub>50</sub>	Halbmaximal toxische Konzentration
TIQ	Tetrahydroisoquinolin

# 1. Einleitung

## 1.1 Morbus Parkinson

### 1.1.1 Grundlagen

Die nach seinem Erstbeschreiber James Parkinson (1755-1824) benannte Erkrankung mit der Trias Rigor, Tremor, Akinese hat als mikroskopisch-morphologisches Korrelat die Degeneration dopaminerger Neurone in der *pars compacta* der *Substantia nigra* (Betarbet et al., 2002). Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium treten auch kognitive Defizite und psychiatrische Störungen auf. Der Morbus Parkinson - auch idiopathisches Parkinsonsyndrom (IPS) genannt - ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung des fortgeschrittenen Lebensalters, sie kommt in allen ethnischen Bevölkerungsgruppen mit einer leichten Geschlechtspräferenz (Männer:Frauen=1,5-2:1) vor. Die Prävalenz ist altersabhängig mit einem exponentiellem Anstieg ab dem 65. Lebensjahr, so dass sie bei den über 65-jährigen bei ca. 3 % liegt, während sie bei der Gesamtbevölkerung lediglich 0,3 % beträgt. In Europa und Nordamerika ist die Prävalenz etwas höher als in China, Japan und Afrika (Moghal et al., 1994; Zhang & Roman, 1993; zur Übersicht, siehe Lang & Lozano, 1998a).

Die Therapie kann in drei Kategorien eingeteilt werden: die symptomatische, die neuroprotektive und die invasiv-restaurative Therapie. Die zur Zeit am breitesten Anwendung findende symptomatische Therapie umfasst die Pharmako- und Physiotherapie. Bei der Pharmakotherapie wird hauptsächlich das Ungleichgewicht zwischen dopaminergen und cholinergen Neuronen ausgeglichen; zur Anwendung kommen L-Dopa plus Decarboxylasehemmer, Dopamin-Agonisten, MAO-B-Hemmer, Amantadin und Anticholinergika.

Die Neuroprotektion im Rahmen des IPS steckt noch in der Forschungsphase: Gegenstand der Forschung sind hier vor allem die Antioxidantien Selegiline und alpha-Tocopherol (Vitamin E)(Shoulsen et al., 1998) sowie das wahrscheinlich anti-exzitotoxisch, d.h. anti-glutamaterg wirkende Riluzole (2-Amino-6-Trifluoromethoxy-Benzothiazol )(Barneoud et al., 1996; Benazzouz et al., 1995; Bezard et al., 1998; Boireau et al., 2000, Martin et al., 1993; MacIver et al., 1996; Doble, 1999; Estevez et al., 1995; Mary et al., 1995, Storch et al. 2000).

Bei den invasiv-restaurativen Therapieansätzen wird embryonales Mittelhirngewebe ins Striatum transplantiert. Studien belegen die funktionell-effektive Integration des Transplantats (Dunnett & Björklund, 1999; Hagall et al., 1999; Kordower et al., 1997; Lindvall et al., 1990; Olanow et al., 1996, Piccini et al, 1999). Vom ethischen Standpunkt ist diese Therapieform jedoch problematisch (Boer, 1994; Hoffer & Olson, 1991). Eine Lösungsmöglichkeit hierfür wären die sogenannten Progenitorzellen. Diese Vorläuferzellen, die im embryonalen und adulten Gehirn vorkommen,

entwickeln sich aus totipotenten Stammzellen (Gage, 2000; McKay, 1997; Vescovi & Snyder, 1999) und sind im Gegensatz zu Stammzellen partiell determiniert, sich in bestimmte Zelltypen (wie z.B. Neuronen oder Gliazellen) zu differenzieren (Gage, 2000; McKay, 1997). Storch et al. sind die *in vitro*-Konvertierung fetaler mesenzephaler Stammzellen des Menschen in Neuronen mit dopaminergen Charakteristika, wie z.B. die Immunoreaktivität für die Tyrosin-Hydroxylase, bereits gelungen (Storch et al. 2001). Außerdem scheint die Generierung funktionell dopaminergener Neurone für die invasiv-restaurative Therapie aus embryonalen und neuralen Stammzellen sowie Knochenmarkszellen möglich zu sein (Schwarz et al. 2006).

### 1.1.2 Neuropathologie und Pathobiochemie

Der Morbus Parkinson ist durch den progredienten Zelluntergang hauptsächlich dopaminergener, neuromelaninhaltiger Neurone charakterisiert, welcher post mortem durch die Depigmentierung der pars compacta der *Substantia nigra* ersichtlich ist. Mikroskopisch lassen sich in den verbleibenden Neuronen die sogenannten Lewy-Körper, aus den Proteinen Ubiquitin und alpha-Synuclein bestehende hyaline Einschlusskörperchen, nachweisen (zur genaueren Beschreibung beider Proteine s. Kap. 1.3, zur Übersicht s. Lang & Lozano, 1998a oder Spillantini et al. 1998).

Das nigrostriatale System ist für die Kontrolle der normalen motorischen Funktion essentiell und ihre Degeneration führt zu einem striatalen Dopamindefizit, welcher für die beschriebenen motorischen Funktionsstörungen verantwortlich gemacht wird. Die Symptome werden erst manifest, wenn der striatale Dopamingehalt um 70-80 % reduziert ist, ein Phänomen, welches auf die Kompensationsmechanismen der Neurone zurückgeführt wird. Diese beinhalten die gesteigerte Aktivität von verbleibenden striatalen dopaminergen Neuronen und Veränderungen in der Dichte bzw. Sensitivität striataler Dopaminrezeptoren (Dunnett und Björklund, 1999).

Eine richtungsweisende Erkenntnis für das Verständnis der biochemischen Transmissionsketten beim M. Parkinson war die Entdeckung, dass der Dopaminmangelzustand mit einer erhöhten Aktivität der Outputkerne der Basalganglien, dem inneren Segment des *Globus pallidus* und die *Pars reticulata der Substantia nigra (SnPr)*, welche beide durch das inhibitorisch wirkende GABA versorgt werden, vergesellschaftet ist. Diese erhöhte Aktivität wird durch ein Ungleichgewicht erklärt: Dopamin hat entgegengesetzte Effekte auf D1- und D2-Rezeptoren: D1-Rezeptoren haben hemmende, D2-Rezeptoren aktivierende Wirkung auf die Neuronen. An den direkt projizierenden GABA-ergen Neuronen vom Striatum zum inneren Segment des *Globus pallidus* und zur *Pars reticulata der Substantia nigra* dominieren D1-Rezeptoren, an den indirekt projizierenden GABA-ergen Neuronen vom Striatum über das äussere Segment des *Globus pallidus* über den

subthalamischen Kern zum inneren Segment des *Globus pallidus* dominieren die D2-Rezeptoren. Beim Dopaminmangel wird eine Überaktivität des exzitierenden indirekten Pfades und eine reduzierte Aktivität des inhibitorischen direkten Pfades verursacht, es resultiert die bereits erwähnte Überaktivität des inneren Segments des *Globus pallidus* sowie der *Pars reticulata der Substantia nigra*, deren Outputs wiederum durch GABA vermittelt werden. Dieser verstärkte inhibitorische Output wirkt an den Zielkerngebieten, den thalamischen und Hirnstamm-Kernen: Die exzessive thalamische Hemmung führt zu einer Unterdrückung des kortikalen motorischen Systems, resultierend in Akinesie, Rigidität, Tremor, wohingegen die absteigenden Projektionsleitungen zu den lokomotorischen Gebieten des Hirnstamms zu einem abnormalen Gang und Haltung beitragen können (Lang und Lozano 1998). Durch die fehlende inhibitorische Wirkung des Dopamins auf die cholinergen Neurone im *Striatum* resultiert ein Überwiegen cholinergener Neuronenaktivität. Dieses Modell ist jedoch unvollständig und teilweise mangelhaft. Viele Projektionsbahnen und ihre Bedeutung sind noch unklar (Lang AE und Lozano AM 1998).

### 1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie und Pathogenese des IPS ist trotz intensiver Forschung in grossen Teilen immer noch ungeklärt. Einerseits wird die im weitesten Sinne toxinbedingte Genese des Zelluntergangs erforscht, andererseits konnten genetische Mutationen bei Parkinsonerkrankten lokalisiert werden, die wahrscheinlich zu einer gesteigerten Anfälligkeit der dopaminergen Neurone beiträgt. Die bei erstgradigen Verwandten Parkinsonerkrankter erhöhte Lebenszeitwahrscheinlichkeit von ca. 17 %, ebenfalls an M. Parkinson zu erkranken, untermauert diese Hypothese (Lazzarini et al. 1994).

In wenigen Familien, in denen der M. Parkinson nachweislich nach Mendelschen Gesetzen auftritt, konnten verschiedene Genmutationen identifiziert (Polymeropoulos et al. 1996, 1997; Krüger et al. 1998; Kiada et al. 1998; Leroy et al. 1998; Chung KK et al. 2001), ihre Pathomechanismen jedoch noch nicht hinreichend geklärt werden (Spillantini et al. 1997; Mizuno Y et al. 2001; Marx et al. 2003). Es handelt sich jedoch um eine geringe Fallzahl, von einer alleinigen hereditären Genese ist - zumindest beim Großteil des gesamten Patientenguts - nicht auszugehen.

Vielmehr konzentrieren sich die Annahmen auf die Existenz mehrerer interagierender Risikogene, welche möglicherweise zu einem pathologisch veränderten Metabolismus potentiell neurotoxischer Substanzen wie z.B. putative Umwelttoxine führen (Wood N., 1997, Duvoisin RC., 1998). Gegenstand von Studien, die sich mit solchen möglichen Polymorphiegenen befassen, sind die Monoaminoxidasen A und B, Apolipoprotein E, die Superoxid-Dismutase und die Katalase (für die Entgiftung des freien Radikals Superperoxid essentielle Enzyme), die Tyrosinhydroxylase, die N-

Acetyltransferase 2, die Debrisoquine-4-Hydroxylase (CYP2D6) - ein Enzym des für die Entgiftung bedeutenden Cytochrom P 450-Systems (Wood N., 1997) sowie die Dopaminrezeptor- und Dopamintransportergene.

Die Forschungsanstrengungen um die toxinbedingte Genese wurde in den 80 er Jahren durch die Entdeckung des durch 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), bzw. seines aktiven Metaboliten 1-Methyl-4-phenyl-pyridiniums (MPP<sup>+</sup>) verursachten Parkinsonsyndroms bei Drogenabhängigen ausgelöst (s. Kap. 2.1). Als potentiell toxisch wirkende Substanzen werden seither sowohl ubiquitäre Umwelttoxine, freie Radikale als auch endogene Metaboliten erforscht. Entsprechend der meisten derzeitigen Hypothesen scheinen die mitochondriale Dysfunktion und Störungen des oxidativen Metabolismus´ die wichtigsten Komponenten des Pathomechanismus´ zu sein: In verschiedenen dopaminergen und nicht-dopaminergen Hirnarealen sowie in Thrombozyten, Muskelgewebe und Fibroblasten von Patienten mit IPS konnte eine reduzierte Aktivität des mitochondrialen Komplex I (NADH-Q-Reduktase) und des Alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes nachgewiesen werden (Krieger et al. 1992; Mizuno et al. 1989; Schapira et al. 1990; Mizuno et al. 1994). Diese Störungen in der mitochondrialen Atmungskette führen zu einer verringerten ATP-Bereitstellung (Beal 1998), die dopaminerge Zellen für endogene oder exogene toxische Substanzen anfälliger machen könnte. Auf der anderen Seite mehren sich die Hinweise, die die Hypothese des oxidativen Stresses (Fahn & Cohen, 1992) belegen: Der Abbau von Dopamin über die Monoaminoxidase bzw. die nichtenzymatische Autooxidation können zur Bildung zelltoxischer Hydroxylradikale führen (Jenner und Olanow 1998). In postmortem-Studien konnte eine Aktivitätsabnahme der protektiven Enzyme Glutathion-Peroxidase und Katalase (Lange et al. 1992; Fahn und Cohen, 1992; Cadet und Brannock, 1998), eine Abnahme des antioxidativ wirkenden reduzierten Glutathions (Fahn und Cohen, 1992; Cadet und Brannock, 1998), eine erhöhte Lipidperoxidation (Dexter et al. 1989, 1994) sowie Veränderungen des Eisenmetabolismus´ in der *Substantia nigra* mit erhöhten Konzentrationen an Fe<sup>3+</sup>- Ionen (Riederer et al. 1989) von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden (Marsden und Olanow 1998). Das Ungleichgewicht von antioxidativen Mechanismen und Radikalbildung führt zu oxidativem Streß und damit zur Schädigung wichtiger biologischer Moleküle wie DNA, essentiellen zellulären Proteinen und Membranlipiden (Halliwell 1992). Die „multifaktorielle Schwellentheorie“ geht von einem Zusammenwirken toxischer und erblicher Faktoren aus, wonach Patienten mit genetischer Disposition besonders empfindlich auf toxische Faktoren wie freie Radikale oder Umwelttoxine sind. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten diese Hypothese durch Nachweis des gehäuften Vorkommens bestimmter Allele in den Zytochrom-P450-Enzymen, welche für den Abbau potentiell neurotoxischer methylierter Ionen verantwortlich sind, untermauern (Green et al. 1991).

## 1.2 Stand der Forschung

### 1.2.1 Toxizität von MPTP bzw. MPP<sup>+</sup>

In den frühen 80 er Jahren traten bei Drogenabhängigen in Kalifornien akute, irreversible parkinsonähnliche Symptome auf, die zu einer fundamentalen Entdeckung und fortan zur Fokussierung vieler Studien auf endogene und exogene Substanzen als potentiell parkinsonauslösende Mittel führten: Die Symptomatik konnte auf die Kontamination der Drogen mit 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) - einem Meperidinderivat, welches bei der Morphinsynthese als Nebenprodukt entstehen kann - zurückgeführt werden (Davis et al. 1979, Langston et al. 1983). 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) bewirkt bei Menschen sowie Rhesus- und Eichhörnchen-Affen parkinsonähnliche Symptome, welche durch die selektive Degeneration dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra* mit eosinophilen Einschlüssen verursacht wird (Langston et al. 1984, Burns et al. 1983, Forno et al. 1986). Es wird angenommen, dass der neurotoxische Effekt des MPTPs durch 1-Methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP<sup>+</sup>), welches aus MPTP durch extraneuronale Oxidation durch das Enzym Monoaminoxidase B in Gliazellen entsteht, bewirkt wird (Heikkila et al. 1985, Gerlach et al. 1991). Die selektive Vulnerabilität dopaminerger Neurone gegenüber MPTP soll durch die aktive Aufnahme von MPP<sup>+</sup> durch den DAT zustande kommen (Javitch et al. 1984, 1985). Diese Hypothese konnte durch Studien an Mäusen, denen das Dopamintransporterergen fehlt, sowie durch Studien an neuronalen Zelllinien, welche mit dem humanen Dopamintransporter ((h)DAT) transfiziert wurden (Gainetdinov et al. 1997, Kitayama et al. 1992, Pifl et al. 1993, Kitayama et al. 1998, Storch et al. 1999), bestätigt werden.

Die intrazelluläre molekulare Sequenz nach der Aufnahme, welche zum MPP<sup>+</sup>-induzierten Zelltod führt, ist noch nicht vollkommen klar. Laut gängiger Hypothesen wird intrazelluläres MPP<sup>+</sup> innerhalb der inneren Mitochondrienmembran durch energieabhängige Aufnahme akkumuliert (Ramsay und Singer, 1986a), wo es die NADH-Q-Reduktase des mitochondrialen Komplex I inhibiert, dadurch den Elektronentransport unterbricht und so zur intrazellulären ATP-Depletion führt (Nicklas et al. 1985, Storch et al. 1999). Interessanterweise wurde eine solche Abnahme der Energieversorgung auch an einer Vielzahl von Systemen inklusive Mitochondrien des Gehirns (Mizuno et al. 1987a), humanen Thrombozyten (Kutty et al. 1991), isolierten Hepatozyten und Astrozyten (Di Monte et al. 1986b; 1992) gezeigt. Ausserdem wurde eine Reduktion der mitochondrialen Komplex-I-Aktivität in der *Substantia nigra*, in nicht-nigralen Gehirnarealen, Thrombozyten, Muskelgewebe und Fibroblasten von Parkinsonerkrankten beobachtet (Schapira et al. 1990, Mizuno et al. 1989, Krige et al. 1992, Mytilineou et al. 1994).

Darüber hinaus hemmen MPTP und MPP<sup>+</sup> auch die Tyrosinhydroxylase, das Schlüsselenzym der Dopaminbiosynthese (Nagatsu und Hirata 1986; Beal 1998) und führen zur Bildung freier Radikale mit zytotoxischer Wirkung (Mizuno et al. 1998; Beal 1998). Mehrere *in vitro* und *in vivo* Studien zeigten einen Anstieg der Produktion freier Radikale nach Behandlung mit MPTP oder MPP<sup>+</sup> (Akaneya et al. 1995, Rosseti et al. 1988, Chiueh et al. 1992, Tsai und Lee 1998). Dennoch sind die Resultate der Studien, welche sich mit der Lipidperoxidation durch MPTP / MPP<sup>+</sup> oder den Effekten von toxisitätsreduzierenden Antioxidantien befassen, widersprüchlich (Ramsay und Singer, 1992, Di Monte et al. 1986a, 1986b, Perry et al. 1985, Mihatsch et al. 1991).

Die durch MPTP verursachte neuronale Degeneration weist eine große Ähnlichkeit mit der beim M. Parkinson auf, so dass sie ein gutes Modell für den M. Parkinson darstellt (Edwards 1993). Auch MPTP- strukturähnliche Substanzen wie die Isoquinoline und Betacarboline könnten demnach eine Rolle in der Pathogenese des IPS spielen.

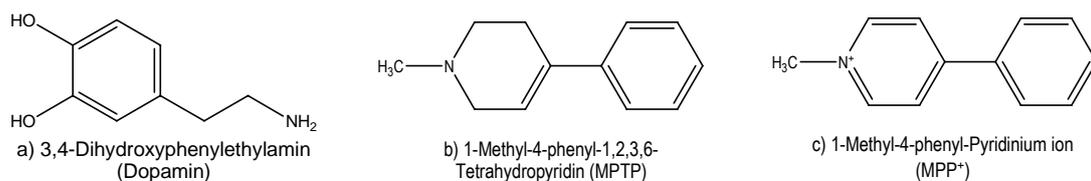


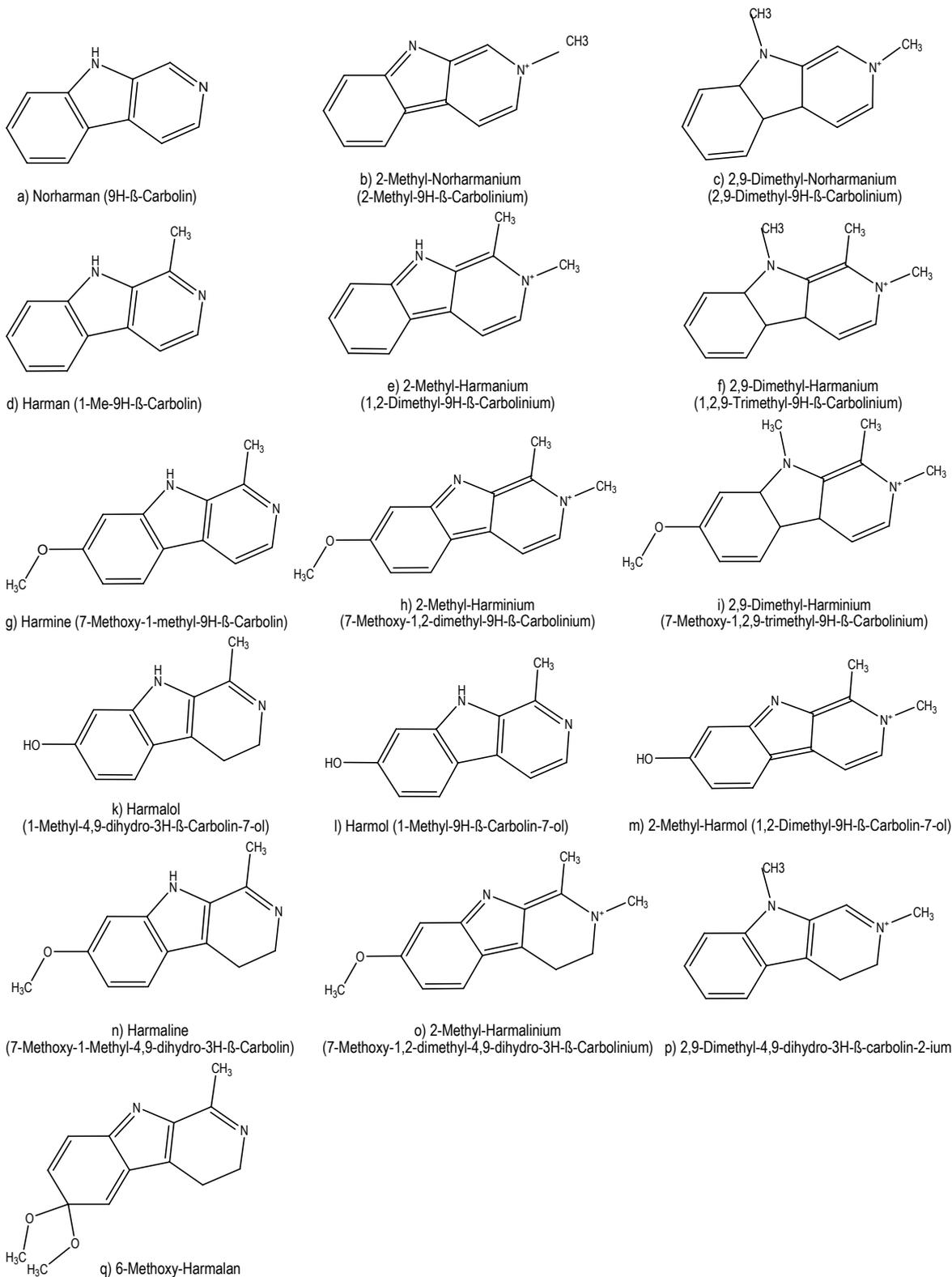
Abb.1: Strukturformeln für a) 3,4-Dihydroxyphenylethylamin (Dopamin), b) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) und c) 1-Methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) (erstellt mit ChemDraw Ultra 8.0, CambridgeSoft Corporation)

## 1.2.2 Toxizität der $\beta$ -Carboline

Betacarboline sind heterozyklische Substanzen, welche das trizyklische 9H-Pyrido-(3,4- $\beta$ )-Indol-Ringsystem als Grundstruktur haben und somit strukturell mit dem MPP<sup>+</sup> verwandt sind. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 2 die in dieser Studie verwendeten  $\beta$ -Carboline aufgelistet. Im Pflanzenreich sind die  $\beta$ -Carboline weit verbreitet. Für den Menschen stellen Lebensmittel die wichtigste Quelle für Betacarboline dar: Sie wurden unter anderem in getrockneten Früchten, alkoholischen Getränken, Essig, Kaffee und Zigarettenrauch sowie in gebratenen und gegrillten Fleisch- und Fischwaren nachgewiesen. Das Vorkommen von Betacarbolinen in Säugern wird sowohl mit der endogenen Aufnahme über die Nahrung als auch mit der endogenen Bildung im Organismus erklärt. Susilo und Rommelspacher belegten bereits 1985 ihre *in vivo* Bildung durch

Kondensation von Indolaminen mit Carbonylverbindungen. Schouten und Bruinvels (1986) haben nachgewiesen, dass Norharman, nicht aber Harman, endogen durch Konversion von Serin in Glycin über die Serin- Hydroxymethyl-Transferase gebildet wird. Die vermehrte Konversion in Glycin soll die Produktion von 5,10-Methylenetetrahydrofolat (CH<sub>2</sub>-FH<sub>4</sub>) aus Tetrahydrofolat steigern; das CH<sub>2</sub>-FH<sub>4</sub> wiederum könnte eine Vorstufe für die Norharmansynthese sein. In Ratten und Meerschwein-Gehirnen wurden Norharman und Harman nachgewiesen (Melchior und Collins, 1982), in den Gehirnen von Guineaschweinen konnte in einer *in vivo*-Studie eine S-Adenosyl-Methionin-abhängige (SAM) N-Methylierung an der 2b- und 9-Indol-Stelle nachgewiesen werden (Matsubara et al. 1992b). Betacarboline kommen auch in menschlichen Geweben, unter anderem menschlichem Gehirngewebe (Matsubara 1993) und Cerebrospinalflüssigkeit vor (Bosin et al. 1989). Insbesondere 2,9-di-methylierten Betacarboline zeigen funktionelle und neurotoxische Eigenschaften analog zu MPP<sup>+</sup>. Signifikant erhöhte Konzentrationen an N-Methylcarbolinium-Ionen im Liquor von Parkinson-Patienten gegenüber Gesunden (Matsubara et al. 1995b) sowie neurotoxische Effekte nach *in vivo* Administration an Ratten (Matsubara et al. 1998a) sprechen für eine Beteiligung der methylierten Betacarboline an der Pathogenese von Morbus Parkinson. Übereinstimmend hiermit zeigten mehrere *in vitro* Studien zytotoxische Wirkung von N-methylierten Betacarbolin-Ionen auf Phäochromozytom-Zellen (PC 12-Zellen) und mesenzephalen Zellkulturen von der Ratte mit partieller Selektivität für dopaminerge Neuronen (Cobuzzi et al. 1994, Matsubara et al. 1998a). Einige 2*N*- und 9*N*-methylierte sowie 2*N*,9*N*-dimethylierte Betacarbolinderivate führen in *in vivo*-Studien zu einer nigrostriatalen Neurodegeneration bei Ratten (Rollema et al. 1988, Neafsey et al. 1989 und 1995, Collins et al. 1992, Matsubara et al. 1998a).

Die Toxizitätsmechanismen sind noch nicht endgültig geklärt, jedoch sprechen die Ergebnisse einiger Studien für eine Inhibition der Komplexe 1 und 2 der mitochondrialen Atmungskette (Fields et al. 1992, Sayre et al. 1991, Albores et al. 1990, Collins et al. 1992, Rollema et al. 1988, Krüger et al. 1993) sowie für eine Inhibition der Monoamino-Oxidase A in Mitochondrien von verschiedenen Säugetier-Geweben (Ho et al. 1973, Buckholtz and Boggan 1977, Hasegawa et al. 1995, Kim et al. 1997).



**Abb.2:** Strukturformeln von a) Norharman b) 2-Methyl-Norharmanium c) 2,9-Dimethyl-Norharmanium d) Harman e) 2-Methyl-Harmanium f) 2,9-Dimethyl-Harmanium g) Harmine h) 2-Methyl-Harminium i) 2,9-Dimethyl-Harminium k) Harmalol l) Harmol m) 2-Methyl-Harmol n) Harmaline o) 2-Methyl-Harmalinium p) 2,9-Dimethyl-4,9-dihydro-3h-β-carbolin-2-ium q) 6-Methoxy-Harmalan (erstellt mit ChemDraw Ultra 8.0, CambridgeSoft Corporation)

### 1.2.3 Toxizität der Isoquinoline

Auch die Isoquinoline sind strukturell mit dem MPP<sup>+</sup> verwandt. Sie sind heterozyklische Substanzen mit einem Benzen- und einem Pyridinring (Abb.3)(Rommelspacher et al. 1991). Bei den Isoquinolinderivaten unterscheidet man zwischen einfachen Tetrahydroisoquinolinen (TIQs) wie z.B. 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin, und TIQs mit Katecholstruktur, wie Salsolinol (1-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4- Tetrahydroisoquinolin) und dessen Derivate. Isoquinolinderivate sind in der Umwelt weit verbreitet, sie kommen in Pflanzen und Nahrungsmitteln (Rommelspacher und Susilo, 1985, Niwa et al. 1989) als auch bei Säugern in Nieren, Leber, Gehirn, Urin, Blut und Liquor vor (Niwa et al. 1991). Einige können die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Niwa et al. 1988). Viele Isoquinolinderivate, wie z.B. TIQ, *N*-Methyl-TIQ und Salsolinol, sind endogene Alkaloide, die im Gehirn hauptsächlich beim nicht-enzymatischen Abbau des Dopamins durch die Pictet-Spengler Kondensation biogener Amine mit Aldehyden entstehen (Collins MA, 1994). *In vivo* werden sie weiter metabolisiert. Das Isoquinolin TIQ z.B. wird durch die *N*-Methyltransferase zum *N*-Methyl-TIQ methyliert, welches wiederum durch die Monoaminoxidase B (MAO B) zum *N*-Methyl-Isoquinolinium-Ion konvertiert wird (Naoi et al. 1989). Salsolinol wurde in humanem Gehirngewebe nachgewiesen (Sjöquist et al. 1982). Da Salsolinol nicht durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert wird (Origitano et al. 1981), wurde ein zusätzlicher enzymatischer Syntheseweg angenommen. Naoi et al. isolierten die *R*-Salsolinol-Synthase aus dem Zytosol von humanem Gehirngewebe, welche *R*-Salsolinol aus Dopamin und Acetaldehyd katalysieren kann (Naoi et al. 1996a). Die Bildung von *N*-Methyl-*R*-Salsolinol durch die *N*-Methyl-Transferase wurde durch eine *in vivo* Mikrodialyse-Untersuchung nachgewiesen (Maruyama et al. 1992). *N*-Methyl-*R*-Salsolinol wird weiter zu 1,2-Dimethyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium-Ion (DMDHIQ<sup>+</sup>) durch enzymatische und nichtenzymatische Oxidation metabolisiert (Maruyama et al. 1995, Naoi et al. 1995b).

Interessanterweise sind im Liquor von Parkinsonerkrankten signifikant erhöhte Spiegel an 1-Benzyl-1,2,3,4-TIQ (Kotake et al. 1995) und *N*-Methyl-*R*-Salsolinol (Maruyama et al. 1996) nachweisbar. Übereinstimmend hiermit ist, dass die Aktivität der neutralen *N*-Me-Transferase, welche die Bildung von *N*-Methyl-*R*-Salsolinol katalysiert, in Lymphozyten von Parkinsonpatienten signifikant erhöht ist im Vergleich zur Kontrolle (Naoi et al. 1998). Im Tierversuch induzierten beide Substanzen parkinsonähnliche Symptome bei Affen, Mäusen und Ratten (Kotake et al. 1996,1995, Naoi et al. 1996b).

Ihre zytotoxische Wirkung bewirken die Isoquinoline hauptsächlich am Mitochondrium: einerseits hemmen mehrere Isoquinolinderivate sowohl die Komplexe 1 und 2 der mitochondrialen Atmungskette als auch die Alpha-Ketoglutaratdehydrogenase (McNaught et al. 1995a, 1995b,

Morikawa et al. 1998). Andererseits führen die Isoquinoline über die Apoptose zum Zelltod. Allerdings kann nach Applikation von *N*-Me-*R*-Salsolinol die Apoptose durch Inhibition des Enzyms Caspase 3 als auch durch Inhibition der MAO B verhindert werden (Akao et al. 1999, Maruyama et al. 2000).

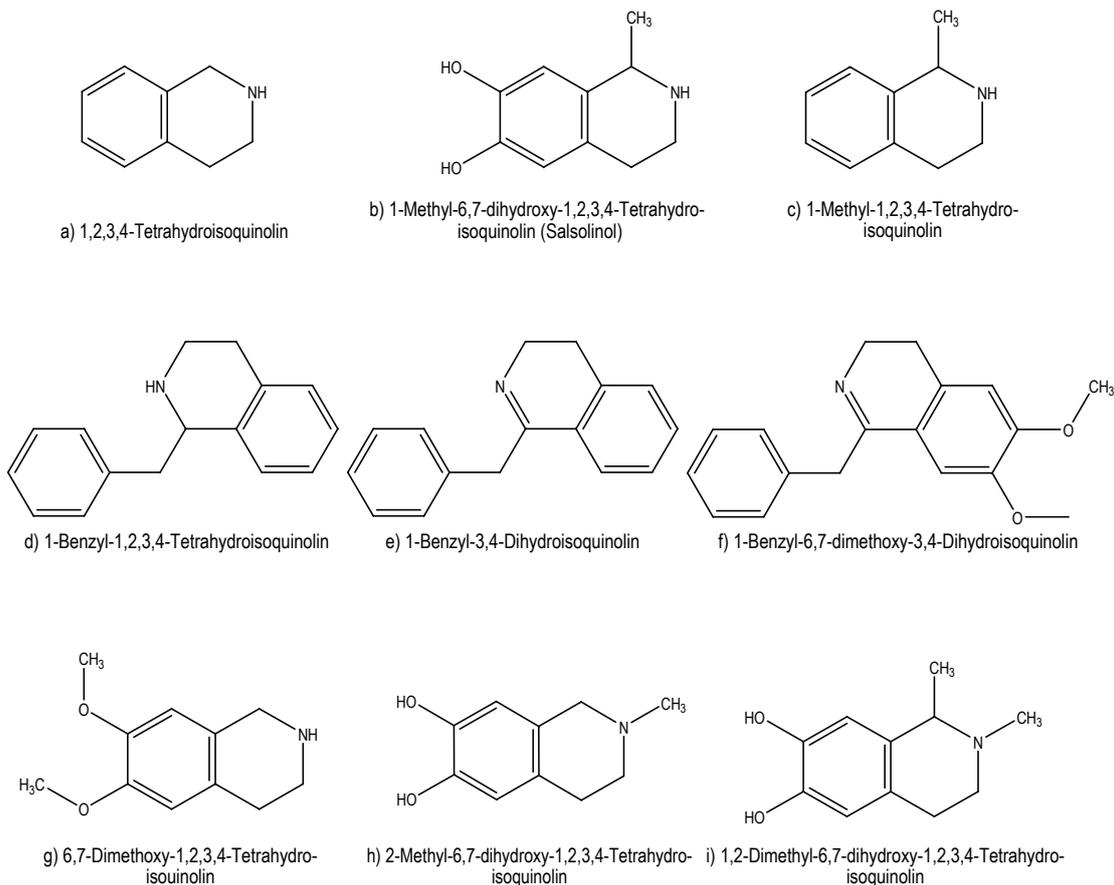


Abb.3: Strukturformeln für: a) 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin b) 1-Methyl-3,4-dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin (Salsolinol) c) 1-Methyl-Tetrahydroisoquinolin d) 1-Benzyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin e) 1-Benzyl-3,4-Dihydroisoquinolin f) 1-Benzyl-6,7-dimethoxy-3,4-Dihydroisoquinolin g) 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin h) 2-Methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin i) 1,2-Dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin (erstellt mit ChemDraw Ultra 8.0, CambridgeSoft Corporation)

## 1.2.4 Der Dopamintransporter

Der Dopamintransporter (DAT) ist für die Terminierung der dopaminergen Neurotransmission verantwortlich, indem er Dopamin (DA) in die präsynaptischen Nervenendigungen wieder aufnimmt (Amara und Kuhar 1993, Giros und Caron 1993). Der DAT ist ein Monoamintransporter, welcher zu den Plasmamembranproteinen aus der Gruppe der Na<sup>+</sup> / Cl<sup>-</sup> - abhängigen Transporter gehört. Er wird ausschließlich in Dopamin synthetisierenden Neuronen bzw. in dopaminerg innervierten Regionen im zentralen Nervensystem exprimiert (Ciliax et al. 1995, Freed et al. 1995).

Beim IPS ist die Zahl der DAT-Bindungsstellen im Rahmen des Verlustes dopaminergener Neuronen reduziert, zusätzlich scheint die Zahl der DATs pro Neuron im Vergleich zu Gesunden ebenfalls reduziert zu sein (Uhl et al. 1994). Die dopaminerge Degeneration beim IPS korreliert streng mit der Expression des DATs (Storch et al. 2004). Damit nimmt der DAT eine wichtige Rolle in der Ätiopathogenese des IPS ein. Die Erforschung des Toxizitätsmechanismus' des MPP<sup>+</sup> wies - wie bereits erwähnt - die zelluläre Aufnahme von MPP<sup>+</sup> durch den DAT nach (s. Kapitel 2.1). Auch gibt es Hinweise, dass bestimmte Betacarboline ihre zytotoxische Wirkung über den DAT bewirken (Drucker et al. 1990, Matsubara 1998b). Weitere Substanzen mit DAT-vermittelter Toxizität sind durchaus denkbar.

## 1.3 Ziel dieser Arbeit

Diese Arbeit soll einen Beitrag zum weiteren Verständnis der Pathomechanismen potentieller dopaminergener Neurotoxine beim idiopathischen Parkinsonsyndrom leisten.

Obwohl die Dopamintransporter-vermittelte Zytotoxizität für einige Betacarbolinderivate beschrieben ist, bleiben die Bedeutung und die Mechanismen für die selektive dopaminerge Toxizität dieser Substanzen unklar. Insbesondere gibt es keine systematische Studie, welche untersucht, ob die Aufnahmekinetik von Betacarbolinen ausreicht, um Konzentrationen zu erreichen, welche vitale Zellstrukturen zerstören.

Aus diesem Grunde verwendeten wir als Modellsystem humane embryonale Nierenzellen (HEK-293-Zellen), welche stabil mit dem humanen Dopamintransporter transfiziert wurden. Anhand dieses *in vitro*- Zellmodells des IPS untersuchte ich die DAT-vermittelte konzentrationsabhängige Zelltoxizität und die semiquantitative DAT-vermittelte intrazelluläre Aufnahme von 21 neutralen und quaternären Betacarbolinderivaten und vier Isoquinolinderivaten (siehe Abbildung 2 und 3).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Alle Experimente wurden an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) und an den mit dem Dopamintransporter transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-(h)DAT-293) durchgeführt.

HEK-293 wurde von American Tissue Type Culture Collection (ATCC CRL 1573; Rockville, USA) erworben. Die HEK-(h)DAT-Zelllinie wurde unter Verwendung der oben genannten Zelllinie mit dem Dopamintransporter stabil transfiziert (Storch et al. 1999, Storch et al. 2002). Die HEK-(h)DAT-Zelllinie exprimiert stabil den humanen Dopamintransporter ((h)DAT) und wurde funktionell und toxikologisch intensiv charakterisiert (Storch et al. 1999).

#### 2.1.2 Chemikalien

Von der *Fa. Gibco*, Eggenstein wurden Modified Eagle's Medium (MEM), Dulbecco's Phosphate Buffered Salts (PBS), Trypsin-EDTA-Lösung, Penicillin / Streptomycin (10000 I.U. / ml; 10000 µg / ml) (P / S) und Geneticin Sulphate 418 (G418) bezogen. 1-Methyl-4-phenyl-pyridinium-Ion (MPP<sup>+</sup>) wurde von der *Fa. RBI*, Natick, USA geliefert. Fetales Kälberserum (Foetal Calf Serum; FCS) wurde von *PAA Laboratories GmbH*, Linz, Österreich und Biochrom-Alphakit-Lösung 2 für die MTT-Methode von der *Fa. Biochrom seromed*, Berlin bezogen.

1-[2-[bis(4-fluorophenyl)metoxy]ethyl]-4-[3-phenylpropyl]Piperacin Dihydrochlorid (GBR 12909) stammte von der *Fa. Tocris*, Bristol, UK, Dimethylsulfoxid (DMSO) von der *Fa. J.T. Baker*, Deventer, Holland. Der Lieferant für die Trypan-Blau-Lösung (0,4 %), Borat-Decahydrat, Poly-L-Lysin, Harmalol HCl, Harmane HCl, Harmine HCl, Harmaline HCl, Harmane-1,2,3,4-Tetrahydro-3-carboxylic acid, Norharman HCl, 1,2,3,4-Tetrahydro-9h-pyrido (3,4-b)indol, 6-Methoxy-1,2,3,4-Tetrahydro-9h-pyrido (3,4-b)indol, Harmol HCl, Tetrahydroisoquinolin, 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin HCl, 1-Benzyl-6,7-dimethoxy-3,4-Dihydroisoquinolin, 1-Benzyl-3,4-Dihydroisoquinolin HCl, 1-Benzyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin, 1,2-Dimethyl-9h-β-carbolin-2-ium Iodid, 2-Propyl-9h-β-carbolin-2-ium Hydroxid, 2-Propyl-9h-β-carbolin-2-ium Iodid, Harmalol hydrobromid und 2,9-Dimethyl-4,9-dihydro-3h-β-carbolin-2-ium Iodid war die *Fa. Sigma-Aldrich*, Steinheim.

Für die folgenden Substanzen, die uns freundlicherweise überlassen wurden, möchte ich mich herzlich bedanken: Für 2,9-Dimethyl-Norharman Iodid, 2-Methyl-Harmaline Iodid, 2-Methyl-Isoharmaline Iodid, 2-Methyl-Harmine base, 2-Methyl-Harmane Iodid, 2,9-Dimethyl-Harmine Iodid und 2,9-Dimethyl-Harmane Iodid bei Herrn M. A. Collins (Department of Cell Biology, Neurobiology and Anatomy, Loyola University Stritch School of Medicine, Maywood, Illinois, USA); für 2-Methyl-Norharman Iodid, 2,9-Dimethyl-Norharman Iodid, 2-Methyl-Harmane Iodid, 2,9-Dimethyl-Harmane Iodid, 6-Methoxy-Harmalan, Harmol HCl bei Kazuo Matsubara (Department of Hospital Pharmacy and Pharmacology, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan).

Ebenso bedanke ich mich bei Debra A. Gearhart (Department of Neuroscience, Loyola University, Chicago, Illinois, USA) für das 2-Methyl-Norharman Chlorid und das 2,9-Dimethyl-Norharman Chlorid. Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma *Sigma*, *Deisenhofen* oder *Merck*, *Darmstadt* geliefert und waren von *per analyse*-Qualität.

### 2.1.3 Geräte

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien werden aus Gründen der Übersicht unter den jeweiligen Methoden bei der Beschreibung ihrer Verwendung aufgeführt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die Arbeitsvorgänge mit den Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt: Unter der Werkbank (*Fa. Heraeus Instruments*, Hanau) wurden steriles Einwegmaterial (*Fa. Greiner*, Nürtingen) bzw. hitzesterilisiertes oder autoklaviertes Glas- und Plastikmaterial (*Fa. Eppendorf*, Hamburg) verwendet.

#### 2.2.1.1 Kultivierung der HEK-293- bzw. HEK-(h)DAT-Zelllinie

Beide Zelllinien wurden im Inkubator (CO<sub>2</sub>-Auto-Zero der *Fa. Heraeus*, Hanau) bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Die Zellmedien setzten sich folgendermaßen zusammen:

### Lösungen:

HEK-293-Medium:

- MEM (90 %)
- FCS, inaktiviert (10 %)
- P / S (100 I.U. bzw. 100 µg/ ml Zellmedium)

HEK-(h)DAT-293-Medium:

- MEM (90 %)
- FCS, inaktiviert (10 %)
- G418 (400 µg/ ml Zellmedium)

Die Inaktivierung des FCS zur Ausschaltung unerwünschter Enzym- und Komplementaktivitäten erfolgt durch 30-minütige Erwärmung im Wasserbad auf 56° C.

Bei der Kultivierung der Zelllinien wurde angestrebt, sie in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Dazu beobachtete man die in 50 ml-Gewebekulturflaschen (*Fa. Greiner*, Nürtingen) wachsenden adhärennten Zelllinien regelmäßig unter dem Mikroskop (*Fa. Zeiss*, Jena) auf Form und Dichte. Sobald der Zellrasen subkonfluent war, wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Zellmedium dekantiert, der Zellrasen mit ca. 5 ml PBS gespült und anschließend mit ca. 1-2 ml Trypsin für ca. 2 Minuten angelöst. Mit frischem Medium wurden die Zellen dann vollständig vom Boden abgelöst, suspendiert und - abhängig vom vorgesehenen Versuchstermin - in unterschiedlicher Verdünnung in neue Kulturflaschen überführt.

Für die Zellzählung wurde die Zellsuspension 1:2 mit 0,4 %-iger Trypanblaulösung zur Markierung abgestorbener Zellen verdünnt. Die Anzahl lebender, nicht angefarbter Zellen wurde in einer Neubauer- Zählkammer unter zur Hilfenahme eines Handstückzählers (beide Geräte von der *Fa. Bender und Hobein*, Neu-Ulm) bestimmt.

#### 2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese zuerst in einer Dichte von  $2-4 \times 10^6$  Zellen/ ml in MEM 10 aufgenommen und auf Eis gestellt.

## Lösungen:

### MEM 10:

- MEM (90 %)
- FCS, inaktiviert (10 %)

### Einfriermedium:

- DMSO (20 %)
- MEM 10 (30 %)
- FCS, inaktiviert (50 %)

In die vorher bei - 80° C gekühlten Einfrierröhrchen wurde zunächst jeweils 0,5 ml 0° C kaltes Einfriermedium vorgelegt und dann mit weiteren 0,5 ml der gekühlten Zellsuspension aufgefüllt. Gut verschlossen wurden sie dann in einer Styroporkiste über Nacht bei - 80° C gelagert. Die Isolierung der Röhrchen und somit die verlangsamte Abkühlung verhinderte die Bildung intrazellulärer Kristalle. Am folgenden Tag wurden die Röhrchen dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und im 37° C warmen Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde unter Schütteln mit 5 ml MEM 10 langsam versetzt und dann bei 1000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Pellet wurde in 6 ml Zellmedium suspendiert, in Kulturflaschen überführt und bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um vom Einfriermedium rührende Rückstände herauszuwaschen.

### 2.2.1.3 MTT- Färbung

Die Messung des Zellüberlebens erfolgte durch die MTT-Methode. Die MTT-Färbung macht sich die Tatsache zu Nutze, daß das schwach gelbe MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazolium) ausschliesslich von lebenden Zellen ins Zellinnere aufgenommen und der Tetrazoliumring durch mitochondriale Dehydrogenasen aufgebrochen wird (Mosmann, 1983). Das daraus entstehende dunkelblaue Formazan ist alkohollöslich, und die Intensität einer solchen alkoholischen Formazanlösung, die photometrisch messbar ist, ist proportional zur Zahl lebender Zellen.

### Lösung:

HCl-Isopropanollösung:

0,04 N HCl in Isopropanol

In den Toxizitätsversuchen wurde das MTT in die mit Zellen bewachsenen Vertiefungen pipettiert (30 µl MTT auf 250 µl Zellsuspension). Nach einstündiger Inkubation wurde der Überstand dekantiert und die Platte bei Raumtemperatur getrocknet. Die Messung erfolgte dann nach Zugabe von jeweils 100 µl HCl-Isopropanollösung. Im Immuno Reader (BioluminTM960 von *Molecular Dynamics*, Krefeld, angeschlossen an einen Performa 5400 / 180-Computer der *Fa. Apple Macintosh*, Cupertino/ Kalifornien) wurde die Platte computergesteuert 8 Minuten lang geschüttelt, die photometrische Auswertung erfolgte anschließend bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 570$  nm und einer Referenzwellenlänge von  $\lambda_0 = 630$  nm. Vertiefungen ohne Zellen wurden als Nullwerte benutzt und von jedem Wert als Hintergrund subtrahiert. Die Meßwerte wurden in Prozent der unbehandelten Kontrolle ausgedrückt.

## 2.2.2 Durchführung und Messung der Versuche

### 2.2.2.1 Versuche zu konzentrationsabhängigen Effekten aufs Zellüberleben

Die zellinien-spezifische Zytotoxizität der verschiedenen Substanzen wurde in Abhängigkeit von ihrer Konzentration bestimmt.

Hierzu wurden die Zellen in einer Zellzahl von  $1,25 \times 10^4$  pro Vertiefung (200 µl/ Vertiefung) auf 96er-well-Platten ausgesetzt und 48 h lang inkubiert.

Bedingt durch die Löslichkeit der Substanzen in DMSO unterschieden sich die Konzentrationen der Stammlösungen. Zu den Substanzen mit der geringen Löslichkeit C (mind. 30 mM) gehört Harmine, zu der Löslichkeit B (90 mM): Harmane und 2-Me-Harminium. Alle anderen Substanzen gehörten der Gruppe A (300 mM) an.

Stammlösungen:

A	300 mM in DMSO
B	90 mM in DMSO
C	30 mM in DMSO

Sämtliche Stammlösungen wurden nach Sterilfiltration zunächst 1:60 und anschließend seriell 1:3,333 mit MEM bis auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Dann wurden die Versuchslösungen auf die vorbehandelten Platten aufgetragen: pro Konzentration und Zelllinie wurden jeweils drei Vertiefungen mit 50 µl Versuchslösung gefüllt. Ebenso wurden zur Kontrolle bei beiden Zelllinien drei Vertiefungen mit toxfreiem MEM behandelt. Vorversuche hatten ergeben, dass bei dieser Verdünnung von 1 ‰ DMSO in toxfreier Lösung kein Zellsterben verursacht wird. Nach 72 stündiger Inkubation wurde anhand des MTT-Tests das Zellüberleben quantitativ gemessen. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

2.2.2.2 Versuche zur intrazellulären Toxinaufnahme / Uptake-Versuche

Um die über den Dopamintransporter aufgenommene intrazelluläre Konzentration der  $\beta$ -Carbolin-Derivate zu messen, wurde die starke Autofluoreszenz der Pyrido-Indole (Spenser 1956) bei Exzitationswellenlängen von 280 nm und Emissionswellenlängen von 450 nm ausgenutzt.

Lösungen:

PLL-Lösung:

100 mg Poly-L-Lysin hydrobromid in  
1000 ml 0,1 M Boratpuffer (Borat-Decahydrat in destilliertem H<sub>2</sub>O), pH 8,4

Pufferlösung, pH 7,4:

1 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 M CaCl<sub>2</sub> in PBS

Lysierungs-Lösung:

0,1 N HCl  
2 mM EDTA in H<sub>2</sub>O

Es wurden zunächst 48er-well Platten mit PLL (Poly-L-Lysin) beschichtet. Durch die Beschichtung wird eine bessere Adhäsion der Zellen bewirkt, so dass die notwendigen Waschungen eine möglichst geringe Ablösung der Zellen vom Grund verursachen. Pro Well wurden 100 µl PLL-Lösung aufgetragen und für 24 h inkubiert. Überschüssiges PLL wurde durch zweimaliges Waschen mit je 200 µl destilliertem Wasser entfernt, durch Waschen mit 500 µl HBSS wurde eine Neutralisierung erreicht. Nach Auffüllen mit weiteren 500 µl HBSS konnten die so präparierten Zellplatten einige Tage bis zum Versuch im Inkubator aufbewahrt werden. Für die Versuche wurde lediglich das HBSS abgesaugt.

Pro Well wurden 100.000 Zellen (500 µl Zellsuspension) ausgesetzt. Nach 48 h wurde der Versuch durchgeführt, die Zellen sind dann zu 90 % konfluent, die Zellzahl betrug zwischen 0,8 und 1,5 Millionen/Well.

Nach Vorkühlung auf Eis wurde jedes Well mit 1 ml kalter (4-10° C) Pufferlösung gespült und mit weiteren 0,5 ml PLL-Lösung für 15 min. versetzt, bevor sie wieder abgesaugt wurde.

Je 100 µl der verschiedenen, in Pufferlösung gelösten Toxinkonzentrationen zwischen 0 und 500 µM wurden in jedes Well gegeben und für 10 min. bei 37 Grad inkubiert. Vorversuche mit 100 µM Toxinlösungen von Norharman, 2-Methyl-Norharmanium und 2,9-Dimethyl-Norharmanium mit 0-60 minütiger Inkubation hatten für das Intervall von 0-10 Minuten eine lineare intrazelluläre Aufnahme ergeben.

Die Aufnahme wurde durch Aspiration der Substanzlösung und dreimaligem Spülen mit 500 µl kalter Pufferlösung gestoppt. Der DAT-unabhängige (unspezifische) Transport wurde in parallel durchgeführten Versuchen mit 15-minütiger Vorinkubation mit 50 µl einer 6 µM GBR12909-Pufferlösung und anschließender Zugabe von 50 µl der doppelt konzentrierten Toxinkonzentrationen (0-1000 µM) bestimmt und als Hintergrund abgezogen.

Nach Zugabe von 100 µl Lysierungslösung wurde die Platte für 1 h auf dem Plattenschüttler behandelt und die Zellen dann mit einer Pipettenspitze vom Grund gelöst. Die Lysierungslösung ist sauer, weil die Toxinfluoreszenz in saurem Milieu am stärksten ausgeprägt ist; sie enthält EDTA zur Chelatbildung von Metallen, da eine Verunreinigung durch Metalle die Fluoreszenz unterdrücken („quenchen“) würde. Die Platten wurden bei - 80° C für mind. 30 min. eingefroren und im Anschluss unter Schütteln bei Raumtemperatur wieder aufgetaut.

Dieser Einfriervorgang zur besseren Zellyse wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Danach wurde jeder Wellinhalt mit einer neuen Pipette durch 3-5 maliges auf- und absaugen gut suspendiert und auf eine schwarze Mikroplatte aus Quarz mit transparentem Boden (96er well, Hellma, Müllheim/Baden) aufgetragen. Die Hintergrund-Fluoreszenz aufgrund der Zellen, des Lysepuffers und des Quarzes wurde an Wells, welche mit Lysepuffer gefüllt waren, gemessen und

als Hintergrund von den Messwerten subtrahiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit einem Exzitationsfilter von 280 nm und einem Emissionsfilter von 452 nm (Bandweite jeweils +/- 20 nm). Um die absolute intrazelluläre Konzentration zu erhalten, wurden die Werte der Fluoreszenzmessung mit Messwerten bekannter Konzentrationen der jeweiligen in Lysierungslösung gelösten Substanzen verglichen. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

### 2.2.3 Statistische Auswertung der Messergebnisse

Die halbmaximal toxischen Konzentrationen  $TC_{50\ wt / DAT}$  wurden durch nicht-lineare Regressionsanalyse mittels Kurveniteration unter Zuhilfenahme des Programms Origin (Version 5.0; MicroCal Software) nach der mathematischen Formel  $y = A1 + (A2 - A1) / [1 + 10^{-(\log B - x) \cdot n_H}]$  berechnet. A1 entspricht dem Wert, bei dem die Konzentration sich dem Null-Wert annähert, A2 ist der Wert, bei dem die Konzentration sich dem Maximum annähert. B entspricht der Konzentration, bei der eine 50-prozentige Reduktion der Zellzahl erzielt wird ( $TC_{50\ wt / DAT}$ ).  $n_H$  ist der Hill-Koeffizient. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte und Standardabweichung (SEM) angegeben. Mit dem Student's unpaired t-Test wurden die  $TC_{50\ wt / DAT}$ -Werte miteinander verglichen.  $I_{DAT}$  wurde als der Quotient von  $TC_{50\ wt / TC_{50\ DAT}}$  definiert und gibt die DAT-vermittelte Toxizität an.

Die kinetischen Parameter Michaeliskonstante ( $K_m$ ), maximale Aufnahmegeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) und Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) der jeweiligen Substanzen wurden ebenfalls durch nicht-lineare Regressionsanalyse der Uptake-Kurven berechnet.

## 3. Ergebnisse

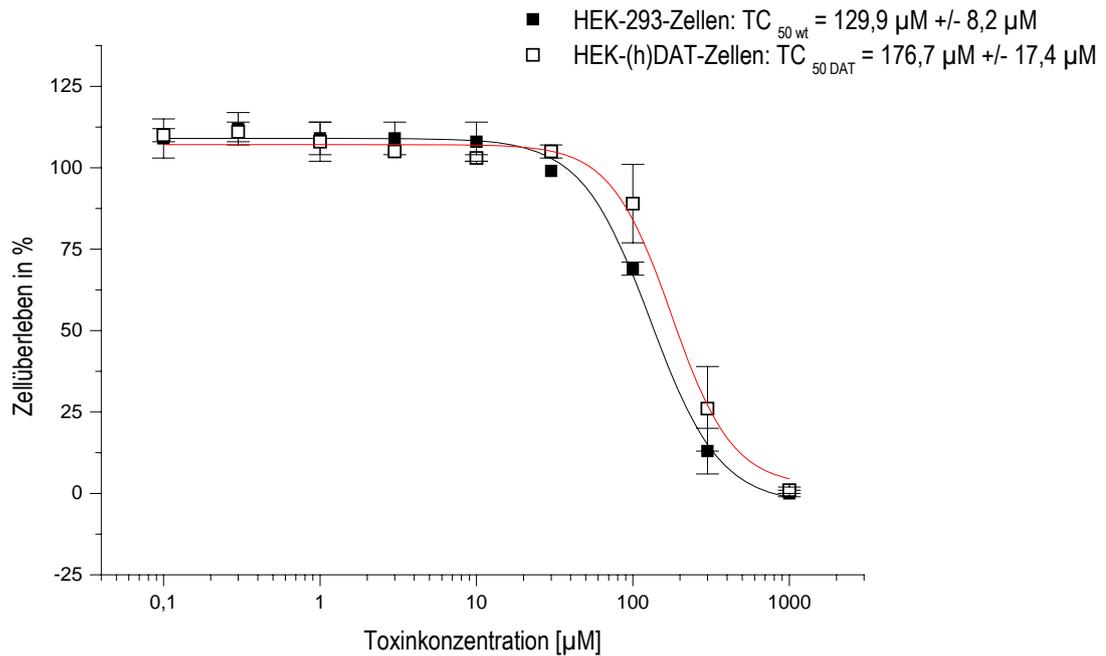
### 3.1 Konzentrationsabhängige Effekte der $\beta$ -Carboline auf das Zellüberleben

Das konzentrationsabhängige Zellüberleben von HEK-293-Zellen und HEK-(h)DAT-293-Zellen nach 72 h Inkubation mit der jeweiligen Substanz wurde mit der MTT-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle ermittelt. Dabei geben die  $TC_{50\ wt}$ , bzw.  $TC_{50\ DAT}$ -Werte die Konzentration (in  $\mu\text{M}$ ) an, bei der es zu einem fünfzig-prozentigen Zelluntergang der HEK-293- bzw. HEK-(h)DAT-293-Zelllinie kommt, gemessen mit der MTT-Methode nach 72 h Inkubation.  $I_{DAT}$  ist definiert als der Quotient  $TC_{50\ wt} / TC_{50\ DAT}$  und stellt einen Parameter für die DAT-abhängige Toxizität dar.

#### 3.1.1 Norharman und seine Derivate

##### Norharman

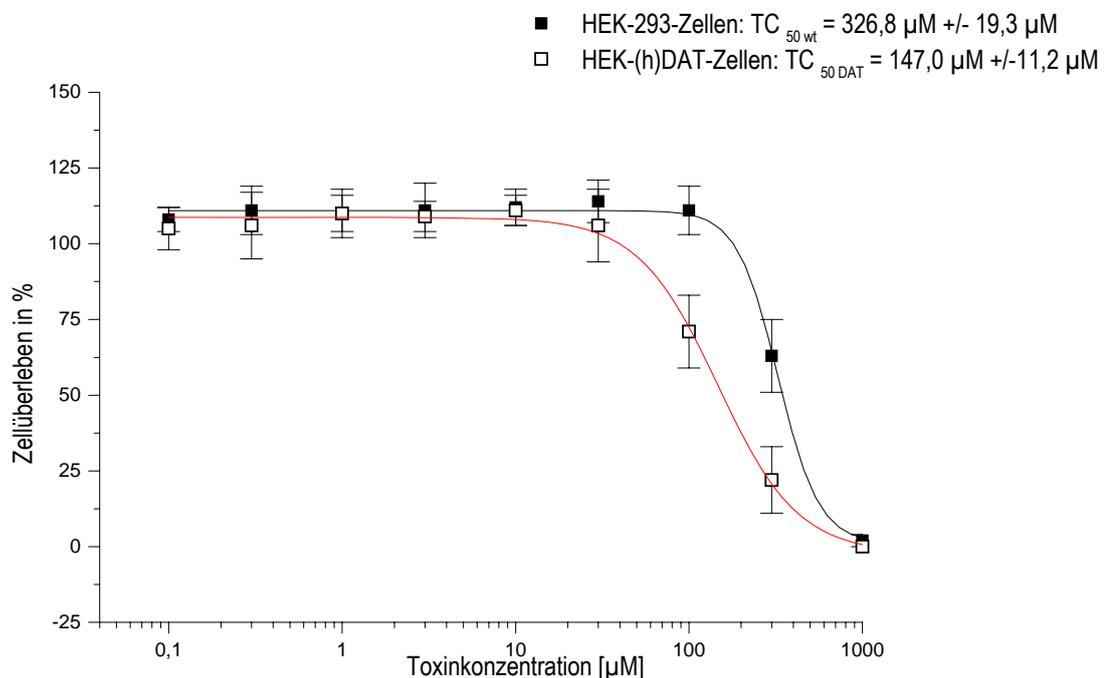
Nach 72 h Inkubation mit Norharman fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien ohne signifikanten Unterschied statt (Abb.1). Der  $TC_{50}$ -Wert bei der HEK-293-Zelllinie ( $TC_{50\ wt}$ ) betrug  $129,9 \pm 8,2 \mu\text{M}$ , der von der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie ( $TC_{50\ DAT}$ ) betrug  $176,7 \pm 17,4 \mu\text{M}$ .  $I_{DAT} = 1,3$ . Es konnte also eine allgemeine Zytotoxizität von Norharman, aber keine DAT-vermittelte Toxizität gezeigt werden.



**Abbildung 1:** Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis des Zellüberlebens der HEK-293-Zelllinie (geschlossene Symbole) und HEK-(h)DAT-Zelllinie (offene Symbole) nach 72 h Inkubation mit Norharman. Das Zellüberleben wurde mit der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $TC_{50\text{ wt}}$  bzw.  $TC_{50\text{ DAT}}$  sind die halbmaximalen Toxizitätskonzentrationen der HEK-293-wt- (humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“) wildtype bzw. HEK-(h)DAT-293- (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters)-Zelllinie. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es konnte bei keiner Toxinkonzentration eine statistisch signifikante Differenz zwischen den beiden Zelllinien gefunden werden.

## 2-Methyl-Norharmanium

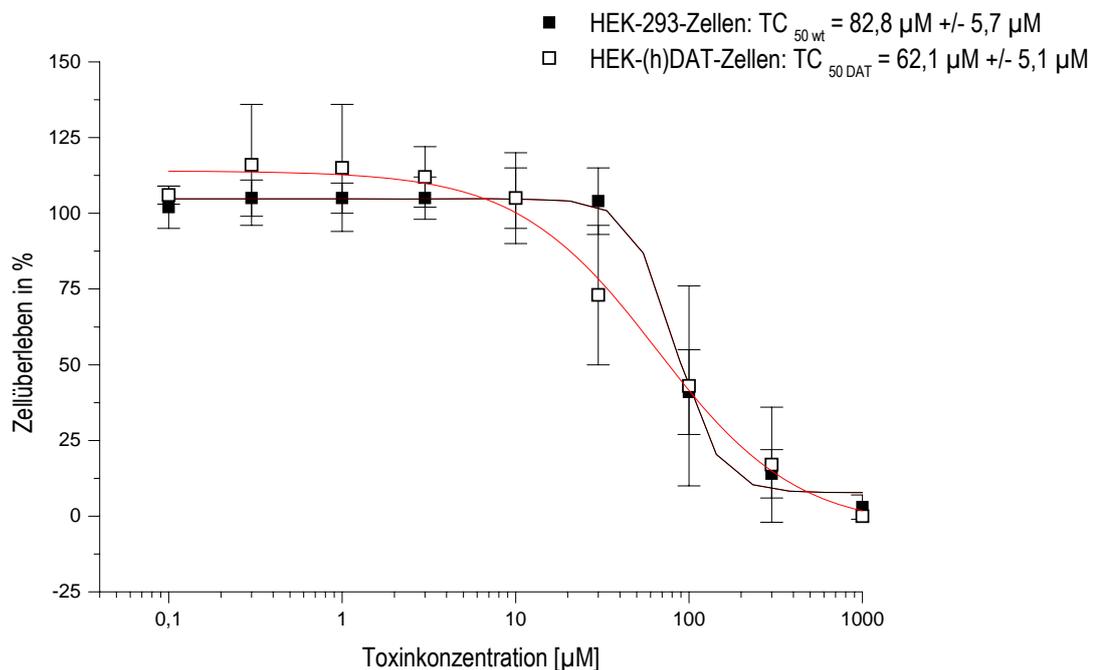
Nach 72 h Inkubation mit 2-Methyl-Norharmanium fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien statt (Abb.2). Der  $TC_{50}$ -Wert bei der HEK-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ wt}}$ ) betrug  $326,8 \pm 19,3 \mu\text{M}$ , der von der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ DAT}}$ ) betrug  $147,0 \pm 11,2 \mu\text{M}$ . Die  $IC_{50}$ -Werte der beiden Zelllinien unterschieden sich signifikant voneinander (\*\* $p < 0,01$ ). Der  $I_{\text{DAT}}$  betrug 2,2. Zusätzlich zur allgemeinen Zytotoxizität von 2-Methyl-Norharman konnte eine DAT-vermittelte Toxizität bei Konzentrationen von 100 und 300  $\mu\text{M}$  gezeigt werden.



**Abbildung 2:** Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis des Zellüberlebens der HEK-293-Zelllinie (geschlossene Symbole) und HEK-(h)DAT-Zelllinie (offene Symbole) nach 72 h Inkubation mit 2-Methyl-Norharmanium. Das Zellüberleben wurde mit der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $TC_{50\text{ wt}}$  bzw.  $TC_{50\text{ DAT}}$  sind die halbmaximalen Toxizitätskonzentrationen der HEK-293-wt- (humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“) wildtype bzw. HEK-(h)DAT-293- (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters)-Zelllinie. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Bei Toxinkonzentrationen von 100 und 300  $\mu\text{M}$  konnte eine statistisch signifikante Differenz ( $p < 0,05$ ) des Zellüberlebens zwischen den beiden Zelllinien gefunden werden.

## 2,9-Dimethyl-Norharmanium

Nach 72 h Inkubation mit 2,9-Dimethyl-Norharmanium fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien mit signifikantem Unterschied statt (Abb.3). Der  $TC_{50}$ -Wert bei der HEK-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ wt}}$ ) betrug  $82,8 \pm 5,7 \mu\text{M}$ , der von der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ DAT}}$ ) betrug  $62,1 \mu\text{M} \pm 5,1 \mu\text{M}$ . Die  $TC_{50}$ -Werte der beiden Zelllinien unterschieden sich signifikant voneinander ( $*p < 0,05$ ). Der  $I_{\text{DAT}}$  betrug 1,3. Zusätzlich zur allgemeinen Zytotoxizität von 2,9-Dimethyl-Norharmanium konnte also eine DAT-vermittelte Toxizität gezeigt werden.



**Abbildung 3:** Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis des Zellüberlebens der HEK-293-Zelllinie (geschlossene Symbole) und HEK-(h)DAT-Zelllinie (offene Symbole) nach 72 h Inkubation mit 2,9-Dimethyl-Norharmanium. Das Zellüberleben wurde mit der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $TC_{50\text{ wt}}$  bzw.  $TC_{50\text{ DAT}}$  sind die halbmaximalen Toxizitätskonzentrationen der HEK-293-wt- („human embryonal kidney cells“) wildtype bzw. HEK-(h)DAT-293- (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters)-Zelllinie. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

### 3.1.2 Harmine und seine Derivate

#### Harmine

Nach 72 h Inkubation mit Harmine fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien ohne signifikanten Unterschied statt (Abb.4). Der  $TC_{50}$ -Wert bei der HEK-293-Zelllinie ( $TC_{50 wt}$ ) betrug  $36,3 \pm 8,9 \mu M$ , der von der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie ( $TC_{50 DAT}$ ) betrug  $37,4 \pm 9,2 \mu M$ .  $I_{DAT}=1,0$ . Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der  $TC_{50}$ -Werte.

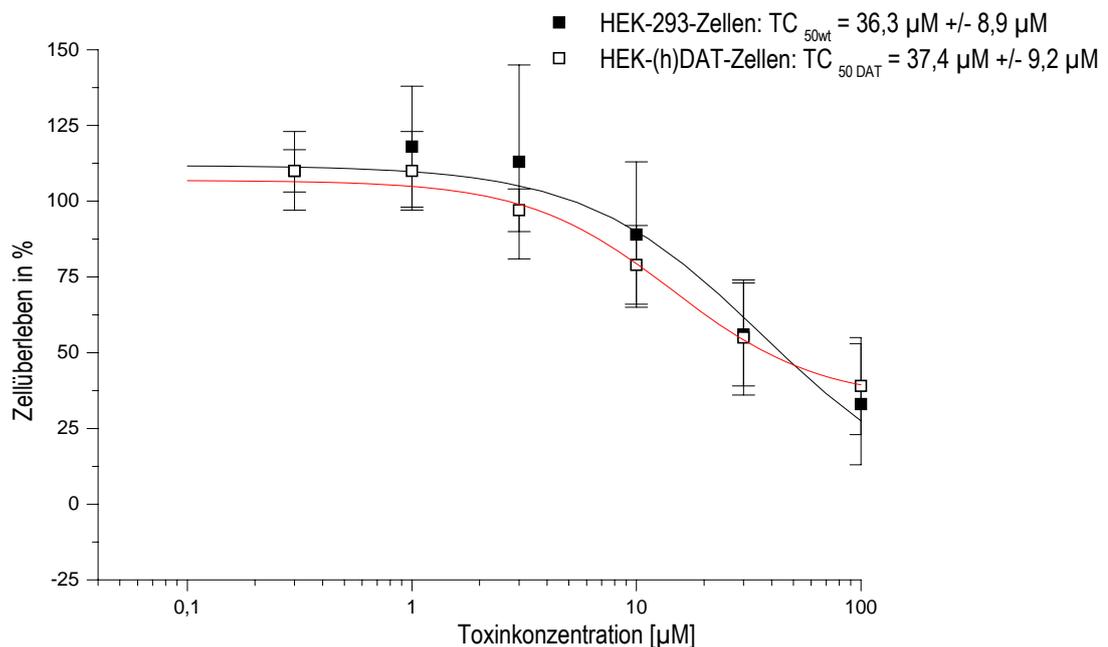
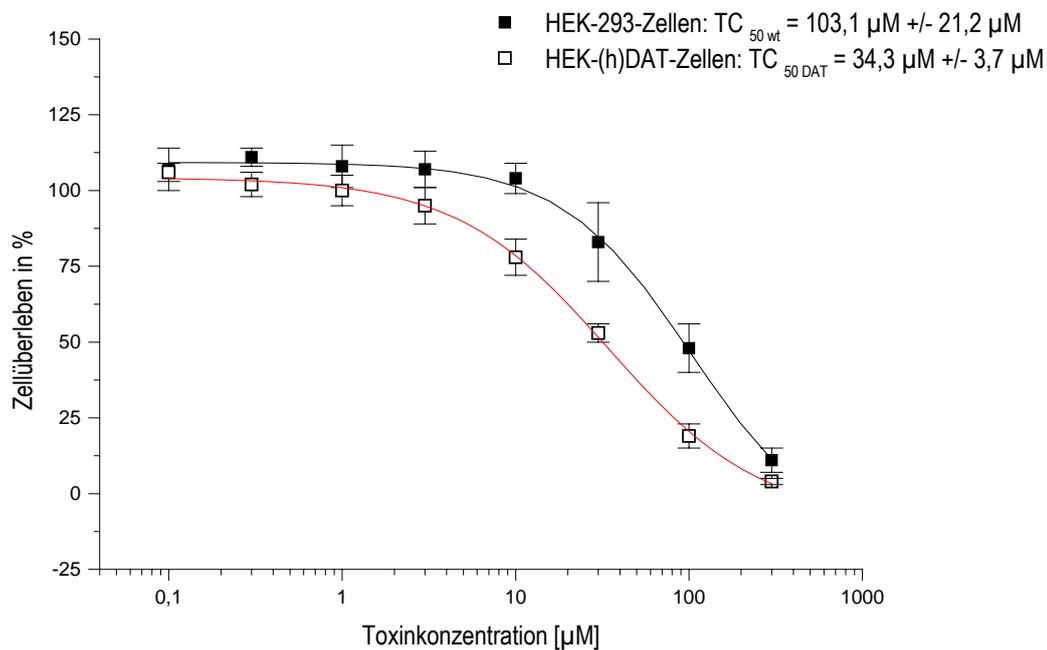


Abbildung 4: Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis des Zellüberlebens der HEK-293-Zelllinie (geschlossene Symbole) und HEK-(h)DAT-Zelllinie (offene Symbole) nach 72 h Inkubation mit Harmine. Das Zellüberleben wurde mit der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $TC_{50 wt}$  bzw.  $TC_{50 DAT}$  sind die halbmaximalen Toxizitätskonzentrationen der HEK-293-wt- (humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“) wildtype bzw. HEK-(h)DAT-293- (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters)-Zelllinie. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es konnte bei keiner Toxinkonzentration eine statistisch signifikante Differenz zwischen den beiden Zelllinien gefunden werden.

## 2- Methyl-Harminium

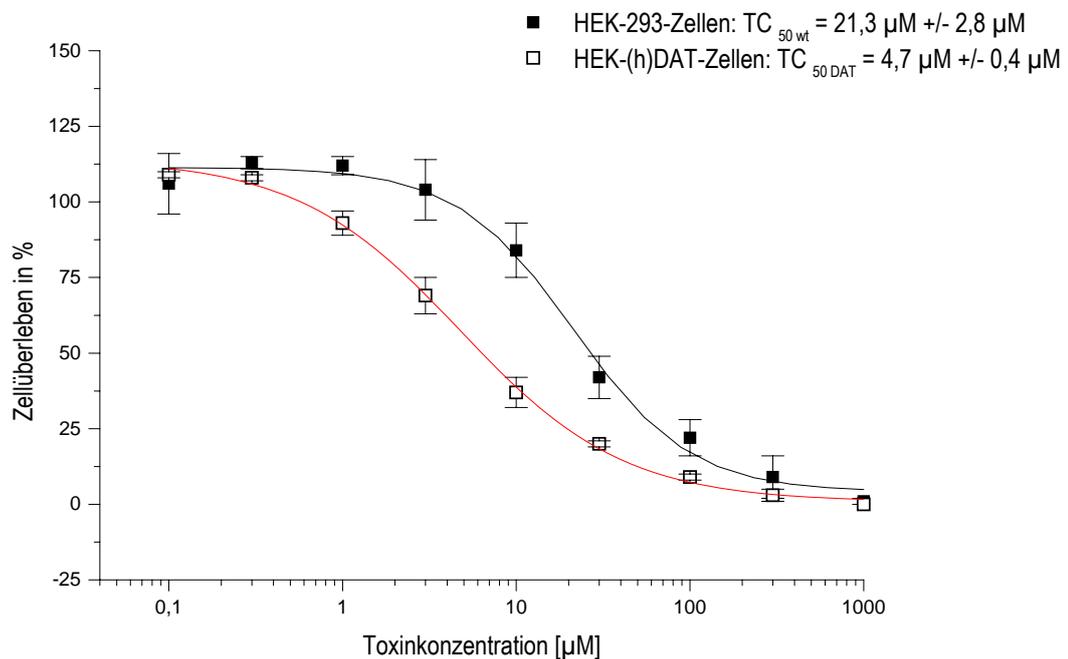
Nach 72 h Inkubation mit 2-Methyl-Harminium fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien statt (Abb.5). Der  $TC_{50}$ - Wert bei der HEK-293-Zelllinie ( $TC_{50\ wt}$ ) betrug  $103,1 \pm 21,2 \mu\text{M}$ , der von der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie ( $TC_{50\ DAT}$ ) betrug  $34,3 \pm 3,7 \mu\text{M}$ . Die  $TC_{50}$ - Werte der beiden Zelllinien unterscheiden sich signifikant voneinander ( $*p < 0,05$ ).  $I_{DAT} = 3,0$ . Zusätzlich zur allgemeinen Zytotoxizität von 2-Methyl-Harminium konnte eine DAT-vermittelte Toxizität bei Konzentrationen von 10, 30 und 100  $\mu\text{M}$  gezeigt werden.



**Abbildung 5:** Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis des Zellüberlebens der HEK-293-Zelllinie (geschlossene Symbole) und HEK-(h)DAT-Zelllinie (offene Symbole) nach 72 h Inkubation mit 2-Methyl-Harminium. Das Zellüberleben wurde mit der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $TC_{50\ wt}$  bzw.  $TC_{50\ DAT}$  sind die halbmaximalen Toxizitätskonzentrationen der HEK-293-wt- (humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“) wildtype bzw. HEK-(h)DAT-293- (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters)-Zelllinie. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Bei Toxinkonzentrationen von 10, 30 und 100  $\mu\text{M}$  konnte eine statistisch signifikante Differenz des Zellüberlebens ( $p < 0,05$ ) zwischen den beiden Zelllinien gefunden werden.

## 2,9-Dimethyl-Harminium

Nach 72 h Inkubation mit 2,9- Dimethyl-Harminium fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien statt (Abb.6). Der  $TC_{50}$ - Wert bei der HEK-293-Zelllinie ( $TC_{50\ wt}$ ) betrug  $21,3 \pm 2,8 \mu\text{M}$ , der von der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie ( $TC_{50\ DAT}$ ) betrug  $4,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$ . Die  $TC_{50}$ - Werte der beiden Zelllinien unterscheiden sich signifikant voneinander (\*\* $p < 0,01$ ).  $I_{DAT} = 4,5$ . Zusätzlich zur allgemeinen Zytotoxizität von 2,9-Dimethyl-Harminium konnte eine DAT-vermittelte Toxizität bei Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{M}$  gezeigt werden.

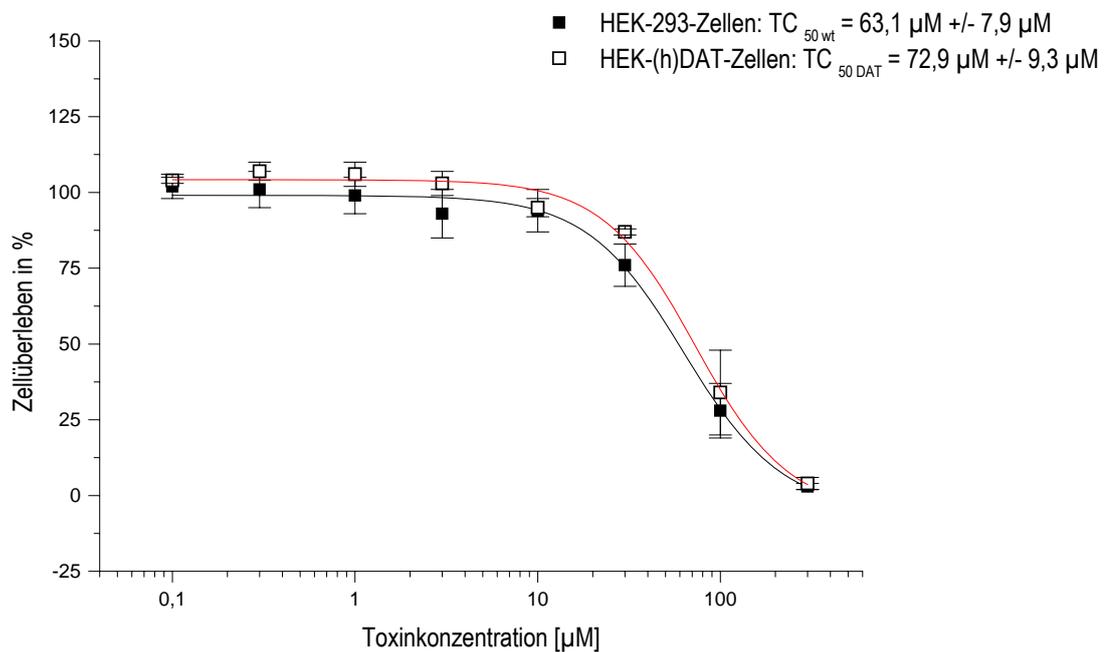


**Abbildung 6:** Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis des Zellüberlebens der HEK-293-Zelllinie (geschlossene Symbole) und HEK-(h)DAT-Zelllinie (offene Symbole) nach 72 h Inkubation mit 2,9-Dimethyl- Harminium. Das Zellüberleben wurde mit der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $TC_{50\ wt}$  bzw.  $TC_{50\ DAT}$  sind die halbmaximalen Toxizitätskonzentrationen der HEK-293-wt- (humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“) wildtype bzw. HEK-(h)DAT-293- (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters)-Zelllinie. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Bei Toxinkonzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{M}$  konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) im Zellüberleben zwischen den zwei Zelllinien gezeigt werden.

### 3.1.3 Harmane und seine Derivate

#### Harmane

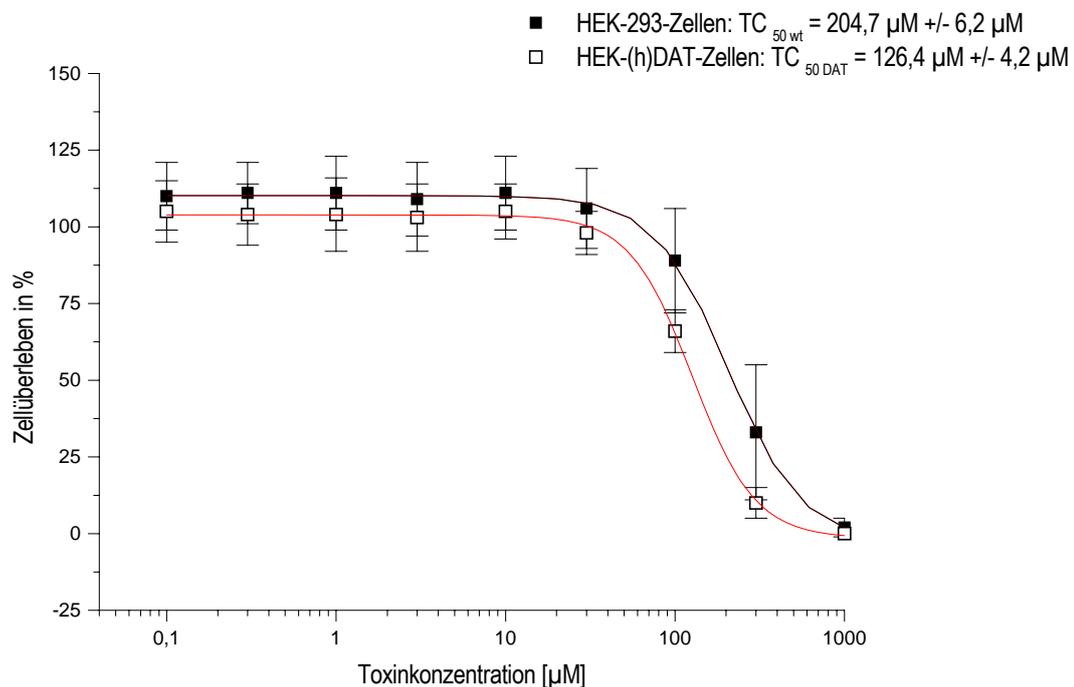
Nach 72 h Inkubation mit Harmane fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien ohne signifikanten Unterschied statt (Abb.7). Der  $TC_{50\text{ wt}}$  Wert bei der HEK-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ wt}}$ ) betrug  $63,1 \pm 7,9 \mu\text{M}$ , der von der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ DAT}}$ ) betrug  $72,9 \pm 9,3 \mu\text{M}$ .  $I_{\text{DAT}} = 0,9$ . Es konnte also eine allgemeine Zytotoxizität von Harmane, aber keine DAT-vermittelte Toxizität gezeigt werden.



**Abbildung 7:** Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis des Zellüberlebens der HEK-293-Zelllinie (geschlossene Symbole) und HEK-(h)DAT-Zelllinie (offene Symbole) nach 72 h Inkubation mit Harmane. Das Zellüberleben wurde mit der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $TC_{50\text{ wt}}$  bzw.  $TC_{50\text{ DAT}}$  sind die halbmaximalen Toxizitätskonzentrationen der HEK-293-wt- (humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“) wildtype bzw. HEK-(h)DAT-293- (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters)-Zelllinie. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es konnte bei keiner Toxinkonzentration eine statistisch signifikante Differenz zwischen den beiden Zelllinien gefunden werden.

## 2-Methyl-Harmanium

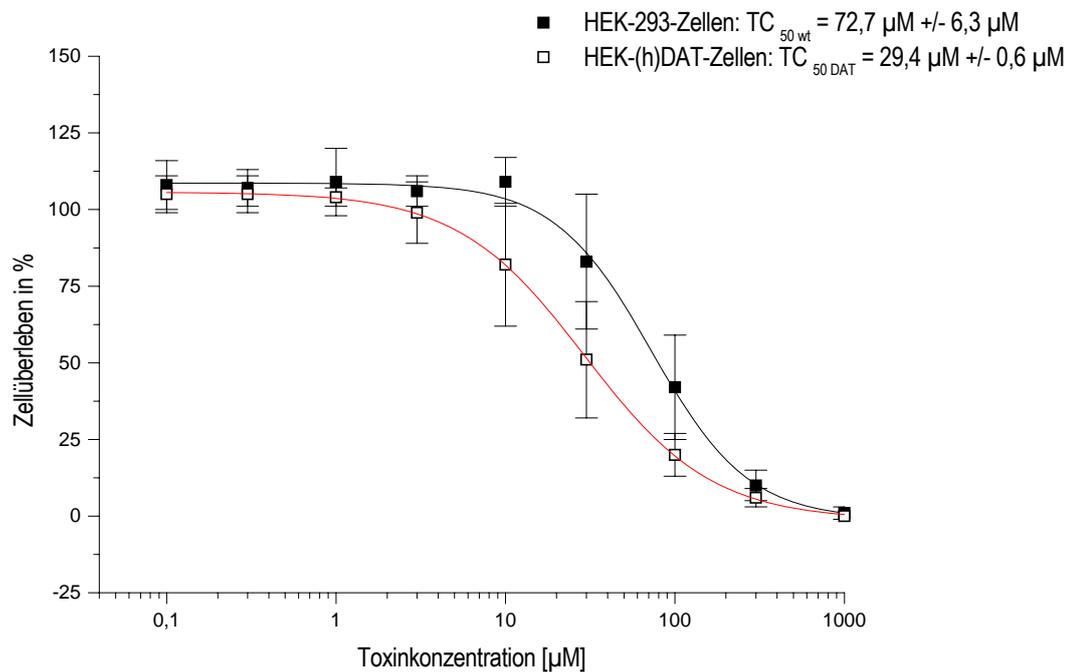
Nach 72 h Inkubation mit 2-Methyl-Harmanium fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien statt (Abb.8). Der  $TC_{50}$  Wert bei der HEK-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ wt}}$ ) betrug  $204,7 \pm 6,2 \mu\text{M}$ , der von der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ DAT}}$ ) betrug  $126,4 \pm 4,2 \mu\text{M}$ . Die  $TC_{50}$  Werte der beiden Zelllinien unterscheiden sich signifikant voneinander (\*\* $p < 0,01$ ).  $I_{\text{DAT}} = 1,6$ . Zusätzlich zur allgemeinen Zytotoxizität von 2-Methyl-Harmanium konnte eine DAT-vermittelte Toxizität gezeigt werden.



**Abbildung 8:** Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis des Zellüberlebens der HEK-293-Zelllinie (geschlossene Symbole) und HEK-(h)DAT-Zelllinie (offene Symbole) nach 72 h Inkubation mit 2-Methyl-Harmanium. Das Zellüberleben wurde mit der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $TC_{50\text{ wt}}$  bzw.  $TC_{50\text{ DAT}}$  sind die halbmaximalen Toxizitätskonzentrationen der HEK-293-wt- (humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“) wildtype bzw. HEK-(h)DAT-293- (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters)-Zelllinie. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die  $TC_{50}$ -Werte unterschieden sich signifikant ( $p < 0,01$ ) voneinander.

## 2,9-Dimethyl-Harmanium

Nach 72 h Inkubation mit 2,9-Dimethyl-Harmanium fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien statt (Abb.9). Der  $TC_{50}$ -Wert bei der HEK-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ wt}}$ ) betrug  $72,7 \pm 6,3 \mu\text{M}$ , der von der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ DAT}}$ ) betrug  $29,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$ . Die  $TC_{50}$ -Werte der beiden Zelllinien unterscheiden sich signifikant voneinander ( $***p < 0,001$ ).  $I_{\text{DAT}} = 2,5$ . Zusätzlich zur allgemeinen Zytotoxizität von 2,9-Dimethyl-Harmanium konnte eine DAT-vermittelte Toxizität gezeigt werden.

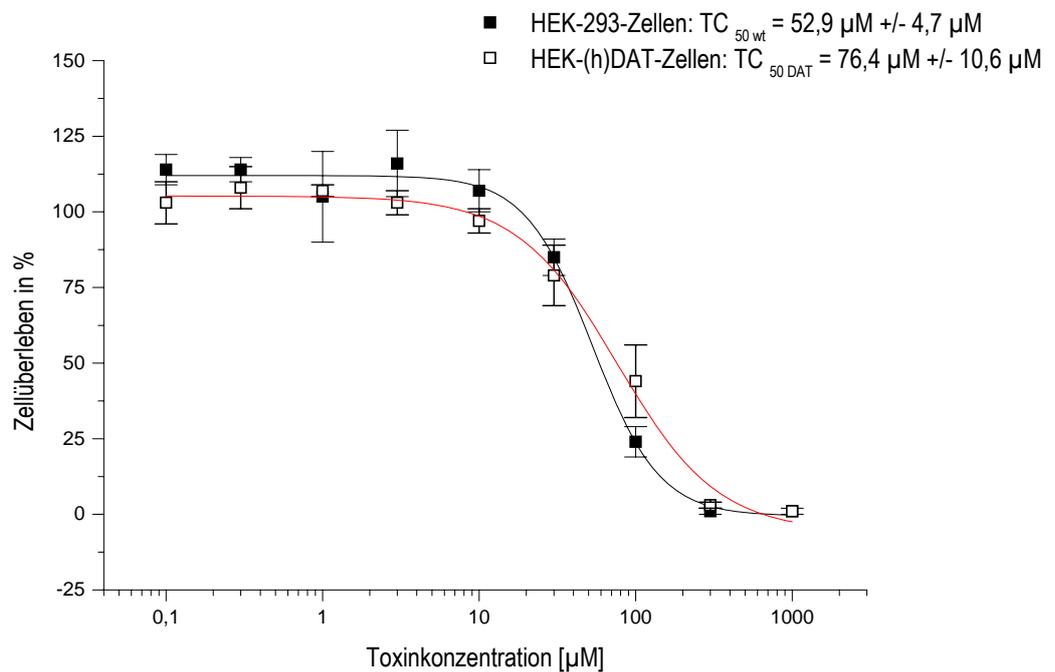


**Abbildung 9:** Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis des Zellüberlebens der HEK-293-Zelllinie (geschlossene Symbole) und HEK-(h)DAT-Zelllinie (offene Symbole) nach 72 h Inkubation mit 2,9-Dimethyl-Harmanium. Das Zellüberleben wurde mit der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $TC_{50\text{ wt}}$  bzw.  $TC_{50\text{ DAT}}$  sind die halbmaximalen Toxizitätskonzentrationen der HEK-293-wt- (humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“) wildtype bzw. HEK-(h)DAT-293- (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters)-Zelllinie. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die  $TC_{50}$ -Werte unterschieden sich signifikant ( $p < 0,001$ ) voneinander.

### 3.1.4 Harmaline und 2-Methyl-Harmalinium

#### Harmaline

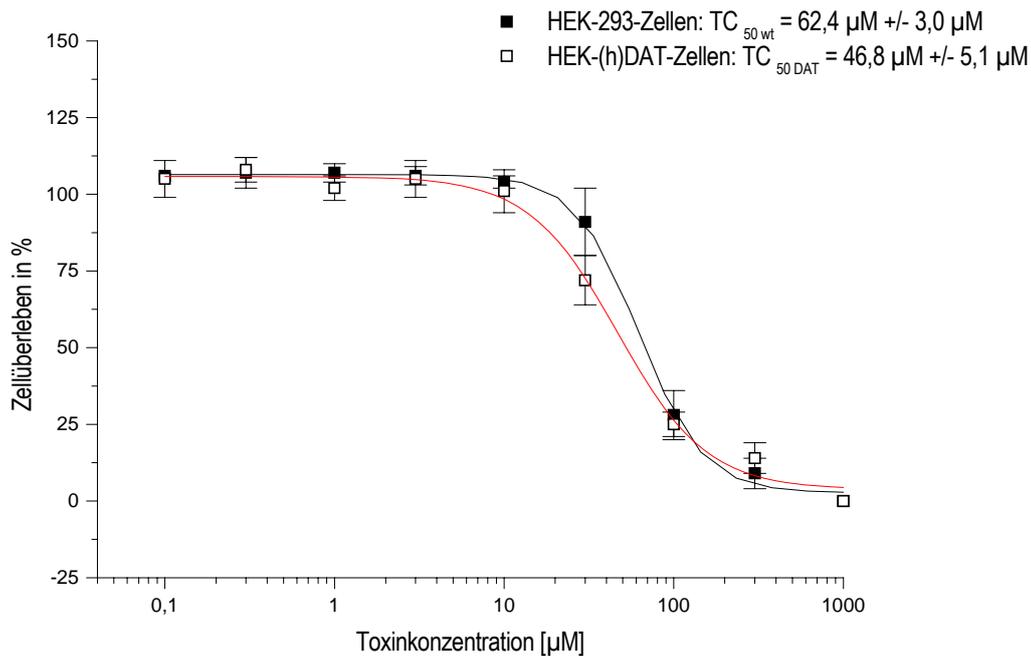
Nach 72 h Inkubation mit Harmaline fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien ohne signifikanten Unterschied statt (Abb.10). Der  $TC_{50}$ -Wert bei der HEK-293-Zelllinie ( $TC_{50\ wt}$ ) betrug  $52,9 \pm 4,7 \mu\text{M}$ , der von der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie ( $TC_{50\ DAT}$ ) betrug  $76,4 \pm 10,6 \mu\text{M}$ .  $I_{DAT} = 0,7$ . Es konnte also eine allgemeine Zytotoxizität von Harmaline, aber keine DAT-vermittelte Toxizität gezeigt werden.



**Abbildung 10:** Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis des Zellüberlebens der HEK-293-Zelllinie (geschlossene Symbole) und HEK-(h)DAT-Zelllinie (offene Symbole) nach 72 h Inkubation mit Harmaline. Das Zellüberleben wurde mit der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $TC_{50\ wt}$  bzw.  $TC_{50\ DAT}$  sind die halbmaximalen Toxizitätskonzentrationen der HEK-293-wt- (humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“) wildtype bzw. HEK-(h)DAT-293- (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters)-Zelllinie. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Bei keiner Toxinkonzentration konnte eine statistisch signifikante Differenz im Zellüberleben zwischen den beiden Zelllinien gefunden werden.

## 2-Methyl-Harmalinium

Nach 72 h Inkubation mit 2-Methyl-Harmaline fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien ohne signifikanten Unterschied statt (Abb.11). Der  $TC_{50}$  Wert bei der HEK-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ wt}}$ ) betrug  $62,4 \pm 3,0 \mu\text{M}$ , der von der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ DAT}}$ ) betrug  $46,8 \pm 5,1 \mu\text{M}$ .  $I_{\text{DAT}} = 1,3$ . Auch hier konnte also eine allgemeine Zytotoxizität von 2-Me-Harmalinium, aber keine DAT-vermittelte Toxizität gezeigt werden.



**Abbildung 11:** Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis des Zellüberlebens der HEK-293-Zelllinie (geschlossene Symbole) und HEK-(h)DAT-Zelllinie (offene Symbole) nach 72 h Inkubation mit 2-Methyl-Harmalinium. Das Zellüberleben wurde mit der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $TC_{50\text{ wt}}$  bzw.  $TC_{50\text{ DAT}}$  sind die halbmaximalen Toxizitätskonzentrationen der HEK-293-wt- (humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“) wildtype bzw. HEK-(h)DAT-293- (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters)-Zelllinie. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Bei keiner Toxinkonzentration konnte eine statistisch signifikante Differenz im Zellüberleben zwischen den beiden Zelllinien gefunden werden.

### 3.1.5 Weitere Carboline mit signifikantem Unterschied des Zellüberlebens

#### Harmalol

Nach 72 h Inkubation mit Harmalol fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien statt (Abb.12). Der  $TC_{50}$ -Wert bei der HEK-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ wt}}$ ) betrug  $230,4 \pm 28,4 \mu\text{M}$ , der von der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie ( $TC_{50\text{ DAT}}$ ) betrug  $110,1 \pm 11,7 \mu\text{M}$ . Die  $IC_{50}$ -Werte der beiden Zelllinien unterscheiden sich signifikant voneinander (\*\* $p < 0,01$ ).  $I_{\text{DAT}} = 2,1$ . Zusätzlich zur allgemeinen Zytotoxizität konnte eine DAT-vermittelte Toxizität gezeigt werden.

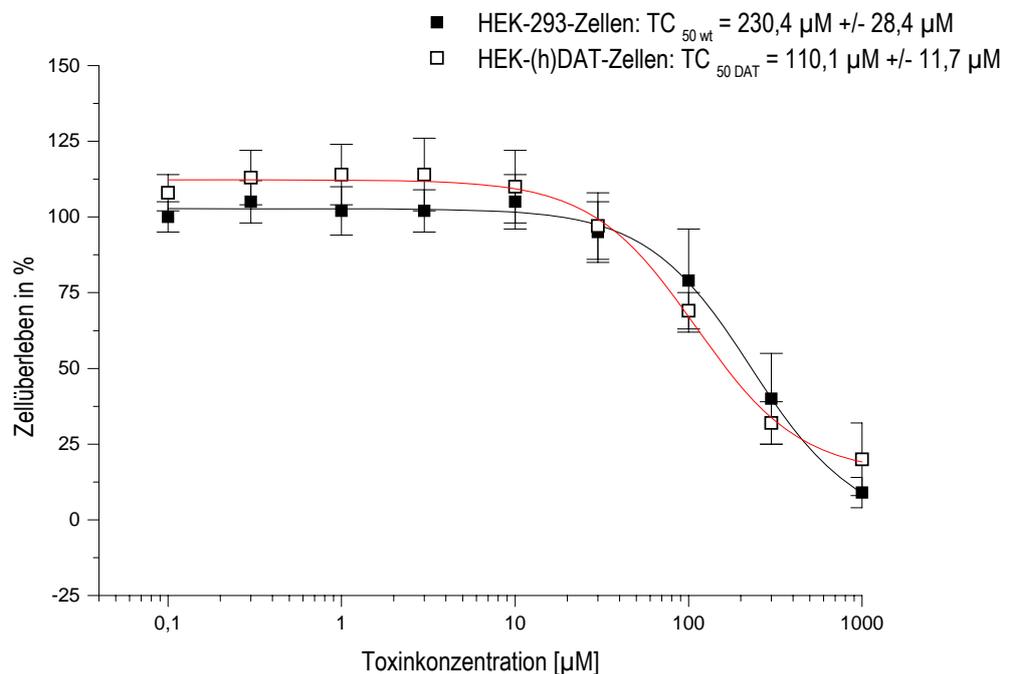
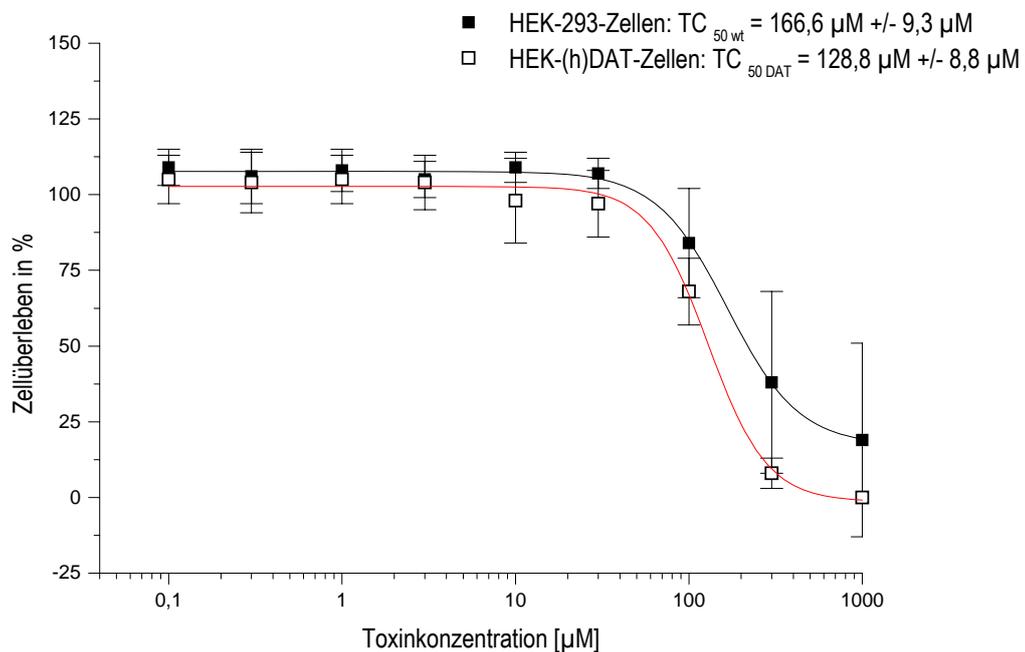


Abbildung 12: Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis des Zellüberlebens der HEK-293-Zelllinie (geschlossene Symbole) und HEK-(h)DAT-Zelllinie (offene Symbole) nach 72 h Inkubation mit Harmalol. Das Zellüberleben wurde mit der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $TC_{50\text{ wt}}$  bzw.  $TC_{50\text{ DAT}}$  sind die halbmaximalen Toxizitätskonzentrationen der HEK-293-wt- (humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“) wildtype bzw. HEK-(h)DAT-293- (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters)-Zelllinie. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die  $TC_{50}$ -Werte unterschieden sich signifikant voneinander ( $p < 0,01$ ).

### 1,2-Dimethyl-9h- $\beta$ -carboline-2-ium

Nach 72 h Inkubation mit 1,2-Dimethyl-9h- $\beta$ -carboline-2-ium fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien statt. Der  $TC_{50}$ -Wert bei der HEK-293-Zelllinie ( $TC_{50\ wt}$ ) betrug  $166,6 \pm 9,3 \mu\text{M}$ , der von der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie ( $TC_{50\ DAT}$ ) betrug  $128,8 \pm 8,8 \mu\text{M}$ . Die  $TC_{50}$ -Werte der beiden Zelllinien unterscheiden sich signifikant voneinander ( $*p < 0,05$ ).  $I_{DAT} = 1,3$ . Zusätzlich zur allgemeinen konnte eine DAT-vermittelte Zytotoxizität von 1,2-Dimethyl-9h- $\beta$ -carboline-2-ium gezeigt werden.



**Abbildung 13:** Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis des Zellüberlebens der HEK-293-Zelllinie (geschlossene Symbole) und HEK-(h)DAT-Zelllinie (offene Symbole) nach 72 h Inkubation mit 1,2-Dimethyl-9h- $\beta$ -carboline-2-ium. Das Zellüberleben wurde mit der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)-Methode bestimmt und als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $TC_{50\ wt}$  bzw.  $TC_{50\ DAT}$  sind die halbmaximalen Toxizitätskonzentrationen der HEK-293-wt- (humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“) wildtype bzw. HEK-(h)DAT-293- (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters)-Zelllinie. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die  $TC_{50}$ -Werte unterschieden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) voneinander.

### 3.1.6 $\beta$ -Carboline ohne signifikanten Unterschied im Zellüberleben

Für folgende Substanzen aus der Gruppe der Betacarboline zeigte sich nach 72 h Inkubation ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien ohne signifikanten Unterschied im Zellüberleben:

#### Harmol:

$TC_{50\text{ wt}} = 22,9 \pm 3,8 \mu\text{M}$ ;  $TC_{50\text{ DAT}} = 24,3 \pm 3,0 \mu\text{M}$ .  $I_{\text{DAT}} = 0,9$ .

#### 2-Propyl-9h-b-carbolin-2-ium:

$TC_{50\text{ wt}} = 259,9 \pm 12,5 \mu\text{M}$ ;  $TC_{50\text{ DAT}} = 236,3 \pm 15,7 \mu\text{M}$ .  $I_{\text{DAT}} = 1,1$ .

#### 6-Methoxy-Tetrapyridol (6-Methoxy-1,2,3,4-Tetrahydro-9h-pyrido (3,4-b)indol)

$TC_{50\text{ wt}} = 474,2 \pm 46,5 \mu\text{M}$ ;  $TC_{50\text{ DAT}} = 712,3 \pm 94,6 \mu\text{M}$ .  $I_{\text{DAT}} = 0,7$ .

#### Tetrapyridol (1,2,3,4-Tetrahydro-9h-pyrido (3,4-b)indol)

$TC_{50\text{ wt}} = 131,0 \pm 14,3 \mu\text{M}$ ;  $TC_{50\text{ DAT}} = 163,6 \pm 9,1 \mu\text{M}$ .  $I_{\text{DAT}} = 0,8$ .

#### 6-Methoxy-Harmalan:

$TC_{50\text{ wt}} = 137,7 \pm 9,1 \mu\text{M}$ ;  $TC_{50\text{ DAT}} = 135,5 \pm 12,7 \mu\text{M}$ .  $I_{\text{DAT}} = 1,0$ .

#### 2,9-Dimethyl-4,9-dihydro-3h- $\beta$ -carboline-2-ium:

$TC_{50\text{ wt}} = 238,3 \pm 8,1 \mu\text{M}$ ;  $TC_{50\text{ DAT}} = 210,4 \pm 11,5 \mu\text{M}$ .  $I_{\text{DAT}} = 1,1$ .

#### 2-Methyl-Isoharmalinium:

Aufgrund mangelnder Substanzmenge wurde nur ein Versuch durchgeführt, hierbei ergaben sich Werte von

$TC_{50\text{ wt}} > 300 \mu\text{M}$ ;  $TC_{50\text{ DAT}}$  ebenfalls  $> 300 \mu\text{M}$

#### Harmane-1,2,3,4-tetrahydro-3-carboxyl:

$TC_{50\text{ wt}} > 1000 \mu\text{M}$ ;  $TC_{50\text{ DAT}} > 1000 \mu\text{M}$ .

## 3.2 Konzentrationsabhängige Effekte der Isoquinoline auf das Zellüberleben

Für alle vier in dieser Studie untersuchten Isoquinolinderivate zeigte sich nach 48 h Inkubation ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang beider Zelllinien, jedoch ohne signifikanten Unterschied im Zellüberleben:

### 1-Methyl-Tetrahydroisoquinolin

$TC_{50\text{ wt}} > 1000\ \mu\text{M}$ ;  $TC_{50\text{ DAT}} > 1000\ \mu\text{M}$

### 1-Benzyl-6,7-dimethoxy-3,4-Dihydroisoquinolin

$TC_{50\text{ wt}} = 61,2 \pm 3,5\ \mu\text{M}$ ;  $TC_{50\text{ DAT}} = 91,7 \pm 205\ \mu\text{M}$ .  $I_{\text{DAT}} = 0,7$ .

### 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin

$TC_{50\text{ wt}} > 1000\ \mu\text{M}$ ;  $TC_{50\text{ DAT}} > 1000\ \mu\text{M}$

### 1-Benzyl-3,4-Dihydroisoquinolin

$TC_{50\text{ wt}} = 286,6 \pm 109,0\ \mu\text{M}$ ;  $TC_{50\text{ DAT}} = 289,4 \pm 96,4\ \mu\text{M}$ .  $I_{\text{DAT}} = 1,0$ .

### 3.3 Zusammenfassung der toxikologischen Daten

Tabelle 1: Zusammenfassung der halbmaximal toxischen Konzentrationen (in  $\mu\text{M}$ : Mikromol) von HEK-293-Zellen ( $\text{TC}_{50 \text{ wt}}$ ) und HEK-(h)DAT-Zellen ( $\text{TC}_{50 \text{ DAT}}$ ) nach 48 h Inkubation mit der jeweiligen Substanz, gemessen mit der MTT-Methode (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid-Methode). Die Werte repräsentieren die effektive mittlere Konzentration  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, welche einen 50-prozentigen Zelluntergang der Zelllinien bewirkt.  $\text{I}_{\text{DAT}}$  ist definiert als der Quotient  $\text{TC}_{50 \text{ wt}} / \text{TC}_{50 \text{ DAT}}$  und stellt einen Parameter für die DAT-abhängige Toxizität dar. Die Signifikanz p wurde mit dem unpaired student's t-test berechnet.  $\text{TC}_{50 \text{ DAT}}$  unterscheidet sich signifikant vom zugehörigen  $\text{TC}_{50 \text{ wt}}$  - Wert bei \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . HEK-(h)DAT: HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters; HEK-293: Humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“). Anmerkung zu #: aufgrund fehlender Substanzmenge wurde lediglich ein Versuch durchgeführt.

Getestete Substanz	$\text{TC}_{50 \text{ wt}} (\mu\text{M})$	$\text{TC}_{50 \text{ DAT}} (\mu\text{M})$	$\text{I}_{\text{DAT}}$
<u>Betacarboline</u>			
Norharman	$129,9 \pm 8,2$	$176,7 \pm 17,4$	0,7
2-Methyl-Norharmanium	$326,8 \pm 19,3$	$147,0 \pm 11,2^{**}$	2,2
2,9-Dimethyl-Norharmanium	$82,8 \pm 5,7$	$62,1 \pm 5,1^*$	1,3
Harmine	$36,3 \pm 8,9$	$37,4 \pm 9,2$	1,0
2-Methyl-Harminium	$103,1 \pm 21,2$	$34,3 \pm 3,7^*$	3,0
2,9-Dimethyl-Harminium	$21,4 \pm 2,8$	$4,7 \pm 0,4^{**}$	4,5
Harmane	$63,1 \pm 7,9$	$72,9 \pm 9,3$	0,9
2-Methyl-Harmanium	$204,7 \pm 6,2$	$126,4 \pm 4,2^{**}$	1,6
2,9-Dimethyl-Harmanium	$72,7 \pm 6,3$	$29,4 \pm 0,6^{**}$	2,5
Harmaline	$52,9 \pm 4,7$	$76,4 \pm 10,6$	0,7
2-Methyl-Harmalinium	$62,5 \pm 3,0$	$46,9 \pm 5,2$	1,3

Harmalol	230,4 ± 28,4	110,1 ± 11,7 **	2,1
1,2-Dimethyl-9h-β-carboline-2ium	166,58 ± 9,25	128,81 ± 8,80 *	1,29
Harmol	22,9 ± 3,8	24,3 ± 3,0	0,94
2-Propyl-9h-β-carboline-2-ium	259,9 ± 12,5	236,3 ± 15,7	1,1
6-Methoxy-Tetrapyridol / 6-Methoxy-1,2,3,4-Tetrahydro-9h-pyrido (3,4-b)indol	474,2 ± 46,5	712,3 ± 94,6	0,7
Tetrapyridol / 1,2,3,4-Tetrahydro-9h-pyrido (3,4-b)indol	131,0 ± 14,3	163,6 ± 9,1	0,8
6-Methoxy-Harmalan	137,7 ± 9,1	135,5 ± 12,7	1,0
2,9-Dimethyl-4,9-dihydro-3h-β-carboline-2-ium	238,3 ± 8,1	210,4 ± 11,5	1,1
2-Methyl-Isoharmalinium #	> 300	> 300	-
Harmane-1,2,3,4-tetrahydro-3-carboxyl	> 1000	> 1000	-
<u>Isoquinoline</u>			
1-Methyl-Tetrahydroisoquinolin	> 1000	> 1000	-
1-Benzyl-6,7-dimethoxy-3,4-Dihydroisoquinolin	61,2 ± 3,5	91,7 ± 205	0,7
6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin	> 1000	> 1000	-
1-Benzyl-3,4-Dihydroisoquinolin	286,6 ± 109,0	289,4 ± 96,4	1,0

Die Potenz der untersuchten signifikant DAT- spezifischen toxischen Substanzen ist wie folgt:

2,9-Dimethyl-Harminium > 2-Methyl-Harminium > 2,9-Dimethyl-Harmanium > 2-Methyl-Norharmanium > Harmalol > 2-Methyl-Harmanium > 2,9-Dimethyl-Norharmanium > 1,2-Dimethyl-9h-β-carboline-2-ium.

### 3.4 Intrazelluläre Toxinaufnahme in HEK-293- und HEK-(h)DAT-293-Zellen / Uptake-Versuche

#### 3.4.1 Intrazelluläre Aufnahme der $\beta$ -Carboline

Die konzentrationsabhängige DAT-vermittelte intrazelluläre Aufnahme von Norharman, Harmane, Harmine, Harmaline und ihren methylierten Derivaten wird nach 10-minütiger Inkubation mit der Fluoreszenzmessung semiquantitativ dargestellt. Die Fluoreszenzmessung basiert auf der starken Autofluoreszenz der Pyrido-Indole (Spenser 1956). Die Exzitationswellenlänge betrug 280 nm, die Emissionswellenlänge 450 nm. Der DAT-unabhängige intrazelluläre Transport in die HEK-(h)DAT-293-Zellen wird mittels 15-minütiger Vorinkubation mit dem DAT- Inhibitor GBR 12909 bestimmt und als Hintergrund abgezogen. Vorversuche mit Inkubationsdauer von 0-60 Minuten hatten für das Intervall von 0-10 Minuten eine lineare intrazelluläre Aufnahme ergeben (Abb.14). Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Exemplarisch wird die Aufnahme von Norharman und seinen Derivaten in Abbildung 14 dargestellt:

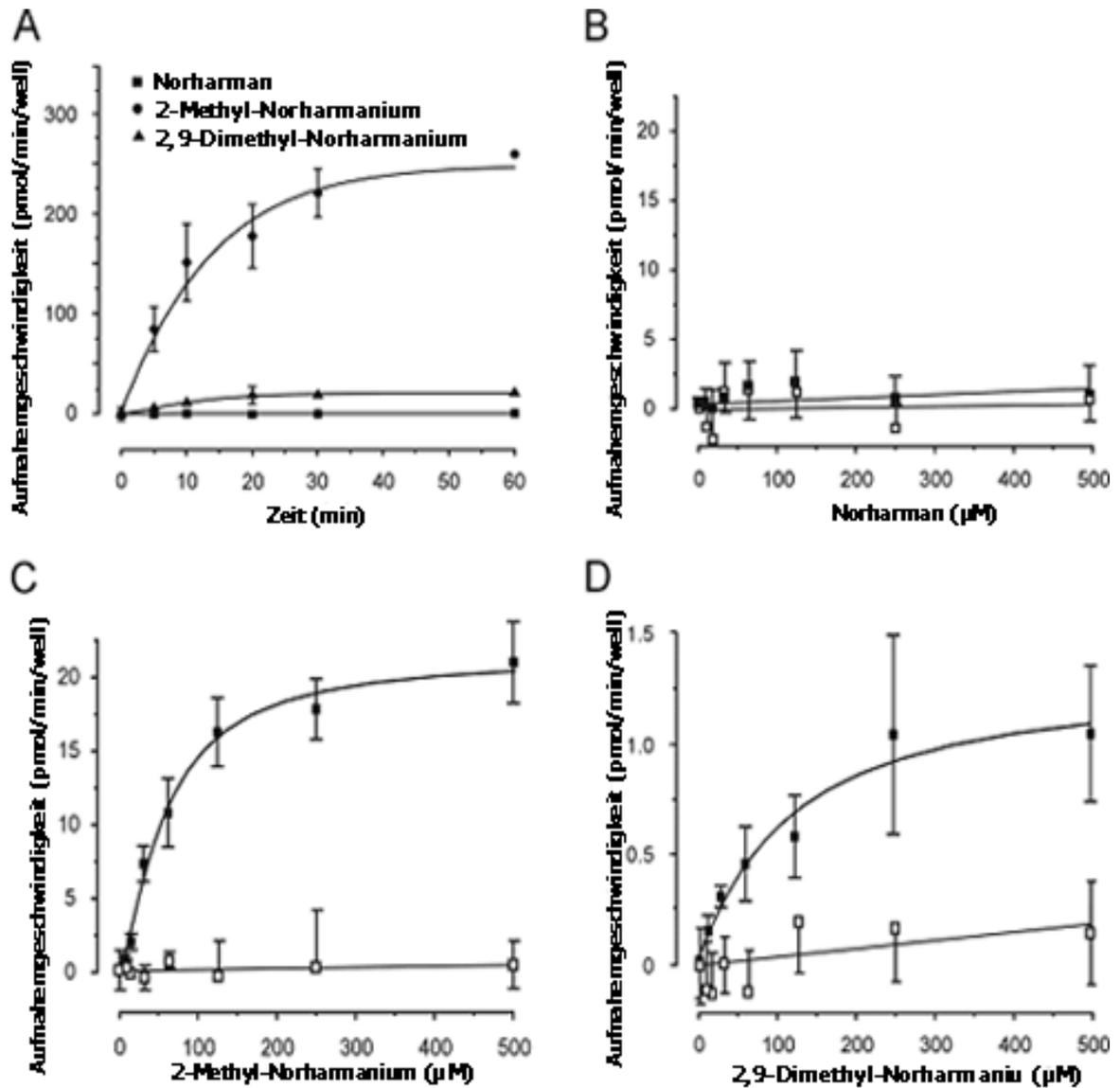


Abbildung 14: A) Zeitabhängige intrazelluläre Aufnahme von Norharman, 2-Methyl-Norharmanium und 2,9-Dimethyl-Norharmanium in HEK(h)DAT-293-Zellen: HEK(h)DAT-293-Zellen wurden für bis zu 60 Minuten mit einer 100 µM Lösung der jeweiligen Substanz inkubiert, danach wurde die akkumulierte Substanzmenge mit der Fluoreszenzmessung bestimmt. Für das Intervall von 0-10 Minuten ergab sich eine lineare Aufnahme, nach 60 Minuten kommt es zu einer Sättigung der intrazellulären Aufnahme. B-D) Konzentrationsabhängige intrazelluläre Aufnahme von Norharman (B), 2-Methyl-Norharmanium (C) und 2,9-Dimethyl-Norharmanium (D) in HEK-293-wt-Zellen (offene Symbole) und HEK(h)DAT-293-Zellen (geschlossene Symbole): HEK(h)DAT-293-Zellen und HEK-293-Zellen wurden 10 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-500 µM) der entsprechenden Substanz inkubiert, die akkumulierte Substanzmenge wurde anhand der Fluoreszenzmessung bestimmt. Der Dopamintransporter-unabhängige intrazelluläre Transport in die HEK(h)DAT-293-Zellen wurde mittels 15-minütiger Vorinkubation mit dem Dopamintransporter-inhibitor GBR 12909 (1-[2-[bis(4-fluorophenyl)metoxy]ethyl]-4-[3-phenyl-propyl]-Piperazin Dihydrochlorid) bestimmt und als Hintergrund abgezogen. Die Punkte der Graphik repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. HEK-293-wt: Humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293 („human embryonal kidney cells“- wildtype; HEK(h)DAT-293: HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters; µM: Mikromol.

Tabelle 2: Zusammenfassung der aus den Uptake-Versuchen durch nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelten Michaeliskonstanten ( $K_m$ ), maximale Aufnahmegeschwindigkeiten ( $v_{max}$ ) und Hill-Koeffizienten ( $n_H$ ) der jeweiligen Substanzen. N.a., nicht über den Dopamintransporter akkumuliert. # Daten aus Storch et al. 1999, 2002.  $\mu\text{M}$ : Mikromol; pM: Picomol; min: Minute; well: Vertiefung; MPP<sup>+</sup>: 1-Methyl-4-phenyl-Pyridinium.

Substanz	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$v_{max}$ (pM/min/well)	$n_H$
[ <sup>3</sup> H]Dopamin	$23,0 \pm 3,7^\#$	$244 \pm 27^\#$	$1,05 \pm 0,13^\#$
[ <sup>3</sup> H]MPP <sup>+</sup>	$25,3 \pm 5,9^\#$	$167 \pm 35^\#$	$1,25 \pm 0,21^\#$
Norharman	n.a.	n.a.	n.a.
2-Methyl-Norharmanium	$58,0 \pm 8,7$	$21,3 \pm 1,3$	$1,40 \pm 0,20$
2,9-Dimethyl-Norharmanium	$\approx 114$	$1,2 \pm 0,3$	$1,10 \pm 0,30$
Harmane	n.a.	n.a.	n.a.
2-Methyl-Harmanium	$48,3 \pm 9,2$	$12,8 \pm 0,9$	$1,07 \pm 0,16$
2,9-Dimethyl-Harmanium	$15,0 \pm 2,1$	$8,0 \pm 0,4$	$1,77 \pm 0,44$
Harmine	n.a.	n.a.	n.a.
2-Methyl-Harminium	$74,1 \pm 9,6$	$17,3 \pm 1,3$	$1,64 \pm 0,21$
2,9-Dimethyl-Harminium	$32,7 \pm 5,0$	$2,7 \pm 0,2$	$1,98 \pm 0,58$
Harmaline	n.a.	n.a.	n.a.
2-Methyl-Harmalinium	$31,7 \pm 2,6$	$1,1 \pm 0,1$	$2,87 \pm 0,58$

Die Affinitäten der akkumulierten Substanzen waren bis auf eine Ausnahme bei allen getesteten Substanzen niedriger als die von Dopamin oder MPP<sup>+</sup> mit bis zu 4-5 fach höheren  $K_m$ -Werten als für Dopamin bzw. MPP<sup>+</sup>. Lediglich bei 2,9-Dimethyl-Harmanium war die Michaeliskonstante niedriger, das heißt die Affinität höher als bei MPP<sup>+</sup> bzw. Dopamin. Des Weiteren sind die maximalen Aufnahmegeschwindigkeiten aller Betacarbolinderivate 12-220-mal kleiner als die von Dopamin oder MPP<sup>+</sup>. Alle 2-N-methylierten Substanzen wurden über den DAT akkumuliert, die Substanzen, denen eine 2-Methyl-Gruppe fehlt, zeigten keine signifikante Aufnahme in HEK-(h)DAT-293-Zellen gegenüber HEK-293-Zellen. Die HEK-293-wt-Zellen zeigten bei keinen der getesteten Betacarboline eine signifikante Akkumulation.

### 3.4.2 Korrelationen zwischen Aufnahmekinetik und Toxizität

Um bestehende Korrelationen zwischen der Aufnahmekinetik und der Toxizität festzustellen, wurden die Michaeliskonstanten ( $K_m$ ) und die maximalen Aufnahmegeschwindigkeiten ( $v_{max}$ ) gegen die  $I_{DAT}$ -Werte aufgetragen (Abb.15). Hierbei konnte keine Relation zwischen  $v_{max}$  und den  $I_{DAT}$ -Werten (Pearson's Korrelationskoeffizient  $r = 0,05$ ), jedoch eine schwache Relation zwischen  $K_m$  und den  $I_{DAT}$ -Werten (Pearson's Korrelationskoeffizient  $r = -0,31$ ) gefunden werden.

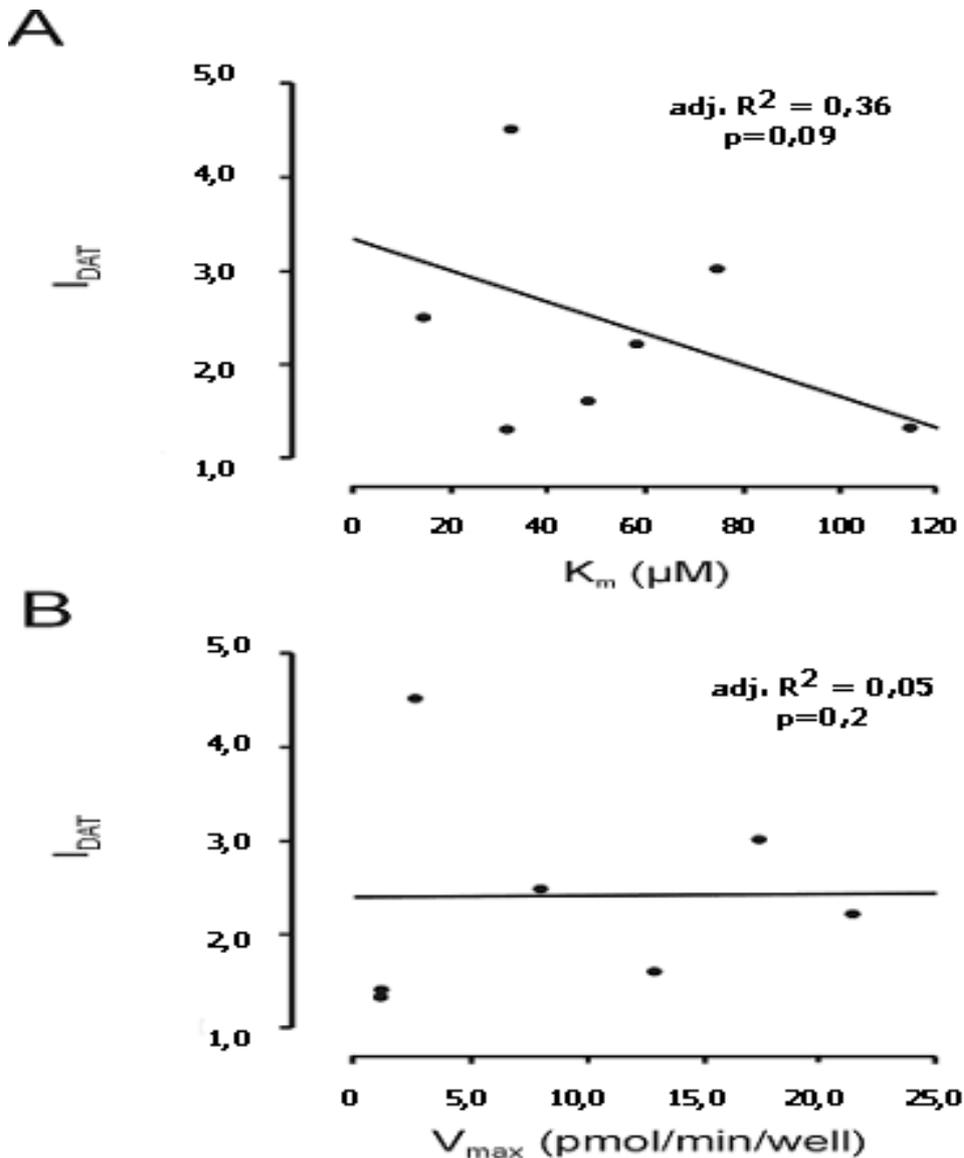


Abbildung 15: Korrelation der Dopamintransporter (DAT)-vermittelten Toxizität mit den Aufnahmeparametern der  $\beta$ -Carboline. Michaeliskonstanten ( $K_m$ ) und maximale Aufnahmegeschwindigkeiten ( $v_{max}$ ) sind gegen den  $I_{DAT}$  aufgetragen, welcher als Quotient von  $TC_{50\ wt}$  (halbmaximale Toxizitätskonzentration der HEK-293-wt- (Humane Embryonale Nierenzelllinie HEK-293) /  $TC_{50\ DAT}$  (halbmaximale Toxizitätskonzentration der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie (HEK-293-Zellen mit stabiler Expression des humanen Dopamintransporters) einen Parameter für die DAT-abhängige Toxizität einer jeweiligen Substanz darstellt. (A) Zwischen  $K_m$  und den  $I_{DAT}$ -Werten (adjustierter Determinationskoeffizient  $R^2 = 0,36$ ,  $p = 0,09$ . Pearson's Korrelationskoeffizient  $r = -0,31$ ) gab es eine schwache Relation, (B) zwischen  $v_{max}$  und den  $I_{DAT}$ -Werten ( $R^2 = 0,05$ ,  $p = 0,2$ .  $r = 0,05$ ) hingegen gab es keine Relation.

## 4. Diskussion

In dieser Studie wurde die Toxizität von  $\beta$ -Carbolen und Isoquinolinen auf HEK-293-Zellen und die stabil mit dem Dopamintransporter transfizierten HEK-(h)DAT-293-Zellen untersucht. Die im Rahmen dieser Studie erhobenen Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität für die untersuchten Betacarboline sowohl auf HEK-293-Zellen (wildtype) als auch für HEK-(h)DAT-293-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten nur die am N2-Atom methylierten Betacarboline eine signifikant erhöhte Toxizität bei der HEK-(h)DAT- gegenüber der parentalen HEK-293-Zelllinie. Die durch N-Methyl-derivate vermittelte selektive Toxizität wurde komplett durch den DAT-Inhibitor GBR 12909 geblockt. Die Reihenfolge der selektiven Zytotoxizität gegenüber der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie war wie folgt: 2,9-Dimethyl-Harminium > 2-Methyl-Harminium > 2,9-Dimethyl-Harmanium > 2-Methyl-Norharmanium > 2-Methyl-Harmanium > 2,9-Dimethyl-Norharmanium. Die  $TC_{50\text{ DAT}}$ -Werte waren bis maximal 4,5-fach kleiner als die  $TC_{50\text{ wt}}$ -Werte. Harmalol ist die einzige nicht 2N-methylierte Substanz mit DAT-spezifischer Toxizität. Für Norharman, Harmane, Harmine, Harmaline und ihre 2N-methylierten, bzw. 2,9-dimethylierten Derivate wurde im Uptakeversuch demonstriert, dass eine DAT-vermittelte intrazelluläre Aufnahme nur für die methylierten Derivate stattfindet. Vergleicht man die konzentrationsabhängigen Effekte auf das Zellüberleben (Tabelle 1) mit den Ergebnissen aus den Uptake-Versuchen (Tabelle 2) stellt man fest, dass alle Betacarbolinderivate, welche eine signifikante DAT-vermittelte Toxizität zeigen auch spezifisch durch den DAT in die Zelle transportiert werden. Keine der getesteten Substanzen hat eine DAT-abhängige Toxizität ohne durch den DAT aufgenommen zu werden. 2-Methyl-Harmalinium zeigt als einzige getestete Substanz eine DAT-spezifische intrazelluläre Aufnahme ohne DAT-vermittelte Toxizität. Zwischen der DAT-vermittelten Toxizität  $I_{\text{DAT}}$  und den Michaeliskonstanten besteht eine schwache Relation.

Die untersuchten Isoquinoline zeigten einen konzentrationsabhängigen Zelluntergang beider Zelllinien ohne signifikanten Unterschied, die toxische Wirkung von 1-Me-TIQ und 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-TIQ ist vergleichsweise gering mit  $TC_{50}$ -Werten von > 1000  $\mu\text{M}$  bei beiden Zelllinien.

In vielen Untersuchungen zum MPP<sup>+</sup>-induzierten Zelltod wurden primäre mesenzephalische Kulturen oder dopaminerge Neuroblastomzellen verwendet (Mytilineou und Friedman 1988, Michel et al. 1990, Kutty et al. 1991, Itano und Nomura 1995), obwohl mesenzephalische Zellkulturen nur eine geringe Anzahl dopaminerger Neurone enthalten (Michel et al. 1990) und daher für biochemische Analysen nicht geeignet sind. Neuroblastomzellen sind relativ wenig sensibel für MPP<sup>+</sup> (Spina et al. 1992, Itano und Nomura 1995, Kutty et al. 1991), was eine hochkonzentrierte Exposition für Versuchszwecke notwendig macht, die unspezifische Effekte haben könnte (Ambrosio et al. 1996). Daher verwendeten wir in unseren Versuchen humane Nierenzelllinien, welche durch Transfektion den (h)DAT stabil exprimieren (Storch et al. 1999). Die in dieser *in vitro*-Studie verwendeten

Zellmodelle HEK-293 (wildtype) und HEK-(h)DAT-293 unterscheiden sich lediglich durch das Vorhandensein des Dopamintransporters, der in der HEK-(h)DAT-293-Zelllinie stabil exprimiert wird. HEK-(h)DAT-Zellen zeigen eine hohe Sensitivität und Selektivität für MPP<sup>+</sup>-vermittelte Toxizität (Storch et al. 1999, Storch et al. 2002). Die Dopaminaufnahmekinetik ist ähnlich wie die anderer Modelle (Pifl et al. 1993, Buck und Amara 1994, Pifl et al. 1996, Kitayama et al. 1998), mit 5-10-fach höheren  $K_m$ -Werten im Vergleich zum DAT in Synaptosomen aus dem Striatum der Ratte (Pifl et al. 1993, Matsubara et al. 1998b). *In vivo* könnten nach der intrazellulären Aufnahme durch den DAT relevante Unterschiede in den intrazellulären Toxizitätsmechanismen bestehen zwischen dopaminergen Neuronen und unseren nicht-neuronalen Zelllinien. Wie für MPP<sup>+</sup> gezeigt wurde, wird die Neurotoxizität nicht nur durch die Inhibition der mitochondrialen Komplex I-Aktivität in den dopaminergen Zellen verursacht, sondern auch durch die zytosolische Clearance des Neurotoxins durch den vesikulären Monoamintransporter 2, der die Neuf ormation von u.a. Dopaminvesikeln bewirkt und die Interaktionen mit Dopamin oder dem Enzym Tyrosinhydroxylase moduliert (Przedborski et al. 2000). Die meisten dieser Faktoren sind in den HEK-(h)DAT-Zellen nicht exprimiert, die intrazellulären Toxizitäts- und Abbaumechanismen entsprechen nicht denen dopaminerg neuronaler Zellen *in vivo*. Hier könnten also zwischen dopaminergen Neuronen und unseren nicht-neuronalen Zellmodellen relevante Unterschiede in den Toxizitätsmechanismen bestehen. Dennoch sind unsere Zelllinien gute Modelle zur Erforschung der Rolle des DAT bei der Vermittlung der Selektivität der dopaminergen Toxizität potentieller Neurotoxine. Mit ihnen kann die DAT-spezifische Zytotoxizität und intrazelluläre Aufnahme der getesteten Substanzen bestimmt werden.

## 4.1 Der Dopamintransporter in der Ätiopathogenese des IPS

Der Dopamintransporter scheint aufgrund mehrerer Studien für die selektive dopaminerge Degeneration beim IPS eine zentrale Rolle zu spielen: Cerruti et al. beobachteten 1993, dass ausserhalb des basalen Mittelhirns nur wenige oder keine dopaminergen Neuronen beim IPS beschädigt waren. Single-Photon-Emissions-Tomographiedarstellungen (SPECT) weisen *in vivo* reduzierte Dopamintransporterbindungen bei Parkinsonpatienten auf (Booij et al. 1997, Booij et al. 1998), die Blockierung des DAT bewirkt *in vivo* eine verlängerte Wirkung von L-Dopa bei Parkinsonpatienten (Nutt et al. 2004). Genetische Studien zum humanen Dopamintransporter, dessen Gen sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 5 befindet (5p15.3) (Giros et al. 1992),

wiesen bestehende Polymorphismen nach (Morino et al. 2000; Sano et al. 1993). Ob Polymorphismen des DAT mit dem IPS assoziiert sind, bleibt noch unklar: In der Studie von Leighton konnte kein Unterschied in der Genetik des DAT bei Parkinsonpatienten im Vergleich zur gesunden Bevölkerung gefunden werden (Leighton et al. 1997), andere Autoren vermuten, dass mit dem IPS assoziierte Genpolymorphismen des DAT bestehen und zu einer erhöhten Suszeptibilität beitragen könnten, zum Beispiel durch gesteigerte zelluläre Aufnahme oder Akkumulation neurotoxischer Substanzen (Kim et al. 2000; Le Couteur et al. 1997).

Exogene und endogene Toxine, welche durch den DAT in die Zelle transportiert werden und dort die mitochondriale Atmungskette pathologisch beeinflussen, könnten eine Rolle in der Pathogenese des IPS spielen. Für die neurotoxische Wirkung von MPP<sup>+</sup> ist die DAT-vermittelte Aufnahme in dopaminerge Neuronen essentiell, bevor es intrazellulär über eine Inhibition des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette zur neuronalen Degeneration führt (Przedborski et al. 1998; Gainetdinov et al. 1997). Die weiteren intrazellulären Mechanismen, durch die MPP<sup>+</sup> letztlich zum Zelluntergang führt, sind noch unklar. Diskutiert werden verschiedene mögliche Faktoren wie oxidativer Streß mit verstärkter Lipidperoxidation, übermäßigem intrazellulärem Calciumeinstrom und Hemmung der Dopaminsynthese durch Inhibition des Enzyms Tyrosinhydroxylase (Matsubara et al. 1995; Przedborski et al. 1998; Gonzalez-Polo et al. 2004). Wie für MPP<sup>+</sup> scheinen auch die strukturell verwandten Isoquinoline und  $\beta$ -Carboline, insbesondere die 2,9-Dimethyl- $\beta$ -Carbolin-Derivate, die Eigenschaft zu besitzen, den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette zu hemmen, wie *in vitro*-Studien an Rattenlebermitochondrien, an Phäochromozytom 12-Zellen der Ratte sowie an primären dopaminergen Zellkulturen aus dem Mesenzephalon von Mäusen implizieren (Cobuzzi et al. 1994; Hamann et al. 2006 ; Seaton et al. 1997; Albores et al. 1990).

## 4.2 Dopaminerge Toxizität von $\beta$ -Carbolinen

Bei den  $\beta$ -Carbolinderivaten handelt es sich um eine Substanzgruppe mit nachgewiesener dopaminergener Toxizität (Cobuzzy et al. 1994; Collins et al. 1995; Matsubara et al. 1998a), die wahrscheinlich durch den DAT transmembranös transportiert werden (Drucker et al. 1990; Matsubara et al. 1998b). Erhöhte Spiegel von  $\beta$ -Carbolinen und eine erhöhte Aktivität der synthetisierenden Enzyme im Gehirn von Parkinsonerkrankten machen zudem eine pathogenetische Rolle der  $\beta$ -Carboline wahrscheinlich: 2,9-Dimethyl-Norharmanium wurde im Liquor bei der Hälfte der getesteten Parkinsonerkrankten gefunden, nicht jedoch bei Kontrollen. Der Gesamtgehalt an methylierten  $\beta$ -Carbolinen war signifikant höher bei der Gruppe der Parkinsonerkrankten gegenüber

den Kontrollen (Matsubara et al. 1995). Weiterhin ist eine enzymatische Aktivität von N-Methyltransferase im Gehirn von Säugetieren und Menschen vorhanden (Gearhart et al. 1997; Gearhart et al. 2000; Gearhart et al. 2002). Diese N-Methyltransferase transferiert die 9-Methylgruppe der  $\beta$ -Carboline, ihre Aktivität ist in post mortem Proben aus dem frontalen Kortex Parkinsonerkrankter vierfach erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Gearhart et al. 2000). Diese Studienergebnisse stimmen mit dem Konzept überein, dass sowohl  $\beta$ -Carbolinderivate als auch biologische Methylierungsprozesse eine Rolle in der Pathogenese zumindest einer Untergruppe des IPS spielen könnten (Waring et al. 1989; Charlton und Mack 1994; Charlton und Crowell 1995).

Die Bedeutung der DAT-vermittelten dopaminergen Toxizität von  $\beta$ -Carbolinen, insbesondere von 2-N-methylierten Derivaten, bleibt unklar; bisher gab es keine systematische Analyse von  $\beta$ -Carbolinderivaten, die ihre Potenz, Selektivität und strukturellen Anforderungen für die DAT-vermittelte Zytotoxizität als auch für ihre intrazelluläre Aufnahme bestimmen.

Die im Rahmen dieser Studie erhobenen Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität im hohen Mikromolarbereich für die untersuchten  $\beta$ -Carboline sowohl auf HEK-293-Zellen als auch für HEK-(h)DAT-293-Zellen. Im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Studien gibt es keine klare Beziehung zwischen der Struktur der Substanz und ihrer zytotoxischen Effekte in HEK-293-Zellen: Weder die Lipophilität (Biagi et al. 1989) noch die Potenz, die mitochondriale Atmungskette zu inhibieren (Hoppel et al. 1987, Albores et al. 1990, Fields et al. 1992, Krueger et al. 1993), korrelieren mit der Rangliste der Toxizität. Im Gegensatz dazu zeigten auffälligerweise zumeist  $\beta$ -Carboline, die am 2N-Atom methyliert sind eine signifikante DAT-spezifische neurotoxische Wirkung auf HEK-(h)DAT-293-Zellen mit folgender Reihenfolge der DAT-vermittelten Zytotoxizität ( $I_{DAT}$ ): 2,9-Dimethyl-Harminium > 2-Methyl-Harminium > 2,9-Dimethyl-Harmanium > 2-Methyl-Norharmanium > Harmalol > 2-Methyl-Harmanium > 2,9-Dimethyl-Norharmanium > 1,2-Dimethyl-9h-b-carboline-2-ium. Die  $TC_{50\text{ DAT}}$ -Werte waren bis maximal 4,5-fach kleiner als die  $TC_{50\text{ wt}}$ -Werte. Die durch N-Methylderivate vermittelte selektive Toxizität wurde vollständig durch den DAT-Inhibitor GBR 12909 geblockt. Diese Tatsache ließ eine wichtige Rolle der DAT-Expression für die Anfälligkeit der Zelllinie gegenüber toxischen Effekten bestimmter  $\beta$ -Carboline vermuten.

Auch in der Studie von Hamann et al. zeigte 2,9-Dimethyl-Norharmanium eine zytotoxische Wirkung auf dopaminerge Zellen (Hamann et al. 2006). Hamann et al. führten die zytotoxische Wirkung von 2,9-Dimethyl-Norharmanium auf die Generierung von oxidativem Stress zurück, hierfür sprachen die Zunahme an freien Radikalen, eine erhöhte Caspase3- Aktivität, die Abnahme des ATP-Gehaltes und eine fehlende Dopamintransporter-vermittelte intrazelluläre Aufnahme.

Um die DAT-vermittelte Toxizität von  $\beta$ -Carbolinderivaten mit der zellulären Aufnahme durch das DAT-Molekül zu vergleichen, untersuchte ich ebenfalls die DAT-abhängige transmembranöse

Aufnahme in HEK-(h)DAT-293-Zellen. Bisher wurden diesbezüglich Methoden publiziert, die allerdings nur die DAT-Bindung oder die Inhibitionskapazität auf die Dopaminaufnahme von  $\beta$ -Carbolinderivaten beschrieben (Drucker et al. 1990). Für diesen Uptakeversuch verwendeten wir die fluoreszierende Eigenschaft von  $\beta$ -Carbolinen. Dies hatte den Vorteil, dass wir die zelluläre Akkumulation von  $\beta$ -Carbolinen messen und damit die Aufnahmekinetikparameter  $K_m$  und  $V_{max}$  bestimmen konnten.

Diese Versuche zeigten, dass alle untersuchten 2-N-methylierten und 2,9-N-dimethylierten  $\beta$ -Carboline durch den DAT in die Zelle transportiert wurden mit bis zu 5-fach höheren  $K_m$ - und 12-220-fach kleineren  $V_{max}$ -Werten, verglichen mit Dopamin und MPP<sup>+</sup> (Storch et al. 1999, Storch et al. 2002). Mit den Ergebnissen aus den Toxizitätsstudien bedeutet dies, dass alle 2-Methyl- bzw. 2,9-Dimethyl- $\beta$ -Carboline mit signifikant DAT-vermittelter Toxizität auch spezifisch durch den DAT in die Zelle transportiert werden. Unsere Ergebnisse stehen damit im Widerspruch zu denen von Hamann et al. (Hamann et al. 2006), die keine DAT-vermittelte intrazelluläre Aufnahme von 2,9-Dimethyl-Norharman nachweisen konnten. Bei den in den Uptakeversuchen untersuchten Substanzen besitzt keine eine DAT-spezifische Toxizität ohne intrazelluläre Aufnahme durch den DAT. Es besteht eine schwache Korrelation zwischen der DAT-vermittelten Selektivität ( $I_{DAT}$ ) und der Affinität von  $\beta$ -Carbolinen zum DAT ( $K_m$ ), jedoch keine zwischen  $I_{DAT}$  und der Aufnahmegeschwindigkeit durch den DAT ( $v_{max}$ ). Deshalb ist anzunehmen, dass insbesondere die Substanzen mit im Vergleich zum MPP<sup>+</sup> niedrigen Affinitätswerten zum DAT (höhere  $K_m$ -Werte) die moderate Selektivität dieser Substanzen zu DAT-exprimierenden Zellsystemen erklären können.

Interessanterweise zeigte nur ein  $\beta$ -Carbolinderivat, das 2-N-Methyl-Harmalinium, eine spezifische intrazelluläre Aufnahme durch den DAT, jedoch keine signifikante DAT-vermittelte Toxizität. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Toxizität könnte durch den hohen  $K_m$ -Wert, die niedrige maximale Aufnahmegeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) und die niedrige mitochondriale Inhibitionskapazität (Krueger et al. 1993) gegeben sein. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis ist, dass die dopaminerge Toxizität von 2-N-Methyl-Harmalinium durch DAT-Inhibitoren (Collins et al. 1995) nicht verhindert werden konnte, was einen DAT-unabhängigen Mechanismus der Toxizität möglich erscheinen lässt. Das würde einen - verglichen mit den anderen untersuchten 2-N-methylierten  $\beta$ -Carbolinen - unterschiedlichen Wirkmechanismus bedeuten. Für 2-Methyl-Isoharmalinium wurde aufgrund eines Mangels an Substanzmenge lediglich ein Versuch durchgeführt, bei dem es - wie beim 2-Methyl-Harmalinium - zwar zu einer konzentrationsabhängigen Zellreduktion in beiden Zelllinien kam, jedoch keine DAT-spezifische Toxizität nachgewiesen wurde. Versuche, die dieses Ergebnis bestätigen, sowie Uptake-Versuche mit dieser Substanz sind aufgrund der sehr nahen

strukturellen Verwandtschaft mit 2-Methyl-Harmaline besonders interessant und könnten weiteren Aufschluß über die molekularen Anforderungen an DAT-Substrate bringen.

Auch das 2,9-Dimethyl-4,9-dihydro-3h- $\beta$ -carboline-2-ium zeigt trotz 2-N-Methylierung keine DAT-spezifische Toxizität. Leider gibt es bisher keine andere Studie, in der diese Substanz im Hinblick auf Zytotoxizität untersucht wurde. Möglicherweise ist die Substanz durch die verzweigte Molekülstruktur kein geeignetes Substrat für den DAT.

Harmalol andererseits ist bei den hier durchgeführten Toxizitätsversuchen die einzige nicht 2-methylierte Substanz mit DAT-spezifischer Toxizität. In der Studie von Kim et al. (Kim et al. 2001) bewirkte Harmalol allerdings keine signifikante Zytotoxizität auf PC-12-Zellen. Es bewirkte zwar eine Inhibition der mitochondrialen Atmungskette, verstärkte jedoch die negative Wirkung der Katecholamine nicht. Harmalol reduzierte sogar die durch Dopamin und 6-Hydroxydopamin ausgelöste Mitochondrienschwellung im Gehirngewebe der Maus und das katecholamininduzierte Absterben von PC12-Zellen. Auch Lee und Kollegen (Lee et al. 2000) bestätigen die toxizitätsmildernde Wirkung von Harmalol: es schwächt die durch MPTP verursachte Schädigung von Gehirnzellen der Maus und den durch MPP<sup>+</sup> induzierten Schaden an Mitochondrien ab. Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse spiegeln die Spezifität - und Problematik der Zellmodelle - wider. Doch auch hier könnte die Untersuchung des Harmalols im Uptake-Versuch Klarheit bringen. Sollte sich die DAT-spezifische Toxizität durch die Aufnahme von Harmalol über den DAT erklären wäre dies ein Zeichen dafür, daß Harmalol und die in den anderen Versuchen verwendeten toxischen Substanzen kompetitive Substrate des DAT sind.

Die in dieser Studie verwendeten  $\beta$ -Carbolinderivate ermöglichen zwar keine quantitative Struktur-Selektivitäts-Beziehung, dennoch zeigt sich eine qualitative Richtung: Die intramolekulare Distanz zwischen dem Stickstoffatom und dem Zentrum des Benzen- oder Katecholrings ist eine der wichtigen Faktoren für die Affinität der Substanzen zum Dopamintransportmolekül. Die Konformation des Dopaminmoleküls auf der Aufnahmeseite des Dopamintransporters ist die extendierte oder trans-Form (Horn et al. 1974, Meiergerd und Schenk 1994). Der Abstand vom Stickstoffatom zum Ringzentrum beim MPP<sup>+</sup> und bei den  $\beta$ -Carbolinderivaten ist sehr ähnlich zu dem bei der extendierten Dopamininformation. Die Ladung des Stickstoffatoms scheint ein weiterer wichtiger Faktor für die Affinität zum DAT als auch für den DAT-vermittelten Transport einer Substanz zu sein (Matsubara et al. 1998b). Tatsächlich sind die DAT-vermittelte Toxizität und die intrazelluläre Aufnahme auf die 2N-methylierten  $\beta$ -Carboline beschränkt, welche eine Ladung vergleichbar mit der des Dopamins besitzen. Strukturell identischen, jedoch neutralen Substanzen hingegen fehlt diese selektive Toxizität gegenüber DAT-exprimierenden Zelllinien.

### 4.3 Dopaminerge Toxizität von Isoquinolinen

Bei den hier untersuchten Isoquinolinderivaten fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Zelllinien statt. Für 1-Methyl-TIQ und 6,7-Dimethoxy-TIQ lagen die  $TC_{50}$ -Werte über der Höchstkonzentration von 1000  $\mu\text{M}$ , bei 1-Benzyl-6,7-Dimethoxy-3,4-dihydro-Isoquinolin und 1-Benzyl-3,4-dihydro-Isoquinolin lagen sie im mittleren Mikromolarbereich.

Die im Vergleich zu  $\beta$ -Carbolinen hohen  $TC_{50}$ -Werte passen zu Beobachtungen von McNaught et al (1996), bei denen Isoquinoline im Vergleich zu  $\beta$ -Carbolinen schwächere Inhibitoren des Dopaminaufnahmesystems sind. Dies könnte daran liegen, dass der Abstand zwischen N-Atom und dem Zentrum des Benzen- oder Katecholrings wesentlich kürzer ist als im Dopamin oder MPP<sup>+</sup>. Die Quaternisation von Katechol-Isoquinolinen bewirkte in der Studie von Matsubara et al. (1998b) einen Verlust der Affinität für den DAT-vermittelten Influx. Dies würde erklären, weswegen 2-Methyl-Salsolinol weniger potent ist als R-Salsolinol. Die Hypothese von Matsubara ist, dass Katechol-Isoquinoline bereits wie Dopamin geladen und damit das geeignetere Substrat für den DAT sind. Matsubara berichtet über eine DAT-vermittelte, konzentrationsabhängige (Konzentrationen zwischen 0,5- 10 oder 1-25  $\mu\text{M}$ ) Akkumulation von unter anderem R-Salsolinol ( $K_m = 23,64 \mu\text{M}$ ,  $v_{max} = 3,57 \text{ pmol/mg Protein pro Min}$ ) und 2-Methyl-Isoquinolin ( $K_m = 10,30 \mu\text{M}$ ,  $v_{max} = 2,65 \text{ pmol/mg Protein pro Min}$ ) in Synaptosomen der Ratte. 2-Methyl-R-Salsolinol wurde nur bei hoher Inkubationskonzentration, d.h.  $> 10 \mu\text{M}$ , in Synaptosomen aufgenommen. Die Aufnahme konnte signifikant durch GBR geblockt werden. In niedrigeren Konzentrationen konnte keine Akkumulation von 2-Methyl-R-Salsolinol festgestellt werden. Andererseits wurden in der *in vitro*-Studie von Storch et al (2002) für 2-Methyl-Isoquinolin, 2-Methyl-Norsalsolinol und 2-Methyl-Salsolinol signifikant erhöhte Toxizitäten in der mit dem humanen DAT-transferierten Zelllinie HEK-(h)DAT-293 als auch in der Neuroblastomzelllinie der Maus, welche den Dopamintransporter der Maus stabil exprimieren (Neuro-2A-mDAT-Zelllinie), gegenüber den parentalien Zelllinien ohne DAT nachgewiesen. Die toxischen Effekte auf die HEK-(h)DAT-293-Zelllinie konnten durch den DAT-Inhibitor GBR12909 komplett auf das Niveau in der HEK-293-Zelllinie reduziert werden, was einen DAT-vermittelten Toxizitätsmechanismus wahrscheinlich macht.

Bei den hier untersuchten Isoquinolin-Derivaten ist ein DAT-vermittelter Toxizitätsmechanismus aufgrund der DAT-unabhängigen Zelltoxizitäten nicht anzunehmen. Andere Toxizitätsmechanismen, wie zum Beispiel über eine Radikalbildung, kommen in Betracht.

## 4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie bezüglich der DAT-Rolle bei der Vermittlung der selektiven Toxizität von  $\beta$ -Carbolinen und Isoquinolinen werfen einige Fragen auf, die Anstöße zu weiteren Forschungen bieten: Es bleibt zu untersuchen, ob die selektive Toxizität und intrazelluläre Aufnahme in dopaminerge neuronale Zellen *in vitro* und *in vivo* reproduzierbar sind, was ein weiteres schwerwiegendes Argument für die Schlüsselrolle des DAT in der Genese des IPS wäre. Dann wäre die Suche nach weiteren Substanzen mit DAT-vermittelter Toxizität und ihren intrazellulären Toxizitätsmechanismen ein wichtiger Schritt auf der Suche nach möglichen Präventionsmaßnahmen oder medikamentösen Therapien. Ebenso würden dann Untersuchungen zur Lokalisation, Expression und funktionellen Auswirkung von Genpolymorphismen des DAT einen Beitrag zur molekularen Erforschung des IPS darstellen, die in der Zukunft einen Ansatzpunkt für das Screening auf ein erhöhtes IPS-Risiko und letztlich für die Gentherapie des IPS bieten könnten.

## 5. Zusammenfassung

Nach der Erforschung des MPP<sup>+</sup> (1-Methyl-4-phenyl-Pyridinium) als ein exogenes Neurotoxin, welches ein Parkinson-ähnliches Syndrom auslöst, rückten  $\beta$ -Carboline und Isoquinoline als Substanzen mit MPP<sup>+</sup>- verwandten Molekülstrukturen als mögliche ubiquitäre Toxine ins engere Forschungsfeld des Morbus Parkinson. In dieser Studie untersuchte ich mittels MTT-Test die konzentrationsabhängige Zytotoxizität von 21  $\beta$ -Carbolin- und 4 Isoquinolinderivaten auf die HEK-293- und die mit dem humanen Dopamintransporter transfizierte HEK-(h)DAT-293-Zelllinie. Des Weiteren untersuchte ich die konzentrationsabhängige intrazelluläre Aufnahme von 11 Betacarbolinderivaten in diese Zelllinien anhand der Fluoreszenzmessung.

Bei den untersuchten Isoquinolinen (1-Methyl-Tetrahydroisoquinolin, 1-Benzyl-6,7-dimethoxy-3,4-Dihydroisoquinolin, 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin, 1-Benzyl-3,4-Dihydroisoquinolin) fand ein konzentrationsabhängiger Zelluntergang ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Zelllinien statt. Für die untersuchten  $\beta$ -Carboline konnte ich zeigen, dass beim Großteil der 2*N*-methylierten  $\beta$ -Carboline eine signifikante ( $p < 0,05$ ) DAT-spezifische Toxizität besteht. In abnehmender Reihenfolge der selektiven Toxizität sind dies: 2,9-Dimethyl-Harminium > 2-Methyl-Harminium > 2,9-Dimethyl-Harmanium > Harmalol > 2-Methyl-Norharmanium > 2-Methyl-Harmanium > 2,9-Dimethyl-Norharmanium > 1,2-Dimethyl-9*h*- $\beta$ -carbolin-2-ium. Die  $I_{DAT}$ -Werte ( $I_{DAT} = TC_{50\ wt} / TC_{50\ DAT}$ ), welche die DAT-spezifische Toxizität anzeigen, lagen zwischen 4,5 für 2,9-Dimethyl-Harminium und 1,29 für 1,2-Dimethyl-9*h*- $\beta$ -carbolin-2-ium. Für die anderen untersuchten Betacarboline (Norharman, Harminium, Harmanium, Harmaline, Harmol, 2-Propyl-9*h*- $\beta$ -carbolin-2-ium, 6-Methoxy-Tetrapyridol, Tetrapyridol, 6-Methoxy-Harmalan, Harmanium-1,2,3,4-tetrahydro-3-carboxyl, 2,9-Dimethyl-4,9-dihydro-3*h*- $\beta$ -carbolin-2-ium, sowie 2-Methyl-Harmalinium) ergab sich eine konzentrationsabhängige Toxizität ohne signifikanten Unterschied im Zellüberleben. Die halbmaximal toxischen Konzentrationen ( $TC_{50\ wt / DAT}$ ) lagen im Mikromolarbereich, bzw. über der maximalen Versuchskonzentration von einem Millimol (Harmanium-1,2,3,4-tetrahydro-3-carboxyl, 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin und 1-Methyl-Tetrahydroisoquinolin). Somit ist einerseits Harmalol die einzige nicht 2*N*-methylierte Substanz mit DAT-spezifischer Toxizität, andererseits weisen 2,9-Dimethyl-4,9-dihydro-3*h*- $\beta$ -carbolin-2-ium, 2-Methyl-Harmalinium und 2-Methyl-Isoharmalinium trotz 2*N*-Methylierung keine DAT-spezifische Toxizität auf.

In den Aufnahmeversuchen konnten nur für die 2*N*-Methyl- und 2*N*,9*N*-Dimethyl-Derivate von Norharman, Harman und Harminium sowie für 2*N*-Methyl-Harmalinium (welches keine DAT-spezifische Toxizität besitzt) die DAT-vermittelte intrazelluläre Aufnahme nachgewiesen werden. Der Dopamintransporter vermittelt somit die Selektivität der durch 2*N*-methylierte  $\beta$ -Carboline induzierte Zytotoxizität gegenüber dopaminergen Neuronen. Zwischen den  $I_{DAT}$ -Werten und den berechneten

Michaeliskonstanten  $K_m$  als Parameter der Aufnahmekinetik besteht eine schwache Relation. Die niedrige Affinität von  $\beta$ -Carbolinen zum DAT ist wahrscheinlich der limitierende Faktor für ihre selektive dopaminerge Toxizität.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist die Hypothese von Matsubara (Matsubara et al. 1998b) anzunehmen, dass ein dem Dopamin ähnlicher Abstand zwischen dem 2-N-Stickstoffatom und dem Zentrum des Benzen- oder Katecholrings sowie eine Dopamin-ähnliche Ladung des Stickstoffatoms wichtige Faktoren für die Affinität der Substanzen zum DAT als auch für die intrazelluläre Aufnahme über ihn sind. Sie stützen die Hypothese, daß selektive Toxinereignisse gegenüber dopaminergen Neuronen durch die DAT-vermittelte Aufnahme exogener und/ oder endogener 2-N-methylierter  $\beta$ -Carbolinderivate eine wichtige Rolle in der dopaminergen Neurodegeneration beim Morbus Parkinson spielen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Airaksinen M, Kari I:  $\beta$ -Carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. Part I: Occurrence, origin and metabolism. *Med. Biol.* 59: 21-34 (1981)
- Akaneya Y, Takahashi M, Hatanaka H: Involvement of free radicals in MPP<sup>+</sup> neurotoxicity against rat dopaminergic neurons in culture. *Neurosci. Lett.* 193: 53-56 (1995)
- Albores R, Neafsey EJ, Drucker G, Fields JZ, Collins MA: Mitochondrial respiratory inhibition by N-methylated  $\beta$ -carboline derivatives structurally resembling N-methyl-4-phenylpyridine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87: 9368-9372 (1990)
- Amara SG, Kuhar MJ: Neurotransmitter transporters: recent progress. *Ann. Rev. Neurosci.* 16:73-93 (1993)
- Ambrosio S, Espino A, Cutillas B, Bartrons R: MPP<sup>+</sup> toxicity in rat striatal slices: relationship between non-selective effects and free radical production. *Neurochem. Res.* 21: 73-78 (1996)
- Barker S, Harrison R, Monti J, Brown G, Christian S: Identification and quantification of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline, 2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline, and 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline as in vivo constituents of rat brain and adrenal gland. *Biochem. Pharmacol.* 30: 9-17 (1981)
- Barneoud P, Mazadier M, Miquet JM, Parmentier S, Dubedat P, Doble A, Boireau A: Neuroprotective effects of riluzole on a model of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience* 74: 971-983 (1996)
- Beal MF: Ageing, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* 38: 357-366 (1995)
- Beal MF: Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann. Neurol.* 44: 110-114 (1998)
- Benazzouz A, Boraud T, Dubedat P, Boireau A, Stutzmann JM, Gross C: Riluzole prevents MPTP-induced parkinsonism in the rhesus monkey: a pilot study. *Eur. J. Pharmacol.* 284: 299-307 (1995)
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT: Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* 24: 308-318 (2002)
- Bezard E, Stutzmann JM, Imbert C, Boraud T, Boireau A, Gross CE: Riluzole delayed appearance of parkinsonian motor abnormalities in a chronic MPTP monkey model. *Eur. J. Pharmacol.* 356: 101-104 (1998)
- Biagi GL, Pietrogrande MC, Barbaro AM, Guerra MC, Borea PA and Forti GC: Study of the lipophilic character of a series of beta-carbolines. *J. Chromatogr.* 469: 121-126 (1989)

- Boer GJ: Ethical guidelines for the use of human embryonic or fetal tissue for experimental and clinical neurotransplantation and restoration (NECTAR). *J. Neurol.* 242: 1-13 (1994)
- Boireau A, Dubedat P, Bordier F, Imperato A, Moussaoui S: The protective effects of riluzole in the MPTP model of Parkinson's disease in mice is not due to a decrease in MPP<sup>+</sup> accumulation. *Neuropharmacol.* 39: 1016-1020 (2000)
- Booij J, Habraken JB, Bergmans P, Tissingh G, Winogrodzka A, Wolters EC, Janssen AG, Stoof JC, van Royen EA: Imaging of dopamine transporters with iodine-123-FP-CIT SPECT in healthy controls and patients with Parkinson's disease. *J. Nucl. Med.* 39: 1879-1884 (1998)
- Booij J, Tissingh G, Boer GJ, Speelman JD, Stoof JC, Janssen AG, Wolters EC, van Royen EA: [<sup>123</sup>I]FP-CIT SPECT shows a pronounced decline of striatal dopamine transporter labelling in early and advanced Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 62: 133-140 (1997)
- Bosin TR, Borg S, Faull KF: Harman in rat brain, lung and human CSF: effect of alcohol consumption. *Alcohol* 5: 505-511 (1989)
- Buck KJ, Amara SG: Chimeric dopamine-norepinephrine transporters delineate structural domains influencing selectivity for catecholamines and 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12584- 12588 (1994)
- Buckholtz NS, Boggan WO: Monoamine oxidase inhibition in brain and liver produced by  $\beta$ -carbolines: structure-activity relationships substrate specificity. *Biochem. Pharmacol.* 26:1991-1996 (1977)
- Buckman TD, Chang R, Sutphin MS, Eiduson S: Interaction of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion with human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 897-904 (1988)
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ: A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4546-4550 (1983)
- Cadet JL, Brannock C: Free radicals and the pathobiology of the brain dopamine systems. *Neurochem. Int.* 32: 117-131 (1998)
- Cerruti C, Walther DM, Kuhar MJ, Uhl GR: Dopamine transporter mRNA expression is intense in rat midbrain neurons and modest outside midbrain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 18: 181-186 (1993)
- Charlton CG, Mack J: Substantia nigra degeneration and tyrosine hydroxylase depletion caused by excess S-adenosylmethionine in the rat brain: support for an excess methylation hypothesis for parkinsonism. *Mol. Neurobiol.* 9: 149-161 (1994)

- Charlton CG, Crowell B.Jr: Striatal dopamine depletion, tremors, and hypokinesia following the intracranial injection of S-adenosylmethionine: a possible role of hypermethylation in parkinsonism. *Mol. Chem. Neuropathol.* 26: 269-284 (1995)
- Chiueh CC, Krishna G, Tulsi P, Obata T, Lang K, Huang SJ, Murphy DL: Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation through dopamine autoxidation in the caudate nucleus: effects of MPP<sup>+</sup>. *Free Radic. Biol. Med.* 13: 581-583 (1992)
- Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM: Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nature Medicine* 7:1144-1150 (2001)
- Ciliax BJ, Heilman C, Demchshyn LL, Pristupa ZB, Ince E, Hersch SM, Niznik HB, Levey AI: The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *J. Neurosci.* 15:1714-1723 (1995)
- Clayton DF, George JM: The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* 21: 249-254 (1998)
- Cobuzzi RJ, Neafsey EJ, Collins MA: Differential cytotoxicities of N-methyl- $\beta$ -carbolinium analogues of MPP<sup>+</sup> in PC12 cells: insights into potential neurotoxicants in Parkinson's disease, *J. Neurochem.* 62: 1503-1510 (1994)
- Collins M: Mammalian alkaloids. In Brossi, A. (Ed), *The Alkaloids*, Vol. XXI, Academic Press, New York: 329-358 (1983)
- Collins MA: Potential parkinsonism protoxicants within and without. *Neurobiol. Aging* 15: 277- 278 (1994)
- Collins MA, Neafsey EJ, Matsubara K, Cobuzzi Jr. RJ, Rollema H: Indole-N-methylated  $\beta$ -carbolinium ions as potential brain-bioactivated neurotoxins. *Brain Res.* 570: 154-160 (1992)
- Collins MA, Slobodnik L and Neafsey EJ: Inhibitors of NO synthase and poly(ADP- ribose) synthase (PARS) do not block toxic actions of  $\beta$ -carbolinium cations or MPP<sup>+</sup> in mesencephalic cultures. *Abstr. Soc. Neurosci.* 21: 1259 (1995)
- Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114: 2283-2301 (1991)
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ: Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues, *Psychiat. Res.* 1: 249- 254 (1979)
- Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD: Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 52: 381-389 (1989)

- Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, Slater TF, Wells RF, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD: Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: An HPLC and ESR study. *Mov. Disord.* 9: 92- 97 (1994)
- Di Monte D, Sandy MS, Ekstrom G, Smith MT: Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>) cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 303-309 (1986a)
- Di Monte D, Jewell SA, Ekstrom G, Sandy MS, Smith MT: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>) cause rapid ATP depletion in isolated hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 310-315 (1986 b)
- Di Monte D, Wu EY, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW: Toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in primary cultures of mouse astrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261: 44-49 (1992)
- Doble A: The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacol. and Ther.* 81: 163-221 (1999)
- Drucker G, Raikoff K, Neafsey EJ, Collins MA: Dopamine uptake inhibitory capacities of beta-carboline and 3,4-dihydro-beta-carboline analogs of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) oxidation products. *Brain Res.* 509: 125- 133 (1990)
- Dunnett SB, Björklund A: Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 399: A32-A39 (1999)
- Duvoisin RC: Role of genetics in the cause of Parkinson's disease. *Movement Disorders* 13: 7-12 (1998)
- Estevez AG, Stutzmann JM, Barbeito L: Protective effect of riluzole on excitatory amino acid-mediated neurotoxicity in motoneuron-enriched cultures. *Eur. J. Pharmacol.* 280: 47-53 (1995)
- Fahn S, Cohen G: The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann. Neurol.* 32: 804- 812 (1992)
- Fields JZ, Albores R, Neafsey EJ, Collins MA: Inhibition of mitochondrial succinate oxidation-similarities and differences between N-methylated beta-carbolines and MPP<sup>+</sup>. *Arch. Biochem. Biophys.* 294: 539-543 (1992)
- Forno LS, Langston JW, DeLanney LE, Irwin I, Ricaurte A: Locus coeruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann. Neurol.* 20: 449-455 (1986)
- Freed C, Revay R, Vaughan RA, Kriek E, Grant S, Uhl GR, Kuhar MJ: Dopamine transporter immunoreactivity in rat brain. *J. Comp. Neurol* 59: 340- 349 (1995)
- Gage FH: Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433-1438 (2000)

- Gainetdinov RR, Fumagalli F, Jones SR, Caron MG: Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J. Neurochem.* 69: 1322-1325 (1997)
- Gasser T, Wszolek ZK, Trofatter J, Ozelius L, Uitti RJ, Lee CS, Gusella J, Pfeiffer RF, Calne DB, Breakfield XO: Genetic linkage studies in autosomal dominant parkinsonism: evaluation of seven candidate genes. *Ann. Neurol.* 6: 387-396 (1994)
- Gasser T, Müller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V: A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat. Genet.* 18: 262-265 (1998)
- Gearhart DA, Neafsey EJ, Collins MA: Characterization of brain beta-carboline-2N-Methyltransferase, an enzyme that may play a role in idiopathic Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* 22: 113-121 (1997)
- Gearhart DA, Collins MA, Lee JM, Neafsey EJ: Increased beta-carboline 9N-methyltransferase activity in the frontal cortex in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 7: 201-211 (2000)
- Gearhart DA, Neafsey EJ, Collins MA: Phenylethanolamine N-methyltransferase has beta-carboline 2N-methyltransferase activity: hypothetical relevance to Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* 40: 611-620 (2002)
- Gerlach M, Riederer P, Przuntek H, Youdim MBH: MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 208: 273-286 (1991)
- Gibb WR, Lees AJ: Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal populations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 54: 388-396 (1991)
- Giros B, Caron MG: Molecular characterization of the dopamine transporter (Review). *Trends Pharmacol. Sci.* 14:43-49 (1993)
- Gonzalez-Polo RA, Soler G, Rodriguezmartin A, Moran JM, Fuentes JM: Protection against MPP<sup>+</sup> neurotoxicity in cerebellar granule cells by antioxidants. *Cell Biol. Int.* 28: 373-380 (2004)
- Green S, Buttrum S, Molloy H, Steventon G, Sturman S, Waring R, Pall H, Williams A: N-methylation of pyridines in Parkinson's disease. *Lancet* 338: 120-121 (1991)
- Gross G, Turesky R, Fay L, Stillwell W, Skipper P, Tannenbaum S: Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and in grill scrapings, *Carcin.* 14: 2313-2318 (1993)
- Hagell P, Schrag A, Piccini P, Jahanshahi M, Brown R, Rehnacrona S, Widner H, Brundin P, Rothwell JC, Odin P, Wenning GK, Morrish P, Gustavii B, Bjorklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Quinn NP, Lindvall OTI: Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. *Brain* 122: 1121-1132 (1999)
- Halliwell B: Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59: 1609-

1623 (1992)

- Hamann J, Rommelspacher H, Storch A, Reichmann H, Gilles G: Neurotoxic mechanisms of 2,9 dimethyl-beta-carbolinium ion in primary dopaminergic culture. *J. Neurochem.* 98: 1185-99 (2006)
- Hasegawa S, Matsubara K, Takahashi A, Naoi M, Nagatsu T: Inhibition of type A monoamine oxidase by N-methyl  $\beta$ -carbolinium ions. *Biogen. Amines* 11: 295-303 (1995)
- Heikkila RE, Manzino L, Cabbat FS, Duvoisin RC: Studies in the oxidation of the dopaminergic neurotoxin MPTP by monoamine oxidase B. *J. Neurochem.* 45: 1049-1054 (1985)
- Hersch SM, Yi H, Heilman CJ, Edwards RH, Levey AI: Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra. *J. Comp. Neurol.* 388: 211-227 (1997)
- Ho BT, Gardner PM, Walker KE: Inhibition of MAO by  $\beta$ -Carbolinium Halides. *J. Pharmaceutical Sciences* 62: 36-39 (1973)
- Hoffer BJ, Olson L: Ethical issues in brain-cell transplantation. *Trends Neurosci.* 14: 384-388 (1991)
- Hoppel CL, Grinblatt D, Kowk HC, Arora PK, Singh MP, Sayre LM, Greenblatt D: Inhibition of mitochondrial respiration by analogs of 4-phenylpyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium cation (MPP<sup>+</sup>), the neurotoxic metabolite of MPTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 148: 684-693 (1987)
- Horn AS: The conformation of dopamine at its uptake site; further studies with rigid analogues. *J. Pharm. Pharmacol.* 26: 735-737 (1974)
- Itano Y, Nomura Y: 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) causes DNA fragmentation and increases the Bcl-2-expression in the human neuroblastoma, SH-SY5Y cells, through different mechanisms. *Brain Res.* 704: 240-245 (1995)
- Javitch JA, Snyder SH: Uptake of MPP<sup>+</sup> by dopaminergic neurons explain selectivity of parkinson inducing neurotoxin MPTP. *Eur. J. Pharmacol.* 106: 455- 456 (1984)
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH: Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explain selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2173-2177 (1985)
- Jenner P, Olanow CW: Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 44: 72-84 (1998)
- Kim DH, Jang YY, Han ES, Lee CS: Protective effect of harmaline and harmalol against dopamine- and 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage of brain mitochondria and synaptosomes, and viability loss of PC12 cells. *Eur. J. Neurosci.* 13: 1861-1872 (2001)

- Kim H, Sablin SO, Ramsay RR: Inhibition of monoamine oxidase A by  $\beta$ -carboline derivatives. Arch. Biochem. Biophys. 337: 137- 142 (1997)
- Kim JW, Kim DH, Kim SH, Cha JK: Association of the dopamine transporter gene with Parkinson's disease in Korean patients. J. Korean Med. Sci. 15: 449-451 (2000)
- Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O: Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. N. Engl. J. of Med. 318: 876-880 (1988)
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N: Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature 392: 605-608 (1998)
- Kitayama S, Shimada S, Uhl GR: Parkinsonism-inducing neurotoxin MPP<sup>+</sup>: uptake and toxicity in non-neuronal COS cells expressing dopamine transporter cDNA. Ann. Neurol. 32: 109-111 (1992)
- Kitayama S, Mitsuhashi C, Davis S, Wang JB, Sato T, Morita K, Uhl GR, Dohi T: MPP<sup>+</sup> toxicity and plasma membrane dopamine transporter: study using cell lines expressing the wild-type and mutant rat dopamine transporters. Biochimica et Biophysica Acta 1404: 305-313 (1998)
- Kordower JH, Goetz CG, Freeman TB, Olanow CW: Dopaminergic transplants in patients with Parkinson's disease: neuroanatomical correlates of clinical recovery. Exp. Neurol. 144: 41-46 (1997)
- Kotake Y, Tasaki Y, Makino Y, Ohta S, Hirobe M: 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline as a parkinsonism-inducing agent: a novel endogenous amine in mouse brain and parkinsonian CSF. J. Neurochem. 65: 2633- 2638 (1995)
- Kotake Y, Yoshida Y, Ogawa M, Tasaki Y, Hirobe M, Ohta S: Chronic administration of 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous amine in the brain, induces Parkinsonism in a primate. Neurosci. Lett. 217: 69-71 (1996)
- Krige D, Carroll MT, Cooper JM, Marsden CD, Schapira AH: Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease: the Royal Kings and Queens Parkinson's disease research group. Ann. Neurol. 32: 782-788 (1992)
- Krueger MJ, Tan AK, Ackrell BA, Singer TP: Is complex II involved in the inhibition of mitochondrial respiration by N-methyl-4-phenylpyridinium cation (MPP<sup>+</sup>) and N-methyl-beta-carbolines? Biochem. J. 291: 673-676 (1993)
- Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S: Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. Nature Genet. 18: 106-108 (1998)

- Kutty RK, Santostasi G, Horng J, Krishna G: MPTP-induced ATP depletion and cell death in neuroblastoma x glioma hybrid NG 108-15 cells: protection by glucose and sensitisation by tetraphenylborate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107: 377-388 (1991)
- Lang AE, Lozano AM: Parkinson's disease. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339: 1044-1053 (1998a)
- Lang AE, Lozano AM: Parkinson's disease. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339: 1130-1143 (1998b)
- Lange KW, Youdim MB, Riederer P: Neurotoxicity and neuroprotection in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 38: 27-44 (1992)
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I: Chronic parkinsonism in humans due to a product of amphetamine-analog synthesis. *Science* 219: 979-980 (1983)
- Langston JW, Forno LS, ebert CS, Irwin I: Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res.* 292: 390-394 (1984)
- Lazzarini AM, Myers RH, Zimmerman TR, Mark MH, Golbe LI, Sage JI: A clinical genetic study of Parkinson's disease: evidence for dominant transmission. *Neurology* 44: 499- 506 (1994)
- Le Couteur DG, Leighton PW, McCann SJ, Pond S: Association of a polymorphism in the dopamine-transporter gene with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 12: 760-763 (1997)
- Lee CS, Han ES, Jang YY, Han JH, Ha HW, Kim DE. Protective effect of harmalol and harmaline on MPTP neurotoxicity in the mouse and dopamine-induced damage of brain mitochondria and PC12 cells. *J. Neurochem.* 75:521-531 (2000)
- Leighton PW, Le Couteur DG, Pang CC, McCann SJ, Chan D, Law LK, Kay R, Pond SM, Woo J: The dopamine transporter gene and Parkinson's disease in a Chinese population. *Neurology* 49: 1577-1579 (1997)
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Gyongyi H, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH: The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395: 451-452 (1998)
- Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD: Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247: 574-577 (1990)
- MacIver MB, Amagasa SM, Mikulec AA, Monroe FA: Riluzole anesthesia: use-dependent block of presynaptic glutamate fibers. *Anesthesiology* 85: 626-634 (1996)

- Marsden CD, Olanow CW: The causes of Parkinson's disease are being unraveled and rational neuroprotective therapy is close to reality. *Ann. Neurol* 44: 189-196 (1998)
- Martin D, Thompson MA, Nadler JV: The neuroprotective agent riluzole inhibits release of glutamate and aspartate from slices of hippocampal area CA1. *Eur. J. Pharmacol.* 250: 473-476 (1993)
- Maruyama W, Nakahara D, Ota M, Takahashi T, Takahashi A, Nagatsu T, Naoi M: N-methylation of dopamine-derived 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, (R)-salsolinol, in rat brains: in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* 59: 395-400 (1992)
- Maruyama W, Dostert P, Matsubara K, Naoi M: N-methyl(R)salsolinol produces hydroxyl radicals: involvement to neurotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 19: 67-75 (1995)
- Maruyama W, Abe T, Tohgi H, Dostert P, Naoi M: A dopaminergic neurotoxin, (R)-N-methylsalsolinol, increases in parkinsonian cerebrospinal fluid. *Ann. Neurol.* 40: 119-122 (1996)
- Marx FP, Holzmann C, Strauss KM, Li L, Eberhardt O, Gerhardt E, Cookson MR, Hernandez D, Farrer MJ, Kachergus J, Engelender S, Ross CA, Berger K, Schols L, Schulz JB, Riess O, Kruger R: Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Human Mol. Genetics* 12: 1223-1231 (2003)
- Matsubara K, Neafsey EJ, Collins MA: Novel S-adenosylmethionine-dependent indole-n-methylation of  $\beta$ -carbolines in brain particulate fractions. *J. Neurochem.* 59: 505-510 (1992)
- Matsubara K, Collins MA, Akane A, Ikebuchi J, Neafsey EJ, Kagawa M, Shiono H: Potential bioactivated neurotoxicants, N-methylated  $\beta$ -carbolinium ions are present in human brain. *Brain Res.* 610: 90-96 (1993)
- Matsubara K, Idzu T, Kobayashi Y, Nakahara D, Maruyama W, Kobayashi S, Kimura K, Naoi M: N-methyl-4-phenylpyridinium and an endogenously formed analog, N-methylated beta-carbolinium, inhibit striatal tyrosine hydroxylation in freely moving rats. *Neurosci. Lett.* 199: 199-202 (1995a)
- Matsubara K, Kobayashi S, Kobayashi Y, Yamashita K, Koide H, Hatta M, Iwamoto K, Tanaka O, Kiumura K:  $\beta$ -Carbolinium cations, endogenous MPP<sup>+</sup>- analogs, in the lumbar cerebrospinal fluid of parkinsonian patients. *Neurology* 45: 2240- 2245 (1995b)
- Matsubara K, Gonda T, Sawada H, Uezono T, Kobayashi Y, Kawamura T, Ohtaki K, Kimura K and Akaike A: Endogenously occurring beta-carboline induces parkinsonism in nonprimate animals: a possible causative protoxin in idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 70: 727-735 (1998a)
- Matsubara K, Senda T, Uezono T et al: Structural significance of azaheterocyclic amines related to Parkinson's disease for dopamine transporter. *Eur. J. Pharmacol.* 348: 77-84 (1998b)

- McKay R: Stem cells in the central nervous system. *Science* 276: 66-71 (1997)
- McNaught KS, Altomare C, Cellamare S, Carotti A, Thull U, Carrupt PA, Testa B, Jenner P, Marsden CD: Inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase by isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Neuroreport* 6: 1105-1108 (1995a)
- McNaught KS, Thull U, Carrupt PA, Altomare C, Cellamare S, Carotti A, Testa B, Jenner P, Marsden CD: Inhibition of complex I by isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Biochem. Pharmacol.* 50: 1903-1911 (1995b)
- McNaught KS, Carrupt PA, Altomare C, Cellamare S, Carotti A, Testa B, Jenner P, Marsden CD: Isoquinoline derivatives as endogenous neurotoxins in the aetiology of Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* 56: 921-933 (1998)
- Meiergerd SM, Schenk JO: Striatal transporter for dopamine: catechol structure-activity studies and susceptibility to chemical modification. *J. Neurochem.* 62: 998- 1008 (1994)
- Melchior CM, Collins MA: The routes and significance of endogenous synthesis of alkaloids in animal. *CRC Crit.Rev.Toxicol.* 10: 313-356 (1982)
- Michel PP, Dandapani BK, Knusel B, Sanchez-Ramos J, Hefti F: Toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium for rat dopaminergic neurons in culture: selectivity and irreversibility. *J. Neurochem.* 54: 1102-1109 (1990)
- Mihatsch W, Russ H, Gerlach M, Riederer P, Przuntek H: Treatment with antioxidants does not prevent loss of dopamine in the striatum of MPTP-treated common marmosets: preliminary observations. *J. Neural. Transm. Park. Dis. Dement. Sect. 3:* 73-78 (1991)
- Mizuno Y, Sone N, Saitoh T: Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain. *J. Neurochem.* 48: 1787-1793 (1987)
- Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kagawa Y: Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 1450-1455 (1989)
- Mizuno Y, Ikebe S, Hattori N, Mochizuki H, Nakagawa-Hattori Y, Kondo T: Studies on the pathogenesis of Parkinson's disease in Japan. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 19: 105-121 (1994)
- Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S, Hattori N, Kobayashi T, Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kondo T: Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 44: S99-109 (1998)
- Mizuno Y, Hattori N, Mori H, Suzuki T, Tanaka K: Parkin and Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology* 14: 477-482 (2001)
- Moghal S, Rajput AH, D'Arcy C, Rajput R: Prevalence of movement disorders in elderly community

- residents. *Neuroepidemiol.* 13: 175-178 (1994)
- Morikawa N, Naoi M, Maruyama W, Ohta S, Kotake Y, Kawai H, Niwa T, Dostert P, Mizuno Y: Effects of various tetrahydroisoquinoline derivatives on mitochondrial respiration and electron transfer complexes. *J. Neural. Trans.* 105: 677-688 (1998)
- Morino H, Kawarai T, Izumi Y, Kazuta T, Oda M, Komure O, Udaka F, Kameyama M, Nakamura S, Kawakami H: A single nucleotide polymorphism of dopamine transporter gene is associated with Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 47: 528-531 (2000)
- Mosmann, T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63 (1983)
- Mytilineou C, Friedman L: Studies on the metabolism and toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in cultures of embryonic rat mesencephalon. *J. Neurochem.* 51: 750-755 (1988)
- Mytilineou C, Werner P, Molinari S, Di Rocco A, Cohen G, Yahr MD: Impaired oxidative decarboxylation of pyruvate in fibroblasts from patients with Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 8: 223-228 (1994)
- Nagatsu T, Hirata Y: Inhibition of the tyrosine hydroxylase system by MPTP, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) and the structurally related compounds in vitro and in vivo. *Eur. Neurol.* 26: 11-15 (1986)
- Naoi M, Matsubara S, Parvez H, Takahashi T, Nagatsu T: A N-methyltransferase in human brain catalyses N-methylation of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, a precursor of a dopaminergic neurotoxin, N-methylisoquinolinium ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161: 1213- 1219 (1989)
- Naoi M, Maruyama W, Zhang JH, Takahashi T, Deng Y, Dostert P: Enzymatic oxidation of dopaminergic neurotoxin, 1(R)-2N-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, into 1,2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium-ion. *Life Sci.* 57:1061-1066 (1995)
- Naoi M, Maruyama W, Dostert P, Kohda K, Kaiya T: A novel enzyme enantio-selective synthesizes (R)-salsolinol, a precursor of dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol. *Neurosci. Lett.* 212:183-186 (1996a)
- Naoi M, Maruyama W, Dostert P, Hashizume Y, Nakahara D, Takahashi T, Ota M: Dopamine-derived endogenous 1(R),2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl-(R)-salsolinol, induced parkinsonism in rat: biochemical, pathological and behavioral studies. *Brain Res.* 709: 285-295 (1996b)
- Naoi M, Maruyama W, Nakao N, Ibi T, Sahashi K, Benedetti MS: (R)salsolinol N-methyltransferase activity increases in parkinsonian lymphocytes. *Ann. Neurol.* 43: 212-216 (1998)

- Neafsey EJ, Drucker G, Raikoff K, Collins MA: Striatal dopaminergic toxicity following intranigral injection in rats of 2-methyl-norharman, a  $\beta$ -carbolinium analog of N-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Neurosci.Lett.* 105: 344-349 (1989)
- Neafsey EJ, Albores R, Gearhart D, Kindel G, Raikoff K, Tamayo F, Collins MA: Methyl-beta-carbolinium analogs of MPP<sup>+</sup> cause nigrostriatal toxicity after substantia nigra injections in rats. *Brain Res.* 675: 279-288 (1995)
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE: Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenylpyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 36: 2503-2508 (1985)
- Nishimura M, Kaji R, Ohta M, Mizuta I and Kuno S: Association between dopamine transporter gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease in Japan. *Mov. Disord.* 17: 831-832 (2002)
- Niwa T, Takeda N, Tatematsu A, Matsuura S, Nagatsu T: Migration of tetrahydroisoquinoline, a possible parkinsonian neurotoxin, into monkey brain from blood as provided by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 492: 85- 91 (1988)
- Niwa T, Yoshizumo H, Tatematsu A, Matsuura S, Nagatsu T: Presence of tetrahydroisoquinoline, a parkinsonism-related compound, in foods. *J. Chromatogr.* 493: 347- 352 (1989)
- Niwa T, Takeda N, Yoshizumi H, Tatematsu A, Yoshida M, Dostert P, Naoi M, Nagatsu T: Presence of 2-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and 1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, novel endogenous amines, in parkinsonian and normal human brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2: 603- 609 (1991)
- Nutt JG, Carter JH, Sexton GJ: The dopamine transporter: importance in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 55: 766-773 (2004).
- Olanow CW, Kordower JH, Freeman T: Fetal nigral transplantation as therapy for Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 19: 102-109 (1996)
- Origitano T, Hannigan J, Collins MA: Rat brain salsolinol and blood-brain barrier. *Brain Res.* 224: 446-451 (1981)
- Pakkenberg B, Moller A, Gundersen HJ, Mouritzen Dam A, Pakkenberg H: The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 54: 30-33 (1991)
- Pena C, Medina JH, Novas ML, Paladini AC, deRobertis E: Isolation and identification in bovine cerebral cortex of n-butyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylate, a potent benzodiazepine binding inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4952-4956 (1986)

- Perry TL, Yong VW, Clavier RM, Jones K, Wright JM, Foulks JG, Wall RA: Partial protection from the dopaminergic neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by different antioxidants in the mouse. *Neurosci. Lett.* 60: 109-114 (1985)
- Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehncrona S, Widner H, Lindvall O: Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nature Neurosci.* 2: 1137-1140 (1999)
- Pifl C, Giros B, Caron MG: Dopamine transporter expression confers cytotoxicity to low doses of the Parkinsonism-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurosci.* 13: 4246-4253 (1993)
- Pifl C, Hornykiewicz O, Giros B and Caron MG: Catecholamine transporters and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity: studies comparing the cloned human noradrenaline and human dopamine transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 1437-1443 (1996)
- Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Die SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC: Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 274: 1197-1199 (1996)
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL: Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047 (1997)
- Przedorski S: Advances in our knowledge of MPTP action and mechanism. In: *Neurotoxic Factors in Parkinson's Disease and Related Disorders* (Storch A and Collins MA eds), 41-54 (2000), Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, USA.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V: Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov. Disord.* 13: 35-38 (1998)
- Ramsay RR, Singer TP: Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 261: 7585-7587 (1986a)
- Ramsay RR, Salach JI, Singer TP: Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD<sup>+</sup> - linked substrates by MPP<sup>+</sup>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 743-748 (1986 b)
- Ramsay RR, Singer TP: Relationship of superoxide generation and lipid peroxidation to the inhibition of NADH-Q oxido-reductase by rotenone, piericidine A, and MPP<sup>+</sup>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 47-52 (1992)
- Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K, Youdim MBH: Transition

- metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in Parkinsonian brains. *J. Neurochem.* 52: 515-520 (1989)
- Rollema H, Booth RG, Castagnoli Jr. N: In vivo dopaminergic neurotoxicity of the 2- $\beta$ -methylcarbolinium ion, a potential endogenous MPP<sup>+</sup> analog. *Eur. J. Pharmacol.* 133: 131-134 (1988)
- Rommelspacher H, Susilo R: Tetrahydroisoquinolines and beta-carbolines: putative natural substances in plants and mammals. *Prog. Drug Res.* 29: 415-459 (1985)
- Rommelspacher H, May T, Susilo R:  $\beta$ -Carbolines and tetrahydroisoquinolines: detection and function in mammals. *Planta. Med.* 57: 85- 92 (1991)
- Rossetti ZL, Sotgiu A, Sharp DE, Hadjiconstantinou M, Neff NH: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and free radicals in vitro. *Biochem. Pharmacol* 37: 4573-4574 (1988)
- Sayre LM, Wang F, Arora PK, Riachi NJ, Harik SI, Hoppel CL: Dopaminergic neurotoxicity in vivo and inhibition of mitochondrial respiration in vitro by possible endogenous pyridinium-like substances. *J. Neurochem.* 57: 2106-2115 (1991)
- Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD: Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54: 823-827 (1990)
- Schouten M, Bruinvels J: Endogenously formed norharman in platelet rich plasma obtained from porphyric rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 24: 1219-1223 (1986)
- Schwarz J, Schwarz SC, Storch A: Developmental perspectives on human midbrain-derived neural stem cells (Review). *Neurodegener. Dis.* 3:45-49 (2006).
- Seaton TA, Cooper JM, Schapira AH: Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. *Brain Res.* 777: 110-118 (1997)
- Shoulson I: DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism. *Ann Neurol* 44: S160-S166 (1998)
- Shoulson I, Oakes D, Fahn S, Lang A, Langston JW, LeWitt P, Olano CW, Penney JB, Tanner C, Kieburtz K, Rudolph A, Parkinson Study Group: Impact of sustained deprenyl (selegiline) in levodopa-treated Parkinson's disease: a randomized placebo-controlled extension of the deprenyl an tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism trial. *Ann. of Neur.* 51: 604-612 (2002)
- Sjoquist B, Eriksson A, Winblad B: Salsolinol and catecholamines in human brain and their relation to alcoholism. *Prog. Clin. Biol. Res.* 90: 57-67 (1982)
- Spenser ID: The structure of N-Alkyl- $\beta$ -Carboline anhydro-bases. *J. Chem. Soc.:* 3659-3663 (1956)
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM: Alpha-Synuclein in Lewi bodies. *Nature* 388: 839-840 (1997)

- Spina MB, Squinto SP, Miller J, Lindsay RM, Hyman C: Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and n-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. *J. Neurochem.* 59: 99-106 (1992)
- Storch A, Ludolph AC, Schwarz J: HEK-293 cells expressing the human dopamine transporter are susceptible to low concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>) via impairment of energy metabolism. *Neurochem. Int.* 35: 393-403 (1999)
- Storch A, Schwarz J: The dopamine transporter: Involvement in selective dopaminergic degeneration. In: *Neurotoxic Factors in Parkinson's Disease and Related Disorders* (Storch A and Collins MA, eds), 17-40 (2000). Kluwer Academic, Plenum Press, New York, USA.
- Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvy PM, Kupsch A, Schwarz J: Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp. Neurol.* 170: 317-325 (2001)
- Storch A, Ott S, Hwang YI, Ortmann R, Hein A, Frenzel S, Matsubara K, Ohta S, Wolf HU, Schwarz J: Selective dopaminergic neurotoxicity of isoquinoline derivatives related to Parkinson's disease: studies using heterologous expression systems of the dopamine transporter. *Biochem. Pharmacol.* 63: 909-920 (2002)
- Storch A, Ludolph AC, Schwarz J: Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration. *J. Neural Transm.* 111: 1267-1286 (2004)
- Susilo R, Rommelspacher H: On the mode of formation of beta-carbolines. *Prog.Clin.Biol.Res.* 183:137-143 (1985)
- Tsai MJ, Lee EH: Nitric oxide donors protect cultured rat astrocytes from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 24: 705-713 (1998)
- Uhl GR, Walther D, Mash D, Faucheux B, Javoy-Agid F: Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. *Ann. Neurol.* 35: 494-498 (1994)
- Vescovi AL, Snyder EY: Establishment and properties of neural stem cell clones: plasticity *in vitro* and *in vivo*. *Brain Pathol.* 9: 569-598 (1999)
- Waring RH, Steventon GB, Sturman SG, Heafield MT, Smith MC, Williams AC: S-Methylation in motoneuron disease and Parkinson's disease. *Lancet* 2: 356-357 (1989)
- Waters CM, Peck R, Rossor M, Reynolds GP, Hunt SP: Immunocytochemical studies on the basal ganglia and substantia nigra in Parkinson's disease and Huntington's chorea. *Neurosci.* 25: 419-438 (1988)
- Wood N: Genes and Parkinsonism. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 62: 305-309 (1997)
- Zhang ZX, Roman GC: Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an update review. *Neuroepidemiol* 12: 195-208 (1993)

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. A.C. Ludolph danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Bei Prof. Dr. A. Storch bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, für die zuverlässige Anleitung und vor allem enthusiastische Betreuung in jeder Phase der Dissertation.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Andrea Hein und Frau Vera Lehmsiek für die Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft, mit der ich im Labor aufgenommen wurde.

Mein Dank gilt außerdem allen, die mir während dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.