

**Aus der Klinik für Neurologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. D. Kömpf**

---

***Wechselwirkung von 6,7-dihydroxylierten Tetrahydroisochinolinen am Beispiel des N-Methyl-  
Norsalsolinol mit der Tyrosinhydroxylase***

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
-Aus der medizinischen Fakultät-**

**Vorgelegt von  
Alexander Luborzewski  
aus Hamburg**

**Lübeck 2010**

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Andreas Moser

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. Nat. Walter Raasch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.09.2010

# 1. Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	5
1.1 Die Parkinson-Krankheit.....	5
1.2 Die Tyrosinhydroxylase.....	6
1.3 N-Methyl-Norsalsolinol und andere 6,7-dihydroxylierte Tetrahydroisochinoline.....	9
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	10
<b>2. Material und Methoden</b> .....	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Humane rekombinante Tyrosinhydroxylase.....	12
2.1.2 Reagenzien des Enzymansatzes und der ESR-Untersuchungen .....	13
2.1.3 System für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	14
2.1.4 Verwendete Laborhilfsmittel.....	14
2.1.5 System für die ESR-Spektroskopie.....	15
2.2 Methoden.....	15
2.2.1 Ansatz zur Bestimmung der basalen Tyrosinhydroxylase Aktivität.....	15
2.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion (HPLC/ED).....	16
2.2.3 Auswertung der mit der HPLC gesammelten Daten.....	17
2.2.4 Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie.....	20
<b>3. Ergebnisse</b> .....	21
3.1 Die enzymatische Aktivität der humanen Tyrosinhydroxylase.....	21
3.1.1 Einfluss der Konzentration des Kofaktors auf die Aktivität der Tyrosinhydroxylase.....	21
3.1.2 TH Aktivität in Anwesenheit eines Redoxsystems für den Kofaktor.....	21
3.1.3 Einfluss der Substratkonzentration auf die Aktivität der Tyrosinhydroxylase.....	23
3.1.4 Einfluss des Zusatzes von zweiwertigem Eisen im TH-Ansatz.....	23
3.1.5 Abhängigkeit der Produktformation von der Inkubationszeit.....	24
3.2 Hemmung der Tyrosinhydroxylase Aktivität durch Dopamin und verschiedene Tetrahydroisochinoline.....	25
3.2.1 <i>Feedback</i> -Hemmung der Tyrosinhydroxylase durch Dopamin.....	25
3.2.2 Hemmung der basalen Tyrosinhydroxylase Aktivität durch N-Methyl-Norsalsolinol und andere Tetrahydroisochinoline.....	26
3.3 Kinetik des Hemmeffektes von Dopamin und N-Methyl-Norsalsolinol.....	27

3.3.1 Kinetik der Hemmung von Dopamin und N-Methyl-Norsalsolinol im Hinblick auf den Kofaktor.....	28
3.3.2 Ermittlung der Dissoziationskonstanten für Dopamin und N-Methyl-Norsalsolinol.....	30
3.3.3 Kinetik des Hemmeffektes von Dopamin und N-Methyl-Norsalsolinol im Hinblick auf das Substrat L-Tyrosin.....	31
3.4 Wirkung von Dopamin und verschiedenen Tetrahydroisochinolinen auf das katalytische Eisenatom der Tyrosinhydroxylase.....	32
3.5 Tyrosinhydroxylase Aktivität in Anwesenheit von oxidiertem Eisen.....	34
3.6 Phosphorylierung der Tyrosinhydroxylase am N-terminalen Abschnitt durch die cAMP abhängige Proteinkinase A .....	35
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>37</b>
4.1 Die enzymatische Reaktion der humanen rekombinanten Tyrosinhydroxylase.....	38
4.2 Wirkung der Tetrahydroisochinoline auf die Aktivität der Tyrosinhydroxylase.....	40
4.3 Wechselwirkung der Tetrahydroisochinoline mit dem katalytischen Eisenatom der Tyrosinhydroxylase.....	41
4.4 Reaktivierung der Tyrosinhydroxylase durch die Proteinkinase A .....	42
4.5 Wechselwirkungen 6,7-dihydroxylierter Tetrahydroisochinoline mit dem dopaminergen System.....	43
4.6 6,7-dihydroxylierte Tetrahydroisochinoline bei M. Parkinson.....	44
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>46</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>47</b>
<b>7. Danksagung.....</b>	<b>53</b>
<b>8. Lebenslauf.....</b>	<b>54</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Parkinson-Krankheit

Als Morbus Parkinson wird eine neurodegenerative Erkrankung bezeichnet, die mit einer für Sie typischen klinischen Symptomatik, dem so genannten Parkinson-Syndrom oder Parkinsonismus, einhergeht. Sie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen und mit einem Durchschnittsalter von etwa 60 Jahren bei Krankheitsbeginn eine typische Erkrankung des mittleren bis höheren Lebensalters (Lees et al., 2009). James Parkinson beschrieb im Jahre 1817 erstmals eine Krankheit, der er aufgrund des auffälligen Zitterns und der Bewegungsarmut seiner Patienten den Namen „shaking palsy“, zu deutsch Schüttellähmung, gab. Der Begriff des Parkinson-Syndroms steht heute stellvertretend für ein variables klinisches Bild extrapyramidaler Bewegungsstörungen, das durch die Hauptmerkmale Ruhetremor, Rigor und Akinese, die zusammenfassend auch als Parkinson-Trias bezeichnet werden, charakterisiert ist. Der Verlauf der Krankheit ist langsam progredient, wobei der Ruhetremor, der bei etwa 70 % der Patienten auftritt, das häufigste Frühsymptom darstellt (Standaert und Stern, 1993; Marsden, 1994). Neben den motorischen Veränderungen treten insbesondere nach längerem Verlauf auch neurovegetative und psychische Symptome auf, die den Krankheitsverlauf neben dem Problem der zunehmenden motorischen Einschränkungen zusätzlich verkomplizieren. Die klinische Symptomatik ist Ausdruck einer langsam fortschreitenden, weitgehend selektiven Systemdegeneration im Zentralnervensystem, bei der es zum Untergang pigmentierter dopaminergener Neurone vor allem in der Substantia nigra pars compacta (SNc) kommt (Graybiel et al 1990; Braak et al 1995). Diese Gruppe melaninhaltiger Nervenzellen im Mittelhirn ist ein wichtiger funktioneller Teil der Basalganglien und steht in afferenter und efferenter Verbindung mit den Kernen des Striatums. Die Hauptfunktion dieses nigrostriatalen Systems wird in der Verarbeitung und Weiterleitung motorischer Impulse und anderer, die Planung und Durchführung von Bewegungen betreffender Informationen gesehen. Damit kommt der SNc als Bestandteil dieses extrapyramidal-motorischen Regelkreises im Großhirn eine wichtige Bedeutung für die Initiation und Regulation von Bewegungsprogrammen zu. Der Neurotransmitter der Projektionen von der SNc zum Striatum ist das zur Gruppe der Katecholamine gehörende Dopamin, dessen Wirkung am postsynaptischen Neuron vom Typ des jeweiligen Dopamin-Rezeptors abhängig ist. Man unterscheidet fünf verschiedene Dopamin-Rezeptoren (D1-D5), wobei eine Stimulation der Rezeptoren D1 und D5 zu einem exzitatorischen, eine Stimulation der Rezeptoren D2-D4 hingegen zu einem inhibitorischen postsynaptischen Potential führt. Der Untergang der dopaminergen Neurone der SNc führt zu einem Dopaminmangel im gesamten nigrostriatalen System, und damit zu einem

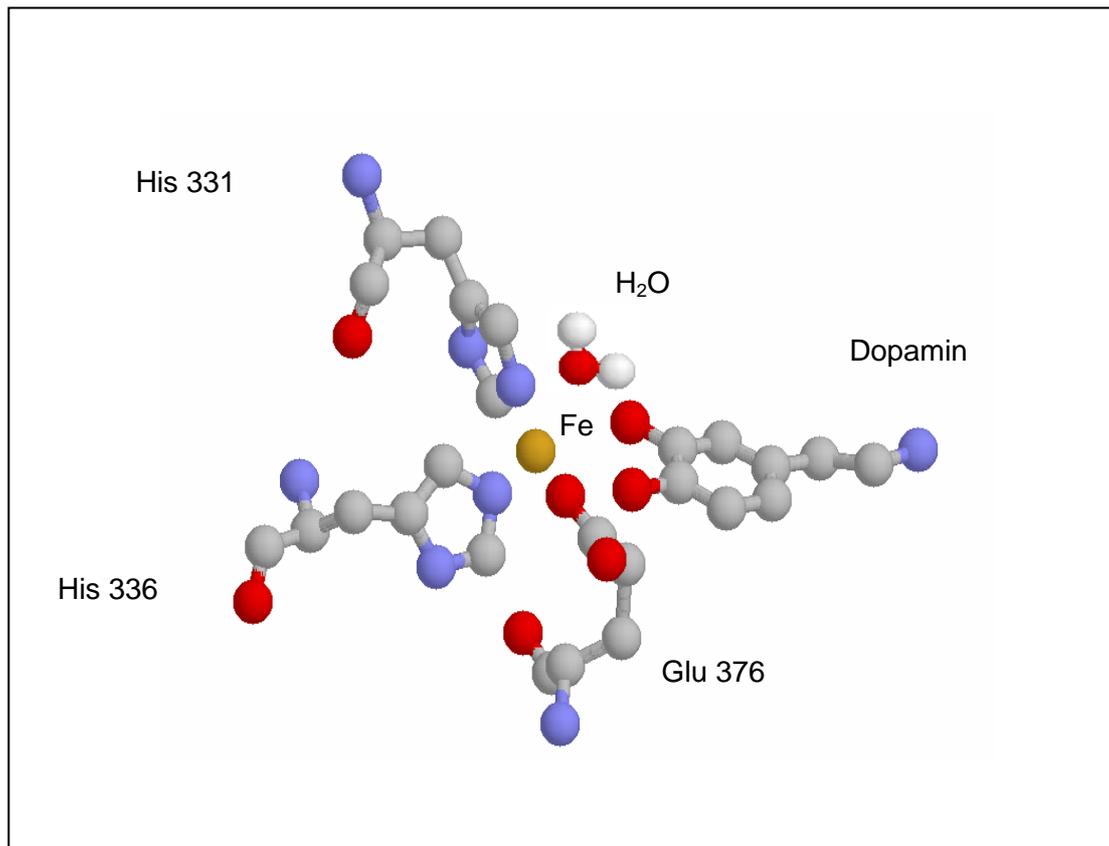
neurochemischen Ungleichgewicht zugunsten der anderen beteiligten Transmittersysteme. Diese Veränderung bildet die Grundlage für die Entwicklung motorischer Symptome beim Morbus Parkinson.

Der Dopamin-Verlust in den Basalganglien bei M. Parkinson geht mit typischen Veränderungen, die einen Untergang dopaminerger Neurone markieren, einher (Hornykiewicz, 2001). Es kommt zu einer Reduktion des Dopamin-Abbauproduktes Homovanillinsäure (HVA), des Dopamin abbauenden Enzyms DOPA-Decarboxylase, der transmembranen und vesikulären Transportproteine für Dopamin, sowie zu einer Reduktion der Proteinmenge und Aktivität des Enzyms Tyrosinhydroxylase, dem Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass das Verhältnis zwischen der Konzentration von Dopamin und dessen Metabolit HVA zugunsten von HVA verschoben ist, was als Ausdruck einer erhöhten Umsatzrate von Dopamin und als Kompensationsmechanismus gegen den langsam voranschreitenden Verlust dopaminerger Innervation gesehen wird (Hornykiewicz, 1993). Zudem konnte in neuropathologischen Befunden gezeigt werden, dass die Erkrankung erst zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Neurodegeneration, nämlich erst bei einem Dopaminverlust von 80 % im Striatum, zu klinisch relevanten motorischen Störungen führt (Jellinger und Paulus, 1992). Die genaue Ursache für die Degeneration dopaminerger Neurone beim M. Parkinson ist bislang ungeklärt. Aus pathogenetischer Sicht finden sich neben der idiopathischen Erkrankung eine Reihe von symptomatisch auftretenden Parkinson-Syndromen, beispielsweise bei der Blockade striataler Dopamin-Rezeptoren durch Antipsychotika, bei dementiellen Erkrankungen als Ausdruck einer fortschreitenden Degeneration multipler Systeme, bei affektiven Störungen oder als toxischer Effekt bei systemischer Verabreichung von 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP), einem Neurotoxin, das nach Umwandlung durch die Monoaminoxidase-B (MAO-B) über den präsynaptischen Dopamintransporter in dopaminerge Neurone gelangt und dort zu einer Blockade mitochondrialer Atmungskettenenzyme führt, die den Zelltod zur Folge hat. Die Entdeckung des Neurotoxins MPTP führte zu einer vermehrten Suche nach anderen potentiellen exogenen oder endogenen Substanzen, die eine pathophysiologische Rolle bei der Entstehung der Parkinson-Erkrankung spielen könnten.

## **1.2 Die Tyrosinhydroxylase**

Als pathobiochemisches Korrelat der oben beschriebenen pathomorphologischen Veränderungen beim Morbus Parkinson kommt es zu einem Dopaminmangel, einer Reduktion der Menge an Tyrosinhydroxylase (TH) und dessen Kofaktor 6-L-Erythro-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), dem katecholaminsynthetisierenden Enzymsystem.

Die TH katalysiert die Hydroxylierung der Aminosäure Tyrosin zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa), den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Katecholaminsynthese (Nagatsu et al., 1964; Levitt et al., 1965). L-Dopa ist die gemeinsame Vorstufe in der Biosynthese von Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin. Der DNS-Abschnitt für menschliche TH wurde als ein einziges Gen auf einem haploiden DNS-Strang auf Chromosom 11 identifiziert und dessen Nukleotidsequenz entschlüsselt (Nagatsu et al., 1993). Bei der Transkription des Gens können vier verschiedene RNA-Formen durch so genanntes alternatives Spleißen des primären DNS-Transkrites entstehen, die für 4 verschiedene Isoformen des Enzyms kodieren (Kobayashi et al., 1988). Exprimiert wird die TH in den katecholaminergen Zellen des Gehirns, den noradrenergen Ganglien- und Nervenzellen des Sympathikus, und in den noradrenergen und adrenergen Zellen des Nebennierenmarks. Die Isoformen 1 und 2 bilden den Hauptanteil der beim Menschen vorkommenden TH in den Basalganglien des Gehirns und dem Nebennierenmark (Scholz und Moser, 1998). Die TH gehört zusammen mit der Phenylalanin-Hydroxylase und der Tryptophan-Hydroxylase zur Gruppe der aromatischen Aminosäure Hydroxylasen, die  $BH_4$  als Kofaktor benötigen. Das Enzym besteht als Tetramer mit einem Molekulargewicht von 240 Kilo-Dalton (KD) aus vier identischen Untereinheiten von je 60 KD. Diese bestehen aus einem C-terminalen Abschnitt, in dem sich das katalytische Zentrum befindet, einem für die Bildung des Tetramers verantwortlichen Abschnitt und einem N-terminalen, regulatorischen Abschnitt. Die 4 Isoformen des Enzyms unterscheiden sich jeweils in ihrem N-terminalen Abschnitt voneinander. Bei der Reaktion am C-terminalen, katalytischen Zentrum der TH werden die Substrate L-Tyrosin, molekularer Sauerstoff, sowie der Kofaktor  $BH_4$  und zweiwertiges Eisen (Fe (II)) benötigt. Der C-terminale, katalytische Abschnitt der TH besteht aus den Aminosäure-Abschnitten 156-498 und ist bei allen 4 Isoenzymen des Menschen, aber auch zwischen verschiedenen Spezies wie dem Menschen, der Ratte und dem Rind, identisch (Flatmark und Stevens, 1999). Die Anwesenheit eines zweiwertigen Eisenatoms im katalytischen Zentrum ist für den Ablauf der enzymatischen Reaktion essentiell (Fitzpatrick, 2003). Basierend auf der Kristallstruktur der TH (Goodwill et al., 1998) konnte die Struktur des katalytischen Abschnittes der TH genauer beschrieben werden (s. Abb.1). Dabei geht das Eisenatom in der Mitte des katalytischen Zentrums als Chelator eine hexagonale Bindung zu zwei Histidinen (His331 und His336), einem Glutamat (Glu 376) und 3 weiteren Bindungsstellen ein, letztere können von Wassermolekülen oder von OH-Gruppen anderer Liganden besetzt werden. Die Aktivität des Enzyms TH wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Direkt am katalytischen Zentrum erfolgt die sogenannte *feedback*-Hemmung durch die Produkte der Katecholaminsynthese Dopamin, Adrenalin oder Noradrenalin. Durch direkte Bindung an das katalytische Eisen der TH kann das Eisenatom im katalytischen Zentrum der TH zu



**Abb1:** Schematische Darstellung des Eisenatoms und seiner Liganden im katalytischen Zentrum der TH. Dargestellt ist auch der natürliche *feedback*-Inhibitor Dopamin, welcher mit dem Kofaktor  $\text{BH}_4$  (nicht dargestellt) um dieselbe Bindungsstelle konkurriert.

dreiwertigem Eisen ( $\text{Fe (III)}$ ) oxidiert werden, was zu einer Inaktivierung des Enzyms führt (Fitzpatrick, 1999). Die Hemmung der TH durch Katecholamine ist dabei kompetitiv zum Kofaktor  $\text{BH}_4$ , und nicht kompetitiv zum Substrat L-Tyrosin, kann also durch die Anwesenheit höherer Konzentrationen des Kofaktors  $\text{BH}_4$  kompensiert werden. Untersuchungen Kristallstruktur der Tyrosinhydroxylase erlaubten neben einer genaueren Charakterisierung des katalytischen Zentrums der TH auch Aussagen zu energetisch wahrscheinlichen Positionen von Liganden am Eisenatom. So konnte gezeigt werden, dass der Kofaktor eine enge, energetisch günstige, koordinative Bindung mit dem katalytischen Eisenatom der TH und dem Aminosäure-Rest Phe 300 eingeht (Goodwill et al., 1998). Auch konnte anhand der Kristallstruktur der TH gezeigt werden, dass die Anlagerung von Dopamin an das katalytische Eisenatom zu einer Blockade der Bindungsstelle des Kofaktors führt (Almas et al., 1992). Abb. 1 zeigt eine schematische Zeichnung des Eisenatoms und der potentiellen Bindungsstelle des natürlichen *feedback*-Inhibitors Dopamin am katalytischen Zentrum der TH. Am N-terminalen, regulatorischen Abschnitt kann eine Phosphorylierung der TH durch verschiedene Enzyme, sogenannte Kinasen, erfolgen, welche eine Aktivierung des Enzyms zur Folge hat. Ein wichtiger

Aktivierungsweg ist dabei die Phosphorylierung an der Aminosäure Ser40 durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (Vulliet et al., 1980), die eine Konformationsänderung des Proteins bewirkt und zu einer veränderten Bindungsaffinität für Liganden am katalytischen Zentrum führt. Durch diese Phosphorylierung an Ser40 kann die Katecholamin-induzierte, irreversible Hemmung der TH wieder aufgehoben werden, da das oxidierte Eisenatom durch den Kofaktor wieder zu Fe (II) reduziert werden kann. Eine erneute Inaktivierung des Enzyms kann wiederum über eine Dephosphorylierung des Proteins durch verschiedene Phosphatasen (Haavik et al., 1989) erreicht werden. Als Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese kommt der TH eine zentrale Bedeutung für eine ganze Reihe physiologischer Prozesse z.B. im Gehirn, vegetativen Nervensystem und Nebennierenmark zu. So zeigten Versuche an Mäusen, die durch eine Null-Mutation keine TH exprimieren konnten, eine perinatale Lethalität der Tiere aufgrund von kardiovaskulärer Dysfunktion (Kobayashi und Nagatsu, 2005). Punktmutationen des TH-Gens beim Menschen lassen sich bei familiären, L-Dopa-responsiven Dystonie-Syndromen (Furukawa, 2003) und progressiven, infantilen Enzephalopathien (Hoffmann et al., 2003) nachweisen.

### **1.3 N-Methyl-Norsalsolinol und andere 6,7-dihydroxylierte Tetrahydroisochinoline**

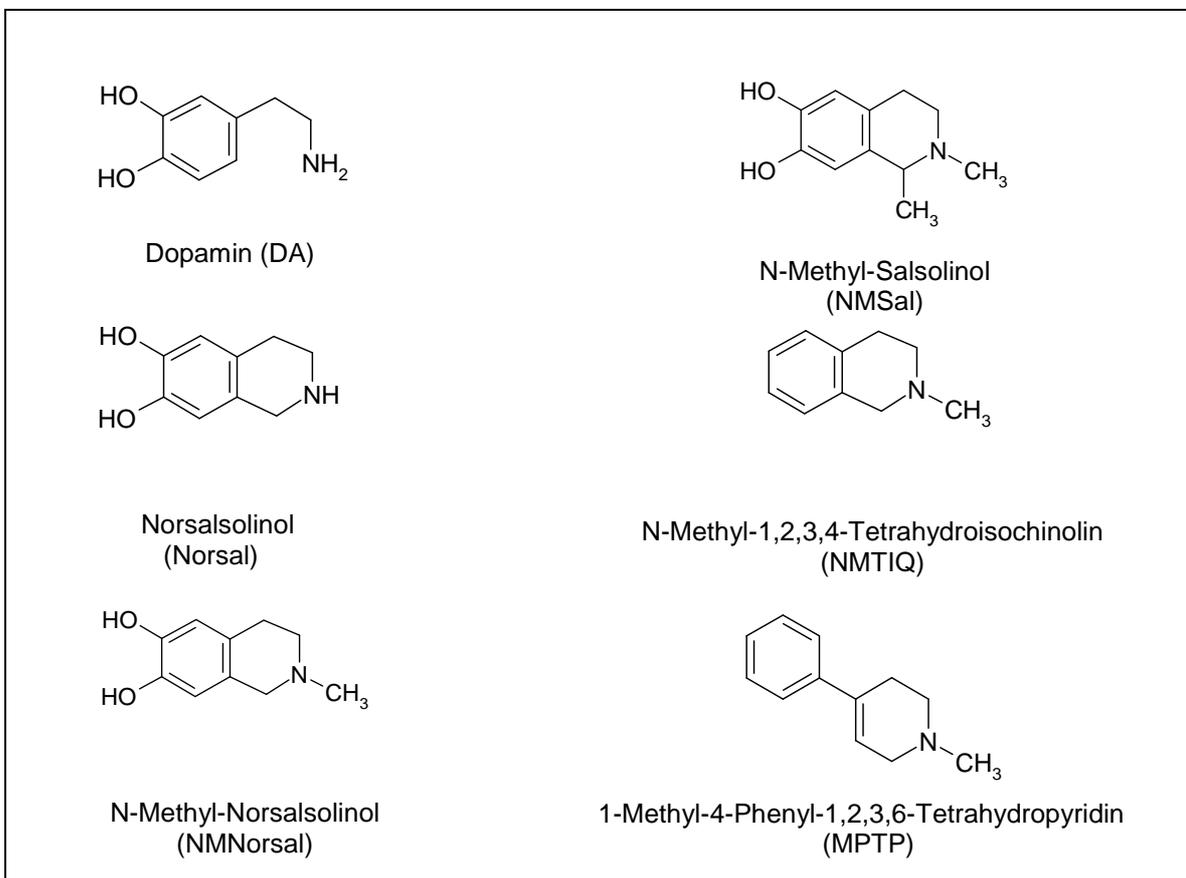
N-Methyl-Norsalsolinol (NMNorsal), N-Methyl-Salsolinol (NMSal) und Salsolinol sind eine Gruppe heterozyklischer Verbindungen, die als endogene Neurotoxine im Gehirn entstehen, vermutlich durch eine nicht-enzymatische Kondensation von Dopamin mit Aldehyden oder Pyruvat (Moser, 1998). Sie stellen eine Gruppe von Derivaten des 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolins dar, welches in der Umwelt in verschiedenen Nahrungsmitteln (Niwa et al., 1989) vorkommt, dar. Die an 6- und 7-Position hydroxylierten Tetrahydroisochinoline NMNorsal und NMSal konnten im Liquor von Patienten mit M. Parkinson nachgewiesen werden (Moser und Kömpf, 1992; Maruyama et al., 1996). Ebenso gelang der Nachweis dieser Substanzen *post mortem* in der Substantia nigra und dem Corpus striatum des menschlichen Gehirns (Maruyama et al., 1997). Aufgrund dieser Nachweise und der strukturellen Ähnlichkeit der Tetrahydroisochinoline mit dem Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP, s. Abb.2) wurde untersucht, ob diese Substanzen als potentielle endogene Neurotoxine an der Pathophysiologie des M. Parkinson beteiligt sein könnten. Im Gegensatz zu MPTP, welches Enzyme der Atmungskette an Mitochondrien hemmt, können jedoch die Tetrahydroisochinolin-Derivate die mitochondriale Membran nur schwer überwinden (Mc. Naught et al., 1998). Auch zeigten Untersuchungen am Tiermodell mit Ratten, dass nur wiederholte stereotaktische Injektionen von NMSal zu

einem Untergang dopaminergener Neurone in der Substantia nigra führten (Naoi et al., 1996). Das toxische Potential der Tetrahydroisochinoline erscheint also im Vergleich zu MPTP relativ gering zu sein. Ein weiterer denkbarer Zusammenhang mit der Pathogenese des M. Parkinson könnte jedoch die Beeinflussung des Katecholamin-Stoffwechsels sein. So zeigten Moser et al. (1995) einen möglichen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von NMNorsal im Liquor cerebrospinalis und einem erhöhten Dopamin-Umsatz bei Patienten mit M. Parkinson auf. Des Weiteren konnten stereotaktische Injektionen von NMSal in das Corpus striatum der Ratte eine Reduktion der TH-Aktivität bei gleichzeitig ausbleibender Neurodegeneration bewirken (Naoi et al., 1996). Schließlich konnte in zahlreichen *in vitro*-Untersuchungen ein hemmender Einfluss verschiedener Tetrahydroisochinoline auf die Aktivität der Tyrosinhydroxylase gezeigt werden (Scholz und Moser, 1998). Scholz et al. (1997) zeigten darüber hinaus, dass die Hemmung der TH aus dem Nucleus accumbens der Ratte nichtkompetitiv zum Substrat L-Tyrosin verläuft. Denkbar ist, dass die an 6- und 7-Position dihydroxylierten Tetrahydroisochinoline aufgrund ihrer Katecholstruktur, analog zum natürlichen *feedback*-Mechanismus durch Katecholamine, die Tyrosinhydroxylase am katalytischen Zentrum hemmen.

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Anhand der in der Literatur beschriebenen Regulation der Tyrosinhydroxylase durch Dopamin und andere Katecholamine und von der in Vorarbeiten gezeigten Hemmung der Tyrosinhydroxylase- Aktivität durch 6,7-dihydroxylierte Tetrahydroisochinoline sollte mit Hilfe humaner, rekombinant hergestellter Tyrosinhydroxylase aus *Escherichia coli*-Bakterien untersucht werden, welcher Mechanismus der oben beschriebenen Hemmung zugrunde liegt. Als Referenzsubstanz für die Untersuchungen mit Tetrahydroisochinolin-Derivaten diene bei allen Versuchen am Enzym dessen natürlicher *feedback*-Inhibitor Dopamin. Vier Tetrahydroisochinoline, nämlich NMNorsal, NMSal, Norsalsolinol (Norsal) und N-methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (NMTIQ), die sich jeweils in den entscheidenden funktionellen Gruppen unterscheiden, sollten zunächst in einem biochemischen Ansatz mit Bestimmung ihrer Wirkung auf die Aktivität der rekombinanten TH untersucht werden. Drei Derivate, nämlich NMNorsal, NMSal und Norsal besitzen eine Katecholgruppe, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Methylierung an 1- und 2-Position. Hingegen besitzt NMTIQ keine Katecholgruppe an Position 6 und 7 (s. Abb.2). Hiermit sollte geklärt werden, ob die Hemmung der TH bei den Tetrahydroisochinolin-Derivaten von der Dihydroxylierung in den Positionen 6 und 7 abhängig ist. Anschließend sollte in weiteren Ansätzen untersucht werden, ob die durch die Tetrahydroisochinoline gehemmte Aktivität der TH durch die Zugabe aufsteigender Konzentrationen des

Kofaktors  $BH_4$  oder des Substrates L-Tyrosin verändert werden kann, was eine genauere biochemische Charakterisierung des Hemmmechanismus im Hinblick auf die Frage einer konkurrierenden Bindungsstelle am Enzym erlaubt. Mittels einer biophysikalischen Untersuchung, nämlich der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie; *syn.* elektronenparamagnetische Resonanz-Spektroskopie, EPR-Spektroskopie), die eine Charakterisierung der Elektronenhülle, und damit des Redoxzustandes von Molekülen in Proteinen erlaubt, sollte im Anschluss an die oben beschriebenen Untersuchungen das Eisenatom im katalytischen Zentrum, in Anwesenheit von Dopamin und der Tetrahydroisochinolin-Derivate, untersucht werden. Abschließend sollte in einem weiteren biochemischen Ansatz geprüft werden, ob eine durch Dopamin oder Tetrahydroisochinoline inhibierte TH durch Phosphorylierung am N-Terminus, analog zu Dopamin, wieder reaktiviert werden kann.



**Abb. 2:** Chemische Struktur von Dopamin, den 4 untersuchten Tetrahydroisochinolinen, die sich jeweils in den entscheidenden funktionellen Gruppen an Position 6 und 7 (Hydroxylgruppen) und am Stickstoffatom (Methylgruppe) des Isochinolinringes unterscheiden, sowie des Neurotoxins MPTP.

## 2. Material und Methoden

Dieses Kapitel dient der Beschreibung des praktischen Vorgehens bei meinen Versuchen und bei der Auswertung der erhobenen Daten. Einer Beschreibung des verwendeten rekombinanten Enzyms Tyrosinhydroxylase folgt eine systematische Auflistung der verwendeten Reagenzien und Hilfsmittel unter Angabe der Bezugsquellen. Anschließend wird die Methodik des biochemischen Versuchsansatzes und dessen Auswertung mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) erläutert. Zuletzt wird auf die Elektron-paramagnetische Resonanz (EPR) – Spektroskopie eingegangen, die im Institut für Physik der Universität Lübeck für die biophysikalischen Experimente verwendet wurde.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Humane rekombinante Tyrosinhydroxylase

Die humane Tyrosinhydroxylase der Isoformen 1 und 4 wurde unserer Arbeitsgruppe durch Prof. Dr. Jan Haavik von der Universität Bergen (N) zur Verfügung gestellt:

##### **Humane Tyrosinhydroxylase Typ 1 (hTH1)**

aus *Escherichia coli*

Proteinkonzentration: 34 mg/ml

Konzentration TH Untereinheiten: 0,6 mmol/l

Äquivalente Eisen/Untereinheit: 1:1

##### **Humane Tyrosinhydroxylase Typ 1 (hTH1)**

aus *Escherichia coli*

Proteinkonzentration: 26 mg/ml

Konzentration TH Untereinheiten: 0,45 mmol/l

Äquivalente Eisen/Untereinheit: 0,1:1

##### **Humane Tyrosinhydroxylase Typ 4 (hTH4)**

aus *Escherichia coli*

Proteinkonzentration: 28 mg/ml

Konzentration TH Untereinheiten: 0,46 mmol/l

Äquivalente Eisen/Untereinheit: 0,1:1

Die Herstellung der rekombinanten Enzyme ist ausführlich beschrieben worden in Haavik et al. (1991). Zusammengefasst wurden die Isoformen 1, 2, und 4 mit Hilfe von *Escherichia coli* Bakterien exprimiert. Unter Zuhilfenahme eines Vektors wurde die cDNA mit den codierenden Sequenzen in die Bakterienzellen überführt. Um die Transkription der TH-Sequenz im Genom des Bakterienstammes während der Anzuchtung zu gewährleisten, wurde mit dem Vektor zusätzlich eine Sequenz überführt, die für die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin codiert. Anschließend wurden die Bakterien

in einem Kulturmedium in Anwesenheit von Ampicillin inkubiert. Nach der Anzucht erfolgte die Synthese des TH-Proteins durch Induktion und Expression einer spezifischen Polymerase. Das so gewonnene Enzymmaterial wurde anschließend in mehreren Schritten isoliert und homogenisiert. Das Proteinkonzentrat befand sich in einer Pufferlösung aus NaHepes (20 mmol/l) und NaCl (150 mmol/l), pH 7,5, und wurde bei -85°C gelagert. Für die Ansätze zur Bestimmung der Tyrosinhydroxylase Aktivität wurde das Konzentrat in einem Verdünnungsverhältnis von 1:10.000 eingesetzt. Hierfür fertigte ich im voraus Portionen zu je 25 µl der Verdünnung 1:100 an. Unmittelbar vor jedem Versuchsansatz wurden jeweils ein bis zwei dieser Proben aufgetaut und weiter bis auf das gewünschte Verhältnis verdünnt. Für die biophysikalischen Versuche zur ESR-Spektroskopie war eine wesentlich höhere Proteinkonzentration notwendig, hier verwendete ich für jede Probe 100 µl unverdünntes Homogenat der hTH1 und hTH4.

### 2.1.2 Reagenzien des Enzymsatzes und der ESR-Untersuchungen

Firma **Acros Organics** (Gehl, BEL):

1,2-Dimethyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (NMSal)

2-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (NMNorsal)

6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (Norsal)

**Institut für Chemie** (Universität Lübeck, D):

2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (NMTIQ)

Firma **Sigma** (Deisenhofen, D):

Adenosin-3,5-zyklisches Monophosphat (cAMP)

Adenosin-5-Triphosphat (ATP)

Bovine Katalase (EC 2000-5000 U/mg)

6,7-Dimethyl-5,6,7,8-Tetrahydropterin (DMPH<sub>4</sub>)

Dihydropterinreduktase (EC 1.6.99.7), aus der Leber von Schafen (100 U/mg)

3,4-Dihydroxyphenylethylamin (Dopamin)

L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa)

α-Methyl-para-L-Tyrosin

6-Methyl-Tetrahydropterin (MPH<sub>4</sub>)

β-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH)

N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure) (HEPES)

Proteinkinase A (EC 2.7.1.37), aus Rinderherzen (1000-2000 U/mg)

Firma **Merck** (Darmstadt,D):

Eisen(II)-Sulfat

L-Tyrosin

Natriumchlorid

Perchlorsäure 3,3 %

Firma **Knauer** (Berlin, D):

Wasser (H<sub>2</sub>O) hochrein

### **2.1.3 System für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Firma **Knauer** (Berlin, D):

HPLC-Pumpe 64

HPLC Ofen, Ofen Kontrolleinheit

Injektionsventil 20 µl

Injektionsspritze 100 µl

Vorsäule Eurosphere 100, C18, 5 µm, 35 x 4 mm

Hauptsäule Eurosphere 100, C18, 5 µm, 250 x 4 mm

Firma **Metrohm**, Herisau (CH):

Elektrochemischer Detektor 656

Firma **Epson**, Meerbusch (D):

PC AX2

### **2.1.4 Verwendete Laborhilfsmittel**

Firma **Eppendorf**, Hamburg (D):

Eppendorf-Pipetten 10, 100, 1000 µl

Varitip S Pipette 1-10 ml und Pipettenspitzen

Firma **Greiner**, Frickenhausen (D):

Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl ( )

Firma **Sarstedt**, Numbrecht (D):

Einweg-Reaktionsgefäße 1 ml , 1,5 ml

Firma **Schott**, Mitterteich (D):

Einweg-Reagenzgläser 10 ml Mehrweg- Reaktionsgefäße

Firma **Sartorius**, Göttingen (D):

Feinwaage

Firma **Hassa**, Lübeck (D):

Magnetischer Rührer Hi 300 N

Schüttelrührer

Firma **Knick** Berlin (D):

pH-Meter 761 Calimatic

### **2.1.5 System für die ESR-Spektroskopie**

Firma **Bruker**, Karlsruhe (D):

Spektrometer 200D SRC

Firma **Oxford Instruments**, Witney (GB):

Helium Kryostat ESR 910

### **2.1.6 Verwendete PC-Software**

Firma **Microsoft**, Redmond (USA):

Windows XP, Excel 2002, PowerPoint 2002, Word 2002

Firma **GraphPad Software**, La Jolla (USA):

Statistik- und Graphikprogramm Graph Pad Prism

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Ansatz zur Bestimmung der basalen Tyrosinhydroxylase Aktivität**

Um die Aktivität der Tyrosinhydroxylase *in vitro* zu bestimmen, verwendete ich einen Ansatz, bei dem das Protein mit allen für die enzymatische Reaktion notwendigen Komponenten im Wasserbad inkubiert wurde. Anschließend konnten die Proben direkt für die Analyse zur Bestimmung der L-Dopa-Konzentration mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendet werden (Naoi et al., 1988).

Die folgenden Angaben beziehen sich auf die im Ansatz befindlichen Endkonzentrationen der jeweiligen Komponenten. Das Proteinkonzentrat befand sich in einer Verdünnung von 1:10.000 in jedem Reaktionsansatz, entsprechend einer Proteinkonzentration von 0,0034 mg/ml bzw. 0,0026 mg/ml für die hTH1 und 0,0028 mg/ml für die hTH4. Das gelöste und mit Eisen(II)-Sulfat versetzte Protein wurde dem Basispuffer für die Inkubation, einer Lösung aus Hepes (50 mmol/l) und boviner Katalase (1 mg/ml, entspricht einer Aktivität von 2000-5000 U/ml) pH 7,0, beigefügt. Es folgten der Zusatz von 6, 7-Dimethyl-Tetrahydropterin (100 µmol/l), von NADH (100 µmol/l) und Dihydropterinreduktase (0,5 U/ml). Durch Zugabe des Substrates L-Tyrosin (100 µmol/l) wurde die Reaktion gestartet. Zur Bestimmung des nicht enzymatischen L-Dopa Umsatzes verwendete ich bei je zwei Proben pro Ansatz D-Tyrosin (100 µmol/l) anstatt L-Tyrosin, zusätzlich hemmte ich dabei die TH mit dem Inhibitor  $\alpha$ -Methyl-para-L-Tyrosin (100 µmol/l). Die Inkubationszeit betrug 2 Minuten und erfolgte im 30 °C warmen Wasserbad, im Anschluss wurde die Reaktion durch den Zusatz von Perchlorsäure (3,3 %) gestoppt. In der Perchlorsäure gelöst befand sich außerdem der verwendete interne Chromatographiestandard  $\alpha$ -Methyl-DOPA (0,45 µmol/l). Die Proben wurden sofort eingefroren und bei -20°C bis zur Chromatographie gelagert.

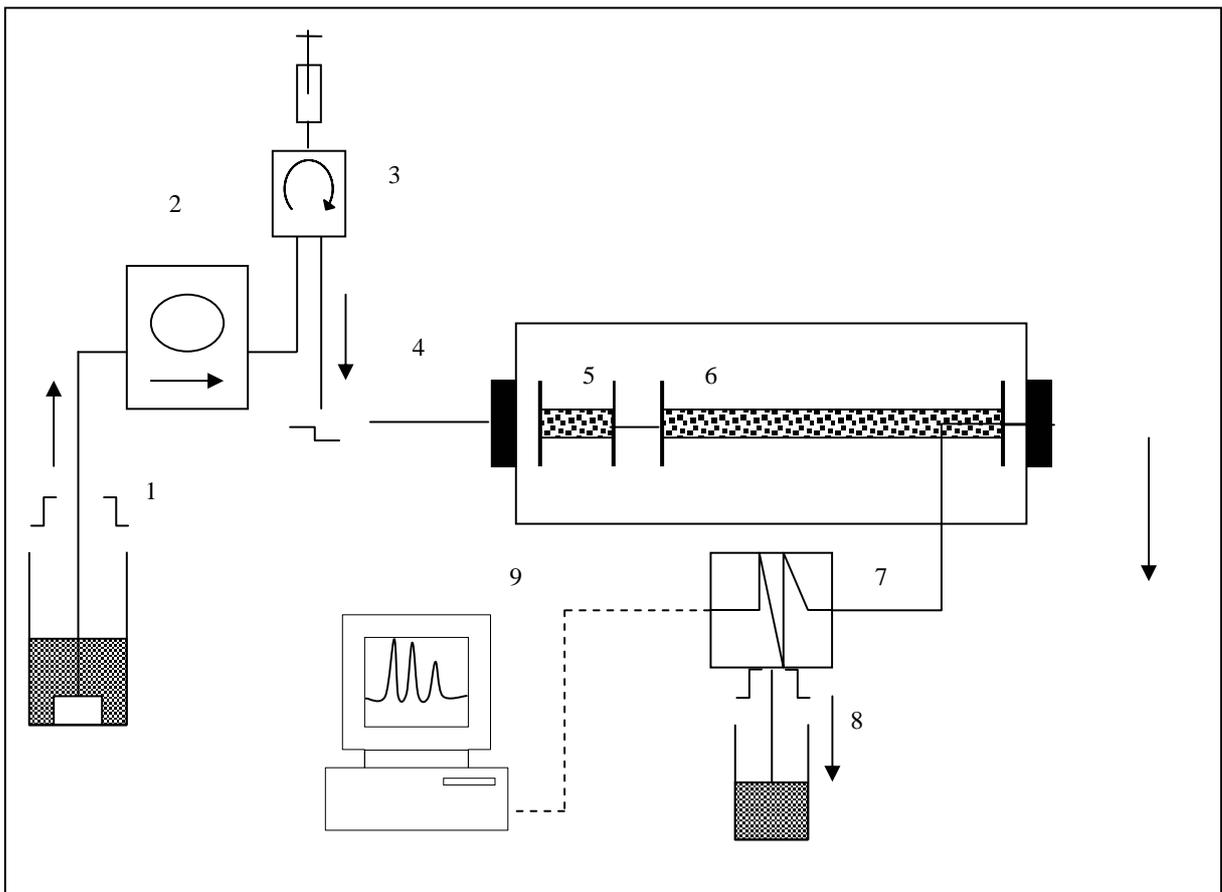
### **2.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion (HPLC/ED)**

Chromatographie bezeichnet ein Verfahren zur Trennung von Substanzen eines Gemisches durch Verteilung auf zwei Phasen, von denen die eine unbeweglich (stationäre Phase), die andere beweglich (mobile Phase) ist. Die mit der mobilen Phase transportierten Substanzen strömen an der stationären Phase vorbei und werden aufgrund unterschiedlich starker Affinität zu dieser unterschiedlich lange zurückgehalten, durch multiplikative Verteilungsvorgänge kommt es schließlich zur Trennung der Komponenten. Die Abkürzung HPLC steht für *High Performance Liquid Chromatography*, Hoch-Leistungs-Flüssig-Chromatographie, oder auch *High Pressure Liquid Chromatography*, Hoch-Druck-Flüssig-Chromatographie, weil bei diesem Verfahren z.B. im Vergleich zur klassischen Säulenchromatographie sehr hohe Drücke zum Durchpressen der mobilen Phase verwendet werden. Der Aufbau des verwendeten HPLC-Systems ist in Abb. 3 schematisch dargestellt. Als stationäre Phase verwendete ich eine kommerziell erhältliche Standardsäule (Säulengröße: 250 x 4 mm, Partikelgröße: 5 µm) aus chemisch modifiziertem Silicagel (Octadecylsilan, ODS), dessen Oberfläche sehr apolar ist. Die mobile Phase, eine Lösung aus Wasser, Methanol (11,5%), Zitronensäure (100 mmol/l), Na<sub>2</sub>-EDTA (0,3 mmol/l) und Na-Octansulfonsäure 0,52 (mmol/l), pH Wert 3,0, war dagegen relativ polar. Bei einem solchen Verhältnis von

mobiler zu stationärer Phase spricht man auch von Umkehrphasen-Chromatographie. Der Trennvorgang fand unter einer konstanten Betriebstemperatur von 30°C statt, die Flussrate der mobilen Phase betrug 1 ml/min. Das Probenmaterial durchläuft vor dem eigentlichen Trennvorgang in der Hauptsäule eine kleinere, in der Zusammensetzung identische Vorsäule (Säulengröße: 35 x 4mm, Partikelgröße: 5 µm), die dem Schutz der Hauptsäule vor Verunreinigungen und stark retardierten Substanzen dient. Nach dem Trennvorgang werden die Substanzen durch einen Detektor transportiert, dessen Schreiber bzw. Rechnerprogramm sie als Glockenkurven (*Peaks*) registriert. Ein solches Chromatogramm liefert unmittelbare qualitative und quantitative Aussagen über den untersuchten Probeninhalt. Qualitativ lassen sich Substanzen anhand ihrer Retentionszeit identifizieren, die unter den gewählten Bedingungen für jede Komponente charakteristisch ist. Quantitative Aussagen liefern sowohl die Höhe als auch die Fläche der *Peaks*, die der in der Probe befindlichen Stoffmenge proportional sind. Zur Registrierung der getrennten (eluierten) Substanzen wurde ein elektrochemischer Detektor verwendet. Dieser besteht aus einer Messzelle, in der ein wählbares Arbeitspotential zwischen einer Arbeits- und einer Referenzelektrode anliegt. Die mit der mobilen Phase transportierten Substanzen gelangen in die Messzelle und werden, abhängig von ihrem Potential, entweder oxidiert oder reduziert, es resultiert ein Stromfluss an der Arbeitselektrode, der vom Detektor verstärkt und registriert wird. Eine dritte Elektrode, die so genannte Hilfselektrode, leitet den bei der elektrochemischen Reaktion entstehenden Strom ab, damit das Arbeitspotential an der Referenzelektrode unbeeinflusst bleibt. Die Betriebsspannung des Detektors betrug + 800 mV bei einem eingestelltem Messbereich von 5 nA. Da die Anwesenheit von Luft in der mobilen Phase ein empfindlicher Störfaktor für die elektrochemische Detektion ist, wurde diese vor der Verwendung für 15 Minuten mit Helium entgast. Um eine stabile Grundlinie für die Auswertung der *Peaks* zu erhalten, musste sich das Gerät für etwa 1,5 Stunden äquilibrieren. Anschließend wurden die bei -20°C eingefrorenen Proben aufgetaut und ein Volumen von 100 µl unmittelbar zur Analyse eingespritzt, die Durchlaufdauer einer Probe betrug dabei etwa 15 Minuten. Alle Proben eines Versuchsansatzes wurden zusammenhängend in einer Sitzung analysiert. Zusätzlich wurden dabei immer der externe Standard L-Dopa und, zur Bestimmung des Wiederfindungswertes (s. Abschnitt 2.2.3), der interne Standard α-Methyl-Dopa jeweils doppelt bestimmt. Die vom HPLC-Programm aufgezeichneten Chromatogramme wurden zur späteren Auswertung am PC gespeichert.

### **2.2.3 Auswertung der mit der HPLC gesammelten Daten**

Zur Quantifizierung der in den Versuchsansätzen entstandenen L-Dopa-Menge orientierte ich mich an der Höhe der aufgezeichneten L-Dopa-*Peaks*. Durch dessen Fußpunkte ich



**Abb. 3:** Schematischer Aufbau des verwendeten Systems für die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie. Aus einem Vorratsbehälter (1) gelangt die mobile Phase in das HPLC-System, die HPLC-Pumpe (2) sorgt dabei für konstanten, pulsationsarmen Fluss. Über eine Injektionsschleife (3) wird das zu untersuchende Probevolumen in das System gespritzt und von der mobilen Phase zu den HPLC-Säulen, in denen sich die stationäre Phase befindet, transportiert. Es durchläuft zunächst die Vorsäule (5), die der Filterung der Probe vor Verunreinigungen dient, dann die Hauptsäule (6), in der der eigentliche Trennvorgang stattfindet. Der HPLC-Ofen (4) gewährleistet dabei eine konstante Temperatur für den chromatographischen Prozess. Der elektrochemische Detektor (7) registriert die eluierten Substanzen und ist mit einem HPLC-Programm am PC (9) verbunden, das die Daten als Chromatogramm am Bildschirm darstellt. Mobile Phase und Probe gelangen nach Durchlauf durch den Detektor zur Entsorgung in einen Sammelbehälter (8).

eine Tangente legte. Anschliessend lässt sich die Peakhöhe in nA durch Fällen des Lots am Scheitelpunkt des Peaks und Messen der Strecke zwischen dem Schnittpunkt mit der Tangente und der Peakspitze bestimmen. Ich verwendete für diesen Arbeitsschritt ein in der HPLC-Software enthaltenes Integrationsprogramm, welches nach Markierung der entsprechenden Fusspunkte die Peakhöhen automatisch ausrechnet. Die so gewonnenen Daten für die L-Dopa-Peakhöhe mussten vor der Bestimmung des enzymatischen Umsatzes noch mit Hilfe des für jede Probe bestimmten Wiederfindungswertes korrigiert werden. Man erhält diesen durch Bildung des Quotienten

aus der  $\alpha$ -Methyl-Dopa-Peakhöhe in der Probe und der gemittelten  $\alpha$ -Methyl-Dopa-Peakhöhe des Standards:

$$W = \alpha\text{-Methyl-Dopa}_{\text{Probe}} / \alpha\text{-Methyl-Dopa}_{\text{Standard}}$$

**(F1):**  $W$  = Wiederfindungswert;  $\alpha\text{-Methyl-Dopa}_{\text{Probe}}$  = Peakhöhe (nA) von  $\alpha$ -Methyl-Dopa in der Probe;  $\alpha\text{-Methyl-Dopa}_{\text{Standard}}$  = Mittelwert der Peakhöhe (nA) von  $\alpha$ -Methyl-Dopa im Standard

Mit Hilfe des durch die Formel (F1) ermittelten Wiederfindungswertes berechnete ich anschliessend die tatsächlich im Ansatz befindliche L-Dopa-Menge wie folgt:

$$L\text{-Dopa}_{\text{korr}} = L\text{-Dopa}_{\text{Probe}} / W$$

**(F2):**  $L\text{-Dopa}_{\text{korr}}$  = korrigierte Peakhöhe von L-Dopa;  $L\text{-Dopa}_{\text{Probe}}$ ;  $L\text{-Dopa}_{\text{Probe}}$ : Peakhöhe von L-Dopa in der Probe

Aus der Peakhöhe in nA lässt sich die im Ansatz befindliche L-Dopa-Konzentration mit Hilfe einer Eichgeraden bestimmen, die ich zu Beginn meiner Versuche erstellte. Dabei setzte ich den Standard L-Dopa in verschiedenen Konzentrationen an und ermittelte die zugehörige Änderung der Signalhöhe in nA (Daten nicht gezeigt). Wie bereits erwähnt bestimmte ich in jedem Versuchsansatz ausserdem zweifach den nichtenzymatischen Umsatz von L-Dopa. Dabei verwendete ich D-Tyrosin, welches im Gegensatz zu L-Tyrosin von der TH nicht als Substrat benutzt werden kann. Zusätzlich wurde die TH in diesen Proben durch Zusatz des Inhibitors  $\alpha$ -Methyl-para-L-Tyrosin gehemmt. Durch Subtraktion des korrigierten Wertes für den nichtenzymatischen Umsatz von dem korrigierten Wert für den Gesamtumsatz erhält man die enzymatisch entstandene L-Dopa Menge, aus der man durch Einsetzen in die Formel (F3) den Wert für die Aktivität der Tyrosinhydroxylase, angegeben in nmol L-Dopa pro Minute pro mg Protein, berechnen kann:

$$A_{\text{TH}} = (L\text{-Dopa}_{\text{ges}} - L\text{-Dopa}_{\text{nenz}}) * b_{\text{L-Dopa}} * V / t * m$$

**(F3):**  $A_{\text{TH}}$  = Aktivität der TH (nmol/min/mg);  $L\text{-Dopa}_{\text{ges}}$  = Gesamthöhe des L-Dopa-Peaks (nA);  $L\text{-Dopa}_{\text{nenz}}$  = Höhe des nichtenzymatisch gebildeten L-Dopa-Peaks (nA);  $b_{\text{L-Dopa}}$  = Steigung der Eichgeraden (nmol/l/nA);  $t$  = Inkubationszeit (min);  $m$  = Proteinmasse (mg)

Bei jedem Versuch zur Enzymaktivität der TH wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zu den jeweiligen Fragestellungen wurden mehrere unabhängige Versuche durchgeführt, ein eventueller Unterschied der Datenmenge wurde anschliessend in der statistischen Auswertung berücksichtigt. Für den Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Enzymaktivitäten verwendete ich den T-Test für unverbundene Stichproben. Dabei wurden Ergebnisse dann als statistisch signifikant angesehen, wenn der berechnete p-

Wert mindestens unter 0,05 lag. Die gezeigten Daten in Kapitel 3 sind entsprechend Ihres Signifikanzniveaus gekennzeichnet.

#### **2.2.4 Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie**

Bei der Oxidation von Eisen (II) zu Eisen (III) verliert das Eisenatom ein Elektron. Dies führt zu charakteristischen Veränderungen in der äußeren Elektronenhülle, welche man mit Hilfe der ESR-Spektroskopie nachweisen kann. In einem Magnetfeld erzeugt die Elektronenhülle des oxidierten Eisenatoms einen charakteristischen paramagnetischen Moment, dessen Resonanzfrequenz, der so genannte g-Faktor, anhand der Absorption von Mikrowellen gemessen wird. Durch die Liganden in seiner Umgebung hat das Eisenatom in einem Metallkomplex wie dem katalytischen Zentrum der TH ein anderes ESR-Spektrum als z.B. frei in der Probe befindliches, ungebundenes Eisen. In der Biochemie wird die ESR-Spektroskopie für die Identifizierung und Quantifizierung von paramagnetischen Molekülen in einer Probe genutzt, wie z.B. Metallkomplexe in Proteinen oder freie Radikale. Für eine ausführliche Beschreibung der physikalischen Grundlagen des ESR-Phänomens sowie Einzelheiten zur Messtechnik sei auf die Lehrbücher der Physik und Physikalischen Chemie verwiesen. Die Versuche zur ESR-Spektroskopie wurden in Zusammenarbeit Herrn PD. Dr. Schünemann, Institut für Physik der Universität Lübeck, durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die enzymatische Aktivität der humanen Tyrosinhydroxylase

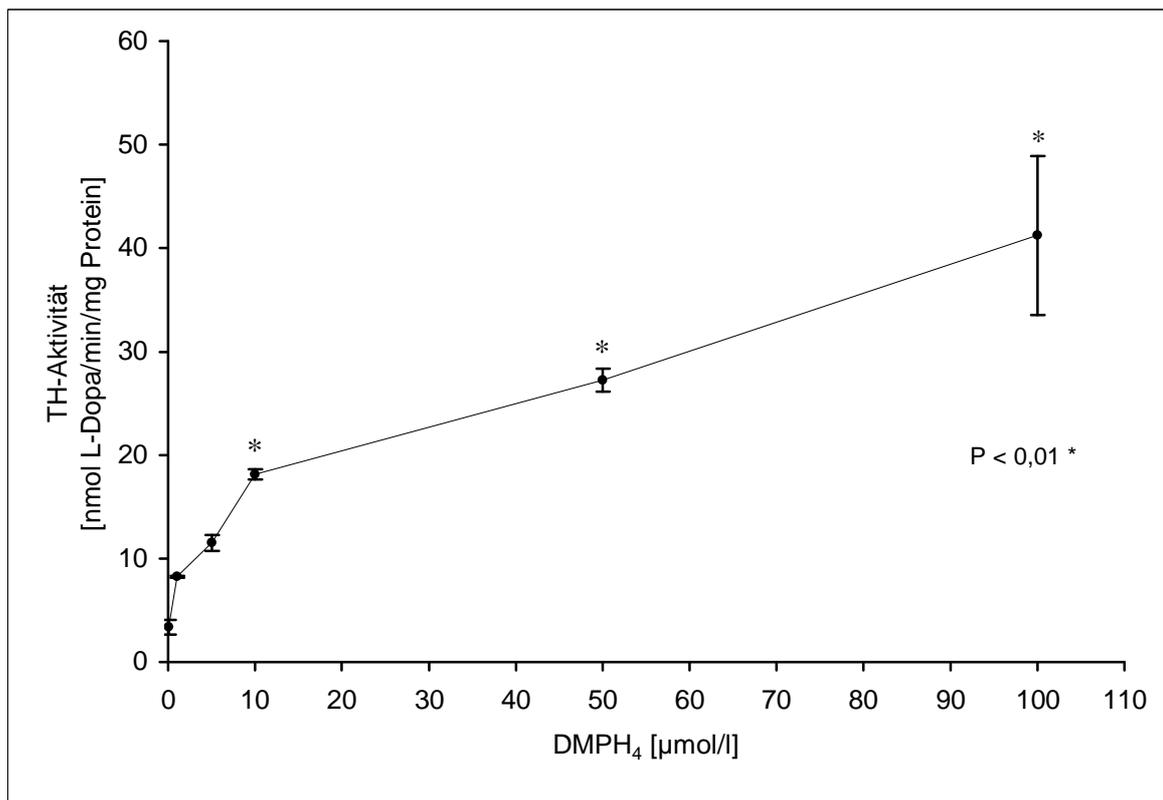
Für die Ansätze zur Bestimmung der Tyrosinhydroxylase Aktivität wurde das Homogenat wie in Kapitel 2 beschrieben aufgearbeitet und befand sich in einer Endverdünnung von 1:10.000 im Ansatz. Diese Verdünnung entsprach einer Proteinkonzentration von 0,0034 mg/ml bzw. 0,0026 mg/ml für die hTH1 und 0,0028 mg/ml für die hTH4. Die im Ansatz befindliche Konzentration an katalytischen Untereinheiten entsprach dabei 0,06  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 0,05  $\mu\text{mol/l}$  bei der hTH1 und 0,05  $\mu\text{mol/l}$  bei der hTH4. Bei einigen Versuchen, z.B. unter Abschnitt 3.1.4, arbeitete ich alternativ aufgrund von zu niedrigen Aktivitäten mit einer Endverdünnung von 1:5000, entsprechend der doppelten Menge an Protein. Ziel der in diesem Abschnitt durchgeführten Versuche war das Herausarbeiten von Ansatzbedingungen, unter denen dann die weiteren Versuche zur Wirkung der verschiedenen Substanzen auf die TH-Aktivität stattfanden.

##### 3.1.1 Einfluss der Konzentration des Kofaktors auf die Aktivität der Tyrosinhydroxylase

In den folgenden Ansätzen untersuchte ich den Einfluss der Konzentration des Pterin-Kofaktors auf die enzymatische Aktivität der Tyrosinhydroxylase. Aufgrund ihrer höheren Stabilität finden neben dem natürlichen Kofaktor L-Erythro-Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) häufig die synthetisch hergestellten Pterin-Abkömmlinge 6-Methyl-Tetrahydropterin ( $\text{MPH}_4$ ) und 6,7-Dimethyl-Tetrahydropterin ( $\text{DMPH}_4$ ) Anwendung. Ich bestimmte die TH-Aktivität in Anwesenheit dieser drei verschiedenen Pterine in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 100  $\mu\text{mol/l}$ , wobei zunächst auf den Einsatz eines Tetrahydropterin regenerierenden Systems (s. Abschnitt 3.1.2) verzichtet wurde. L-Tyrosin wurde in der Konzentration 100  $\mu\text{mol/l}$  eingesetzt und die TH Aktivität über 2 Minuten bestimmt. Zu den besten Ergebnissen führte hier der Einsatz von  $\text{DMPH}_4$  mit vergleichsweise hohen Enzymaktivitäten, wobei diese mit maximal 41 nmol L-Dopa/min/mg Protein generell sehr niedrig waren.

##### 3.1.2 TH Aktivität in Anwesenheit eines Redoxsystems für den Kofaktor

Ein limitierender Faktor beim Ablauf der enzymatischen Reaktion *in vitro* ist der rasche



**Abb. 4:** Einfluss der Konzentration des Kofaktors DMPH<sub>4</sub> auf die Aktivität der hTH1. Die gekennzeichneten Enzymaktivitäten sind statistisch signifikant größer als die Aktivität bei 0,1 µmol/l DMPH<sub>4</sub>.

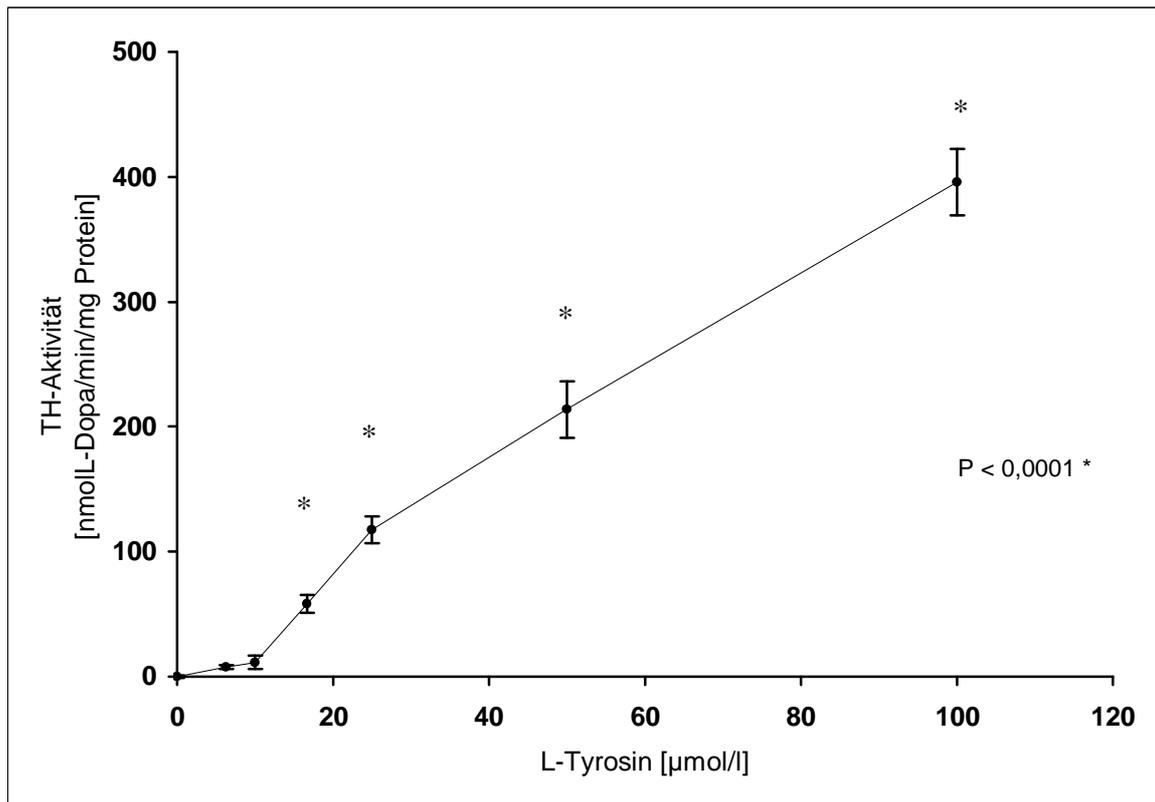
Zerfall des Pterin-Kofaktors. Für DMPH<sub>4</sub> ermittelte ich anhand der Abnahme der Peakhöhen einen relativen Zerfall von 57% nach zehn Minuten Inkubation bei 30°C. Unter physiologischen Bedingungen kann das durch die enzymatische Reaktion entstandene L-Erythro-Dihydrobiopterin (qBH<sub>2</sub>) durch die Dihydropterinreduktase (DPR, EC 1.6.99.7) wieder zu BH<sub>4</sub> reduziert werden, welches dann erneut für die Reaktion zur Verfügung steht. In gleicher Weise wie BH<sub>4</sub> können auch die synthetischen Kofaktoren MPH<sub>4</sub> und DMPH<sub>4</sub> als Substrat der DPR reduziert werden, weshalb ich mich für den Einsatz eines solchen Redoxsystems in meinen Ansätzen entschied. Ich verwendete dabei kommerziell erhältliches Konzentrat einer DPR aus der Leber von Schafen, Nikotinamadenindinukleotid (NADH) als essentieller Kofaktor der DPR wurde in einer Konzentration von 100 µmol/l angesetzt und das Homogenat darin gelöst, so dass die im Ansatz vorhandene Menge des Gemisches einer Aktivität der DPR von 0,5 U/ml entsprach. Der Effekt auf die TH-Aktivität zeigte sich unmittelbar in Form einer dramatischen Steigerung des L-Dopa-Umsatzes um das etwa 200 bis 300-fache. Während die TH-Aktivität ohne Zusatz der DPR um Werte zwischen 30 und 60 nmol L-Dopa/min/mg Protein betrug, konnten nun Aktivitäten zwischen 600 und 1000 nmol L-Dopa/min/mg Protein bestimmt werden. Alle folgenden Versuche wurden in Anwesenheit der Komponente DPR/NADH in den oben genannten Konzentrationen durchgeführt.

### 3.1.3 Einfluss der Substratkonzentration auf die Aktivität der Tyrosinhydroxylase

Der enzymatische L-Dopa Umsatz der Tyrosinhydroxylase ist abhängig von der im Ansatz befindlichen Menge an Substrat. Zur Überprüfung dieser Annahme bestimmte ich die Aktivität der TH in Anwesenheit aufsteigender Substratkonzentrationen. L-Tyrosin wurde dabei in einem Konzentrationsbereich zwischen 6,25 und 100  $\mu\text{mol/l}$  eingesetzt, und die TH-Aktivität wurde über einen Zeitraum von 2 Minuten unter Einsatz von 100  $\mu\text{mol/l}$  DMPH<sub>4</sub> und in Anwesenheit der NADH-abhängigen Dihydropterinreduktase (s. Abschnitt 3.1.2) bestimmt. In Abwesenheit von L-Tyrosin waren keine L-Dopa Peaks detektierbar. Ab einer eingesetzten L-Tyrosin Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  stieg die TH-Aktivität dann steil an. Größere Konzentrationen als die im Ansatz befindlichen 100  $\mu\text{mol/l}$  ließen sich nicht zuverlässig untersuchen, da L-Tyrosin sich nur bis zu dieser Konzentration in Wasser lösen ließ. Abb. 5 gibt die Ergebnisse mit der hTH1 wieder. In meinem Standardansatz zur Bestimmung der basalen TH-Aktivität setzte ich im Folgenden L-Tyrosin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  ein, für die enzymkinetischen Untersuchungen wurde die Konzentration zwischen 12,5 und 100  $\mu\text{mol/l}$  variiert. Dabei stieg die Aktivität im Bereich zwischen 0,1 und 10  $\mu\text{mol/l}$  relativ steil an, während bei den höheren Konzentrationen 50 und 100  $\mu\text{mol/l}$  nur noch eine leichte Zunahme zu beobachten war. Der Einsatz von BH<sub>4</sub> und MPH<sub>4</sub> zeigte einen ähnlichen Verlauf mit Enzymaktivitäten von maximal 16,3 bzw. 11,8 nmol L-Dopa/min/mg Protein. DMPH<sub>4</sub> wurde zur Bestimmung der basalen TH-Aktivität mit 100  $\mu\text{mol/l}$  eingesetzt, für die kinetischen Versuche wurde die Konzentration zwischen 12,5 und 100  $\mu\text{mol/l}$  variiert.

### 3.1.4 Einfluss des Zusatzes von zweiwertigem Eisen im TH-Ansatz

Da die Anwesenheit von zweiwertigen Eisenionen für die Funktion der TH essentiell ist, setzte ich in meinen Vorversuchen Eisen(II)-Sulfat (Fe(II)) in verschiedenen Konzentrationen 0,1 und 100  $\mu\text{mol/l}$  ein, um die für die enzymatische Reaktion kritische Konzentration zu ermitteln. Bei diesen Versuchen setzte ich das Proteinkonzentrat in einer Verdünnung von 1:5000 an, die Konzentration der katalytischen Untereinheiten der Tyrosinhydroxylase betrug dabei 0,12  $\mu\text{mol/l}$ . Zwischen 0,5 und 100  $\mu\text{mol/l}$  eingesetztem Fe (II) war keine wesentliche Änderung der TH-Aktivität mit Werten zwischen 200 und 300 nmol L-Dopa/min/mg Protein zu beobachten. Erst ab einer Fe (II)-Konzentration von 0,1  $\mu\text{mol/l}$  sank der L-Dopa Umsatz deutlich ab. In den folgenden Ansätzen zur Bestimmung der TH-Aktivität löste ich das Proteinkonzentrat im letzten Verdünnungsschritt in

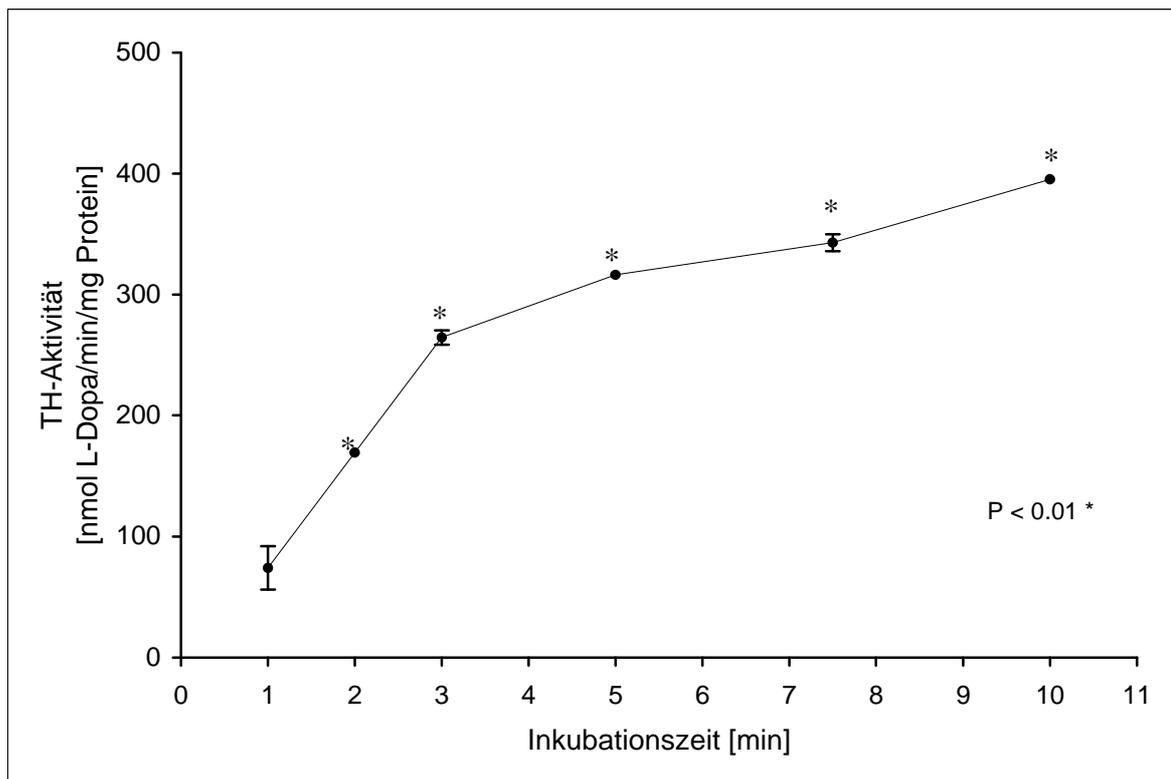


**Abb. 5:** Aktivität der hTH1 in Anwesenheit aufsteigender Substratkonzentrationen. Die gekennzeichneten Enzymaktivitäten sind statistisch signifikant höher als die Aktivität bei 6,25 µmol/l L-Tyrosin.

Eisen(II)-Sulfat-Lösung (1 mmol/l), entsprechend einer Endverdünnung von 50 µmol/l im Ansatz, um eine ausreichende Sättigung der TH mit Eisen zu gewährleisten. Auch bei der mit Eisen beladenen hTH1 (Verhältnis Eisen zu Untereinheit: 1:1) führte der Zusatz von zweiwertigen Eisenionen zu wesentlich höheren Enzymaktivitäten.

### 3.1.5 Abhängigkeit der Produktformation von der Inkubationszeit

Ich bestimmte die Formation des Reaktionsproduktes L-Dopa in nmol/mg Protein über einen Zeitraum von insgesamt 10 Minuten bei einer Temperatur von 30°C. Die Konzentration von Substrat und Kofaktor betrug dabei 100 µmol/l, und der Ansatz erfolgte in Anwesenheit der Dihydropterinreduktase (s. Abschnitt 3.1.2). Am Anfang der Inkubation ermittelte ich einen relativ raschen Anstieg der Produktformation, der über einen Zeitraum von 3 Minuten linear war. Im weiteren Verlauf flachte die Kurve, bei der die L-Dopa Menge gegen die Zeit aufgetragen wurde, dann deutlich ab. Nach Inkubationszeiten länger als 5 Minuten nahm die Menge des Reaktionsproduktes nur noch geringfügig zu (s. Abb. 6). Für alle weiteren Ansätze erfolgte die Bestimmung der TH Aktivität über 2 Minuten.



**Abb. 6:** L-Dopa-Formation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Angaben zur Signifikanz der gekennzeichneten Werte beziehen sich auf die entstandene L-Dopa Menge nach 1 Minute.

### 3.2 Hemmung der Tyrosinhydroxylase Aktivität durch Dopamin und verschiedene Tetrahydroisochinoline

Zunächst erfolgte die Bestimmung der Aktivität der hTH1 und hTH4 in Anwesenheit von Dopamin, einem natürlichen *feedback*-Inhibitor des Enzyms. Dopamin wurde dabei in aufsteigenden Konzentrationen dem Assay beigefügt und die ermittelten Aktivitäten mit der basalen, also derjenigen Aktivität in Abwesenheit von Inhibitoren, verglichen. In gleicher Weise wurden anschließend die verschiedenen Tetrahydroisochinoline bezüglich ihrer Wirkung auf die basale TH-Aktivität untersucht. Die basale Aktivität der hTH1 lag bei  $294,3 \pm 22,0$  nmol L-Dopa/min/mg Protein, die der hTH4 bei  $564,3 \pm 39,3$  nmol/mg/min.

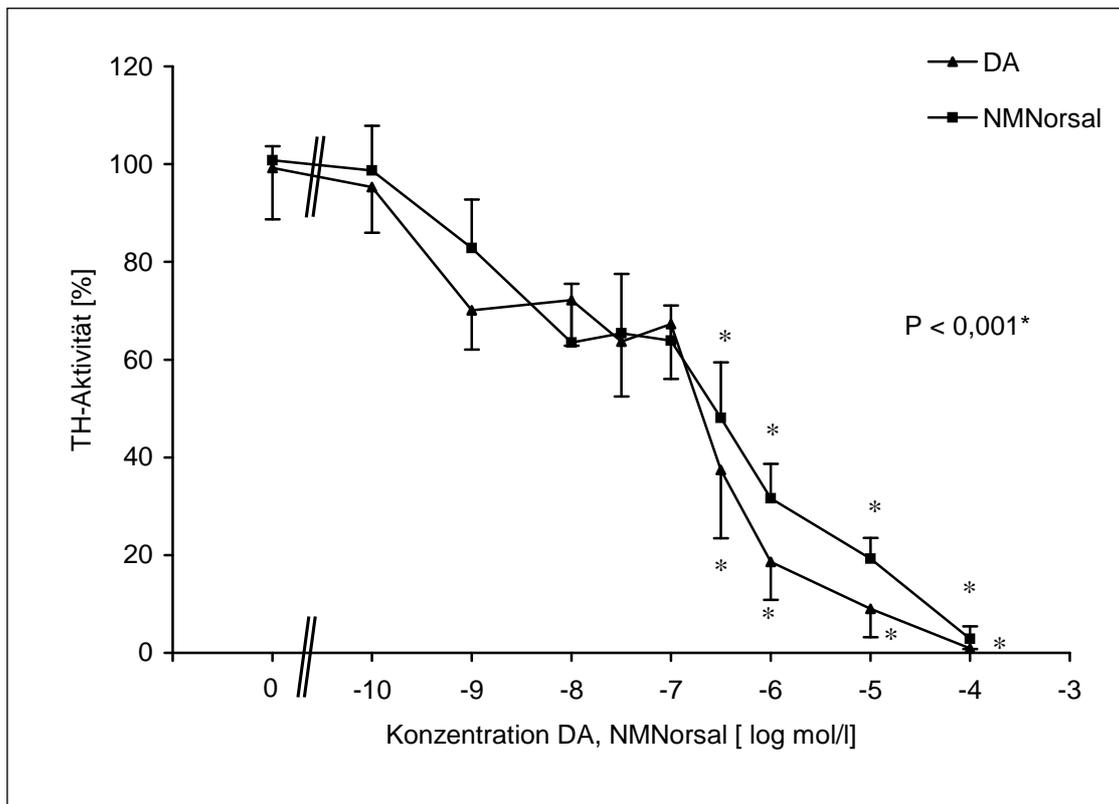
#### 3.2.1 *Feedback*-Hemmung der Tyrosinhydroxylase durch Dopamin

Die Konzentration von Dopamin wurde in einem Bereich zwischen 0,0001 und 100  $\mu\text{mol/l}$  variiert. Der Zusatz von Dopamin bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Aktivität der hTH1 bis auf  $2,6 \pm 0,2$  nmol L-Dopa/min/mg Protein bei der höchsten

eingesetzten Dopaminkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$ . Der gleiche Effekt ließ sich bei der hTH4 beobachten, dessen Aktivität bis auf  $188,7 \pm 5,1$  nmol L-Dopa/min/mg Protein bei einer eingesetzten Dopamin Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  absank. Für den unteren Konzentrationsbereich von 0,0001 bis 0,1  $\mu\text{mol/l}$  war der Hemmeffekt von Dopamin relativ gering, während ab einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{mol/l}$  ein wesentlich steilerer Abfall der TH-Aktivität zu beobachten war. Für die Darstellung der Versuchsergebnisse in der Gesamtauswertung wurden die absoluten Werte für die ermittelten Aktivitäten in prozentuale Werte umgerechnet, wobei die basale Aktivität als Ausgangsaktivität gleich 100 % festgelegt wurde und alle übrigen Werte auf diese bezogen wurden (s. Abb. 7). Der Wert für die halbmaximale Hemmstoffkonzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) von Dopamin lag bei 0,2  $\mu\text{mol/l}$  für die hTH1 und bei 0,8  $\mu\text{mol/l}$  für die hTH4 und wurde graphisch ermittelt.

### **3.2.2 Hemmung der basalen Tyrosinhydroxylase Aktivität durch N-Methyl-Norsalsolinol und andere Tetrahydroisochinoline**

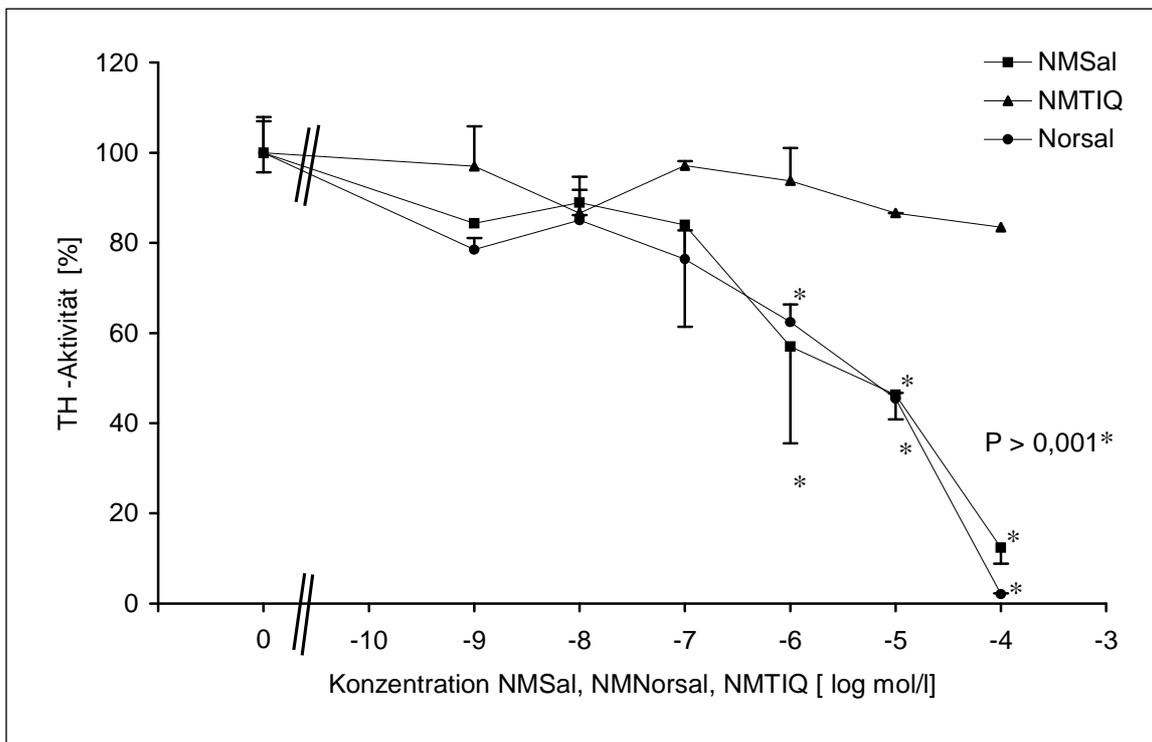
In gleicher Weise wie der Einfluss von Dopamin auf die TH-Aktivität wurde der Einfluss von N-Methyl-Norsalsolinol (NMNorsal) auf die basale Aktivität der hTH1 und hTH4 untersucht. Für den eingesetzten Bereich zwischen 0,0001 und 100  $\mu\text{mol/l}$  ließ sich ein konzentrationsabhängiger Hemmeffekt auf die Aktivitäten beider Isoenzyme nachweisen, bis auf  $2,9 \pm 1,9$  nmol L- Dopa/min/mg Protein bei der hTH1 und  $144,6 \pm 15,5$  nmol L-Dopa/min/mg Protein bei der hTH4. Die  $\text{IC}_{50}$  für NMNorsal lag bei 0,4  $\mu\text{mol/l}$  bei der hTH1 und 1,5  $\mu\text{mol/L}$  bei der hTH4. Auch hier zeigte sich eine relativ rasche Abnahme der TH Aktivität ab einer eingesetzten Hemmstoffkonzentration von 0,5  $\mu\text{mol/l}$ . Abbildung 7 zeigt die konzentrationsabhängige Hemmwirkung von Dopamin und NMNorsal auf die hTH1. Die Ergebnisse mit der hTH4 ergaben ein nahezu identisches Bild, weshalb aus Gründen der Übersichtlichkeit auf ihre Darstellung hier verzichtet wird. Die Aktivität der TH sank bei 100  $\mu\text{mol/l}$  Norsal bis auf  $16,7 \pm 1,6$  nmol L-Dopa/min/mg Protein, die  $\text{IC}_{50}$  lag bei 5,5  $\mu\text{mol/l}$ . Bei NMSal hemmten 100  $\mu\text{mol/L}$  die Aktivität bis auf  $97,4 \pm 27,9$  nmol L-Dopa/min/mg Protein, bei einer  $\text{IC}_{50}$  von 4,5  $\mu\text{mol/l}$ . Demgegenüber zeigte der Einsatz NMTIQ im Ansatz keinen mit den anderen Substanzen vergleichbaren Effekt auf die TH-Aktivität. Diese sank zwar in Anwesenheit von NMTIQ geringfügig auf Werte zwischen 97,1 % und 86,6 % der basalen Aktivität über den untersuchten Konzentrationsbereich, eine konzentrationsabhängige Hemmung der TH-Aktivität wie bei 6,7-dihydroxylierten Tetrahydroisochinolinolen ließ sich jedoch nicht beobachten.



**Abb. 7:** Wirkung von Dopamin (DA) und NMNorsal auf die basale TH-Aktivität. Die eingesetzten Hemmstoff-Konzentrationen sind logarithmisch dargestellt, die Werte für die enzymatische Aktivität der TH als Prozentwerte relativ zur basalen Aktivität. Auf diese beziehen sich auch die Angaben zur Signifikanz der gekennzeichneten Werte.

### 3.3 Kinetik des Hemmeffektes von Dopamin und N-Methyl-Norsalsolinol

Wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, ist die Geschwindigkeit des enzymatischen Umsatzes der TH unter anderem abhängig von der Konzentration des in den Versuchen eingesetzten Substrates L-Tyrosin und des Kofaktors DMPH<sub>4</sub>. In den folgenden Versuchen sollte deshalb untersucht werden, in welcher Weise die im Ansatz befindliche Menge an Substrat bzw. Kofaktor einen Einfluss auf die in Abschnitt 3.2.2 gezeigte Hemmung der TH hat. Zu diesem Zweck bestimmte ich die enzymatische Aktivität der hTH1 und hTH4 mit und ohne Hemmstoff in einer festen Konzentration, während L-Tyrosin bzw. DMPH<sub>4</sub> in aufsteigenden Konzentrationen dem Ansatz eingesetzt wurden. Zunächst wurde auch bei diesen Versuchen der natürliche Feedback-Inhibitor Dopamin eingesetzt, anschließend untersuchte ich aus der Gruppe der Tetrahydroisochinoline N-Methyl-Norsalsolinol. Zur Charakterisierung der Kinetik erfolgte die graphische Auswertung der Versuchsergebnisse in einem Lineweaver-Burk-Diagramm, bei dem die reziproken Werte für die Enzymaktivität gegen die reziproken Konzentrationen des Substrates bzw. Kofaktors gegeneinander aufgetragen wurden. Durch die Datenpunkte



**Abb. 8.:** Wirkung von NMSal, Norsal und NMTIQ auf die TH. NMTIQ zeigte im Gegensatz zu den anderen Tetrahydroisochinolininen keinen konzentrationsabhängigen Hemmeffekt auf die Enzymaktivität.

für die Enzymaktivität mit und ohne Inhibitor wurde je eine lineare Trendlinie gelegt, anschließend wurden die Schnittpunkte dieser Geraden mit den Achsen des Diagramms ermittelt. Auf diese Weise lassen sich Aussagen zur Michaelis-Konstante  $K_M$  sowie zur maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  der gehemmten und ungehemmten Reaktion treffen.

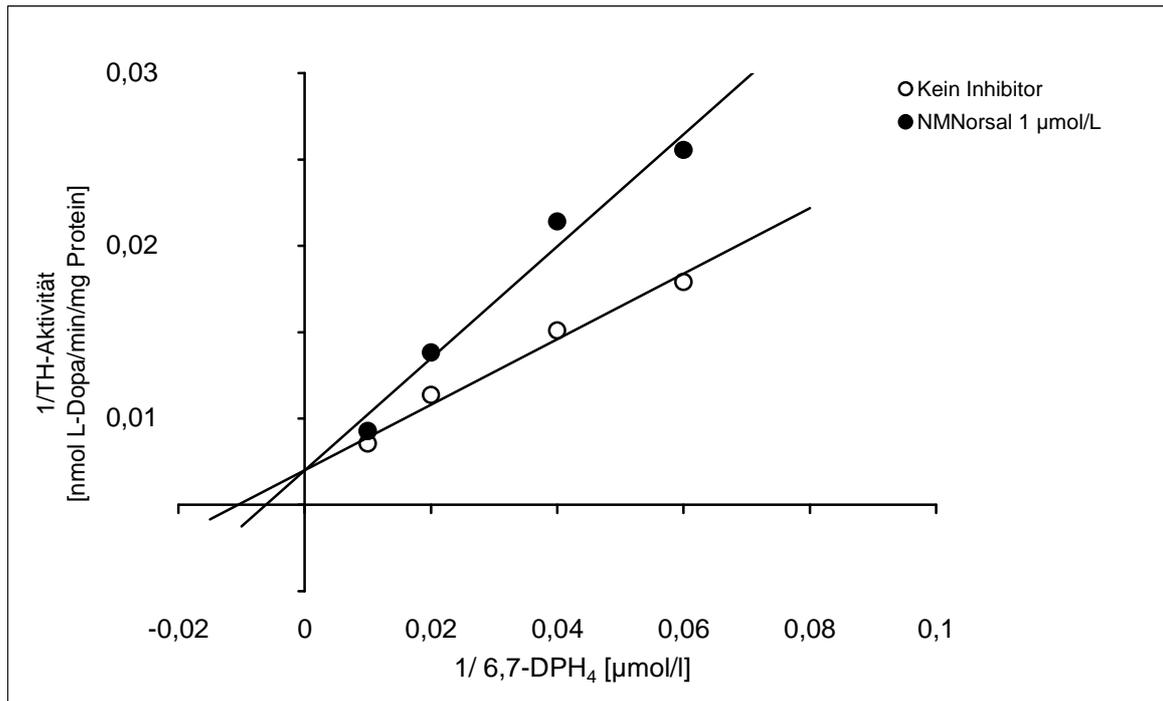
### 3.3.1 Kinetik der Hemmung von Dopamin und N-Methyl-Norsalsolinol im Hinblick auf den Kofaktor

Ich setzte Dopamin und NMNorsal zunächst in einer ungefähr der  $IC_{50}$  entsprechenden Konzentration von  $1 \mu\text{mol/l}$  an, die Konzentration des Kofaktors  $\text{DMPH}_4$  wurde zwischen 25 und  $100 \mu\text{mol/l}$  variiert. Bei den durchgeführten Versuchen konnte ich für beide Inhibitoren eine Abschwächung des Hemmeffektes bei aufsteigenden Kofaktor-Konzentrationen feststellen. Bei der Auswertung im Lineweaver-Burk-Diagramm schnitten sich die Geraden der ungehemmten und gehemmten Reaktion auf der y-Achse, an einem Punkt, der definitionsgemäß dem Wert  $1/V_{max}$  entspricht. Demnach ist der Wert für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  für das gehemmte und ungehemmte Enzym identisch. Beide Geraden schneiden die X-Achse an unterschiedlichen Stellen im

	Humane Tyrosinhydroxylase Typ 1 IC <sub>50</sub> [µmol/l]	Humane Tyrosinhydroxylase Typ 4 IC <sub>50</sub> [µmol/l]
Dopamin	0,2	0,8
N-Methyl-Norsalsolinol (NMSal)	0,4	1,5
Norsalsolinol (Norsal)		5,5
N-Methyl-Salsolinol (NMSal)		4,5

**Tabelle 1:** Halbmaximale Hemmstoffkonzentration (IC<sub>50</sub>) verschiedener Inhibitoren der hTH1 und hTH4. Die Werte wurden graphisch aus Diagrammen ermittelt, in denen die Aktivität der TH als Prozentwert der basalen Aktivität gegen logarithmisch skalierte Hemmstoffkonzentration aufgetragen wurde.

negativen Bereich des Diagramms, und diese Punkte entsprechen den Werten  $-1/K_m$  für das gehemmte und ungehemmte Enzym (siehe Abb.9). Dies bedeutet, dass die Michaelis-Konstante  $K_m$  für den Kofaktor beim gehemmten Enzym erhöht ist, während die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  konstant bleibt. Der Verlauf der Trendlinien zeigt somit das Bild einer kompetitiven Hemmung der TH durch Dopamin und NMNorsal im Hinblick auf den Kofaktor DMPH<sub>4</sub>. Zur Überprüfung der Ergebnisse setzte ich in weiteren Versuchen Dopamin und NMNorsal in einer höheren Konzentration von 100 µmol/l an, anschließend in einer niedrigeren Konzentration von 0,1 µmol/l. Auch bei diesen eingesetzten Hemmstoffkonzentrationen oberhalb und unterhalb der IC<sub>50</sub> fand ich bei der Auswertung nach Lineweaver-Burk das Bild einer kompetitiven Hemmung im Hinblick auf den Kofaktor. Abb. 9 zeigt die Ergebnisse mit NMNorsal am Beispiel der hTH4.



**Abb. 9:** Lineweaver-Burk-Darstellung der kompetitiven Hemmung der hTH4 durch NMNorsal (Konzentration: 1 µmol/L) im Hinblick auf den Kofaktor DMPH<sub>4</sub>. Der Schnittpunkt der geraden mit der Y-Achse zeigt eine identische  $V_{max}$ , der Schnittpunkt mit der x-Achse eine unterschiedliche  $K_m$  an.

### 3.3.2 Ermittlung der Dissoziationskonstanten für Dopamin und N-Methyl-Norsalsolinol

Bei den Versuchen zur Kinetik des Hemmeffektes von Dopamin und NMNorsal im Hinblick auf den Kofaktor zeigte sich, dass beide Substanzen die Michaeliskonstante für DMPH<sub>4</sub> im Sinne einer kompetitiven Hemmung erhöhen. Aus den experimentell gewonnenen Daten für die  $K_M$  der jeweils gehemmten und ungehemmten Reaktion sowie der eingesetzten Hemmstoffkonzentration lässt sich die Dissoziationskonstante  $K_i$  für den Enzym-Inhibitor Komplex mit Hilfe folgender Formel (Karlson et al., 2005) berechnen:

$$K_i = \frac{K_M * [I]}{K_M' - K_M}$$

$K_i$  = Dissoziationskonstante

$K_M$  = Michaelis-Konstante für das ungehemmte Enzym

$K_M'$  = Michaelis-Konstante für das gehemmte Enzym

$I$  = Hemmstoffkonzentration

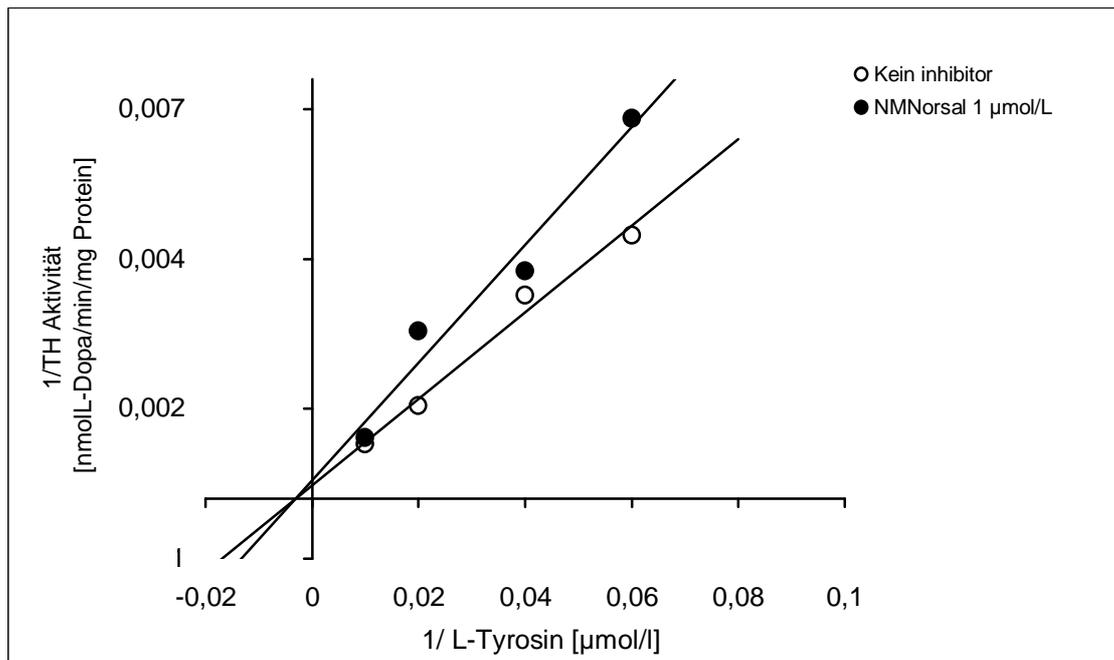
$K_i$  ist definiert als diejenige Konzentration eines Hemmstoffes, die bei äquimolarer Konzentration enzymatischer Untereinheiten die Hälfte der vorhandenen Bindungsstellen besetzt. Die Dissoziationskonstante  $K_i$  beschreibt auf diese Weise die Affinität eines Inhibitors zur Bindungsstelle am Enzym. Die Werte für  $K_M$  und  $K_{M'}$  wurden aus jedem wie unter Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Einzelversuch aus der Darstellung nach Lineweaver-Burk graphisch ermittelt und zusammen mit der jeweils eingesetzten Hemmstoffkonzentration in die oben beschriebene Formel eingesetzt. Aus den so berechneten Werten für die  $K_i$  aus den verschiedenen Versuchen bestimmte ich den Mittelwert für jeden Hemmstoff. Für Dopamin und NMNorsal ermittelte ich eine für die hTH1 und hTH4 annähernd identische Dissoziationskonstante, dessen Wert bei etwa 0,5  $\mu\text{mol/l}$  lag. Tabelle 2 fasst die Ergebnisse zusammen.

	Humane Tyrosinhydroxylase Typ 1 $K_i$ [ $\mu\text{mol/L}$ ] $\pm$ STABW	Humane Tyrosinhydroxylase Typ 4 $K_i$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Mittelwert $\pm$ STABW
Dopamin	0,47 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ *	0,43 $\pm$ 0,08
NMNorsal	0,84 $\pm$ 0,06	0,50 $\pm$ 0,00	0,67 $\pm$ 0,20

**Tab. 2:** Dissoziationskonstante  $K_i$  von Dopamin und N-Methyl-Norsalsolinol (NMNorsal) für die hTH1 und hTH4, berechnet aus den kinetischen Versuchen im Hinblick auf den Kofaktor DMPH<sub>4</sub>. \* keine Standardabweichung, da Einfachbestimmung.

### 3.3.3 Kinetik des Hemmeffektes von Dopamin und N-Methyl-Norsalsolinol im Hinblick auf das Substrat L-Tyrosin

Nach der Beschreibung der Kinetik der Hemmung von Dopamin und NMNorsal im Hinblick auf den Kofaktor untersuchte ich den Einfluss der Substratkonzentration auf die Hemmung der TH. Auch bei diesen Versuchen wählte ich zunächst eine Hemmstoffkonzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$ . Die enzymatische Aktivität der TH mit und ohne Dopamin bzw. NMNorsal wurde bei aufsteigenden L-Tyrosin-Konzentrationen zwischen 16.67  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$  bestimmt und die Ergebnisse nach Lineweaver und Burk

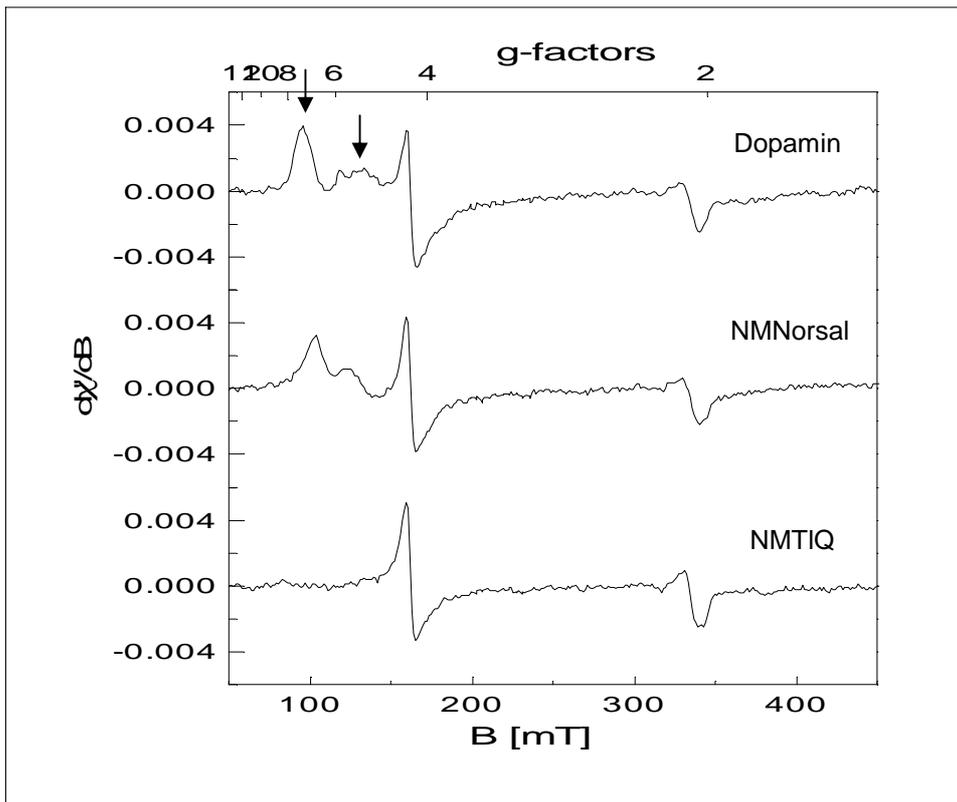


**Abb. 10:** Lineweaver-Burk-Darstellung der nichtkompetitiven Hemmung der TH durch NMNorsal im Hinblick auf das Substrat L-Tyrosin.

dargestellt. Bei den durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass sich die Geraden der gehemmten und ungehemmten Reaktion auf der x-Achse schneiden an einem Punkt, der dem Wert  $-1/K_m$  entspricht, während die y-Achse an unterschiedlichen Stellen geschnitten wird. Während die Michaelis-Konstante  $K_m$  für das gehemmte und ungehemmte Enzym also konstant bleibt, ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  vermindert, was dem Bild einer nichtkompetitiven Hemmung im Hinblick auf das Substrat L-Tyrosin entspricht (Abb. 10).

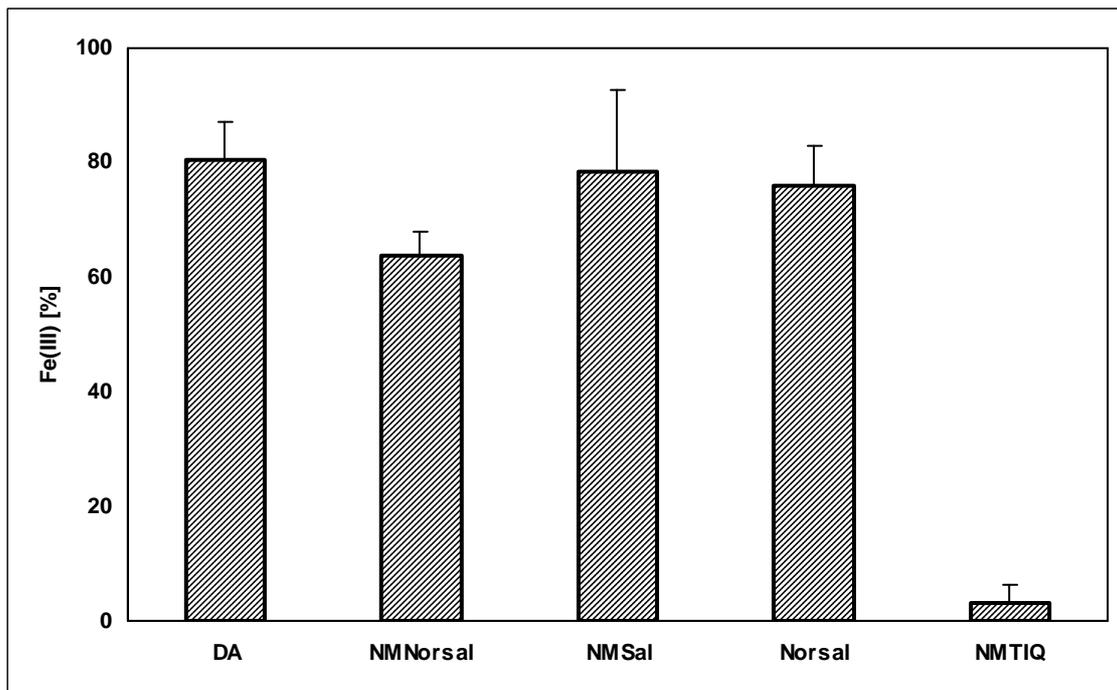
### 3.4 Wirkung von Dopamin und verschiedenen Tetrahydroisochinolininen auf das katalytische Eisenatom der Tyrosinhydroxylase

Zweiwertige Eisenionen spielen als essentieller Kofaktor der TH eine wichtige Rolle. In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, welchen Einfluss zunächst Dopamin, dann verschiedene Tetrahydroisochinoline auf das Eisenatom im katalytischen Zentrum des Enzyms haben. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Physik der Universität Lübeck wurde in mehreren Versuchen die elektroparamagnetische Resonanz des Eisenatoms im katalytischen Zentrum der TH gemessen. Die Methodik der EPR-Spektroskopie wurde in Kapitel 2, Abschnitt 2.2.4, kurz beschrieben. Ich verwendete bei diesen Versuchen konzentriertes Homogenat der hTH1 und hTH4, die Konzentration der katalytischen



**Abb. 11:** Elektroparamagnetische Resonanz des Eisenatoms im katalytischen Zentrum der TH. Dargestellt sind die Ergebnisse mit drei der fünf untersuchten Inhibitoren. In Anwesenheit NMTIQ fehlt das für TH-gebundenes Eisen (III) charakteristische Signal, der bei Dopamin und N-Methyl-Norsalsolinol deutlich zu sehen ist (Pfeile).

Untereinheiten betrug dabei  $100 \mu\text{mol/l}$  bei der hTH1 bzw.  $200 \mu\text{mol/l}$  bei der hTH4. Eisen(II)-Sulfat wurde in äquimolarer Konzentration dem Homogenat beigefügt, um eine Beladung der katalytischen Untereinheiten zu gewährleisten. Es folgte der Zusatz der verschiedenen Inhibitoren in ebenfalls äquimolarer Konzentration und eine kurze Inkubation des Gemisches für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Als Negativkontrolle dienten bei diesen Versuchen Proben, die nur Eisen(II)-Sulfat und Dopamin bzw. NMNorsal enthielten. Unmittelbar nach der Inkubation erfolgte das Einfrieren der Proben mit flüssigem Stickstoff und die Messung der EPR-Spektren. Die Proben, welche Dopamin als Zusatz enthielten, zeigten in ihrem Spektrum ein charakteristisches Signal, welches für die Anwesenheit von gebundenem Eisen (III) im katalytischen Zentrum der TH typisch ist (s. Abb. 8). Auch beim Zusatz von N-Methyl-Norsalsolinol und den anderen 6,7-dihydroxylierten Tetrahydroisochinolin Norsal und NMSal konnte ein entsprechendes Signal für proteingebundenes oxidiertes Eisen identifiziert werden. Hingegen konnte keine Formation von TH-gebundenem Eisen (III) in den Proben mit NMTIQ nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der aufgenommenen Spektren ergab eine etwa gleich große Menge an entstandenem Fe (III) in Anwesenheit von Dopamin

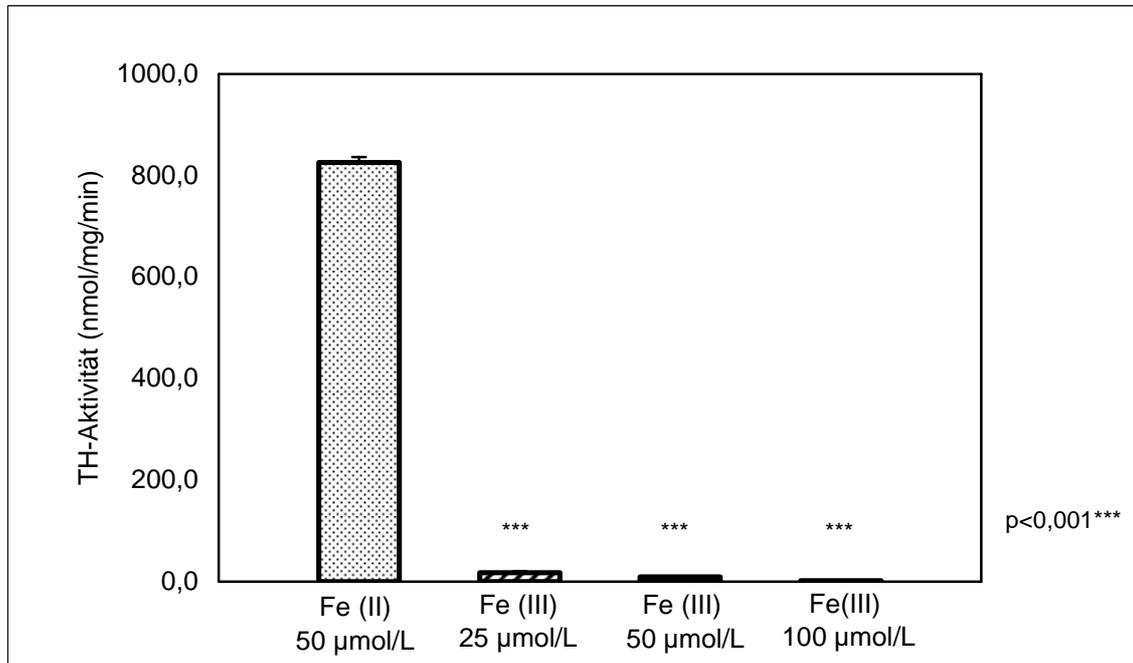


**Abb. 12:** Aus den Versuchen zur ESR-Spektroskopie wurde die entstandene Menge an Eisen(III) in Anwesenheit der fünf untersuchten Substanzen berechnet.

und den dihydroxylierten Tetrahydroisochinolin - Derivaten, siehe Abb. 11. Dagegen führte der Zusatz von Dopamin bzw. NMNorsal bei den Kontrollproben, die keine Tyrosinhydroxylase enthielten, zu keiner in der EPR-Spektroskopie nachweisbarer Oxidation von Fe (II).

### 3.5 Tyrosinhydroxylase Aktivität in Anwesenheit von oxidiertem Eisen.

Durch den folgenden Versuch sollte geprüft werden, ob die Anwesenheit von oxidiertem Eisen tatsächlich einen Einfluss auf die Aktivität der Tyrosinhydroxylase hat. Zu diesem Zweck musste dem TH-Ansatz vor Beginn der Reaktion dreiwertiges Eisen in ausreichender Menge hinzugefügt werden, um eine Beladung der katalytischen Untereinheiten zu gewährleisten. Neben der bisher verwendeten Lösung mit 50 µmol/l Eisen(II)-Sulfat setzte ich das Protein deshalb in Lösungen mit Eisen(III)-Sulfat in den Konzentrationen 25, 50, und 100 µmol/l an und bestimmte danach auf herkömmlichem Weg die TH Aktivität. Der basale Wert bei diesem Versuch dabei um 800 nmol L-Dopa/min/mg Protein in Anwesenheit von 50 µmol/l Eisen(II)-Sulfat. Schon der Zusatz von 25 µmol/l Eisen(III) dagegen bewirkte ein deutliches Absinken der Enzymaktivität auf Werte um 20 nmol L-Dopa/min/mg Protein, noch höhere Konzentrationen an oxidiertem Eisen führten zu kaum noch messbaren Werten. Die Ergebnisse dieses Versuches, wiedergegeben in Abb. 13, zeigen also, dass die Anwesenheit von Eisen(III) im

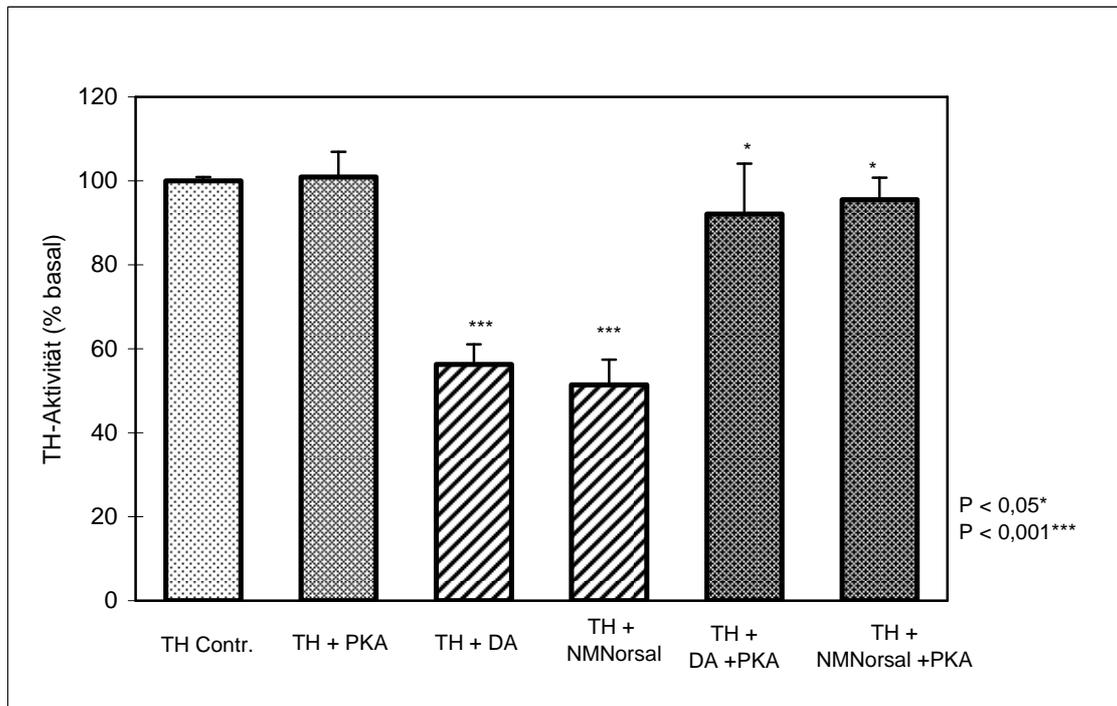


**Abb. 13:** Die Anwesenheit von oxidiertem Eisen im TH-Assay führte zu einer nahezu vollständigen Blockade der enzymatischen Reaktion mit statistisch signifikant kleineren Werten als bei 50 µmol/l eingesetztem Eisen(II)-Sulfat.

Überschuss zu einer nahezu vollständigen Blockade des Reaktionsablaufes führt.

### 3.6 Phosphorylierung der Tyrosinhydroxylase am N-terminalen Abschnitt durch die cAMP abhängige Proteinkinase A

Wie bereits in der Einleitung erwähnt ist ein natürlicher Weg der Aktivierung der Tyrosinhydroxylase *in vivo* die Phosphorylierung an der regulatorischen Untereinheit, die sich am N-terminalen Abschnitt des Enzyms befindet. Die folgenden Versuche sollten zeigen, ob und in welcher Weise ein im Ansatz befindliches Enzymsystem zur Phosphorylierung der TH die basale und die durch Dopamin und NMNorsal gehemmte Enzymaktivität beeinflusst. In Anlehnung an die Arbeiten anderer Autoren wählte ich einen Versuchsablauf, in dem das Protein zunächst in Anwesenheit der Inhibitoren für kurze Zeit bei 30°C im Wasserbad vorinkubiert wurde. Anschließend sollte die Phosphorylierung der nun mit den Hemmstoffen beladenen TH am N-Terminus erfolgen, dazu wurde die Proteinkinase A mit Ihrem Kosubstrat ATP zu den Proben gegeben und die Reaktion durch den Zusatz von cAMP gestartet, wobei auch hier bei 30°C im Wasserbad inkubiert wurde. Danach erfolgte wie in den vorherigen Versuchen die Bestimmung der basalen TH-Aktivität über 2 Minuten durch Zugabe des Kofaktors und des Substrates. Bei den Ansätzen, in denen die ungehemmte Tyrosinhydroxylase als



**Abb. 14:** Wirkung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A auf die basale und durch Dopamin und N-Methyl-Norsalsolinol gehemmte Tyrosinhydroxylase. Statistisch signifikant größer sind die Aktivitäten der phosphorylierten TH im Vergleich zu den Aktivitäten der durch 1  $\mu\text{mol/l}$  Dopamin/NMNorsal gehemmten TH. Diese waren wiederum statistisch signifikant kleiner als die basale Aktivität.

Substrat der Proteinkinase A phosphoryliert wurde, konnte keine wesentliche Änderung des enzymatischen Umsatzes festgestellt werden. Die Aktivität der mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Dopamin und NMNorsal vorinkubierten TH jedoch, ohne Zusatz der Proteinkinase A auf etwa 50 % der basalen Aktivität gehemmt, konnte durch die Phosphorylierung wieder gesteigert werden und Erreichte annähernd 100 % des Ausgangswertes (s. Abb. 14). Diese Versuche zeigten, dass die Hemmung der Tyrosinhydroxylase durch NMNorsal, genau wie beim natürlichen Feedback-Inhibitor Dopamin, prinzipiell durch die Phosphorylierung am N-Terminus reversibel ist. Eine Aktivierung des ungehemmten Enzyms über die basale Aktivität hinaus konnte hingegen in meinen Versuchen nicht nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

Die Tyrosinhydroxylase (TH), das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Katecholaminsynthese (Nagatsu et al., 1964), katalysiert die 3-Hydroxylierung von L-Tyrosin zu L-Dopa. Das humane Enzym, welches in 4 verschiedenen Isoformen existiert, befindet sich im Zytosol aller katecholaminproduzierender Zellen, vorwiegend im Zentralnervensystem und der Nebenniere. Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin sind potente Inhibitoren der TH-Aktivität und die physiologischen *feedback*-Inhibitoren des Enzyms. Drei Gesichtspunkte der natürlichen Regulation des Enzyms durch die Katecholamine waren für meine Untersuchungen von Bedeutung: zum einen die reversible, kompetitive Hemmung in Bezug auf den Kofaktor BH<sub>4</sub>, die Blockade der TH-Aktivität durch die Oxidation des Eisenatoms im katalytischen Zentrum des Proteins (Kumer und Vrana, 1996; Fitzpatrick 1999), und schliesslich die Phosphorylierung des Proteins durch die PKA und damit die Wiederherstellung seiner Aktivität (Andersen et al., 1992). Anhand dieser drei Gesichtspunkte konnte in meinen Versuchen mit humaner rekombinanter Tyrosinhydroxylase gezeigt werden, dass 6,7-dihydroxylierte Tetrahydroisochinoline das Enzym analog zur physiologischen *feedback*-Hemmung durch Katecholamine hemmen. Die an 6- und 7- Position dihydroxylierten Tetrahydroisochinoline waren zunächst wie Dopamin wirksame Inhibitoren der TH-Aktivität. Die Hemmung erfolgte dabei als zum Kofaktor kompetitive Bindung an das Eisenatom im katalytischen Zentrum der TH, dessen Oxidation in den EPR-spektroskopischen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte und eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge hatte. Schliesslich konnte die Enzymaktivität der durch die Tetrahydroisochinoline gehemmten TH durch Anwesenheit der Proteinkinase A wiederhergestellt werden. Grundlage für meine Untersuchungen bildete die Erkenntnis, dass Dopamin sich mit seinen beiden OH-Gruppen an das katalytische Eisenatom der TH anlagert (Almas et al., 1992). Ich verglich deshalb vier verschiedene Tetrahydroisochinolin-Derivate, die sich jeweils hinsichtlich ihrer funktionellen Gruppen voneinander unterschieden. Drei Derivate, nämlich N-Methyl-Norsalsolinol (NMNorsal), N-Methyl-Salsolinol (NMSal) und Norsalsolinol (Norsal) besitzen eine Katecholgruppe, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Methylierung an 1- und 2-Position. N-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (NMTIQ) hingegen besitzt keine Katecholgruppe an Position 6 und 7. Die Substanzen wurden zum einen in biochemischen Ansätzen zur Untersuchung ihrer hemmenden Wirkung auf die Enzymaktivität der TH, zum anderen in spektroskopischen Untersuchungen zur Darstellung ihrer Position im katalytischen Zentrum der TH verglichen. Der natürliche *feedback*-Inhibitor Dopamin diente dabei als Referenzsubstanz.

#### 4.1 Die enzymatische Reaktion der humanen rekombinanten Tyrosinhydroxylase

Vor den eigentlichen Untersuchungen zur Wirkung der Tetrahydroisochinoline auf die TH-Aktivität mussten zunächst Versuchsbedingungen geschaffen werden, unter denen die enzymatische Reaktion stabil und reproduzierbar verläuft. In meinem *in vitro* Ansatz zur Bestimmung der Tyrosinhydroxylase Aktivität verwendete ich rekombinantes humanes Protein der Isoformen 1 und 4, hergestellt aus *E. coli* Bakterien (Haavik et al. 1991). Der C-terminale Abschnitt des Enzyms, welcher das katalytische Zentrum enthält, ist bei allen 4 Isoformen des Menschen, aber auch im Vergleich mit anderen Säugetieren wie z.B. der Ratte identisch (Flatmark und Stevens, 1999). Naoi et al. (1988) beschrieben einen biochemischen Ansatz zur Bestimmung der Aktivität der Tyrosinhydroxylase unter Verwendung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion (HPLC/ED), bei dem Homogenat aus Gewebsschnitten menschlicher Gehirne und aus Phäochromozytom-Zellen der Ratte als Enzymquelle diente. Das gewonnene Enzymaterial wird bei diesem Ansatz in Anwesenheit aller für die Reaktion notwendigen Komponenten inkubiert, anschliessend wird die Menge des entstandenen Produktes L-Dopa chromatographisch bestimmt. Scholz et al. (1997) verwendeten einen leicht modifizierten Ansatz zur Bestimmung der TH-Aktivität im Nucleus accumbens der Ratte. Der Ansatz erlaubt eine relativ genaue und leicht durchführbare Quantifizierung des enzymatischen Umsatzes der Tyrosinhydroxylase. Das Reaktionsprodukt L-Dopa kann reproduzierbar mittels HPLC/ED detektiert werden, und das Verfahren erlaubt sehr sensitive Bestimmungen von Konzentrationsunterschieden im Bereich von wenigen pmol/l. Ich orientierte mich bei der Auswahl der Reagenzien an der Vorarbeit von Scholz et al. (1997), und ermittelte so in meinen Vorversuchen die optimalen Versuchsbedingungen hinsichtlich der Inkubationszeit sowie der erforderlichen Konzentrationen von Substrat, Kofaktor und zweiwertigem Eisen. Hinsichtlich der Verwendung von reinem, rekombinantem Proteinkonzentrat ergeben sich für die in meinen Versuchen geplanten Aussagen zu den biochemischen Mechanismen am katalytischen Zentrum des Proteins eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Verwendung von Homogenat aus lebenden Zellen. Bei den Versuchen war es notwendig, neben dem reinen Proteinkonzentrat alle für die Reaktion notwendigen Komponenten dem Ansatz hinzuzufügen. Durch die Möglichkeit der willkürlichen Veränderung jeder dieser Komponenten ist somit eine wesentlich genauere Kontrolle der Versuchsbedingungen möglich, was insbesondere im Hinblick auf den postulierten strikten Ablauf der enzymatischen Reaktion mit ihren einzelnen Komponenten wichtig ist. Bei den oben genannten Arbeiten wurde das gewonnene Homogenat vor der eigentlichen Inkubation

zur Aktivitätsbestimmung zunächst in Anwesenheit eines Inhibitors der L-Dopa-Dekarboxylase vorinkubiert, um eine weitere Verstoffwechslung von L-Dopa durch dieses in den catecholaminergen Zellen vorhandene Enzym zu vermeiden. Da es sich bei dem von mir verwendeten Homogenat um rekombinantes Proteinkonzentrat ohne andere zelluläre Bestandteile handelte, konnte ich dieses direkt für den Ansatz zur Aktivitätsbestimmung verwenden und auf eine entsprechende Vorinkubation, die aufgrund des schnellen Zerfalles der verwendeten hochempfindlichen Reagenzien immer kritisch ist, verzichten. Des Weiteren erlaubt das Wissen um die genaue Konzentration an TH-Untereinheiten stöchiometrisch genauere Aussagen zum postulierten Hemmechanismus am katalytischen Zentrum der 6,7-dihydroxylierten Tetrahydroisochinoline, da die genaue Konzentration an Eisenionen, mit denen das Enzym beladen ist, bekannt ist. Der Einsatz boviner Katalase zum Schutz vor der Entstehung freier Radikale während der Reaktion erwies sich in meinen Versuchen, wie auch bei Scholz et al. (1997), als vorteilhaft in Bezug auf die zu erreichenden Enzymaktivitäten. Ein für die praktische Durchführung der Versuche kritischer Punkt ist der rasche Zerfall einiger Reaktionskomponenten, insbesondere die Autooxidation des natürlichen Kofaktors  $\text{BH}_4$ . Neben der Verwendung des etwas stabileren und in der Literatur etablierten Kofaktor-Analogons  $\text{DMPH}_4$  (Kappock und Caradonna, 1996) führte der Einsatz der NADH-abhängigen Dihydropterinreduktase zu einem deutlichen Anstieg der Enzymaktivität um das 20- bis 30-fache. Der Einsatz eines solchen Redoxsystems wurde von Craine et al. (1972) anhand boviner Tyrosinhydroxylase etabliert, erste Versuche mit humaner rekombinanter TH aus Phäochromozytomzellen erfolgten durch Ribero et al. (1992). Hinsichtlich der basalen Aktivität der hTH1 und hTH4 in meinem Ansatz konnte ich mit deutlich höheren Ausgangsaktivitäten, verglichen mit Scholz et al. (1997) arbeiten. Neben der in meinen Versuchen erreichten relativ hohen Ausgangsaktivität der hTH1 und hTH4 ist die relativ kurz gewählte Inkubationszeit von 2 Minuten erwähnenswert. Für meine geplanten Aussagen zur Enzymkinetik musste für die Inkubation ein Zeitrahmen gewählt werden, in dem der Zuwachs der Produktentstehung linear verläuft, denn nur in dieser Phase besteht ein Fließgleichgewicht (steady state) der enzymatischen Reaktion. Die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes bleibt über die lineare Phase konstant, und die Steigung der Geraden in dieser Phase ist Ausdruck der Aktivität des Enzyms, bestimmt als  $\text{nmol L-Dopa/ mg Protein/ Zeiteinheit}$ . In meinen Untersuchungen verlief die enzymatische Reaktion der hTH1 und hTH4 über einen Zeitraum von 3 Minuten linear, um sich danach asymptotisch einem Maximum zu nähern. Für meine Untersuchungen wählte ich daher eine Inkubationszeit von 2 Minuten, die zwar deutlich kürzer als die der meisten anderen Voruntersuchungen war, dafür aber zuverlässige Bestimmungen zur Kinetik erlaubte (Kappock und Caradonna, 1996).

## 4.2 Wirkung der Tetrahydroisochinoline auf die Aktivität der Tyrosinhydroxylase

Bereits bei den Versuchen zur Hemmung der basalen TH-Aktivität zeigte sich, dass die Katecholstruktur bei den untersuchten Inhibitoren eine entscheidende Rolle zu spielen scheint, denn nur an Position 6 und 7 dihydroxylierte Tetrahydroisochinoline bzw. Dopamin konnten in meinen Versuchen die TH hemmen, während die Aktivität des rekombinanten Enzyms in Anwesenheit von NMTIQ nahezu unverändert blieb. Unter den untersuchten Substanzen war NMNorsal der stärkste Inhibitor der TH, dessen halbmaximale Hemmstoffkonzentration annähernd der von Dopamin entsprach. Hingegen waren um den Faktor 3-4 höhere Konzentrationen der TIQ-Derivate Norsal und NMSal erforderlich, um die Enzymaktivität um die Hälfte des Ausgangswertes zu reduzieren. Die Methylierung an Position 1 oder 2 des Isochinolin-Ringes scheint also nicht von entscheidender Bedeutung für den inhibitorischen Effekt zu sein, denn Norsal, welches nicht methyliert ist, vermochte die TH Aktivität ebenfalls zu hemmen. Eine weitere Arbeit verglich den Effekt vier verschiedener, nicht an 6- und 7- Position dihydroxylierter Tetrahydroisochinoline mit der Wirkung von Salsolinol auf Tyrosinhydroxylase aus dem Corpus striatum der Ratte und zeigte lediglich eine relevante Hemmwirkung von Salsolinol auf die Aktivität des Enzyms (Patsenka und Antkiewicz-Michaluk, 2004), während die an 1- oder 2- Position methylierten Tetrahydroisochinoline ohne Katechol-Gruppe zu keiner Hemmung der Enzymaktivität führten. Analog zur Kinetik der TH-Hemmung durch Katecholamine, welche in biochemischen Ansätzen und Untersuchungen zur Röntgenkristallsstruktur an rekombinanter TH des Menschen (Almas et al., 1992) und der Ratte (Ribeiro et al., 1992) ausführlich untersucht wurde, war die Kinetik der Hemmung durch NMNorsal in meinen Ansätzen kompetitiv zum Tetrahydropterin- Kofaktor und nichtkompetitiv zu dem Substrat L-Tyrosin. Scholz et al. (1997) charakterisierten diese Art der Hemmung anhand von Lineweaver-Burk-Diagrammen bereits bei NMNorsal, wobei Homogenat aus Gewebsschnitten des Nucleus accumbens der Ratte als Enzymquelle diente. Die Untersuchungen von Patsenka und Antkiewicz-Michaluk (2004) bestätigten die Ergebnisse einer kompetitiven Hemmung von Salsolinol in Bezug auf den Kofaktor. Weitere Hinweise auf den Hemmechanismus der Tetrahydroisochinoline mit Katecholstruktur ergeben sich bei genauerer Betrachtung des katalytischen Zentrums der TH und des Ablaufes der enzymatischen Reaktion. Untersuchungen zur Röntgenstrukturanalyse ermöglichen eine Aussage zu Bindungseigenschaften verschiedener Liganden mit dem katalytischen Zentrum der TH. Basierend auf der Kristallstruktur des katalytischen Zentrums der TH (Goodwill et al., 1998) ermöglichen computergestützte Protein-Ligand-Berechnungen, sogenannte Docking-Experimente,

einen Vergleich der verschiedenen Liganden anhand der berechneten Bindungsenergien mit dem katalytischen Zentrum der TH. Diese Untersuchungen zeigten eine enge, bindungsenergetisch günstige, koordinative Bindung des Kofaktors mit dem katalytischen Eisenatom der TH und dem Aminosäure-Rest Phe 300 im katalytischen Zentrum (Teigen et al., 2004). Der natürliche Kofaktor  $BH_4$  ist der erste Ligand in einer theoretischen Reaktionsabfolge während der enzymatischen Reaktion am katalytischen Zentrum, gefolgt von Sauerstoff und dem Substrat L-Tyrosin (Fitzpatrick, 1991a; Teigen et al., 2007). Die enzymatische Reaktion wird dabei durch die Anlagerung von  $BH_4$  ermöglicht, indem durch Elektronentransfer von der Carbonylgruppe des  $BH_4$  auf das Eisenatom ein intermediäres, die Hydroxylierungsreaktion limitierendes Reaktionszwischenprodukt entsteht (Fitzpatrick, 1991b, Almas et al., 1996). In Docking-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Anlagerung von Dopamin an das katalytische Zentrum der TH zu einer Blockade dieser Bindungsstelle führt (Meyer-Klaucke et al., 1996; Maas et al., 2003). Für die 6,7-dihydroxylierten TIQs konnte eine identische Position am katalytischen Zentrum der TH gezeigt werden (Scholz et al., 2008). Dabei lagern NMNorsal, NMSal und Norsal sich beim molecular docking mit ihren OH-Gruppen an das katalytische Eisenatom der TH, in nahezu gleicher Koordination und Bindungsaffinität wie Dopamin, was zu einer Blockade der enzymatischen Reaktion führt. Das untersuchte NMTIQ hingegen, welches keine Katecholgruppe an den Positionen 6 und 7 besitzt, und auch das Neurotoxin MPTP besetzten stattdessen die im molecular docking ermittelte Bindungsstelle für das Substrat L-Tyrosin (Andersen et al., 2002). Beide Substanzen hatten dabei niedrige Bindungsaffinitäten und zeigten kaum elektrostatische Interaktionen mit umgebenden Aminosäureresten des Proteins. Eine relevante und zu L-Tyrosin kompetitive Hemmung der TH durch NMTIQ ist vor diesem Hintergrund eher unwahrscheinlich. Ein Einfluss der Tetrahydroisochinoline auf die N-terminale, regulatorische Domäne der TH konnte bislang aufgrund der noch nicht analysierten Kristallstruktur dieses Proteinabschnittes nicht gezeigt werden.

#### **4.3 Wechselwirkung der Tetrahydroisochinoline mit dem katalytischen Eisenatom der Tyrosinhydroxylase**

Die Bindung von Dopamin und anderer Katecholamine an das katalytische Eisenatom der TH hat zwei Konsequenzen: Zum einen die Oxidation des zweiwertigen Eisenatoms und damit die Blockade der enzymatischen Aktivität (Almas et al., 1992; Meyer-Klaucke et al. 1996), zum anderen eine Erhöhung der Thermostabilität des Proteins, die es auch vor Proteolyse schützt (Martinez et al., 1996). Andersson et al. (1988) beschrieben bei Beladung boviner TH aus der Nebenniere mit Katecholaminen eine charakteristische blau-grüne Färbung der Enzymlösung, die in einer weiteren Arbeit auch bei TH aus

Phäochromozytomzellen der Ratte beschrieben und als Dopamin-Fe(III)-Komplex interpretiert wurde (Andersson et al., 1992). Diese Hypothese wurde von Almas et al. (1992) und Meyer-Klaucke et al. (1996) für die rekombinante humane TH bestätigt. Auch wenn die Struktur des katalytischen Zentrums der TH, unabhängig von der Enzymquelle, identisch ist (Flatmark und Stevens, 1999), so ist ein Problem bei Präparationen aus Gewebsschnitten die Beladung der gewonnenen TH mit Katecholaminen (Andersson et al., 1988). Das Enzym enthält somit eine nicht genau bekannte Menge an oxidiertem Eisen (III). Bei rekombinanter TH erlaubt das Wissen um die genaue Konzentration an TH-Untereinheiten stöchiometrisch genauere Aussagen zum Hemmechanismus der 6,7-dihydroxylierten Tetrahydroisochinoline, da die genaue Konzentration an Eisenionen, mit denen das Enzym beladen ist, bekannt ist. Die Formation von Eisen (III) durch Dopamin und die Tetrahydroisochinoline kann somit quantitativ genauer bestimmt werden. Zweiwertiges, also reduziertes Eisen wurde in sämtlichen von mir durchgeführten Versuchen dem Proteinkonzentrat hinzugefügt, und ist ein essentieller Bestandteil für den Ablauf der enzymatischen Reaktion (Fitzpatrick, 2003). Für die Tetrahydroisochinoline NMNorsal, NMSal und Norsal, die in äquimolaren Konzentrationen zu den in der Lösung befindlichen TH-Untereinheiten und der Menge an Eisen(II)Sulfat eingesetzt wurden, konnte in meinen Ansätzen mittels EPR-Spektroskopie die Formation von Eisen(III) im katalytischen Zentrum der TH gezeigt werden, der Prozentsatz des oxidierten Eisens lag dabei zwischen 64 und 78 %, im Vergleich zu 80 % in Anwesenheit von Dopamin. Die Zugabe von NMTIQ hingegen bestätigte die Ergebnisse aus den zuvorigen biochemischen Versuchen, bei denen kein signifikanter Einfluss dieser Substanz auf die TH Aktivität gezeigt werden konnte. Der Zusatz von NMTIQ in äquimolarer Konzentration zu den TH- Untereinheiten bewirkte lediglich eine unspezifische Formation von Eisen (III), die weniger als 4 % des insgesamt an Protein gebundenen Eisens entsprach. Der Aspekt einer vermehrten Thermostabilität bei Bindung von Katecholaminen und Tetrahydroisochinolininen wurde von Scholz et al. (2008) untersucht. Sie inkubierten die rekombinante TH mit den Inhibitoren Dopamin, NMNorsal und Norsal bei 37°C für 20 Stunden, und fanden neben der hier bereits dargestellten initialen Hemmung der Aktivität eine über mehrere Stunden stabile Restaktivität in Anwesenheit, im Gegensatz zum Ansatz in Abwesenheit von Inhibitoren.

#### **4.4 Reaktivierung der Tyrosinhydroxylase durch die Proteinkinase A**

Der Regulation der TH durch Katecholamine am katalytischen Zentrum gegenüber steht die mögliche Phosphorylierung des Proteins am N-terminalen Abschnitt durch die Proteinkinase A (Dunkley et al., 2004), die zu einer Reaktivierung des Enzyms führt. Die Phosphorylierung am Serin-Rest 40 bewirkt hierbei eine Konformationsänderung des

Proteins, durch die sich die Bindungsaffinität der Katecholamine an das katalytische Zentrum ändert (Daubner et al., 1992; Ramsey und Fitzpatrick 2000; Frantom et al., 2006). Hierdurch kann der Pterin-Kofaktor erneut an die jetzt freie Bindungsstelle am katalytischen Eisenatom und dieses zu Eisen (II) reduzieren. In meinen Ansätzen konnte ich durch Dopamin, aber auch durch NMNorsal gehemmte TH durch den Zusatz von PKA und cAMP nach einer kurzen Inkubation wieder reaktivieren. Aufgrund der oben dargestellten Vermutung eines identischen Bindungsmodus von NMNorsal und Dopamin am katalytischen Zentrum der TH lassen diese Ergebnisse vermuten, dass eine Konformationsänderung des Proteins nach Phosphorylierung an Ser 40 die Bindungsaffinität von NMNorsal genau wie bei Dopamin herabsetzt. Der genaue Mechanismus einer solchen Reaktivierung der TH nach Phosphorylierung ist in seinen Details noch unbekannt, denkbar sind elektrochemische Interaktionen mit den Aminogruppen des Dopamins bzw. dem Tetrahydroisochinolin-Ring von NMNorsal, die zu einer Entfernung der Liganden aus der Bindungsstelle am Eisenatom führen (Ramsey et al., 1996), oder eine Änderung der Bindungsaffinität durch Interaktion mit anderen beteiligten Liganden (Haavik et al., 1990).

#### **4.5 Wechselwirkungen 6,7-dihydroxylierter Tetrahydroisochinoline mit dem dopaminergen System**

N-Methyl-Norsalsolinol (NMNorsal), N-Methyl-Salsolinol (NMSal) und Salsolinol sind Tetrahydroisochinoline, die im menschlichen Gehirn durch die nichtenzymatische Kondensation von Dopamin mit Aldehyden oder Pyruvat entstehen können. Ein weiterer Entstehungsweg im menschlichen Gehirn ist die enzymatische Synthese von Salsolinol und NMSal aus Dopamin und Acetaldehyd oder Pyruvat durch eine Salsolinol-spezifische Synthase (Naoi et al., 2004). Die Tetrahydroisochinoline NMNorsal und NMSal wurden im Liquor cerebrospinalis von Patienten mit M. Parkinson nachgewiesen (Maruyama et al., 1996; Moser 1998). Der zusätzliche Nachweis von NMSal in der Substantia nigra und im Corpus striatum des menschlichen Gehirns (Maruyama et al., 1997, Naoi et al., 1997), sowie die strukturelle Ähnlichkeit mit dem Parkinson-induzierenden Neurotoxin 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) legten die Vermutung nahe, dass diese Substanzen an der Degeneration dopaminergere Neurone bei M. Parkinson beteiligt sein könnten. Zudem konnte gezeigt werden, dass Salsolinol oder NMNorsal (Thümen et al., 2002) die Blut-Hirn-Schranke überwinden können und darüber hinaus über den Dopamin-Transporter in dopaminerge Neurone aufgenommen werden können (Storch et al., 2002), was deren Akkumulation in den nigro-striatalen dopaminergen Neuronen zusätzlich zur endogenen, nichtenzymatischen und enzymatischen Synthese erklären könnte.

Hinsichtlich der potentiellen Neurotoxizität zeigten Mc Naught et al. (1995) für NMNorsal und NMSal eine im Vergleich zum MPTP-Metaboliten MPP+ relativ starke Hemmung von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette an Mitochondrienfragmenten. Dieser hemmende Einfluss durch die Tetrahydroisochinolin-Derivate war jedoch an intakten Mitochondrien im Vergleich zu MPP+ wesentlich geringer, da die Substanzen die Mitochondrienmembran nur schwer überwinden können (Mc Naught et al., 1996, 1998). Auch sind *in vitro* im Vergleich zu MPTP relativ hohe Konzentrationen an NMSal erforderlich, um in dopaminergen Zellen Apoptosevorgänge zu induzieren (Akao et al., 2002). *In vivo* führt nur die wiederholte stereotaktische Injektion von NMSal zu einem Untergang Tyrosinhydroxylase-positiver Nervenzellen in der Substantia nigra der Ratte und löste bei den Tieren ein dem M. Parkinson entsprechendes Syndrom aus. (Naoi et al., 1996). Einige Studien belegten sogar einen neuroprotektiven Effekt N-methylierter Tetrahydroisochinoline nach Verabreichung von Rotenon, einem Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette, oder anderer dopaminergere Neurotoxine (Antkiewicz-Michaluk et al., 2004; Kotake et al., 2005), sowie eine Herabsetzung Glutamat-induzierter Toxizität (Antkiewicz-Michaluk et al., 2006). Die Zytotoxizität der in den striatalen Neuronen akkumulierenden Tetrahydroisochinoline erscheint also im Vergleich zu MPTP relativ gering. Ein weiterer möglicher pathobiochemischer Angriffspunkt dieser Substanzen beim M. Parkinson ist deren Wirkung auf die Dopamin-Synthese der nigro-striatalen Neurone. Ein Einfluss der Tetrahydroisochinoline NMNorsal (Scholz et al., 1997) und Salsolinol (Minami et al., 1992; Patsenka und Antkiewicz-Michaluk, 2004) auf die Aktivität des Enzyms Tyrosinhydroxylase, dem Schlüsselenzym der Dopamin-Synthese, konnte bereits in mehreren *in vitro* -Studien gezeigt werden. *In vivo* führte darüber hinaus die einmalige Injektion von NMSal in das Corpus striatum der Ratte zu einer verminderten TH-Aktivität und einem konsekutivem Verlust von Dopamin in dieser Region. Dabei wurde bei den behandelten Tieren ein Parkinson-ähnliches, hypokinetisches Syndrom ausgelöst, ohne dass ein Nachweis neuronaler Degeneration in dieser Region gelang (Naoi et al., 1996). Der genaue Mechanismus, mit dem Tetrahydroisochinoline die Tyrosinhydroxylase hemmen, ist jedoch bislang ungeklärt.

#### **4.7 6,7-dihydroxylierte Tetrahydroisochinoline bei M. Parkinson**

Endogen entstehende Tetrahydroisochinolin-Derivate wurden im Liquor von Patienten mit neu diagnostiziertem M. Parkinson nachgewiesen (Moser et al., 1995). In diesem Krankheitsstadium, bei Auftreten erster klinischer Symptome, sind bereits etwa zwei Drittel der dopaminergen Neurone der Substantia nigra zerstört. Dies zeigten frühere neuropathologische Untersuchungen (Bernheimer et al., 1973), deren Ergebnisse durch

neuere sterologische Methoden bestätigt wurden (Pakkenberg et al., 1991). Bei weiterem klinischem Fortschreiten der Erkrankung kommt es wiederum zu einer Abnahme der Tetrahydroisochinolin-Konzentrationen, wie Maruyama et al. (1999) anhand des NMSal zeigen konnten. Die Hemmung der TH durch die Tetrahydroisochinoline wäre demzufolge in einem Krankheitsstadium denkbar, in dem das nigrostriatale System den Verlust dopaminergener Neurone kompensieren muss. Neben Hinweisen auf nicht-dopaminerge Kompensationsmechanismen (Bezard et al., 2003) müssen die im frühen Krankheitsstadium verbleibenden Neurone das entstandene Dopamin-Defizit wieder ausgleichen, was neben nachgewiesenen präsynaptischen Veränderungen (Lee et al., 2000; Mc Callum et al., 2006) zu einem erhöhten Umsatz von Dopamin in diesen Zellen führt (Hornykiewicz, 1993). Dabei besitzt das nigrostriatale System eine hohe Plastizität, so dass erste klinische Symptome vermutlich erst Jahre nach Beginn der Neurodegeneration auftreten (Dauer und Przedborski, 2003). Untersuchungen am Tiermodell der Ratte konnten beispielsweise eine Remission motorischer Symptome bei den Versuchstieren erreichen, nachdem durch Gentransfer DNA-Material für Tyrosinhydroxylase und GTP-Cyclohydrolase, letzteres ein Schlüsselenzym für die Synthese des Biopterin-Kofaktors, direkt in das Striatum appliziert wurde (Kirik et al., 2002). Die Ergebnisse meiner Untersuchungen, die einen identischen Hemmechanismus der 6,7-dihydroxylierten Tetrahydroisochinoline und des Dopamins postulieren, legen die Vermutung nahe, dass eine Blockade der Dopaminsynthese durch die Tetrahydroisochinoline beim M. Parkinson von pathophysiologischer Bedeutung ist. Relativ geringe Mengen von NMNorsal genügten, um in meinen Experimenten das rekombinante Enzym analog zur Wirkung von Dopamin zu hemmen. 6,7-dihydroxylierte Tetrahydroisochinoline, und insbesondere NMNorsal, besitzen also Eigenschaften, die zu einer potenten Inhibition der intrazellulären Dopamin-Synthese führen könnten. Das ohnehin aufgrund der fortgeschrittenen Degeneration geschwächte dopaminerge System könnte bei vermehrtem Aufkommen der Tetrahydroisochinoline, die als Nebenprodukt bei gesteigertem Dopaminumsatz entstehen können, dekompensieren. Hierfür spricht auch die nachgewiesene Akkumulation der 6,7-dihydroxylierten Tetrahydroisochinoline in der Substantia nigra menschlicher Gehirne (Maruyama et al., 1997; Naoi et al., 1997). Auch wenn die Anwesenheit von TIQ-Derivaten einen stabilisierenden Effekt auf die TH-Aktivität *in vitro* haben kann (Scholz et al., 2008), könnte ein Effekt dieser Substanzen *in vivo* beim M. Parkinson eine Hemmung der Dopamin-Synthese sein, die zur funktionellen Dekompensation des dopaminergen Systems der Substantia nigra beitragen könnte.

## 5. Zusammenfassung

Tetrahydroisochinoline entstehen im Gehirn durch eine nichtenzymatische Kondensation von Dopamin und akkumulieren in der Substantia nigra und den Basalganglien. Erhöhte Konzentrationen dieser Substanzen konnten im Liquor und Gehirn von Patienten mit Morbus Parkinson nachgewiesen werden. Ich konnte in meinen Untersuchungen zeigen, dass bestimmte Tetrahydroisochinolin-Derivate entscheidende Aspekte der physiologischen *feedback*-Hemmung der Tyrosinhydroxylase durch Katecholamine imitieren. Die Tyrosinhydroxylase katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Katocholaminsynthese, die 3-Hydroxylierung von L-Tyrosin zu L-Dopa. Vier verschiedene Tetrahydroisochinoline, die sich jeweils hinsichtlich ihrer funktionellen Gruppen voneinander unterscheiden, wurden dabei einerseits in biochemischen Ansätzen, andererseits in spektroskopischen Experimenten zur Untersuchung der Wirkung auf die TH verglichen, der natürliche *feedback*-Inhibitor Dopamin diente dabei als Referenzsubstanz. Analog zu Dopamin lagern 6,7-dihydroxylierte Tetrahydroisochinolin-Derivate sich mit ihren OH-Gruppen an das Eisenatom im katalytischen Zentrum des Enzyms an. Die Hemmung der Tyrosinhydroxylase erfolgt dabei wie bei Dopamin kompetitiv zum Kofaktor DMPH<sub>4</sub>, der mit den Tetrahydroisochinolin-Derivaten um dieselbe Bindungsstelle konkurriert. Diese Bindung an das katalytische Zentrum der Tyrosinhydroxylase bewirkt eine Oxidation des Eisenatoms, die mittels Messung der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) in Anwesenheit von Dopamin und 6,7-dihydroxylierten Tetrahydroisochinolin-Derivaten nachgewiesen werden konnte und eine Inaktivierung der Enzymaktivität zur Folge hat. Schliesslich konnte die Enzymaktivität der durch die Tetrahydroisochinoline gehemmten Tyrosinhydroxylase durch Anwesenheit der Proteinkinase A, analog zu Dopamin, wiederhergestellt werden. In Zusammenhang mit Befunden, die ein vermehrtes Vorkommen der Tetrahydroisochinolin-Derivate in früheren Krankheitsstadien des M. Parkinson vermuten lassen, liefern die oben dargestellten Ergebnisse wichtige Hinweise für eine mögliche pathophysiologische Bedeutung dieser Substanzen im Hinblick auf die im Verlauf der Erkrankung auftretende Dekompensation des dopaminergen Systems, die zu klinischen Symptomen führt. Die Erkenntnisse über den Hemmechanismus der TH durch bestimmte Tetrahydroisochinoline liefern somit einen Beitrag zum Verständnis der pathobiochemischen Veränderungen in frühen Krankheitsstadien des M. Parkinson und könnten einen Beitrag zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien in diesem Krankheitsstadium leisten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Akao Y, Maruyama W, Shimizu S, Yi H, Nakagawa Y, Shamoto-Nagai M, Youdim MB, Tsujimoto Y, Naoi M: Mitochondrial permeability transition mediates apoptosis induced by N-methyl(R)salsolinol, an endogenous neurotoxin, and is inhibited by Bcl-2 and rasagiline, N-propargyl-1-(R)-aminoindan. *J Neurochem* **82**, 913-923 (2002)
2. Almas B, Haavik J, Flatmark T: Charakterisation of a novel pterin intermediate formed in the catalytic cycle of tyrosine hydroxylase *Biochem J* **319**, 947-951 (1996)
3. Almas B, Le Bourdelles B, Flatmark T, Mallet J, Haavik J: Regulation of recombinant human tyrosine hydroxylase isozymes by catecholamine binding and phosphorylation. Structure/ activity studies and mechanistic implications. *Eur J Biochem* **209**, 249-255 (1992)
4. Andersen OA, Flatmark T und Hough E: Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of the human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation. *J Mol Biol* **320**, 1095-1108 (2002)
5. Andersson KK, Cox DD, Que L Jr, Flatmark T, Haavik J: Resonance Raman studies on the blue-green-colored bovine adrenal tyrosine 3-monooxygenase (tyrosine hydroxylase). Evidence that the feedback inhibitors adrenaline and noradrenaline are coordinated to iron. *J Biol Chem* **263**, 18621-18626 (1988)
6. Andersson KK, Vassort C, Brennan BA, Que L Jr, Haavik J, Flatmark T, Gros F, Thibault J: Purification and characterization of the blue-green rat phaeochromocytoma (PC12) tyrosine hydroxylase with a dopamine-Fe(III) complex. Reversal of the endogenous feedback inhibition by phosphorylation of serine-40. *Biochem J* **284**, 687-695 (1992)
7. Antkiewicz-Michaluk L, Lazarewicz JW, Patsenka A, Kajta M, Zieminska E, Salinska E, Wasik A, Golembiowska K, Vetulani J: The mechanism of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines neuroprotection: the importance of free radicals scavenging properties and inhibition of glutamate-induced excitotoxicity. *J Neurochem* **97**, 846-856 (2006)
8. Antkiewicz-Michaluk L, Wardas J, Michaluk J, Romaska I, Bojarski A, Vetulani J: Protective effect of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline against dopaminergic neurodegeneration in the extrapyramidal structures produced by intracerebral injection of rotenone. *Int J Neuropsychopharmacol* **7**, 155-163 (2004)
9. Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F: Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* **20**, 415-455 (1973)
10. Bezard E, Gross CE, Brotchie JM: Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends Neurosci* **26**, 215-221 (2003)
11. Braak H, Braak E, Yilmazer D, Schultz C, de Vos RA, Jansen EN: Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* **46**, 15-31 (1995)
12. Craine JE, Hall ES, Kaufman S: The isolation and characterization of dihydropteridine reductase from sheep liver. *J Biol Chem* **247**, 6082-6091 (1972)

13. Daubner SC, Lauriano C, Haycock JW, Fitzpatrick PF: Site directed mutagenesis of serine 40 of rat tyrosine hydroxylase. Effects of dopamine and cAMP-dependent phosphorylation on enzyme activity. *J Biol Chem* **267**, 12639-12646 (1992)
14. Dauer W, Przedborski S: Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889-909 (2003)
15. Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, von Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW: Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem* **91**, 1025-1043 (2004)
16. Fitzpatrick PF. Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. *Biochemistry* **42**, 14083-14091 (2003)
17. Fitzpatrick PF: Steady-state kinetic mechanism of rat tyrosine hydroxylase. *Biochemistry* **30**, 3658-3662 (1991a)
18. Fitzpatrick PF: Studies of the rate-limiting step in the tyrosine hydroxylase reaction: alternate substrates, solvent isotope effects, and transition-state analogues. *Biochemistry* **30**, 6386-6391 (1991b)
19. Fitzpatrick PF: Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* **68**, 355-381 (1999)
20. Flatmark T und Stevens RC: Structural insight into the aromatic amino acid hydroxylases and their disease-related mutant forms. *Cem Rev* **99**, 2137-2160 (1999)
21. Frantom PA, Seravalli J, Ragsdale SW, Fitzpatrick PF: Reduction and oxidation of the active site iron in tyrosine hydroxylase: kinetics and specificity. *Biochemistry* **45**, 2372-2379 (2006)
22. Furukawa Y: Genetics and biochemistry of dopa responsive dystonia: significance of striatal tyrosine hydroxylase protein loss. *Adv Neurol* **91**, 401-10 (2003)
23. Goodwill KE, Sabatier C, Stevens RC: Crystal structure of tyrosine hydroxylase with bound cofactor analogue and iron at 2.3 Å resolution: self-hydroxylation of Phe300 and the pterinbinding site. *Biochemistry* **37**, 13437-13445 (1998)
24. Graybiel AM, Hirsch EC, Agid Y: The nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Adv Neurol* **53**, 17-29 (1990)
25. Haavik J, Le Bourdelles B, Martinez A, Flatmark T, Mallet J: Recombinant human tyrosine hydroxylase isozymes. Reconstitution with iron and inhibitory effect of other metal ions. *Eur J Biochem* **199**, 371-378 (1991)
26. Haavik J, Martinez A, Flatmark T: pH-dependent release of catecholamines from tyrosine hydroxylase and the effect of phosphorylation of Ser-40. *FEBS Lett* **262**, 363-365 (1990)
27. Haavik J, Schelling DL, Campbell DG, Andersson KK, Flatmark T, Cohen P: Identification of protein phosphatase 2A as the major tyrosine hydroxylase phosphatase in adrenal medulla and corpus striatum: evidence from the effects of okadaic acid. *FEBS Lett* **251**, 36-42 (1989)
28. Hoffmann GF, Assmann B, Bräutigam C, Dionisi-Vici C, Häussler M, de Klerk JB, Naumann M, Steenbergen-Spanjers GC, Strassburg HM, Wevers RA: Tyrosine

- hydroxylase deficiency causes progressive encephalopathy and dopa-nonresponsive dystonia. *Ann Neurol* **54**, 56-65 (2003)
29. Hornykiewicz O: Chemical neuroanatomy of the basal ganglia – normal and in Parkinson's disease. *J Chem Neuroanat* **22**, 3-12 (2001)
  30. Hornykiewicz, O: Parkinson's disease and the adaptive capacity of the nigrostriatal dopamine system: possible neurochemical mechanisms. *Adv Neurol* **60**, 140–147 (1993)
  31. Jellinger KA und Paulus W: Clinico-pathological correlations in Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg* **94**, 86-88 (1992)
  32. Kappock TJ und Caradonna JP: Pterin-Dependent Amino Acid Hydroxylases. *Chem Rev* **96**, 2659-2756 (1996)
  33. Karlson P, Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W: Enzymkinetik, Regulation der Enzymaktivität. In: Karlson P, Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W: Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. 15. Aufl., 62-65, Thieme, Stuttgart (2005)
  34. Kirik D, Georgievska B, Burger C, Winkler C, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A: Reversal of motor impairments in parkinsonian rats by continuous intrastriatal delivery of L-dopa using rAAV-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 4708-4713 (2002)
  35. Kobayashi K, Kaneda N, Ichinose H, Kishi F, Nakazawa A, Kurosawa Y, Fujita K, Nagatsu T: Structure of the human tyrosine hydroxylase gene: alternative splicing from a single gene accounts for generation of four mRNA types. *J Biochem* **103**: 907-912 (1988)
  36. Kobayashi K, Nagatsu T. Molecular genetics of tyrosine 3-monooxygenase and inherited diseases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 267-270 (2005)
  37. Kotake Y, Taguchi R, Okuda K, Sekiya Y, Tasaki Y, Hirobe M, Ohta S: Neuroprotective effect of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline on cultured rat mesencephalic neurons in the presence or absence of various neurotoxins. *Brain Res* **1033**:143-150 (2005)
  38. Kumer SC und Vrana KE: Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* **67**, 443-462 (1996)
  39. Lee, CS, Samii, A, Sossi, V, Ruth, TJ, Schulzer, M, Holden, JE, Wudel, J, Pal, PK, Fuente-Fernandez, R, Calne, DB & Stoessl, AJ: *In vivo* positron emission tomographic evidence for compensatory changes in presynaptic dopaminergic nerve terminals in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **47**, 493–503 (2000)
  40. Lees AJ, Hardy J, Revesz T: Parkinson's disease. *Lancet* **373**, 2055-2066 (2009)
  41. Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S: Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea pig heart. *J Pharmacol Exp Ther* **148**, 1-8 (1965)
  42. Maas A, Scholz J, Moser A: Modeled ligand-protein complexes elucidate the origin of substrate specificity and provide insight into catalytic mechanisms of phenylalanine hydroxylase and tyrosine hydroxylase. *Eur J Biochem* **270**, 1065-1075 (2003)
  43. Marsden CD: Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **57**, 672-681 (1994)

44. Martinez A, Haavik J, Flatmark T, Arrondo JL, Muga A: Conformational properties and stability of tyrosine hydroxylase studied by infrared spectroscopy. Effect of iron/catecholamine binding and phosphorylation. *J Biol Chem* **271**, 19737-19742 (1996)
45. 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)
46. Maruyama W, Abe T, Tohgi H, Naoi M: An endogenous MPTP-like dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, in the cerebrospinal fluid decreases with progression of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **262**, 13-16 (1999)
47. Maruyama W, Sobue G, Matsubara K, Hashizume Y, Dostert P, Naoi M: A dopaminergic neurotoxin, 1(R), 2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl(R)salsolinol, and its oxidation product, 1,2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium ion, accumulate in the nigro-striatal system of the human brain. *Neurosci Lett* **223**, 61-64 (1997)
48. McCallum, SE, Parameswaran, N, Perez, X. A, Bao, S, McIntosh, JM, Grady, SR & Quik, M: Compensation in pre-synaptic dopaminergic function following nigrostriatal damage in primates. *J Neurochem* **96**, 960-972 (2006)
49. 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)
50. McNaught KS, Thull U, Carrupt PA, Altomare C, Cellamare S, Carotti A, Testa B, Jenner P, Marsden CD: Effects of isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on mitochondrial respiration. *Biochem Pharmacol* **51**, 1503-1511 (1996)
51. 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 (1995)
52. Meyer-Klaucke W, Winkler H, Schuenemann V, Trautwein AX, Nolting HF, Haavik J: Moessbauer, electron-paramagnetic resonance and X-ray-absorption fine-structure studies of the iron environment in recombinant human tyrosine hydroxylase. *Eur J Biochem* **241**, 432-439 (1996)
53. Minami M, Takahashi T, Maruyama W, Takahashi A, Dostert P, Nagatsu T, Naoi M: Inhibition of tyrosine hydroxylase by R and S enantiomers of salsolinol, 1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline. *J Neurochem* **58**, 2097-2101 (1992)
54. Moser A: TIQ derivatives in the human central nervous system. In: Moser A: Pharmacology of Endogenous Neurotoxins, 1. Aufl., 25-40, Birkhäuser, Boston (1998)
55. Moser A, Kömpf D: Presence of methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines, derivatives of the neurotoxin isoquinoline, in parkinsonian lumbar CSF. *Life Sci* **50**, 1885-1891 (1992)

56. Moser A, Scholz J, Nobbe F, Vieregge P, Boehme V, Bamberg H: Presence of N-methyl-norsalsolinol in the CSF: correlations with dopamine metabolites of Patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* **131**, 183-189 (1995)
57. Nagatsu T, Kaneda N, Kobayashi K, Ichinose H, Sasaoka T, Kiuchi K, Fujita K, Kurosawa Y: The human tyrosine hydroxylase gene. In: Naoi M und Parvez SH Tyrosine Hydroxylase, 1. Aufl., 177-191, VSP, Utrecht (1993)
58. Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S: Tyrosine Hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* **239**, 2910-2917 (1964)
59. 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-tetrahydroisochinoline, N-methyl-(R)-salsolinol, induced parkinsonism in rat: biochemical, pathological and behavioral studies. *Brain Res* **709**, 285-295 (1996)
60. Naoi M, Maruyama W, Matsubara K, Hashizube Y: A neutral N-methyltransferase activity in the striatum determines the level of an endogenous MPP<sup>+</sup>-like neurotoxin, 1,2-dimethyl-6,7-dihydroxyisocholinolium ion, in the substantia nigra of human brains. *Neurosci Lett* **235**, 81-84 (1997)
61. Naoi M, Maruyama W, Nagy GM: Dopamine-derived salsolinol derivatives as endogenous monoamine oxidase inhibitors: occurrence, metabolism and function in human brains. *Neurotoxicology* **25**, 193-204 (2004)
62. Naoi M, Takahashi T, Nagatsu T: Simple assay procedure for tyrosine hydroxylase activity by high performance liquid chromatography employing coulometric detection with minimal sample preparation. *J Chromatogr* **427**, 229-238 (1988)
63. Niwa T, Yoshizumi H, Tatematsu A, Matsuura S, Nagatsu T: Presence of tetrahydroisoquinoline, a parkinsonism-related compound, in foods. *J Chromatogr* **493**, 347-352 (1989)
64. Pakkenberg B, Moeller A, Gundersen HJ, Mouritzen DA, 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)
65. Patsenka A, Antkiewicz-Michaluk L: Inhibition of rodent brain monoamine oxidase and tyrosine hydroxylase by endogenous compounds - 1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline alkaloids. *Pol J Pharmacol* **56**: 727-734 (2004)
66. Ramsey AJ und Fitzpatrick PF: Effects of phosphorylation on binding of catecholamines to tyrosine hydroxylase: specificity and thermodynamics. *Biochemistry* **39**, 773-778 (2000)
67. Ramsey AJ, Hillas PJ, Fitzpatrick PF: Characterization of the active site iron in tyrosine hydroxylase. Redox states of the iron. *J Biol Chem* **271**, 24395-24400 (1996)
68. Ribero P, Wang Y, Citron BA, Kaufman S: Regulation of recombinant rat tyrosine hydroxylase by dopamine. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 9593-9597 (1992)
69. Scholz J, Bamberg H, Moser A: N-methyl-norsalsolinol, an endogenous neurotoxin, inhibits tyrosine hydroxylase activity in the rat brain nucleus accumbens in vitro. *Neurochem Int* **31**:845-849 (1997)

70. Scholz J und Moser A: Tyrosine hydroxylase and endogenous neurotoxins. In: Moser A: Pharmacology of Endogenous Neurotoxins. 1. Aufl., 221-236, Birkhäuser, Boston (1998)
71. Scholz J, Toska K, Luborzewski A, Maass A, Schünemann V, Haavik J, Moser A: Endogenous tetrahydroisoquinolines associated with Parkinson's disease mimic the feedback inhibition of tyrosine hydroxylase by catecholamines. *FEBS J* **275**, 2109-2121 (2008)
72. Standaert DG und Stern MB: Update on the management of Parkinson`s disease. *Med Clin North Am* **77**, 169-183 (1993)
73. 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 Pharmacool* **63**, 909-920 (2002)
74. Teigen K, Dao KK, McKinney JA, Gorren AC, Mayer B, Frøystein NA, Haavik J, Martínez A: Tetrahydrobiopterin binding to aromatic amino acid hydroxylases. Ligand recognition and specificity. *J Med Chem* **47**, 5962-5971 (2004)
75. Teigen K, McKinney JA, Haavik J, Martinez A: Selectivity and affinity determinants for ligand binding to the aromatic aminno acid hydroxylases. *Biochemistry* **30**, 3658-3662 (2007)
76. Thümen A, Behnecke A, Qadri F, Bäuml E, Thümen A, Behnecke CA, Qadri F, Bäuml E, Moser A: N-methyl-norsalsolinol, a putative dopaminergic neurotoxin, passes through the blood-brain barrier in vivo. *Neuroreport* **21**, 25-28 (2002)
77. Vulliet PR, Langan TA, Weiner N: Tyrosine hydroxylase: a substrate of cyclic AMP-dependent protein kinase *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 92-96 (1980)

## **7. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Moser möchte ich herzlich danken für die Überlassung des Themas und für die hervorragende Betreuung. Herrn Dr. med. Joachim Scholz danke ich für die jederzeit hilfreiche Unterstützung bei der Konzeption der Versuche und deren Durchführung sowie Auswertung. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. Detlef Kömpf für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Nutzung des Labores für Liquordiagnostik in der Klinik für Neurologie der Universität Lübeck. Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Volker Schünemann für die Zusammenarbeit bei der ESR-Spektroskopie am Institut für Physik der Universität Lübeck. Herrn Prof. Dr. Jan Haavik möchte ich danken für die Bereitstellung der Tyrosinhydroxylase und für die Unterstützung während der Versuche. Ich danke den Mitarbeitern im Labor für Liquordiagnostik und insbesondere Frau Katerina Schnackenberg, für die freundliche technische Assistenz, und meinem Kollegen Herrn Dr. med. Franz Riederer für die freundliche Zusammenarbeit.

## 8. Lebenslauf

Geburtsdatum/ -Ort: \*09.02.1976 in Hamburg  
Vater: Dr. Andrzej Luborzewski (\*02.12.1942)  
Mutter: Ute Luborzewski (Geb. Clasen, \*06.11.1939)  
Geschwister: Andrea Luborzewski (\*09.02.1976)

### Schulbildung:

09.1982 - 06.1986 Grundschule Schimmelmannstrasse in Hamburg  
09.1986 - 06.1995 Charlotte Paulsen Gymnasium in Hamburg  
Abschluss: Abitur

### Zivildienst:

08.1995 – 09.1996 Am Dialysezentrum Alter Teichweg in Hamburg

### Medizinische Laufbahn:

10.1996 Beginn des Medizinstudiums an der Medizinischen Universität zu Lübeck  
08.1998 Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung  
04.2000 Bestehen des 1. Staatsexamens  
04.2001 – 07.2001 Arbeit als wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Biochemie der Medizinischen Universität zu Lübeck (D)  
04.2001- 12.2001 Arbeit als wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Anatomie der Medizinischen Universität zu Lübeck  
04.2002 Bestehen des 2. Staatsexamens  
04.2002 Beginn des Praktischen Jahres (PJ)  
04.2002 – 08.2002 PJ in der Inneren Medizin der Universitätsklinik Lübeck (D)  
08.2002 – 10.2002 PJ in der Neurologie des Royal Melbourne Hospital (AUS)  
10.2002 – 12.2002 PJ in der Neurologie des Auckland Hospital (NZ)  
12.2002 – 04.2003 PJ in der Chirurgie im Spital Muri (CH)  
10. 2003 Bestehen des dritten Staatsexamens  
Seit 02/2004 Assistenzarzt an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin.