

Aus dem Charité Centrum 15
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Direktor: Professor Dr. med. Andreas Heinz

Habilitationsschrift

Degeneration, Protektion und Regeneration dopaminerges Neurone

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Neurobiologie und Experimentelle Pharmakologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Catrin V. Wernicke
geboren am 27.08.1963 in Staaken

Eingereicht:	15. April 2010
Dekanin:	Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter:	Prof. Dr. Heide Hörtnagel, Innsbruck
2. Gutachter:	Prof. Dr. Stefan Schulz, Jena
Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag:	14. Februar 2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	4
2. Störungen der neuronalen Differenzierung im Zellkultursystem durch Alkohol und die Rolle des RKIP in der neuronalen Differenzierung	9
<i>P1: Chronic ethanol exposure changes dopamine D2 receptor splicing during retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y cells</i>	12
<i>P2: Long-term ethanol exposure impairs neuronal differentiation of human neuroblastoma cells involving neurotrophin-mediated intracellular signalling and in particular protein kinase C</i>	13
<i>P3: Raf kinase inhibitor protein enhances neuronal differentiation in human SH-SY5Y cells</i>	14
3. β-Carboline	15
3.1. Neurotoxische Wirkung von β-Carbolinen	15
<i>P4: 2,9-Dimethyl-β-carbolinum, a neurotoxin occurring in human brain, is a potent inducer of apoptosis as 1-methyl-4-phenyl-pyridinium</i>	18
<i>P5: Parkinson's disease like syndrome in rats induced by 2,9-dimethyl- β-carbolinium ion, a β-carboline occurring in the human brain</i>	19
<i>P6: Cytotoxicity of β-carbolines in dopamine-transporter expressing cells: Structure-activity relationships</i>	20
3.2. Neuroprotektive Wirkung von β-Carbolinen	21
<i>P7: 9-Methyl-β-carboline up-regulates the appearance of differentiated dopaminergic neurones in primary mesencephalic culture</i>	24
<i>P8: 9-Methyl-β-carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson's disease</i>	25
4. Diskussion	26
5. Zusammenfassung	35
Referenzen	37
Danksagung	44
Eidesstattliche Erklärung	45

Abkürzungsverzeichnis

ARMETL1	arginine-rich, mutated in early stage tumors like 1
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain derived neurotrophic factor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDNF	conserved dopamine neurotrophic factor (synonym of ARMETL1)
DAT	Dopamintransporter
DRD2 L/S	Dopamin D2 Rezeptoren, lange bzw. kurze Splicevariante
GABA	γ -Aminobuttersäure
GPK	G-Proteinkinase
GPCR	G-Proteingekoppelte Rezeptoren
GSH	reduziertes Glutathion
HEK	humane embryonale Nieren-Zelllinie 293
En1/ En2	Engrail 1 / 2
ERK	extracellular-signal regulated kinase
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
MAOA /MAOB	Monoaminoxidase A / B
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAP-Kinase-Kinase
BMP2, BMP4	bone morphogenic protein 2 / 4
MPP ⁺	1-Methyl-4-Phenylpyridiniumkation
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine
NADPH	Nicotinsäureamidadenindinucleotidphosphat
NOX/XOX	NADPH/Xanthinoxidase
Nurr1	Nuclear receptro related 1 protein
PKC	Proteinkinase C
Ptx3	pituitary homeobox 3
Raf-1	rapidly growing fibrosarcoma 1 (MAP-Kinase-Kinase-Kinase)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RKIP	Raf-Kinase-Inhibitor-Protein
RA	Retinsäure
RARE	RA-Responselement
shRNA	small hairpin RNA
SN	Substantia nigra
Shh	Sonic hedgehog homolog
TH	Tyrosinhydroxylase
TrkB	Tyrosinkinaserzeptor B
VTA	ventral tegmental area
Wnt1/ Wnt5a	wingless type mouse mammary tumor virus integration site family 1/5a

1. Einleitung

Auf Basis der anatomischen Lokalisation und der Projektion werden verschiedene Populationen dopaminergener Neurone unterschieden. Die beiden größten Gruppen sind im Mittelhirn lokalisiert, wobei die Neurone der Substantia nigra (SN) zum dorsalen Striatum projizieren und Bewegungen und Reflexe regulieren, während die Neurone des ventralen Tegmentums (VTA) zum ventralen Striatum und präfrontalen Cortex projizieren und Bestandteile der mesolimbischen und mesocorticalen Schaltkreise sind. Sie sind an der Regulierung von Belohnung, Aufmerksamkeit, Motivation und Emotionen beteiligt. Die Dysfunktion dopaminergener Neurone ist die Grundlage einer Reihe neuropsychiatrischer Erkrankungen wie Abhängigkeitserkrankungen, Depression, Schizophrenie und Morbus Parkinson wobei verschiedene Schaltkreise beteiligt sind.

Zu Beginn der Entwicklung des Nervensystems werden mehr Nervenzellen gebildet, als für die optimale Funktion notwendig sind. Im Verlauf der Differenzierung der einzelnen Hirnareale überleben nur solche Zellen, die korrekt in neuronale Netzwerke eingebettet sind und über funktional ausreichende Verknüpfungen mit anderen Zellen verfügen. Diese Verknüpfungen führen zur Expression extrinsischer und intrinsischer Faktoren, die den programmierten Zelltod unterdrücken. Um den Energiebedarf des Organismus nicht unnötig zu belasten, werden Neurone, die nicht über die notwendigen Verknüpfungen verfügen, der Apoptose zugeführt (Oppenheim, 1991; Calabrese et al., 2002). Der programmierte Zelltod ist deshalb ein charakteristisches Merkmal der neuronalen Entwicklung. Ausdifferenzierte Neurone können sich nicht, wie anderen Körperzellen, durch Zellteilung erneuern. Im ausgereiften Nervensystem sichern neurotrophe Faktoren das Überleben der Zellen. Obwohl eine Neurogenese aus Stammzellen auch im adulten Hirn nachgewiesen werden konnte, kommt es nicht zu einem regelmäßigen Zellersatz. Dieser Umstand macht neuronale Strukturen besonders vulnerabel gegenüber schädigenden Einflüssen. Eine massive Schädigung führt deshalb zur irreversiblen Neurodegeneration und damit zum Verlust der betroffenen Hirnfunktion.

Eine der Ursachen neurodegenerativer Prozesse ist der übermäßige Konsum neurotoxischer Substanzen. Dazu gehört vor allem der Alkohol. Die neuronalen Strukturen sind gegenüber toxischen Substanzen in verschiedenen Lebensphasen unterschiedlich vulnerabel (Goodlett and Thomas, 1999; Berghuis et al., 2007). Besonders gravierend wirkt sich Alkoholexposition während der neuronalen Entwicklung in der Foetalperiode aus. Dies führt zu Störungen der Differenzierung und Verknüpfung von Neuronen. Folgen zeigen sich in den Beeinträchtigungen, die Kinder mit einer Alkoholembryopathie aufweisen. Obwohl morphologische Analysen in der Regel eine unveränderte Neuronenanzahl ergaben, wurde wiederholt von einem verminderten Hirnvolumen berichtet. Dieser Befund geht auf eine verminderte Größe der Zellkörper und einer Verminderung des dendritischen Wachstums

zurück (Shetty et al., 1999). Außerdem sind die Neurotransmittersysteme langfristig gestört. Da Neurotransmitter neben der Informationsweiterleitung auch indirekt neurotrophe Wirkungen haben, tragen diese Veränderungen zum bestehenden Defizit bei. Unter anderem kann es zu fehlerhaften und weniger effizienten Verknüpfungen von neuronalen Schaltkreisen kommen. Eine weitere vulnerable Phase ist die Adoleszenz, in der umfangreiche Umbauprozesse im Gehirn stattfinden. Die Störung der mesolimbischen / mesocorticalen dopaminergen Neurotransmission steht besonders im Focus der Alkoholabhängigkeit, da dieses System eine besondere Bedeutung für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des Alkohol- und Drogenkonsums hat (Heinz et al., 2004).

Auch in späteren Lebensabschnitten kommt es durch übermäßige, chronische Alkoholexposition zu neuro-cognitiven Defiziten und neuronaler Degeneration (Parson et al., 1998; Zeigler et al., 2005; Harper, 1998). Post mortem Untersuchungen an Gehirngewebe von Alkoholabhängigen wiesen cerebrale Ödeme, Gewebeverlust und Dysfunktionen der Blut-Hirn-Schranke auf. Als zugrunde liegende mögliche Prozesse der alkoholbedingten Neurodegeneration wurden in Tierversuchen nach chronischer Alkoholexposition eine vermehrte Neuroinflammation und Störungen durch oxidative Prozesse beobachtet (Potula et al, 2006). Ethanol wird durch die Alkoholdehydrogenase und durch das Cytochrom P450-2E1 zu Azetaldehyd oxidiert. Während beim Abbau durch die Alkoholdehydrogenase keine reaktiven Sauerstoffmoleküle (ROS) entstehen, wird beim Abbau über Cytochrom P450-2E1 Wasserstoffperoxid gebildet, das über die Fenton-Weiss-Haber Reaktion zur Bildung von ROS führt. Haorah et al. (2008) konnten zeigen, dass in primären humanen Neuronen die Expression und Aktivität von CYP2E1 unter Ethanolexposition erhöht waren. Außerdem fanden sie, dass Azetaldehyd zur Aktivierung von NADPH/Xanthinoxidase (NOX/XOX) und der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) führt. Dieser Prozess war transkriptionsabhängig, da die ROS-Produktion durch RNA-Syntheseinhibition vermindert war.

Azetaldehyd kann aber noch in anderer Hinsicht für die Alkoholabhängigkeit eine Rolle spielen: Es kann in Kondensationsreaktionen mit Indolaminen β -Carboline bilden (Rommelspacher et al., 1980). Zum Beispiel entsteht aus Tryptamin und Azetaldehyd Tetrahydroharman, das über Dehydrierung zu Harmalan und anschließend zum voll aromatischen Harman umgewandelt wird (Susilo und Rommelspacher, 1987; Rommelspacher et al., 1990). Die Harman- und Norharmankonzentrationen waren im Blut von Alkoholabhängigen im Vergleich zu Gelegenheitskonsumenten 5- bis 7-fach erhöht (Rommelspacher et al., 1991, Wodarz et al., 1996, Stohler et al 1995). In Tierexperimenten führte die intrakranielle Applikation von Harman in das Ventrikelsystem oder den Hippokampus zur Erhöhung des freiwilligen Konsums von Ethanol bei Ratten (Rommelspacher et al., 1987; Adell and Myers, 1994). In *in vivo* Mikrodialyseexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass die intraperitoneale Applikation besonders von Norharman, aber in geringerem Maße auch von Harman zur Erhöhung der Dopaminausschüttung im Nucleus accumbens führt (Sällström Baum et al.,

1995, 1996). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für Salsolinol, einem Kondensationsprodukt aus Azetaldehyd und Dopamin, nachgewiesen werden (Baum et al., 1999; Hipolito et al., 2009). Der Nucleus accumbens ist ein wichtiger Bestandteil des Belohnungssystems und eine erhöhte Dopaminausschüttung ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung einer Abhängigkeitserkrankung. Diese Befunde legen nahe, dass über die Bildung von β -Carbolinen und anderen Kondensationsprodukten der Alkoholkonsum durch einen *circulus vitiosus* aufrechterhalten wird.

Um Hinweise auf mögliche Wirkungsmechanismen der β -Carboline zu erhalten, wurde in früheren Experimenten der Arbeitsgruppe aus der Rattenleber und aus bovinem Hirngewebe über [^3H]Norharman-Bindungsstudien Proteine isoliert, an die Norharman mit hoher Affinität bindet (Greube und Rommelspacher, 2003; Bonnet et al., 2004, Bonnet, 2005). Eines der Proteine konnte als Raf-Kinase-Inhibitor-Protein (RKIP) identifiziert werden, das für die Differenzierung von Zellen von Bedeutung ist. Die Untersuchung der Wirkung von Ethanol auf die neuronale Differenzierung dopaminerger Zellen und die Beteiligung von RKIP daran stehen im Focus des zweiten Kapitels der vorliegenden Arbeit.

β -Carboline werden aber auch mit neurodegenerativen und neurotoxischen Prozessen in Zusammenhang gebracht. Das ist vor allem deshalb von besonderem Interesse, da β -Carboline in vielen pflanzlichen Produkten vorkommen, beim Erhitzen durch Pyrolyse aus Tryptophan und durch Trocknen der Nahrung entstehen und auch endogen im Körper gebildet werden können.

Der Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit. Die Prävalenz liegt bei 1-2% bei den 65jährigen und nimmt mit steigendem Alter zu. Familiäre Formen mit einem meist frühen Erkrankungsalter sind vergleichsweise selten. Die meisten Erkrankungen treten sporadisch und in einem höheren Lebensalter auf, wobei genetische Ursachen unbekannt sind. Deshalb nimmt man pathogene Umwelteinflüsse als wesentliche Ursachen an. Die Identifizierung der den familiären Formen zugrunde liegenden genetischen Veränderungen hat Erkenntnisse über die Pathomechanismen des Morbus Parkinson erbracht. Mutationen in den Genen von Parkin, Pink, DJ1 und alpha-Synuclein führen zu einer Erhöhung von oxidativem Stress, einer intraneuronalen Ansammlung geschädigter oder missgefalteter Proteine und einer Schädigung der DNA. Eine Erhöhung des oxidativen Stresses, eine Ansammlung geschädigter Proteine in der Zelle, eine Schädigungen der DNA und inflammatorische Prozesse konnten auch für sporadische Erkrankungen nachgewiesen werden. Obwohl diese Prozesse mit steigendem Alter in allen Neuronen zunehmen, müssen weitere Faktoren hinzukommen, die diese Prozesse in distinkten Neuronen akzellerieren und so zur Ausprägung des Krankheitsbildes führen. Beim Morbus Parkinson ist der Verlust der dopaminergen Neurone der SN für das anfängliche Krankheitsbild ausschlaggebend. Substanzen aus der Umwelt, die den oxidativen Stress besonders in diesen Zellen erhöhen, könnten ein Risikofaktor sein. Für den Morbus Parkinson wurde das auf fatale Weise

gezeigt: In den 70er Jahren traten bei Personen, die selbst hergestelltes Meperidin, ein Atropinderivat mit opioiden Eigenschaften, konsumierten, Symptome einer Parkinsonerkrankung auf, die von einem drastischen und irreversiblen Verlust dopaminerger Neurone der SN herrührten. Untersuchungen konnten aufzeigen, dass die Droge einen hohen Anteil der Substanz 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) enthielt (Langston et al., 1983). Diese Substanz wird im Körper zum 1-Methyl-4-Phenylpyridiniumkation (MPP^+) oxidiert, das ein sehr gutes Substrat für den Dopamintransporter (DAT) darstellt. Deshalb wird diese Substanz selektiv in dopaminergen Neuronen angereichert und schädigt diese dadurch, dass sie sich, getrieben durch den elektrochemischen Gradienten, in der Mitochondrienmatrix anreichert und dort den Komplex I der Atmungskette hemmt (Nicklas et al., 1985). Neben der erhöhten ROS-Produktion und ihren schädigenden Folgen, führt das auch zu einer verminderten Energiebereitstellung (Adenosintriphosphat, ATP). Dies wiederum beeinträchtigt wichtige Zellfunktionen wie das Ubiquitin-Proteasom-System und die DNA-Reparaturmechanismen. Dopaminerge Neurone der SN sind davon besonders betroffen, da sie einen höheren Energieverbrauch und allgemeinen Metabolismus aufweisen als die dopaminergen Neurone der VTA. Die dopaminergen Neurone der SN weisen außerdem eine höhere DAT-Dichte auf, als die dopaminergen Neurone der VTA, was sie für kationische Toxine besonders vulnerabel macht (Madras et al., 1989; Canfield et al., 1990; Wong et al., 1993; Uhl et al., 1994; Uhl, 1998). Eine weitere Besonderheit liegt im hohen Gehalt der SN-Zellen an Eisen, das sich im Neuromelanin der Zellen anreichert und eine erhöhte ROS-Produktion katalysiert (Tanaka et al., 1991). Die geschädigte Zelle kann die physiologische dopaminerge Neurotransmission nicht mehr aufrechterhalten und beginnt Synapsen und Fortsätze abzubauen. Durch die verringerte Aktivierung postsynaptischer Dopamin-D2-Rezeptoren (DRD2) verringert sich auch die Ausschüttung neurotropher Faktoren aus der Postsynapse. Dadurch wird der Prozess der Neurodegeneration weiter vorangetrieben. Diese Prozesse führen dann zu einer Aktivierung der Mikroglia und damit inflammatorischer Prozesse, wodurch die Degeneration der Neurone weiter beschleunigt wird. Erste Symptome treten auf, wenn die dopaminerge Neurotransmission um 70-80% reduziert ist. In diesem Stadium sind bereits mehr als die Hälfte der dopaminergen Zellen der SN abgestorben.

Bisherige Therapieansätze beschränken sich auf die Wiederherstellung der dopaminergen Neurotransmission durch den Einsatz von Monoaminoxidase B (MAOB) -Hemmstoffen oder die Substitution von Dopamin über L-DOPA. Diese Optionen können die Funktion für eine gewisse Zeit wieder herstellen. Gleichzeitig werden die Zellen aber durch den erhöhten oxidativen Stress zusätzlich geschädigt, da Dopamin der Autooxidation unterliegt und so selber neurotoxisch wirkt (Filloux et al., 1993; Founstedt, 1990; Chiuch et al., 1993). Zurzeit gibt es, vielleicht mit Ausnahme von Rasagilin, noch keine Medikation, die die Neurodegeneration aufhalten kann (Andressoo und Saarma, 2008; Schulz, 2008). In klinischen Studien wurde gezeigt, dass die frühe Gabe von Rasagilin den Zeitpunkt der Notwendigkeit der

Dopaminsubstitution verzögern kann (Parkinson Study Group, 2004; Biglan et al., 2006). In *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen führte die Gabe von Rasagilin zu einer Verminderung des Zellabsterbens und zu einer erhöhten Expression neurotropher Faktoren, der PKC und verschiedener anti-apoptotischer Faktoren (Youdim et al., 2001; Tabakman et al., 2004; Blandini et al., 2004; Bar-Am et al., 2005). Dabei waren die meisten Effekte nicht von der MAOB-Inhibition abhängig, da auch das optische S-Enantiomer, das die MAO vergleichsweise schwach hemmt, *in vitro* und *in vivo* vergleichbare Effekte zeigte (Youdim et al., 2005).

Ausgehend von den Befunden zu MPP⁺ stand im Focus unserer Untersuchungen die Frage, inwieweit andere exogene und endogene Substanzen, die in ihrer Struktur dem MPP⁺ ähneln, zur Pathogenese der Parkinsonerkrankung beitragen können. Wir prüften die Hypothese, dass kationische β -Carboline aufgrund ihrer Struktur analogie zu MPP⁺ und ihrem endogenen und exogenen Vorkommen an der Pathogenese des Morbus Parkinson beteiligt sind. Darüber hinaus ergaben sich aus diesen Untersuchungen Ansätze für neue therapeutische Substanzen, die zwar dieselbe Leitstruktur aufweisen, aber neuroprotektiv wirken. Eigene Arbeiten dazu sind im Kapitel 3 dargestellt.

2. Störungen der neuronalen Differenzierung im Zellkultursystem durch Alkohol und die Beteiligung des RKIP daran

Chronische pränatale Ethanolexposition führte in Tierexperimenten zu einer Reduzierung der Transmitter Dopamin und Serotonin, während GABA erhöht war (Maier et al., 1996). Außerdem war nach pränataler Ethanolexposition im Tierversuch die spontane Aktivität dopaminerger Neurone bei unverminderter Zellzahl reduziert (Shen et al. 1999). Szot et al. (1999) fanden in adulten männlichen Ratten, die pränatal mit Ethanol exponiert worden waren, dass die Genexpression des DAT und der Tyrosinhydroxylase (TH) in der VTA erniedrigt waren. Die dopaminergen Neurone der VTA projizieren zum mesolimbischen System, das ein wichtiger Bestandteil des Belohnungssystems ist und die Motivation beeinflusst. Damit spielen sie für die Abhängigkeitsentwicklung eine besondere Rolle. Mit bildgebenden Verfahren konnte gezeigt werden, dass Alkoholabhängige im Nucleus accumbens und in den Amygdalae eine verminderte Dichte des DRD2 aufweisen (Repo et al., 1999; Tupala et al., 2003; Heinz et al., 2004; Kienast et al., 2008). In Tierexperimenten beeinflusste die Expression von DRD2 im Nucleus accumbens den Alkoholkonsum reziprok (Thanos et al., 2001, 2004, 2005; Bice et al., 2008; Nader et al., 2008).

Direkt oder indirekt bewirken alle Substanzen mit Abhängigkeitspotential eine kurzfristige Erhöhung der dopaminergen Neurotransmission gefolgt von einer langfristigen Erniedrigung durch Adaptationsprozesse bei chronischem Gebrauch. Der DRD2 spielt dabei eine entscheidende Rolle. Während die lange Splicevariante (DRD2L) des DRD2 postsynaptisch exprimiert wird und somit für die Signalweiterleitung entscheidend ist, spielt die kurze Splicevariante (DRD2S) als präsynaptisch exprimierter Autorezeptor für die Feinabstimmung der dopaminergen Neurotransmission eine entscheidende Rolle (Mercuri et al., 1997; Kahn et al., 1998; Uziel et al., 2000). Diese wichtige Unterscheidung wurde in bisherigen Untersuchungen kaum beachtet. Neurotransmitter haben neben der Informationsweiterleitung auch neurotrophe Wirkung. Eine verminderte Neurotransmission trägt somit auch langfristig zum bestehenden Defizit bei. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Dopamin die Entwicklung dopaminerger Neurone reguliert (Todd, 1992; Schmidt et al., 1996). Kim et al. (2006) wiesen nach, dass die Aktivierung des DRD2 die Entwicklung der Neurone über die extrazellulär regulierte Kinase (ERK)-Kaskade und nuclear receptor related 1 protein (Nurr1)-Aktivierung beeinflusst.

Bei der Differenzierung dopaminerger Neurone spielt die Retinsäure (RA) eine entscheidende Rolle. Neben anderen Faktoren haben auch die Gene für den DRD2 und die Tyrosinkinase B (TrkB) ein RA-Responselement (RARE; Samad et al., 1997). TrkB ist der Rezeptor für den neurotrophen Faktor brain derived neurotrophic factor (BDNF). Seine Stimulierung führt ebenfalls zur Aktivierung der ERK-Kaskade und damit zur Differenzierung. RKIP ist ein die ERK-Kaskade regulierendes Protein. Frühere Untersuchungen der eigenen

Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass β -Carboline, die unter Alkoholkonsum verstärkt endogen gebildet werden, mit hoher Affinität an RKIP binden. Um den Einfluss von Ethanol auf diese Faktoren der Differenzierung dopaminerger Neurone zu untersuchen, haben wir ein geeignetes Zellmodell gesucht. Die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y schien uns dafür aus folgenden Gründen geeignet zu sein:

1. Sie exprimiert dopaminerge Proteine wie die TH, den DRD2 und den DAT.
2. Unter basalen Zellkulturbedingungen zeigt die Zelllinie einen undifferenzierten Phänotyp mit sich kontinuierlich teilenden Zellen. Unter RA-Behandlung entwickeln die Zellen einen neuronalen Phänotyp mit kleineren Zellkörpern und langen neuritenähnlichen Fortsätzen und einem Netzwerk aus Zellverbindungen.
3. Der Karyotyp der Zelllinie ist stabil, so dass Experimente vergleichbar sind.

In unseren Untersuchungen war unter kontinuierlicher Alkoholexposition während der Differenzierung der Anstieg von DRD2L nicht beeinträchtigt, jedoch der von DRD2S, was zu einem verringerten Quotienten von DRD2S/DRD2L führte. Unter Ethanolentzug stiegen beide Splicevarianten an, jedoch derart, dass der unter Ethanol entstandene DRD2S/DRD2L-Quotient bestehen blieb. Die unter RA-Differenzierung erfolgende Erhöhung des Dopamingehalts der Zellen war sowohl unter Ethanolexposition als auch nach dem Ethanolentzug verringert. Dies weist auf eine verminderte dopaminerge Neurotransmission auch nach dem Alkoholentzug hin, wobei die Zellzahl nicht beeinflusst war. Diese Befunde zeigen, dass die dopaminerge Neurotransmission auch ohne Zellverlust nachhaltig negativ beeinflusst wird. Wir konnten zeigen, dass präsynaptische Prozesse davon besonders betroffen sind.

Auf morphologischer Ebene prägten die SH-SY5Y-Zellen unter kontinuierlicher RA-Behandlung nicht nur einen neuronalen Phänotyp mit langen und verzweigten Neuriten aus, sondern die Zellen bildeten nachfolgend ein Netzwerk aus ganglionähnlichen Cluster, die untereinander über Bündel von sehr langen, parallel angeordneten Neuriten in Verbindung stehen. Bei zusätzlicher Ethanolexposition zeigten die Zellen weniger Neuriten und Verzweigungen und die Clusterbildung blieb gänzlich aus. Obwohl unter Ethanolexposition TrkB und die Kinasen der ERK-Kaskade (Raf-1, MEK, ERK) in ihrer Expression nicht verändert waren, war die BDNF-induzierte Aktivierung von ERK durch die Ethanolexposition gestört. Die Expression von RKIP stieg unter RA-Behandlung kontinuierlich an, war aber unter kombinierter RA/Ethanol-Behandlung vermindert. Dieser Befund müsste eigentlich zu einer verminderten Aktivität von ERK während der Differenzierung und zu einer Verstärkung unter RA/Ethanolbehandlung führen, da die inhibitorische Funktion des RKIP beeinträchtigt ist. Aber das Gegenteil ist der Fall. Dieser Befund ist der Tatsache geschuldet, dass RKIP nur im unphosphorylierten Status an Raf-1 bindet und somit die Kaskade hemmt. Die Aktivierung von TrkB durch BDNF führt auch zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC).

Diese phosphoryliert RKIP welches dadurch von Raf-1 dissoziiert und damit die ERK-Kaskade freigibt (Corbit et al., 2003). In der Folge bindet das phosphorylierte RKIP an G-Proteinkinasen (GPK) und verstärkt so die Signalübertragung über G-proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR). Die dadurch erfolgende Aktivierung der cAMP-Kaskade führt zu einer Stimulierung von ERK. Da sowohl PKC als auch RKIP unter Ethanol signifikant vermindert waren, ist anzunehmen, dass die reduzierte positive Rückkopplung auf ERK über diesen Weg maßgeblich für die gestörte neuronale Differenzierung ist. Von diesem Befund leiteten wir eine wichtige Rolle von RKIP für die neuronale Differenzierung ab und konnten dies auch in unseren Untersuchungen durch RKIP-Überexpression und shRNA-vermittelter RKIP-Herunterregulierung zeigen. RKIP-Überexpression führte zu einer verstärkten spontanen Differenzierung und zu einer beeindruckenden Verstärkung der Differenzierung unter RA-Behandlung, mit größeren Clustern und markanten Bündeln von Neuriten, die die Cluster untereinander verbanden. Die Herunterregulierung führte zu einer Verschiebung der Differenzierung zum gliären Phänotyp. Die PKC-vermittelte ERK-1/2-Aktivierung korrelierte mit der RKIP-Expression. Weiterhin waren sowohl der basale als auch der forskolin-stimulierte intrazelluläre zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP)-Gehalt in RKIP-überexprimierenden Zellen um mehr als das Doppelte bzw. 10fache erhöht. Damit konnten wir zeigen, dass RKIP die neuronale Differenzierung über eine verstärkte PKC-ERK-Kaskade Interaktion und eine Verstärkung der G-proteingekoppelten Signalwege positiv beeinflusst.

Eigene Publikationen:

P1: Wernicke C, Hellmann J, Finckh U, Rommelspacher H (2010) Chronic ethanol exposure changes dopamine D2 receptor splicing during retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y cells. *Pharmacological Reports*; 62 (4): 659-663.

P2: Hellmann J, Rommelspacher H, Wernicke C (2009) Long-term ethanol exposure impairs neuronal differentiation of human neuroblastoma cells involving neurotrophin-mediated intracellular signalling and in particular protein kinase C. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*; 33(3): 538-550.

P3: Hellmann J, Rommelspacher H, Mühlbauer E, Wernicke C (2010) Raf kinase inhibitor protein enhances neuronal differentiation in human SH-SY5Y cells. *Developmental Neuroscience*; 32(1): 33-46.

Pharmacol Rep. 2010; 62(4):659-63.

Chronic ethanol exposure changes dopamine D2 receptor splicing during retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y cells.

Wernicke C, Hellmann J, Finckh U, Rommelspacher H.

Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Dorotheenstr. 94, 10117 Berlin, Germany. catrin.wernicke@charite.de

Abstract

There is evidence for ethanol-induced impairment of the dopaminergic system in the brain during development. The dopamine D2 receptor (DRD2) and the dopamine transporter (DAT) are decisively involved in dopaminergic signaling. Two splice variants of DRD2 are known, with the short one (DRD2s) representing the autoreceptor and the long one (DRD2l) the postsynaptic receptor. We searched for a model to investigate the impact of chronic ethanol exposure and withdrawal on the expression of these proteins during neuronal differentiation. RA-induced differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells seems to represent such a model. Our real-time RT-PCR, Western blot, and immunocytochemistry analyses of undifferentiated and RA-differentiated cells have demonstrated the enhanced expression of both splice variants of DRD2, with the short one being stronger enhanced than the long one under RA-treatment, and the DRD2 distribution on cell bodies and neurites under both conditions. In contrast, DAT was down-regulated by RA. The DAT is functional both in undifferentiated and RA-differentiated cells as demonstrated by [³H]dopamine uptake. Chronic ethanol exposure during differentiation for up to 4 weeks resulted in a delayed up-regulation of DRD2s. Ethanol withdrawal caused an increased expression of DRD2l and a normalization of DRD2s. Thus the DRD2s/DRD2l ratio was still disturbed. The dopamine level was increased by RA-differentiation compared to controls and was diminished under RA/ethanol treatment and ethanol withdrawal compared to RA-only treated cells. In conclusion, chronic ethanol exposure impairs differentiation-dependent adaptation of dopaminergic proteins, specifically of DRD2s. RA-differentiating SH-SY5Y cells are suited to study the impact of chronic ethanol exposure and withdrawal on expression of dopaminergic proteins during neuronal differentiation.

PMID: 20885005 [PubMed - indexed for MEDLINE] Free Article

Alcohol Clin Exp Res. 2009 Mar; 33(3): 538-50. Epub 2008 Dec 19.

Long-term ethanol exposure impairs neuronal differentiation of human neuroblastoma cells involving neurotrophin-mediated intracellular signaling and in particular protein kinase C.

Hellmann J, Rommelspacher H, Wernicke C.

Department of Psychiatry, Section of Clinical Neurobiology, CBF, Charité-University Medicine Berlin, Germany.

Abstract

BACKGROUND: Revealing the molecular changes in chronic ethanol-impaired neuronal differentiation may be of great importance for understanding ethanol-related pathology in embryonic development but also in the adult brain. In this study, both acute and long-term effects of ethanol on neuronal differentiation of human neuroblastoma cells were investigated. We focused on several aspects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signaling because BDNF activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade, promoting neuronal differentiation including neurite outgrowth. **METHODS:** The effects of ethanol exposure on morphological differentiation, cellular density, neuronal marker proteins, basal ERK activity, and ERK responsiveness to BDNF were measured over 2 to 4 weeks. qRT-PCR and Western blotting were performed to investigate the expression of neurotrophin receptor tyrosin kinase B (TrkB), members of the ERK-cascade, protein kinase C (PKC) isoforms and Raf-Kinase-Inhibitor-Protein (RKIP). **RESULTS:** Chronic ethanol interfered with the development of a neuronal network consisting of cell clusters and neuritic bundles. Furthermore, neuronal and synaptic markers were reduced, indicating impaired neuronal differentiation. BDNF-mediated activation of the ERK cascade was found to be continuously impaired by ethanol. This could not be explained by expressional changes monitored for TrkB, Raf-1, MEK, and ERK. However, BDNF also activates PKC signaling which involves RKIP, which finally leads to ERK activation as well. Therefore, we hypothesized that ethanol impairs this branch of BDNF signaling. Indeed, both PKC and RKIP were significantly down-regulated. **CONCLUSIONS:** Chronic ethanol exposure impaired neuronal differentiation of neuroblastoma cells and BDNF signaling, particularly the PKC-dependent branch. RKIP, acting as a signaling switch at the merge of the PKC cascade and the Raf/MEK/ERK cascade, was associated with neuronal differentiation and significantly reduced in ethanol treatment. Moreover, PKC expression itself was even more strongly reduced. In contrast, members of the Raf-1/MEK/ERK cascade were less affected and the observed changes were not associated with impaired differentiation. Thus, reduced RKIP and PKC levels and subsequently reduced positive feedback on ERK activation provide an explanation for the striking effects of long-term ethanol exposure on BDNF signal transduction and neuronal differentiation, respectively. PMID: 19120063 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Dev Neurosci. 2010 Mar; 32(1): 33-46. Epub 2009 Dec 3.

Raf kinase inhibitor protein enhances neuronal differentiation in human SH-SY5Y cells.

Hellmann J, Rommelspacher H, Mühlbauer E, Wernicke C.

Section of Clinical Neurobiology, Department of Psychiatry, Campus Benjamin Franklin, Charité University Medicine Berlin, Berlin, Germany.

Abstract

Neuronal differentiation has evolved as an essential process even in the adult brain, once disturbed being associated with the pathogenesis of several psychiatric disorders. To study the effects of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) on neuronal differentiation, we generated neuroblastoma cell lines overexpressing RKIP (RKIP(+)) and expressing RKIP-directed short hairpin RNA for downregulation of RKIP (RKIP(-)). During a 4-week time course of continuous differentiation by retinoic acid (RA), expression of neuronal and glial markers, intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels, protein kinase C (PKC) signal transduction to extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK-1/2) and cellular morphology were investigated in relation to RKIP levels. RKIP(+) cells showed accelerated neurite outgrowth, formation of elaborated neuronal networks and increased neuronal marker expression both in RA-induced differentiation and to some extent even in non-RA-treated cells. RKIP(-) cells showed glial-like cell bodies and increased glial fibrillary acidic protein, suggesting a shift from neuronal to glial phenotype. With respect to differentiation-inducing signal pathways, PKC-mediated ERK-1/2 activation significantly correlated with RKIP levels. Furthermore, basal and forskolin-stimulated intracellular cAMP was potently increased in RKIP(+) cells versus controls. In conclusion, the conserved signal transduction modulator RKIP was shown to enhance several aspects of neuronal differentiation via enhanced crosstalk from PKC to ERK-1/2 and enhancement of G-protein-coupled receptor signaling.

Copyright 2009 S. Karger AG, Basel. PMID: 19955695 [PubMed - indexed for MEDLINE]

3. β -Carboline

3.1. Neurotoxische Wirkung von β -Carbolinen

Aromatische β -Carboline zeigen eine auffallende Strukturhomologie zu MPP⁺. Während das unsubstituierte β -Carbolin, das Norharman, kein permanentes Kation ist, führt die N-Methylierung am Pyridyl-Stickstoff (2er Position) zur Bildung eines quaternären Stickstoffs und damit zu einem permanenten Kation. Dieses kann sich, wie MPP⁺, in der Matrix der Mitochondrien anreichern. β -Carboline sind Indolamine die endogen aus Tryptophan und Tryptamin entstehen können. Außerdem können sie pyrolytisch bei der Nahrungszubereitung durch Erhitzen bei hohen Temperaturen aus Tryptophan gebildet werden und sind deshalb auch im Tabakrauch nachweisbar.

Die N-Methylierung, besonders am Pyridyl-Stickstoff (2er Position), scheint eine notwendige Voraussetzung für die neurotoxische Wirkung zu sein und kann im Gehirn durch S-Adenosylmethionin-abhängige N-Methyltransferasen erfolgen. Gearhart et al. (2002) charakterisierten die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase als das entscheidende Enzym für die 2N-Methylierung. Permanent kationische β -Carboline (BC⁺) stellen ein gutes Substrat für den DAT dar, was die selektive Vulnerabilität dopaminerger Neurone zum Teil erklärt (Storch et al., 2004). Außerdem konnten Gearhart et al. (1997) zeigen, dass Eisenionen die Enzymaktivität der Phenylethanolamin-N-Methyltransferase verdoppeln. In den Zellen der SN, der Region, die bei der Parkinsonschen Erkrankung besonders betroffen ist, kommt Eisen in sehr hohen Konzentrationen vor. Bei ersten Untersuchungen (Collins et al., 1992; Neafsey et al., 1995) führte die einmalige unilaterale Injektion von 2,9-Dimethyl-BC⁺ in die SN von Ratten zu Hirnstammläsionen und zur Reduktion der striatalen Dopaminkonzentration. 2,9-Dimethyl-BC⁺ wurde im menschlichen Hirngewebe nachgewiesen (Matsubara et al., 1993) und war in CSF von L-DOPA-behandelten Parkinson-Patienten höher als in Kontrollen (Matsubara et al., 1995). Außerdem war die Konzentration von Norharman, dem Vorläufer von 2,9-DiMe-BC⁺, in CSF und Plasma von unbehandelten Parkinson-Patienten höher als in Patienten ohne neurologische Erkrankung (Kuhn et al., 1995, 1996). 2,9-Dimethyl-BC⁺ hemmt den Komplex I der Atmungskette mit einer höheren Potenz als MPP⁺ (Albores et al., 1990). Obwohl die neurotoxischen Wirkungen von β -Carbolinen wiederholt beschrieben wurden, sind die Mechanismen noch nicht vollständig verstanden.

In unseren Untersuchungen an einer murinen Neuroblastomzelllinie konnten wir zeigen, dass 2,9-Dimethyl-BC⁺ primär apoptotische Prozesse in Gang setzt und erst sekundär Nekrose auftritt. Außerdem führte nach 60 min Inkubation 2,9-Dimethyl-BC⁺ wie MPP⁺ bei 50 μ M zu einer vergleichbaren ROS-Produktion und bei einer höheren Konzentration (500 μ M) zu einer stärkeren ROS-Produktion als MPP⁺. Das Membranpotential von Mitochondrien war unter MPP⁺ nach 60 min jedoch stärker reduziert als unter 2,9-Dimethyl-BC⁺. 2,9-Dimethyl-BC⁺ zeigte zusätzlich eine paradoxe Wirkung, da das Membranpotential nach 60 min invers

mit der Konzentration korrelierte. Das weist auf weitere Wirkungen von 2,9-Dimethyl-BC⁺ hin. In früheren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass 2,9-Dimethyl-BC⁺ die Triosephosphat-isomerase (TPI) hemmt und so über Aktivierung des Pentosephosphatwegs die Konzentration an NADPH erhöht, welches für die Aktivität der GSH Reduktase erforderlich ist (Bonnet 2005). 2,9-Dimethyl-BC⁺ führte nach 60 min Inkubation zu einer dosisabhängigen Erhöhung von GSH. Das kann auch erklären, weshalb die Caspase 3/7-Aktivierung unter 2,9-Dimethyl-BC⁺ trotz erhöhter ROS-Produktion etwas geringer war als unter MPP⁺. Norharman führte nur zu einer leichten Erhöhung der ROS-Produktion. Das ist konkordant mit den strukturellen Eigenschaften, da Norharman kein permanentes Kation darstellt und sich so auch nicht in der Mitochondrienmatrix anreichert. Bis 500 µM induzierte Norharman auch keine Apoptose. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die neurotoxische Wirkung von strukturellen Besonderheiten einzelner β-Carboline abhängt. Wir konnten zeigen, dass 2,9-Dimethyl-BC⁺ Prozesse in Gang setzt, die für die Pathogenese der Parkinsonerkrankung beschrieben sind. In *in vivo* Experimenten untersuchten wir an Ratten die biochemischen, morphologischen und funktionellen Konsequenzen einer bilateralen intranigralen Applikation von 2,9-Dimethyl-BC⁺. Wir konnten zeigen, dass sowohl 15 nmol als auch 40 nmol pro Seite zu einer signifikanten Reduktion von Dopamin und seiner Metaboliten im Striatum, zu einer signifikanten Abnahme von TH-positiven Zellen und einer Reduktion des Volumens der SN führen. Bei den funktionellen Tests waren sowohl die Extension als auch die Flexion der hinteren Extremität der Tiere, die 40 nmol 2,9-Dimethyl-BC⁺ auf beiden Seiten erhalten hatten, signifikant erhöht. Dieser Befund ist mit dem Auftreten der Muskelrigidität, die ein typisches Syndrom des Morbus Parkinson ist, äquivalent. Damit wiesen wir zum ersten Mal nach, dass 2,9-Dimethyl-BC⁺ Symptome eines Morbus Parkinson auslösen kann.

Ausgehend von den unterschiedlichen Wirkungen, die Norharman und 2,9-Dimethyl-BC⁺ in unseren Zellexperimenten auf die ROS-Produktion, Caspase 3/7-Aktivierung und Apoptoseinduktion zeigten, untersuchten wir in weiteren Zellexperimenten genauer die strukturellen Erfordernisse für eine zytotoxische Wirkung von β-Carbolin-Derivaten.

Anhand von 32 β-Carbolinen und strukturverwandten Substanzen bestimmten wir, inwieweit der Transport über den DAT für die toxische Wirkung relevant ist. Dazu inkubierten wir die humane embryonale Nieren-Zelllinie 293 (HEK) als Wildtyp und als permanent DAT-überexprimierend mit den β-Carbolin-Derivaten und untersuchten das Zellüberleben nach 48 Stunden Inkubation. Außerdem bestimmten wir für ausgewählte Derivate die intrazelluläre Konzentration nach 1 Stunde Inkubation mit mehreren Konzentrationen der β-Carboline. Wir konnten zeigen, dass nichtkationische BC eine 10fach höhere intrazelluläre Konzentration als kationische β-Carboline erreichen müssen um den gleichen toxischen Effekt zu erzielen. Wie erwartet, waren nichtkationische β-Carboline in DAT-exprimierenden Zellen nicht toxischer als in Wildtypzellen. Während von 17 untersuchten kationischen β-Carbolinen 13 Derivate eine DAT-abhängige Toxizität aufwiesen, zeigten überraschenderweise 2 katio-

nische Derivate eine vergleichbare Toxizität in DAT-exprimierenden und DAT-freien Zellen. Diese beiden Derivate hatten eine Methoxygruppe in der Position 6, was den DAT-Transport zu beeinträchtigen scheint, die Diffusion durch die Zellmembran jedoch, wegen der höheren Lipophilie, erhöht. Weitere zwei kationische Derivate zeigten bis 1000 μM keine nennenswerte Toxizität in beiden Zellsystemen. Überraschenderweise spielte die Größe der Derivate eine untergeordnete Rolle: Unsere Daten zeigen, dass das bivalente Norharmanium, das aus zwei Norharmamolekülen besteht, die über eine Butylgruppe an den jeweiligen 2er Stickstoffatomen gekoppelt sind, ein sehr gutes DAT-Substrat darstellt. Es ist mehr als doppelt so groß wie Dopamin.

P4: Pavlovic S, Schulze G, Wernicke C, Bonnet R, Gille G, Badiali L, Kaminska A, Lorenc-Koci E, Ossowska K, Rommelspacher H (2006) 2,9-Dimethyl-beta-carbolinium, a neurotoxin occurring in human brain, is a potent inducer of apoptosis as 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Neuroscience*; 139(4):1525-1537.

P5: Lorenc-Koci E, Rommelspacher H, Schulze G, Wernicke C, Kuter K, Smialowska M, Wieronska J, Zieba B, Ossowska K (2006) Parkinson's disease-like syndrome in rats induced by 2,9-dimethyl-b-carbolinium ion, a β -carboline occurring in human brain. *Behavioural Pharmacology*; 17: 463-473.

P6: Wernicke C, Schott Y, Enzensperger C, Schulze G, Lehmann J, Rommelspacher H (2007) Cytotoxicity of beta-carbolines in dopamine transporter expressing cells: structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology*; 74(7):1065-1077.

Neuroscience. 2006; 139(4): 1525-37. Epub 2006 Mar 6.

2,9-Dimethyl-beta-carbolinium, a neurotoxin occurring in human brain, is a potent inducer of apoptosis as 1-methyl-4-phenylpyridinium.

Pavlovic S, Schulze G, Wernicke C, Bonnet R, Gille G, Badiali L, Kaminska A, Lorenc-Koci E, Ossowska K, Rommelspacher H.

Section of Clinical Neurobiology, Department of Psychiatry, Charité University Medicine, Berlin, Germany.

Abstract

The causes of neurodegeneration are not well understood. However, the role of environmental and endogenous toxins is receiving much attention. In this study, we compared the synthetic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-pyridinium with beta-carbolines occurring in human brain. Methylation of both nitrogens is necessary to convert a beta-carboline into a potent inhibitor of mitochondrial complex I. The respective beta-carboline, 2,9-dimethyl-beta-carbolinium ion is neurotoxic in rats. To investigate the underlying mechanisms, we incubated mouse neuroblastoma 2A cells with 2,9-dimethyl-beta-carbolinium ion, and compared the findings with effects of norharman, the precursor beta-carboline of methylated derivatives, and with 1-methyl-4-phenyl-pyridinium. 2,9-Dimethyl-beta-carbolinium ion caused a significant increase of reactive oxygen species (higher efficiency than 1-methyl-4-phenyl-pyridinium) and of mitochondrial membrane potential within the first minutes. After 60 min, the membrane potential dissipated. Concomitantly, the levels of glutathione increased in 2,9-dimethyl-beta-carbolinium ion but not in 1-methyl-4-phenyl-pyridinium treated cells. After 24 h effector caspases 3 and 7 were activated and the number of apoptotic cells increased as revealed by fluorescence-activated cell sorting cytometry. When incubated longer (48 h), cells underwent late apoptosis/secondary necrosis as shown by fluorescence-activated cell sorting analysis and confirmed qualitatively by an electron microscopy study. The effects of 2,9-dimethyl-beta-carbolinium ion on apoptotic changes were similar to those induced by 1-methyl-4-phenyl-pyridinium(,) while norharman showed only a weak potency at the very high doses. To investigate whether 2,9-dimethyl-beta-carbolinium ion is neurotoxic under in vivo conditions and whether only dopaminergic neurones are affected we conducted a dose-response study. Three weeks after injection of 2,9-dimethyl-beta-carbolinium ion in the substantia nigra we found a dose-dependent decrease of dopamine and its metabolites in the striatum of rats. The levels of 5-hydroxytryptamine were diminished although the decrease was less. The levels of noradrenaline increased after some doses. The findings strongly suggest an important role of endogenous beta-carbolines in neurodegeneration with apoptosis as the predominant mechanism. PMID: 16517085 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Behav Pharmacol. 2006 Sep; 17(5-6): 463-73.

Parkinson's disease-like syndrome in rats induced by 2,9-dimethyl-beta-carbolinium ion, a beta-carboline occurring in the human brain.

Lorenc-Koci E, Rommelspacher H, Schulze G, Wernicke C, Kuter K, Smiałowska M, Wierońska J, Zieba B, Ossowska K.

Department of aNeuropsychopharmacology, Institute of Pharmacology, Polish Academy of Science, Kraków, Poland.

Abstract

Regarding the pathogenesis of Parkinson's disease, a neurotoxin hypothesis was proposed following the discovery that 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) produces a Parkinson-like syndrome in humans and primates. Since then, researchers have searched for endogenous and exogenous compounds that are structurally similar to this neurotoxin. Such compounds include beta-carbolines, formed from tryptophan and its derivatives. beta-carbolines are present naturally in the human brain and cerebrospinal fluid. The present study examined the effect of bilateral, intranigral administration of 2,9-dimethyl-beta-carbolinium ion on muscle tone, electromyographic activity, dopamine metabolism in the striatum, and the number of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and volume of the substantia nigra in rats. We found that the beta-carbolinium ion (15 or 40 nmol per side) caused a significant decrease in the striatal levels of dopamine and its metabolites, which was accompanied by an enhancement of muscle tone and electromyographic activity. Stereological counting revealed that the beta-carbolinium caused a significant decrease in the total number of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and shrinkage of the substantia nigra. The findings suggest that the methylated beta-carbolinium ion produces a dose-dependent degeneration of nigrostriatal neurons, leading to deficits in dopaminergic neurotransmission and an increase of muscle resistance and electromyographic activity, a syndrome equivalent to muscle rigidity in Parkinson's disease.

PMID: 16940767 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Biochem Pharmacol. 2007 Oct 1; 74(7): 1065-77. Epub 2007 Jul 7.

Cytotoxicity of beta-carbolines in dopamine transporter expressing cells: structure-activity relationships.

Wernicke C, Schott Y, Enzensperger C, Schulze G, Lehmann J, Rommelspacher H.
Charité-University Medicine, Department of Psychiatry, CBF, Section Clinical Neurobiology,
Eschenallee 3, 14050 Berlin, Germany. catrin.wernicke@charite.de

Abstract

Some beta-carbolines (BC) are natural constituents in the human brain deriving from tryptophan, tryptamine, and serotonin. In vitro and animal experiments suggest that BC-cations may cause neurodegeneration with a higher vulnerability of dopaminergic than of other neurons. Despite the possible implication of the BC-cations in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD), the underlying mechanisms are poorly understood. The present study further explores the structural requirements for the cytotoxic effects of BCs and searches for additional compounds involved in the pathogenesis of PD. Previous studies were now extended to serotonin-derived BCs, tetrahydro-BCs, a BC-dimer, and a BC-enantiomer to reveal possible stereoselectivity. Neutral, rather lipophilic BCs may pass the plasma membrane and the outer and inner mitochondrial membranes by diffusion whereas the cationic, more polar compounds, can be transported by the dopamine transporter (DAT). In the present study, 4 out of 17 BC-cations caused DAT-independent toxicity. This number is unexpected in view of previous findings that all BC-cations are transported by DAT. 3-Carboxylated and 6-methoxylated BCs were poor substrates. The size alone does not seem to be a limiting factor. A dimeric BC-cation was readily transported by the DAT despite its much larger structure compared to dopamine. Furthermore, (R)-enantiomers were preferentially transported. The neutral BCs were approximately one order of magnitude less toxic than the cationic BCs. There are considerable differences of the transport efficiency between the BCs. Potent cytotoxic tetrahydro-BCs were detected. Because precursor tetrahydro-BCs are present in the brain, the search for the occurrence of these compounds in human brain is warranted.

PMID: 17692827 [PubMed - indexed for MEDLINE]

3.2. Neuroprotektive und neuroregenerative Wirkung von β -Carbolinen

Epidemiologische Daten weisen darauf hin, dass Raucher ein geringeres Risiko haben an Morbus Parkinson zu erkranken. Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass der Gehalt an den β -Carbolinen Harman und Norharman im Zigarettenrauch hoch genug ist, um die Enzymaktivität von MAOA und MAOB zu hemmen (Rommelspacher et al., 2002). Während Norharman bevorzugt MAOB hemmt, wirkt Harman überwiegend auf die MAOA (Rommelspacher et al., 1994; May et al., 1990, 1991a,b). MAOB ist am Abbau von Dopamin beteiligt. Wird dieses gehemmt, wird Dopamin verstärkt über MAOA abgebaut. Erst die Hemmung beider Enzyme führt somit zur Reduktion von ROS, die beim Dopaminabbau über die MAO entstehen.

Darüber hinaus können verschiedene β -Carboline sehr unterschiedliche Reaktionen hervorrufen. Derivate mit einer Carboxylgruppe in der Position 3 binden mit hoher Affinität an den Benzodiazepinrezeptor und wirken dort als inverse Agonisten, was sich beispielsweise in Krämpfe äußert. Andere dieser synthetische β -Carboline hingegen wirken als Agonisten des Benzodiazepinrezeptors und führen zur Sedierung (Stephens et al., 1990). Bei der Untersuchung zur Hemmung der TPI, einem Protein an das [3 H]Norharman mit hoher Affinität bindet, zeigten sich Unterschiede zwischen den Derivaten 2-Methyl-BC⁺, 9-Methyl-BC und 2,9-Dimethyl-BC⁺ (Bonnet et al., 2004). Während die kationischen Derivate die Enzymaktivität hemmten, führte die Inkubation mit 9-Methyl-BC zu einer Erhöhung der Enzymaktivität. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass geringe Strukturunterschiede zwischen den β -Carbolinen zu gravierenden Wirkungsunterschieden führen können. In Analogie zu den gegensätzlichen Wirkungen von verschiedenen β -Carbolinen am Benzodiazepinrezeptor und an der TPI entwickelten wir die Hypothese, dass einige β -Carboline auch eine neuroprotektive Wirkung haben. Aus unseren Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen schlussfolgerten wir, dass ein mögliches neuroprotektives Derivat keinen quaternären Stickstoff in der 2er Position enthalten sollte. Ausgehend von den Befunden zur TPI-Inhibition stellte sich 9-Methyl-BC als ein aussichtsreicher Kandidat für eine mögliche neuroprotektive Wirkung dar.

In Primärzellkulturen embryonaler mesencephaler Neurone fanden wir eine einzigartige Kombination an prodifferenzierenden und antiapoptotischen Wirkungen. Sowohl die Anzahl an TH-positiven Zellen, als auch deren Neuritenanzahl und Neuritenverzweigung nahmen unter der 9-Methyl-BC-Exposition innerhalb von 48 h konzentrationsabhängig zu. Die Transkription einer Reihe von Genen, die für die Differenzierung dopaminerger Neurone wichtig sind und von Markergenen dopaminerger Neurone waren unter 9-Methyl-BC-Behandlung hochreguliert. Der ATP-Gehalt war ebenfalls erhöht. Die Anzahl nekrotischer Zellen und die Caspase-3 Aktivität, als Merkmal der Apoptose, nahmen unter der Exposition

ab. Ebenfalls reduzierte sich der Anteil teilungsaktiver Zellen. Im Zusammenhang mit dem vorigen Befund spricht das für eine Verschiebung von der Zellproliferation zur Zelldifferenzierung. Dies konnte auch in einem weiteren Zellsystem bestätigt werden. 9-Methyl-BC Behandlung führte auch in SH-SY5Y-Zellen zu einer Reduktion der Zellteilung bei gleichzeitiger Differenzierung in den neuronalen Phänotyp mit verzweigten Neuriten und der Ausbildung eines neuronalen Netzwerkes.

Auf Basis dieser Befunde untersuchten wir die neuroregenerative Wirkung von 9-Methyl-BC im Tiermodell. Dazu wurde Ratten über osmotische Minipumpen für 28 Tage MPP⁺ in den linken Seitenventrikel des Gehirns infundiert, um eine chronische Degeneration der dopaminergen Neurone der SN hervorzurufen. Anschließend wurden die osmotischen Pumpen ausgetauscht und für 14 Tage 9-Methyl-BC oder äquimolare Kochsalzlösung injiziert. Eine weitere Vergleichsgruppe waren Tiere, an denen ohne Substanzapplikation die gleichen operativen Eingriffe vorgenommen worden waren. Die MPP⁺/NaCl-behandelten Tiere wiesen eine etwa 50 %ige Reduktion des Dopamingehalts im linken Striatum im Vergleich zum rechten Striatum und im Vergleich zu scheinoperierten Tieren auf. In Tieren mit MPP⁺/9-Methyl-BC-Behandlung hatte sich der Dopamingehalt wieder normalisiert. Ein vergleichbares Bild ergab sich bei der Anzahl und der Dichte TH-positiver Zellen in der SN. Die Reduktion dieser dopaminergen Parameter unter MPP⁺/NaCl war nach MPP⁺/9-Methyl-BC-Behandlung nicht mehr nachweisbar. Über PCR-Array und single real time RT-PCR konnten wir zeigen, dass eine Reihe von neurotrophen Faktoren, die entscheidend für das Überleben dopaminergener Zellen sind, unter MPP⁺/9-Methyl-BC-Behandlung hochreguliert waren. Dazu gehörte sowohl der BDNF, für den schon gezeigt wurde, dass er das Überleben neuronaler Zellen nach Toxingabe erhöht (Nosheny et al., 2007), als auch der Faktor argininerich, mutated in early stage tumors like 1 (ARMETL1, Synonym: conserved dopamine neurotrophic factor = CDNF) und der ciliary neurotrophic factor (CNTF), deren Wichtigkeit für neuronale Zellen ebenfalls demonstriert wurde (Lindholm et al., 2007; Hartnick et al., 196). Das Cerebellin-1-Precursorprotein war ebenfalls hochreguliert. Unsere Untersuchungen bringen dieses Protein das erste Mal in den Zusammenhang mit dopaminergen Zellen. In ausgewählten Westernblotanalysen konnten diese Ergebnisse auf Proteinebene ebenfalls nachgewiesen werden.

Aufgrund des erhöhten ATP-Gehalts in den 9-Methyl-BC-behandelten mesenzephalen Primärzellen untersuchten wir die verschiedenen Komplexe der Atmungskette im Striatum derselben Tiere mit der Blue-nativ-2D-Gelelektrophorese. Das ermöglichte uns, die Enzymaktivität des Komplexes I im Gel zu bestimmen. Die Peptidmenge und die Komplexmenge waren nicht unterschiedlich zwischen den einzelnen Behandlungen. Jedoch war nach MPP⁺/9-Methyl-BC-Behandlung die Enzymaktivität des Komplex I in einem bestimmten Superkomplex erhöht. Dies weist darauf hin, dass die Restitution dopaminergener Neurone nicht nur durch die vermehrte Transkription und Expression bestimmter Neurotrophine

erfolgt, sondern dass darüber hinaus die Effektivität der Atmungskette durch 9-Methyl-BC erhöht wurde.

Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal eine Wirksubstanz, die die natürlichen Reparaturmechanismen der dopaminergen Neurone aktiviert. Diese Befunde wurden inzwischen in einem dritten *in vitro* Zellsystem reproduziert.

P7: Hamann J, Wernicke C, Lehmann J, Reichmann H, Rommelspacher H, Gille G (2008) 9-Methyl-beta-carboline up-regulates the appearance of differentiated dopaminergic neurones in primary mesencephalic culture. *Neurochemistry International*; 52(4-5): 688-700.

P8: Wernicke C, Hellmann J, Zieba B, Kuter K, Ossowska K, Frenzel M, Dencher NA, Rommelspacher H (2010) 9-Methyl- β -carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson's disease. *Pharmacological Reports*; 62, 35-53.

Neurochem Int. 2008 Mar-Apr; 52(4-5): 688-700. Epub 2007 Sep 4.

9-Methyl-beta-carboline up-regulates the appearance of differentiated dopaminergic neurones in primary mesencephalic culture.

Hamann J, Wernicke C, Lehmann J, Reichmann H, Rommelspacher H, Gille G.

Department of Neurology, Technical University of Dresden, Fetscherstr. 74, 01307 Dresden, Germany.

Abstract

beta-Carbolines (BCs) derive from tryptophan and its derivatives. They are formed endogenously in humans and mammals and occur inter alia in cooked meat and tobacco smoke. They have been detected in human brain, cerebrospinal fluid, and plasma. Up to now they were predominantly identified as compounds exhibiting neurotoxic actions. Since significantly higher amounts are present in parkinsonian patients, they are regarded as potential pathogenetic factors in Parkinson's disease. We identified for the first time a BC (9-methyl-BC; 9-me-BC) exerting neuroprotective and neuron-differentiating effects. Treatment of primary mesencephalic dopaminergic cultures with 9-me-BC inhibited the basal release of lactate dehydrogenase and reduced the number of cells stained with propidium iodide. Caspase-3 activity was decreased, the total protein content was unchanged and ATP content was increased. Furthermore, the expression of inflammation-related genes was reduced. The number of differentiated dopaminergic neurones was significantly increased and a wide array of neurotrophic/transcription factors (Shh, Wnt1, Wnt5a, En1, En2, Nurr1, Pitx3) and marker genes (Th, Dat, Aldh1a1) decisive for dopaminergic differentiation was stimulated. Consistently, the dopamine content was slightly, although non-significantly, increased and the dopamine uptake capacity was elevated. An anti-proliferative effect was observed in human neuroblastoma SH-SY5Y cells which is consistent with a reduced incorporation of bromodesoxyuridine into the DNA of primary mesencephalic cells. Whether the additional dopaminergic neurones in primary culture derive from dopaminergic precursor cells, previously tyrosine hydroxylase negative dopaminergic neurones or are the result of a transdifferentiation process remains to be established.

PMID: 17913302 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Pharmacol Rep. 2010 Jan-Feb; 62(1): 35-53.

9-Methyl-beta-carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson's disease.

Wernicke C, Hellmann J, Zieba B, Kuter K, Ossowska K, Frenzel M, Dencher NA, Rommelspacher H.

Department of Psychiatry, CCM, Charité-University Medicine Berlin, Dorotheenstr. 94, 10117 Berlin, Germany. catrin.wernicke@charite.de

Abstract

In a previous study, a primary culture of midbrain cells was exposed to 9-methyl-beta-carboline for 48 h, which caused an increase in the number of tyrosine hydroxylase-positive cells. Quantitative RT-PCR revealed increased transcription of genes participating in the maturation of dopaminergic neurons. These in vitro findings prompted us to investigate the restorative actions of 9-methyl-beta-carboline in vivo. The compound was delivered for 14 days into the left cerebral ventricle of rats pretreated with the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) for 28 days applying a dose which lowered dopamine by approximately 50%. Interestingly, 9-methyl-beta-carboline reversed the dopamine-lowering effect of the neurotoxin in the left striatum. Stereological counts of tyrosine hydroxylase-immunoreactive cells in the substantia nigra revealed that the neurotoxin caused a decrease in the number of those cells. However, when treated subsequently with 9-methyl-beta-carboline, the number reached normal values. In search of an explanation for the restorative activity, we analyzed the complexes that compose the respiratory chain in striatal mitochondria by 2-dimension gel electrophoresis followed by MALDI-TOF peptide mass fingerprinting. We found no changes in the overall composition of the complexes. However, the activity of complex I was increased by approximately 80% in mitochondria from rats treated with MPP+ and 9-methyl-beta-carboline compared to MPP+ and saline and to sham-operated rats, as determined by measurements of nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase activity. Microarray technology and single RT-PCR revealed the induction of neurotrophins: brain-derived neurotrophic factor, conserved dopamine neurotrophic factor, cerebellin 1 precursor protein, and ciliary neurotrophic factor. Selected western blots yielded consistent results. The findings demonstrate restorative effects of 9-methyl-beta-carboline in an animal model of Parkinson's disease that improve the effectiveness of the respiratory chain and promote the transcription and expression of neurotrophin-related genes.

PMID: 20360614 [PubMed - indexed for MEDLINE] Free Article

4. Diskussion

In der vorliegenden Schrift sind eigene Arbeiten dargestellt, die sich mit der Störung dopaminerger Neurone durch schädigende Substanzen und möglichen neue therapeutische Ansätze beschäftigen.

Wir konnten zeigen, dass die unter RA vom indifferenten in den neuronalen Phänotyp differenzierende humane SH-SY5Y-Neuroblastomzelllinie ein geeignetes Modell für dopaminerge Neurone und deren Beeinträchtigung durch chronische Ethanolgabe darstellt. In mehreren Aspekten waren die in der Zellkultur beobachteten Befunde kohärent mit Befunden aus Tierexperimenten und Beobachtungen bei Kindern mit Alkoholembryopathie.

1. Die unter RA-Exposition gefundene Erhöhung an Dopamin war unter chronischer Ethanolexposition und nach Ethanolentzug vermindert. Eine verminderte dopaminerge Neurotransmission ist sowohl von Tierexperimenten bekannt und wurde auch wiederholt bei Kindern mit Alkoholembryopathie beobachtet.

2. Die gefundenen Veränderungen in der Transkription der beiden Splicevarianten von DRD2 sind in Übereinstimmung mit physiologischen Befunden im Tiermodell, die gezeigt haben, dass sie prä- bzw. postsynaptisch exprimiert werden und mit der DRD2-Expression nach pränataler Alkoholexposition.

3. Die Zellzahl war nicht vermindert, jedoch war die Morphologie stark beeinträchtigt. Die Zellen zeigten weniger Neuriten und Verzweigungen. Dieser Befund ging einher mit einer verminderten Expression neuronaler Marker. Außerdem blieb die Bildung von größeren Zellkomplexen und deren Vernetzung über lange Neurite gänzlich aus. Dies weist auf Störungen der Verschaltung von neuronalen Netzwerken durch Ethanol hin. Auch diese Befunde sind konsistent mit *in vivo* Beobachtungen, bei denen nicht die Zellzahl, aber das Hirnvolumen vermindert war.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die RA-induzierte Differenzierung der SH-SY5Y-Zellen in den neuronalen Phänotyp und die Ausprägung neuronaler Charakteristika BDNF-vermittelt ist (Kaplan et al., 1993). RA führt zur Induktion der Expression des TrkB, dem Rezeptor von BDNF. Außerdem wird BDNF von den Zellen verstärkt gebildet und sezerniert. Die Aktivierung des TrkB führt zur Signalweiterleitung über die Ras-Raf-1-MEK-ERK-Kaskade und die Phosphoinositol-III-kinase aber auch über den PKC-Signalweg. In diesem Zusammenhang konnten wir die besondere Bedeutung von RKIP als regulierendem Protein der ERK-Kaskade und der Interaktion mit der cAMP aktivierten Kaskade herausarbeiten. Eine Aktivierung der PKC führt zur verstärkten Phosphorylierung von RKIP. Dieses verliert seine Affinität zu Raf-1 und gibt so die MAP-Kaskade frei (Corbit et al., 2003; Schuierer et al., 2006). Das phospho-RKIP bindet an GPK und hemmt deren Wirkung. Dadurch können GPCR nicht mehr inaktiviert werden und die Bindung ihrer Liganden führt zu einer verstärkten Wirkung. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass auch die Aktivierung

von DRD2 über die Untereinheit $G_{\beta\gamma}$ das MAPK-System aktiviert (Bonci & Hopf, 2005). Dadurch wird das MAPK-System über mehrere Wege aktiviert. Diese Aktivierung ist für den Autorezeptor DRD2S aber nicht für den postsynaptischen Rezeptor DRD2L PKC-abhängig (Choi et al., 1999). Sowohl die panPKC als auch die PKC γ Expression war nach 2 Wochen Ethanolexposition reduziert. Das ist in sofern interessant, da wir zeigen konnten, dass unter chronischer Ethanolexposition die Expression von DRD2S vermindert, die von DRD2L jedoch leicht erhöht war und das verminderte Verhältnis DRD2S/DRD2L auch unter Ethanolentzug bestehen blieb. Unsere Befunde mit erhöhten DRD2L und verminderten DRD2S weisen auf eine veränderte Splicefunktion hin und sind konkordant mit tierexperimentellen Befunden (Oomizu et al., 2003). Die Untersuchung der Expression der beiden Splicevarianten des DRD2 ist gegenwärtig nur auf mRNA-Ebene möglich, da zurzeit keine selektiven Antikörper zur Verfügung stehen um den Befund auf Proteinebene zu verifizieren. Auch mit bildgebenden Verfahren kann auf Grund fehlender selektiver Liganden nur der Gesamt-DRD2-Gehalt dargestellt werden. Zusammengefasst kommt es durch die Reduzierung des präsynaptischen Autorezeptors zu einer verminderten Rückkopplung. Dies und der verminderte Dopamingehalt in den Zellen nach Ethanolentzug führen zu einem erhöhten Suchtrisiko. Aus verschiedenen Tierexperimenten ist bekannt, dass eine gestörte dopaminerge Neurotransmission sowohl Konsequenz als auch Ursache einer Alkoholerkrankung sein kann (Hannigan et al., 1990; Randall und Hannigan, 1999; Bice et al., 2008; Nader et al., 2008; Thanos et al, 2001, 2004, 2005). Auch beim Menschen wurde wiederholt von veränderter DRD2-Rezeptordichte berichtet (Heinz et al., 2004; Heinz et al., 2005; Tupala et al, 2003; Repo et al., 1999). In eigenen genetischen Studien konnten wir zeigen, dass Haplotypen, die gering exprimierende Allele darstellen, mit einem höheren Erkrankungsrisiko für Alkoholabhängigkeit assoziiert sind (Kraschewski et al., 2009).

Die Veränderungen der PKC-Expression können nicht Ursache der unter chronischer Ethanolexposition kontinuierlich erniedrigten DRD2S-Expression sein, da die Expression von PKC nach einer Woche Ethanolexposition erhöht war und erst danach abnahm. Auch die Expression von TrkB, dem Rezeptor für BDNF, war nur nach einer Woche Ethanolexposition erniedrigt und nach 2 Wochen wieder normalisiert. Wir konnten in unseren Experimenten die zentrale Rolle von RKIP im Prozess der dopaminergen Differenzierung herausarbeiten. Wie DRD2S war die Expression von RKIP unter chronischer Ethanolexposition kontinuierlich erniedrigt. Dies ging einher mit einer verminderten Aktivierbarkeit der ERK-Stimulierbarkeit. Die Expression der Kinasen der ERK-Kaskade und die basale Aktivität waren hingegen unverändert. Dieser Widerspruch lässt sich nur durch die Funktion von RKIP erklären, wie sie in den Publikation dargestellt ist. Mit den weiterführenden Experimenten zur Überexpression und Herunterregulierung von RKIP konnten wir die wichtige Schlüsselfunktion dieses Proteins für die Differenzierung dopaminergener Neurone weiter herausarbeiten. RKIP ist ein hoch konserviertes Protein. Es initiiert das Aufblühen in

verschiedenen Pflanzen (Banfield et al., 1998) und reguliert die Differenzierung humaner Keratinozyten und Monozyten (Yamazaki et al., 2004, Schuierer et al., 2006). Taiji et al. (1996) wiesen eine hohe Expression in Hirnregionen während der Entwicklung nach. Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass neuronale Merkmale auf Protein- und morphologischer Ebene direkt mit der RKIP-Expression korrelierten. Obwohl RKIP nicht im Focus der Untersuchungen zur Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen steht, wurde gelegentlich über eine veränderte Expression berichtet (Keller et al., 2004, George et al., 2006, Klysiak et al., 2008). King und Murphy (2007) berichten über eine erhöhte RKIP-Expression in einem Zellmodell nach Exposition mit Ginsengextrakt, dem mögliche neuroprotektive Wirkung zugeschrieben wird.

In früheren Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe wurde RKIP als ein an [³H]Norharman bindendes Protein identifiziert (Bonnet 2005). Die Wirkung blieb jedoch unbekannt. Die β -Carboline Norharman und Harman kommen unter anderem im Tabakrauch vor (Rommerspacher et al., 2002; Herraiz und Chaparro, 2005). Aus epidemiologischen Studien ist bekannt, dass Raucher ein reduziertes Risiko haben, an Morbus Parkinson zu erkranken. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Norharman und Harman die MAOB bzw. die MAOA hemmen (Rommerspacher et al., 1994; May et al., 1991 a, b). Gelegentlich wird dieser Eigenschaft eine mögliche neuroprotektive Wirkung zugeschrieben (Herraiz, 2007). MAOB-Hemmer werden auch in der Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt. Langzeitstudien weisen aber darauf hin, dass durch diese Therapie zwar die dopaminerge Neurotransmission für eine gewisse Zeit erhöht werden kann, die Neurodegeneration jedoch nicht aufgehalten wird. MAOA und MAOB sind in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. MAOA wird besonders hoch in catecholaminergen Neuronen exprimiert, während die höchsten Werte von MAOB in serotonergen Neuronen und Astrozyten gefunden wurden (Vanyukov et al., 2004). Beim Abbau von Dopamin über die MAO entstehen ROS (Cookson, 2005). Erst wenn beide MAO-Enzyme gehemmt werden, erfolgt der Abbau von Dopamin über die COMT, die keine ROS produziert.

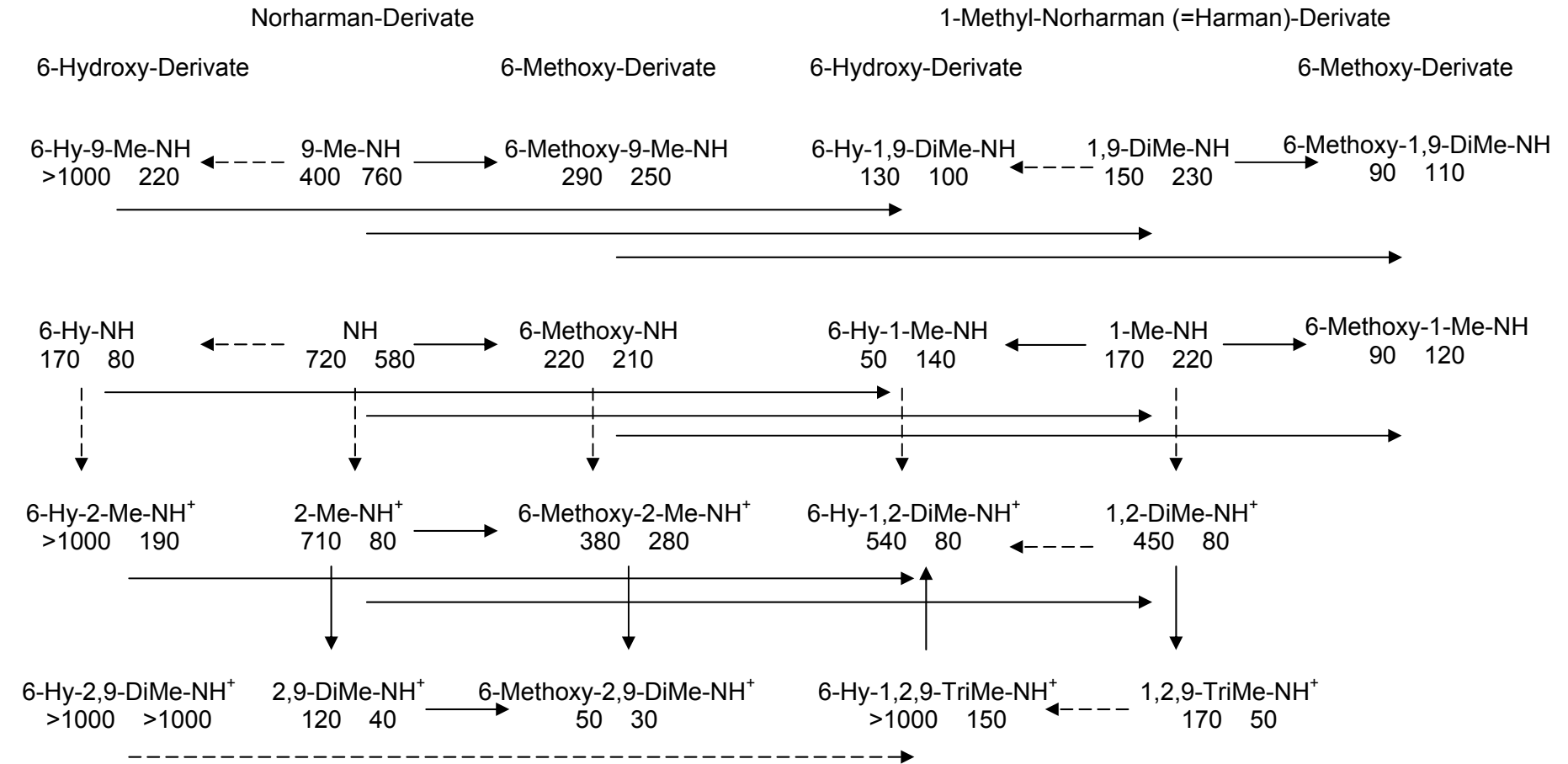
Wegen der Strukturhomologie zu MPP⁺ wird aber auch eine neurotoxische Wirkung der β -Carboline besonders für dopaminerge Neurone diskutiert. Wir konnten in unseren Struktur-Aktivitätsuntersuchungen klare Strukturmerkmale herausarbeiten: Besonders die Derivate mit einer Methylierung am Pyridinstickstoff (N2) weisen eine DAT-abhängige Zytotoxizität auf. Die neurotoxische Wirkung von 2,9-Dimethyl-BC⁺ war bereits beschrieben (Matsubara, 1998). Wir konnten einzelne Mechanismen dieser Wirkung aufklären und zeigen, dass es neben den ähnlichen Wirkungen zu MPP⁺ (z.B. Apoptose) auch Unterschiede gibt. Außerdem zeigten wir zum ersten Mal, dass chronische 2,9-Dimethyl-BC⁺-Exposition im Tiermodell zu muskulären Veränderungen führt, wie sie bei Morbus Parkinson als Rigor beschrieben sind. Norharman und Harman kommen verbreitet in der Umwelt vor und können auch endogen gebildet werden. Gearhart et al. (1997) wiesen 2N-Methyl- und 9N-Methyl-

transferaseaktivität im Gehirn nach. Dieser Prozess könnte zur endogenen Bildung neurotoxischer β -Carboline beitragen. Die 2N-Methyltransferaseaktivität konnte durch Eisenionen erhöht werden. In der SN wird im Neuromelanin Eisen akkumuliert. Dies könnte eine Erklärung für die besondere Vulnerabilität der SN-Neurone sein. Jedoch gibt es bisher keine Erkenntnisse über die tatsächliche *in vivo* Aktivität dieser Enzyme. Die Methylierung der β -Carboline wurde stark durch das Vorhandensein anderer Substrate gehemmt (Gearhart et al., 2000). Außerdem liegt das pH-Optimum der Methyltransferaseaktivität, bei 8,5-9. Der in den neuronalen Zellen vorherrschende pH liegt aber bei 7 oder etwas darunter. Reyman et al. (2007) konnten zeigen, dass Norharman und Harman mit Hydrogenbindungsdonoren / akzeptoren interagieren: Norharman bildet mit Essigsäure einen Komplex von 1:2 und Harman von 1:3. Dieses Verhalten könnte eine Methylierung unter physiologischen Bedingungen stark beeinträchtigen.

Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass nichtkationische β -Carboline überwiegend durch Diffusion in die Zelle gelangen. Außerdem waren sie durchgängig weniger toxisch, da ihre intrazelluläre Konzentration bei der EC_{50} um das 10-20fache höher war als die der kationischen β -Carboline. Kationische β -Carboline werden bevorzugt über den DAT in die Zelle aufgenommen. Während die EC_{50} zwischen DAT-exprimierenden und Wildtypzellen für MPP^+ um den Faktor 300 differierte, lag der Faktor für toxisch wirkende kationische β -Carboline zwischen 2,2 und 92,0. Die meisten kationischen β -Carboline zeigen damit auch in unterschiedlicher Ausprägung eine Diffusion. Methylgruppen in der 1er (Harmanderivate) und in den meisten Derivaten besonders in der 9er Position erhöhen die Fähigkeit zur Diffusion der kationischen β -Carboline ohne zwangsläufig den Transport über den DAT zu beeinflussen. Eine Methoxygruppe in der 6er Position hingegen verhindert fast vollständig den DAT-Transport der kationischen Derivate und verbesserte deren Diffusion auch bei kationischer Struktur. Auch hier erleichtert eine weitere Methylgruppe in der 9er Position die Diffusion. Bei den nichtkationischen Methoxyderivaten erhöht die Methylierung in der 1er Position die Diffusion. Auch bei den anderen nichtkationischen β -Carbolinen führt die Methylierung in der 1er Position zu einer Verbesserung der Diffusion. Eine Methylierung in der 9er Position nichtkationischer Derivate hat keinen Einfluss auf die Diffusion. Die Synopsis ist in der Abbildung 1 dargestellt.

Unsere systematischen Untersuchungen zur neurotoxischen Wirkung von β -Carbolinen führten uns schließlich zur Identifizierung von 9-Methyl-BC als ein möglicherweise neuroprotektiv wirkendes Derivat. Auch frühere Untersuchungen ergaben schon Hinweise, dass 9-Methyl-BC zum Teil andere Wirkungen hervorruft als 2-Methyl-BC⁺ und 2,9-Dimethyl-BC⁺ (Bonnet et al., 2004; P4). Es ist nicht ungewöhnlich, dass innerhalb einer Substanzklasse Derivate mit unterschiedlichen und zum Teil sogar gegensätzlichen physiologischen Wirkungen existieren. Am bekanntesten sind wohl die Tetrazykline, deren

Abb 1: Schema der verschiedenen BC-Derivate mit den EC₅₀-Werten [µM] in HEK_{wildtyp} und HEK_{hDAT}-Zellen.



- > Zunahme der hDAT unabhängigen Toxizität gekennzeichnet durch Abnahme der EC₅₀ in HEK_{wildtyp} bzw. in beiden Zelllinien
 - - - - -> Zunahme der hDAT-abhängigen Toxizität gekennzeichnet durch Abnahme der EC₅₀ vor allem in HEK_{hDAT}-Zellen bzw. durch Zunahme der EC₅₀ in HEK_{wildtyp}-Zellen
 Hy: Hydroxy; NH: Norharman; NH⁺: Norharmanium; Me: Methyl

diverse Derivate entweder als Antibiotika oder als Antidepressiva wirken. Auch einzelne synthetische β -Carbolin-Derivate wirken entweder als Agonist oder als inverser Agonist am Benzodiazepinrezeptor mit entsprechender physiologischer Wirkung der Sedierung bzw. Aktivierung. Distinkte Struktureigenschaften können also ausschlaggebend für die physiologische Wirkung sein. Für eine Auswahl an Norharmanderivaten ist das in Abbildung 2 dargestellt. Neben 9-Methyl-BC zeigte auch das strukturell ähnliche Harman (1-Methylnorharman) in den SH-SY5Y-Zellen eine leicht differenzierende Wirkung, die Neuriten waren aber nicht so lang und weniger verzweigt (noch nicht publiziert). Norharman hingegen wirkte nicht prodifferenzierend. Die Methylierung am 9er Stickstoff und eine nichtkationische Struktur scheinen damit wichtig für die neuroprotektive/prodifferenzierende Wirkung zu sein. Da, wie oben dargestellt, ein Restrisiko besteht, dass β -Carboline endogen N2-methyliert werden könnten und somit ein toxisches Derivat entsteht, untersuchten wir auch die prodifferenzierende Wirkung von 9-Methylcarbazol, dem 2-Deazaanalogon von 9-Methyl-BC. Diese Substanz zeigte in den SH-SY5Y-Zellen keine differenzierende Wirkung. Der 2er Stickstoff mit dem freien Elektronenpaar scheint somit eine wichtige Strukturvoraussetzung für die prodifferenzierende Wirkung von β -Carbolin-Derivaten zu sein (noch nicht publiziert).

Der Anstieg der Anzahl dopaminerger Neurone in der Primärzellkultur embryonaler mesenzephaler Zellen nach Inkubation mit 9-Methyl-BC ging einher mit der Erhöhung der Expression neurotropher und Transkriptionsfaktoren wie Sonic hedgehog homolog (Shh), wingless type mouse mammary tumor virus integration site family (Wnt)1, Wnt5a, Engrail (En)1, En2, Nurr1, bone morphogenic protein (BMP)2, BMP4 und pituitary homeobox 3 (Ptx3). Da der Anteil bromdesoxyuridinpositiver Zellen abnahm, ist ausgeschlossen, dass die erhöhte Anzahl dopaminerger Zellen auf eine verstärkte Proliferation von Progenitor oder Precursorzellen zurückgeht. Deshalb kommen als mögliche Prozesse die verstärkte Differenzierung postmitotischer Zellen oder die Transdifferenzierung reifer Neurone in Betracht. Im *in vivo* Rescuexperiment normalisierte sich die Anzahl dopaminerger Zellen in der SN nach 9-Methyl-BC-Behandlung im Vergleich zu den Tieren, die nur mit MPP⁺ behandelt wurden. Auch der Dopamingehalt im Striatum normalisierte sich. Die Faktoren Nurr1, Ptx3, BMP2, BMP4 waren in ihrer Expression nicht verändert. Das ist nicht verwunderlich, da es sich dabei um intrinsische Faktoren dopaminerger Zellen handelt, die vor allem im Soma und nicht in den Nervenendigungen lokalisiert sind. Im Striatum ging die regenerative Wirkung von 9-Methyl-BC einher mit der Aktivierung einer ganzen Reihe von neurotrophen Faktoren, die für das Überleben dopaminerger Neurone wichtig sind. Dazu zählen BDNF, CNTF und ARMETL1. Außerdem brachten wir Precerebellin 1 das erste Mal in Zusammenhang mit dem Überleben dopaminerger Zellen. Diese Faktoren können retrograd das Überleben dopami-

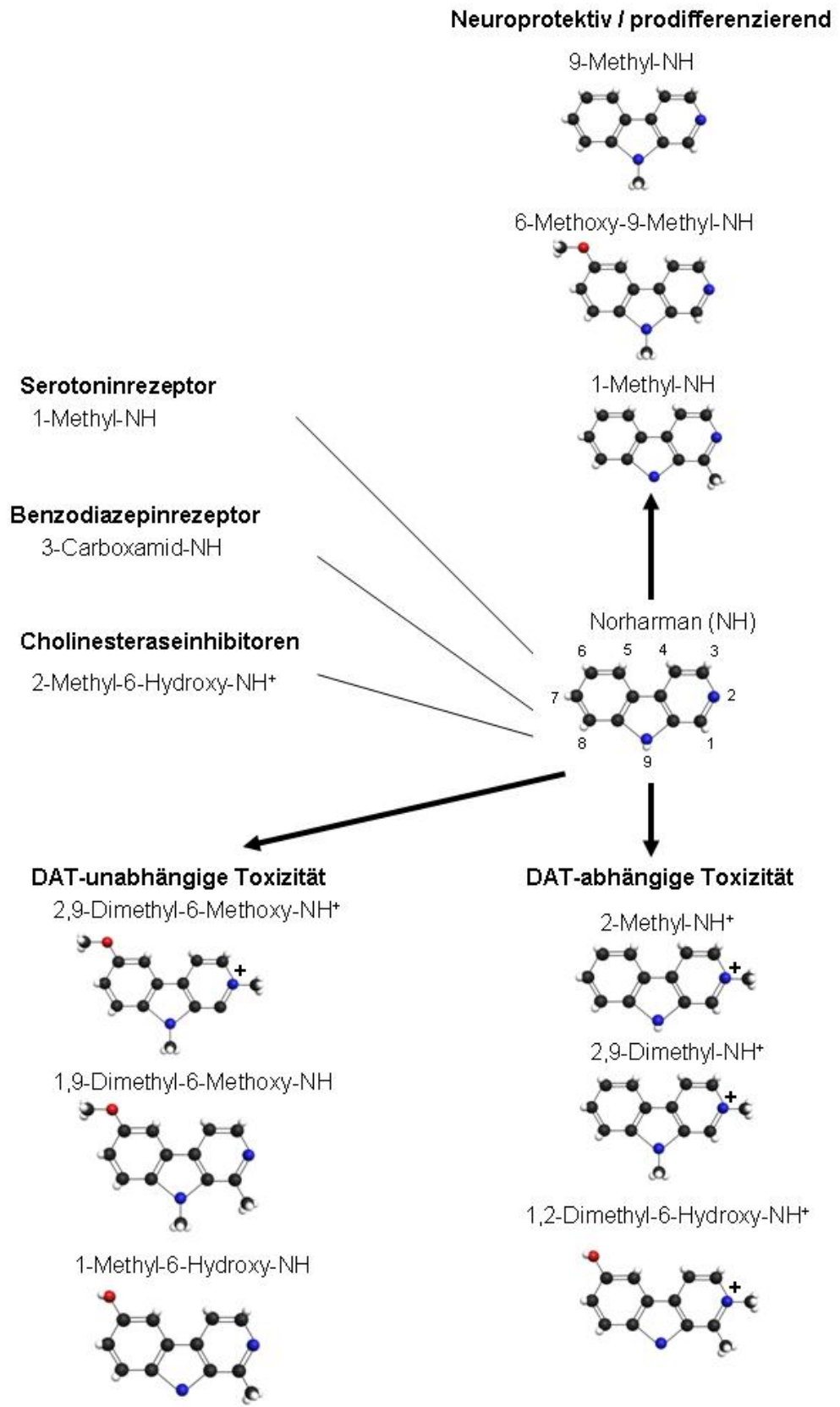


Abb. 2 zeigt die chemischen Strukturen einzelner Derivate mit neuroprotektiver / neurodifferenzierender bzw. toxischer Wirksamkeit (Auswahl). Abk. siehe Abb. 1.

nerger Zellen sichern und die synaptischen Verbindungen stabilisieren. In diversen *in vitro* Untersuchungen konnte die neuroprotektive Wirkung der zusätzlichen Gabe von BDNF, GDNF bzw. CDFN (Lindholm et al., 2007) nachgewiesen werden. Erste klinische Studien mussten jedoch wegen zu vieler Nebenwirkungen abgebrochen werden (Gill et al., 2002; Slevin et al., 2005). Niedermolekulare Substanzen, die die Expression neurotropher Faktoren positiv beeinflussen, sind deshalb eine viel versprechende Therapieoption. Außerdem ist die konzertante Wirkung mehrerer Faktoren den *in vivo* Bedingungen ähnlicher und deshalb möglicherweise erfolgreicher als die Erhöhung der Konzentration eines einzelnen neurotrophen Faktors. Diese Annahme wird durch Befunde zu intrinsischen Expressionsunterschieden zwischen den dopaminergen Neuronen der SN und der VTA gestützt. Die dopaminergen Neurone der VTA sind gegenüber toxischen Substanzen bedeutend unempfindlicher als die der SN. Expressionsunterschiede können Ansatzpunkte zum Verständnis der unterschiedlichen Vulnerabilität gegenüber neurodegenerativen Faktoren liefern und damit eine Basis für eine gezielte Therapie bilden. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die SN und VTA ein sehr ähnliches Expressionsprofil aufweisen. Weniger als 5% der Gene werden unterschiedlich exprimiert (Chung et al., 2005; Greene et al., 2005). Einige dieser Unterschiede scheinen jedoch kritisch zu sein, da sie potentiell relevante zelluläre Signalwege betreffen. In der SN sind vor allem solche Gene stärker exprimiert, die den Energiestoffwechsel, die Mitochondrien, den Lipidstoffwechsel und die Phosphatignalübertragung betreffen (Chung et al., 2005; Greene et al., 2005). Das ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass der Energiestoffwechsel in der SN höher als in der VTA ist. Der erhöhte Energiestoffwechsel führt zu einem stärkeren oxidativen Stress und zu geringeren Energiereserven. Diese Eigenschaft könnte eine Erklärung für die selektive Vulnerabilität dieser Neurone besonders gegenüber mitochondrialen Toxinen erklären (Greene et al., 2005). Hauser et al. (2005) konnten zeigen, dass die Expression nucleär codierter mitochondrialer Gene in postmortem humanen SN Regionen signifikant verändert war. In der VTA hingegen sind solche Gene stärker exprimiert, die zur synaptischen Plastizität und Neuroprotektion beitragen, einschließlich der Neurotrophine. Diese Clusterung legt den Schluss nahe, dass für eine erfolgreiche Therapie nicht die Erhöhung eines einzelnen Faktors (z.B. eines Neuropeptides) sondern vielmehr die gemeinsame Wirkung mehrerer Faktoren ausschlaggebend ist. Diese Annahme ist mit dem so genannten Neurotrophinkonzept konsistent. Dieses Konzept besagt, dass ein neurotrophes Molekül vom innervierten Gewebe sezerniert wird und durch die Endigung der Axone aufgenommen und retrograd transportiert wird (Levi-Montalcini, 1987; Thoenen et al., 1987; Oppenheim 1991). Anfänglich nur für das periphere Nervengewebe konzipiert, wurde das Konzept auf das ZNS ausgedehnt (DiStefano et al., 1992; Mufson et al., 1999). Afferente Neurone, die nicht in Kontakt mit den innervierten Neuronen stehen und damit diesen neurotrophen Faktor nicht erhalten, werden der Apoptose zugeführt. Weiter Untersuchungen haben zur

Erweiterung dieses Konzeptes geführt. Es ist jetzt allgemein akzeptiert, dass trophische Verstärkung von verschiedenen Quellen kommt: sowohl von pre- und postsynaptischen Neuronen (v. Bartheld, 2004; Conner et al., 1998; Zweifel et al., 2005), als auch von axonal gelegenen Gliazellen (Kinameri und Matsuoka, 2003; Sendtner et al., 2000; Creange et al., 1997) und autokrin gebildet wird (Acheson et al., 1995). Außerdem gibt es Hinweise, dass die multiplen neurotrophen Faktoren simultan und/oder sequentiell wirken müssen, um das Überleben der Neurone zu unterstützen (Davies 1998). Mit unseren Experimenten konnten wir nachweisen, dass sowohl die Expression intrinsischer (murine embryonale mesenzephal Primärzellen) als auch extrinsischer (Rattenstriatum) Faktoren dopaminerger Neurone durch 9-Methyl-BC erhöht wird.

Neben der Erhöhung der Expression verschiedener neurotropher Faktoren im Striatum konnten wir in unserem *in vivo* Experimenten auch erstmalig zeigen, dass die Aktivität eines Superkomplexes erhöht war. Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht geklärt, da diese Erhöhung nicht mit einer verstärkten Expression der Proteine des Superkomplexes einherging. Es sind weiterführende Untersuchungen nötig, um dieses Ergebnis zu verifizieren und mögliche Mechanismen aufzudecken. Eine erhöhte Superkomplexaktivität wäre therapeutisch von Nutzen, da so der erhöhte Energiebedarf besser gedeckt werden könnte.

In primären mesenzephalen Zellen führte die Inkubation mit 9-Methyl-BC auch zur Herunterregulierung von Faktoren, die in inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielen. Diese Faktoren wurden im *in vivo* Experiment nicht untersucht, da wir dabei auf neurotrophe Faktoren fokussiert haben. Eine antiinflammatorische Wirkung wäre für eine erfolgreiche Therapie ein weiterer Vorteil, da im Prozess der Neurodegeneration inflammatorische Prozesse das Fortschreiten der Degeneration beschleunigen.

Zusammengenommen zeigt 9-Methyl-BC eine einzigartige Kombination an Wirkungen, die an verschiedenen Stellgliedern des neurodegenerativen Prozesses ansetzen und somit einen mehrschichtigen neuroprotektiven und neuroregenerativen Prozess in Gang setzt.

5. Zusammenfassung

Dopamin wurde als eigenständiger Neurotransmitter in den 50er Jahren des vorigen Jahrhunderts entdeckt. Nachfolgend konnten wesentliche Populationen von dopaminergen Neuronen lokalisiert werden. Die dopaminergen Neurone des ventralen Tegmentums projizieren zu den limbischen Regionen des ventralen Striatums und zum präfrontalen Cortex. Sie stellen einen wesentlichen Bestandteil des Belohnungssystems dar und sind bedeutend für die Motivation und Aufmerksamkeit. Die Neurone der Substantia nigra projizieren zum dorsalen Striatum und kontrollieren insbesondere die Motorik. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Funktion führen auch Störungen in den distinkten Regionen zu unterschiedlichen Symptomen.

Störungen der mesolimbocorticalen dopaminergen Neurone werden mit Abhängigkeits-erkrankungen in Verbindung gebracht. Tierexperimente und Untersuchungen an Alkohol-abhängigen weisen auf eine reduzierte dopaminerge Neurotransmission in diesen Regionen hin. Dies kann sowohl Ursache, als auch Konsequenz eines verstärkten Alkoholkonsums sein. In der Entwicklung befindliche Neurone sind gegenüber schädigenden Einflüssen besonders vulnerabel. In der humanen Neuroblastomzelllinie untersuchten wir den Einfluss chronischer Ethanolexposition auf die retinsäureinduzierte dopaminerge Differenzierung dieser Zellen. Die Langzeitexposition mit Retinsäure führte zur neuronalen Differenzierung der Zellen mit langen und verzweigten Neuriten. Die Zellen organisierten sich in Clustern, die untereinander über lange und gebündelte Neurite in Kontakt standen. Wir konnten zeigen, dass dieser Prozess mit der Expression des Rafkinaseinhibitorproteins (RKIP) korrelierte, da die Expression dieses Proteins während der Retinsäureinkubation kontinuierlich anstieg. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Überexpression von RKIP zu einer Verstärkung der Differenzierung führt, während die siRNA-vermittelte Herunterregulierung der Expression die neuronale Differenzierung inhibierte. Unter kombinierter Retinsäure/Ethanolexposition war der Anstieg der RKIP-Expression vermindert. Dies ging einher mit dem morphologischen Bild der Zellen, die zwar auch Neuriten ausbildeten, die die Zellen untereinander verbanden, allerdings blieb dieses Netz diffus und es kam nicht zur Ausbildung der Cluster mit ihren gebündelten Neuriten. Die Neuriten waren kürzer und weniger verzweigt. Durch weitere Untersuchungen konnten wir zeigen, dass RKIP die prodifferenzierenden Effekte über Proteinkinase C (PKC) vermittelte extrazelluläre signalregulierte Kinasekaskade (ERK)-Aktivierung und eine Verstärkung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren vermittelt. Diese Befunde dürften für die Pathogenese der Alkoholembryopathie relevant sein.

Außerdem konnten wir hier zum ersten Mal zeigen, dass unter Ethanol vor allem die Expression der kurzen Splicevariante des DRD2 vermindert wird. Dies ist insofern von Bedeutung, da diese Splicevariante vor allem präsynaptisch exprimiert wird und als Autorezeptor für die Regulierung der dopaminergen Neurotransmission wichtig ist. Außerdem war der Dopamingehalt unter Ethanolexposition vermindert. Eine verminderte dopaminerge

Neurotransmission und eine verminderte Autorezeptorfunktion sind prädisponierend für die Entwicklung einer Abhängigkeitserkrankung. Alkohol (und andere Suchstoffe) erhöhen akut die Ausschüttung von Dopamin. Dies wird allgemein als belohnend empfunden, aber besonders dann, wenn der dopaminerge Tonus vorher besonders niedrig war. Über den Autorezeptor wird die Dopaminausschüttung normalerweise herunterreguliert. Ist diese Funktion jedoch gestört, hält die Dopaminausschüttung länger an. Damit erhöht sich das Risiko für die Entwicklung einer Abhängigkeitserkrankung.

Eine weitere Substanz, die dopaminerge Neurone schädigt, ist das MPP⁺. Dieses gelangt über den Dopamintransporter bevorzugt in dopaminerge Zellen. Es reichert sich in der Mitochondrienmatrix dieser Zellen an und hemmt dort den Komplex I der Atmungskette. Besonders betroffen davon sind die Neurone der Substantia nigra, da sie eine vergleichsweise hohe DAT-Dichte aufweisen und einen stärkeren Energieverbrauch haben. β -Carboline kommen in vielen getrockneten und gebratenen, stark erhitzten Nahrungsmitteln vor und zeigen eine auffallende Strukturhomologie zu MPP⁺. Wir konnten zeigen, dass 2,9-Dimethyl-BC⁺ in einer Neuroblastomzelllinie zu einer stärkeren ROS-Produktion führt als MPP⁺. In einem Rattenmodell führte die intranigrale Applikation von 2,9-Dimethyl-BC⁺ zu einem signifikanten Verlust TH-positiver Neurone in der Substantia nigra. Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass dieser Verlust auch muskuläre Störungen hervorruft, wie sie als Rigor vom Morbus Parkinson bekannt sind. In einer systematischen Untersuchung von natürlich vorkommenden und synthetischen β -Carbolinen konnten wir klare Strukturmerkmale für eine toxische Wirkung von β -Carbolinen herausarbeiten. Außerdem konnten wir davon Strukturbesonderheiten für mögliche neuroprotektiv wirkende β -Carboline ableiten. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* demonstrierten wir die neuroprotektive und neuroregenerative Wirkung von 9-Methyl-BC und klärten mögliche Mechanismen auf. 9-Methyl-BC führte im Parkinsonmodell zur Normalisierung des Dopamingehalts im Striatum. Das ging einher mit der Aktivierung einer ganzen Reihe von neurotrophen Faktoren, die für die Differenzierung und für das Überleben dopaminerger Neurone wichtig sind. Dazu zählen BDNF, CNTF und ARMETL1. Außerdem brachten wir Precerebellin 1 das erste Mal in Zusammenhang mit dem Überleben dopaminerger Zellen.

Wir haben hier erstmalig eine Substanz identifiziert, die auf mehreren Ebenen in den Prozess der Degeneration dopaminerger Neurone eingreift und *in vivo* neuroregenerative Wirkung zeigt.

Referenzen

- Andressoo JO, Saarma M. 2008. Signalling mechanisms underlying development and maintenance of dopamine neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 18: 297-306.
- Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM. 1995. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*, 374: 450-453.
- Adell A, Myers RD. 1994. Increased alcohol intake in low alcohol drinking rats after chronic infusion of the β -carboline Harman into the hippocampus, *Pharmacol Biochem Behav*, 49: 949.
- Albores R, Neafsey EJ, Drucker G, Fields JZ, Collins MA. 1990. Mitochondrial respiratory inhibition by N-methylated β -carboline derivatives structurally resembling N-methyl-4-phenylpyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9368-9372.
- Banfield MJ, Barker JJ, Perry AC, Brady RL. 1998. Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. *Structure* 6: 1245-1254.
- Bar-Am O, Weinreb O, Amit T, Youdim MBH. 2005. Regulation of Bcl-2 family proteins, neurotrophic factors, and APP processing in the neurorescue activity of propargylamine. *FASEB J*, 19: 1899-1901.
- Bartheld CS v. 2004. Axonal transport and neuronal transcytosis of trophic factors, tracers, and pathogens. *J Neurobiol*, 58: 295-314.
- Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urban GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T. 2007. Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science*, 316: 1212-1216.
- Bice PJ, Liang T, Zhang L, Strother WN, Carr LG. 2008. Drd2 expression in the high alcohol-preferring and low alcohol-preferring mice. *Mamm Genome*, 19(2), 669-676.
- Biglan KM, Schwid S, Eberly S, Blindauer K, Fahn S, Goren T, Kiebertz K, Oakes D, Plumb S, Siderowf A, Stern M, Shoulson I. 2006. Rasagiline improves quality of life in patients with early Parkinson's disease. *Mov Disord*, 21: 616-623.
- Blandini F, Armentero MT, Fancellu R, Blaugrund E, Nappi G. 2004. Neuroprotective effect of rasagiline in a rodent model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 187: 455-459.
- Bonci A, Hopf FW. 2005. The dopamine D2 receptor: New surprise from an old friend. *Neuron*, 47: 8104-8109.
- Bonnet R, Pavlovic S, Lehmann J, Rommelspacher H. 2004. The strong inhibition of triosephosphate isomerase by the natural β -carbolines may explain their neurotoxic actions. *Neuroscience*, 127: 443-453.
- Bonnet R. 2005. Nachweis eines neuen Pathomechanismus der neurodegenerativen Wirkung der β -Carboline. Dissertationsschrift, Charité-Universitätsmedizin, Berlin.
- Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Guffrida Stella AM, Butterfield DA. 2002. Molecular chaperons and their roles in neuronal cell differentiation. *Dev Neurosci*, 24: 1-13.
- Canfield DR, Spealman RD, Kaufman MJ, Madras BK. 1990. Autoradiographic localization of cocaine binding sites by [3 H]CFT ([3 H]WIN 35,428) in the monkey brain. *Synapse*, 6: 189-195.
- Chiuch CC, Miyake H, Peng MT. Role of dopamine autooxidation, hydroxyl radical generation and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced parkinsonism. *Adv Neurol* 1993; 60; 251-258.
- Choi EY, Jeong DW, Park KW, Baik JH. 1999. G protein-mediated mitogen-activated protein kinase activation by two dopamine D2 receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 256, 33-40.
- Chung CY, Seo H, Sonntag KC, Brooks A, Lin L, Isacson O. 2005. Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Hum Mol Genet*, 14: 1709-1725.
- Collins MA, Neafsey EJ, Matsubara K, Cobuzzi RJ, Rollema H. 1992. Indole-N-methylated β -carbolinium ions as potential brain-bioactivated toxins. *Brain Res*, 505:154-160.

- Conner JM, Lauterborn JC, Gall CM. 1998. Anterograde transport of neurotrophin proteins in the CNS – reassessment of the neurotrophic hypothesis. *Rev Neurosci*, 9: 91-103.
- Cookson MR. 2005. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem*, 74: 29-52.
- Corbit KC, Trakul N, Eves EM, Diaz B, Marshall M, Rosner MR. 2003. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem*, 278: 13061-13068.
- Creange A, Barlovatz-Meimon G, Gheradi RK. 1997. Cytokines and peripheral nerve disorders. *Eur Cytokine Netw*, 8: 145-151.
- Davies AM. 1998. Developmental changes in the neurotrophic factor survival requirements of peripheral nervous system neurons. *Prog Brain Res*, 117: 47-56.
- DiStefano PS, Friedman B, Radziejewski C, Alexander C, Boland P, Schick CM, Lindsey RM, Wiegand SJ. 1992. The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron*, 8: 983-993.
- Fillux F, Townsend JJ. 1993. Pre- and postsynaptic neurotoxic effects of dopamine demonstrated by intrastriatal injection. *Exp Neurol*, 119: 79-88.
- Founstedt B. Role of catechol autooxidation in the degeneration of dopamine neurones. 1990. *Acta Neurol Scand*, 129: 12-14.
- Gearhart DA, Neafsey EJ, Collins MA. 1997. Characterization of brain β -carboline-2-N-methyltransferase, an enzyme that may play a role in idiopathic Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 22 (2): 113-121
- Gearhart DA, Collins MA, Lee JM, Neafsey EJ. 2000. Increased β -carboline 9-N-methyltransferase activity in the frontal cortex in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 7:210–211.
- Gearhart DA, Neafsey EJ, Collins MA. 2002. Phenylethanolamine N-methyltransferase has β -carboline 2N-methyltransferase activity: hypothetical relevance to Parkinson's disease. *Neurochem Int*, 40: 611–620.
- George AJ, Holsinger RM, McLean CA, Tan SS, Scott HS, Cardamone T, Cappai R, Masters CL, Li QX. 2006. Decreased phosphatidylethanolamine binding protein expression correlates with A β accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27: 614–623.
- Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P. 2002. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med*, 9: 589-595.
- Goodlett CR, Thomas J. 1999. Temporal windows of vulnerability within the third trimester equivalent: Why "knowing when" matters, in *Alcohol: Effects on Brain and Development* (Hannigan J ed): 59–91.
- Greene JG, Dingledine R, Greenamyre JT. 2005. Gene expression profiling of rat midbrain dopamine neurons: implications for selective vulnerability in parkinsonism. *Neurobiol Dis*, 18: 19-31.
- Greube A, Rommelspacher H. 2003. Isolation and identification of two [3 H]norharman – [3 H]beta-carboline-binding proteins from rat liver. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 784(1): 155-168.
- Hannigan JH, Blanchard BA, Horner MP, Riley EP, Pilati ML. 1990. Apomorphine-induced motor behavior in rats exposed prenatally to alcohol. *Neurotoxicol Teratol*, 12: 79-84.
- Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morse B, Persidsky Y. 2008. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 45: 1542-1550.
- Harper C. 1998. The neuropathology of alcohol-specific brain damage, or does alcohol damage the brain? *J Neuropathol Exp Neurol*, 57: 101-110.
- Hauser MA, Li YJ, Xu H, Noureddine MA, Shao YS, Gullans SR, et al. 2005. Expression profiling of substantia nigra in Parkinson disease, progressive supranuclear palsy, and frontotemporal dementia with parkinsonism. *Arch Neurol*, 62: 917-921.
- Hartnick CJ, Staecker H, Malgrange B, Lefebvre PP, Liu W, Moonen G, Van de Water TR. 1996. Neurotrophic effects of BDNF and CNTF, alone and in combination, on postnatal day 5 rat acoustic ganglion neurons. *J Neurobiol*, 30: 246-254.
- Heinz A, Siessmeier T, Wrase J, Hermann D, Klein S, Grüsser SM, Flor H, Braus DF, Buchholz HG, Gründer G, Schreckenberger M, Smolka MN, Rösch F, Mann K, Bartenstein

- P. 2004. Correlation between dopamine D(2) receptors in the ventral striatum and central processing of alcohol cues and craving. *Am J Psychiatry*, 161: 1783-1789.
- Heinz A, Siessmeier T, Wrase J, Buchholz HG, Grunder G, Kumakura Y, Cumming P, Braus DF, Buchholz HG, Gründer G, Schreckenberger M, Smolka MN, Rösch F, Mann K, Bartenstein P. 2005. Correlation of alcohol craving with striatal dopamine synthesis capacity and D2/3 receptor availability: a combined [¹⁸F]DOPA and [¹⁸F]DMFP PET study in detoxified alcoholic patients. *Am J Psychiatry*, 162: 1515-1520.
- Herraiz T, Chaparro C. 2005. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: β -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 326: 378–386.
- Herraiz T. 2007. Identification and occurrence of β -carboline alkaloids in raisins and inhibition of monoamine oxidase (MAO). *J of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8534-8540.
- Hipolito L, Sanchez-Catalan MJ, Granero L, Polache A. 2009. Local salsolinol modulates dopamine extracellular levels from rat nucleus accumbens: shell/core differences. *Neurochemistry International*, 55: 187-192.
- Kaplan DR, Matsumoto K, Lucarelli E, Thiele CJ. 1993. Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. *Eukaryotic Signal Transduction Group. Neuron*, 11: 321-331.
- Keller ET, Fu Z, Brennan M. 2004. The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem Pharmacol*, 68: 1049–1053.
- Khan ZU, Mrzljak I, Gutierrez A, de la Calle A, Goldman-Rakic P. 1998. Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl. Acad Sci*, 95, 7731-7736.
- Kienast T, Hariri AR, Schlagenhaut F, Wrase J, Sterzer P, Buchholz HG, Smolka MN, Gründer G, Cumming P, Kumakura Y, Bartenstein P, Dolan RJ, Heinz A. 2008. Dopamine in amygdala gates limbic processing of aversive stimuli in humans. *Nat Neurosci*, 11(12):1381-1382.
- Kim SY, Choi KC, Chang MS, Kim MH, Kim SY, Na YS, Lee JE, Jin BK, Lee BH, Baik JH. 2006. The dopamine D2 receptor regulates the development of dopaminergic neurons via extracellular signal-regulated kinase and Nurr1 activation. *J Neurosci*, 26(17): 4567-4576.
- Kinameri E, Matsuoka I. 2003. Autocrine action of BMP2 regulates expression of GDNF-mRNA in sciatic Schwann cells. *Mol Brain Res*, 117: 221-227.
- King ML, Murphy LL, 2007. American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) extract alters mitogen-activated protein kinase cell signalling and inhibits proliferation of MCF-7 cells. *J Exp Ther Oncol*, 6: 147–155.
- Klysik J, Theroux SJ, Sedivy JM, Moffit JS, Boekelheide K. 2008. Signaling crossroads: the function of Raf kinase inhibitory protein in cancer, the central nervous system and reproduction. *Cell Signal*, 20: 1–9.
- Kraschewski A, Reese J, Anghelescu I, Winterer G, Schmidt LG, Gallinat J, Finckh U, Rommelspacher H, Wernicke C. 2009. Association of the dopamine D2 receptor gene with alcohol dependence: haplotypes and subgroups of alcoholics as key factors for understanding receptor function. *Pharmacogen Genom*, 19 (7): 513-527.
- Kuhn W, Müller Th, Grosse H, Dierks T, Rommelspacher H. 1995. Plasma levels of the beta-carbolines harman and norharman in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*, 92: 451–454.
- Kuhn W, Müller Th, Grosse H, Rommelspacher H. 1996. Elevated levels of harman and norharman in cerebrospinal fluid of Parkinsonian patients. *J Neural Transm*, 103:1435–1440.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meprobamate analog synthesis. *Science (NY)*, 219: 979-980.
- Levi-Montalcini R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 237: 1154-1162.
- Lindholm P, Voutilainen M H, Lauren J, Peranen J, Leppanen V M, Andressoo J O, Lindahl M et al. 2007. Novel neurotrophic factor CDFN protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature*, 448: 73-77.
- Madras BK, Spealman RD, Fahey MA, Neumeyer JL, Saha JK, Milius RA. 1989. Cocaine receptors labeled by [³H]2 β -carbomethoxy-3 β -(4-fluorophenyl)tropane. *Mol Pharmacol*, 36: 518-524.

- Maier S, Chen W-J A, West J. 1996. Prenatal Binge-like Alcohol exposure alters neurochemical profiles in fetal rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 55 (4): 521-529.
- Matsubara K, Collins MA, Akane A, Ikebuchi J, Neafsey EJ, Kagawa M, Shiono H. 1993. Potential bioactivated neurotoxicants, N-methylated β -carbolinium ions are present in human brain. *Brain Research*, 610: 90-96.
- Matsubara K, Kobayashi S, Kobayashi Y, Yamashita K, Koide H, Hatta M, Iwamoto K, Tanaka O, Kimura K. 1995. β -Carbolinium cations, endogenous MPP⁺ analogs, in the lumbar cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Neurology*, 45: 2240-2245.
- Matsubara K, Gonda T, Sawada H, Uezono T, Kobayashi Y, Kawamura T, Ohtaki K, Kimura K, Akaike A. 1998. Endogenously occurring β -carboline induces Parkinsonism in nonprimate animals: a possible causative protoxin in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurochem*, 70:727-735.
- May T, Rommelspacher H, Pawlik M. 1991a. [³H]harman binding experiments. I: A reversible and selective radioligand for monoamine oxidase subtype A in the CNS of the rat. *J Neurochem*, 56: 490-499.
- May T, Pawlik M, Rommelspacher H. 1991b. [³H]harman binding experiments. II: Regional and subcellular distribution of specific [³H]harman binding and monoamine oxidase subtypes A and B activity in marmoset and rat. *J Neurochem*, 56: 500-508
- May T, Strauss S, Rommelspacher H. 1990. [³H]Harman labels selectively and with high affinity the active site of monoamine oxidase (EC 1.4.3.4.) subtype A (MAO-A) in rats, marmoset and pig. *J Neural Transm Suppl*, 1990: 93-102.
- Mercuri NB, Saiardi A, Bonci A, Picetti R, Calabresi P, Bernardi G, Borrelli E. 1997. Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience*, 79, 323-327.
- Mufson EJ, Kroin JS, Sendera TJ, Sobreviela T. 1999. Distribution and retrograde transport of trophic factors in the central nervous system: functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol*, 57: 451-484.
- Myers WD, Mackenzie L, Ng KT, Singer G, Smythe GA, Duncan MW. 1985. Salsolinol and dopamine in rat medial basal hypothalamus after chronic ethanol exposure. *Life Sci*, 36: 309-314.
- Nader MA, Czoty PW, Gould RW, Riddick NV. 2008. Positron emission tomography imaging studies of dopamine receptors in primate models of addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363(1507): 3223-3232.
- Neafsey EJ, Albores R, Gearhart D, Kindel G, Raikoff K, Tamayo F, Collins MA. 1995. Methyl- β -carbolinium analogs of MPP⁺ cause nigrostriatal toxicity after substantia nigra injections in rats. *Brain Res*. 675:279-288.
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. 1985. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci*, 36: 2503-2508.
- Nosheny RL, Ahmed F, Yakovlev A, Meyer EM, Ren K, Tessarollo L, Mocchetti I. 2007. Brain-derived neurotrophic factor prevents the nigrostriatal degeneration induced by human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 in vivo. *Eur J Neurosci*, 25: 2275-2284.
- Oomizu S, Boyadjieva N, Sarkar DK. 2003. Ethanol and estradiol modulate alternative splicing of dopamine D2 receptor messenger RNA and abolish the inhibitory action of bromocriptine on prolactin release from the pituitary gland. *Alcohol Clin Exp Res*, 27, 975-980.
- Oppenheim RW. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev. Neurosci*, 14: 453-501.
- Parkinson Study Group. 2004. A controlled, randomized, delayed-start study of rasagiline in early Parkinson disease. *Arch Neurol*, 61: 561-566.
- Parson OA. 1998. Neurocognitive deficits in alcoholics and social drinkers: a continuum? *Alcohol Clin Exp Res*, 22: 954-961.
- Potula T, Haorah J, Knipe B, Leibhart J, Chrastil J, Heilmann D et al. 2006. Alcohol abuse enhances neuroinflammation and impairs immune response in an animal model of human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol*, 168: 1335-1344.

- Repo E, Kuikka JT, Bergström KA, Karhu J, Hiltunen J, Tiihonen J. 1999. Dopamine transporter and D2-receptor density in late-onset alcoholism. *Psychopharmacology (Berl)*, 147(3): 314-318.
- Randall S, Hannigan JH. 1999. In utero alcohol and postnatal methylphenidate locomotion and dopamine receptors. *Neurotoxicol Teratol*, 21, 587-593.
- Reyman D, Hallwass F, da Cruz Concales SM, Camacho JJ. 2007. Coupled hydrogen-bonding interactions between b-carboline derivatives and acetic acid. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45: 830-834.
- Rommelspacher H, Strauss S, Lindemann J. 1980. Excretion of tetrahydroharmaline and Harmaline into the urine of man and rat after a load with ethanol. *FEBS letters*, 109 (2): 209-212.
- Rommelspacher H, Büchau C, Weiss JJ. 1987. Harman induces preference for ethanol in rats: Is the effect specific for ethanol? *Pharmacol Biochem Behav*, 26: 749-755.
- Rommelspacher H, Damm H, Lutter S, Schmidt LG, Otto M, Sachs-Ericsson N, Schmidt G. 1990. Harman (1-methyl-beta-carboline) in blood plasma and erythrocytes of nonalcoholics following ethanol loading. *Alcohol*, 7:27-31.
- Rommelspacher H, Schmidt LG, May T. 1991. Plasma norharman (betacarboline) levels are elevated in chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, 15:553-559.
- Rommelspacher H, May T, Salewski B. 1994. Harman (1-methyl- β -carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. *Eur J Pharmacol*, 252: 51-59.
- Rommelspacher H, Meier-Henco M, Smolka M, Kloft C. 2002. The levels of norharman are high enough after smoking to affect monoamine oxidase B in platelets. *European J of Pharmacology*,
- Sällström Baum S, Hill R, Rommelspacher H. 1995. Norharman-induced changes of extracellular concentrations of dopamine in the nucleus accumbens of rats. *Life Sciences*, 56 (20): 1715-1720.
- Sällström Baum S, Hill R, Rommelspacher H. 1996. Harman-induced changes of extracellular concentrations of neurotransmitters in the nucleus accumbens of rats. *European J of Pharmacology*, 314: 75-82
- Sällström Baum S, Hill R, Klianmaa K, Rommelspacher H. 1999. Effect of ethanol on (R)- and (S)-salsolinol, salsolinol, and THP in the nucleus accumbens of AA and ANA rats. *Alcohol*, 18(2-3): 165-169.
- Samad TA, Krezel W, Chambon P, Borelli E. 1997. Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: Activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 14349-14354.
- Schmidt LG, Dettling M, Graef KJ, Heinz A, Kuhn S, Podschus J, Rommelspacher H. 1996. Reduced dopaminergic function in alcoholics is related to severe dependence. *Biol Psychiatry*, 39(3): 193-198.
- Schuijter MM, Heilmeyer U, Boettcher A, Ugocsai P, Bosserhoff AK, Schmitz G, Langmann T. 2006. Induction of Raf kinase inhibitor protein contributes to macrophage differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 342: 1083-1087.
- Schulz JB. 2008. Update on the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol*, 255 [Suppl 5]: 3-7.
- Shen RY, Hannigan JH, Kapatoss G. 1999. Prenatal ethanol reduces the activity of adult midbrain dopaminergic neurons *Alcohol Clin Exp Res*, 23: 1801-1807.
- Shetty AK, Burrows RC, Phillips DE. 1999. Alterations in neuronal development in the substantia nigra pars compacta following in utero ethanol exposure: immunohistochemical and golgi studies. *Neuroscience*, 52, 311-322.
- Sendtner M, Pei G, Beck M, Schweizer U, Wiese S. 2000. Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res*, 301: 71-84.
- Siegel SG, Patton B, English AW. 2000. Ciliary neurotrophic factor is required for motoneurons sprouting. *Exp Neurol*, 166: 205-212.
- Slevin JT, Gerhardt GA, Smith CD, Gash DM, Kryskio R, Young B. 2005. Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputaminial infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosurg*, 102: 216-222.

- Stephens DN, Schneider HH, Kehr W, Andrews JS, Rettig KJ, Turski L, Schmiechen R, Turner JD, Jensen LH, Petersen EN, Honore T, Hansen B. 1990. Abercanil, a metabolically stable, anxiolytic β -carboline acting at benzodiazepine receptors. *J of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, 253 (1): 334-343.
- Stohler R, Rommelspacher H, Ladewig D. 1995. The role of beta-carbolines (Harman / norharman) in heroin addicts. *Eur J. Psychiat*, 10: 56-58.
- Storch A, Hwang YI, Gearhart DA, Beach JW, Neafsey EJ, Collins MA, Schwarz J. 2004. Dopamine transporter-mediated cytotoxicity of beta-carbolinium derivatives related to Parkinson's disease: relationship to transporter-dependent uptake. *J Neurosci*, 24(3): 685-694.
- Susilo R, Rommelspacher H. 1987. Formation of a betacarboline (1,2,3,4-tetrahydro-1-methyl-beta-carboline-1-carboxylic acid) following intracerebroventricular injection of tryptamine and pyruvic acid. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 335: 70-76.
- Szot P, White SS, Veith RC, Rasmussen DD. 1999. Reduced gene expression for dopamine biosynthesis and transport in midbrain neurons of adult male rats exposed prenatally to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 23(10): 1643-1649.
- Tabakman R, Lech S, Lazarovici P. 2004. Neuroprotection by monoamine oxidase B inhibitors: a therapeutic strategy for Parkinson's disease? *Bioessays*, 26: 80-90.
- Tanaka M, Sotomatsu A, Kanai H, Hirai S. 1991. DOPA and dopamine cause cultured neuronal death in the presence of iron. *J Neurochem*, 57: 198-203.
- Tajiri M, Tohdoh N, Ojika K. 1996. Neuronal expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP)-precursor mRNA in rat brain. *J Neurosci Res*, 45: 202-215.
- Thanos PK, Volkow ND, Freimuth P, Umegaki H, Ikari H, Roth G, Ingram DK, Hitzemann R. 2001. Overexpression of dopamine D2 receptors reduces alcohol self-administration. *J Neurochem*, 78(5): 1094-1103.
- Thanos PK, Taintor NB, Rivera SN, Umegaki H, Ikari H, Roth G, Ingram DK, Hitzemann R, Fowler JS, Gately SJ, Wang GJ, Volkow ND. 2004. DRD2 gene transfer into the nucleus accumbens core of the alcohol preferring and nonpreferring rats attenuates alcohol drinking. *Alcohol Clin Exp Res*, 28(5): 720-728.
- Thanos PK, Rivera SN, Weaver K, Grandy DK, Rubinstein M, Umegaki H, Wang GJ, Hitzemann R, Volkow ND. 2005. Dopamine D2R DNA transfer in dopamine D2 receptor-deficient mice: effects on ethanol drinking. *Life Sci*, 77(2): 130-139.
- Thoenen H, Bandtlow C, Heumann R. 1987. The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 109: 145-178.
- Todd RD. 1992. Neural development is regulated by classical neurotransmitters: dopamine D2 receptor stimulation enhances neurite outgrowth. *Biol Psychiatry*, 31(8): 794-807.
- Tupala E, Hall H, Mantere T, Rasanen P, Sarkioja T, Tiihonen J. 2003. Dopamine receptors and transporters in the brain reward circuits of type 1 and 2 alcoholics measured with human whole hemisphere autoradiography. *Neuroimage*, 19: 145-155.
- Uhl GR, Walther D, Mach D, Faucheux B, Javoy-Agid F. 1994. Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. *Ann Neurol*, 35: 494-498.
- Uhl GR. 1998. Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 43: 555-560.
- Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borelli E. 2000. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*, 408: 199-203.
- Vanyukov MM, Maher BS, Devlin B, Tarter RE, Kirillova GP, Yu LM, Ferrell RE. 2004. Haplotypes of the Monoamine Oxidase genes and the risk for substance use disorder. *American Journal of Med Genet Part B (Neuropsych Genet)*, 125B: 120-125.
- Wodarz N, Wiesbek GA, Rommelspacher H, Riederer P, Böning J. 1996. Excretion of β -carbolines harmaline and norharman in 24-hour urine of chronic alcoholics during withdrawal and controlled abstinence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 20(4), 706-710.
- Wong DF, Yung B, Dannals RF, et al. 1993. In vivo imaging of baboon and human dopamine transporters by position emission tomography using [^{11}C]WIN 35,428. *Synapse*, 9: 43-49.

- Yamazaki T, Nakano H, Hayakari M, Tanaka M, Mayama J, Tsuchida S. 2004. Differentiation induction of human keratinocytes by phosphatidylethanolamine-binding protein. *J Biol Chem*, 279: 32191–32195
- Youdim MB, Wadia A, Tatton W, Weinstock M. 2001. The anti-Parkinson drug rasagiline and its cholinesterase inhibitor derivatives exert neuroprotection unrelated to MAO inhibition in cell culture and in vivo. *Ann N Y Acad Sci*, 939: 450-458.
- Youdim MBH, Bar-Am O, Yogev-Falach M, Weinreb O, Maruyama W, Naoi M, Amit T. 2005. Rasagiline: neurodegeneratin, neruoprotection, and mitochondrial permeability transition. *J Neurosci Res*, 79: 172-179.
- Zeigler DW, Wang CC, Yoast RA, Dickinson BD, McCaffree Ma, Robinowitz CB, Sterling M. 2005. The neurocognitive effects of alcohol on adolescents and college students. *Prev Med*, 40: 23-32.
- Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD. 2005. Functions and mechanisms of retrograd neruotrophin signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 6: 615-625.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich auf dem Weg zur Habilitation begleitet und unterstützt haben. Dies gilt in erster Linie meinen Kollegen Herrn Prof. Dr. med. Hans Rommelspacher und Herrn Dr. med. Gert Schulze. Frau Anke Sänger, Frau Sabine Strauss, Frau Regina Hill und Frau Christa Fähndrich danke ich für die exzellente technische Assistenz und die langjähriges Zusammenarbeit unter zum Teil schwierigen Bedingungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jochen Lehman, Herrn Dr. Christoph Enzensperger und Frau Dr. Yvonne Rook für die Synthesen der zahlreichen β -Carbolinderivate und für die interessanten Diskussionen zu Struktureigenschaften verschiedener Derivate. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Dencher und Frau Monika Frenzel danke ich für die Kooperation zur Untersuchung der Funktion der Atmungskette und Frau PD Dr. rer. nat. Gabriele Gille für die Unterstützung bei der Array-RT-PCR-Untersuchung und die stimulierende Zusammenarbeit.

Den Doktoranden Adrian Kraschewski, Jörn Reese und Julian Hellmann danke ich für ihre Einsatzbereitschaft.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. Andreas Heinz und Herrn Prof. Dr. med. Rainer Hellweg für die freundliche Aufnahme in ihrer Klinik.

An Hannes vielen Dank für seine Geduld und die Erstellung der Kalottenmodelle. Vielen Dank auch an meine Eltern, die mich in vielerlei Hinsicht unterstützen.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

15.04.2010

.....
Datum



.....
Unterschrift